

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

**CHARAKTERISIERUNG DES PROMOTORS DES GENS FÜR DAS LYSOSOMALE INTEGRALE  
MEMBRANPROTEIN TYP-2 (LIMP-2/SCARB2)**

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

vorgelegt von  
**SOPHIA CHARLOTTE WESSELER**  
aus Kiel

Kiel 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Paul J. Saftig, Biochemisches Institut
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Bleich, Physiologisches Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

Gez.:

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>3</b>
1.1 Das Lysosom und seine pathophysiologische Rolle .....	3
1.1.1 Das Lysosom.....	3
1.1.2 Morbus Gaucher .....	4
1.1.3 Das Parkinson-Syndrom .....	5
1.1.4 Die physiologische Rolle der $\beta$ -Glukocerebrosidase ( $\beta$ -GC) .....	6
1.1.5 Das Lysosomale Integrale Membranprotein Typ-2 (LIMP-2).....	8
1.1.6 Erhalt der $\beta$ -GC-Funktion als therapeutischer Ansatz .....	8
1.2 Aspekte der Genregulation.....	10
1.2.1 Promotoren.....	10
1.2.2 Transkriptionsfaktoren .....	10
1.3 Saccharose-bedingte Effekte auf die Zelle .....	12
<b>2 Fragestellung</b> .....	<b>14</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
3.1 Geräte .....	15
3.2 Labormaterialien .....	17
3.3 Chemikalien, Enzyme, Reagenzien, Kits .....	18
3.4 Puffer und Lösungen.....	22
3.5 Antikörper.....	26
3.5.1 Primäre Antikörper .....	26
3.5.2 Sekundäre Antikörper .....	27
3.6 Zellkultur.....	28
3.6.1 Zelllinien .....	28
3.6.2 Kulturmedien .....	29

3.6.3 Zellen <i>splitten</i> .....	31
3.6.4 Einfrieren und Auftauen, Mycoplasmen-PCR.....	31
3.6.5 Transiente Transfektion.....	32
3.6.6 Stabile Transfektion.....	33
3.6.7 <i>Small interfering</i> Ribonukleinsäure (siRNA) Transfektion.....	33
3.7 Klonierung.....	34
3.7.1 Oligonukleotide.....	34
3.7.2 Vektoren.....	35
3.7.3 Plasmide.....	36
3.7.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
3.7.5 Fusions-PCR.....	37
3.7.6 Gelelektrophorese und Eluation.....	37
3.7.7 Restriktionsverdau.....	38
3.7.8 Ligation.....	38
3.7.9 Transfektion von <i>E. coli</i> .....	38
3.7.10 Plasmidaufreinigung und -amplifikation.....	39
3.7.11 Sequenzierung.....	39
3.8 Luziferase-Assay.....	40
3.8.1 Gaussia-Luziferase-Assay.....	40
3.8.2 Renilla-Luziferase-Assay.....	40
3.9 <i>Western blot</i> .....	41
3.9.1 Zellernte und Aufbereitung.....	41
3.9.2 Gelelektrophorese.....	41
3.9.3 Blottingverfahren.....	42
3.9.4 Detektion.....	42
3.9.5 EndoH- und PNGase F-Verdau.....	42

3.9.6 Strippen.....	43
3.10 Enzym-Aktivitäts-Assays .....	43
3.10.1 $\beta$ -GC-Aktivitäts-Assay.....	43
3.10.2 $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivitäts-Assay.....	44
3.11 Immunfluoreszenz .....	44
3.11.1 Färbung .....	44
3.11.2 Transferrin-Aufnahme-Test .....	45
3.11.3 Lyotracker-Färbung .....	45
3.12 Computerbasierte Methoden.....	46
3.12.1 Software und Statistik.....	46
3.12.2 <i>In silico</i> Analyse des Promotors .....	47
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
4.1 Grundlegende Charakterisierung des humanen <i>SCARB2</i> -Promotors .....	48
4.1.1 <i>In silico</i> Analyse des <i>SCARB2</i> -Promotors.....	48
4.1.2 Detektion der Promotor-Aktivität von Deletionskonstrukten des <i>SCARB2</i> -Promotors .....	50
4.2 Untersuchung ausgewählter Substanzen auf ihr Aktivierungspotenzial für den humanen <i>SCARB2</i> -Promotor .....	53
4.2.1 Auswahl der zu untersuchenden Substanzen .....	53
4.2.2 Bestimmung des Aktivierungspotenzials der ausgewählten Substanzen mittels Luziferase-Assay.....	56
4.3 <i>Screening</i> von 20 Substanzen einer Compound Library auf ihr Aktivierungspotenzial für den humanen <i>SCARB2</i> -Promotor .....	58
4.4 Der Einfluss von Saccharose auf die Zelle .....	60
4.4.1 Morphologische Veränderungen in Zellen nach Saccharose-Einwirkung .....	60
4.4.2 Abhängigkeit des Saccharose-Effekts auf die $\beta$ -GC-Aktivität von der Einwirkungszeit und -konzentration .....	62

4.4.3 Der Einfluss von Saccharose auf die Lokalisation von $\beta$ -GC in HEK-Zellen.....	63
4.4.4 Der Einfluss von Saccharose auf die Lokalisation von $\beta$ -GC in HeLa-Zellen nach LIMP-2- <i>knock-down</i> .....	65
4.4.5 Der Einfluss von Saccharose auf die Lokalisation von $\beta$ -GC in MEF-Zellen nach LIMP-2- <i>knock-out</i> .....	66
4.4.6 Bestimmung der $\beta$ -GC-Aktivität in LIMP-2-defizienten Zellen nach Saccharose-Einwirkung.....	69
4.4.7 Erste Untersuchungen des von LIMP-2 unabhängigen Transportmechanismus für $\beta$ -GC mit den Reagenzien Bafilomycin und Dynasore .....	71
4.4.8 Die Wirkung von Saccharose auf $\alpha$ -Synuclein-Aggregate sowie auf Cathepsin D in N2A-Zellen.....	74
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>76</b>
5.1 Charakterisierung und Stimulation des <i>SCARB2</i> -Promotors .....	76
5.2 Der Einfluss von Saccharose auf LIMP-2, $\beta$ -GC und $\alpha$ -Synuclein .....	81
5.3 Therapeutische Relevanz der Ergebnisse .....	87
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>89</b>
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>91</b>
<b>8 Anhang .....</b>	<b>98</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>108</b>
<b>Publikationen .....</b>	<b>109</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>110</b>

## Abkürzungsverzeichnis

---

AMRF	<i>Action Myoclonus-Renal Failure Syndrome</i>
β-GC	β-Glukocerebrosidase
BCA Protein Assay	<i>Bicinchoninic Acid</i> (Bicinchoninsäure) Protein Assay
bp	Basenpaar
CLEAR-Netzwerk	<i>Coordinated Lysosomal Expression And Regulation</i> Netzwerk
COS7	<i>CV-1-in-Origin-carrying-SV40-Zellen</i>
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding Protein</i>
DLB	Lewy-Körper-Demenz (engl. <i>Dementia with Lewy bodies</i> )
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
cDNS	<i>complementary</i> DNS
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EBSS	<i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
ECL	Elektrochemilumineszenz-Reagenz
EndoH	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fetales Kälberserum)
<i>GBA-1</i>	β-Glukocerebrosidase-Gen
h	human
HEK	<i>Human Endothelial Kidneycells</i> (Humane endotheliale Nierenzellen)
HeLa	Humane Zellen von Henrietta Lacks
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IF	Immunfluoreszenz
KO	<i>knock-out</i>
LAMP-1 / LAMP-2	Lysosomal-assoziiertes Membranprotein Typ-1 / Typ-2
LB-Medium	<i>Lysogeny-Broth-Medium</i>
LIMP-1 / LIMP-2	Lysosomales Integrales Membranprotein Typ-1 / Typ-2

---

m	murin
M6PR	Mannose-6-phosphat-Rezeptor
MEF	<i>Murine Endothelial Fibroblasts</i> (Murine endotheliale Fibroblasten)
mTOR	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
N2A	Neuro-2a-Zellen
ns	nicht signifikant
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PNGase F	Peptid-N-Glykosidase F
q-PCR	<i>real-time</i> quantitative PCR
RCF	<i>Relative Centrifugal Force</i> (relative Zentrifugalbeschleunigung)
RNS	Ribonukleinsäure
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (RNS)
rpm	<i>Revolutions Per Minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SCARB2	LIMP-2-Gen
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> (Standardfehler des Mittelwerts)
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i> (RNS)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
TAE-Puffer	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat- Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS/T	<i>Tris Buffered Saline/Tween</i> (trisgepufferte Salzlösung mit Polysorbat)
TFEB	Transkriptionsfaktor EB
UV	Ultraviolettes Licht
WB	<i>Western blot</i>
WT	Wildtyp

Anmerkung: Namen von Genen werden im Folgenden *kursiv*, Namen von Proteinen senkrecht geschrieben.



# **1 Einleitung**

Dem Lysosomalen Integralen Membranprotein Typ-2 (LIMP-2) wird zunehmend eine wichtige Rolle in der Pathogenese verschiedener Krankheiten wie Morbus Gaucher und dem Parkinson-Syndrom zugesprochen. Um die Expression von LIMP-2 *in vivo* regulieren zu können, sollen in dieser Arbeit Erkenntnisse zur Charakterisierung und Stimulation des Promotors des Gens für LIMP-2 (*SCARB2*) gewonnen werden.

Zum Verständnis der Funktion von LIMP-2 sowie der Regulationsmechanismen, die dieses Protein betreffen, werden in dieser Einleitung zunächst die bekannten Grundlagen erläutert.

## **1.1 Das Lysosom und seine pathophysiologische Rolle**

### **1.1.1 Das Lysosom**

Die eukaryotische Zelle ist in verschiedene Kompartimente unterteilt, welche für den Erhalt und die Funktionalität der Zelle unabdingbar sind. Zu den größten Kompartimenten gehören der Zellkern, welcher die Erbsubstanz enthält, die Mitochondrien, welche für den Energiehaushalt zuständig sind, das endoplasmatische Retikulum (ER) und der Golgi-Apparat, welche die Prozessierung und Sortierung der zellulären Proteine ausführen, sowie die Lysosomen.

Lysosomen sind runde bis tubuläre Organellen, welche von einer 7-10 nm dicken Membran umgeben sind (Saftig *et al.* 2010). Sie haben eine durchschnittliche Größe von 0,5 µm, welche aber stark variieren kann (Novikoff *et al.* 1956). Erstmals wurden sie im Jahre 1955 von de Duve beschrieben (Appelmans *et al.* 1955). Die Aufgabe der Lysosomen ist vornehmlich der Abbau von Material, das aus der Zelle selbst stammt oder durch Endozytose aufgenommen wurde. Im Inneren des Lysosoms herrscht ein saures Milieu von etwa pH 4,5-5 (Saftig und Klumperman 2009), in dem über 50 saure Hydrolasen aktiv sind (Bainton 1981). Zum Schutz vor diesem niedrigen pH-Wert sind die lysosomalen Proteine zumeist stark glykosyliert. Diese Zuckerreste bewahren sie vor der Degradierung (Granger *et al.* 1990, Fukuda 1991).

Makromoleküle der Zelle, welche in das Lysosom gelangen sollen, werden über das ER, den Golgi-Apparat und Endosomen dorthin transportiert. Ein gut erforschter

Transportmechanismus ist der Mannose-6-phosphat-Weg. Hierbei werden Proteine, die einen Mannose-6-phosphatrest tragen, vom membranständigen Mannose-6-phosphat-Rezeptor im trans-Golgi-Netzwerk gebunden und in ein Vesikel abgeschnürt. Dieses fusioniert anschließend mit einem Endosom, in dem sich das transportierte Protein aufgrund des sauren pH-Wertes wieder von dem Rezeptor löst. Über späte Endosomen gelangt das Protein schlussendlich zum Lysosom (Kornfeld 1986). Für einige lysosomale Proteine nutzt die Zelle allerdings andere Transportwege. So konnten beispielsweise Reczek *et al.* 2007 zeigen, dass die Hydrolase  $\beta$ -Glukocerebrosidase ( $\beta$ -GC) vom Lysosomalen Integralen Membranprotein Typ-2 (LIMP-2) gebunden und ins Lysosom gebracht wird.

### 1.1.2 Morbus Gaucher

Die häufigste lysosomale Speichererkrankung mit einer weltweiten Prävalenz von 1:75.000 der Lebendgeburten ist Morbus Gaucher (Stirnemann *et al.* 2012). Bei dieser autosomal rezessiv vererbten Erkrankung kommt es durch eine Mutation im Gen der  $\beta$ -GC (*GBA-1*) zu einem Defekt des Enzyms (Brady *et al.* 1965, Beutler 1988), welcher beispielsweise bei der in nicht-jüdischen Patienten häufigsten Mutation L444P in einer Fehlfaltung des Enzyms besteht (Grace *et al.* 1994, Dvir *et al.* 2003, Beutler 2006). Dies führt zu einer Akkumulation von Glukosylceramid, dem Substrat von  $\beta$ -GC (Rosenberg und Chargaff 1958, Gatt 1966). Glukosylceramid oder auch Glukocerebrosid ist ein Glykosphingolipid und ist Bestandteil vieler zellulärer Membranen (Quinn 2014). Infolge eines  $\beta$ -GC-Defekts schwellen die Lysosomen in den betroffenen Zellen an, da sich immer mehr Glukosylceramid in ihnen ansammelt. Es bilden sich aus Makrophagen die typischen Schaumzellen (Gaucher-Zellen) (Beutler 1988).

Es gibt drei verschiedene Verlaufsformen des Morbus Gaucher, welche sich hauptsächlich durch das Erstmanifestationsalter und die Verlaufsgeschwindigkeit unterscheiden. Patienten, die dem Verlaufstyp I zugeordnet werden, leiden unter Splenomegalie, Thrombozytopenie, Knochenarrosionen sowie Schmerzzuständen. Die Verlaufstypen II und III treten bei den Mutationsträgern bereits früher auf und sie haben einen schwerwiegenderen Verlauf mit einer schnelleren Progression. Sie führen außerdem zu neurologischen Symptomen wie Demenz, Psychose, Spastik und generalisierten Anfällen (Beutler und Grabowski 2001). Aber auch im späteren Verlauf des Typ I Morbus Gaucher

konnten parkinsonartige und damit neurologische Symptome beobachtet werden (Neudorfer *et al.* 1996).

Ein modulierender Einfluss wird Mutationen im Gen für LIMP-2 zugeschrieben, welche den Schweregrad der Erkrankung mitbestimmen können (Velayati *et al.* 2011, Gonzalez *et al.* 2014).

Als therapeutisches Konzept für Morbus Gaucher wird derzeit hauptsächlich die Enzymsubstitution mit  $\beta$ -GC eingesetzt, welche allerdings aufgrund der Undurchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für  $\beta$ -GC nicht im zentralen Nervensystem wirksam ist (Altarescu *et al.* 2001). Es gibt weitere Ansätze, in denen die Glukosylceramidsynthese reduziert wird (Aerts *et al.* 2006) oder auf rein symptomatischer Ebene therapiert wird. Mit diesen Optionen ist aber vor allem die Behandlung der neurologischen Komponente nur unzureichend abgedeckt (Charrow und Scott 2015).

### **1.1.3 Das Parkinson-Syndrom**

Auch für das Parkinson-Syndrom wurde eine Verbindung zu Mutationen in *SCARB2* und *GBA-1* beobachtet (Sidransky *et al.* 2009, Do *et al.* 2011). Das Parkinson-Syndrom ist eine degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems, welche mit den typischen Symptomen Bradykinesie, Rigor, Ruhetremor und posturaler Instabilität einhergeht. Im fortgeschrittenen Verlauf der Krankheit kommen des Weiteren neurologische Störungen wie Demenz und Depression als Symptome hinzu, wodurch das Syndrom häufig bereits nach wenigen Jahren in der völligen Unselbständigkeit des Patienten gipfelt (Parkinson 1817, Jankovic 2008). Mit einer Prävalenz von 50-200:100.000 ist sie die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung (Spatola und Wider 2014) und tritt mit steigender Lebenserwartung in unserer Gesellschaft immer häufiger auf (de Rijk *et al.* 1995).

Das Parkinson-Syndrom ist charakterisiert durch den Zelltod Dopamin-produzierender Neuronen in der *Substantia nigra Pars compacta* im Mesencephalon. Pathognomonisch für die Erkrankung sind Akkumulationen von  $\alpha$ -Synuclein und Ubiquitin zu Lewy-Körpern, welche histologisch in verschiedenen Regionen des Gehirns zu finden sind (Davie 2008). Die Ursache der Erkrankung ist nach heutigem Wissensstand nicht eindeutig geklärt. Es gibt das idiopathische Parkinson-Syndrom, welches in den meisten Fällen vorliegt, sowie symptomatische Parkinson-Syndrome beispielsweise nach Trauma oder Intoxikation (Davie

2008). Daneben gibt es aber auch genetische Formen, die durch Mutationen in Genen wie beispielsweise *Parkin* hervorgerufen werden und etwa 10 % der Parkinson Erkrankungen ausmachen (Crosiers *et al.* 2011, Spatola und Wider 2014). Als einer der stärksten genetischen Risikofaktoren wurden außerdem *GBA-1*-Mutationen festgestellt, welche mit einem etwa 5-fach gesteigerten Risiko für das Parkinson-Syndrom und schwerwiegenderen Verläufen der Erkrankung einhergehen (Sidransky *et al.* 2009, Schapira 2015). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Aktivität von  $\beta$ -GC in den Zellen von Parkinson-Patienten reduziert ist (Gegg *et al.* 2012, Wong und Krainc 2016). Obwohl eine gesteigerte Expression von LIMP-2, dem Transporter von  $\beta$ -GC, in den Zellen von Parkinson-Patienten noch umstritten ist (Gegg *et al.* 2012, Rothaug *et al.* 2014), konnte ein statistischer Zusammenhang zwischen Mutationen im LIMP-2-Gen und dem Auftreten des Parkinson-Syndroms gezeigt werden (Do *et al.* 2011, Michelakakis *et al.* 2012).

Therapeutisch wird das Parkinson-Syndrom nur symptomatisch behandelt. Hierbei wird zunächst eine Therapie mit Dopaminvorläufersubstanzen und Dopaminagonisten oder der Wirkungsverstärkung von Dopamin eingesetzt, welche den durch Zellsterben in der *Substantia nigra* induzierten Dopaminmangel ausgleichen soll (Davie 2008). Im Verlauf wird auch die invasive Methode der tiefen Hirnstimulation durchgeführt (Moro und Lang 2006). Trotz allem kann die Progredienz der Erkrankung hierdurch nur verzögert werden und nach jahrelanger Therapie kommt es schlussendlich zu extrem starken Nebenwirkungen und Therapieversagen (Davie 2008).

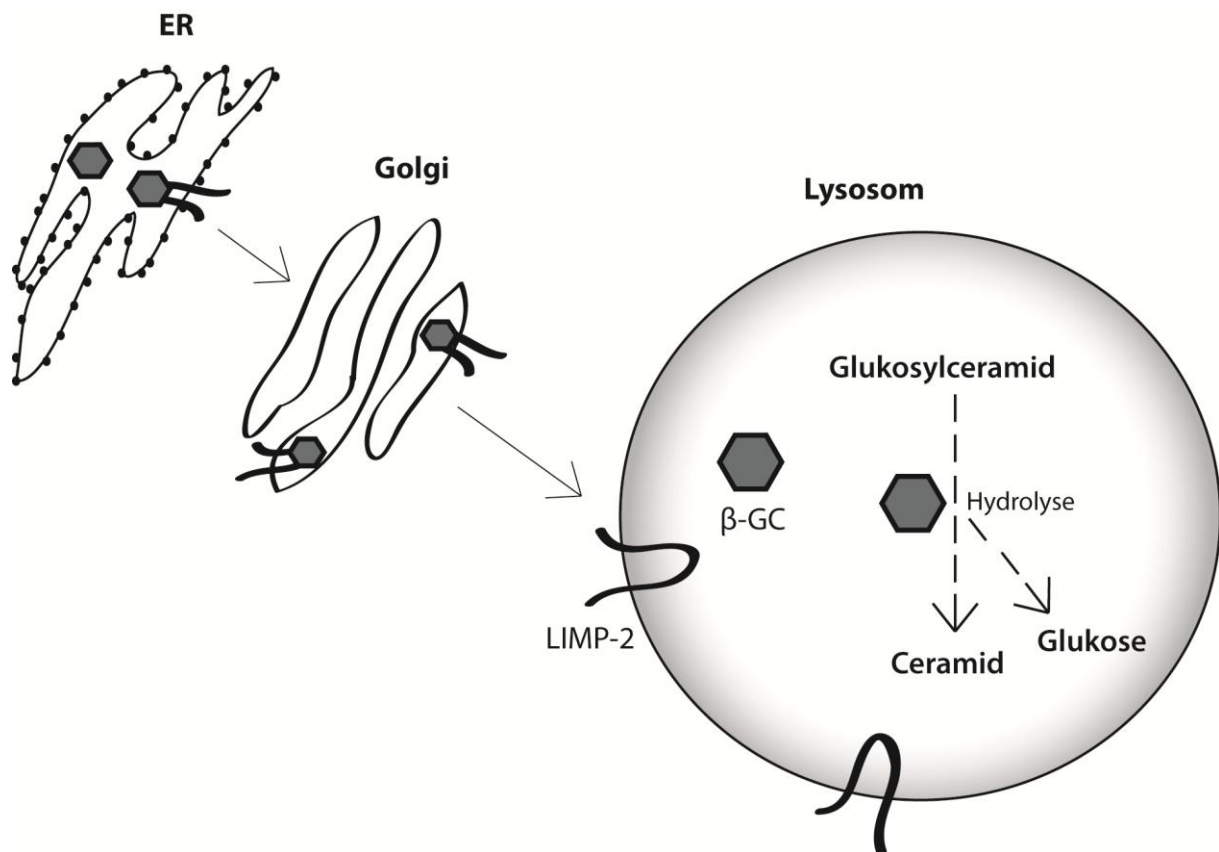
#### **1.1.4 Die physiologische Rolle der $\beta$ -Glukocerebrosidase ( $\beta$ -GC)**

Wie in Abschnitt 1.1.2 und 1.1.3 erläutert, wird sowohl für Morbus Gaucher als auch das Parkinson-Syndrom ein Zusammenhang zwischen der lysosomalen Hydrolase  $\beta$ -GC und der Pathophysiologie der beiden Erkrankungen angenommen.

$\beta$ -GC ist ein aus 536 Aminosäuren bestehendes, in drei Domänen untergliedertes Protein (Dvir *et al.* 2003) mit einem Molekulargewicht von etwa 60 kDa (Pentchev *et al.* 1973), welches im menschlichen Organismus vierfach N-glykosyliert ist (Berg-Fussman *et al.* 1993). Die Funktion der  $\beta$ -GC ist die hydrolytische Aufspaltung von Glukosylceramid in Glukose und Ceramid (Grabowski *et al.* 1990). Dies ist auch ein Hinweis auf die Verbindung zum

Parkinson-Syndrom, da gezeigt werden konnte, dass Glukosylceramid zur Stabilisierung von  $\alpha$ -Synuclein-Aggregaten beiträgt (Mazzulli *et al.* 2011).

Die  $\beta$ -GC wird in ihrem Entstehungsprozess zunächst als lösliches Protein in das ER hinein synthetisiert. Bereits dort bindet sie an ihren Transporter LIMP-2 (Reczek *et al.* 2007). Die Bindung der beiden Proteine erfolgt über die Interaktionsdomäne von LIMP-2, bestehend aus den Helices  $\alpha 5$  und  $\alpha 7$  (Neculai *et al.* 2013), und einem ebenfalls helikalen Motiv von  $\beta$ -GC (Liou *et al.* 2014, Zunke *et al.* 2016). Vom Golgi-Apparat aus wird  $\beta$ -GC dann von seinem Transporter über frühe und späte Endosomen ins Lysosom gebracht, wo die beiden Proteine im sauren pH wieder dissoziieren (Zachos *et al.* 2012) (s. Abb. 1.1.4). In Abwesenheit von LIMP-2 wird  $\beta$ -GC aus der Zelle sezerniert (Reczek *et al.* 2007).



**Abbildung 1.1.4: Schema des Transports von  $\beta$ -GC durch LIMP-2.** Bereits im ER wird  $\beta$ -GC von seinem Transporter LIMP-2 gebunden. Über das Golgi-Netzwerk wird es zum Lysosom transportiert, wo beide Proteine wieder dissoziieren. Im sauren pH kann  $\beta$ -GC nun Glukosylceramid hydrolytisch aufspalten. Modifiziert nach Rothaug, 2013.

### 1.1.5 Das Lysosomale Integrale Membranprotein Typ-2 (LIMP-2)

LIMP-2, in der Literatur auch als SCARB2 oder LGP85 bezeichnet, gehört zur Familie der CD36 Proteine (Calvo *et al.* 1995). Im murinen Organismus ist es ein 11-fach N-glykosyliertes Typ-III-Transmembranprotein aus 478 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 73-85 kDa (Fujita *et al.* 1991), im Menschen liegt es 10-fach N-glykosyliert vor (Neculai *et al.* 2013). Sowohl N- als auch C-Terminus von LIMP-2 sind dem Zytosol zugewandt und es wurde ein hydrophober Tunnel der im Lumen des Lysosoms gelegenen Ektodomäne beschrieben (Neculai *et al.* 2013). C-Terminus enthält LIMP-2 ein Dileucin-Sortierungsmotiv, durch welches es zum Lysosom gelangt (Vega *et al.* 1991, Ogata und Fukuda 1994). Neben den Lysosomal-Assoziierten Proteinen (LAMP) Typ-1 und Typ-2 sowie LIMP-1 gehört es zu den häufigsten Membranproteinen des Lysosoms (Marsh *et al.* 1987, Eskelinen *et al.* 2003).

Die Funktionen von LIMP-2 sind derzeit noch nicht gänzlich geklärt. Zum Einen spielt es bei einigen viralen Infektionen als Rezeptor eine Rolle, beispielsweise mit dem Enterovirus 71 (Yamayoshi *et al.* 2009), zum Anderen ist es ein Bestandteil des myokardialen Glanzstreifens (*Discus intercalaris*) (Schroen *et al.* 2007). Außerdem wurde das Protein wie bereits erwähnt als Transporter für  $\beta$ -GC identifiziert (Reczek *et al.* 2007, Blanz *et al.* 2015). Aufgrund seines hohen Vorkommens im Lysosom wird allerdings vermutet, dass LIMP-2 dort noch weitere Aufgaben erfüllen könnte.

Mutationen im LIMP-2-Gen können zum *Action Myoclonus-Renal Failure Syndrome* (AMRF [MIM 254900]) führen (Berkovic *et al.* 2008), welches eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung ist. Kennzeichnende Symptome des AMRF-Syndroms sind eine progressive myoklonische Epilepsie sowie Nierenversagen, wobei es zu weiteren neurologischen Auffälligkeiten kommen kann, die kognitiven Funktionen der Patienten aber erhalten bleiben (Badhwar *et al.* 2004).

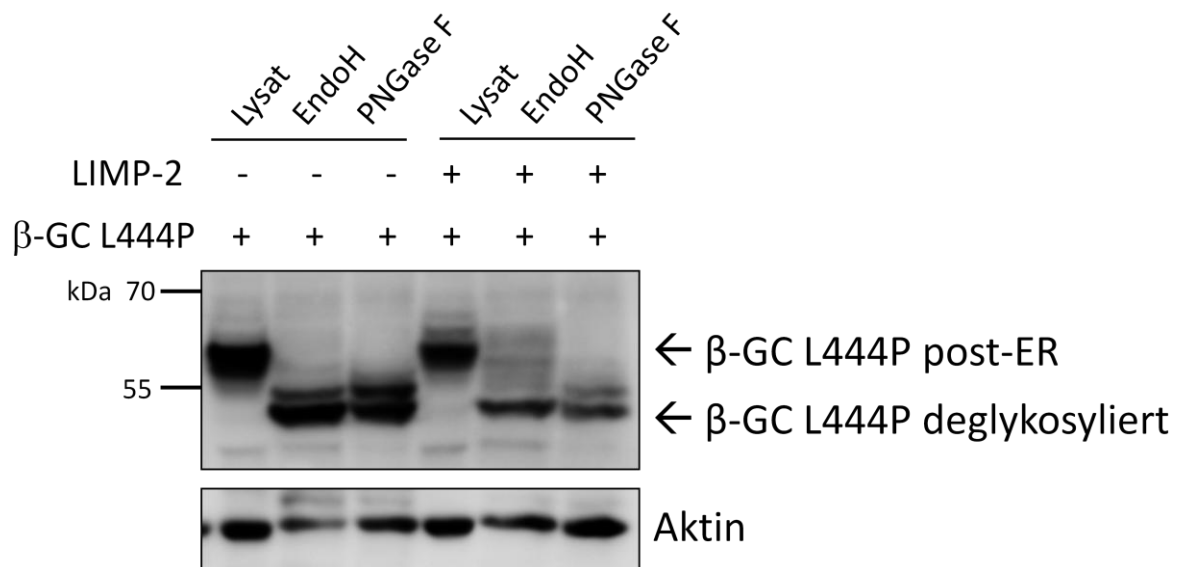
Wie schon erwähnt steht LIMP-2 außerdem im Zusammenhang mit Morbus Gaucher und dem Parkinson-Syndrom (s. Abschnitt 1.1.2 und 1.1.3).

### 1.1.6 Erhalt der $\beta$ -GC-Funktion als therapeutischer Ansatz

Es gibt verschiedene Mutationen im Gen von  $\beta$ -GC. So kann es zu einem völligen Funktionsverlust der enzymatischen Aktivität kommen. Es gibt allerdings auch Mutationen wie die L444P, bei denen es zu einer speziellen Fehlfaltung des Proteins kommt (Grace *et al.*

1994, Dvir *et al.* 2003). Hierdurch wird der Transport von  $\beta$ -GC ins Lysosom verhindert; allerdings zeigt diese Mutante immer noch eine Aktivität von etwa 5 % des Normalwertes (Grace *et al.* 1991, Grace *et al.* 1994). Diese Restaktivität könnte eventuell ausreichen, um die Zelle vor größeren Glukosylceramid-Akkumulationen zu bewahren, sofern der Transport von  $\beta$ -GC ins Lysosom hergestellt werden könnte.

Reczek *et al.* konnten 2007 in ersten Experimenten zeigen, dass beim Vorliegen der *GBA-1*-Mutation L444P die heterologe Expression von LIMP-2 ausreicht, um die mutierte  $\beta$ -GC ins Lysosom zu transportieren. Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit mittels *Western blot* reproduziert werden (s. Abb. 1.1.6). Rothaug *et al.* konnten 2014 des Weiteren zeigen, dass die heterologe Expression von LIMP-2 zu einer deutlichen Reduktion von  $\alpha$ -Synuclein führt. Aus diesen Erkenntnissen entstand die Annahme, dass durch eine vermehrte LIMP-2-Expression die Aktivität von  $\beta$ -GC gesteigert oder bei einigen Mutationsformen die Aktivität von  $\beta$ -GC überhaupt erst hergestellt werden könnte. Dies wäre ein möglicher Ansatz, um bei Erkrankungen wie Morbus Gaucher oder dem Parkinson-Syndrom zu weiteren Therapieoptionen zu gelangen.



**Abbildung 1.1.6: Einfluss von heterolog exprimiertem LIMP-2 auf die intrazelluläre Lokalisation von  $\beta$ -GC L444P.** EndoH- und PNGase F-Verdau (Erläuterung s. Abschnitt 4.4.3) von Lysaten aus N2A-Zellen, die wie eingezeichnet mit LIMP-2 und  $\beta$ -GC L444P transfiziert und für 72 h inkubiert wurden, n=1. Die heterologe Expression von LIMP-2 führt zu einer verstärkten EndoH-resistenten Bande von  $\beta$ -GC L444P. Dies bedeutet, dass  $\beta$ -GC L444P in einer glykosylierten Form vorliegt, wie sie erst in post-ER-Kompartimenten vorkommt. Heterologe LIMP-2-Expression führt also zu gesteigerten Mengen von  $\beta$ -GC L444P in post-ER-Kompartimenten. AK: 8E4 ( $\beta$ -GC), A2066 (Aktin).

## 1.2 Aspekte der Genregulation

### 1.2.1 Promotoren

Die Informationen über die einzelnen Bausteine des menschlichen Organismus sind in seiner Desoxyribonukleinsäure (DNS) in Form von Genen festgehalten. Es gibt verschiedene Mechanismen, mit welchen festgelegt wird, welche Gene abgelesen und in Proteine übersetzt werden, und welche stillgelegt sind. Unter diese Mechanismen fällt beispielsweise die Methylierung von DNS, die Modifizierung von Histonen, aber auch das Vorhandensein von *enhancern*, *silencern* und Promotoren (Arnaudo und Garcia 2013).

Promotoren sind Abschnitte auf der DNS, die einem Gen vorgeschaltet sind. Im Gegensatz zu *enhancern* und *silencern* kommen sie in der DNS-Sequenz direkt vor dem regulierten Gen (Banerji *et al.* 1981). In der Regel sind eukaryotische Promotoren nicht aktiviert, erst durch die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren kann die RNS-Polymerase binden und die Transkription beginnen (Riethoven 2010, Sainsbury *et al.* 2015).



**Abbildung 1.2.1: Schema eines Promotors.** Während andere Elemente wie *enhancer* und *silencer* weit stromaufwärts vor dem Gen in der DNS lokalisiert sind, ist der Promotor dem Startcodon direkt vorgeschaltet.

### 1.2.2 Transkriptionsfaktoren

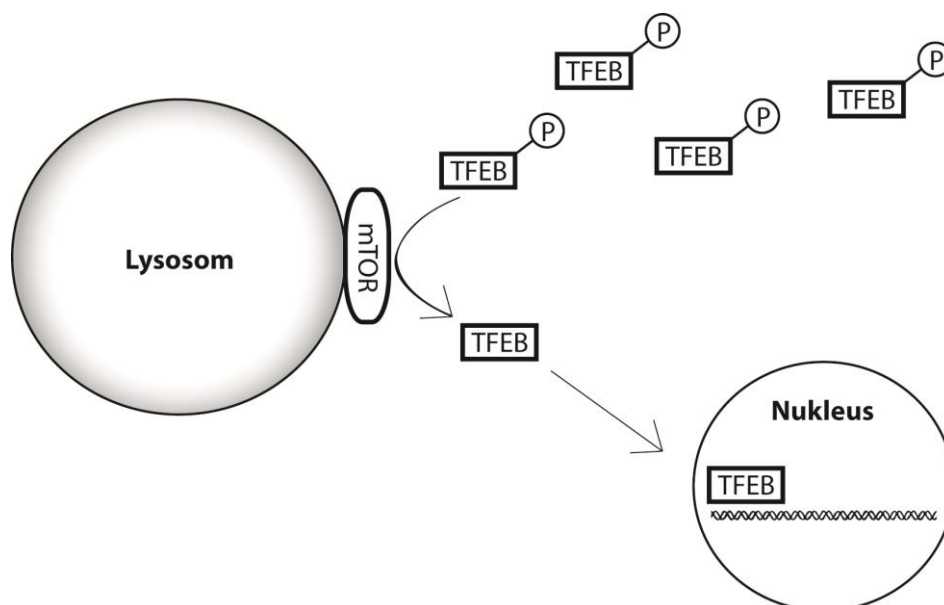
Promotoren können von für ein Gen spezifischen Transkriptionsfaktoren angesteuert werden, es gibt aber auch ganze Gen-Netzwerke mit einheitlichen Transkriptionsfaktorbindungsstellen in deren Promotoren. Wenn das Zusammenspiel verschiedener Gene für einen zellulären Prozess erforderlich ist, gibt es für solch ein Gen-Netzwerk oft einen Haupttranskriptionsfaktor, der die Promotoren aller dieser Gene aktiviert (Palmieri *et al.* 2011). Da Transkriptionsfaktoren an definierte Zielsequenzen von ca. 5 – 15 Nukleotiden binden (Khan *et al.* 2012), ist also in allen Promotoren eines Gen-Netzwerks



eine identische oder stark ähnliche Bindungsstelle enthalten. Auch für den Lysosomen-Autophagie-Pfad wurde ein solches Netzwerk beschrieben: Das *Coordinated Lysosomal Expression And Regulation* (CLEAR) Netzwerk (Palmieri *et al.* 2011).

Haupttranskriptionsfaktor des CLEAR-Netzwerkes ist der Transkriptionsfaktor EB (TFEB). Über 70 Gene wurden als direkt von TFEB reguliert identifiziert, darunter lysosomale Hydrolasen, Membranproteine, ATPasen sowie Autophagie-assoziierte Proteine (Palmieri *et al.* 2011). In seiner dephosphorylierten Form ist der Transkriptionsfaktor aktiv, während er nach Phosphorylierung durch das *mammalian Target Of Rapamycin* (mTOR) inaktiv ist (Roczniak-Ferguson *et al.* 2012, Settembre *et al.* 2012) (s. Abb. 1.2.2). Die Proteinkinase mTOR ist an regulatorischen Prozessen rund um Wachstum und Zellmetabolismus beteiligt. So findet beispielsweise unter Hungerbedingungen über mTOR eine Induktion von Autophagie statt, wozu auch die Aktivierung von TFEB gezählt werden kann (Zoncu *et al.* 2011).

Insbesondere wurden auch *GBA-1* (Palmieri *et al.* 2011, Song *et al.* 2013) und *SCARB2* (Song *et al.* 2013) als Zielgene von TFEB beschrieben. In Versuchen mit Mäusen konnte außerdem gezeigt werden, dass TFEB-Expression einen protektiven Einfluss auf  $\alpha$ -Synuclein-überladene Neuronen hat und sogar die Entwicklung von motorischen Defiziten in diesem Parkinson-Modell vermindert (Decressac *et al.* 2013).



**Abbildung 1.2.2: Regulation von TFEB.** Über einen Fühlmechanismus am Lysosom reguliert mTOR je nach Nährstofflage die Aktivität von TFEB. Unter Hungerbedingungen wird TFEB dephosphoryliert und somit aktiviert, wodurch die Transkription der dem CLEAR-Netzwerk angehörigen Gene angeregt wird. Modifiziert nach Roczniak-Ferguson *et al.* (2012).

Ein weiterer für diese Arbeit relevanter Transkriptionsfaktor ist das *cAMP Response Element-Binding Protein* (CREB). Die Aktivierung von CREB, die durch Phosphorylierung stattfindet, wird von der cAMP-abhängigen Proteinkinase A gesteuert (Mayr und Montminy 2001). CREB wird unter anderem ein neuroprotektiver Charakter (Riccio *et al.* 1999) sowie eine Rolle in der synaptischen Plastizität und der Bildung des Langzeitgedächtnisses (Bartsch *et al.* 1998) zugeschrieben. Des Weiteren wurde verklumptes zytoplasmatisches CREB in degenerierenden Neuronen der *Substantia nigra* von Parkinson-Patienten beschrieben (Chalovich *et al.* 2006). Daher wird davon ausgegangen, dass dysfunktionales CREB zu Neurodegeneration beitragen könnte (Chalovich *et al.* 2006).

### 1.3 Saccharose-bedingte Effekte auf die Zelle

Saccharose ist ein Disaccharid bestehend aus Glukose und Fruktose. Gibt man diesen Zucker in ein Zellkulturmedium, wird er von den Zellen durch Pinozytose aufgenommen (Helip-Wooley und Thoene 2004). Da in Säugerzellen das Enzym Invertase nicht vorhanden ist, kann Saccharose hier nicht hydrolysiert werden und die Zellen auch sonst nicht wieder verlassen (Isaac *et al.* 2000). Die Effekte, die durch Saccharose entstehen, sind daher zum großen Teil osmotischer Natur (Getty *et al.* 2013).

Durch das Einwirken hypoosmolarer Saccharose bilden sich in den Zellen sogenannte Sucrosomen (engl. *sucrose* = „Saccharose“, gr. *soma* = „Körper“) (Deng und Storrie 1988), welche geschwollenen späten Endosomen entsprechen (Isaac *et al.* 2000). In diesen Sucrosomen herrscht ein erhöhter pH-Wert (Montgomery *et al.* 1991) und die Konzentration an Proteasen ist herabgesetzt (Isaac *et al.* 2000).

Gleichzeitig steigt sowohl die Synthese lysosomaler Enzyme (Helip-Wooley und Thoene 2004) als auch die Aktivität der lysosomalen Hydrolasen (Kato *et al.* 1982) unter Saccharoseeinfluss. Dies muss aber wegen des vergrößerten Volumens der Sucrosomen nicht im Widerspruch zu den Beobachtungen des gestiegenen pH-Werts und der verminderten Enzymkonzentration stehen. Außerdem erhöht Saccharose beispielsweise die Halbwertszeit von LAMP-1 auf das Dreifache, wobei dessen Glykosylierung unverändert bleibt (Isaac *et al.* 2000).

Der genaue Mechanismus, über den Saccharose die Transkriptionsrate einiger Gene steigert, ist nicht geklärt. Möglich wäre ein Einfluss über das *CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP)* (Helip-Wooley und Thoene 2004) oder über TFEB (Song *et al.* 2013). Die Familie der C/EBPs ist an der Regulation der zellulären Proliferation, der Differenzierung, des Metabolismus sowie der Adipogenese beteiligt (Helip-Wooley und Thoene 2004). Nach Stimulation mit Saccharose wurde unter anderem eine gesteigerte Expression von *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) von *GBA-1* (Helip-Wooley und Thoene 2004) und *SCARB2* (Song *et al.* 2013) festgestellt.

Interessant ist des Weiteren die Beobachtung, dass in Zellen mit der lysosomalen Speicherstörung I-Zellerkrankung unter Saccharose die Aktivität defekter Hydrolasen fast auf ihr normales Niveau zurückkehrte und die gespeicherten Einschlüsse abgebaut wurden (Kato *et al.* 1982). Auch die Faltung einer  $\beta$ -GC-Mutante (L444P) kann über den Zucker verbessert werden, wodurch es zu vermehrtem Transport in post-ER-Kompartimente und somit auch zur Funktionalität der sonst fehlgefalteten  $\beta$ -GC-Mutante kommt (Song *et al.* 2013).

## 2 Fragestellung

LIMP-2 wurde in vorausgegangenen Arbeiten als Transporter für die  $\beta$ -Glukocerebrosidase identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass die heterologe Expression von LIMP-2 den Transport dieser lysosomalen Hydrolase beeinflusst. Um die Expression von LIMP-2 *in vivo* regulieren zu können, sollte in dieser Arbeit der Promotor von *SCARB2* analysiert werden. Hierzu erfolgte zunächst mittels einer *in silico* Analyse ein Abgleich der Promotorsequenz mit bereits bekannten Transkriptionsfaktorbindungsstellen. Zusätzlich sollten Deletionskonstrukte des *SCARB2*-Promotors erstellt werden, welche Rückschluss auf die Lokalisation von wichtigen Sequenzen im Promotor geben sollten. Anhand der daraus resultierenden Erkenntnisse wurden einige Transkriptionsfaktoren und Substanzen auf ihr Aktivierungspotenzial am *SCARB2*-Promotor geprüft. Dies geschah mittels eines Luziferase-Assays. Außerdem sollte nach Etablierung dieses Luziferase-Assays ein *screening* nach Substanzen durchgeführt werden, welche den *SCARB2*-Promotor aktivieren.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte der Einfluss von Saccharose auf LIMP-2,  $\beta$ -GC und  $\alpha$ -Synuclein untersucht werden. Hierbei sollte ein besonderes Augenmerk auf der Expressionsregulierung von LIMP-2 und  $\beta$ -GC durch Saccharose liegen. Auch die Lokalisation dieser beiden Proteine nach Stimulation sollte mittels Immunfluoreszenz sowie *Western blot* und zugehörigem Enzymverdau ermittelt werden. Der Einfluss von Saccharose auf  $\beta$ -GC in LIMP-2-defizienten Zellen sollte besondere Beachtung finden, wobei Lokalisation und Enzymaktivität als Zielgrößen untersucht wurden.

Die Steigerung der Promotoraktivität des LIMP-2-Gens könnte der Annahme nach zu einem vermehrten Transport von  $\beta$ -GC ins Lysosom führen und somit die Akkumulation von Glukosylceramid und letztendlich  $\alpha$ -Synuclein verhindern und damit die Krankheiten Morbus Gaucher und das Parkinson-Syndrom positiv beeinflussen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Agarosegel-Dokumentationsanlage	Gel Jet Imager UV Systeme	Intas GDS, Göttingen, D
Agarosegel-Elektrophoresekammer	Sub-Cell GT	BioRad, München, D
Waage	MC1 Laboratory LC 4200	Sartorius AG, Göttingen, D
Autoklav	DX-150	Systec, Linden, D
Blotting-Kammern	Criterion Blotter	BioRad, München, D
Chemilumineszenzkamera	ImageQuant LAS 4000	GE-Healthcare, München, D
Drehrad	TC-7	New Brunswick Scientific, Eppendorf, Hamburg, D
Elektroporationsgerät	Gene Pulser™ Pulse Controller	BioRad, München, D
Feinwaage	Kern 770	Kern & Sohn, Dürrwangen, D
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Horizontalschüttler	Swip	Edmund Bühler, Hechingen, D
Luminometer	GLOMAX	Promega, Mannheim, D
Magnetrührer	IKAMAG RCT	IKA-Labortechnik, Staufen, D
Mikrowellenherd	NN-E245W	Panasonic, Hamburg, D
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	Zeiss, Jena, D
Konfokales Fluoreszenzmikroskop	FluoView1000	Olympus, Hamburg, D
Lichtmikroskop	Eclipse TS 100	Nikon, Düsseldorf, D
Multifunktionsplattenlesegerät	Synergy HAT	BioTek Instruments Inc., Bad-Friedrichshall, D

Ofen		Memmert, Schwabach, D
PCR-Cycler	GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA
	2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems, Darmstadt, D
	T-Gradient	Biometra, Göttingen, D
pH-Meter	DIGITAL-pH-METER 646	Knick, Berlin, D
Pipetboy	Accu-jet® pro	BRAND, Wertheim, D
Pipette	(100 µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Pipette	(10 µl, 1000 µl)	Gilson, Limburg-Offheim, D
Reinstwasseranlage	Milli-Q Plus	Millipore, Schwalbach, D
Rollbrett	Roller mixer, SRT9D	Stuart, Staffordshire, UK
37 °C Schrank	B 6760	Heraeus, Hanau, D
SDS-PAGE-Elektrophoresekammern	Mini-Protean™	BioRad, München, D
Schüttler	VF2	IKA-Labortechnik, Staufen, D
Spannungsquelle	PowerPac 300/200/HC/Basic	BioRad, München, D
Sterilbank	VFR1806	CLAUS DAMM A/S, Humlebæk, DK
	HS 12	Heraeus, Hanau, D
Ultraschallgerät	Branson Sonifier 450	Branson, Dietzenbach, D
Ultraschalldurchlaufkühler	Multistar	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, D
UV-Tisch	Reprostar	Lamag, Berlin, D
17 °C Wasserbad	RM 6, RM S	Lauda, Lauda-Königshofen, D
37 °C Wasserbad	1003 37 °C	GFL, Burgwedel, D
Zellkulturinkubator	HERA cell 150	Heraeus, Hanau, D; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Große Zentrifuge	Multifuge 3SR+	Heraeus, Hanau, D

	Universal 32	Hettich	Zentrifugen, Tuttlingen, D
Kleine Zentrifuge	SN 0708	Labnet International, Inc, Edison, USA	
Kühlzentrifuge	Mikro 220R	Hettich	Zentrifugen, Tuttlingen, D
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, D	
Ultrazentrifuge	J2-HS, Rotor JA-17	Beckman, Fullerton, USA	

### 3.2 Labormaterialien

Produkt	Hersteller
Bechergläser	VitLab, Grossostheim, D; VWR, Radnor, USA; Schott, Mainz, D
Gel- <i>Blotting</i> -Papier	GE-Healthcare, München, D
Glasflaschen	Schott, Mainz, D
Cryo-Gefäß, 1,6 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Deckgläser	Assistent, Sondheim v. d. Rhön, D
Einmalpipetten 5 – 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Elektroporationsküvetten	Peqlab, Erlangen, D
Erlenmeyerkolben	Simax, Schott, Mainz, D
Filter Tips Biosphere®	Sarstedt, Nümbrecht, D
Handschuhe rotiprotect®, Latex, Nitril	Roth, Karlsruhe, D
Kulturflaschen 175 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht, D
Kulturschalen 10er, 6er	Sarstedt, Nümbrecht, D
Kultur- <i>well</i> -Platten 6, 24, 96	Sarstedt, Nümbrecht, D
Messzylinder	BRAND, Wertheim, D; VitLab, Grossostheim, D
Mikrotiterplatten 96- <i>well</i>	Sarstedt, Nümbrecht, D
Objektträger	VWR, Radnor, USA

Papiertücher	Roth, Karlsruhe, D
Parafilm	VWR, Radnor, USA
Pasteurpipetten	Assistent, Sondheim v. d. Rhön, D
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße für Ultrazentrifuge	Beckman, Fullerton, USA
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht, D
Weißer 96-well-Platte	Greiner bio-one, Kremsmünster, A
Whatman-Papier „Immobilon“	Millipore, Schwalbach, D
Zellschaber	TPP, Trasadingen, CH

### 3.3 Chemikalien, Enzyme, Reagenzien, Kits

Chemikalie	Hersteller
Rotiphorese Gel 30: 30 % Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe, D
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, D
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma Aldrich, München, D
Ampicillin 50 mg/ml	Sigma Aldrich, München, D
Bafilomycin A1	Sigma Aldrich, München, D
BamH I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BamH I-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BCA Protein Assay <i>Pierce</i> <sup>®</sup>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, D
BSA	Roth, Karlsruhe, D



Chloroquin (Chloroquin-Diphosphat-Salz)	Sigma Aldrich, München, D
Chlorwasserstoff (HCl)	Roth, Karlsruhe, D
<i>Complete</i> Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim, D
<i>Compound Library</i> DIVERSet™	Chembridge, San Diego, USA
Cyclodextrin (2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin)	Sigma Aldrich, München, D
<i>p-Coumaric-Acid</i>	Sigma Aldrich, München, D
DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan)	Sigma Aldrich, München, D
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma Aldrich, München, D
Desipramin-Hydrochlorid	Sigma Aldrich, München, D
Dimethylsulfoxid (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS; DMSO)	Roth, Karlsruhe, D
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe, D
DNS-Leiter, 1 kb	Fermentas, St. Leon-Rot, D
dNTPs (4 mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Dual-Luciferase</i> ® Reporter Assay System	Promega, Mannheim, D
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Sigma Aldrich, München, D
Dynasore	Enzo Lifesciences, Lörrach, D
<i>Earle's Balanced Salts Solution</i> (EBSS)	Invitrogen, Darmstadt, D
EcoR I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EDTA	Roth, Karlsruhe, D
Endoglykosidase H	Roche, Mannheim, D
Essigsäure (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O)	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromidlösung 1 % in H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe, D
FastAP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FCS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA; Invitrogen, Darmstadt, D
Forskolin	Enzo Lifesciences, Lörrach, D
FuGENE® HD Transfektions Reagenz	Promega, Mannheim, D

Genetecin G418 100 mg/ml	InvivoGen, San Diego, USA
Glycerol	Roth, Karlsruhe, D
Glycin	Roth, Karlsruhe, D
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, D
<i>High Pure PCR Product Purification Kit</i>	Roche, Mannheim, D
Hind III	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin)	Enzo Lifesciences, Lörrach, D
Isopropanol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O)	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe, D
Kanamycin 30 mg/ml	Roth, Karlsruhe, D
Ligase-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lipofectamin2000 <sup>®</sup>	Invitrogen, Darmstadt, D
<i>6x Loading Dye</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Luminogen TMA6 A	Lumigen Inc., Southfield, USA
Luminogen TMA6 B	Lumigen Inc., Southfield, USA
Luminol	Roth, Karlsruhe, D
5x Lysispuffer	Promega, Mannheim, D
<i>Lysotracker RED DND-99</i>	Invitrogen, Darmstadt, D
2-Mercaptoethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)	Roth, Karlsruhe, D
Methanol (CH <sub>4</sub> O)	Roth, Karlsruhe, D
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, D
Mowiol	Merck, Darmstadt, D; Sigma Aldrich, München, D
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, D
Natriumzitat	Roth, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, D

Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe, D
Natriumphosphat (Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe, D
4-Nitrophenyl-β-D-Glukopyranosid	Sigma Aldrich, München, D
p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glukosaminid	Sigma Aldrich, München, D
NP-40	Merck, Darmstadt, D
Penicillin/Streptomycin	PAA, Laboratories, Linz, A
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe, D
Pfu-DNS-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pfu-Puffer (+MgSO <sub>4</sub> )	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Plasmid Midiprep System <i>PureYield</i>	Promega, Mannheim, D
Plasmid Miniprep Kit <i>GeneJET</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PNGase F	Roche, Mannheim, D
Proteinmarker <i>Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pufferlösung pH 7	Roth, Karlsruhe, D
Puromycin 1 mg/ml	InvivoGen, San Diego, USA
D-(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe, D
Saponin	Roth, Karlsruhe, D
Secrete-Pair™ Gaussia Luciferase Assay Kit	GeneCopoeia, Rockville, USA
T4-Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Taq-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Taq-Polymerasepuffer (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TEMED	Roth, Karlsruhe, D
Transferrin-488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tris	Roth, Karlsruhe, D
Triton <sup>®</sup> X-100	Sigma Aldrich, München, D
Trypsin-EDTA	PAA, Laboratories, Linz, A
Trypton/Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe, D
TurboFect Transfektions Reagenz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tween <sup>®</sup> 20	Roth, Karlsruhe, D
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe, D
Zeocin 100 mg/ml	InvivoGen, San Diego, USA
Zitronensäure, Ziträt	Roth, Karlsruhe, D

### 3.4 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
1,5 % Agarosegel	400 ml 1x TAE-Puffer 6 g Agarose In der Mikrowelle erhitzen 10 µl Ethidiumbromid
10 % Ammoniumperoxidsulfat (APS)	0,1 g/ml APS In H <sub>2</sub> O Bei -20 °C lagern
Zitratpuffer	0,2 M Zitronensäure 0,08 % Natriumazid 4 % BSA pH 4,6
DABCO-Lösung	200 mg/ml 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan 1x PBS Bei -20 °C lagern
DAPI-Lösung	1 mg/ml DAPI 1x PBS

	Bei -20 °C im Dunkeln lagern
ECL Lösung A	200 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,6 50 mg Luminol
ECL Lösung B	10 ml DMSO 11 mg p-Coumaric-Acid
ECL Komplettlösung	1 ml Lösung A 100 µl Lösung B 100 µl Luminogen TMA6 A 100 µl Luminogen TMA6 B 0,5 µl Wasserstoffperoxid
EndoH-Puffer	100 mM Na-Zitrat 0,1 % β-Mercaptoethanol 1 % SDS 1x <i>Complete</i> Proteaseinhibitor pH 5,5
10x Gelelektrophoresepuffer (SDS-Gel)	144,13 g Glycin 30,29 g Tris 100 ml 10 %-iges SDS H <sub>2</sub> O ad 1 l (kein pH-Wert einstellen)
β-Glukocerebrosidase-Substrat	10 mM 4-Nitrophenyl-β-D-Glukopyranosid 0,2 M Zitratpuffer
β-Hexosaminidase-Substrat	10 mM p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glukosaminid 0,2 M Zitratpuffer
5x Lämmli Ladepuffer	250 mM Tris 10 % SDS 50 % Glycerol Bromphenolblau (wenig)
Mowiol-Lösung	10 g Mowiol

---

	<p>40 ml PBS</p> <p>24 h bei Raumtemperatur rühren</p> <p>20 ml 10 %-iges Glycerol</p> <p>24 h bei Raumtemperatur rühren</p> <p>pH 6 – 7</p> <p>15 min bei 12000 rpm zentrifugieren</p> <p>Bei -20 °C lagern</p>
Mowiol/DABCO/DAPI	<p>1 ml Mowiol-Lösung</p> <p>0,1 ml DABCO-Lösung</p> <p>±1 µl DAPI-Lösung</p>
10x PBS	<p>80 g Natriumchlorid</p> <p>2 g Kaliumchlorid</p> <p>17,8 g Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H<sub>2</sub>O (= 11,5 g wasserfrei)</p> <p>2,4 g Kaliumdihydrogenphosphat</p> <p>H<sub>2</sub>O ad 1 l</p> <p>pH 7,4</p>
PNGase F-Puffer 1	<p>50 mM Natriumphosphat</p> <p>1 % SDS</p> <p>1 % β-Mercaptoethanol</p> <p>1x <i>Complete</i> Proteaseinhibitor</p> <p>pH 7,8</p>
PNGase F-Puffer 2	<p>50 mM Natriumphosphat</p> <p>1 % NP-40</p> <p>1x <i>Complete</i> Proteaseinhibitor</p> <p>pH 7,5</p>
Sammelgelpuffer	<p>30,28 g Tris</p> <p>2 g SDS</p> <p>H<sub>2</sub>O ad 500 ml</p> <p>pH 6,8</p>
SDS-Sammelgel	<p>1,35 ml Sammelgelpuffer</p>

---

	1,75 ml 30 % Acrylamid
	6,85 ml H <sub>2</sub> O
	60 µl 10 % APS
	30 µl TEMED
7,5 % SDS-Trenngel	2,6 ml Trenngelpuffer
	2,5 ml 30 % Acrylamid
	4,8 ml H <sub>2</sub> O
	60 µl 10 % APS
	30 µl TEMED
10 % SDS-Trenngel	2,6 ml Trenngelpuffer
	3,3 ml 30 % Acrylamid
	4,0 ml H <sub>2</sub> O
	60 µl 10 % APS
	30 µl TEMED
Stop-Lösung	0,4 M Glycin
	pH 10,4
<i>Stripping</i> -Puffer	20 g SDS
	7,57 g Tris
	8,3 ml 2-Mercaptoethanol
	H <sub>2</sub> O ad 1 l
	pH 6,8
50x TAE-Puffer	2 M Tris
	5,5 % Essigsäure
	50 mM EDTA pH 8,0
	H <sub>2</sub> O ad 1 l
TBS/T	10 ml Tween
	1 l 10x TBS
	9 l H <sub>2</sub> O
10x Transferpuffer ( <i>Western blot</i> )	30,27 g Tris
	144 g Glycin
	H <sub>2</sub> O ad 1 l

	pH 8,3
1x Transferpuffer ( <i>Western blot</i> )	100 ml 10x Transferpuffer 200 ml Methanol 700 ml H <sub>2</sub> O
Trenngelpuffer	90,85 g Tris 2 g SDS H <sub>2</sub> O ad 500 ml pH 8,8

### 3.5 Antikörper

#### 3.5.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Aus Spezies	Herkunft	Verdünnung
13-6800	Transferrin-Rezeptor	Maus	Invitrogen, Darmstadt, D	IF: 1/500
3F10	HA-tag	Ratte	Roche, Mannheim, D	WB: 1/500
3F10-POD	HA-tag	- (POD)	Roche, Mannheim, D	WB: 1/1000
8E4	h $\beta$ -GC	Maus	Hans Aerts, Academic Medical Center Amsterdam, NL	IF: 1/200 WB: 1/1000
9B11	myc-tag	Maus	Cell Signaling, Danvers, USA	IF: 1/500 WB: 1/1000
A2066	Aktin	Kaninchen	Sigma Aldrich, München, D	WB: 1/2000
ab11432	PDIA6	Kaninchen	abcam, UK	Cambridge, IF: 1/100
ADI-SPA-827-	KDEL	Maus	Enzo Lifesciences,	IF: 1/20



D			Lörrach, D			
EEA1 610457	Humane frühe Endosomen	Maus	Transduction Laboratories, Franklin Lakes, USA	IF: 1/500		
F1804 / M2	Flag-tag	Maus	Sigma Aldrich, München, D	IF: 1/500	WB: 1/1000	
G4171	h/(m) $\beta$ -GC	Kaninchen	Sigma Aldrich, München, D	IF: 1/100	WB: 1/1000	
GTX30518	myc-tag	Ziege	Genetex, Cambridge, UK	IF: 1/500	WB: 1/1000	
H4B4 - c	hLAMP-2	Maus	DSHB, Iowa, USA	IF: 1/200		
LIMP-2-T2	m/hLIMP-2	Kaninchen	Pineda, Berlin, D	IF: 1/200	WB: 1/1000	
PAB17715	h/mKDEL-Rezeptor 3	Kaninchen	Abnova, Taipei City, TW	IF: 1/200		
SII-10	mCathepsin D	Kaninchen	Universität Köln, D		WB: 1/1000	
sc-30159	h/mTransferrin M-70	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA		WB: 1/200	

IF: Immunfluoreszenz, WB: *Western blot*

### 3.5.2 Sekundäre Antikörper

Antigen	Aus Spezies	Herkunft	Verdünnung	Wellenlänge
Kaninchen	Esel	Alexa Fluor, Invitrogen, Karlsruhe, D	IF: 1/500	488 nm
Maus	Esel	Alexa Fluor, Invitrogen, Karlsruhe, D	IF: 1/500	594 nm
Kaninchen	Ziege	Dianova, Hamburg, D	WB: 1/10000	
Maus	Schaf	Dianova, Hamburg, D	WB: 1/10000	
Ratte	Ziege	Dianova, Hamburg, D	WB: 1/10000	

---

Ziege                      Kaninchen                      Dianova, Hamburg, D                      WB: 1/10000

---

IF: Immunfluoreszenz, WB: *Western blot*

## 3.6 Zellkultur

### 3.6.1 Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaft	Referenz
COS7	Nierengewebszellen der grünen Meerkatze ( <i>Cercopithecus aethiops</i> ), SV-40-immortalisiert	DMSZ, Braunschweig, D
HEK 293	Humane Nierengewebszellen, Adenovirus-immortalisiert	ATCC, Wesel, D
HeLa	Humane Zervix-Karzinom-Zellen, isoliert von Frau Henrietta Lacks 1951	DMSZ, Braunschweig, D
MEF GBA KO	$\beta$ -GC-defiziente primäre murine embryonale Fibroblasten, nicht immortalisiert	Ellen Sidransky, NIH, Barthesda, MD, USA
MEF LIMP-2 KO 583-2	LIMP-2-defiziente murine embryonale Fibroblasten, spontan immortalisiert	AG Schröder, 2008, Kiel, D
MEF LIMP-2 KO 583-2 RESCUE	LIMP-2-defiziente murine embryonale Fibroblasten, spontan immortalisiert. Stabil mit retroviralem LIMP-2-Expressionsvektor transfiziert; 2,5 $\mu$ g/ml Puromycin, 400 $\mu$ g/ml G418	Christina Zachos, Kiel, D
MEF WT 583-3	Murine embryonale Fibroblasten, spontan	AG Schröder, 2008, Kiel, D

	immortalisiert	
MEF PHOSPHOTRANSFERASE KO	Phosphotransferase-defiziente murine embryonale Fibroblasten, SV-40-LT-immortalisiert	Thomas Braulke, Hamburg, D
MEF WT	Murine embryonale Fibroblasten, SV-40-LT-immortalisiert	Thomas Braulke, Hamburg, D
N2A	Murine Neuroblastomzellen	ATCC, Wesel, D
wnt3a Fibroblasten	Murine Fibroblasten, stabil mit einem Wnt-3a Expressionsvektor transfiziert, Zeomycin-Selektionsmarker	Madelon Maurice, CMC Utrecht, NL
L-Cell Fibroblasten	Murine Fibroblasten	Madelon Maurice, CMC Utrecht, NL

### 3.6.2 Kulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
DMEM-Komplettmedium	DMEM 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium	DMEM 1 % Penicillin/Streptomycin 20 % FCS 10 % DMSO
LB-Agarplatten	10 g Trypton / Pepton aus Casein 5 g Hefeextrakt 10 g Natriumchlorid H <sub>2</sub> O ad 1 l pH 7,0 15 g Agar-Agar

	Nach dem Autoklavieren auf 65 °C abkühlen lassen und in 10 cm Schalen gießen
LB-Medium	10 g Trypton / Pepton aus Casein 5 g Hefeextrakt 10 g Natriumchlorid H <sub>2</sub> O ad 1 l pH 7,0 Autoklavieren, bei 4 °C lagern

### **wnt-/L-Medium**

Das verwendete wnt- und L-Medium wurde von Judith Peters hergestellt.

Um Medium mit wnt3a anzureichern werden Fibroblasten verwendet, die das wnt3a-Gen stabil überexprimieren (zur Selektion wurde 125 µg/ml Zeocin (100 mg/ml) benutzt). Nachdem die Zellen zu 100 %-iger Konfluenz gewachsen waren, wurden sie auf 175 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen ausplattiert. Daraufhin wurden die Fibroblasten mit 50 ml DMEM-Komplettmedium ohne Zeomycin bedeckt. Nach 2 – 3 Tagen ist dieses Medium von den Zellen mit wnt3a-Protein angereichert worden. Nach einem Mediumswechsel wurde das Medium für 5 min bei 200 G zentrifugiert, um es von toten Zellen zu reinigen. Der Überstand, der nun das reine DMEM-Komplettmedium mit wnt3a-Protein enthielt, wurde abgenommen und bei 4 °C für höchstens 1 Jahr gelagert. Der Vorgang kann bis zu 50 mal mit einer Fibroblastenkultur durchgeführt werden, bevor die Zellen nicht mehr genug wnt3a-Protein produzieren.

Für das Kontrollmedium (L-Medium) wurde das gleiche Protokoll mit Wildtyp Fibroblasten durchgeführt.

Die Wirksamkeit des wnt-Mediums wurde von Judith Peters in einem Kontroll-Luziferase-Assay nachgewiesen.

### **3.6.3 Zellen *splitten***

Zur langfristigen Kultivierung von Zellen wurden diese in der Regel zweimal in der Woche ausgedünnt (*gesplittet*).

Von den Zellen wurde das Medium abgenommen und sie wurden einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie 20 min mit 1 ml Trypsin bei 37 °C inkubiert und dann in DMEM-Komplettmedium aufgenommen. Alle Zelllinien wurden im Verhältnis 1:10 *gesplittet*, nur die N2A-Zellen wurden im Verhältnis 1:5 geteilt.

### **3.6.4 Einfrieren und Auftauen, Mycoplasmen-PCR**

#### **Zellen einfrieren**

Für die langfristige Lagerung von Zellen wurden die entsprechenden Zelllinien eingefroren. Zellen der gewünschten Zelllinie wurden bis zur 90 %-igen Konfluenz wachsen gelassen, mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Danach wurden sie je 10er Schale in 4 ml DMEM-Komplettmedium aufgenommen und in einem Falcon gesammelt. Nach einer Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 min wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml Einfriermedium/Schale aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann in Kryoröhrchen gefüllt und direkt bei -80 °C eingefroren. Am Folgetag wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **Zellen auftauen**

Die im Stickstoff gelagerten Zellen wurden kurz im Wasserbad erwärmt. Anschließend wurden sie direkt in einen 15 ml Falcon mit 5 ml DMEM-Komplettmedium gegeben und 5 min bei 440 RCF abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml DMEM-Komplettmedium resuspendiert. Diese Suspension wurde in eine 10er Kulturschale überführt, die bereits mit 9 ml DMEM-Komplettmedium gefüllt war. Inkubation bei 37 °C.

#### **Mykoplasmen-PCR**

Mykoplasmen sind Bakterien, die im Labor kultivierte Zellen befallen und ihnen schaden können. Zum Nachweis von eventuell vorhandenen Mykoplasmen wurde wie folgt verfahren:

200 µl Überstand der Zellkultur wurden in einem Reaktionsgefäß 5 min bei 95 °C erhitzt. Nach einer Zentrifugation bei 4000 rpm für 1 min wurde der Überstand für die Mykoplasmen-PCR verwendet:

5 µl 10x Taq-Polymerasepuffer

4 µl 2 mM dNTPs

1 µl MYCF1 Primer

1 µl MYCR1 Primer

37 µl Wasser

0,5 µl Taq-Polymerase

1,5 µl Überstand aus der Zellkultur.

Nach kurzem Schütteln wurde die Probe im PCR-Cycler mit folgendem Programm inkubiert:

3 min bei 94 °C

30 sec bei 94 °C  
120 sec bei 55 °C  
60 sec bei 72 °C

} x 35

7 min bei 72 °C

bis zur Weiterverarbeitung bei 10 °C.

Im Anschluss wurden 1,5 µl dieser PCR als neue Matrix für einen zweiten Durchlauf mit den Primern MYCF2 und MYCR2 verwendet.

Als Positivkontrolle wurde der Überstand einer mit Mykoplasmen infizierten Zellkultur verwendet, als Negativkontrolle ein PCR-Ansatz ohne Matrix.

### 3.6.5 Transiente Transfektion

Bei der transienten Transfektion wird fremde DNS in Zellen eingebracht. Diese DNS wird dann über eine gewisse Zeit von den Zellen exprimiert, allerdings nicht zwangsläufig an die Folgeneration der Zellen weitervererbt.

COS7-, HEK- und N2A-Zellen wurden mit TurboFect nach Herstellerangaben transfiziert.

MEF-Zellen wurden mit FuGENE nach Herstellerangaben transfiziert.

Es wurden folgende Mengen an DNS verwendet:

10er Schale: 3 µg DNS

6er Schale: 2 µg DNS

6-well: 1 µg DNS

24-well: 0,25 µg DNS

### 3.6.6 Stabile Transfektion

Bei der stabilen Transfektion wird ebenfalls fremde DNS in Zellen eingebracht. Diese DNS wird dann dauerhaft auch in Folgegenerationen der Zellen exprimiert.

Für die stabile Transfektion wurden HEK- und N2A-Zellen mit TurboFect nach Herstellerangaben transfiziert. Es wurden Plasmide mit pEZX-PG02-Vektor verwendet und zur Selektion wurde im Folgenden Puromycin benutzt. Am Tag 2 nach der Transfektion begann die Selektion mit 1 µg/ml Antibiotikum, die Dosis wurde am Tag 5 verdoppelt. Nach 9 Tagen waren in der Kontrollschale die nicht transfizierten HEK-Zellen komplett abgestorben, nach 13 Tagen war der gleiche Zustand in der N2A-Kontrolle erreicht. Anschließend wurde bei jedem Mediumswechsel auf die HEK-Zellen 1 µg/ml und auf die N2A-Zellen 2 µg/ml Puromycin gegeben, um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten.

Zur Kontrolle, ob die Zellen tatsächlich transfiziert waren, wurde die Lumineszenz des Mediumüberstands gemessen.

### 3.6.7 *Small interfering* Ribonukleinsäure (siRNA) Transfektion

Um bestimmte Gene in Kulturzellen auszuschalten, kann über *small interfering* Ribonukleinsäure (siRNA) ein *knock-down* dieser Gene induziert werden.

Die Transfektion von siRNA wurde mit Lipofectamin2000 durchgeführt. Zellen wurden in 6er Schalen bis zur 60 %-igen Konfluenz wachsen gelassen. Für die Transfektion wurden folgende Ansätze zunächst getrennt pipettiert und 5 min inkubiert:

- a) 250 µl DMEM, 5 µl Lipofectamin (x2)
- b) 250 µl DMEM, 5 µl siRNA
- c) 250 µl DMEM, 5 µl Kontroll-siRNA

Anschließend wurden je die Ansätze a) und b) sowie a) und c) vereint und 20 min inkubiert.

Von den Zellen wurde das Nährmedium abgesaugt und die entsprechenden Transfektionsansätze wurden auf die Kulturschalen gegeben. Die Schalen wurden zudem mit DMEM-Komplettmedium aufgefüllt.

Nach 3 bis 6 h wurde ein Mediumswechsel durchgeführt und zu diesem Zeitpunkt wurde auch 150 mM Saccharose auf die gewünschten Schalen gegeben. Nach 36 h wurde der ganze Vorgang wiederholt. Nach insgesamt 72 h wurden die Zellen geerntet.

## 3.7 Klonierung

### 3.7.1 Oligonukleotide

Oligonukleotidbezeichnung	Sequenz
CREB Primer 1 for HindIII	GATCAAGCTTATGACCATGGAATCTGGA
CREB Primer 2 rev BamHI	GATCGGATCCATCTGATTTGTGGCAGTA
LIMP-2 Primer 1 rev HIND III	GATCAAGCTTCCAGGGATCCAAGTCAA
LIMP-2 500 Primer 2 for EcoR I	GATCGAATTCATGAGTGTGTGAACCAGG
LIMP-2 1000 Primer 3 for EcoR I	GATCGAATTCCTCCGACTCCACCCCCT
LIMP-2 250 Primer 4 for EcoR I	GATCGAATTCCTCTCCCGAGCTGCGC
LIMP-2 TFBS ex Primer 5 for	TGCGGCGAGCCCCACTCTCCCGAG
LIMP-2 TFBS ex Primer 6 rev	CTCGGGAGAGTGGGGCTCGCCGCA
LIMP-2 Primer 7 for EcoR I	GATCGAATTCGCTTCCTCCACCCAACC
MYCF1	ACACCATGGGAGCTGGTAAT
MYCR1	CTTCWTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT
MYCF2	GTTCTTTGAAAAGTGAAT
MYCR2	GCATCCACCAWAWACTCT
pF3r	GAGACTCCATTCGGGTGTTCT
pFrog-hin	GAGAACCCACTGCTTACTGG
TFEB for HIND III	GATCAAGCTTATGGCGTCACGCATAGGG
TFEB rev BamH I no Stop	GATCGGATCCCAGCACATCGCCCTCCTC
TFEB S211A Primer 1 for	GGGCGTCACCAGCAGCGCCTGCCC
TFEB S211A Primer 2 rev	GGGCAGGCGCTGCTGGTGACGCC

W, Y sind sog. *Wobble*-Basen, also gemischte Basen; W = A+T; Y = C+T



### 3.7.2 Vektoren

#### **pFrog**

Der pFrog-Vektor wurde ursprünglich als eine Abwandlung des pcDNA3.1 (+)-Vektors (Invitrogen, Darmstadt, D) hergestellt, um komplementäre RNS zu synthetisieren (Gunther *et al.* 1998). Er besitzt 5'- und 3'-untranslatierte Regionen des  $\beta$ -Globingens aus *Xenopus laevis*. Der pFrog-Vektor bietet eine Resistenz gegen Neomycin und Ampicillin. Als Restriktionsenzyme wurden bei der Klonierung BamH I und Hind III verwendet.

#### **pcDNA3.1**

Der pcDNA3.1-Vektor (Invitrogen, Darmstadt, D) erbringt eine hohe Expression des Zielgens, da er drei Promotoren enthält. Er bietet eine Resistenz gegen Neomycin und Ampicillin und lässt sich mit seinem pUC-Ursprung gut in *E. coli* replizieren.

#### **pEZX-PG02**

Der pEZX-PG02-Vektor (Genecopoeia, Rockville, USA) enthält das Luziferase-Gen des Ruderfußkrebses *Gaussia princeps*, welches in dieser Arbeit für Luziferase-Assays genutzt wurde. Die als Promotor verwendeten DNS-Sequenzen werden in Abschnitt 4.1.2 genauer beschrieben. Der Vektor bietet eine Resistenz gegen Puromycin und Kanamycin. Als Restriktionsenzyme wurden bei der Klonierung EcoR I und Hind III verwendet.

#### **pGL4**

Der pGL4-Vektor (Promega, Mannheim, D), der ebenfalls in dieser Arbeit verwendet wurde, enthält das Luziferase-Gen der Seefeder *Renilla reniformis*. Er wurde als Expressionskontrolle zusätzlich zum pEZX-PG02-Vektor transfiziert, um die basale Expressionsrate nach Transfektion zu ermitteln. Da responsive Elemente in diesem Vektor nicht vorhanden sind, kommt es lediglich zu einer konstitutiven Expression des Luziferase-Gens. Der Vektor bietet eine Resistenz gegenüber Ampicillin.

### 3.7.3 Plasmide

Plasmidbezeichnung	Vektor	Resistenz	Herkunft
$\alpha$ -Synuclein	pcDNA3.1-HA	Ampicillin	Michelle Rothaug, Kiel, D
GLuc $\beta$ -GC HPRM24726-PG02	pEZX-PG02	Puromycin, Kanamycin	GeneCopoeia, Rockville, USA
GLuc LIMP-2 HPRM18018-PG02	pEZX-PG02	Puromycin, Kanamycin	GeneCopoeia, Rockville, USA
GLuc Negativvektor NEG-PG02	pEZX-PG02	Puromycin, Kanamycin	GeneCopoeia, Rockville, USA
h $\beta$ -GC	pFrog	Ampicillin, Neomycin	Michael Schwake, Kiel, D
h $\beta$ -GCmut L444P	pFrog	Ampicillin, Neomycin	Michael Schwake, Kiel, D
hCREB1	pFrog-myc	Ampicillin, Neomycin	Eigene Herstellung, cDNS von Source BioScience LifeSciences
hTFEB	pcDNA3-Flag	Ampicillin	Andrea Ballabio, Houston, USA
hTFEBmut S211A	pFrog-myc	Ampicillin, Neomycin	Eigene Herstellung, cDNS aus dem Konstrukt hTFEB
mLIMP-2	pFrog-myc	Ampicillin, Neomycin	Michael Schwake, Kiel, D
Renilla	pGL4	Ampicillin	Promega, Mannheim, D

h: human; m: murin

### 3.7.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der PCR werden DNS-Fragmente amplifiziert.

1  $\mu$ l 10  $\mu$ M Vorwärtsprimer und 1  $\mu$ l 10  $\mu$ M Rückwärtsprimer mit 2,5  $\mu$ l DMSO, 5  $\mu$ l 10x Pfu-Puffer (+MgSO<sub>4</sub>), 4  $\mu$ l 2 mM dNTPs, 1  $\mu$ l der zu amplifizierenden DNS, 36  $\mu$ l Wasser und 0,5

µl Pfu-DNS-Polymerase ansetzen. Nach kurzem Schütteln wurde die Probe im PCR-Cycler mit folgendem Programm inkubiert:

5 min bei 95 °C  
 30 sec bei 95 °C  
 30 sec bei 58 °C  
 90 sec bei 72 °C  
 10 min bei 72 °C

} x 45

bis zur Weiterverarbeitung bei 10 °C.

### 3.7.5 Fusions-PCR

Zur Fusionierung zweier DNS-Fragmente wird eine Fusions-PCR durchgeführt.

Bei der ersten PCR wurden zwei Stücke des Gens amplifiziert, wobei ein PCR-Ansatz den normalen Vorwärtsprimer sowie den rückwärtsgewandten Primer an der Mutationsstelle enthielt, während im zweiten Ansatz der normale Rückwärtsprimer sowie der vorwärtsgewandte Primer an der Mutationsstelle verwendet wurden.

Bei der darauf folgenden Fusions-PCR wurden je 7 µl der beiden DNS-Fragmente aus der ersten PCR eingesetzt, die nun fusioniert werden sollten. Der Rest des Protokolls entspricht dem der normalen PCR. Als Primer wurden nun diejenigen eingesetzt, die das komplette Gen einrahmen.

### 3.7.6 Gelelektrophorese und Eluation

Um die Länge der DNS-Fragmente nach der PCR zu kontrollieren, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Anschließend werden die aufgereinigten DNS-Fragmente wieder aus dem Gel gelöst.

Die DNS-Probe wurde mit 6x *Loading Dye* versetzt. Sie wurde in ein 1,5 %-iges Agarosegel geladen und bei 120 V für 30 min in 1x TAE-Puffer laufen gelassen.

Die Detektion erfolgte am UV-Tisch bzw. an der Agarosegel-Dokumentationsanlage.

Für die Eluation der DNS aus dem Agarosegel wurde das *High Pure PCR Product Purification Kit* von Roche (Mannheim, D) nach Herstellerangaben verwendet.

### 3.7.7 Restriktionsverdau

Vorbereitend auf die Insertion in einen Vektor werden die Enden der DNS-Fragmente nach der PCR mit Restriktionsenzymen zugeschnitten.

Für den Verdau des DNS-Fragments wurden 50 µl des PCR-Produkts mit 5,5 µl BamH I-Puffer angesetzt. Sollte das Fragment mit EcoR I und Hind III verdaut werden, so wurde je 1 µl jedes Enzyms zugegeben. Sollte es dagegen mit Hind III und BamH I verdaut werden, so wurden 2 µl Hind III und 1 µl BamH I zugegeben.

Für den Vektorverdau wurden 2 µg Vektor, 2 µl BamH I-Puffer und dieselben Mengen Enzym wie im Fragmentverdau eingesetzt. Diese Ansätze wurden ad 20 µl mit Wasser aufgefüllt.

Die Restriktionsverdaue wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Auf den Vektorverdau wurde vor der weiteren Verarbeitung noch 1 µl FastAP für 15 min bei 37 °C zugegeben.

### 3.7.8 Ligation

Abschließend wurden die generierten DNS-Fragmente in Vektoren eingebracht.

Für die Ligation der gewünschten DNS mit einem Vektor wurden 7 µl des verdauten DNS-Fragments mit 1 µl verdautem Vektor sowie 1 µl T4-Ligase und 1 µl Ligasepuffer im 17 °C Wasserbad über Nacht inkubiert. Als Negativkontrolle wurde der gleiche Ansatz aber mit 7 µl Wasser statt des DNS-Fragments hergestellt.

Am Folgetag wurden die Ansätze 15 min bei 65 °C inaktiviert.

### 3.7.9 Transfektion von *E. coli*

Zur Amplifizierung von Plasmiden wurden diese DNS-Fragmente in *E. coli* transfiziert und mit MINI und MIDI aufgereinigt.

1 µl Plasmid wurde auf 50 µl elektrokompenter *E. coli*-Bakterien (bereitgestellt von Judith Peters und Lisa Andresen, Protokoll aus der Dissertation von Christina Zachos, 2012, S. 57) in eine Küvette gegeben. Bei einer Einstellung von 2,5 V wurde ein 7,5 – 8,5 sec langer Elektropuls abgegeben. Selbiges Protokoll war auch immer mit der Negativkontrolle durchzuführen. Die Zellen wurden daraufhin in 1 ml LB-Medium resuspendiert und bei 37 °C für 30 min inkubiert.

### 3.7.10 Plasmidaufreinigung und -amplifikation

#### Plasmidaufreinigung

Für eine Plasmidaufreinigung („MINI“) wurden die transfizierten *E. coli* auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Die LB-Agarplatte war so zu wählen, dass sie mit dem Antibiotikum versetzt war, gegen welches das entsprechende Plasmid eine Resistenz besitzt. Über Nacht wurde die Platte bei 37 °C inkubiert.

Am Folgetag waren auf der Kontroll-Platte keine Kolonien zu erwarten, während auf der Platte mit Plasmid einige Kolonien gewachsen waren. Diese wurden nun einzeln mit einem Zahnstocher gepickt und über Nacht in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum im Drehrad inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wurde die MINI mit dem *Plasmid Miniprep Kit GeneJET* von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) nach Firmenangaben geerntet.

Die DNS-Reinheit wurde mit dem Multifunktionsplattenlesegerät bestimmt. Außerdem wurden stets ein Kontrollverdau und eine Sequenzierung durchgeführt.

#### Plasmidamplifikation

Für eine Plasmidamplifikation („MIDI“) wurden die transfizierten *E. coli* in 100 ml LB-Medium in einen 500 ml Erlenmeyerkolben gegeben. Das LB-Medium war so zu wählen, dass es mit dem Antibiotikum versetzt war, gegen welches das entsprechende Plasmid eine Resistenz trägt. Über Nacht wurden die Erlenmeyerkolben auf einem Horizontalschüttler bei 37 °C inkubiert.

Am Folgetag wurde die MIDI mit dem *Plasmid Midiprep System PureYield* von Promega (Mannheim, D) nach Firmenangaben geerntet.

Die DNS-Reinheit wurde mit dem Multifunktionsplattenlesegerät bestimmt.

### 3.7.11 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von der Firma GATC-Biotech (Konstanz, D) über das Programm *LIGHTrun<sup>TM</sup>* Sequenzierung durchgeführt.

### 3.8 Luziferase-Assay

Um die Aktivität von Promotoren zu messen, wurden in dieser Arbeit Luziferase-Assays verwendet. Dabei war der zu untersuchende Promotor einem Luziferase-Gen vorgeschaltet. Diese Luziferase löste nach Zugabe von Substrat eine Lumineszenz der Probe aus. Je aktiver der Promotor war und je mehr dadurch das Luziferase-Gen abgelesen wurde, desto stärker war die Lumineszenz der Probe.

#### 3.8.1 Gaussia-Luziferase-Assay

Zellen wurden für den Assay in 24-*well*-Platten je als Doppelansätze wachsen gelassen. Das gemessene Medium wurde entweder direkt ab Stimulationsbeginn nicht mehr gewechselt oder 5 h nach einer Transfektion einmalig gewechselt.

Der Gaussia-Luziferase-Assay wurde nach Herstellerangaben von GeneCopoeia (Rockville, USA) mit dem GL-S-Puffer durchgeführt, wobei das Reaktionsreagenz wie folgt abgewandelt wurde: 95% Wasser, 5 % GL-S-Puffer, 0,5% Luziferase-Substrat. Dieses wurde etwa 30 min präinkubiert.

In der Zwischenzeit wurde das angereicherte Medium von den Zellen abgenommen und 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

Für die Messung wurde ein Injektionsvolumen von 95 µl, eine Integrationszeit von 2 sec und eine Verzögerung von 60 sec festgelegt.

Bei dem in Abschnitt 4.3 beschriebenen *screening* wich die Präinkubationszeit des Reaktionsreagenz von den hier genannten 30 min ab, da die Aufbereitung der Proben sich aufgrund der hohen Anzahl verzögerte. Hierdurch kam es zu insgesamt höheren Lumineszenzwerten, welche keine starken Differenzen untereinander mehr zeigten. Dies erklärt beispielsweise, warum der im *screening* ermittelte Saccharose-Wert wesentlich weniger von der unbehandelten Probe abweicht, als in den vorherigen Messungen.

#### 3.8.2 Renilla-Luziferase-Assay

Zellen wurden für den Assay in 24-*well*-Platten wachsen gelassen.

Für den Renilla-Luziferase-Assay wurden die Zellen je *well* mit 100 µl Lysispuffer lysiert. Nach 30 min auf dem Horizontalschüttler wurden die Lysate 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert.

Von dem Überstand wurden 20 µl in eine weiße 96-well-Platte überführt, wobei immer Duplikate gemessen wurden.

Der Renilla-Luziferase-Assay wurde mit einem Reaktionsreagenz, das zu 98 % aus Puffer und zu 2 % aus 50x Luziferase-Substrat bestand, durchgeführt.

Für die Messung wurde ein Injektionsvolumen von 95 µl, eine Integrationszeit von 10 sec und eine Verzögerung von 0,4 sec festgelegt.

### **3.9 Western blot**

Beim *Western blot* werden die Proteine einer Probe nach ihrer Größe in einem Gel aufgetrennt. Mittels spezifischer Antikörper können gezielt einzelne Proteine in der Probe nachgewiesen werden. Die Menge des Proteins lässt sich quantifizieren und es können nach Zusatzverfahren auch Aussagen über die Lokalisation des Proteins getroffen werden.

#### **3.9.1 Zellernte und Aufbereitung**

Die zu erntenden Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen (HEK-Zellen wegen ihrer geringen Adhärenz nur einmal waschen). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS abgeschabt und 10 min bei 4 °C und 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 – 500 µl PBS/*Complete*/1 % Triton-X resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde zweimal für je 10 sec im Ultraschallbad sonifiziert, was nach einer halben Stunde Wartezeit auf Eis wiederholt wurde. Anschließend wurde die Suspension für 10 min bei 4 °C und 13000 rpm abzentrifugiert. Im Überstand befanden sich nun die gelösten Proteine.

Der Proteingehalt wurde mit dem Multifunktionsplattenlesegerät und dem BCA Protein Assay bestimmt.

Um die Zelllysate für das *Western blot* Verfahren vorzubereiten, wurden sie ad 2 µg/µl in Lämmli Ladepuffer angesetzt.

#### **3.9.2 Gelelektrophorese**

Für die Gelelektrophorese wurde 7,5 %-ige oder 10 %-ige SDS-Gele gegossen. Die in Lämmli Ladepuffer angesetzten Proteine wurden mit 20 µl je Tasche in die Sammelgele aufgetragen und bei 100 V im Gelelektrophoresepuffer nach Bedarf aufgetrennt.

### **3.9.3 Blotting-Verfahren**

Zum *Blotting* wurden die fertig aufgetrennten SDS-Gele auf ein Whatman-Papier gelegt und mit Gel-*Blotting*-Papier beidseits fixiert. Dann wurden die Proteine bei 100 V für 1 h im Transferpuffer auf das Whatman-Papier übertragen.

Im Anschluss wurde die Membran in 2 % Milchpulver in TBS/T blockiert.

### **3.9.4 Detektion**

Zur Detektion spezifischer Proteine wurde die blockierte Membran über Nacht in den entsprechenden Erstantikörper gegeben, der in 2 % Milchpulver in TBS/T gelöst worden war (Konzentration der Antikörper s. Tabelle 3.5.1). Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal 10 min in TBS/T gewaschen und dann für 1 h in den Zweitantikörper gegeben (s. Tabelle 3.5.2). Anschließend wurde die Membran dreimal 20 min in TBS/T gewaschen und dann mit ECL am ImageQuant LAS 4000 detektiert.

### **3.9.5 EndoH- und PNGase F-Verdau**

#### **EndoH-Verdau**

Im EndoH-Verdau werden von Proteinen alle Zuckerreste abgespalten, die bereits im ER vorhanden sind. Dieser Verdau wird in Kombination mit dem PNGase F-Verdau genutzt, um die Lokalisation des Zielproteins zu bestimmen (vgl. Abschnitt 4.4.3).

50 µg Protein (ad 20 µl mit Wasser aufgefüllt) wurden mit 23 µl EndoH-Puffer versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Nachdem die Proben abgekühlt waren, wurden 2 µl EndoH hinzugegeben und der Ansatz bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde der Ansatz in Lämmli Ladepuffer angesetzt, 30 min bei 55 °C erwärmt und anschließend im SDS-Gel aufgetrennt.

#### **PNGase F-Verdau**

Im PNGase F-Verdau werden alle N-Glykosylierungen von dem untersuchten Protein abgeschnitten. Hierbei werden auch die Zuckerreste entfernt, die erst in post-ER-Kompartimenten vorliegen (vgl. Abschnitt 4.4.3).



50 µg Protein (ad 20 µl mit Wasser aufgefüllt) wurden mit 11,5 µl PNGase F-Puffer 1 versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden 12,5 µl PNGase F-Puffer 2 hinzugegeben. Nachdem die Proben abgekühlt waren, wurden 2 µl PNGase F zugefügt und der Ansatz bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde der Ansatz in Lämmli Ladepuffer angesetzt, 30 min bei 55 °C erwärmt und anschließend im SDS-Gel aufgetrennt.

Parallel zum EdnoH- und PNGase F-Verdau wurde auch immer ein Ansatz mit unverdauten Lysaten aufbereitet, der mit Lämmli Ladepuffer versetzt und 30 min bei 55 °C erwärmt wurde.

### **3.9.6 Strippen**

Um eine mit Protein beladene *Blotting*-Membran wieder von Antikörpern zu befreien, wurde sie *gestriipt*. Hierzu wurde sie 30 min in *Stripping*-Puffer bei 65 °C erwärmt und anschließend mehrfach mit TBS/T gewaschen, bis kein Geruch nach Mercaptoethanol mehr vorhanden war. Danach konnte mit einem neuen Antikörper Protein detektiert werden.

## **3.10 Enzym-Aktivitäts-Assays**

Zum Nachweis der Aktivität von Enzymen können den Proben artifizielle Substrate zugegeben werden. Anhand der darauf folgenden Reaktion kann ein Rückschluss auf die Enzymaktivität stattfinden.

### **3.10.1 $\beta$ -GC-Aktivitäts-Assay**

Alle Werte wurden als Doppelwerte angesetzt und dann noch einmal als Duplikate gemessen. Es wurden je Probe also zwei Reaktionsgefäße mit je 100 µl  $\beta$ -GC-Substrat (s. Tab. 3.4) und 10 µl Protein (mindestens 200 µg) angesetzt. Außerdem wurde ein Leerwert bestehend aus 100 µl Substrat und 10 µl Zitratpuffer hergestellt.

Diese Ansätze wurden exakt 120 min bei 37 °C inkubiert und mit 500 bis 1000 µl Stop-Lösung abgestoppt. Anschließend wurden sie 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und mit 161 µl pro *well* in eine 96-*well*-Platte überführt (Schichtdicke der Lösung 1 cm). Die Platten wurden im Multifunktionsplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 405 nm ausgelesen.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe folgender Rechnung:

$$\text{Faktor: } \frac{V \text{ total (ml)} \times 1000}{e \times V \text{ Probe (ml)} \times t \text{ (min)}}$$

$$e = 18,51 \times \text{mMol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

$\Delta E$  = Extinktion Probe – Extinktion Leerwert

$$\text{mU/ml} = \Delta E \times \text{Faktor}$$

anschließend mit der Proteinkonzentration ins Verhältnis setzen → mU/mg

### 3.10.2 $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivitäts-Assay

Das Protokoll entspricht dem des  $\beta$ -GC-Aktivitäts-Assays (s. Abschnitt 3.10.1). Als Substrat wurde hier aber das  $\beta$ -Hexosaminidase-Substrat (s. Tab. 3.4) verwendet und die Inkubationszeit lag bei etwa 5 min.

## 3.11 Immunfluoreszenz

In der Immunfluoreszenz werden Proteine in fixierten Zellen sichtbar gemacht. Mittels spezifisch bindender Antikörper werden Oberflächenstrukturen der Proteine gebunden und durch einen Sekundärantikörper kommt es zu einem fluoreszierenden Signal.

### 3.11.1 Färbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden Zellen etwa bis zu einer 50 %-igen Konfluenz auf Deckgläsern wachsen gelassen und dann einmal mit PBS gewaschen. Zur Fixation wurden sie anschließend 20 min in 4 % PFA/PBS inkubiert. Danach wurden sie erneut 3 mal in PBS gewaschen und 5 min mit 0,2 % Saponin/PBS bedeckt. Anschließend wurden sie 10 min in einer Lösung aus 0,2 % Saponin, 0,12 % Glycin und PBS stehen gelassen, um danach mit einer Lösung aus 10 % FCS, 0,2 % Saponin und PBS für 15 min blockiert zu werden.

In der feuchten Kammer wurden die Deckgläser nun im Erstantikörper, der ebenfalls in 10 % FCS, 0,2 % Saponin und PBS angesetzt war (Verhältnis s. Tabelle 3.5.1), für 1 h im Dunkeln inkubiert. Dann wurden sie 4 mal in 0,2 % Saponin/PBS gewaschen und im Zweitantikörper, der auch in 10 % FCS, 0,2 % Saponin und PBS angesetzt war (Verhältnis s. Tabelle 3.5.2), für 1 h im Dunkeln inkubiert.

Zum Schluss wurden die Deckgläser 4 mal in 0,2 % Saponin/PBS und 2 mal in Wasser gewaschen, bevor sie mit Mowiol/DABCO/DAPI auf die Objektträger gebracht wurden.

Nach 1 bis 2 Tagen zum Härten wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

### **3.11.2 Transferrin-Aufnahme-Test**

COS7-Zellen wurden auf Deckgläsern in DMEM-Komplettmedium in zwei Schalen wachsen gelassen. Dann wurden die Zellen 3 h in DMEM-Medium ohne FCS hungern gelassen, wobei in eine der Schalen 80  $\mu$ M Dynasore gegeben wurde. Danach wurden die Zellen einmal mit EBSS gewaschen. Markiertes Transferrin-488 wurde mit einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ml in EBSS auf die Zellen gegeben und bei 4 °C für 20 min inkubiert. Anschließend wurde das EBSS abgesaugt und warmes DMEM für eine Schale mit 80  $\mu$ M Dynasore, für die andere Schale mit DMSO auf die Zellen gegeben. Über 10 min konnte das Transferrin-488 nun bei 37 °C internalisiert werden. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4 % PFA/PBS fixiert. Eine Fluoreszenzfärbung wurde wie zuvor beschrieben vorgenommen (s. Abschnitt 3.11.1 ).

### **3.11.3 LysoTracker-Färbung**

Mittels LysoTracker-Färbung können saure Organellen in Zellen sichtbar gemacht werden. Hierbei dient der LysoTracker als Indikator, welcher durch Protonierung im sauren Milieu zu Fluoreszenz angeregt wird.

COS7-Zellen wurden auf Deckgläsern in DMEM-Komplettmedium in zwei Schalen wachsen gelassen. Auf eine Schale wurde nun 100 nM Bafilomycin A1 gegeben und 4 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und LysoTracker 1:3000 in DMEM auf die Zellen gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen

einmal mit PBS gewaschen, 20 min in 4% PFA/PBS fixiert, erneut 3 mal mit PBS gewaschen und sofort anschließend mit DAPI eingedeckelt.

## 3.12 Computerbasierte Methoden

### 3.12.1 Software und Statistik

Software	Hersteller
Adobe Imager	Adobe Systems GmbH, San Jose, CA, USA
Adobe Photoshop	Adobe Systems GmbH, San Jose, CA, USA
AxioVision	Zeiss, Jena, D
Excel	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
FV10-ASW 4.1 Viewer	Olympus, Hamburg, D
GEN5™ 1.09	BioTek Instruments Inc., Bad-Friedrichshall, D
Genomatix	Genomatix Software GmbH, München, D
GloMax	Promega, Mannheim, D
GraphPad Prism 5.01	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
ImageJ	<a href="http://rsbweb.nih.gov/ij/">http://rsbweb.nih.gov/ij/</a>
ImageQuant TL	GE-Healthcare, München, D
Intas GDS Application	Intas GDS, Göttingen, D
Power Point	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

SeqBuilder	DNASTAR Lasergene <sup>®</sup> , Madison, USA
SeqMan Pro	DNASTAR Lasergene <sup>®</sup> , Madison, USA
Word	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

Mittelwerte und Verhältnisse wurden mit Excel, alle weiteren statistischen Auswertungen wurden mit GraphPad Prism berechnet.

### 3.12.2 *In silico* Analyse des Promotors

Die *in silico* Analyse des *SCARB2*-Promotors wurde mit der Software Genomatix (<http://www.genomatix.de/>) durchgeführt. Als Sequenz für den humanen *SCARB2*-Promotor wurde die Sequenz genutzt, die von der Firma GeneCopoeia (Rockville, USA) in ihrem Vektor HPRM18018-PG02 verwendet wird. Als murine *SCARB2*-Promotorsequenz wurde die Basenabfolge bis zur Position -1500 vor dem Startcodon für das LIMP-2-Gen genutzt.

Für eine generelle Suche nach möglichen Transkriptionsfaktorbindungsstellen wurde die Funktion MatInspector genutzt, die die Promotor-Sequenz nach bekannten Sequenzen durchsucht, an welche bekannte Transkriptionsfaktoren binden können. Hierbei wurde die *core similarity* auf den Wert 1 festgelegt.

Um konservierte Transkriptionsfaktorbindungsstellen zu identifizieren, wurde die Funktion DiAlign genutzt. Dabei wurde der humane *SCARB2*-Promotor mit dem murinen *SCARB2*-Promotor abgeglichen. Hier wurde die *core similarity* auf den Wert 1 festgelegt.

## **4 Ergebnisse**

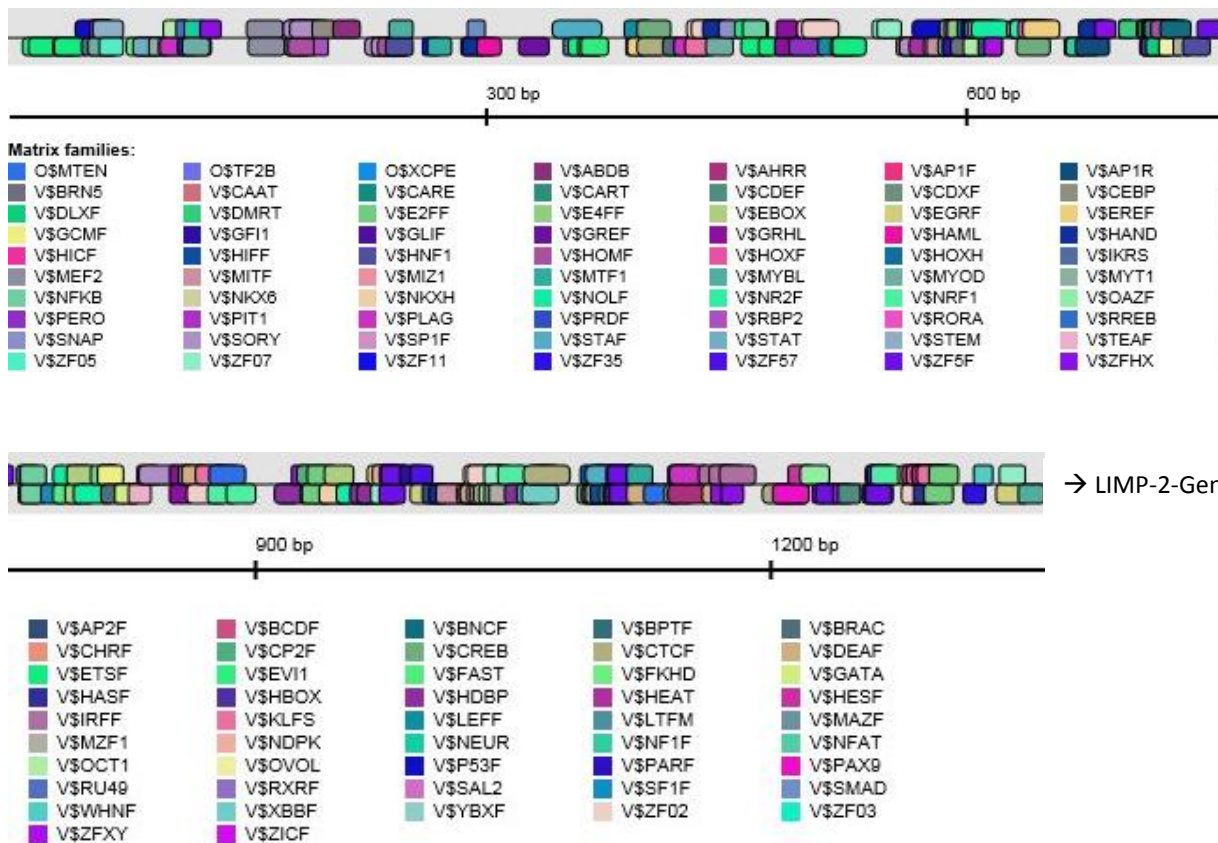
### **4.1 Grundlegende Charakterisierung des humanen *SCARB2*-Promotors**

#### **4.1.1 *In silico* Analyse des *SCARB2*-Promotors**

Das Ziel dieser Arbeit war, eine Substanz oder einen Transkriptionsfaktor zu identifizieren, der die Promotoraktivität des LIMP-2-Gens positiv beeinflusst. Dies könnte der Annahme nach zu einer erhöhten Expression von LIMP-2 und im weiteren einem vermehrten Transport von  $\beta$ -GC ins Lysosom führen und somit die Akkumulation von Glukosylceramid und letztendlich  $\alpha$ -Synuclein verhindern.

Die *SCARB2*-Promotorsequenz des der Arbeit zugrundeliegenden Konstrukts HPRM18018-PG02 von GeneCopoeia (Rockville, USA) wurde mit der Software MatInspector von Genomatix (<http://www.genomatix.de/>) zunächst auf Sequenzen durchsucht, an welche bereits bekannte Transkriptionsfaktoren binden. Dabei wurden insgesamt 294 Transkriptionsfaktorbindungsstellen identifiziert. Da einige Bindungsstellen mehrfach vorkommen, sind hierunter allerdings nur 117 verschiedene Matrizes auszumachen (s. Abb. 4.1.1.1).

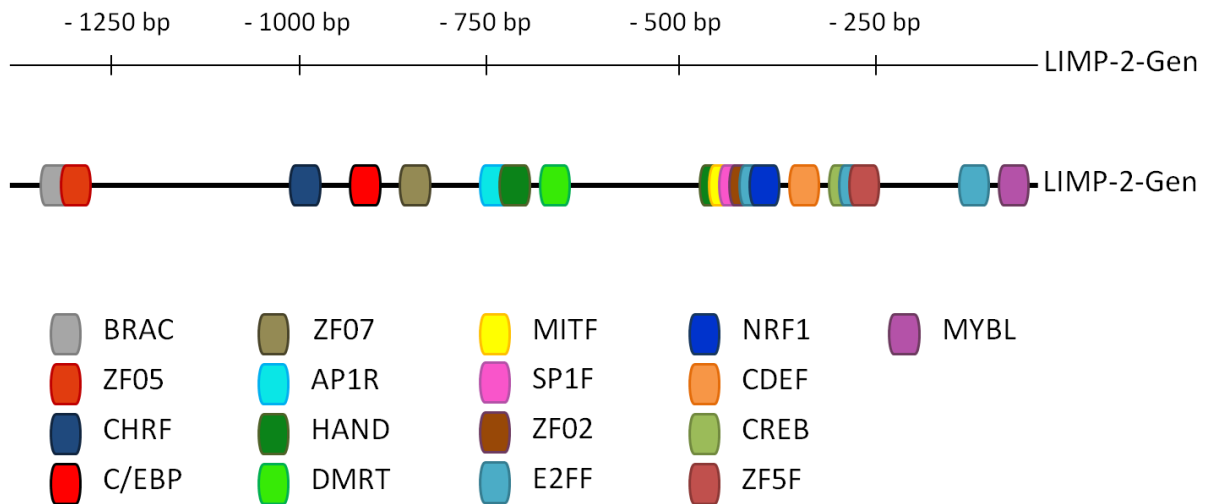
Auffällig ist, dass es für die meisten Transkriptionsfaktoren nur eine potenzielle Bindungsstelle gibt, für andere kommen die Matrizes dagegen in größerer Anzahl vor. Beispielsweise ist die Bindungsstelle E2FF 15 mal vorhanden und somit am häufigsten, während die Bindungsstelle CREB fünfmal und die Bindungsstelle MITF nur zweimal im Promotor vertreten sind.



**Abbildung 4.1.1.1: SCARB2-Promotor mit Transkriptionsfaktorbindungsstellen.** Schematische Übersicht des *SCARB2*-Promotorkonstrukts HPRM18018-PG02 mit farbig markierten Sequenzen, für die gezeigt wurde, dass bestimmte Transkriptionsfaktoren an diese binden können. Die Namen der Matrizes sind mit entsprechender Farbkodierung aufgeführt. Die Abbildung wurde mit der Software MatInspector von Genomatix erstellt.

Des Weiteren wurde mit der Software DiAlign von Genomatix nach zwischen Mensch und Maus konservierten Matrizes gesucht. Es ist zu erwarten, dass Sequenzen, die evolutionär konserviert sind, funktionell bedeutender sind, als solche, die nur in einer Spezies vorkommen (Koonin und Galperin 2003).

Hierdurch ließ sich die Anzahl an potenziellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen auf 19 reduzieren. Die Matrix HAND ist zweimal und E2FF dreimal vorhanden, sodass insgesamt 16 verschiedene konservierte Transkriptionsfaktorbindungsstellen im *SCARB2*-Promotorkonstrukt identifiziert werden konnten (s. Abb. 4.1.1.2 und Tabelle 8.1.1).



**Abbildung 4.1.1.2: SCARB2-Promotor mit konservierten Transkriptionsfaktorbindungsstellen.** Neben den zwischen Maus und Mensch konservierten Transkriptionsfaktorbindungsstellen ist in dieser Grafik noch die Bindungsstelle C/EBP eingezeichnet, über die Saccharose ggf. Einfluss auf die Transkription von Genen haben könnte (Helip-Wooley und Thoene 2004). Die genauen Sequenzen und Positionen sind im Anhang Tabelle 8.1.1 nachzulesen.

#### 4.1.2 Detektion der Promotor-Aktivität von Deletionskonstrukten des SCARB2-Promotors

Zur Feststellung, welche Abschnitte des SCARB2-Promotors aktivierende oder auch repressive Einflüsse auf die Promotoraktivität haben, wurden verschiedene Deletionskonstrukte des SCARB2-Promotors erstellt. Diese wurden in den Vektor pEZX-PG02 kloniert, sodass anhand des nachgeschalteten Gaussia-Luziferase-Gens die Transkriptionsaktivität der einzelnen Konstrukte gemessen werden konnte (s. Abb. 4.1.2 B und Tabelle 8.1.2.2).

Die Zellen wurden mit einem Renilla-Luziferase-Vektor (pGL4) kotransfiziert und es wurde zusätzlich eine Probe mit dem Negativvektor, der dem Vektor pEZX-PG02 ohne vorgeschalteten Promotor entspricht, als Negativ-Wert gemessen. Alle Zahlenwerte, die im Gaussia-Luziferase-Assay gemessen wurden, wurden zunächst auf die Renilla-Aktivität derselben Probe normiert, um die Werte an die Transfektionsrate anzugleichen. Diese Werte wurden wiederum auf den Negativ-Wert normiert, um die Promotoraktivität von der generellen transkriptionellen Grundaktivität abzugrenzen. Schließlich wurde noch eine Normierung auf den „Promotor 1350“ (enthält den SCARB2 Wildtyp Promotor, vgl. Abschnitt

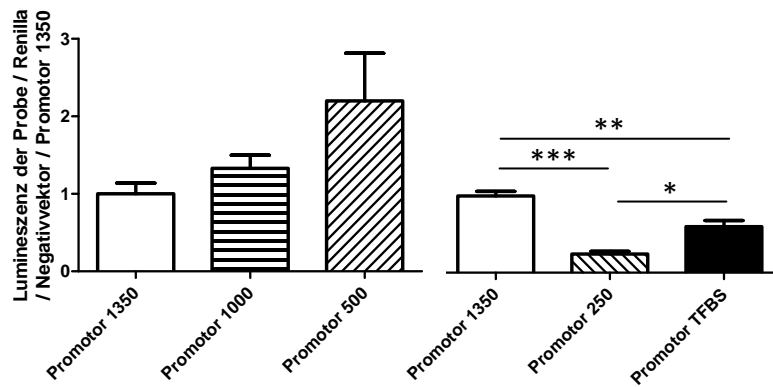


5.1) vorgenommen, da so direkt das Verhältnis der Aktivität der Deletionskonstrukte zum nativen *SCARB2*-Promotor abgebildet werden kann.

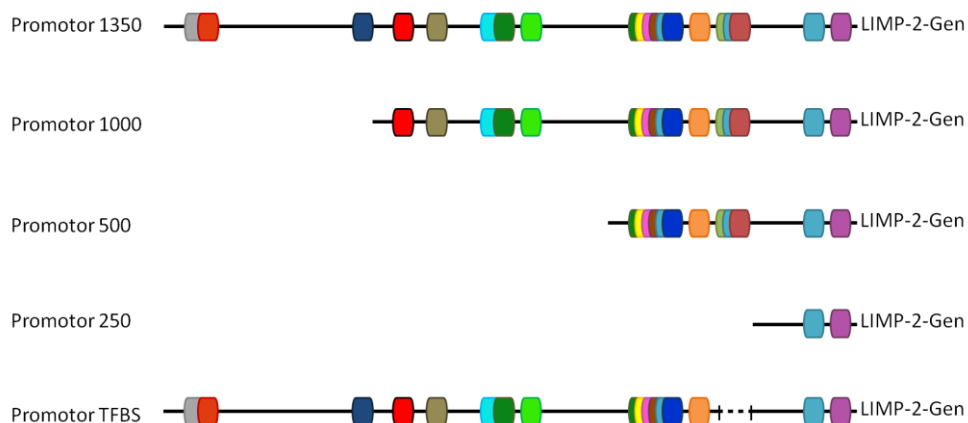
Es zeigte sich, dass die Entfernung der ersten 1000 Basenpaare zu einer Steigerung der Promotoraktivität auf das 2,2-fache führte (s. Abb. 4.1.2 A, Promotor 1000 und Promotor 500). Dies weist auf repressive Elemente in der frühen Promotorsequenz hin. Da lediglich nach Transkriptionsfaktoren gesucht werden sollte, welche die LIMP-2-Expression steigern, wurden die dort bindenden Transkriptionsfaktoren nicht in die weitere Analyse eingeschlossen. Die niedrigste Promotoraktivität wurde bei dem Konstrukt „Promotor 250“ gemessen (0,2-fach gegenüber „Promotor 1350“;  $p < 0,001$ ), welches noch aus etwa 250 Basenpaaren besteht. Somit zeigt sich, dass eine Deletion des *SCARB2*-Promotors auf lediglich 250 Basenpaare die Aktivität des Promotors fast vollständig unterbindet, was darauf schließen lässt, dass sich in diesem Bereich kaum regulatorische oder aber überwiegend repressive Elemente befinden. Des Weiteren stellt dieses Konstrukt somit eine Negativkontrolle für den Luziferase-Assay dar (s. Abb 4.1.2 A, Promotor 250).

Außerdem wurde die Aktivität des Deletionskonstruktes „Promotor TFBS“ (TFBS: Transkriptionsfaktorbindungsstelle) gemessen. In diesem Konstrukt wurde lediglich eine Sequenz von 34 Basenpaaren deletiert (GGCCCGCGAACGTCACGTCCCTGCGCGCTCCCTG), welche die Transkriptionsfaktorbindungsstellen CREB, E2FF und ZF5F enthält. Trotz dieser nur recht kleinen Deletion zeigte das Konstrukt eine auf das 0,6-fache verminderte Promotoraktivität gegenüber dem ursprünglichen *SCARB2*-Promotorkonstrukt „Promotor 1350“ ( $p < 0,01$ ) (s. Abb. 4.1.2 A und Tabelle 8.1.2.1). Dies lässt darauf schließen, dass sich in diesem Bereich essentielle Bindestellen für positiv wirkende Transkriptionsfaktoren befinden.

A



B



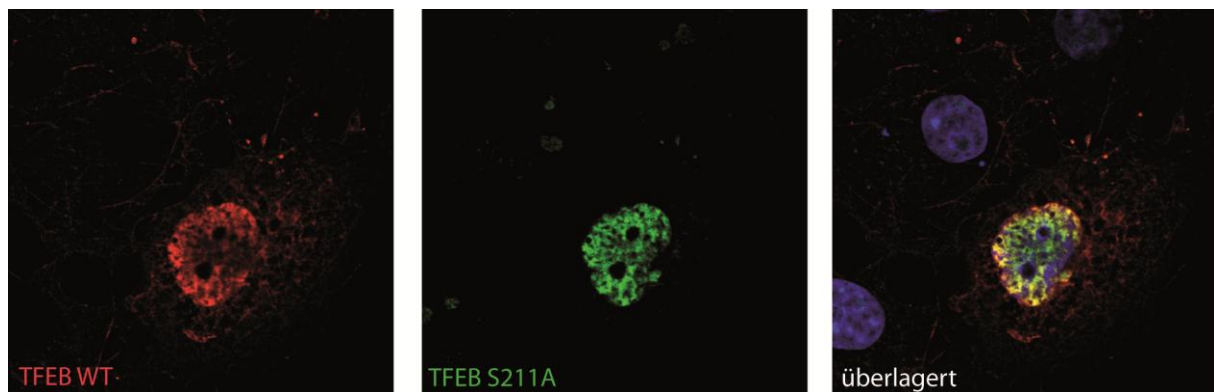
**Abbildung 4.1.2: Deletionskonstrukte des *SCARB2*-Promotors. (A)** Auswertung des Gaussia-Luziferase-Assays, in dem die Aktivität der einzelnen Deletionskonstrukte des *SCARB2*-Promotors gemessen wurde,  $n=3$ . Der Assay wurde in für 96 h transient transfizierten HEK-Zellen durchgeführt. Die Daten wurden mit dem ANOVA und *post hoc* Test Tukey ausgewertet,  $*=p<0,5$ ;  $**=p<0,01$ ;  $***=p<0,001$ ; Fehlerbalken zeigen SEM an. Siehe auch Anhang Tabelle 8.1.2.1. **(B)** Schematische Darstellung der Deletionskonstrukte, die in dem Gaussia-Luziferase-Assay verwendet wurden. Die farbig markierten Bereiche stellen die in Abb. 4.1.1.2 beschriebenen Transkriptionsfaktorbindungsstellen dar. Die genauen Deletionsbereiche sind im Anhang Tabelle 8.1.2.2 nachzulesen.

## 4.2 Untersuchung ausgewählter Substanzen auf ihr Aktivierungspotenzial für den humanen *SCARB2*-Promotor

### 4.2.1 Auswahl der zu untersuchenden Substanzen

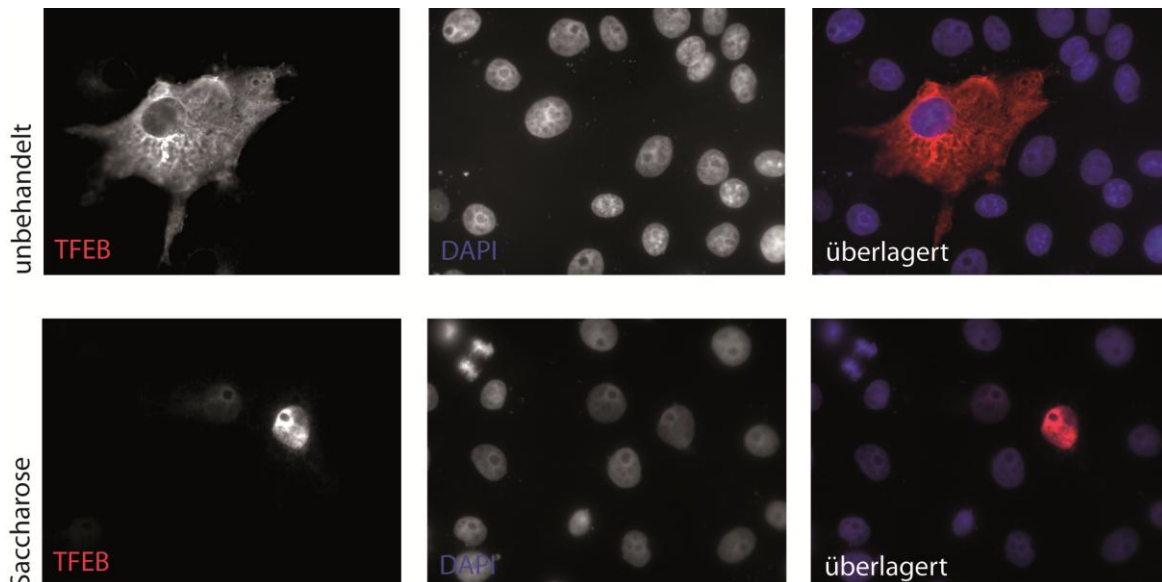
Im Folgenden wurden verschiedene Substanzen und Transkriptionsfaktoren bezüglich ihres Aktivierungspotenzials auf den *SCARB2*-Promotor getestet. Hierzu wurde mit dem Gaussia-Luziferase-Assay nach Stimulation der Zellen eine Steigerung oder Reduktion der Lumineszenz gegenüber einer unbehandelten Probe gemessen. Zur Stimulation wurden folgende Substanzen und Transkriptionsfaktoren eingesetzt (s. Abb. 4.2.1.3):

- **TFEB**, ein Transkriptionsfaktor, der nach heutigem Kenntnisstand ein Hauptregulator des Autophagie-Lysosomen Pfades ist und über das CLEAR-Netzwerk agiert (Palmieri *et al.* 2011); TFEB bindet laut Genomatix-Software an die Matrix MITF;
- **TFEB S211A**, eine konstitutiv aktive Mutante von TFEB, welche dauerhaft dephosphoryliert und damit aktiviert vorliegt (Roczniak-Ferguson *et al.* 2012) (s. Abb. 4.2.1.1);



**Abbildung 4.2.1.1: Lokalisation von Wildtyp TFEB und TFEB S211A.** Immunfluoreszenz von COS7-Zellen. Die Zellen wurden mit Wildtyp TFEB (Flag-tag) und TFEB S211A (myc-tag) transfiziert und für 48 h wachsen gelassen. Das Wildtyp TFEB ist sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu detektieren, während TFEB S211A nur im Zellkern vorliegt. Die Lokalisation im Zellkern spricht für einen aktiven Transkriptionsfaktor. AK: GTX30518 (myc), F1804 / M2 (Flag).

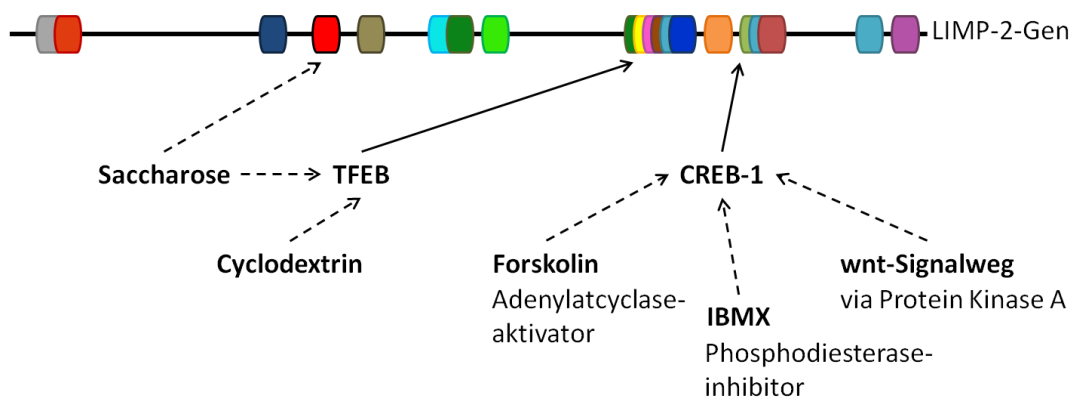
- **Saccharose**, die in vorherigen Untersuchungen zur Aktivierung von TFEB führte (Song *et al.* 2013) (s. Abb. 4.2.1.2); Saccharose könnte außerdem einen Einfluss über den Transkriptionsfaktor C/EBP auf dessen Matrix haben (Helip-Wooley und Thoene 2004);



**Abbildung 4.2.1.2: Einfluss von Saccharose auf TFEB.** Immunfluoreszenz von COS7-Zellen. Die Zellen wurden mit TFEB (Flag-tag) transfiziert und in DMEM-Komplettmedium ohne bzw. mit 150 mM Saccharose für 24 h wachsen gelassen. In den unbehandelten Zellen ist TFEB hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert, während in den mit Saccharose inkubierten Zellen TFEB größtenteils im Nucleus detektierbar ist. Eine Translokalisierung von TFEB in den Nucleus indiziert eine Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors. AK: F1804 / M2 (Flag).

- **Cyclodextrin** (2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin), welches ebenfalls als Aktivator von TFEB identifiziert wurde (Song *et al.* 2014);
- **CREB-1**, ein Transkriptionsfaktor, dem eine neuroprotektive Funktion zugeschrieben wird (Riccio *et al.* 1999); CREB-1 bindet laut Genomatix-Software an die Matrix CREB;
- **IBMX**, welches durch Inhibition der Phosphodiesterase zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung von CREB-1 führt (Alberts *et al.* 1994);
- **Forskolin**, welches durch eine Aktivierung der Adenylatcyclase A eine Phosphorylierung und damit Aktivierung von CREB-1 bewirkt (Barlow *et al.* 2008);
- **wnt-Medium** und das zugehörige Kontrollmedium **L-Medium**, da gezeigt wurde, dass der wnt-Signalweg CREB-1 aktiviert (Chen *et al.* 2005);

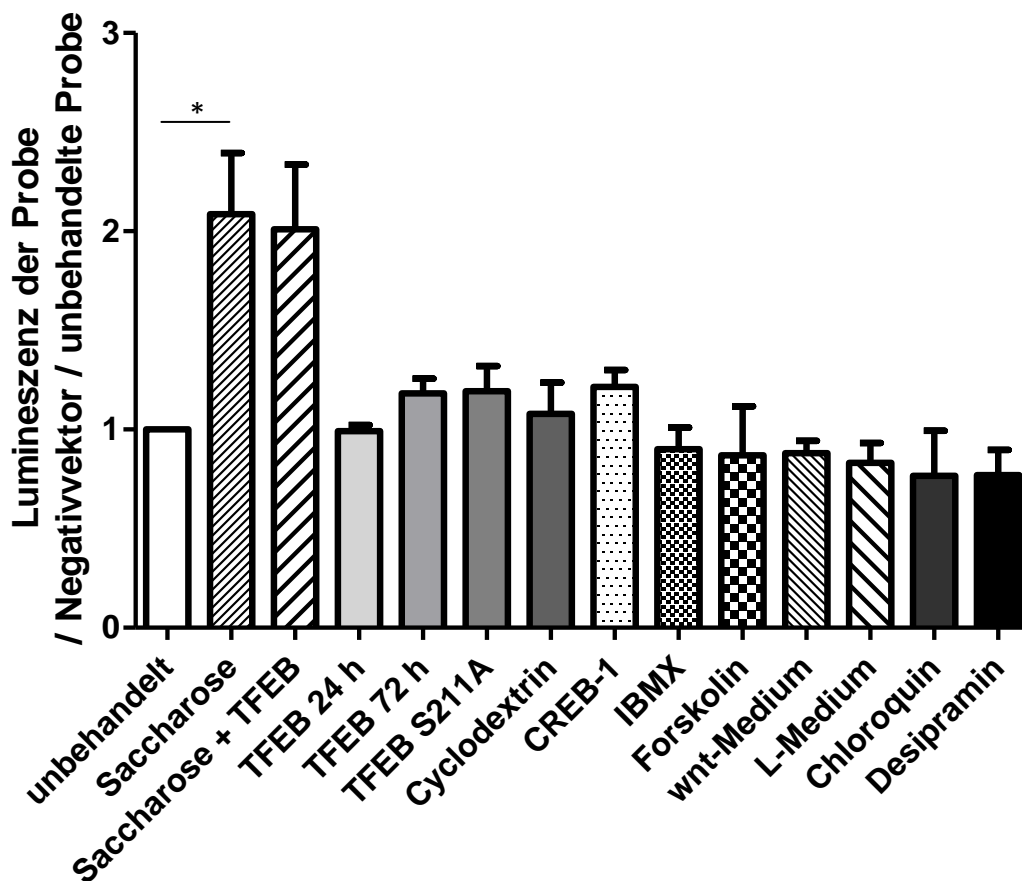
- **Chloroquin**, welches zur Gruppe der kationischen amphiphilen Medikamente (CADs) gehört und zur Membranpermeabilisierung von Lysosomen führen kann (Petersen *et al.* 2013, Saftig und Sandhoff 2013); über diesen lysosomalen Stress, könnte es zu einer Aktivierung des Promotors von *SCARB2* kommen;
- **Desipramin**, welches ebenfalls zur Gruppe der CADs gehört (Petersen *et al.* 2013) und auf dieselbe Fragestellung wie Chloroquin untersucht wurde.



**Abbildung 4.2.1.3: Wirkungsort der getesteten Substanzen.** Übersicht der Substanzen, die im Gaussia-Luziferase-Assay getestet wurden. In der schematischen Darstellung des *SCARB2*-Promotors sind die potenziellen Zielstrukturen der Substanzen und Transkriptionsfaktoren eingezeichnet.

## 4.2.2 Bestimmung des Aktivierungspotenzials der ausgewählten Substanzen mittels Luziferase-Assay

Zur Testung des Aktivierungspotenzials der einzelnen Substanzen und Transkriptionsfaktoren auf den *SCARB2*-Promotor wurden stabil-transfizierte HEK-Zellen in Zellkultur über eine jeweils definierte Zeit stimuliert (s. Abb. 4.2.2.1, Zeitangaben in der Bildunterschrift).



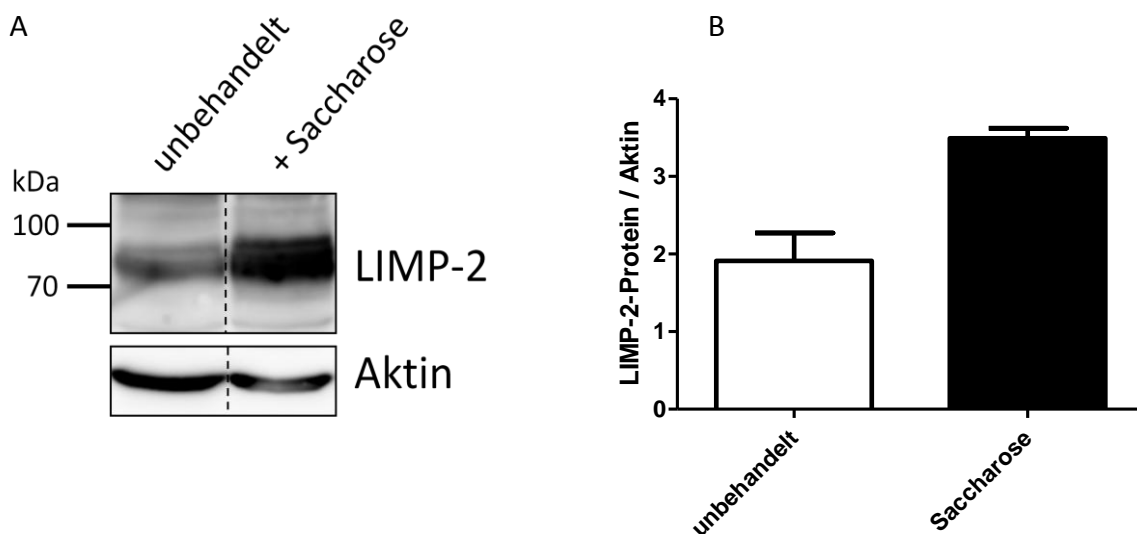
**Abbildung 4.2.2.1: Aktivierungspotenzial der einzelnen Substanzen für den *SCARB2*-Promotor.** Auswertung des Gaussia-Luziferase-Assays, in dem die Aktivität des *SCARB2*-Promotors nach Stimulation gemessen wurde,  $n=2-4$ . Der Assay wurde in stabil-transfizierten HEK-Zellen durchgeführt. Die angegebenen Substanzen wurden wie folgt eingesetzt: Saccharose 150 mM für 96 h; Saccharose 150 mM und TFEB gemeinsam für 96 h; TFEB für 24 h bzw. 72 h; TFEB S211A für 72 h; Cyclodextrin 1 mM für 72 h; CREB-1 für 72 h; IBMX 500  $\mu\text{M}$  für 24 h; Forskolin 25  $\mu\text{M}$  für 24 h; wnt-Medium für 24 h; L-Medium für 24 h; Chloroquin 10  $\mu\text{M}$  für 24 h; Desipramin 10  $\mu\text{M}$  für 24 h. Die Daten wurden mit dem ANOVA und *post hoc* Test Tukey ausgewertet,  $*=p<0,5$ ; Fehlerbalken zeigen SEM an. Anhang Tabelle 8.1.3.

Unter den getesteten Substanzen führte allein die Inkubation mit Saccharose zu einer signifikanten Erhöhung der Promotoraktivität. So ging die Stimulation der Zellen mit 150 mM Saccharose über 96 h mit einer Steigerung der Lumineszenz auf das 2,1-fache einher (s. Tabelle 8.1.3.). Da in diesem Assay die Lumineszenz ein direktes Maß für die

Promotoraktivität ist, lässt dies den Schluss zu, dass Saccharose die Promotoraktivität von *SCARB2* verdoppelt.

Die Kostimulation der Zellen mit Saccharose und TFEB zur selben Zeit führte zu keiner darüber hinausgehenden Aktivitätssteigerung. Leichte stimulierende Effekte zeigten sich außerdem unter Einwirkung von TFEB (72 h), TFEB S211A und CREB-1, wobei diese Auswirkungen nicht signifikant waren. Leichte repressive aber ebenfalls nicht signifikante Effekte waren nach Behandlung mit Chloroquin und Desipramin zu beobachten.

Zur Überprüfung des positiven Effekts von Saccharose wurde der Einfluss von Saccharose auf die LIMP-2-Proteinexpression mittels *Western blot* gemessen. Hier zeigte sich, dass unter Saccharose-Einwirkung tendenziell mehr LIMP-2-Protein vorliegt (s. Abb. 4.2.2.2, vgl. Abb. 4.4.3.1). Es kommt also durch Saccharose nicht nur zu einer Aktivitätssteigerung des *SCARB2*-Promotors, sondern es wird auch mehr Protein exprimiert. Dies könnte durch einen kausalen Zusammenhang zwischen Promotoraktivierung und LIMP-2-Expression erklärt werden (vgl. Abschnitt 5.2).



**Abbildung 4.2.2.2: Saccharose-induzierte LIMP-2-Expression.** (A) *Western blot* von HEK Zellen, die über 72 h mit bzw. ohne 75 mM Saccharose inkubiert wurden, n=3. Saccharose führt zu einer Expressionssteigerung von LIMP-2. AK: LIMP-2-T2 (LIMP-2), A2066 (Aktin). (B) Quantifizierung der LIMP-2-Expression im *Western blot* in HEK-Zellen, normiert auf Aktin, n=3. Die Stimulation der Zellen mit 75 mM Saccharose über 72 h führt zu einer 1,8-fachen Steigerung von exprimiertem LIMP-2-Protein. Die Daten wurden mit dem ANOVA und *post hoc* Test Tukey ausgewertet, ns; Fehlerbalken zeigen SEM an. Anhang Tabelle 8.1.4.

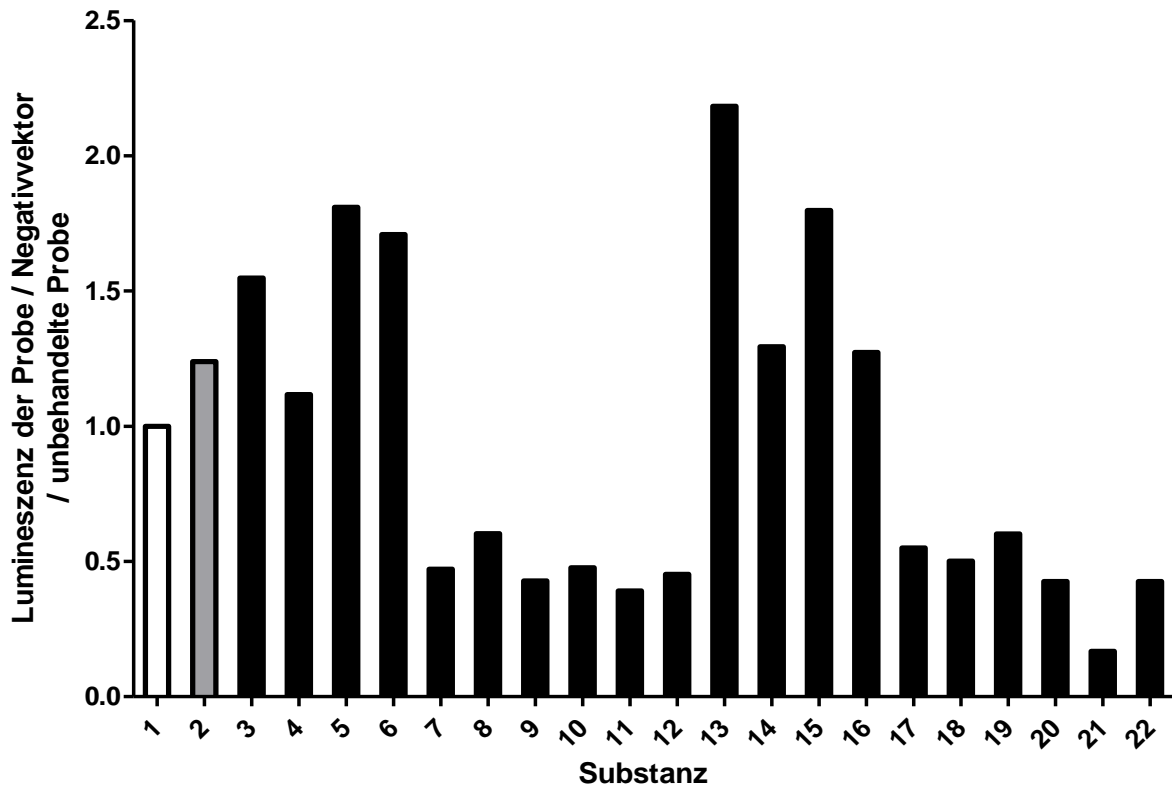
### **4.3 Screening von 20 Substanzen einer *compound library* auf ihr Aktivierungspotenzial für den humanen *SCARB2*-Promotor**

Die Methode des Luziferase-Assays wurde in dieser Arbeit etabliert, um in einer Fortsetzung des Forschungsprojektes größere Suchdurchläufe nach den *SCARB2*-Promotor aktivierenden Substanzen durchführen zu können.

Beispielhaft sollte hier mit dem Gaussia-Luziferase-Assay ein solches *screening* mehrerer Substanzen durchgeführt werden, ohne bereits im Vorfeld eine genauere Auswahl zu treffen. Hierfür wurden zufällig 20 Substanzen aus der *Compound Library* DIVERSet™ von Chembridge (San Diego, USA) ausgewählt und in einem einmaligen *screening* getestet (s. Abb. 4.3, Hinweis zur Durchführung im Abschnitt 3.8.1).

Es zeigte sich in dem Durchlauf, dass die Substanzen 7, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 18, 19, 20, 21 und 22 (vgl. Abb. 4.3) die Aktivität des *SCARB2*-Promotors reduzierten. Auf der anderen Seite führten die Substanzen 3, 5, 6, 13, 14, 15 und 16 (vgl. Abb. 4.3) zu einer Steigerung der Promotoraktivität über das Maß hinaus, welches durch Saccharose erzeugt werden konnte. Eine besonders starke Lumineszenz wurde nach Stimulation mit der Substanz 13 (3-(2-Chlorophenyl)-N-(5-Isopropyl-1,3,4-Thiadiazol-2-yl)-5-Methyl-4-Isoxazolcarboxamid) gemessen.





**Abbildung 4.3: Screening verschiedener Substanzen hinsichtlich ihres Aktivierungspotenzials.** Auswertung des Gaussia-Luziferase-Assays, in dem die Aktivität des *SCARB2*-Promotors nach Stimulation gemessen wurde (s. Tabelle 8.1.5). Der Assay wurde in stabil-transfizierten HEK-Zellen durchgeführt, n=1. Die angegebenen Substanzen wurden über 72 h wie folgt eingesetzt:

1: unbehandelt

2: Saccharose (150 mM)

3: N-(4-Methoxybenzyl)Cyclopentancarboxamid (100 µM)

4: {1-[2-(3-Methylphenoxy)Ethyl]-1H-Benzimidazol-2-yl}Methanol (100 µM)

5: N-(2,5-Dimethylphenyl)Cyclopentancarboxamid (100 µM)

6: 3-(4-Methyl-1-Piperazinyl)-1-(4-Phenoxyphenyl)-2,5-Pyrrolidindion (100 µM)

7: 2-Cyclohexyl-3a,4,7,7a-Tetrahydro-1H-Isoindol-1,3(2H)-dion (100 µM)

8: 3-Methyl-N-{{1-(3-Methylbenzoyl)-4-Piperidiny}Methyl}Benzamid (100 µM)

9: 2-Methyl-N-{{3-(4-Morpholinyl)Propyl}-3-Furamid (100 µM)

10: 5-Bromo-N-(3-Methylbutyl)-2-Furamid (100 µM)

11: 2-(4-Bromophenyl)-N-(5-Methyl-1,3-Thiazol-2-yl)Acetamid (100 µM)

12: N-(2-Methoxy-5-Methylphenyl)-5-Methyl-3-Phenyl-4-Isoxazolcarboxamid (100 µM)

13: 3-(2-Chlorophenyl)-N-(5-Isopropyl-1,3,4-Thiadiazol-2-yl)-5-Methyl-4-Isoxazolcarboxamid (100 µM)

14: N-1H-Benzimidazol-2-ylcyclopropanocarboxamid (100 µM)

15: N-(4-Methoxybenzyl)-2-Phenylcyclopropanocarboxamid (100 µM)

16: N-(2,3-Dihydro-1,4-Benzodioxin-6-yl)-N'-(4-Fluorophenyl)Urea (100 µM)

17: 4-Benzyl-1-Butyrylpiperidin (100 µM)

18: 2-(3-Chlorophenoxy)-N-1,3-Thiazol-2-ylpropanamid (100 µM)

19: N-(4,6-Dimethyl-2-Pyridinyl)-2-Phenoxyacetamid (100 µM)

20: 6-{{2-(Trifluoromethyl)Phenyl}Amino}Carbonyl-3-Cyclohexen-1-Carboxylische Säure (100 µM)

21: 3,6-Dichloro-N-{{1-Ethyl-1H-Pyrazol-4-yl}Methyl}-1-Benzothiophen-2-Carboxamid (100 µM)

22: 2,5-Dichloro-N-(5-Isopropyl-1,3,4-Thiadiazol-2-yl)Benzamid (100 µM)

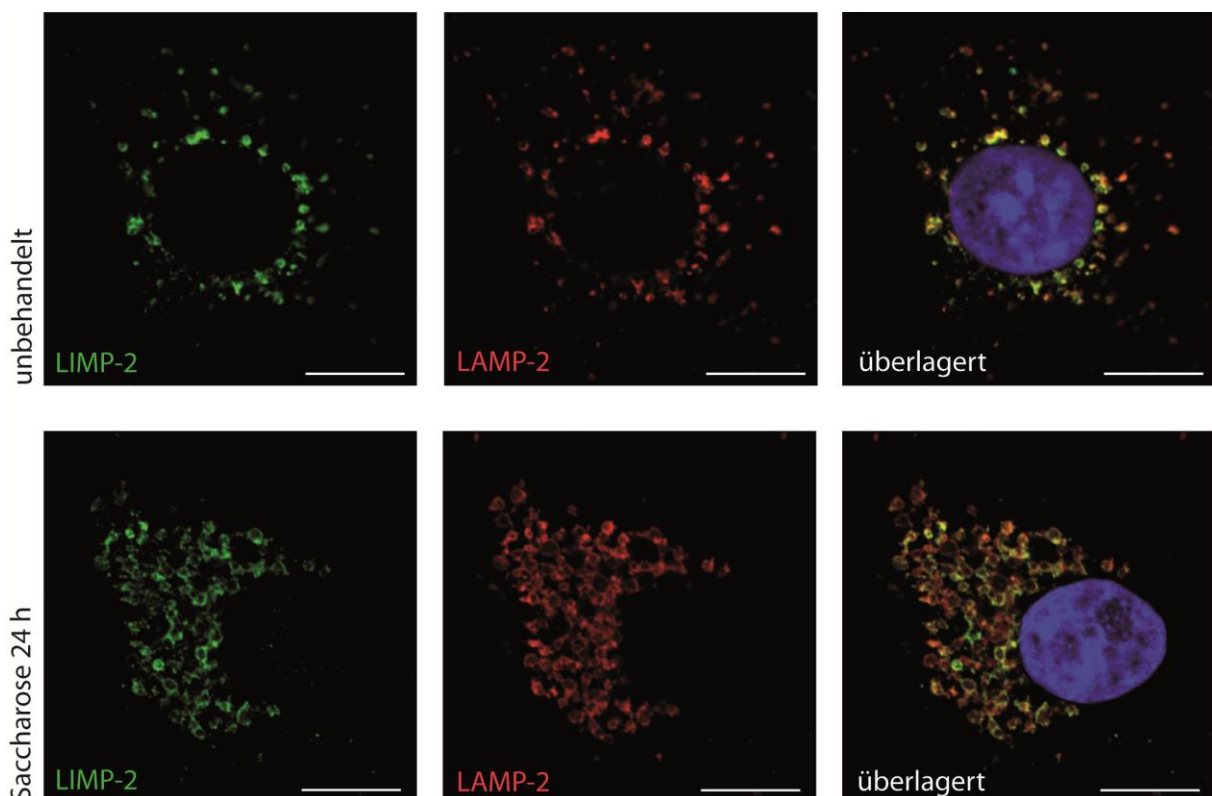
## 4.4 Der Einfluss von Saccharose auf die Zelle

### 4.4.1 Morphologische Veränderungen in Zellen nach Saccharose-Einwirkung

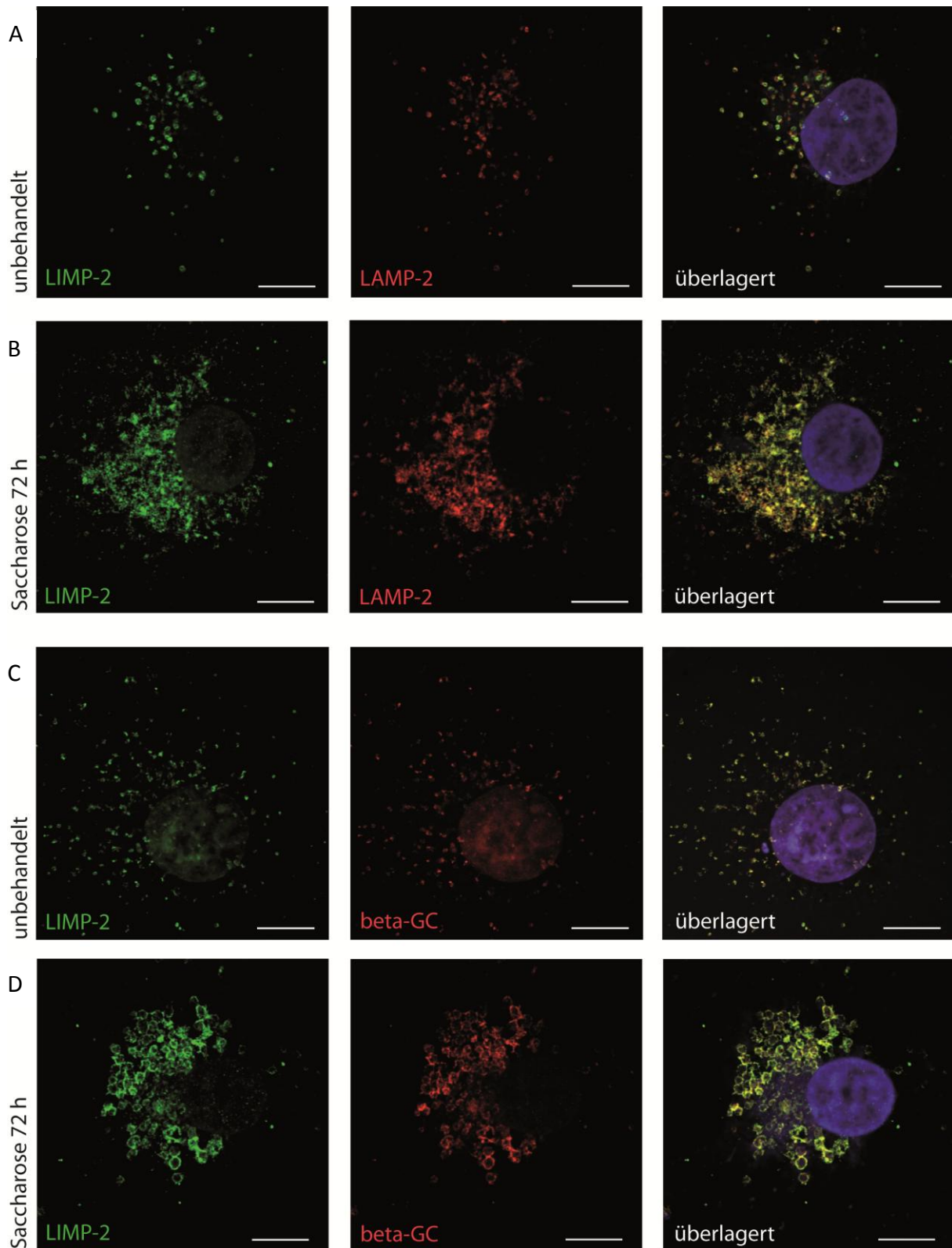
Nachdem im Luziferase-Assay unter Saccharose-Einwirkung eine gesteigerte *SCARB2*-Promotoraktivität gemessen wurde, sollte im Weiteren der Einfluss von Saccharose auf die Zelle im Allgemeinen untersucht werden.

In der Immunfluoreszenz zeigte sich, dass bereits nach einer Inkubationszeit von 24 h die Lysosomen der behandelten COS7-Zellen an Größe zunahmten (s. Abb. 4.4.1.1). Diese geschwollenen Lysosomen sind in der Literatur als „Sucrosomen“ bereits beschrieben worden (Wagner *et al.* 1971, Warburton und Wynn 1976, Deng und Storrie 1988).

Die Vergrößerung der Lysosomen und damit die Zunahme der umgebenden Membranfläche könnte die in Abb. 4.2.2.2 gezeigte gesteigerte LIMP-2-Menge nach Saccharose-Stimulation widerspiegeln.



**Abbildung 4.4.1.1: Kurzfristiger Einfluss von Saccharose auf die Lysosomenmorphologie.** Immunfluoreszenz von COS7-Zellen. Die Zellen wurden ohne bzw. mit 75 mM Saccharose für 24 h wachsen gelassen. In den stimulierten Zellen waren die Lysosomen größer. Der angezeigte Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ . AK: LIMP-2-T2 (LIMP-2), H4B4-c (LAMP-2).



**Abbildung 4.4.1.2: Längerfristiger Einfluss von Saccharose auf die Lysosomenmorphologie.** Immunfluoreszenz von COS7-Zellen. Die Zellen wurden ohne bzw. mit 75 mM Saccharose für 72 h wachsen gelassen. Auch nach dieser Zeit zeigten die Zellen geschwollene, aber zum Teil unrunde Lysosomen.  $\beta$ -GC kolokalisiert mit LIMP-2 im Lysosom. Der angezeigte Balken entspricht 10  $\mu$ m. AK: LIMP-2-T2 (LIMP-2), 8E4 ( $\beta$ -GC), H4B4-c (LAMP-2).

Nach einer Inkubationszeit von 72 h zeigte sich unter Saccharose-Behandlung, dass die Lysosomen weiterhin geschwollen (s. Abb. 4.4.1.2 D), zum Teil aber auch unrund und wie lysiert aussahen (s. Abb. 4.4.1.2 B). Die Zellen sahen in der Zellkultur dabei noch vital aus, die Saccharose-Stimulation führte lediglich zu einer leichten Wachstumshemmung.

Es zeigte sich außerdem, dass auch nach Inkubation mit Saccharose das von LIMP-2 transportierte Enzym  $\beta$ -GC im Lysosom lokalisiert war (s. Abb. 4.4.1.2 D). Des Weiteren ist in der Immunfluoreszenz ein stärkeres Signal von  $\beta$ -GC auszumachen, was für eine erhöhte Menge dieses Proteins spricht. Die Hydrolase  $\beta$ -GC ist, wie bereits beschrieben, essenziell für den Katabolismus von Glukosylceramid. Damit ist die Lokalisation und Funktionalität der  $\beta$ -GC entscheidend für den erhofften Effekt nach der Stimulation des *SCARB2*-Promotors.

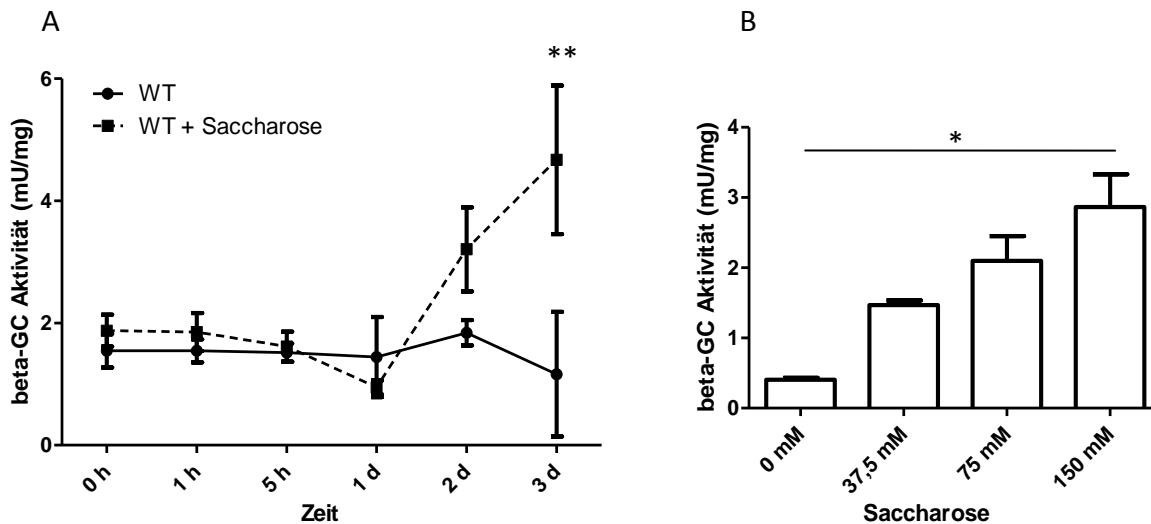
#### **4.4.2 Abhängigkeit des Saccharose-Effekts auf die $\beta$ -GC-Aktivität von der Einwirkzeit und -konzentration**

Die Idee, die dieser Forschungsarbeit zugrunde lag, baut, wie einleitend erklärt, auf dem Transport von  $\beta$ -GC durch LIMP-2 auf. Ziel war es, über eine gesteigerte LIMP-2-Expression möglichst viel funktionsfähige  $\beta$ -GC in die Lysosomen der Zelle zu bringen. In den folgenden Experimenten wurden daher Messungen direkt am Endpunkt des beschriebenen Transportweges durchgeführt: Betrachtet wurden Funktionalität und Menge von  $\beta$ -GC.

Zur Feststellung, unter welchen Bedingungen der durch Saccharose ausgelöste Effekt auf die Zelle maximal ist, wurde die Aktivität von  $\beta$ -GC in Abhängigkeit von Einwirkzeit und Saccharose-Konzentration mittels Enzym-Aktivitäts-Assay gemessen (s. Abb. 4.4.2).

Hierbei ließ sich zunächst als Ergebnis festhalten, dass Saccharose die Aktivität von  $\beta$ -GC steigert. Je länger die Einwirkzeit auf die Zellen war, desto stärker war die Aktivität des Enzyms (s. Abb. 4.4.2 A). Diese Aktivitätssteigerung setzte allerdings erst nach zwei Tagen ein, also erst, nachdem schon vorher morphologische Veränderungen der Lysosomen beobachtet werden konnten (vgl. Abb. 4.4.1.1).

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Aktivität von  $\beta$ -GC mit der Konzentration der Saccharose positiv korreliert (s. Abb. 4.4.2 B). Je höher allerdings die Konzentration war, desto langsamer vermehrten sich die Zellen in der Zellkultur. Konzentrationen von 300 mM und 600 mM Saccharose führten zum Sterben der Zellen.



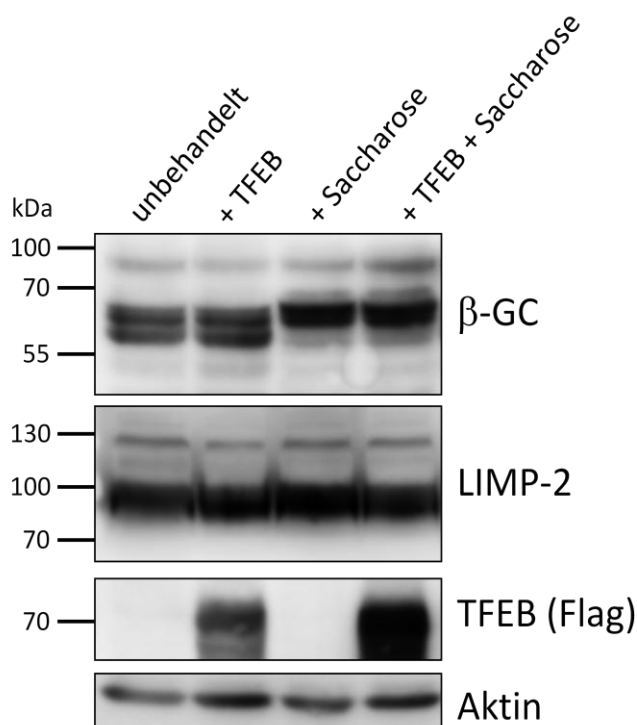
**Abbildung 4.4.2: Maximaler Saccharose-Einfluss auf die Zelle. (A)**  $\beta$ -GC-Aktivitäts-Assay in murinen endothelialen Fibroblasten (MEF)-WT-Zellen bei einer Saccharose-Konzentration von 75 mM, n=2. In diesem Assay zeigt Saccharose ihren größten Einfluss nach 3 d Einwirkzeit, wobei eine weitere Effektsteigerung nach noch längerer Zeit nicht ausgeschlossen werden kann. **(B)**  $\beta$ -GC-Aktivitäts-Assay in MEF-WT-Zellen nach einer Saccharose-Einwirkzeit von 3 d, n=2. Der maximale Effekt von Saccharose wurde bei einer Konzentration von 150 mM gemessen. Zellen, die einer noch höheren Konzentration ausgesetzt wurden, starben. Die Daten wurden mit dem ANOVA und *post hoc* Test Tukey ausgewertet, \*=p<0,05; \*\*=p<0,01; Fehlerbalken zeigen SEM an. Anhang Tabellen 8.1.6.1 und 8.1.6.2.

#### 4.4.3 Der Einfluss von Saccharose auf die Lokalisation von $\beta$ -GC in HEK-Zellen

Saccharose hat wie bisher gezeigt ihren maximalen Einfluss nach mindestens drei Tagen Inkubationszeit bei einer Konzentration von 150 mM. Dabei kommt es zum Schwellen der Lysosomen sowie einer vermehrten LIMP-2-Expression. Außerdem verstärkte sich auch das von  $\beta$ -GC ausgehende Signal in der Immunfluoreszenz.

Zur genaueren Charakterisierung des Einflusses von Saccharose auf  $\beta$ -GC wurde die Lokalisation des Enzyms nun in HEK-Zellen mittels *Western blot* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch Saccharose-Behandlung ein anderes Laufverhalten hervorgerufen wurde, wobei  $\beta$ -GC in einer molekular schwereren Form vorliegt (s. Abb. 4.4.3.1). Es wurde außerdem eine Probe mit TFEB behandelt, einem der Transkriptionsfaktoren, die im Luziferase-Assay keine Steigerung der LIMP-2-Expression hervorriefen (vgl. Abb. 4.2.2.1). Dieser Transkriptionsfaktor hatte im *Western blot* keinen Einfluss auf das Laufverhalten von  $\beta$ -GC oder die Expression von LIMP-2. Dies unterstützt noch einmal die Ergebnisse des Luziferase-Assays. Normalerweise liegt  $\beta$ -GC im *Western blot* in einer Doppelbande vor, wie sie hier in den beiden linken Proben zu sehen ist. Hierbei

repräsentiert die untere Bande vermutlich die ER Form von  $\beta$ -GC, während die obere Bande der glykosylierten post-ER-Form entspricht (vgl. Abb. 4.4.3.2). In beiden Proben, die mit Saccharose inkubiert wurden, zeigte sich eine Verschiebung des  $\beta$ -GC-Proteins in eine einheitliche Bande, die auf Höhe der schwereren Bande des unbehandelten  $\beta$ -GC läuft. Es liegt also nahe, dass nach Saccharose-Behandlung  $\beta$ -GC vermehrt in der post-ER-Form vorliegt.

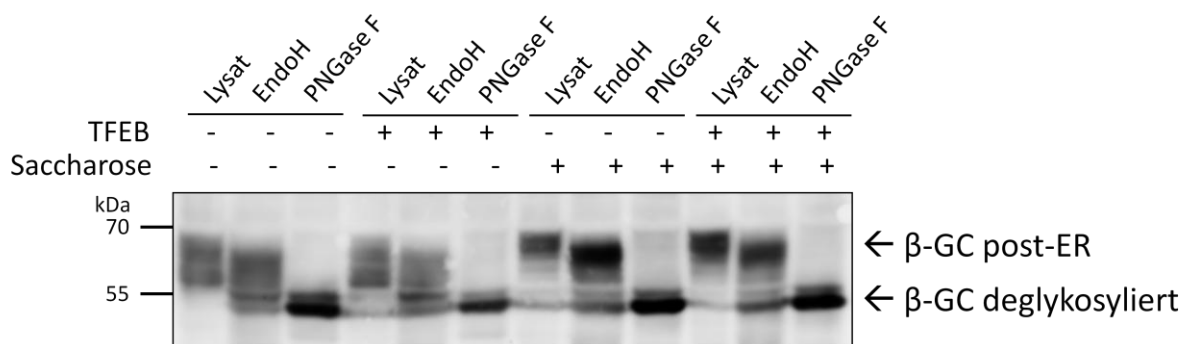


**Abbildung 4.4.3.1: Einfluss von Saccharose auf die das Laufverhalten von  $\beta$ -GC.** *Western blot* von HEK Zellen, die über 72 h mit bzw. ohne 75 mM Saccharose inkubiert wurden und nach Angabe mit TFEB (Flag-tag) transfiziert wurden, n=3. Saccharose führt zu einer Verschiebung der  $\beta$ -GC Bande in eine nahezu einheitliche schwerere Bande, während TFEB in diesem Experiment keinen Einfluss zeigt. AK: G4171 ( $\beta$ -GC), LIMP-2-T2 (LIMP-2), F1804 / M2 (Flag), A2066 (Aktin).

Zur Verifizierung, dass  $\beta$ -GC nach Saccharose-Einwirken vermehrt in post-ER-Kompartimenten lokalisiert ist, wurde ein Verdau mit den Enzymen Endoglykosidase H (EndoH) und Peptid-N-Glykosidase (PNGase F) durchgeführt. Im EndoH-Verdau werden von Proteinen nur jene Zuckerreste abgespalten, welche bereits im ER vorhanden sind. Dies führt dazu, dass Proteine, die in post-ER-Kompartimenten glykosyliert werden, auch nach dem EndoH-Verdau auf derselben Höhe laufen wie ohne vorherigen Verdau, während Proteine, die im ER glykosyliert werden, nach dem EndoH-Verdau leichter werden und so im *Western blot* weiter laufen als zuvor. Beim PNGase F-Verdau werden hingegen alle N-

Glykosylierungen von dem untersuchten Protein abgeschnitten und die gesamte Proteinmasse wird nun leichter und das Laufverhalten ändert sich entsprechend. Ein Protein, das also erst in post-ER-Kompartimenten glykosyliert wird, hat unverdaut und im EndoH-Verdau dasselbe Laufverhalten. Des Gleichen hat ein Protein, welches schon im ER glykosyliert wird, im EndoH- sowie im PNGase F-Verdau dasselbe Laufverhalten (Reczek *et al.* 2007).

Es zeigte sich, dass tatsächlich mehr  $\beta$ -GC in post-ER-Kompartimenten vorliegt, nachdem die Zellen mit Saccharose inkubiert worden waren (s. Abb. 4.4.3.2).



**Abbildung 4.4.3.2: Einfluss von Saccharose auf die intrazelluläre Lokalisation von  $\beta$ -GC.** EndoH- und PNGase F-Verdau der Proben aus Abb. 4.4.3.1. Die Behandlung der Zellen mit Saccharose führt zu einer verstärkten EndoH-resistenten Bande. Dies bedeutet, dass  $\beta$ -GC in einer glykosylierten Form vorliegt, wie sie erst in post-ER-Kompartimenten vorkommt. Der Enzymverdau bestätigt also, dass Saccharose zu gesteigerten Mengen von  $\beta$ -GC in post-ER-Kompartimenten führt. AK: G4171 ( $\beta$ -GC).

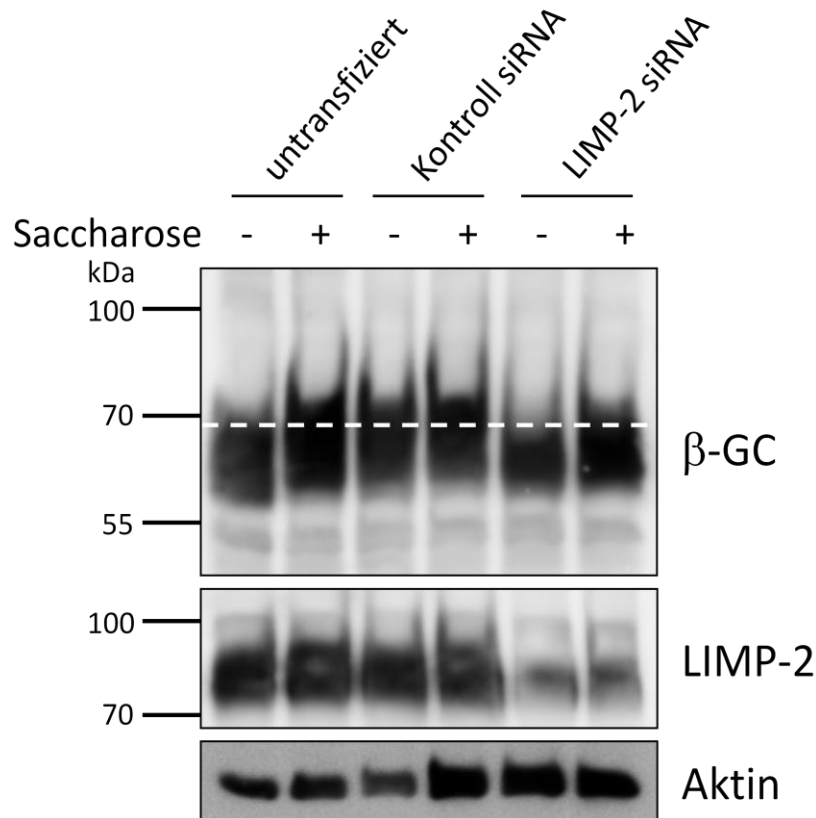
#### 4.4.4 Der Einfluss von Saccharose auf die Lokalisation von $\beta$ -GC in HeLa-Zellen nach LIMP-2-knock-down

Die Hypothese, dass die Verlagerung von  $\beta$ -GC in seine post-ER-Form durch vermehrten Transport via LIMP-2 hervorgerufen wird, sollte nun mittels eines LIMP-2-knock-down untersucht werden. Für diese Methode wurde die LIMP-2-Expression in HeLa-Zellen mit einer siRNA herunter reguliert.

In dem daraus entwickelten *Western blot* zeigte sich der bereits beobachtete Effekt von Saccharose in den untransfizierten Zellen. Auch nach LIMP-2-knock-down war noch eine Verlagerung der Proteinmasse hin zu einer schwereren  $\beta$ -GC-Form zu sehen (s. Abb. 4.4.4). Allerdings gelang die Auftrennung des  $\beta$ -GC-Proteins in den HeLa-Zellen nicht sehr

anschaulich und außerdem führte der *knock-down* lediglich zu einer verminderten Expression von LIMP-2, wobei immer noch ein Rest an LIMP-2-Protein in den Zellen vorlag.

Daher wurden die Versuche im nachfolgenden Abschnitt in LIMP-2-*knock-out* Zellen fortgesetzt.



**Abbildung 4.4.4: Effekt von Saccharose nach LIMP-2-*knock-down*.** Western blot von HeLa Zellen, die wie eingezeichnet transfiziert und für 72 h ohne bzw. mit 75 mM Saccharose inkubiert wurden, n=1. Saccharose führt sowohl in den untransfizierten Zellen als auch nach LIMP-2-*knock-down* zu einer Verschiebung der  $\beta$ -GC-Bande hin zu einer schwereren Form. In den kontroll-transfizierten Zellen ist keine eindeutige Bandenverlagerung auszumachen. Dieser Western blot gibt einen ersten Hinweis darauf, dass die  $\beta$ -GC-Bandenverlagerung von LIMP-2 unabhängig sein könnte. AK: G4171 ( $\beta$ -GC), LIMP-2-T2 (LIMP-2), A2066 (Aktin).

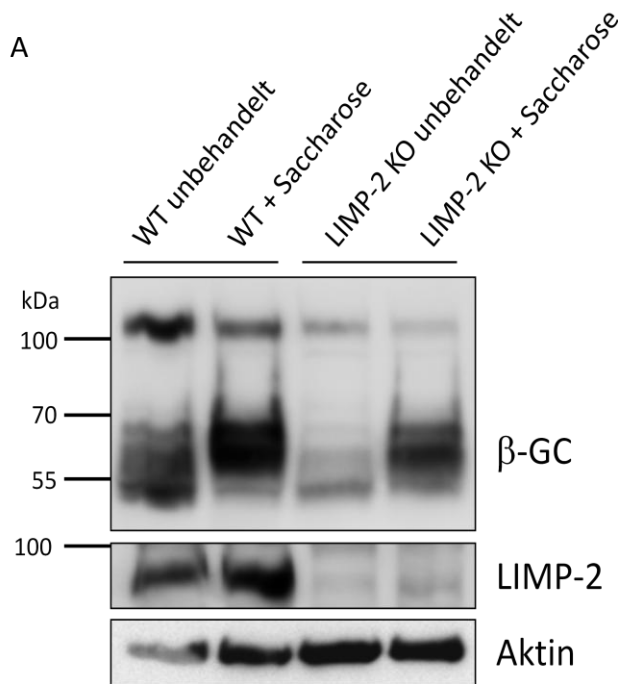
#### 4.4.5 Der Einfluss von Saccharose auf die Lokalisation von $\beta$ -GC in MEF-Zellen nach LIMP-2-*knock-out*

Zur Betrachtung des Effekts von Saccharose auf  $\beta$ -GC unter Ausschaltung des Transporters LIMP-2 wurde nun statt mit einem *knock-down* fortan mit murinen embryonalen Fibroblasten (MEF), in denen LIMP-2 durch *knock-out* völlig fehlte, gearbeitet. In diesen LIMP-2-defizienten Zellen kommt es ohne weitere Stimulation zu keinem Transport von  $\beta$ -GC ins Lysosom, da der hierfür zuständige Transporter LIMP-2 nicht zur Verfügung steht.  $\beta$ -GC verbleibt also zunächst im ER und wird dort entweder abgebaut oder von der Zelle sezerniert (Reczek *et al.* 2007).

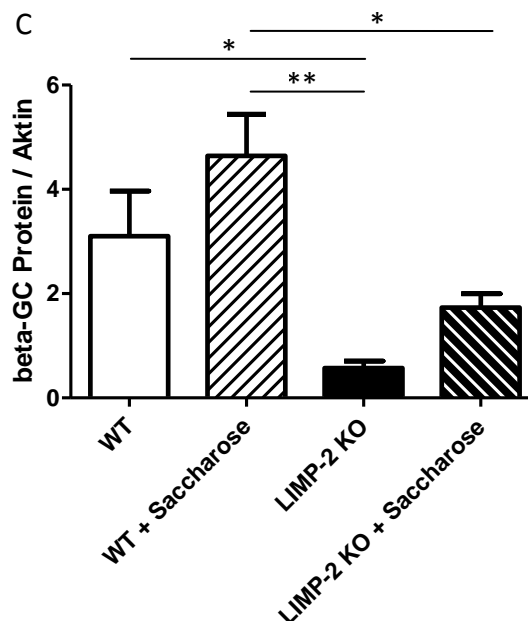
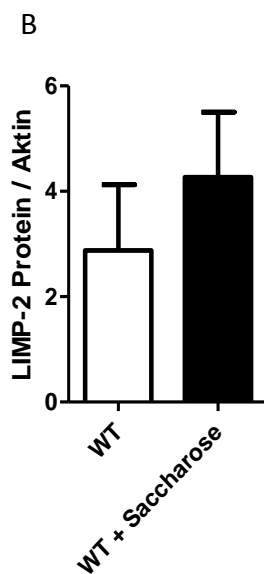
Auch in Wildtyp MEF-Zellen zeigte sich nach Saccharose-Behandlung die Verschiebung des  $\beta$ -GC-Proteins hin zu einer schwereren Bande. Der gleiche Effekt konnte ebenfalls in LIMP-2-



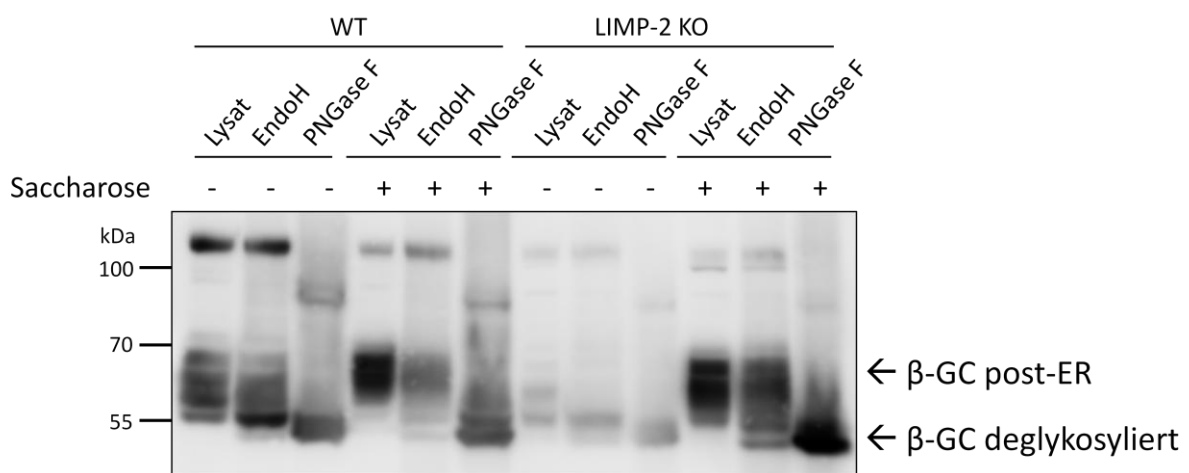
defizienten MEF-Zellen beobachtet werden (s. Abb. 4.4.5.1 A). Außerdem ließ sich die Steigerung der LIMP-2-Expression durch Saccharose aus Abschnitt 4.2.2 hier in MEF-Zellen reproduzieren (s. Abb. 4.4.5.1 B). Zusätzlich verstärkte sich das  $\beta$ -GC-Signal nach Saccharose-Einwirkung, was für eine gesteigerte Expression auch von  $\beta$ -GC nach Stimulation spricht (s. Abb. 4.4.5.1 C).



**Abbildung 4.4.5.1: Saccharose-induzierte Expression von LIMP-2 und  $\beta$ -GC.** (A) Western blot von MEF-WT- und LIMP-2-KO-Zellen, die ohne bzw. mit 75 mM Saccharose für 72 h inkubiert wurden, n=5. In beiden Zelllinien führte Saccharose zu einer stärkeren  $\beta$ -GC-Bande. In den WT Zellen ist außerdem eine Verstärkung des LIMP-2 Signals zu beobachten. AK: G4171 ( $\beta$ -GC), LIMP-2-T2 (LIMP-2), A2066 (Aktin). (B) Quantifizierung des LIMP-2-Proteins, n=4. Nach Saccharose-Stimulation wird mehr LIMP-2 exprimiert. Vgl. Anhang Tabelle 8.1.7.1. (C) Quantifizierung des  $\beta$ -GC Proteins, n=5. Nach Saccharose-Stimulation wird in beiden Zelllinien mehr  $\beta$ -GC exprimiert. Vgl. Anhang Tabelle 8.1.7.2. Die Daten der Diagramme wurden mit dem ANOVA und *post hoc* Test Tukey ausgewertet, \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; Fehlerbalken zeigen SEM an.



Zur Sicherstellung, dass es sich auch im *Western blot* der MEF-Zellen um die post-ER-Form von  $\beta$ -GC handelt, wurde wiederum ein EndoH- und PNGase F-Verdau durchgeführt (s. Abb. 4.4.5.2). Dieser bestätigte, dass  $\beta$ -GC ohne Saccharose-Behandlung in LIMP-2-defizienten Zellen nicht das ER verlässt. Es zeigte sich nämlich kaum ein  $\beta$ -GC-Signal, da das Protein im ER wie erwähnt abgebaut oder aus der Zelle abgegeben wird. Gleichzeitig zeigte sich hier, dass nach Saccharose-Stimulation selbst in den LIMP-2-defizienten Zellen  $\beta$ -GC in post-ER-Kompartimente gelangt. Diese Ergebnisse widersprechen der Hypothese, dass die vermehrte Detektion von post-ER- $\beta$ -GC durch die vermehrte Expression von LIMP-2 erklärt werden kann, da auch in LIMP-2-defizienten Zellen eine Translokation von  $\beta$ -GC in post-ER-Kompartimenten stattfindet. Dies legt nahe, dass es einen alternativen Transportmechanismus für  $\beta$ -GC geben muss, der unter Saccharose-Einwirkung aktiviert werden kann.



**Abbildung 4.4.5.2: Einfluss von Saccharose auf die intrazelluläre Lokalisation von  $\beta$ -GC in LIMP-2-defizienten Zellen.** EndoH- und PNGase F-Verdau der Proben aus Abb. 4.4.3.1. Die Behandlung der Zellen mit Saccharose führt zu einer verstärkten EndoH-resistenten Bande. Saccharose führt also zu gesteigerten Mengen von  $\beta$ -GC in post-ER-Kompartimenten. Dieser Effekt bleibt auch unter Ausschaltung des Transportproteins LIMP-2 erhalten. AK: G4171 ( $\beta$ -GC).

#### **4.4.6 Bestimmung der $\beta$ -GC-Aktivität in LIMP-2-defizienten Zellen nach Saccharose-Einwirkung**

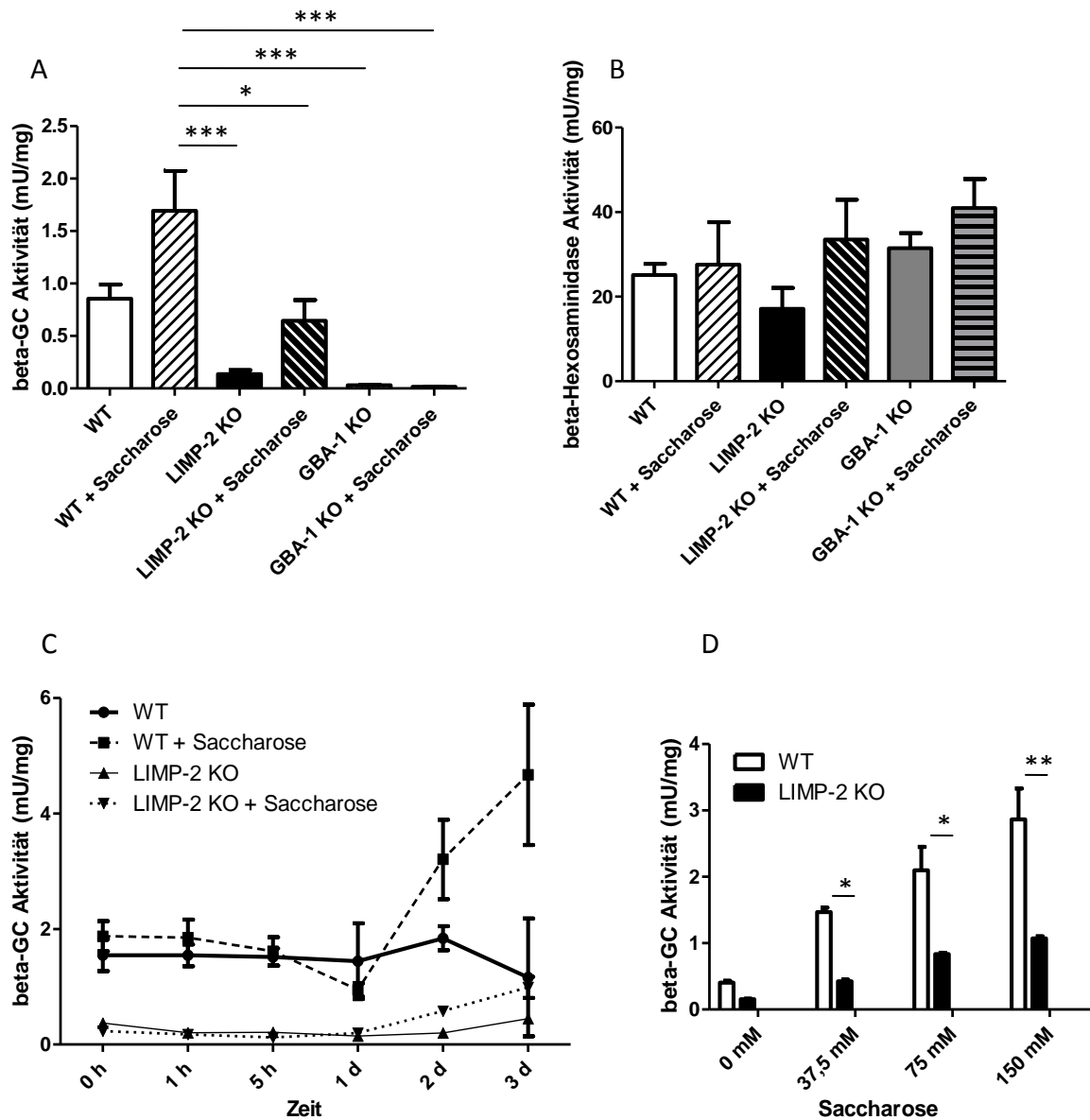
Wie bisher in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führt Saccharose zu einem gesteigerten Transport von  $\beta$ -GC in post-ER-Kompartimente. In diesem Abschnitt soll nun die Funktionalität des Enzyms überprüft werden, um zu sehen, ob Saccharose die Aktivität von  $\beta$ -GC beeinflusst.

Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurde ein Enzym-Aktivitäts-Assay durchgeführt. Wie in Abbildung 4.4.6 A zu sehen ist, führt die Behandlung der Zellen mit Saccharose zu einer gesteigerten Aktivität von  $\beta$ -GC. Die Aktivitätssteigerung könnte beispielsweise durch einen direkten aktivitätsfördernden Einfluss von Saccharose hervorgerufen werden, könnte aber auch nur eine Folge der vermehrten Expression des Proteins an sich sein.

Als Abgrenzung wurde außerdem die Aktivität der  $\beta$ -Hexosaminidase in den selben Proben bestimmt (s. Abb. 4.4.6 B). Diese ist ebenfalls ein lysosomales Enzym. Im Aktivitäts-Assay zeigte sich auch hier tendenziell eine leichte Aktivitätssteigerung, allerdings nicht in einem signifikanten oder mit der Aktivitätssteigerung von  $\beta$ -GC vergleichbaren Maße (vgl. hierzu auch Anhang Abb. 8.1.9.3 B).

Der Einfluss von Saccharose scheint demnach nicht unspezifisch auf alle lysosomalen Enzyme zu wirken, sondern ist diesen Ergebnissen zur Folge eher selektiv.

Wie in Abbildung 4.4.6 zu sehen ist, führt Saccharose auch in LIMP-2-defizienten MEF-Zellen zu einer vermehrten Aktivität von  $\beta$ -GC. Obwohl der normale Transport von  $\beta$ -GC in diesen Zellen nicht stattfinden kann, kommt es trotzdem zu vermehrten Mengen einer funktionsfähigen Form dieses Enzyms in post-ER-Kompartimenten. Die Enzymaktivität kann auf ein Niveau angehoben werden, die der Aktivität von Wildtyp Zellen im unbehandelten Zustand entspricht. Dies könnte mit einem verbesserten Abbau der Substrate von  $\beta$ -GC einhergehen und somit die Ansammlung und Aggregation von Metaboliten der Zellen im Lysosom verhindern.



**Abbildung 4.4.6: Saccharose-Einfluss auf verschiedene lysosomale Enzyme. (A)**  $\beta$ -GC-Aktivitäts-Assay in MEF-WT-, MEF-LIMP-2-KO- und MEF-GBA-1-KO-Zellen bei einer Saccharose-Konzentration von 0 oder 75 mM über 72 h, n=3-4. Saccharose führt zu einer gesteigerten  $\beta$ -GC-Aktivität in den Zellen, in denen  $\beta$ -GC vorhanden ist. In den GBA-1-KO-Zellen ist wie erwartet kein Signal der  $\beta$ -GC-Aktivität zu detektieren. Vgl. Anhang Tabelle 8.1.8.1. **(B)**  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivitäts-Assay in MEF-WT-, MEF-LIMP-2-KO- und MEF-GBA-1-KO-Zellen bei einer Saccharose-Konzentration von 0 oder 75 mM über 72 h, n=3. Saccharose führt zu keinem signifikanten Effekt auf die  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität. Vgl. Anhang 8.1.8.2. **(C)**  $\beta$ -GC-Aktivitäts-Assay in MEF-WT- und MEF-LIMP-2-KO-Zellen bei einer Saccharose-Konzentration von 75 mM, n=2. In diesem Assay zeigt Saccharose ihren größten Einfluss nach 3 d Einwirkzeit, wobei eine weitere Effektsteigerung nach noch längerer Zeit nicht ausgeschlossen werden kann. Vgl. Anhang Tabelle 8.1.6.1. **(D)**  $\beta$ -GC-Aktivitäts-Assay in MEF-WT- und MEF-LIMP-2-KO-Zellen nach einer Saccharose-Einwirkzeit von 3 d, n=2. Der maximale Effekt von Saccharose wurde bei einer Konzentration von 150 mM gemessen. Zellen, die einer noch höheren Konzentration ausgesetzt wurden, starben. Vgl. Anhang Tabelle 8.1.6.2. Die Daten der Diagramme wurden mit dem ANOVA und *post hoc* Test Tukey ausgewertet, \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ; Fehlerbalken zeigen SEM an.

#### 4.4.7 Erste Untersuchungen des von LIMP-2 unabhängigen

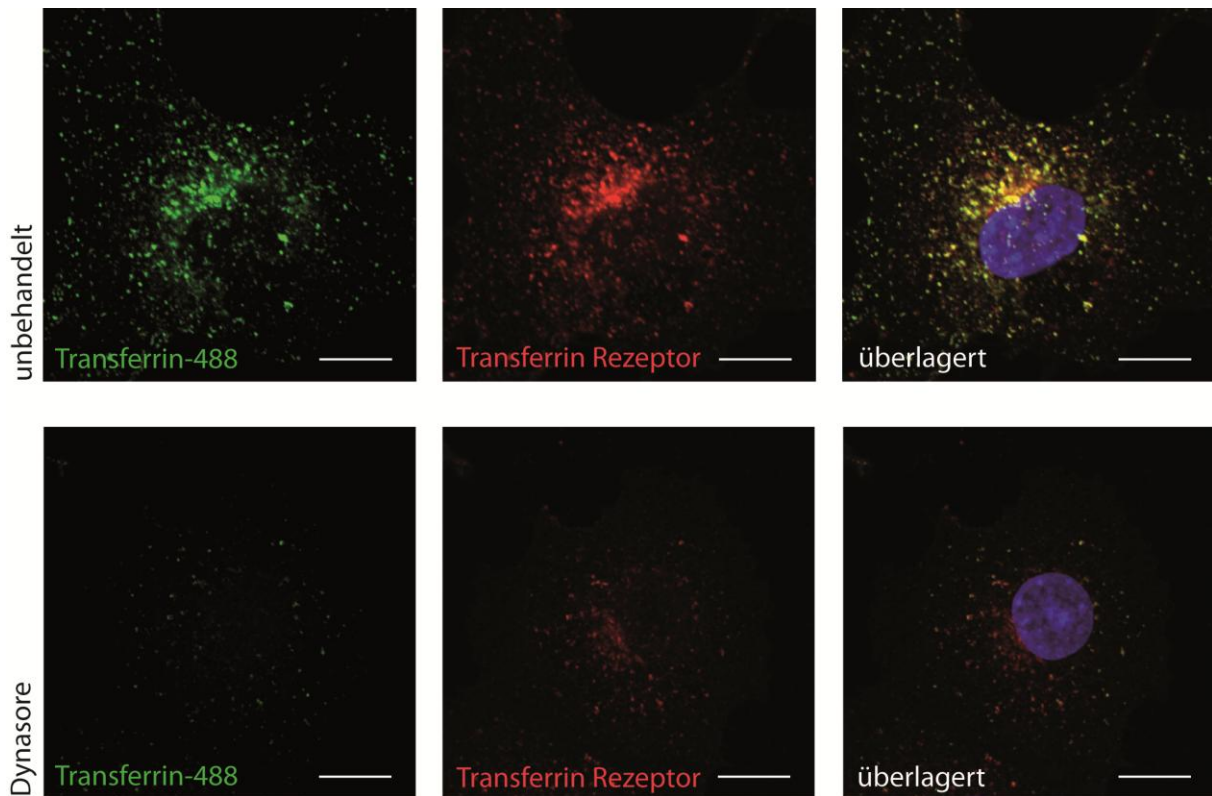
#### Transportmechanismus für $\beta$ -GC mit den Reagenzien Bafilomycin und

#### Dynasore

Da in Folge der vorausgegangenen Experimente davon ausgegangen werden kann, dass  $\beta$ -GC nach Saccharose-Einwirkung einen von LIMP-2 unabhängigen Weg aus dem ER in post-ER-Kompartimente nutzt, wurden einige Untersuchungen zur Identifikation dieses Weges vorgenommen.

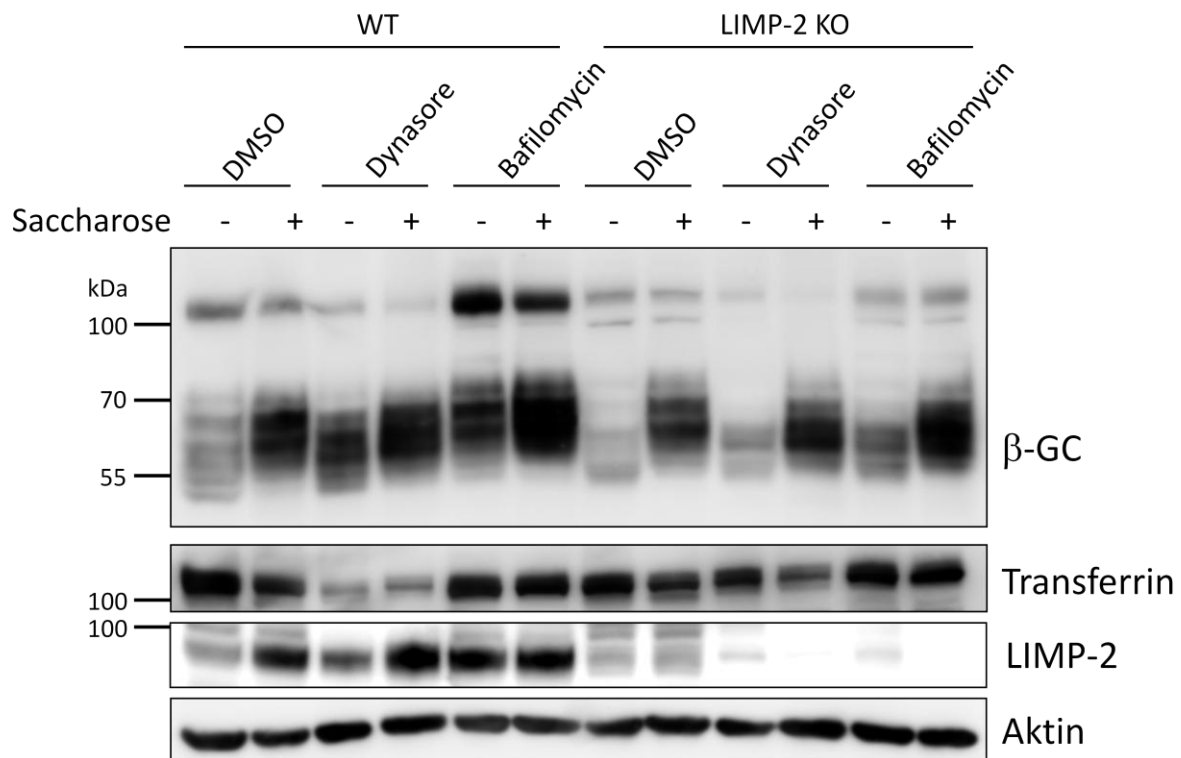
Zunächst wurde untersucht, ob  $\beta$ -GC ggf. nach Sekretion durch Endozytose in post-ER-Kompartimente gelangt. Es könnte sein, dass  $\beta$ -GC im LIMP-2-*knock-out* zwar zunächst das ER durchläuft, dann aber mangels Transporter sezerniert wird (Reczek *et al.* 2007). Unter Saccharose-Einfluss könnte nun die Endozytose der Zelle angeregt sein und durch diesen Prozess könnte das vorher sezernierte  $\beta$ -GC nun in Endosomen und Endo-Lysosomen gelangen.

Als Blocker der Endozytose wurde in diesem Versuch Dynasore eingesetzt. Dynasore ist ein Inhibitor der GTPase Dynamin, welche für die Clathrin-vermittelte Endozytose unabdinglich ist (Hill *et al.* 2001, Macia *et al.* 2006). Dieses Protein vermittelt die Abschnürung der Vesikel. Die Funktion von Dynasore wurde zunächst mittels Immunfluoreszenz überprüft (s. Abb. 4.4.7.1), indem die Endozytose von fluoreszierendem Transferrin ohne bzw. mit Dynasore abgebildet wurde. Transferrin ist ein Protein, welches unter Normalbedingungen von Zellen via Endozytose aufgenommen wird (Aisen 1998). Unter Einwirkung von Dynasore war ein wesentlich schwächeres Signal des intrazellulär lokalisierten Transferrins zu beobachten. Demzufolge wurde in diesem Versuch die Endozytose von Transferrin mittels Dynasore effektiv vermindert.



**Abbildung 4.4.7.1: Endozytose-Inhibition durch Dynasore.** COS7-Zellen wurden wie in Abschnitt 3.11.2 beschrieben ohne bzw. mit 80  $\mu\text{M}$  Dynasore inkubiert. Im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen zeigt sich in den Zellen mit Dynasore eine wesentliche Verminderung des Signals von Transferrin und Transferrin-Rezeptor. Es fand also nach Dynasore-Einwirkung weniger Endozytose statt. Der angezeigte Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ . AK: 13-6800 (Transferrin Rezeptor).

Auch im *Western blot* wurde die Wirksamkeit von Dynasore durch die Messung von Transferrin kontrolliert. Es war zu erwarten, dass nach Inkubation mit Dynasore eine schwächere Bande des Transferrin-Proteins zu detektieren ist, da durch Inhibition der Endozytose weniger Transferrin in den Zellen vorliegen sollte. Dieser Effekt konnte in Abbildung 4.4.7.2 bei den Wildtyp MEF-Zellen auch beobachtet werden. Allerdings gelang diese Kontrolle in den LIMP-2-defizienten MEF-Zellen nicht und sie ließ sich in Wiederholungen dieses Experimentes auch nicht reproduzieren oder besser darstellen.



**Abbildung 4.4.7.2: Einfluss von Dynasore und Bafilomycin auf die Saccharose-induzierte Bandenverlagerung von  $\beta$ -GC.** *Western blot* von MEF-WT- und MEF-LIMP-2-KO-Zellen, die mit den angegebenen Substanzen inkubiert wurden: 75 mM Saccharose für 72 h, zusätzlich 10,4  $\mu$ l DMSO / 4ml DMEM für 12 h, 80  $\mu$ M Dynasore für 12 h, 100 nM Bafilomycin-A1 für 12 h, n=3. Auch die Behandlung der Zellen mit Dynasore (Endozytose-Inhibitor) oder Bafilomycin (Inhibitor der V-ATPase) verhinderte die Bandenverlagerung und das verstärkte Signal von  $\beta$ -GC nicht. AK: G4171 ( $\beta$ -GC), sc-30159 (Transferrin), LIMP-2-T2 (LIMP-2), A2066 (Aktin).

Der *Western blot* in Abbildung 4.4.7.2 zeigt das Laufverhalten von  $\beta$ -GC nach Dynasore Behandlung in Wildtyp und LIMP-2-defizienten MEF-Zellen. Hierbei zeigte sich, dass  $\beta$ -GC unabhängig von der durch Clathrin vermittelten Endozytose in post-ER-Kompartimente gelangte. Denn auch nach Blockade der Endozytose mittels Dynasore war eine schwerere Bande von  $\beta$ -GC in Wildtyp und LIMP-2-defizienten MEF-Zellen zu detektieren, welche der post-ER-Form entspricht (s. EndoH- und PNGase F-Verdau Anhang Abb. 8.1.9.1).

Die vermehrte  $\beta$ -GC Proteinmenge nach Saccharose-Behandlung könnte des Weiteren auf einen verminderten Abbau des  $\beta$ -GC Protein zurückzuführen sein. Bei dieser Annahme würde Saccharose die lysosomalen Enzyme am  $\beta$ -GC-Abbau hemmen. Zur Testung, ob eine Hemmung der lysosomalen Proteasen den gleichen Effekt auf  $\beta$ -GC wie Saccharose hat, wurde eine Testreihe mit Bafilomycin untersucht. Bafilomycin ist ein Inhibitor der V-ATPase (Bowman *et al.* 1988) und verhindert so die Azidifizierung des Lysosoms (s. Anhang Abb. 8.1.9.2). Dadurch können die lysosomalen Proteasen nicht ordnungsgemäß arbeiten und es

kommt zur Ansammlung ihrer Substrate, darunter eventuell auch  $\beta$ -GC. Im Ergebnis führte die Behandlung der Zellen mit Bafilomycin zwar an sich schon zu einem Anstieg der  $\beta$ -GC-Menge, auch unter Bafilomycin-Einwirkung blieb aber der zuvor beobachtete Effekt von Saccharose auf die Bandenverlagerung von  $\beta$ -GC erhalten. Weiterhin war eine Verstärkung des  $\beta$ -GC-Signals nach Saccharose-Behandlung zu beobachten. Durch dieses Experiment konnte also gezeigt werden, dass das vermehrte  $\beta$ -GC-Signal im *Western blot* nicht durch einen verminderten lysosomalen Abbau von  $\beta$ -GC hervorgerufen wird. Es scheinen vielmehr andere transkriptionelle oder post-transkriptionelle Mechanismen, die durch Saccharose induziert werden, eine Rolle zu spielen.

Die in diesem Abschnitt besprochenen Ergebnisse legen also zusammenfassend die Hypothese nahe, dass  $\beta$ -GC nach Saccharose-Einwirkung weder über Endozytose noch über LIMP-2 alleine ins Lysosom gelangt und die gesteigerte Menge an  $\beta$ -GC-Protein auch nicht durch gestörte Abbauprozesse zustande kommt. Es scheint vielmehr einen LIMP-2-unabhängigen intrazellulären Weg zu geben, der vermehrt exprimiertes  $\beta$ -GC unter Saccharose-Einfluss in das Lysosom transportiert.

#### **4.4.8 Die Wirkung von Saccharose auf $\alpha$ -Synuclein-Aggregate sowie auf Cathepsin D in N2A-Zellen**

Zuletzt wurde überprüft, ob die durch Saccharose induzierte Expression und Aktivitätssteigerung von  $\beta$ -GC auch einen funktionellen Einfluss auf den Abbau von  $\alpha$ -Synuclein-Aggregaten hat. Diese Aggregate sind wichtiger Bestandteil des anfangs beschriebenen Parkinson-Syndroms und könnten für die Pathogenese von Bedeutung sein (Sardi *et al.* 2011, Sardi *et al.* 2013). Eine Auflösung dieser Aggregate ist daher ein möglicher therapeutischer Ansatz.

Wie sich in Abbildung 4.4.8 zeigte, führte die durch Transfektion hervorgerufene Expression von  $\alpha$ -Synuclein zu einem deutlichen Signal des Proteins. Da ohne eine vorherige Transfektion mit  $\alpha$ -Synuclein keine Bande zu detektieren war, wurde der Einfluss von Saccharose auf  $\alpha$ -Synuclein in diesen transfizierten N2A-Zellen untersucht. Die Behandlung der transfizierten Zellen mit Saccharose führte zu einer Verminderung der  $\alpha$ -Synuclein-Bande, was durch einen gesteigerten Abbau von  $\alpha$ -Synuclein erklärt werden könnte. Dieser

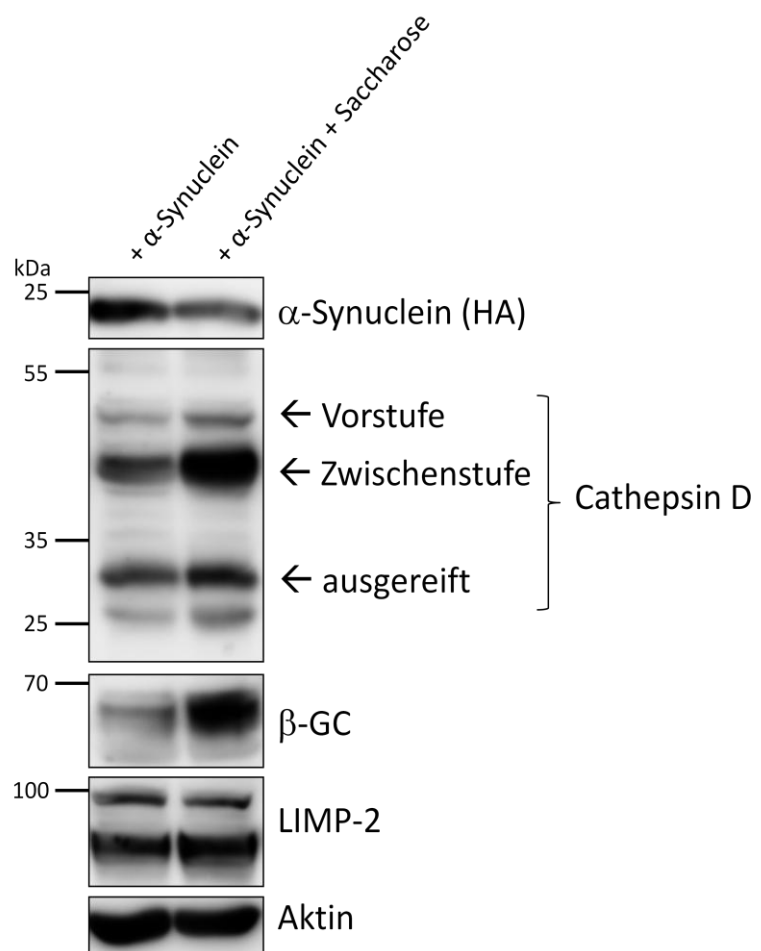


könnte durch die gesteigerte Aktivität von  $\beta$ -GC in post-ER-Kompartimenten wie dem Lysosom hervorgerufen sein, die durch Saccharose induziert wird.

Außerdem ist in diesem *Western blot* eine vermehrte Expression von Cathepsin D nach Saccharose-Einwirkung zu sehen. Cathepsin D ist eine endosomale und lysosomale Protease, welche eine bedeutende Rolle im Abbau von  $\alpha$ -Synuclein spielt (Sevlever *et al.* 2008). Besonders die Zwischenstufe konnte verstärkt detektiert werden. Die Prozessierung von Cathepsin D wird unter anderem durch die Enzyme Cathepsin B und L vorgenommen (Laurent-Matha *et al.* 2006). Auch auf diese Enzyme könnte Saccharose einen aktivitätsmodulierenden Einfluss haben.

**Abbildung 4.4.8: Einfluss von Saccharose auf Cathepsin D und den Abbau von  $\alpha$ -Synuclein.**

*Western blot* von mit  $\alpha$ -Synuclein transfizierten N2A-Zellen, die ohne bzw. mit 75 mM Saccharose für 72 h inkubiert wurden, n=2. Nach Transfektion mit  $\alpha$ -Synuclein ist ein starkes Signal dieses Proteins detektierbar. Durch zusätzliche Inkubation mit Saccharose wird diese Bande schwächer. Außerdem wird durch Saccharose die Expression von Cathepsin D angeregt. AK: SII-10 (Cathepsin D), G4171 ( $\beta$ -GC), LIMP-2-T2 (LIMP-2), 3F10-POD (HA), A2066 (Aktin).



## **5 Diskussion**

Nachdem LIMP-2 im Jahr 2007 von Reczek *et al.* als Transporter für  $\beta$ -GC identifiziert wurde, wurden in kurzer Zeit viele Verbindungen zum Morbus Gaucher, seit neuestem aber auch zum Parkinson-Syndrom hergestellt. LIMP-2 scheint bei diesen Erkrankungen zumindest einen modifizierenden Einfluss auf das Krankheitsgeschehen oder das Erkrankungsrisiko zu haben.

In Zusammenhang mit einer *GBA-1*-Mutation konnte, wie einleitend beschrieben, gezeigt werden, dass die heterologe LIMP-2-Expression zum Transport dieser sonst im ER persistierenden mutierten  $\beta$ -GC führt. Dies konnte auch im Rahmen dieser Arbeit reproduziert werden (s. Abb. 1.1.6).

Mit dem Ziel, einen ähnlichen Effekt *in vivo* erzielen zu können, wurde in dieser Arbeit an der Charakterisierung und Stimulation des *SCARB2*-Promotors gearbeitet. Im Folgenden sollen die Ergebnisse diskutiert werden.

### **5.1 Charakterisierung und Stimulation des *SCARB2*-Promotors**

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Promotorsequenz für *SCARB2* setzt sich zusammen aus den 1397 Basenpaaren, die dem Startcodon von *SCARB2* vorgeschaltet sind. Da Promotoren Sequenzen sind, die dem von ihnen regulierten Gen direkt vorgestellt sind und eine Länge von einigen hundert Basenpaaren haben (Riethoven 2010), ist es somit höchst wahrscheinlich, dass der Promotor von *SCARB2* in der untersuchten Sequenz vollständig enthalten ist. Es ist gleichzeitig nicht völlig auszuschließen, dass er sich in noch weiter stromaufwärts gelegene Sequenzbereiche oder bis in Regionen, die stromabwärts hinter dem Startcodon liegen, erstreckt.

Promotoren sind nicht die einzigen Mechanismen, über welche die Expression von Genen gesteuert wird. In Abschnitt 1.2.1 wurden bereits die weiter vom Gen entfernten *silencer* und *enhancer* beschrieben (Riethoven 2010). Zusätzlich gibt es auch regulatorische Einflüsse, die vom Gen selbst ausgeübt werden, und die zum Teil sogar von Exonen desselben Gens ausgehen können (Khan *et al.* 2012). Des Weiteren gibt es Modifikationen, welche die DNS nur von außen betreffen; zu ihnen gehört die Methylierung von DNS sowie beispielsweise die Acetylierung von Histonen (Arnaudo und Garcia 2013). In dieser Arbeit wurde also nur

einer von vielen möglichen Regulationsmechanismen untersucht, der die Expression von LIMP-2 beeinflussen könnte.

Für viele lysosomale Gene wurde das Vorhandensein von sogenannten *housekeeping*-Promotoren beschrieben (Calvo *et al.* 1995, Karageorgos *et al.* 1997). Dies sind Promotoren, die ohne besondere Stimulation für eine kontinuierliche Expression ihres nachgeschalteten Gens sorgen. Sie regulieren Gene, welche die Zelle unter Normalbedingungen benötigt, ohne dass sie auf einen konkreten Reiz reagieren muss. *Housekeeping*-Promotoren sorgen also im Falle von lysosomalen Genen dafür, dass genug funktionelle Proteine vorhanden sind, um die reguläre Aufgabe der Lysosomen erfüllen zu können. Inwieweit diese *housekeeping*-Promotoren über ihr Basisniveau an Aktivität hinaus angeregt werden können, muss aber im Einzelfall untersucht werden.

Beim Abgleich der humanen mit der murinen Promotorsequenz von *SCARB2* konnten 19 Transkriptionsfaktorbindungsstellen identifiziert werden (s. Abb. 4.1.1.1). Allerdings ist dies nicht zwangsläufig die absolute Zahl der realen Transkriptionsfaktorbindungsstellen, da bei dieser *in silico* Analyse nur solche Matrizes erkannt werden konnten, die der Software bei heutigem Wissensstand bekannt sind. Außerdem könnten Bindungsstellen übersehen worden sein, die im Menschen eine wichtige Rolle spielen, aber in Mäusen nicht vorkommen. Auch können viele der ermittelten Matrizes ohne regulatorische Bedeutung sein, da sie gegebenenfalls nur zufällig zwischen Maus und Mensch konserviert sein könnten. Um der Bedeutung der ermittelten Transkriptionsfaktorbindungsstellen genauer auf den Grund zu gehen, wurden die Deletionskonstrukte des *SCARB2*-Promotors erstellt und auf ihre Aktivität hin überprüft. Dabei zeigte sich, dass in den vom Gen weiter entfernten Sequenzen allenfalls überwiegend repressive Elemente zu finden sind (s. Abb. 4.1.2). Trotzdem ist es möglich, dass hier Matrizes lokalisiert sind, die auf spezielle Stimulation hin die Expression von LIMP-2 steigern könnten. Es zeigte sich, dass durch das alleinige Entfernen der „TFBS“ genannten Sequenz die Aktivität des *SCARB2*-Promotors auf das 0,6-fache sank (s. Abb. 4.1.2). Über diese Sequenz scheinen daher Stimuli vermittelt zu werden, welche die Expression des Gens erhöhen. In Folge dieser Beobachtung schien es sinnvoll, einen oder mehrere der hier bindenden Transkriptionsfaktoren genauer zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde daraufhin der Transkriptionsfaktor CREB-1 ausgewählt. Für CREB-1 wurde bereits eine Verbindung zu neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben

(Chalovich *et al.* 2006) und seine Bindungsmatrix kommt im untersuchten *SCARB2*-Promotor fünfmal vor. Damit erschien CREB-1 ein vielversprechender Kandidat zu sein, der die Expression von LIMP-2 steigern könnte. Auch der Transkriptionsfaktor E2FF könnte eine wichtige Rolle in der Regulation der LIMP-2-Expression spielen. Für diesen Transkriptionsfaktor liegen mit 15 Bindungsstellen mit Abstand die meisten Matrizes im Promotor vor. Allerdings ist nach heutigem Wissenstand kein direkter Zusammenhang zwischen E2FF und Lysosomen oder Neurodegeneration bekannt, weswegen dieser Transkriptionsfaktor hier nicht näher untersucht wurde.

Um den Einfluss von CREB-1 auf den *SCARB2*-Promotor zu beleuchten, wurde in dieser Arbeit ein Luziferase-Assay verwendet. Es zeigte sich allerdings, dass CREB-1 keinen signifikanten Effekt auf die Promotoraktivität hat. Bei der Transfektion mit *CREB-1* zeigte sich zwar eine leichte Aktivitätssteigerung des *SCARB2*-Promotors (1,2-fach), diese erreichte aber keine Signifikanz (s. Abb. 4.2.2.1). Bei CREB-1 handelt es sich um einen phosphorylationsabhängig regulierten Transkriptionsfaktor, der in seiner phosphorylierten Form an die DNS bindet (Mayr und Montminy 2001). Zur weiteren Untersuchung des CREB-1-Einflusses wurde der Luziferase-Assay auch mit dem Phosphodiesteraseinhibitor IBMX und dem Adenylatcyclaseaktivator Forskolin durchgeführt. So sollte endogenes CREB-1 in den Zellen aktiviert werden. Aber auch in diesem Versuch zeigte sich kein signifikanter Effekt auf den *SCARB2*-Promotor (s. Abb. 4.2.2.1). Des Weiteren gibt es Erkenntnisse, denen zufolge CREB-1 über den wnt-Signalweg stimuliert werden kann (Chen *et al.* 2005). Um auch diese Möglichkeit zu prüfen, wurden Zellen für den Luziferase-Assay mit wnt- und L-Medium inkubiert. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Effekt auf den *SCARB2*-Promotor (s. Abb. 4.2.2.1). Es kann also davon ausgegangen werden, dass CREB-1 unter den Bedingungen dieses Versuches höchstens einen sehr geringen Einfluss auf die Regulation der LIMP-2-Expression hat.

In einem weiteren Ansatz sollte die Rolle von kationischen amphiphilen Medikamenten (CADs) untersucht werden. Über eine Membranpermeabilisierung von Lysosomen wird Stress auf die Zelle ausgeübt (Petersen *et al.* 2013), welcher zu einer gesteigerten Expression von lysosomalen Proteinen wie LIMP-2 führen könnte. Die beiden im Luziferase-Assay betrachteten Medikamente Desipramin und Chloroquin führten allerdings zu keiner signifikanten Veränderung der *SCARB2*-Promotoraktivität (s. Abb. 4.2.2.1). Wenn überhaupt

konnte in diesem Versuch eine leichte Verminderung der Expression festgestellt werden (0,8-fach). Es könnte sein, dass durch die eingesetzten Medikamente ein so großer Stress auf die Lysosomen ausgeübt wurde, dass sie zunächst völlig zerstört wurden und es erst in einer späteren Phase zur Reparatur oder Neubildung dieser Kompartimente kam. Eventuell liegt also ein möglicher Expressionsanstieg von *SCARB2* außerhalb des betrachteten Zeitfensters. Es wäre aber auch möglich, dass die LIMP-2-Expression nicht ansteigt, weil trotz Membranpermeabilisierung der Lysosomen das noch vorhandene LIMP-2 wiederverwertet werden kann. Zusammenfassend scheinen die CADs nach diesem Ergebnis nicht geeignet, um die LIMP-2-Expression über eine Promotoraktivierung zu steigern.

Der in der Literatur als Haupttranskriptionsfaktor des CLEAR-Netzwerkes beschriebene Transkriptionsfaktor ist TFEB (Palmieri *et al.* 2011). Für TFEB zeigten Song *et al.* 2013, dass er eine Steigerung des mRNA-Levels von LIMP-2 induzieren kann. In dem hier durchgeführten Luziferase-Assay konnte durch TFEB allerdings keine signifikante Steigerung der *SCARB2*-Promotoraktivität dokumentiert werden (s. Abb. 4.2.2.1). Auch im *Western blot* ließ sich kein sichtbarer Effekt von TFEB auf LIMP-2 detektieren (s. Abb. 4.4.3.1). Um eine sichere Aussage treffen zu können, wurde im Luziferase-Assay außer humanem *TFEB* auch mutiertes humanes *TFEB S211A* (konstitutiv aktiv) transfiziert und außerdem Cyclodextrin eingesetzt. Cyclodextrin führt zu einer Aktivierung von endogenem TFEB (Song *et al.* 2014). In all diesen Versuchen konnte kein signifikanter Effekt gemessen werden, es kam lediglich zu einer nicht signifikanten sehr leichten Aktivierung des *SCARB2*-Promotors auf das 1,2-fache (s. Abb. 4.2.2.1). Dieses Ergebnis steht zunächst im Widerspruch zur Veröffentlichung von Song *et al.* (2013). Allerdings misst der hier angewandte Luziferase-Assay auf Ebene der Promotoraktivität. Es wäre denkbar, dass TFEB zwar kaum einen Effekt auf den *SCARB2*-Promotor hat, es aber trotzdem zu einer Stabilisierung der LIMP-2-mRNA führt. So ließe sich dieses Ergebnis mit der Literatur in Einklang bringen. Dass allerdings auch im *Western blot* kein Effekt von TFEB auf LIMP-2 auszumachen ist, würde dann wiederum bedeuten, dass es trotz gesteigerter LIMP-2-mRNA nicht zu einer gesteigerten Proteinexpression kommt. Demzufolge hätte TFEB einen alleingestellten Einfluss auf die mRNA von LIMP-2 und weder auf die Promotoraktivität und damit Transkription, noch auf die Translation und damit Expression von LIMP-2. Eine ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte *real-time* quantitative PCR (q-PCR) sollte Aufschluss darüber geben, führte aber unter den gegebenen Umständen zu keinem eindeutigen Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Nach den Erkenntnissen

dieser Arbeit scheint aber eine Regulation der LIMP-2-Expression über TFEB eher unwahrscheinlich zu sein.

Als einziger signifikanter Einfluss, der die Promotoraktivität von *SCARB2* steigert, wurde im Luziferase-Assay die Inkubation mit hypoosmolarer Saccharose detektiert (s. Abb. 4.2.2.1). Diese führte auch im *Western blot* zu einer 1,8-fachen Steigerung der Expression des nachgeschalteten Gens (s. Abb. 4.2.2.2). Die Ergebnisse zum Thema Saccharose sollen im Abschnitt 5.2 separat diskutiert werden.

Abschließend wurde mit der nun etablierten Methode des Luziferase-Assays ein *screening* nach Substanzen durchgeführt, welche die Aktivität des *SCARB2*-Promotors steigern könnten. Allerdings wurde dieser mit  $n=1$  nur exemplarisch durchgeführt. Es wurden 20 Substanzen ohne vorherige Auswahl getestet und im Ergebnis zeigte sich vor allem für 3-(2-Chlorophenyl)-N-(5-Isopropyl-1,3,4-Thiadiazol-2-yl)-5-Methyl-4-Isoxazolcarboxamid eine deutliche Aktivitätssteigerung des Promotors auf das 2,2-fache (s. Abb. 4.3). Es handelt sich hierbei um ein einmaliges Ergebnis, welches daher weiter abgesichert werden sollte. Hinzu kommt, dass das *screening* unter suboptimalen Arbeitsbedingungen stattgefunden hat. Aufgrund der hohen Probenanzahl kam es zu Verzögerungen in der Aufbereitung (s. Abschnitt 3.8.1), wodurch selbst der Positivwert von Saccharose verfälscht wurde.

Zur weitergehenden Untersuchung und Charakterisierung des Promotors von *SCARB2* erscheinen weitere Versuche sinnvoll. Zum Einen könnten weitere Transkriptionsfaktoren wie E2FF, die in der Region „TFBS“ binden, untersucht werden. Zum Anderen wäre ein groß angelegtes *screening* auf regulierende Substanzen und Transkriptionsfaktoren hin ein wichtiger Schritt. Auch könnte neben dem Luziferase-Assay eine q-PCR als sinnvoll angesehen werden, da sie Ergebnisse auf mRNA Ebene verifizieren könnte. Auch ein *Western blot* könnte verwendet werden, um den realen Einfluss von Stimulanzen auf die LIMP-2-Expression zu überprüfen und auch zu quantifizieren. Sowohl in q-PCR als auch im *Western blot* gäbe es den Vorteil, dass nicht nur der Promotor isoliert betrachtet, sondern auch andere regulatorische Elemente berücksichtigt würden. Schlussendlich müssten bei einem positiven Treffer die Effekte auf die Zelle insgesamt, den  $\beta$ -GC-Transport, den Abbau von Glukosylceramid und  $\alpha$ -Synuclein sowie die den ganzen Organismus betreffenden Wirkungen untersucht werden.

## 5.2 Der Einfluss von Saccharose auf LIMP-2, $\beta$ -GC und $\alpha$ -Synuclein

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Inkubation von Zellen mit hypoosmolarer Saccharose zu einer Aktivierung des Promotors für *SCARB2* auf das 2,1-fache führt (s. Abb. 4.2.2.1). Auch die Menge an exprimiertem LIMP-2 stieg nach Saccharose-Stimulation (s. Abb. 4.2.2.2). Song *et al.* konnten bereits 2013 einen Anstieg von LIMP-2-mRNA nach Inkubation mit Saccharose beobachten. Um auch diese Auswirkungen von Saccharose auf die mRNA von LIMP-2 zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine q-PCR durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Diese führte allerdings unter den gegebenen Umständen zu keinem eindeutigen Ergebnis. Die Quantifizierung der LIMP-2 mRNA wäre insofern interessant, als dass der Angriffspunkt von Saccharose so genauer spezifiziert werden könnte. Es wäre möglich, dass durch Saccharose neben der beobachteten Promotoraktivierung auch eine posttranskriptionelle Modifikation der LIMP-2-mRNA induziert wird, über welche das Expressionslevel des Proteins wiederum beeinflusst werden könnte. Da allerdings die Promotoraktivität auf das 2,1-fache und die Proteinexpression auf das 1,8-fache steigen (vgl. Tabelle 8.1.3 und 8.1.4), scheinen zwischengeschaltete Schritte eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Es ist eher anzunehmen, dass der durch Saccharose auf LIMP-2 ausgeübte Effekt hauptsächlich über die Promotoraktivierung vermittelt wird. Als Erklärungsansatz wurde von Song *et al.* 2013 deklariert, dass Saccharose über eine Aktivierung von TFEB wirkt. Der vorgeschlagene Mechanismus wäre demzufolge, dass Saccharose TFEB aktiviert und TFEB wiederum den Promotor von *SCARB2* anregt. In diesem Zusammenhang konnte in dieser Arbeit reproduziert werden, dass Saccharose zu einer Translokation TFEBs vom Zytoplasma in den Nukleus führt, was für eine Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors spricht (Roczniak-Ferguson *et al.* 2012). Allerdings konnte, wie in Abschnitt 5.1 bereits erläutert, in dieser Arbeit kein Einfluss von TFEB allein auf den Promotor von *SCARB2* gemessen werden. Auch die Expression von LIMP-2 schien nicht durch TFEB beeinflusst (Abb. 4.4.3.1). Außerdem führte die gleichzeitige Expression von TFEB mit einer Inkubation mit Saccharose zu keiner Steigerung der Promotoraktivität oder der LIMP-2-Expression über das Maß hinaus, welches auch alleine durch Saccharose erreicht wird. Der von Saccharose auf LIMP-2 ausgeübte Einfluss scheint also nicht über TFEB vermittelt zu sein, jedoch trotzdem über eine Promotoraktivierung von *SCARB2* zu wirken.

Die Beobachtungen, die zur allgemeinen Wirkung von Saccharose in dieser Arbeit gemacht wurden, decken sich weitestgehend mit den in der Literatur beschriebenen Effekten. Wie von Deng und Storrie 1988 erstmals beschrieben führt die Inkubation von Zellen mit hypoosmolarer Saccharose zur Vergrößerung der späten Endosomen (s. Abb. 4.4.1.1). Der zeitliche Verlauf der Saccharosewirkung wurde in dieser Arbeit anhand der Aktivität des Enzyms  $\beta$ -GC gemessen. Es zeigten sich erste Effekte nach einer Inkubationszeit von einem Tag, welche sich annähernd positiv linear über die beiden Folgetage fortsetzten (s. Abb. 4.4.6 C). Dies entspricht in etwa dem zeitlichen Verlauf, der für die Enzymaktivität (Warburton und Wynn 1976) und mRNA-Synthese (Song *et al.* 2013) verschiedener lysosomaler Enzyme nach Saccharose-Stimulation beschrieben worden war. Ebenso wurde die Dosis-Wirkungs-Beziehung von Saccharose an der Aktivität von  $\beta$ -GC gemessen. Hier zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen Konzentration und Enzymaktivität (s. Abb. 4.4.6 D), welcher für andere lysosomale Enzyme bereits 1982 von Kato *et al.* beobachtet wurde. Zur Abgrenzung, ob der Effekt von Saccharose auf die Enzymaktivität von  $\beta$ -GC spezifisch ist, wurde die lysosomale Hydrolase  $\beta$ -Hexosaminidase untersucht. Hier ließ sich zum Teil ebenfalls eine leichte Enzymaktivitätssteigerung messen (s. Abb. 4.4.6 B), allerdings kam es in anderen Versuchsreihen eher zu einer Aktivitätsminderung (s. Abb. 8.1.9.3). Keine der beiden Tendenzen erreichte eine statistische Signifikanz. Dies spricht für eine recht spezifische Wirkung von Saccharose auf  $\beta$ -GC. Schon Kato *et al.* (1982) untersuchten ebenfalls den Einfluss von Saccharose auf verschiedene lysosomale Enzyme und konnten je nach Zellart und Enzym entweder eine Senkung oder Steigerung der entsprechenden Enzymaktivität beobachten. Saccharose scheint demzufolge auf viele lysosomale Enzyme zu wirken.

Zur Betrachtung eines anderen lysosomalen Stressfaktors wurde in dieser Arbeit ein Versuch durchgeführt, in welchem die Zellen unter Hungerbedingungen gehalten wurden (s. Abb. 8.2.1). Es zeigte sich ein ähnliches Ergebnis wie nach Inkubation mit Saccharose. Die Steigerung der Enzymaktivität von  $\beta$ -GC wäre demnach wie folgt erklärbar: Saccharose übt einen unspezifischen Stress auf das Lysosom aus, wodurch es zur Herauf- und Herunterregulation der Aktivität verschiedener lysosomaler Enzyme kommt. Eines davon ist  $\beta$ -GC. Eine andere Hypothese besagt, dass durch Hungerbedingungen mTOR inaktiviert wird und es hierüber wiederum zu einer Aktivierung von TFEB kommt (Settembre *et al.* 2012) (vgl. Abb.1.2.2). Dies entspräche dem Ansatz, dass TFEB eben doch eine Rolle in der Aktivierung



von  $\beta$ -GC spielt. Diese Hypothese wird durch die vorhergehenden Ergebnisse dieser Arbeit aber nicht unterstützt. Besonders die Tatsache, dass es auch in LIMP-2-defizienten Zellen unter Hungerbedingungen zu einer Bandenverschiebung von  $\beta$ -GC kommt (Daten nicht gezeigt), eröffnet weiteren Raum für Erklärungshypothesen (s. S. 84).

Neben dem Effekt von Saccharose auf die LIMP-2-Expression wurde des Weiteren die Wirkung auf die Proteine  $\beta$ -GC, Cathepsin D und  $\alpha$ -Synuclein untersucht. Ebenso wie bei LIMP-2 führte eine Inkubation der Zellen mit Saccharose zu einer Expressionssteigerung von  $\beta$ -GC (s. Abb. 4.4.5.1 (2,2-fach) und Abb. 4.4.8) und Cathepsin D (s. Abb. 4.4.8). Für Cathepsin D wurde schon 1976 gezeigt, dass durch Saccharose die Aktivität des Enzyms gesteigert wird (Warburton und Wynn 1976). Dies würde die Theorie stützen, dass durch hypoosmolare Saccharose ein lysosomaler Stress ausgelöst wird, der zur vermehrten Produktion verschiedener lysosomaler Proteine führt. Das Bild, welches sich nach dem Einwirken von Saccharose zeigt, ist daher nicht isoliert auf die Expressionssteigerung von LIMP-2 zurückzuführen. Auch bleibt die Frage offen, ob die gesteigerte Enzymaktivität von  $\beta$ -GC durch den vermehrten Transport via LIMP-2 oder durch die Expressionssteigerung von  $\beta$ -GC induziert durch Saccharose selbst zustande kommt.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Proteinen kommt es bei  $\alpha$ -Synuclein durch Saccharose zu einer Reduktion der messbaren Proteinmenge (s. Abb. 4.4.8).  $\alpha$ -Synuclein ist, wie eingangs beschrieben, ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese des Parkinson-Syndroms und es ist ein Substrat der  $\beta$ -GC. Infolge der Expressions- und Enzymaktivitätssteigerung von  $\beta$ -GC scheint auch der Abbau von  $\alpha$ -Synuclein anzusteigen. Diese Hypothese könnte zumindest die Reduktion von  $\alpha$ -Synuclein im *Western blot* erklären (Abb. 4.4.8). Die Reduktion von  $\alpha$ -Synucleinaggregaten ist eines der Hauptziele dieses Gesamtprojektes. In dieser Arbeit bleibt offen, über welchen exakten Mechanismus es zu dieser Reduktion kommt. Neben der Einbindung von LIMP-2 und  $\beta$ -GC sind auch andere Mechanismen denkbar, welche beispielsweise den Transport von  $\alpha$ -Synuclein oder die Stabilisierung der Aggregate betreffen könnten. Auch der Anstieg von Cathepsin D (s. Abb. 4.4.8) oder anderer Proteasen nach Inkubation mit Saccharose könnte zu einem vermehrten Abbau von  $\alpha$ -Synuclein führen (McGlinchey und Lee 2015).

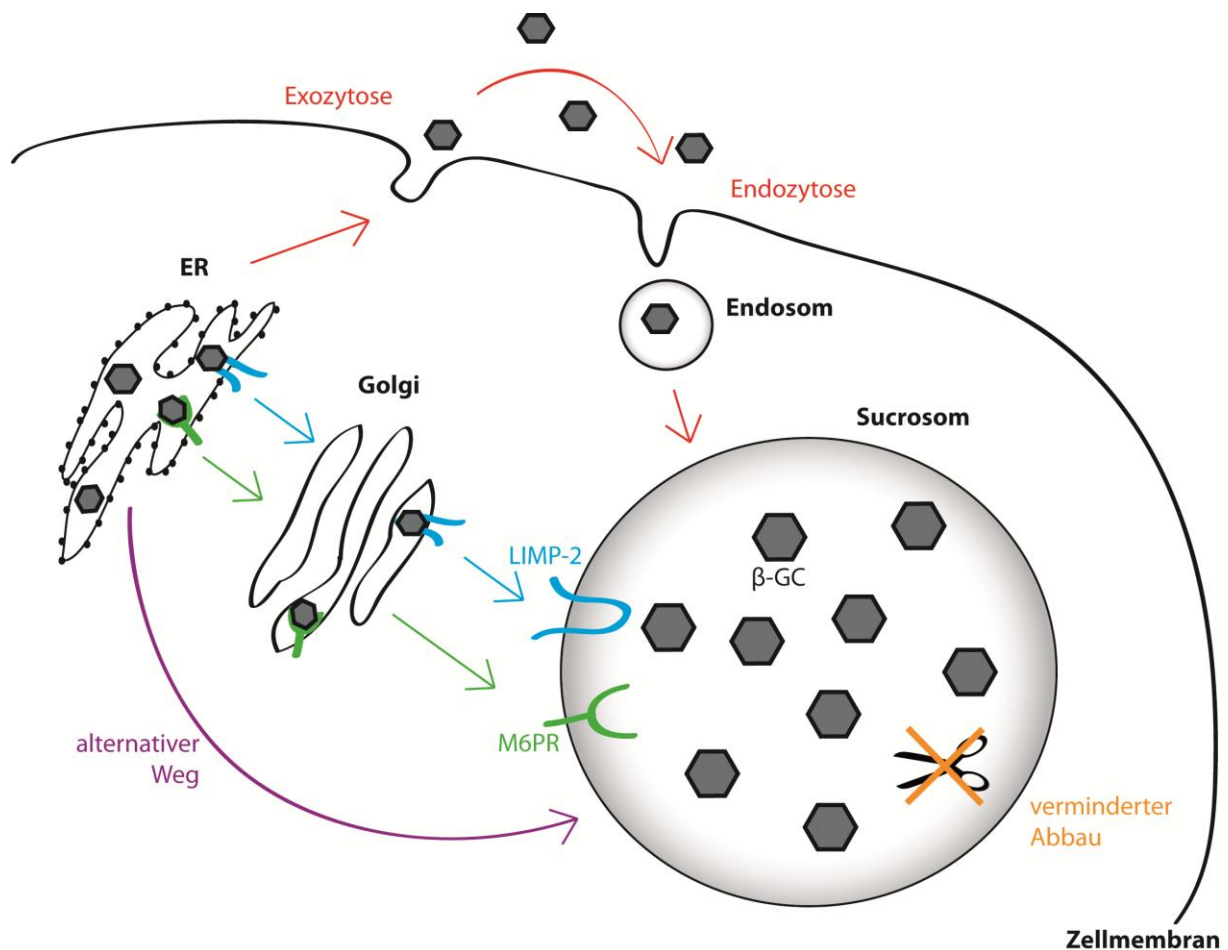
Bei der Betrachtung der Wirkung von Saccharose ergeben sich noch weitere, vor allem den Morbus Gaucher betreffende Auswirkungen des Zuckers. Beim Morbus Gaucher kommt es zu einem Defekt der  $\beta$ -GC, welcher wie bei der Mutation L444P zu einer Fehlfaltung des Enzyms führen kann. In der Folge verbleibt das Enzym im ER statt in die Lysosomen transportiert zu werden (Beutler und Grabowski 2001). Wie Reczek *et al.* 2007 zeigten, führt eine heterologe Expression von LIMP-2 dazu, dass auch die fehlgefaltete  $\beta$ -GC L444P in post-ER-Kompartimente gelangt. Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit reproduziert werden (s. Abb. 1.1.6). Bereits im Vorfeld dieser Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass die Inkubation von Zellen mit Saccharose einen ähnlichen Effekt auf die Lokalisation von  $\beta$ -GC L444P hat (Song *et al.* 2013). Hier könnte der Querschluss gezogen werden, dass es durch Saccharose zu einer gesteigerten Expression von LIMP-2 kommt, welche dann wiederum für den gesteigerten Transport von  $\beta$ -GC L444P verantwortlich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es auch in LIMP-2-defizienten MEF-Zellen durch Saccharose zu gesteigerten Mengen an  $\beta$ -GC in post-ER-Kompartimenten kommt. Zur genaueren Bestimmung der Lokalisation der  $\beta$ -GC nach Saccharose-Stimulation wurde ein *Inhibody staining* durchgeführt (Witte *et al.* 2010), welches allerdings kein valides Ergebnis lieferte (Daten nicht gezeigt). Dass  $\beta$ -GC aber auch in Abwesenheit von funktionellem LIMP-2 nach Saccharose-Inkubation in post-ER-Kompartimente gelangt, konnte in der Arbeitsgruppe von Paul Saftig durch Friederike Zunke in AMRF-Patientenzellen reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Beobachtungen ist anzunehmen, dass es für  $\beta$ -GC einen alternativen Weg in post-ER-Kompartimente geben muss, der von LIMP-2 unabhängig ist. Außerdem lässt sich hier der Rückschluss ziehen, dass die Enzymaktivitätssteigerung von  $\beta$ -GC nicht durch die Expressionssteigerung von LIMP-2 hervorgerufen ist (vgl. Abb. 4.4.6). Für Wildtyp Zellen hingegen lässt sich nicht sagen, dass LIMP-2 unter Saccharose-Einfluss keinen modulierenden Effekt auf  $\beta$ -GC hat.

Was aber auf jeden Fall unter Saccharose-Einwirkung beobachtet werden konnte, ist, dass es für  $\beta$ -GC eine Möglichkeit gibt, in post-ER-Kompartimente zu gelangen, ohne durch LIMP-2 transportiert zu werden (s. Abb. 5.2). Normalerweise zeigt sich in LIMP-2-defizienten Zellen nur ein Signal für im ER lokalisierte  $\beta$ -GC (Reczek *et al.* 2007). Da der Transporter LIMP-2 in diesen Zellen nicht vorhanden ist, wird sein Zielprotein  $\beta$ -GC nicht mehr ins Lysosom

transportiert. Doch in denselben Zellen zeigt sich nach Inkubation mit Saccharose im *Western blot* ein Signal für  $\beta$ -GC in post-ER-Kompartimenten (s. Abb. 4.4.5.2). Es wäre denkbar, dass  $\beta$ -GC dorthin gelangt, indem es durch Endozytose aus dem umgebenden Medium wieder aufgenommen wird, nachdem es zuvor mangels Transporter sezerniert wurde (Reczek *et al.* 2007). Eine andere Hypothese ist, dass durch Saccharose und ihre Wirkungen auf die Zelle ein alternativer Transportmechanismus für  $\beta$ -GC in Gang gesetzt wird. Beispielsweise wäre es möglich, dass in diesem Falle der Mannose-6-phosphat-Weg eingeschaltet wird. Dass Saccharose den Abbau von  $\beta$ -GC beeinflussen würde, ist zwar auch denkbar, ist nach den Ergebnissen in Abbildung 4.4.7.2 aber nicht anzunehmen.

In dieser Arbeit wurde ein erster Versuch unternommen, den Weg von  $\beta$ -GC nach Stimulation mit Saccharose zu beschreiben. Dabei wurde die Hypothese untersucht, dass  $\beta$ -GC durch Endozytose aufgenommen würde und so in post-ER-Kompartimente gelangt. Hierzu wurde mittels Dynasore die Clathrin-vermittelte Endozytose blockiert (Macia *et al.* 2006). Trotz dieser Endozytoseblockade in LIMP-2-defizienten Zellen war immer noch post-ER- $\beta$ -GC detektierbar. Bereits zuvor war beschrieben worden, dass die Inkubation von Zellen mit hypoosmolarer Saccharose an sich schon zu einer Blockierung der Endozytose führt (Wagner *et al.* 1971, Warburton und Wynn 1976). Auch osmotischer Stress (allerdings hier hyperosmolar) führt zu einer Blockade der Clathrin-vermittelten Endozytose (Heuser und Anderson 1989). Zusammengenommen sprechen das Ergebnis des *Western blots* mit Dynasore sowie die einschlägige Literatur dagegen, dass  $\beta$ -GC nach Saccharose-Stimulation über Endozytose in post-ER-Kompartimente gelangt. Es scheint daher wahrscheinlich, dass es einen intrazellulären Weg gibt, über welchen das Enzym das Lysosom in Abwesenheit von LIMP-2 erreicht. In Zellen, die sowohl für LIMP-2 als auch für die Phosphotransferase defizient sind, könnte der Einfluss von Saccharose auf den  $\beta$ -GC-Transport untersucht werden. In ersten Versuchen, in denen der Mannose-6-Phosphat-Weg über einen Phosphotransferase-*knock-out* ausgeschaltet war, wurde der gleiche Effekt wie in Wildtyp und LIMP-2-defizienten Zellen beobachtet (s. Abb. 8.1.9.3). Allerdings kann, solange nur entweder LIMP-2 oder die Phosphotransferase ausgeschaltet ist, gegebenenfalls immer noch das jeweils andere Protein den Transport von  $\beta$ -GC übernehmen. Daher ist ein doppelter *knock-out* notwendig, um eine Einbindung des Mannose-6-phosphat-Weges als Alternative zum Transport via LIMP-2 auszuschließen.



**Abbildung 5.2: Schema verschiedener Hypothesen bezüglich des Transports und der Anreicherung von  $\beta$ -GC unter Saccharose-Einfluss.**  $\beta$ -GC wird unter Normalbedingungen von seinem Transporter LIMP-2 gebunden und zum Lysosom transportiert. Unter dem Einfluss von Saccharose scheint es aber einen weiteren oder alternativen Transportmechanismus zu geben, da  $\beta$ -GC auch in LIMP-2-defizienten Zellen in post-ER-Kompartimente gelangt. Denkbar ist ein Transport mittels Mannose-6-phosphat-Rezeptor (M6PR), über Exo- und Endozytose oder einen noch nicht bekannten intrazellulären Weg. Eine andere Möglichkeit, wie es zur Anreicherung von  $\beta$ -GC nach Inkubation mit Saccharose kommt, ist, dass in Sucrosomen der Abbau von  $\beta$ -GC reduziert sein könnte.

Es kann abschließend bezüglich Saccharose gesagt werden, dass sie zu einer Promotoraktivitäts- und Expressionssteigerung von LIMP-2 führt. Außerdem steigert sie die Expression von verschiedenen lysosomalen Proteinen, darunter auch  $\beta$ -GC. Besonders der Anteil an post-ER- $\beta$ -GC steigt unter Saccharose-Einfluss. Es zeigt sich ein ähnliches Bild, wie nach heterologer LIMP-2-Expression, aber es scheint zumindest partiell ein anderer Mechanismus als der Transport via LIMP-2 angeregt zu werden.

### 5.3 Therapeutische Relevanz der Ergebnisse

Grundlage dieser Arbeit ist die Annahme, dass eine Funktionsstörung von  $\beta$ -GC eine essentielle Rolle für die Pathogenese vom Morbus Gaucher sowie in einigen Fällen für das Parkinson-Syndrom spielt. Trotz einer großen Anzahl von Belegen einer Assoziation zwischen  $\beta$ -GC und  $\alpha$ -Synuclein-Aggregaten (Manning-Bog *et al.* 2009, Mazzulli *et al.* 2011, Sardi *et al.* 2011, Xu *et al.* 2011, Sardi *et al.* 2013, Bae *et al.* 2014, Ginns *et al.* 2014, Spatola und Wider 2014) gibt es auch Veröffentlichungen, welche keinen Zusammenhang zwischen  $\beta$ -GC-Funktionalität und der Ansammlung von  $\alpha$ -Synuclein beschreiben (Dermentzaki *et al.* 2013). Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen aber erneut, dass über eine Anregung des Transports und der Expression von  $\beta$ -GC mittels Saccharose der Abbau von  $\alpha$ -Synuclein gefördert werden kann (s. Abb. 4.4.8). Die Ausgangshypothese, dass  $\beta$ -GC an der Pathogenese vom Parkinson-Syndrom beteiligt ist, wird also durch diese Arbeit gestützt.  $\beta$ -GC als Angriffspunkt für eine Therapie dieser Erkrankung zu nutzen, erscheint daher weiterhin sinnvoll. Die heterologe  $\beta$ -GC-Expression wird auch in ersten *in vivo* Studien als wirkungsvoll erachtet (Sardi *et al.* 2011).

Neben dem Parkinson-Syndrom könnten noch andere Synucleinopathien betrachtet werden. Beispielsweise kommt es auch bei der Lewy-Körper-Demenz (engl. *Dementia with Lewy bodies*, DLB), der zweithäufigsten neurodegenerativen Demenz, zu Ansammlungen von  $\alpha$ -Synuclein (Zaccai *et al.* 2005).

Die Bedeutung von LIMP-2 im Spezielleren ist für das Parkinson-Syndrom noch umstritten. Während einige Autoren davon ausgehen, dass es in normalen Mengen vorhanden ist (Gegg *et al.* 2012), zeigten andere, dass LIMP-2 in gesteigerten Mengen in den überlebenden dopaminergen Neuronen von Parkinson-Patienten vorkommt (Rothaug *et al.* 2014). Sollte letztere Annahme zutreffen, so scheint der Körper schon endogen die Expression von LIMP-2 hochzuregulieren, um dem Parkinson-Syndrom entgegen zu wirken. Diese Tendenz weiter zu verstärken oder schon in früheren Stadien der Erkrankung therapeutisch einzusetzen, scheint daher ein vielversprechender Ansatz zu sein.

Ob diese Steigerung der LIMP-2-Expression allerdings *in vivo* durch Saccharose hervorgerufen werden kann, ist zweifelhaft. Zwar konnte durch Saccharose eine Reduktion von  $\alpha$ -Synuclein (s. Abb. 4.4.8), eine gesteigerte  $\beta$ -GC-Expression (s. Abb. 4.4.5.1 C) und ein

gesteigerter  $\beta$ -GC-Transport (s. Abb. 4.4.5.2) sowie eine gesteigerte LIMP-2-Expression (s. Abb. 4.2.2.2 und Abb. 4.4.5.1 B) erreicht werden, jedoch hatte Saccharose in höheren Konzentrationen toxische Effekte auf die inkubierten Zellen. Es wurde ein nicht unerheblicher osmotischer Stress ausgeübt, dessen Wirkung im lebenden Organismus zu einer Volumen- und Elektrolytverschiebung führen könnte. Auch können die Zellen von Säugetieren sich nicht ohne weiteres von der Saccharose befreien, da ihnen das Enzym Invertase fehlt (Isaac *et al.* 2000). Hierdurch kommt es zum Anschwellen der Lysosomen und die Funktionalität dieser Kompartimente könnte in einem solchen Maße beeinträchtigt sein, dass dies fatale Auswirkungen auf den Organismus hätte. Bestenfalls könnte ein Therapieversuch mit Saccharose mittels lokaler Injektion in die *Substantia nigra* durchgeführt werden. Hierbei würden die den Gesamtorganismus betreffenden Nebenwirkungen umgangen. Eine orale Gabe der Saccharose ist hingegen kontraindiziert, da der Zucker dann wie bei normaler Nahrungsaufnahme aufgespalten und verdaut würde.

Diskussionswürdig ist des Weiteren die Rolle von TFEB. Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge hat TFEB keinen Effekt auf die LIMP-2-Expression (s. Abb. 4.2.2.1 und Abb. 4.4.3.1). Auch die Expression von  $\beta$ -GC scheint nicht durch TFEB beeinflusst zu sein (s. Abb. 4.4.3.1). Decressac *et al.* konnten aber 2013 zeigen, dass die Injektion von TFEB dopaminerge Neuronen von Mäusen mit Parkinson-Syndrom vor dem Zelluntergang bewahrt. Auch die  $\alpha$ -Synuclein-Aggregate und die Ausprägung der Krankheitssymptome konnten durch die TFEB-Injektion vermindert werden. TFEB scheint also therapeutisch im Mausmodell gute Erfolge zu erzielen. Vor dem Hintergrund dieser Arbeit werden diese Effekte aber nicht über LIMP-2 oder  $\beta$ -GC direkt vermittelt.

Unabhängig von TFEB erscheinen auch  $\beta$ -GC und LIMP-2 weiterhin als potentielle Therapieangriffspunkte für das Parkinson-Syndrom vielversprechend zu sein. Besonders für den Morbus Gaucher spielt der Transport von  $\beta$ -GC eine herausragende Rolle. Um diesen weiter zu adressieren, ist eine weitere Forschung an der Regulierung der LIMP-2-Expression von großer Wichtigkeit.

## **6 Zusammenfassung**

LIMP-2 wird als Transporter für  $\beta$ -GC zunehmend eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Erkrankungen Morbus Gaucher und Parkinson-Syndrom zugesprochen. Dabei scheint LIMP-2 vor allem einen modulierenden Einfluss auf das Krankheitsgeschehen zu haben. Wie gezeigt werden konnte, führt die heterologe Expression von LIMP-2 in einem Zell-Modell für Morbus Gaucher zu einem gesteigerten Transport des fehlgefalteten Enzyms  $\beta$ -GC in post-ER-Kompartimente.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Promotor von *SCARB2* genauer charakterisiert. Hierbei ließ sich eine Sequenz von 34 Basenpaaren als ein wichtiges regulatorisches Element identifizieren. Mittels einer *in silico* Analyse konnte der Kreis der Transkriptionsfaktoren, die an dieser Sequenz binden, auf drei Transkriptionsfaktoren eingekreist werden. Als ein potenzieller Regulator, der an dieser Sequenz bindet, wurde der Transkriptionsfaktor CREB-1 untersucht, was jedoch kein positives Ergebnis erbrachte. Außerdem wurde der Transkriptionsfaktor EB (TFEB) getestet, welcher in der Literatur als Stimulator der LIMP-2-Expression beschrieben wurde. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen dies allerdings weder auf Promotor- noch auf Expressionsebene (Luziferase-Assay und *Western blot*). Des Weiteren wurde auch der Einfluss von kationischen amphiphilen Medikamenten (CADs) auf den *SCARB2*-Promotor untersucht, ohne aber eine Steigerung der Promotoraktivität festzustellen.

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist, dass es durch Inkubation mit hypoosmolarer Saccharose zu einem signifikanten Anstieg der *SCARB2*-Promotoraktivität kommt. Gibt man diesen Zucker in das Nährmedium der Zellkultur, führt dies zur Aufnahme der Saccharose in die Zelle und zur Ausbildung großer Vakuolen, sogenannter „Sucrosomen“. Nach Stimulation mit Saccharose konnte sowohl im Luziferase-Assay eine Aktivierung des *SCARB2*-Promotors gemessen, als auch im *Western blot* eine gesteigerte Expression von LIMP-2 und  $\beta$ -GC festgestellt werden. Außerdem kam es in LIMP-2-defizienten Zellen zu einem gesteigerten Transport von  $\beta$ -GC in post-ER-Kompartimente sowie zu einem Anstieg der  $\beta$ -GC-Aktivität. In einem abschließenden Experiment konnte nachgewiesen werden, dass das Einwirken von Saccharose auch zu einer Reduktion der  $\alpha$ -Synuclein-Menge in den Zellen führt. Solch eine Reduktion von  $\alpha$ -Synuclein ist ein Ansatzpunkt in der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten des Parkinson-Syndroms.

## Summary

LIMP-2 as the transporter of  $\beta$ -GC is involved in the pathogenesis of the diseases Parkinson's disease and Gaucher Disease. Thereby LIMP-2 seems to have a modulating influence on the development and severity of these diseases. Recently it has been shown that the heterologous expression of LIMP-2 leads to an increased transport of misfolded  $\beta$ -GC in a model of Gaucher disease.

In the present work the promotor of *SCARB2* has been characterized more specifically. In this issue a sequence of 34 base pairs has been identified which seems to have a major impact on the regulation of the promotor activity. An *in silico* analysis of this regulatory element revealed three transcription factors binding to this sequence. As one potential regulator, the transcription factor CREB-1 was examined, showing no positive effect on the promotor activity. Further, the transcription factor EB (TFEB) was tested, which is described as a transcription factor stimulating the expression of LIMP-2. The results of the present work could not confirm this positive effect of TFEB on LIMP-2 neither in promotor activity (luciferase assay) nor in expression (Western blot). In addition the cationic amphiphilic drugs (CADs) were examined in respect to their influence on the promotor of *SCARB2* but were not found to induce an increased promotor activity.

However it could be shown that incubation with hypoosmolar sucrose leads to a significantly elevated *SCARB2* promotor activity. Cultivating cells in sucrose enriched medium induces the uptake of the sugar into the cells and the vacuolation, building so called "sucrosomes". After the stimulation with sucrose there was a mensurable increase of the activity of the *SCARB2* promotor in the luciferase assay as well as an increased protein expression of LIMP-2 and  $\beta$ -GC in Western blotting. Furthermore there was an elevation in the transport of  $\beta$ -GC into post-ER compartments in LIMP-2 deficient cells and an increase of  $\beta$ -GC activity. In a concluding experiment it could be shown that the incubation of cells with sucrose leads to a reduction of  $\alpha$ -synuclein inside the cells. Such a reduction of  $\alpha$ -synuclein is a promising approach for the development of new therapeutic strategies concerning Parkinson's disease.



## 7 Literaturverzeichnis

- Aerts, J.M., Hollak, C.E., Boot, R.G., Groener, J.E., Maas, M., (2006). Substrate reduction therapy of glycosphingolipid storage disorders. *J Inherit Metab Dis* **29** (2-3), 449-456.
- Aisen, P., (1998). Transferrin, the transferrin receptor, and the uptake of iron by cells. *Met Ions Biol Syst* **35**, 585-631.
- Alberts, A.S., Montminy, M., Shenolikar, S., Feramisco, J.R., (1994). Expression of a peptide inhibitor of protein phosphatase 1 increases phosphorylation and activity of CREB in NIH 3T3 fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 4398-4407.
- Altarescu, G., Hill, S., Wiggs, E., Jeffries, N., Kreps, C., Parker, C.C., Brady, R.O., Barton, N.W., Schiffmann, R., (2001). The efficacy of enzyme replacement therapy in patients with chronic neuronopathic Gaucher's disease. *J Pediatr* **138**, 539-547.
- Appelmans, F., Wattiaux, R., De Duve, C., (1955). Tissue fractionation studies. 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. *Biochem J* **59** (3), 438-45.
- Arnaudo, A.M., Garcia, B.A., (2013). Proteomic characterization of novel histone post-translational modifications. *Epigenetics Chromatin* **6** (1), 24.
- Badhwar, A., Berkovic, S.F., Dowling, J.P., Gonzales, M., Narayanan, S., Brodtmann, A., Berzen, L., Caviness, J., Trenkwalder, C., Winkelmann, J., Rivest, J., Lambert, M., Hernandez-Cossio, O., Carpenter, S., Andermann, F., Andermann, E., (2004). Action myoclonus-renal failure syndrome: characterization of a unique cerebro-renal disorder. *Brain* **127** (Pt 10), 2173-82.
- Bae, E.J., Yang, N.Y., Song, M., Lee, C.S., Lee, J.S., Jung, B.C., Lee, H.J., Kim, S., Masliah, E., Sardi, S.P., Lee, S.J., (2014). Glucocerebrosidase depletion enhances cell-to-cell transmission of alpha-synuclein. *Nat Commun* **5**, 4755.
- Bainton, D.F., (1981). The Discovery of Lysosomes. *J Cell Biol* **91**, 66s-76s.
- Banerji, J., Rusconi, S., Schaffner, W., (1981). Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* **27**, 299-308.
- Barlow, C.A., Kitiphongspattana, K., Siddiqui, N., Roe, M.W., Mossman, B.T., Lounsbury, K.M., (2008). Protein kinase A-mediated CREB phosphorylation is an oxidant-induced survival pathway in alveolar type II cells. *Apoptosis* **13** (5), 681-92.
- Bartsch, D., Casadio, A., Karl, K.A., Serodio, P., Kandel, E.R., (1998). CREB1 encodes a nuclear activator, a repressor, and a cytoplasmic modulator that form a regulatory unit critical for long-term facilitation. *Cell* **95** (2), 211-223.
- Berg-Fussman, A., Grace, M.E., Ioannou, Y., Grabowski, G.A., (1993). Human acid beta-glucosidase. N-glycosylation site occupancy and the effect of glycosylation on enzymatic activity. *J Biol Chem* **268** (20), 14861-6.
- Berkovic, S.F., Dibbens, L.M., Oshlack, A., Silver, J.D., Katerelos, M., Vears, D.F., Lüllmann-Rauch, R., Blanz, J., Zhang, K.W., Stankovich, J., Kalnins, R.M., Dowling, J.P., Andermann, E., Andermann, F., Faldini, E., D'hooge, R., Vadlamudi, L., Macdonell, R.A., Hodgson, B.L., Bayly, M.A., Savige, J., Mulley, J.C., Smyth, G.K., Power, D.A., Saftig, P., Bahlo, M., (2008). Array-Based Gene Discovery with Three Unrelated Subjects Shows SCARB2/LIMP-2 Deficiency Causes Myoclonus Epilepsy and Glomerulosclerosis. *Am J Hum Genet.* **82** (3), 673-684.
- Beutler, E., (1988). Gaucher disease. *Blood Rev* **2** (1), 59-70.
- Beutler, E., (2006). Gaucher disease: multiple lessons from a single gene disorder. *Acta Paediatr Suppl* **95** (451), 103-9.

- Beutler, E., Grabowski, G.A., (2001). The metabolic and molecular bases of inherited diseases, Gaucher Disease, 8 ed., *McGraw-Hill*.
- Blanz, J., Zunke, F., Markmann, S., Damme, M., Braulke, T., Saftig, P., Schwake, M., (2015). Mannose 6-phosphate-independent Lysosomal Sorting of LIMP-2. *Traffic* **16** (10), 1127-36.
- Bowman, E.J., Siebers, A., Altendorf, K., (1988). Bafilomycins: A class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7972 - 7976.
- Brady, R.O., Kanfer, J.N., Shapiro, D., (1965). Metabolism of Glucocerebrosides. II. Evidence of an Enzymatic Deficiency in Gaucher's Disease. *Biochem Biophys Res Commun* **18**, 221-225.
- Calvo, D., Dopazo, J., Vega, M.A., (1995). The CD36, CLA-1 (CD36L1), and LIMP2 (CD36L2) gene family: cellular distribution, chromosomal location, and genetic evolution. *Genomics* **25** (1), 100-6.
- Chalovich, E.M., Zhu, J.H., Caltagarone, J., Bowser, R., Chu, C.T., (2006). Functional repression of cAMP response element in 6-hydroxydopamine-treated neuronal cells. *J Biol Chem* **281** (26), 17870-81.
- Charrow, J., Scott, C.R., (2015). Long-term treatment outcomes in Gaucher disease. *Am J Hematol* **90 Suppl 1**, S19-24.
- Chen, A.E., Ginty, D.D., Fan, C.-M., (2005). Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature* **433**, 317-322.
- Crosiers, D., Theuns, J., Cras, P., Van Broeckhoven, C., (2011). Parkinson disease: insights in clinical, genetic and pathological features of monogenic disease subtypes. *J Chem Neuroanat* **42** (2), 131-41.
- Davie, C.A., (2008). A review of Parkinson's disease. *Br Med Bull* **86**, 109-27.
- De Rijk, M.C., Breteler, M.M., Graveland, G.A., Ott, A., Grobbee, D.E., Van Der Meché, F.G., Hofman, A., (1995). Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam Study. *Neurology* **45**, 2143-2146.
- Decressac, M., Mattsson, B., Weikop, P., Lundblad, M., Jakobsson, J., Bjorklund, A., (2013). TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from alpha-synuclein toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** (19), E1817-26.
- Deng, Y., Storrie, B., (1988). Animal cell lysosomes rapidly exchange membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 3860-3864.
- Dermentzaki, G., Dimitriou, E., Xilouri, M., Michelakakis, H., Stefanis, L., (2013). Loss of beta-glucocerebrosidase activity does not affect alpha-synuclein levels or lysosomal function in neuronal cells. *PLoS One* **8** (4), e60674.
- Do, C.B., Tung, J.Y., Dorfman, E., Kiefer, A.K., Drabant, E.M., Francke, U., Mountain, J.L., Goldman, S.M., Tanner, C.M., Langston, J.W., Wojcicki, A., Eriksson, N., (2011). Web-Based Genome-Wide Association Study Identifies Two Novel Loci and a Substantial Genetic Component for Parkinson's Disease. *PLoS Genet* **7** (6), e1002141.
- Dvir, H., Harel, M., Mccarthy, A.A., Toker, L., Silman, I., Futerman, A.H., Sussman, J.L., (2003). X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Rep* **4** (7), 704-9.
- Eskelinen, E.L., Tanaka, Y., Saftig, P., (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* **13**, 137-145.

- Fujita, H., Ezaki, J., Noguchi, Y., Kono, A., Himeno, M., Kato, K., (1991). Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding 85kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **178** (2), 444-52.
- Fukuda, M., (1991). Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem* **266**, 21327-21330.
- Gatt, S., (1966). Enzymic hydrolysis of sphingolipids: Hydrolysis of ceramide glucoside by an enzyme from ox brain. *Biochem J* **101** (3), 687-91.
- Gegg, M.E., Burke, D., Heales, S.J., Cooper, J.M., Hardy, J., Wood, N.W., Schapira, A.H., (2012). Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. *Ann Neurol* **72** (3), 455-63.
- Getty, A., Kovacs, A.D., Lengyel-Nelson, T., Cardillo, A., Hof, C., Chan, C.H., Pearce, D.A., (2013). Osmotic stress changes the expression and subcellular localization of the Batten disease protein CLN3. *PLoS One* **8** (6), e66203.
- Ginns, E.I., Mak, S.K., Ko, N., Karlgren, J., Akbarian, S., Chou, V.P., Guo, Y., Lim, A., Samuelsson, S., Lamarca, M.L., Vazquez-Derose, J., Manning-Bog, A.B., (2014). Neuroinflammation and alpha-synuclein accumulation in response to glucocerebrosidase deficiency are accompanied by synaptic dysfunction. *Mol Genet Metab* **111** (2), 152-62.
- Gonzalez, A., Valeiras, M., Sidransky, E., Tayebi, N., (2014). Lysosomal integral membrane protein-2: a new player in lysosome-related pathology. *Mol Genet Metab* **111** (2), 84-91.
- Grabowski, G.A., Gatt, S., Horowitz, M., (1990). Acid beta-glucosidase: enzymology and molecular biology of Gaucher disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **25** (6), 385-414.
- Grace, M.E., Berg, A., He, G.S., Goldberg, L., Horowitz, M., Grabowski, G.A., (1991). Gaucher disease: heterologous expression of two alleles associated with neuronopathic phenotypes. *Am J Hum Genet* **49** (3), 646-55.
- Grace, M.E., Newman, K.M., Scheinker, V., Berg-Fussman, A., Grabowski, G.A., (1994). Analysis of human acid beta-glucosidase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. *J Biol Chem* **269** (3), 2283-91.
- Granger, B.L., Green, S.A., Gabel, C.A., Howe, C.L., Mellman, I., Helenius, A., (1990). Characterization and cloning of lgp110, a lysosomal membrane glycoprotein from mouse and rat cells. *J Biol Chem* **265**, 12036-12043.
- Gunther, W., Luchow, A., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., Jentsch, T.J., (1998). CIC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (14), 8075-80.
- Helip-Wooley, A., Thoene, J.G., (2004). Sucrose-induced vacuolation results in increased expression of cholesterol biosynthesis and lysosomal genes. *Exp Cell Res* **292**, 89-100.
- Heuser, J.E., Anderson, R.G., (1989). Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* **108** (2), 389-400.
- Hill, E., Van Der Kaay, J., Downes, C.P., Smythe, E., (2001). The role of dynamin and its binding partners in coated pit invagination and scission. *J Cell Biol* **152** (2), 309-23.
- Isaac, E.L., Karageorgos, L.E., Brooks, D.A., Hopwood, J.J., Meikle, P.J., (2000). Regulation of the lysosome-associated membrane protein in a sucrose model of lysosomal storage. *Exp Cell Res* **254** (2), 204-9.
- Jankovic, J., (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **79** (4), 368-76.

- Karageorgos, L.E., Isaac, E.L., Brooks, D.A., Ravenscroft, E.M., Davey, R., Hopwood, J.J., Meikle, P.J., (1997). Lysosomal Biogenesis in Lysosomal Storage Disorders. *Exp Cell Res* **234**, 85-97.
- Kato, T., Okada, S., Ohshima, T., Inui, K., Yutaka, T., Yabuuchi, H., (1982). Normalization of Intracellular Lysosomal Hydrolases in I-cell Disease Fibroblasts with Sucrose Loading. *The Journal of Biological Chemistry* **257**, 7814-7819.
- Khan, A.H., Lin, A., Smith, D.J., (2012). Discovery and characterization of human exonic transcriptional regulatory elements. *PLoS One* **7** (9), e46098.
- Koonin, E.V., Galperin, M.Y., (2003). Sequence - Evolution - Function, *Kulwer Academic, Boston*.
- Kornfeld, S., (1986). Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *J Clin Invest* **77** (1), 1-6.
- Laurent-Matha, V., Derocq, D., Prebois, C., Katunuma, N., Liudet-Coopman, E., (2006). Processing of human cathepsin D is independent of its catalytic function and auto-activation: involvement of cathepsins L and B. *J Biochem* **139** (3), 363-71.
- Liou, B., Haffey, W.D., Greis, K.D., Grabowski, G.A., (2014). The LIMP-2/SCARB2 binding motif on acid beta-glucosidase: basic and applied implications for Gaucher disease and associated neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* **289** (43), 30063-74.
- Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C., Kirchhausen, T., (2006). Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* **10** (6), 839-50.
- Manning-Bog, A.B., Schule, B., Langston, J.W., (2009). Alpha-synuclein-glucocerebrosidase interactions in pharmacological Gaucher models: a biological link between Gaucher disease and parkinsonism. *Neurotoxicology* **30** (6), 1127-32.
- Marsh, M., Schmid, S., Kern, H., Harms, E., Male, P., Mellman, I., Helenius, A., (1987). Rapid analytical and preparative isolation of functional endosomes by free flow electrophoresis. *J Cell Biol* **104** (4), 875-86.
- Mayr, B., Montminy, M., (2001). Transcriptional Regulation by the Phosphorylation-Dependent Factor CREB. *Molecular Cell Biology* **2**, 599-609.
- Mazzulli, J.R., Xu, Y.H., Sun, Y., Knight, A.L., Mclean, P.J., Caldwell, G.A., Sidransky, E., Grabowski, G.A., Krainc, D., (2011). Gaucher disease glucocerebrosidase and alpha-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell* **146** (1), 37-52.
- McGlinchey, R.P., Lee, J.C., (2015). Cysteine cathepsins are essential in lysosomal degradation of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112** (30), 9322-7.
- Michelakakis, H., Xiomerisiou, G., Dardiotis, E., Bozi, M., Vassilatis, D., Kountra, P.M., Patramani, G., Moraitou, M., Papadimitriou, D., Stamboulis, E., Stefanis, L., Zintzaras, E., Hadjigeorgiou, G.M., (2012). Evidence of an association between the scavenger receptor class B member 2 gene and Parkinson's disease. *Mov Disord* **27** (3), 400-5.
- Montgomery, R.R., Webster, P., Mellman, I., (1991). Accumulation of indigestible substances reduces fusion competence of macrophage lysosomes. *J Immunol* **147**, 3087-3095.
- Moro, E., Lang, A.E., (2006). Criteria for deep-brain stimulation in Parkinson's disease: review and analysis. *Expert Rev Neurother* **6** (11), 1695-705.
- Neculai, D., Schwake, M., Ravichandran, M., Zunke, F., Collins, R.F., Peters, J., Neculai, M., Plumb, J., Loppnau, P., Pizarro, J.C., Seitova, A., Trimble, W.S., Saftig, P., Grinstein, S., Dhe-Paganon, S., (2013). Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36. *Nature* **504** (7478), 172-6.

- Neudorfer, O., Giladi, N., Elstein, D., Abrahamov, A., Turezkite, T., Aghai, E., Reches, A., Bembi, B., Zimran, A., (1996). Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. *QJM* **89** (9), 691-4.
- Novikoff, A.B., Beaufay, H., De Duve, C., (1956). Electron microscopy of lysosomeric fractions from rat liver. *J Biophys Biochem Cytol* **2** (4 Suppl), 179-84.
- Ogata, S., Fukuda, M., (1994). Lysosomal Targeting of LIMP-2 Membrane Glycoprotein Requires a Novel Leu-Ile Motif at a Particular Position in Its Cytoplasmic Tail. *Journal of Biological Chemistry* **269** (7), 5210-5217.
- Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., Di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., Ballabio, A., (2011). Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum Mol Genet* **20** (19), 3852-66.
- Parkinson, J., 1817. An Essay on the Shaking Palsy London.
- Pentchev, P.G., Brady, R.O., Hibbert, S.R., Gal, A.E., Shapiro, D., (1973). Isolation and characterization of glucocerebrosidase from human placental tissue. *J Biol Chem* **248** (15), 5256-61.
- Petersen, N.H., Olsen, O.D., Groth-Pedersen, L., Ellegaard, A.M., Bilgin, M., Redmer, S., Ostenfeld, M.S., Ulanet, D., Dovmark, T.H., Lonborg, A., Vindelov, S.D., Hanahan, D., Arenz, C., Ejsing, C.S., Kirkegaard, T., Rohde, M., Nylandsted, J., Jaattela, M., (2013). Transformation-associated changes in sphingolipid metabolism sensitize cells to lysosomal cell death induced by inhibitors of acid sphingomyelinase. *Cancer Cell* **24** (3), 379-93.
- Quinn, P.J., (2014). Sphingolipid symmetry governs membrane lipid raft structure. *Biochim Biophys Acta* **1838** (7), 1922-30.
- Reczek, D., Schwake, M., Schroder, J., Hughes, H., Blanz, J., Jin, X., Brondyk, W., Van Patten, S., Edmunds, T., Saftig, P., (2007). LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell* **131** (4), 770-83.
- Riccio, A., Ahn, S., Davenport, C.M., Blendy, J.A., Ginty, D.D., (1999). Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* **286** (5448), 2358-61.
- Riethoven, J.J., (2010). Regulatory regions in DNA: promoters, enhancers, silencers, and insulators. *Methods Mol Biol* **674**, 33-42.
- Roczniak-Ferguson, A., Petit, C.S., Froehlich, F., Qian, S., Ky, J., Angarola, B., Walther, T.C., Ferguson, S.M., (2012). The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Sci Signal* **5** (228), ra42.
- Rosenberg, A., Chargaff, E., (1958). A reinvestigation of the cerebroside deposited in Gaucher's disease. *J Biol Chem* **233** (6), 1323-6.
- Rothaug, M., 2013. Characterisation of the Lysosomal Integral Membrane Protein Type 2 (LIMP-2) in Murine Brain. Dissertation. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Rothaug, M., Zunke, F., Mazzulli, J.R., Schweizer, M., Altmepfen, H., Lullmann-Rauch, R., Kallemeijn, W.W., Gaspar, P., Aerts, J.M., Glatzel, M., Saftig, P., Krainc, D., Schwake, M., Blanz, J., (2014). LIMP-2 expression is critical for beta-glucocerebrosidase activity and alpha-synuclein clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111** (43), 15573-15578.
- Saftig, P., Klumperman, J., (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10** (9), 623-35.
- Saftig, P., Sandhoff, K., (2013). Cancer: Killing from the inside. *Nature* **502** (7471), 312-3.
- Saftig, P., Schröder, B., Blanz, J., (2010). Lysosomal membrane proteins: life between acid and neutral conditions. *Biochemical Society Transactions* **38**, 1420-1423.

- Sainsbury, S., Bernecky, C., Cramer, P., (2015). Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16** (3), 129-43.
- Sardi, S.P., Clarke, J., Kinnecom, C., Tamsett, T.J., Li, L., Stanek, L.M., Passini, M.A., Grabowski, G.A., Schlossmacher, M.G., Sidman, R.L., Cheng, S.H., Shihabuddin, L.S., (2011). CNS expression of glucocerebrosidase corrects alpha-synuclein pathology and memory in a mouse model of Gaucher-related synucleinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108** (29), 12101-6.
- Sardi, S.P., Clarke, J., Viel, C., Chan, M., Tamsett, T.J., Treleaven, C.M., Bu, J., Sweet, L., Passini, M.A., Dodge, J.C., Yu, W.H., Sidman, R.L., Cheng, S.H., Shihabuddin, L.S., (2013). Augmenting CNS glucocerebrosidase activity as a therapeutic strategy for parkinsonism and other Gaucher-related synucleinopathies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** (9), 3537-42.
- Schapira, A.H., (2015). Glucocerebrosidase and Parkinson disease: Recent advances. *Mol Cell Neurosci* **66** (Pt A), 37-42.
- Schroen, B., Leenders, J.J., Van Erk, A., Bertrand, A.T., Van Loon, M., Van Leeuwen, R.E., Kubben, N., Duisters, R.F., Schellings, M.W., Janssen, B.J., Debets, J.J., Schwake, M., Hoydal, M.A., Heymans, S., Saftig, P., Pinto, Y.M., (2007). Lysosomal integral membrane protein 2 is a novel component of the cardiac intercalated disc and vital for load-induced cardiac myocyte hypertrophy. *Journal of Experimental Medicine* **204** (5), 1227-1235.
- Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D.L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M.C., Facchinetti, V., Sabatini, D.M., Ballabio, A., (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J* **31** (5), 1095-108.
- Sevlever, D., Jiang, P., Yen, S.H., (2008). Cathepsin D is the main lysosomal enzyme involved in the degradation of alpha-synuclein and generation of its carboxy-terminally truncated species. *Biochemistry* **47** (36), 9678-87.
- Sidransky, E., Nalls, M.A., Aasly, J.O., Aharon-Peretz, J., Annesi, G., Barbosa, E.R., Bar-Shira, A., Berg, D., Bras, J., Brice, A., Chen, C.M., Clark, L.N., Condroyer, C., De Marco, E.V., Durr, A., Eblan, M.J., Fahn, S., Farrer, M.J., Fung, H.C., Gan-Or, Z., Gasser, T., Gershoni-Baruch, R., Giladi, N., Griffith, A., Gurevich, T., Januario, C., Kropp, P., Lang, A.E., Lee-Chen, G.J., Lesage, S., Marder, K., Mata, I.F., Mirelman, A., Mitsui, J., Mizuta, I., Nicoletti, G., Oliveira, C., Ottman, R., Orr-Urtreger, A., Pereira, L.V., Quattrone, A., Rogava, E., Rolfs, A., Rosenbaum, H., Rozenberg, R., Samii, A., Samaddar, T., Schulte, C., Sharma, M., Singleton, A., Spitz, M., Tan, E.K., Tayebi, N., Toda, T., Troiano, A.R., Tsuji, S., Wittstock, M., Wolfsberg, T.G., Wu, Y.R., Zabetian, C.P., Zhao, Y., Ziegler, S.G., (2009). Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* **361** (17), 1651-61.
- Song, W., Wang, F., Lotfi, P., Sardiello, M., Segatori, L., (2014). 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin promotes transcription factor EB-mediated activation of autophagy: implications for therapy. *J Biol Chem* **289** (14), 10211-22.
- Song, W., Wang, F., Savini, M., Ake, A., Di Ronza, A., Sardiello, M., Segatori, L., (2013). TFEB regulates lysosomal proteostasis. *Hum Mol Genet* **22** (10), 1994-2009.
- Spatola, M., Wider, C., (2014). Genetics of Parkinson's disease: the yield. *Parkinsonism & Related Disorders* **20**, S35-S38.
- Stirnemann, J., Vigan, M., Hamroun, D., Heraoui, D., Rossi-Semerano, L., Berger, M.G., Rose, C., Camou, F., De Roux-Serratrice, C., Grosbois, B., Kaminsky, P., Robert, A., Caillaud,

- C., Froissart, R., Levade, T., Masseau, A., Mignot, C., Sedel, F., Dobbelaere, D., Vanier, M.T., Valayanopoulos, V., Fain, O., Fantin, B., De Villemeur, T.B., Mentré, F., Belmatoug, N., (2012). The French Gaucher's disease registry: clinical characteristics, complications and treatment of 562 patients. *Orphanet J Rare Dis* **7**, 77.
- Vega, M.A., Rodriguez, F., Segui, B., Cales, C., Alcalde, J., Sandoval, I.V., (1991). Targeting of Lysosomal Integral Membrane-Protein Limp-li - the Tyrosine-Lacking Carboxyl Cytoplasmic Tail of Limp-li Is Sufficient for Direct Targeting to Lysosomes. *Journal of Biological Chemistry* **266** (25), 16269-16272.
- Velayati, A., Depaolo, J., Gupta, N., Choi, J.H., Moaven, N., Westbroek, W., Goker-Alpan, O., Goldin, E., Stubblefield, B.K., Kolodny, E., Tayebi, N., Sidransky, E., (2011). A mutation in SCARB2 is a modifier in Gaucher disease. *Hum Mutat* **32** (11), 1232-8.
- Wagner, R., Rosenberg, M., Estensen, R., (1971). Endocytosis in chang liver cells. *J. Cell Biol.* **50**, 804-817.
- Warburton, M.J., Wynn, C.H., (1976). The Hyperactivity of Hamster Fibroblast Lysosomal Enzymes after Endocytosis of Sucrose. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **70**, 94-100.
- Witte, M.D., Kallemeijn, W.W., Aten, J., Li, K.Y., Strijland, A., Donker-Koopman, W.E., Van Den Nieuwendijk, A.M., Bleijlevens, B., Kramer, G., Florea, B.I., Hooibrink, B., Hollak, C.E., Ottenhoff, R., Boot, R.G., Van Der Marel, G.A., Overkleeft, H.S., Aerts, J.M., (2010). Ultrasensitive in situ visualization of active glucocerebrosidase molecules. *Nat Chem Biol* **6** (12), 907-13.
- Wong, Y.C., Krainc, D., (2016). Lysosomal trafficking defects link Parkinson's disease with Gaucher's disease. *Mov Disord.*
- Xu, Y.H., Sun, Y., Ran, H., Quinn, B., Witte, D., Grabowski, G.A., (2011). Accumulation and distribution of alpha-synuclein and ubiquitin in the CNS of Gaucher disease mouse models. *Mol Genet Metab* **102** (4), 436-47.
- Yamayoshi, S., Yamashita, Y., Li, J.F., Hanagata, N., Minowa, T., Takemura, T., Koike, S., (2009). Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nature Medicine* **15** (7), 798-U15.
- Zaccai, J., Mccracken, C., Brayne, C., (2005). A systematic review of prevalence and incidence studies of dementia with Lewy bodies. *Age Ageing* **34** (6), 561-6.
- Zachos, C., 2012. Untersuchungen zur pH-Wert-Abhängigkeit des lysosomalen integralen Membranproteins Typ 2 als Transportrezeptor. Dissertation. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Zachos, C., Blanz, J., Saftig, P., Schwake, M., (2012). A critical histidine residue within LIMP-2 mediates pH sensitive binding to its ligand beta-glucocerebrosidase. *Traffic* **13** (8), 1113-23.
- Zoncu, R., Efeyan, A., Sabatini, D.M., (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12** (1), 21-35.
- Zunke, F., Andresen, L., Wessler, S., Groth, J., Arnold, P., Rothaug, M., Mazzulli, J.R., Krainc, D., Blanz, J., Saftig, P., Schwake, M., (2016). Characterization of the complex formed by beta-glucocerebrosidase and the lysosomal integral membrane protein type-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113** (14), 3791-3796.

## 8 Anhang

### 8.1 Anhang zu den Ergebnissen

#### 8.1.1 *In silico* Analyse des *SCARB2*-Promotors

Transkriptionsfaktor- bindungsstelle	Position	Sequenz
BRAC	-1351 bis -1329	CAAGGATCACACCTGCATCCCAG
ZF05	-1340 bis -1326	CCTGCATCCCAGGTC
CHRF	-1011 bis -999	GCCCTTCAAAGTC
C/EBP	-893 bis -889	CCAAT
ZF07	-857 bis -843	TGCCTCCTCCTCCCT
AP1R	-730 bis -710	GCATGATCTCAGCAGGCACCT
HAND	-728 bis -708	ATGATCTCAGCAGGCACCTGG;
	-397 bis -377	CCGCAGGGCACATGACTGCGG
DMRT	-703 bis -683	AGCACTTGCTACATTGTGTTG
MITF	-393 bis -379	AGGGCACATGACTGC
SP1F	-379 bis -357	CGGCCTCCGCCCCCGCCCGCTC
ZF02	-375 bis -353	CTCCGCCCCCGCCCGCTCCCCG
E2FF	-371 bis -355	GCCCCGCCCCGCTCCC;
	-295 bis -279	GTCCCTGCGCGCTCCCT;
	-109 bis -93	TGGGCGTGGCGCCGAAG
NRF1	-357 bis -341	CCCCGCGCAGTCGCCGG
CDEF	-335 bis -323	GCCTCGCGGGTT
CREB	-311 bis -286	GGCCCGCGAACGTACGTCCCTGCGC
ZF5F	-296 bis -278	CGTCCCTGCGCGCTCCCTG
MYBL	-54 bis -40	TCCTTGACAGTTGGAT

Die Positionsangaben beziehen sich auf das Adenosin im Startcodon des humanen LIMP-2-Gens. Die Angaben sind jeweils einschließlich des erst- und letztgenannten Basenpaars.



## 8.1.2 Detektion der Promotor-Aktivität von Deletionskonstrukten des *SCARB2*-Promotors

### 8.1.2.1 Gaussia-Luziferase-Assay

#### Versuchsreihe 1

	Promotor 1350	Promotor 1000	Promotor 500
Messung 1	1,223588	1,401022	3,398013
Messung 2	0,7438895	1,580957	1,83537
Messung 3	1,032523	1,007052	1,362302
<b>Mittelwert</b>	<b>1,00000017</b>	<b>1,329677</b>	<b>2,19856167</b>

Je Messung wurden die Werte als technische Doppelwerte ermittelt und wurden auf die Lumineszenz des jeweils mitgemessenen Negativvektor und Promotor 1350 normiert. Anschließend wurde aus diesen normierten technischen Doppelwerten der Mittelwert errechnet, welcher hier je Messung angegeben ist.

#### Versuchsreihe 2

	Promotor 1350	Promotor 250	Promotor TFBS
Messung 1	0,8787245	0,2161147	0,6494095
Messung 2	1,076125	0,3129901	0,4407248
Messung 3	1,045151	0,2044843	0,7099294
<b>Mittelwert</b>	<b>1,00000017</b>	<b>0,2445297</b>	<b>0,60002123</b>

s.o.

### 8.1.2.2 Deletionskonstrukte

Deletionskonstrukt	Beschreibung der Sequenz
Promotor 1350	Beginnend an Basenpaar -1397 (GCTTCCTTCC...)
Promotor 1000	Beginnend an Basenpaar -977 (CCTCCGACTC...)
Promotor 500	Beginnend an Basenpaar -557 (ATGAGTGTGT...)
Promotor 250	Beginnend an Basenpaar -277 (CACTCTCCCG...)
Promotor TFBS	Deletion der Basenpaare -311 bis -278 (GCCCCGGAACGTACGTCCCTGCGCGCTCCCTG)

Die Positionsangaben beziehen sich auf das Adenosin im Startcodon des humanen LIMP-2-Gens.

### 8.1.3 Bestimmung des Aktivierungspotenzials für den humanen *SCARB2*-Promotor der ausgewählten Substanzen mittels Luziferase-Assay

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Mittelwert
<b>unbehandelt</b>	1	1	1	1	<b>1</b>
<b>Saccharose</b>	1,413119	2,345601	2,807835	1,779893	<b>2,086612</b>
<b>Saccharose + TFEB</b>	2,360672	1,358159	2,312355	-	<b>2,01039533</b>
<b>TFEB 24 h</b>	0,9462613	0,9767166	1,052156	-	<b>0,9917113</b>
<b>TFEB 72 h</b>	1,066765	1,320623	1,15818	-	<b>1,181856</b>
<b>TFEB S211A</b>	0,9716235	1,204083	1,406372	-	<b>1,19402617</b>
<b>Cyclodextrin</b>	0,7876413	1,322093	1,129404	-	<b>1,07971277</b>
<b>CREB-1</b>	1,047395	1,273454	1,326061	-	<b>1,21563667</b>
<b>IBMX</b>	1,010808	0,79131101	-	-	<b>0,9010595</b>
<b>Forskolin</b>	1,1168	0,622677	-	-	<b>0,8697385</b>
<b>wnt-Medium</b>	0,8545815	1,000135	0,786493	-	<b>0,88040317</b>
<b>L-Medium</b>	0,8638941	0,6458942	0,987278	-	<b>0,83235543</b>
<b>Chloroquin</b>	0,3956197	1,176477	0,7295846	-	<b>0,7672271</b>
<b>Desipramin</b>	0,5605271	0,7488446	1,001836	-	<b>0,77040257</b>

Je Messung wurden die Werte als technische Doppelwerte ermittelt und wurden auf die Lumineszenz des jeweils mitgemessenen Negativvektor und der unbehandelten Probe normiert. Anschließend wurde aus diesen normierten technischen Doppelwerten der Mittelwert errechnet, welcher hier je Messung angegeben ist.

### 8.1.4 Saccharose-induzierte LIMP-2-Expression

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Mittelwert
<b>HEK unbehandelt</b>	1,207586	2,408600	2,117613	<b>1,91126633</b>
<b>HEK Saccharose</b>	3,751788	3,373217	3,347906	<b>3,49097033</b>

Die Werte wurden mit Image-J ermittelt und sind auf Aktin normiert.

### 8.1.5 Screening von 20 Substanzen einer *compound library* auf ihr Aktivierungspotenzial für den humanen *SCARB2*-Promotor

Probe	Messung	Probe	Messung
1	1	12	0,45212226
2	1,23878854	13	2,18285976
3	1,54769433	14	1,29424113
4	1,11767536	15	1,79808218
5	1,80966119	16	1,27284344
6	1,70930484	17	0,54950698
7	0,47134212	18	0,50102334
8	0,60326424	19	0,60186843
9	0,42847117	20	0,42606373
10	0,47726657	21	0,16725005
11	0,3915277	22	0,42610431

Die Werte wurden auf die Lumineszenz des jeweils mitgemessenen Negativvektors und der unbehandelten Probe normiert.

### 8.1.6 Maximaler Saccharose-Einfluss auf die Zelle

#### 8.1.6.1 Saccharose-Einfluss in Abhängigkeit von der Zeit (A)

	0 h	1 h	5 h	1 d	2 d	3 d
WT 1	1,823	1,355	1,664	0,788	1,632	0,143
WT 2	1,271	1,733	1,368	2,098	2,050	2,182
WT + Saccharose 1	2,135	2,163	1,368	1,059	3,894	5,886
WT + Saccharose 2	1,613	1,542	1,858	0,832	2,518	3,456
LIMP-2 KO 1	0,396	0,206	0,215	0,122	0,172	0,478
LIMP-2 KO 2	0,347	0,200	0,209	0,175	0,230	0,421
LIMP-2 KO + Saccharose 1	0,223	0,137	0,101	0,113	0,595	1,173
LIMP-2 KO + Saccharose 2	0,238	0,210	0,139	0,283	0,559	0,807

Enzymaktivität in mU/mg

### 8.1.6.2 Saccharose-Einfluss in Abhängigkeit von der Konzentration (B)

	0 mM	37,5 mM	75 mM	150 mM
<b>WT 1</b>	0,433	1,536	2,451	3,333
<b>WT 2</b>	0,376	1,400	1,749	2,396
<b>LIMP-2 KO 1</b>	0,163	0,448	0,854	1,040
<b>LIMP-2 KO 2</b>	0,147	0,405	0,818	1,102

Enzymaktivität in mU/mg

### 8.1.7 Saccharose-induzierte Expression von LIMP-2 und $\beta$ -GC

#### 8.1.7.1 Saccharose-induzierte Expression von LIMP-2 (B)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Mittelwert
<b>WT</b>	1,937105	1,177934	1,813819	6,586103	<b>2,8787403</b>
<b>WT + Saccharose</b>	7,790187	2,792822	2,331289	4,148002	<b>4,265575</b>

Die Werte wurden mit Image-J ermittelt und sind auf Aktin normiert.

#### 8.1.7.2 Saccharose-induzierte Expression von $\beta$ -GC (C)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	Mittelwert
<b>WT</b>	4,683284	1,626841	5,676023	1,645174	1,880375	<b>3,1023394</b>
<b>WT + Saccharose</b>	6,463555	2,945734	3,464158	3,655065	6,687152	<b>4,6431328</b>
<b>LIMP-2 KO</b>	0,2035648	0,9305755	0,4525332	0,8474656	0,4221602	<b>0,5712599</b>
<b>LIMP-2 KO + Saccharose</b>	1,781106	2,543957	1,850524	0,8732725	1,608749	<b>1,7315217</b>

Die Werte wurden mit Image-J ermittelt und sind auf Aktin normiert.

## 8.1.8 Saccharose-Einfluss auf die Enzymaktivität

### 8.1.8.1 Saccharose-Einfluss auf die $\beta$ -GC-Aktivität (A)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Mittelwert
<b>WT</b>	0,682	1,108	1,066	0,565	<b>0,85525</b>
<b>WT + Saccharose</b>	2,649	0,795	1,811	1,519	<b>1,6935</b>
<b>LIMP-2 KO</b>	0,098	0,160	0,231	0,058	<b>0,13675</b>
<b>LIMP-2 KO + Saccharose</b>	1,212	0,622	0,379	0,365	<b>0,6445</b>
<b>GBA-1 KO</b>	0,039	0,025	0,027	-	<b>0,0303</b>
<b>GBA-1 KO + Saccharose</b>	0,015	0,016	0,014	-	<b>0,015</b>

Enzymaktivität in mU/mg

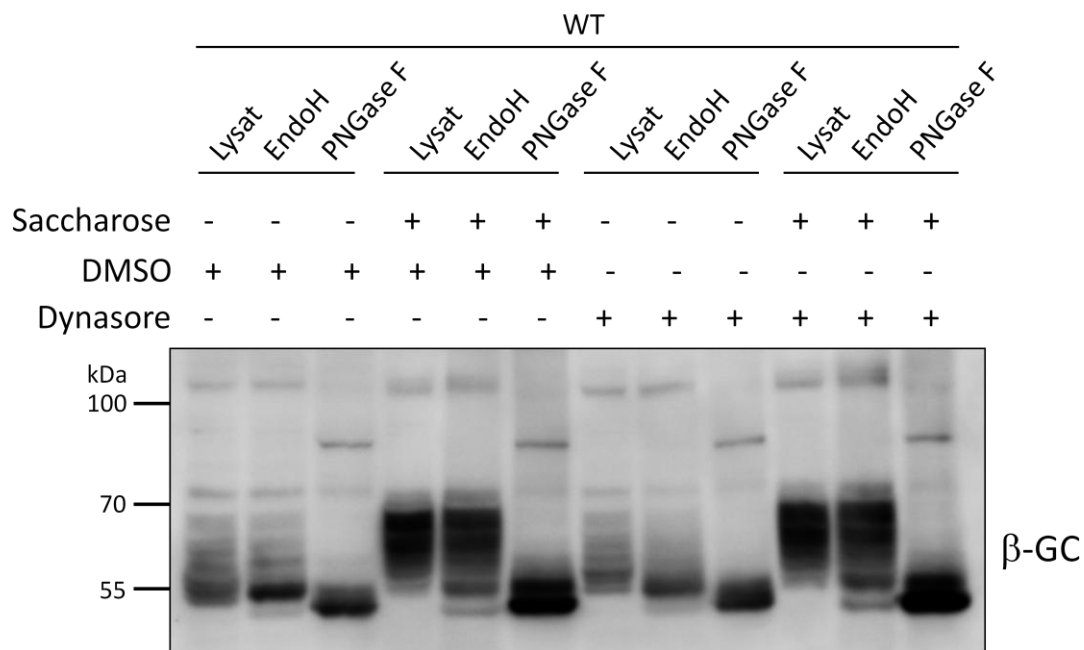
### 8.1.8.2 Saccharose-Einfluss auf die $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität (B)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Mittelwert
<b>WT</b>	21,222	30,230	23,938	<b>25,13</b>
<b>WT + Saccharose</b>	8,133	41,708	32,845	<b>27,562</b>
<b>LIMP-2 KO</b>	10,908	26,935	13,554	<b>17,1323333</b>
<b>LIMP-2 KO + Saccharose</b>	20,152	51,624	28,775	<b>33,517</b>
<b>GBA-1 KO</b>	34,084	24,364	35,916	<b>31,4547</b>
<b>GBA-1 KO + Saccharose</b>	29,465	53,169	40,267	<b>40,967</b>

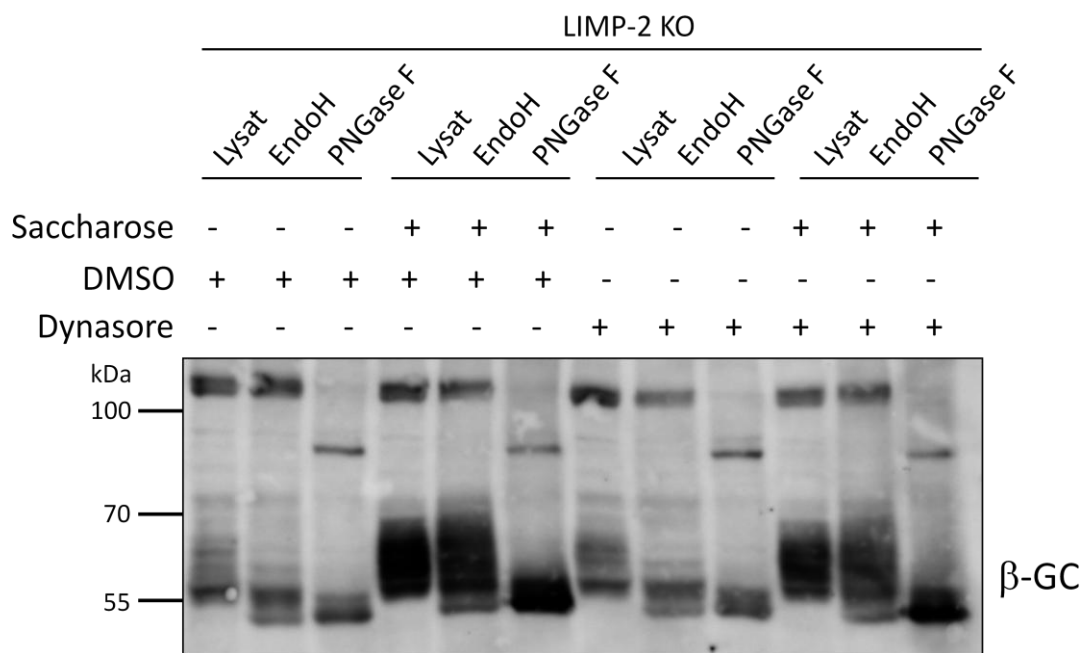
Enzymaktivität in mU/mg

## 8.1.9 Erste Untersuchungen des LIMP-2-unabhängigen Transportmechanismus für $\beta$ -GC

### 8.1.9.1 Verdau der mit Dynasore behandelten MEF-Zellen

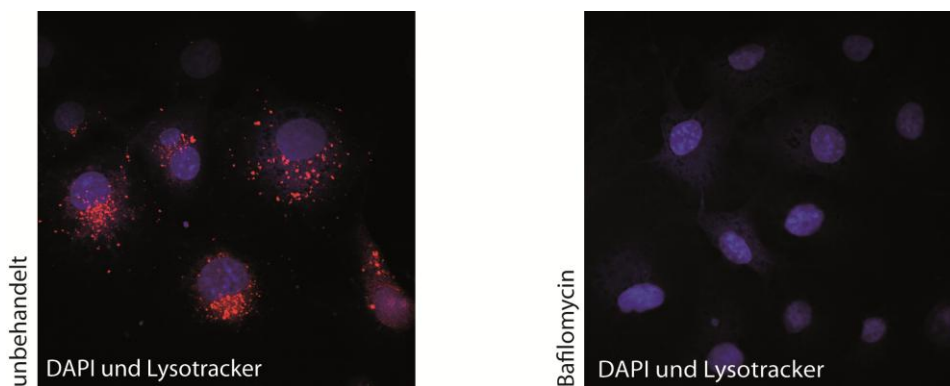


**Abbildung 8.1.9.1.1: Einfluss von Dynasore auf die Lokalisation von  $\beta$ -GC in MEF-WT-Zellen.** Verdau der Proben aus Abb. 4.4.8. Der Endozytose-Inhibitor Dynasore führt zu keiner wesentlichen Veränderung des Laufverhaltens von  $\beta$ -GC im *Western blot*. Nach Saccharose-Einwirkung ist das Enzym weiterhin vermehrt in post-ER-Kompartimenten zu detektieren. AK: G4171 ( $\beta$ -GC).



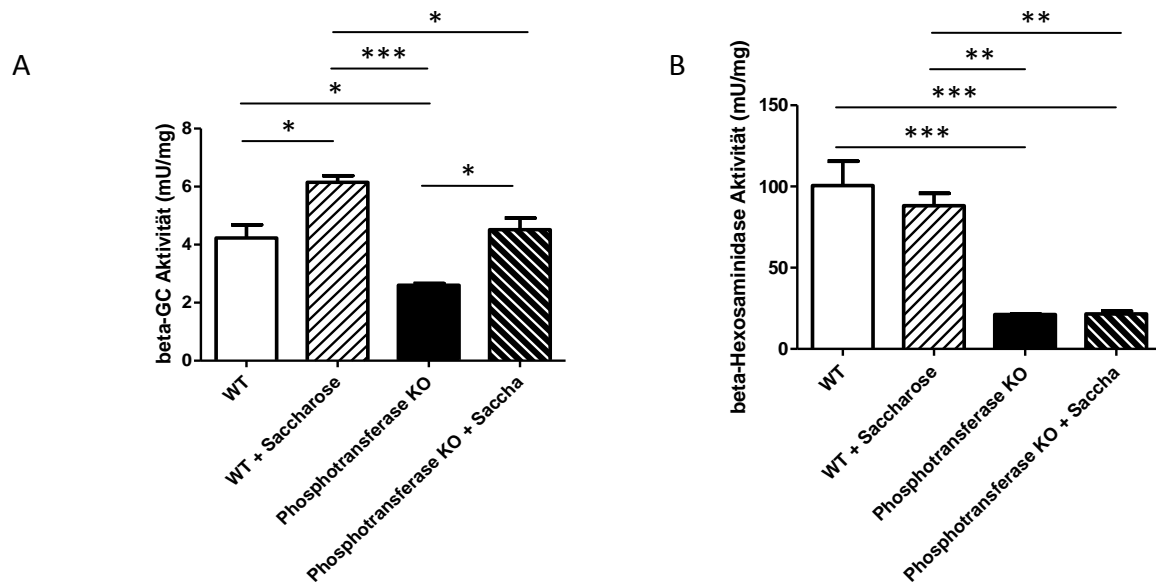
**Abbildung 8.1.9.1.2: Einfluss von Dynasore auf die Lokalisation von  $\beta$ -GC in MEF-LIMP-2-KO-Zellen.** Verdau der Proben aus Abb. 4.4.8. Der Endozytose-Inhibitor Dynasore führt zu keiner wesentlichen Veränderung des Laufverhaltens von  $\beta$ -GC im *Western blot*. Nach Saccharose-Einwirkung ist das Enzym auch in den MEF-LIMP-2-KO-Zellen in post-ER-Kompartimenten zu detektieren. AK: G4171 ( $\beta$ -GC).

### 8.1.9.2 Wirkungsnachweis von Bafilomycin



**Abbildung 8.1.9.2: Einfluss von Bafilomycin auf die Azidifizierung der Lysosomen.** COS7-Zellen wurden wie in Abschnitt 3.11.3 beschrieben ohne bzw. mit 100 nM Bafilomycin-A1 inkubiert. Im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen zeigt sich in den Zellen mit Bafilomycin kaum noch ein LysoTracker-Signal. Dies bedeutet, dass in diesen Zellen keine Ansäuerung der Lysosomen mehr stattfindet und so der Farbstoff nicht mehr umgesetzt werden kann. Bafilomycin verhindert also die Azidifizierung dieser Kompartimente.

### 8.1.9.3 Vorläuferversuch in Phosphotransferase-defizienten MEF-Zellen

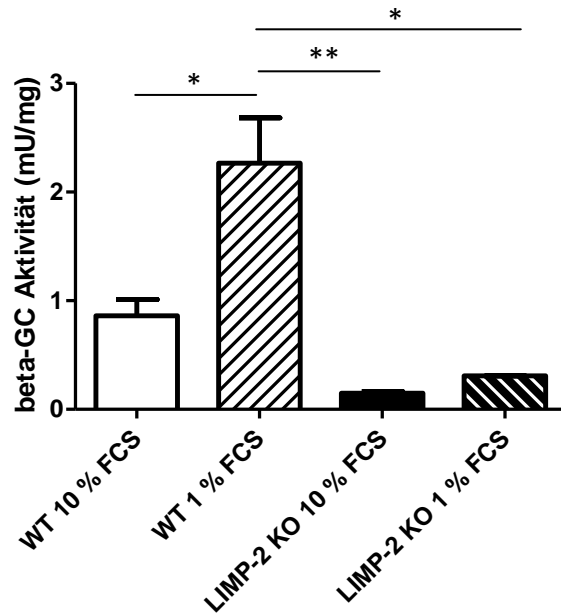


**Abbildung 8.1.9.3: Saccharose-Einfluss auf Phosphotransferase- oder  $\beta$ -GC-defiziente Zellen. (A)**  $\beta$ -GC-Aktivitäts-Assay in MEF-WT- und MEF-Phosphotransferase-KO-Zellen bei einer Saccharose-Konzentration von 0 oder 75 mM über 72 h, n=3. Saccharose führt zu einer gesteigerten  $\beta$ -GC-Aktivität in den Wildtyp und Phosphotransferase-defizienten Zellen. **(B)**  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivitäts-Assay in MEF-WT- und MEF-Phosphotransferase-KO-Zellen bei einer Saccharose-Konzentration von 0 oder 75 mM über 72 h, n=3. Saccharose führt zu keinem signifikanten Effekt auf die  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität. Die Daten der Diagramme wurden mit dem ANOVA und *post hoc* Test Tukey ausgewertet, \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ; Fehlerbalken zeigen SEM an.



## 8.2 Anhang zur Diskussion

### 8.2.1 $\beta$ -GC-Aktivität unter Hungerbedingungen



**Abbildung 8.2.1:  $\beta$ -GC Aktivität unter Hungerbedingungen.**  $\beta$ -GC-Aktivitäts-Assay in MEF-WT- und MEF-LIMP-2-KO-Zellen bei normaler (10 % FCS) und reduzierter (1 % FCS) Nährstofflage über 72 h, n=2. Hungerbedingungen führen zu einer gesteigerten  $\beta$ -GC-Aktivität in beiden Zellreihen. Die Daten der Diagramme wurden mit dem ANOVA und *post hoc* Test Tukey ausgewertet, \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; Fehlerbalken zeigen SEM an.

## Lebenslauf

Name **Sophia Charlotte Wesseler**  
Geburtsdatum 23. April 1991  
Geburtsort Kiel  
Staatsangehörigkeit Deutsch

### Promotion

2013 – 2014 **Biochemisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (CAU), Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Paul Saftig**  
Förderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs 1459

### Studium

2010 – 2017 **Studium der Humanmedizin an der CAU Kiel**  
2011 – 2012: Förderung durch das Deutschlandstipendium an der CAU  
2012: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,5)  
2016: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2)  
2017: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1)

### Schulausbildung

1997 – 2010 **Abitur** (Note 1,2)  
1997 – 2001: Freie Waldorfschule Kiel  
2001 – 2010: Käthe Kollwitz Schule Kiel

## Publikationen

### Wissenschaftlicher Artikel

April 2016                      Zunke, F., Andresen, L., **Wessler, S.**, Groth, J., Arnold, P., Rothaug, M., Mazzulli, J.R., Krainc, D., Blanz, J., Saftig, P., Schwake, M., (2016). *Characterization of the complex formed by beta-glucocerebrosidase and the lysosomal integral membrane protein type-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*** 113 (14), 3791-3796.

### Kongresse / Meetings

Oktober 2013                **Retreat des Graduiertenkollegs 1459** in Wismar, „*Characterization of the LIMP-2/SCARB2 Promotor*“ (Vortrag)

März 2014                    **International Meeting of the German Society for Cell Biology** in Regensburg, „*Modulating the expression of the glucocerebrosidase receptor LIMP-2/SCARB2*“ (Poster und Abstract)

September 2014            **3rd International Symposium for PhD Students on Protein Trafficking in Health and Disease** in Hamburg, „*Modulating the expression of the glucocerebrosidase receptor LIMP-2/SCARB2*“ (Poster und Abstract)

## Danksagung

Danken möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Paul Saftig, der mich herzlich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen, mich gefordert und beraten hat. Desweiteren danke ich PD Dr. Michael Schwake, der mein Projekt mit vielen Ideen vorangetrieben und mich auch aus der Ferne gut betreut hat. Ein besonderer Dank gilt Dr. Judith Peters, die mir mit Rat und Tat zur Seite stand und mich in die Kunst der Laborarbeit eingeführt hat. Auch möchte ich mich bei der ganzen AG Saftig für die Unterstützung und die schöne Zeit bedanken. Insbesondere danke ich Dr. Friederike Zunke und Dr. Michelle Rothaug für ihre Anregungen und die Bereitstellung von Plasmiden.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Markus Glatzel vom Universitätsklinikum Eppendorf für die Möglichkeit, die *Compound Library DIVERSet*<sup>TM</sup> (Chembridge, San Diego, USA) nutzen zu dürfen. Dem Graduiertenkolleg 1459 und der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchte ich für die interessanten Seminare und für die finanzielle Unterstützung danken.

Bei meinen Freunden und meiner Familie bedanke ich mich für die offenen Ohren, das Interesse an meiner Arbeit und die Ermutigungen beim Schreiben. Für das Korrekturlesen, das Zuhören und Miterleben meiner Zeit im Labor danke ich Jona Röseler, der mir immer wieder die Sicht von außen auf mein Projekt ermöglichte und der sich in die Thematik einarbeitete wie kein anderer. Unendlich dankbar bin ich meinen Eltern, die mir bei jedem Vorhaben ihre Unterstützung geben und mich mit einer Freude begleiten, die mich tief berührt und stärkt. Auch sie haben mir mit Korrekturvorschlägen sehr geholfen und mir ermöglicht, ohne zeitlichen oder finanziellen Druck diese Arbeit anzufertigen.