

**Wechselwirkungen von Proteinen mit der cytoplasmatischen
Domäne des 46 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptors
bei *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1796)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium

vorgelegt von
Karin Fritsch
aus Hermannstadt, Rumänien

beim Fachbereich Biologie
der
Universität Hamburg

Hamburg 2002

Für meine Eltern
Für Ute, Elke und Roger

Gutachter: Prof. Dr. T. Braulke
Prof. Dr. E. Pratje

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 24.05.2002

I just want to know God's thoughts.

The rest are details.

Albert Einstein

1	Einleitung.....	8
1.1	Synthese und Transport löslicher lysosomaler Enzyme.....	8
1.2	Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren.....	9
1.2.1	Der MPR 300.....	10
1.2.2	Der MPR 46.....	11
1.3	Signalabhängiger Transport von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren.....	12
1.3.1	Cytosolische Bindungspartner der Mannose-6-Phosphat- Rezeptoren.....	15
1.3.1.1	Adaptorproteine.....	15
1.3.1.2	GGAs.....	18
1.3.1.3	TIPs und PACS.....	19
2	Zielsetzung.....	20
3	Material und Methoden.....	21
3.1	Material.....	21
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	21
3.1.2	Radioaktive Substanzen.....	23
3.1.3	Geräte.....	23
3.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	25
3.1.5	Kits zur Bearbeitung von DNA und Proteinen.....	26
3.1.6	Plasmide und DNA-Standards.....	26
3.1.7	cDNA-Banken.....	26
3.1.8	Enzyme und Nucleotide.....	26
3.1.9	Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards.....	27
3.1.10	Bakterienstämme.....	27
3.1.11	Hefestämme.....	27
3.1.12	Zelllinien.....	28
3.1.13	Puffer, Medien und Lösungen.....	28
3.1.13.1	Medien zur Aufzucht von Bakterien und Hefen.....	28
3.1.13.2	Zellkulturmedien.....	29
3.1.14	Antikörper.....	29
3.1.14.1	Primärantikörper.....	29
3.1.14.2	Sekundärantikörper.....	30
3.2	Methoden.....	31
3.2.1	Molekulargenetische Methoden.....	31
3.2.1.1	Methoden zur Arbeit mit Hefezellen.....	31
3.2.1.1.1	Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen.....	31
3.2.1.1.2	Bestimmung von β -Galactosidase im Filtrertest.....	33
3.2.1.1.3	Plasmidisolierung aus Hefekulturen.....	34
3.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	35
3.2.2.1	DNA-Präzipitation mit Ethanol.....	35
3.2.2.2	DNA-Extraktion mit Phenol, Phenol/Chloroform/Iso- amylalkohol oder Chloroform.....	35
3.2.2.3	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	35
3.2.2.3.1	Photometrische Analyse.....	35
3.2.2.3.2	Ethidiumbromid-Fluoreszenzmessung im Agarosegel.....	35
3.2.2.4	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen.....	36
3.2.2.5	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.....	36
3.2.2.5.1	Herstellung chemokompetenter Zellen.....	36
3.2.2.5.2	Transformation chemokompetenter Zellen.....	36
3.2.2.5.3	Herstellung elektrokompeter Bakterien.....	36
3.2.2.5.4	Transformation elektrokompeter Zellen.....	37
3.2.2.5.5	Anlegen einer Glycerol-Kultur.....	37
3.2.2.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	37
3.2.2.6.1	Schnelle Isolierung kleiner Mengen.....	37
3.2.2.6.2	Isolierung größerer Mengen.....	38
3.2.2.7	Auftrennung von DNA in Agarosegelen.....	38

3.2.2.8	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	39
3.2.2.9	Polymerase-Kettenreaktion	39
3.2.2.10	Sequenzierung von Plasmid-DNA	40
3.2.3	Zellbiologische Methoden	41
3.2.3.1	Kultivierung von Zelllinien	41
3.2.3.2	Trypsinieren von Zellen	41
3.2.3.3	Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse	41
3.2.3.4	Metabolische Markierung von Zellen mit [³⁵ S]-Methionin	42
3.2.3.5	Immunpräzipitation von Cathepsin D und ASA	43
3.2.3.6	Endocytose des jodierten MPR 46 Antikörpers 21-D3	45
3.2.3.7	Endocytose der jodierten Arylsulfatase A	45
3.2.4	Biochemische Methoden	46
3.2.4.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	46
3.2.4.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese	46
3.2.4.3	Färbung von Proteinen	47
3.2.4.3.1	Anfärbung mit Coomassie-Blue	47
3.2.4.3.2	Silberfärbung	47
3.2.4.3.3	Imprägnierung von Polyacrylamid-Gelen für die Fluorographie	47
3.2.4.4	Westernblot Analyse	47
3.2.4.5	TCA-Fällung radioaktiv markierter Proteine	48
3.2.4.6	Sequenzierung von Proteinen	48
3.2.4.7	Massenspektrometrische Analyse von Proteinen	48
3.2.4.8	Expression und Aufreinigung von <i>Glutathion-S- Transferase</i> -Fusionsproteinen	48
3.2.4.9	Aufbereitung des Rattenhirns für Affinitätschromatographie	50
3.2.4.10	Copräzipitation von cytosolischen Proteinen mit GST-MPR 46-CD	51
4	<i>Ergebnisse</i>	52
4.1	Suche nach cytoplasmatischen Bindungspartnern für den MPR 46 im <i>yeast-two-hybrid</i>-System	52
4.1.1	Untersuchung einer Rattenhirn cDNA-Bank	53
4.1.2	Untersuchung einer humanen Hirn-cDNA-Bank	55
4.2	MPR 46-CD Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von interagierenden Proteinen aus Rattenhirn	57
4.2.1	Expression der GST-Fusionsproteine	57
4.2.2	Aufreinigung potentieller MPR 46-CD-Bindungspartner aus Rattenhirn	59
4.2.2.1	Westernblot-Analyse	61
4.2.3	Untersuchungen zu der physiologischen Bedeutung der Interaktion zwischen der MPR 46-CD und Aktin	62
4.2.3.1	Beteiligung des Aktin-Cytoskeletts an der Internalisierung des MPR 46	62
4.2.3.1.1	Optimierung des MPR 46-Endocytose-Assays	62
4.2.3.1.2	Endocytose des MPR 46 in BHK MPR 46-Zellen	64
4.2.3.1.3	Endocytose von Arylsulfatase A in BHK MPR 46-Zellen	66
4.2.3.1.4	Endocytose von Arylsulfatase A in neuronalen Zelllinien	67
4.2.3.2	Sortierung neusynthetisierter lysosomaler Enzyme	69
4.2.3.3	Lokalisation von MPR 46 und Aktin in kultivierten Zellen	72
4.2.3.4	Lokalisation von MPR 300 und Aktin in kultivierten Zellen	74
4.2.4	Erweiterte Suche nach MPR 46-CD-interagierenden Proteinen	76
4.2.4.1	Westernblot-Analyse	77
4.2.5	Copräzipitations-Analysen	80
4.2.6	Indirekte Immunfluoreszenz-Analysen an kultivierten Zellen	82
5	<i>Diskussion</i>	86
5.1	Suche nach Interaktionspartnern für die cytoplasmatische Domäne des 46 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptors	86
5.1.1	Das <i>yeast-two-hybrid</i> -System	86
5.1.2	Affinitätschromatographische Aufreinigung MPR 46-CD-bindender Proteine	90
5.1.2.1	Aktin und die Endocytose von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren	93
5.1.2.2	Talin	100

Inhaltsverzeichnis

5.1.2.3	Myosin VII.....	102
5.1.2.4	Annexin III.....	104
5.1.2.5	Tiam 1	106
6	Zusammenfassung.....	110
7	Literaturverzeichnis.....	112
8	Abkürzungsverzeichnis.....	130
9	Anhang.....	132

1 EINLEITUNG

1.1 Synthese und Transport löslicher lysosomaler Enzyme

Eukaryotische Zellen liefern ein hervorragendes Beispiel dafür, wie effiziente Wiederaufbereitung in der Natur funktioniert. So sind diese Zellen in der Lage, die meisten heterogenen Makromoleküle, die in der Zelle und in dem extrazellulären Raum entstehen (z. B. Proteine, komplexe Kohlenhydratverbindungen, Lipide, Nucleinsäuren) in ihre Bausteine zu zerlegen und daraus ohne Qualitätsverlust neue Produkte zu synthetisieren. Die wichtigsten für den intrazellulären Abbau spezialisierten Zellorganellen sind Lysosomen. Lysosomen sind membranumgebene Organellen, in denen eine Vielzahl verschiedener saurer Hydrolasen angereichert sind. Die Funktionen der lysosomalen Membran bestehen in der Aufrechterhaltung eines intralysosomalen sauren Milieus durch ATP-getriebene Protonenpumpen, dem selektiven Transport von Abbauprodukten in das Cytosol durch Transportproteine und dem Schutz cytoplasmatischer Strukturen vor hydrolytischem Abbau.

Während die Mechanismen und Signale, die lysosomale Membranproteine zu ihrem Bestimmungsort dirigieren, weitestgehend unbekannt sind, sind die Transportwege und Sortierungsmechanismen neusynthetisierter, löslicher lysosomaler Enzyme besser charakterisiert. Der Transport löslicher lysosomaler Enzyme von dem Ort ihrer Biosynthese zu den Lysosomen hängt wesentlich von der Erkennung und Bindung eines für diese Enzyme spezifischen Mannose-6-Phosphat-Signals durch Rezeptoren ab [1].

Lösliche lysosomale Enzyme werden am rauen Endoplasmatischen Reticulum (ER) mit einer N-terminalen Signalsequenz synthetisiert, die zur Steuerung und Translokation durch die ER-Membran erforderlich ist. Die Polypeptidketten werden kotranslational mit Oligosacchariden an spezifischen Asparaginresten der Konsensussequenz N-X-T/S (X steht für jede beliebige Aminosäure) versehen. Nach Prozessierung der Oligosaccharidketten durch Abspaltung von drei Glucoseresten und einem Mannoserest gelangen die lysosomalen Enzyme über Transportvesikel zu dem *cis*-Golgi Apparat, wo eine weitere Prozessierung der Oligosaccharidketten vom mannosereichen zum komplexen Typ stattfinden kann. Während Oligosaccharidketten vom komplexen Typ charakteristisch für

sekretorische Proteine sind, findet man in lysosomalen Enzymen eher mannosereiche Seitenketten [1]. Die Prozessierung der Oligosaccharidketten wird im *trans*-Golgi-Netzwerk (tGN) durch Addition von Galactose- und Sialinsäureresten komplettiert [1] [2]. Ein entscheidender Schritt bei der Prozessierung der Zuckerketten löslicher lysosomaler Enzyme ist die Bildung von Phosphomannosylresten an Oligosaccharidketten vom mannosereichen Typ. Dabei erfolgt im *cis*-Kompartiment die Übertragung eines Phosphoryl-N-Acetylglucosamin-Restes auf die Hydroxylgruppe am C6-Atom eines Mannoserestes durch die UDP-N-Acetylglucosamin-1-Phosphotransferase. Anschließend spaltet eine Phosphodiesterase (α -N-Acetylglucosamidase) den N-Acetylglucosamin-Rest ab und erzeugt einen Mannose-6-Phosphat-Rest (M6P). Die Phosphomannosylreste ermöglichen die Segregation der neusynthetisierten lysosomalen Enzyme von der sekretorischen Route im tGN durch Bindung an M6P-Rezeptoren (MPR). Die Ligand-Rezeptorkomplexe werden in Clathrin-beschichtete Vesikel verpackt, die nach Verlust der Clathrinhülle mit einem prälysosomalen/endosomalen Kompartiment fusionieren, wo es aufgrund des sauren pH-Wertes zu der Dissoziation der Ligand-Rezeptorkomplexe kommt. Während die lysosomalen Enzyme auf noch ungeklärte Weise ins Lysosom gelangen, rezirkulieren die MPR zu dem tGN und stehen für neue Transportrunden zur Verfügung [3].

1.2 Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren

Bis heute sind zwei MPR beschrieben, die beide am Transport löslicher lysosomaler Proteine beteiligt sind und damit eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung der Integrität der Lysosomen und ihrer Funktion besitzen. Die beiden Rezeptoren werden nach ihren apparenten molaren Massen von 46 bzw. 300 kDa als MPR 46 und MPR 300 bezeichnet. Der MPR 300, der wegen seiner Fähigkeit, den nicht-glycosylierten Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor II (IGF II) zu binden, auch als M6P/IGF II-Rezeptor bezeichnet wird [4], wurde erstmals von Sahagian 1982 isoliert. Da sich die Bindungsaffinität des MPR 46 zu seinen Liganden im Gegensatz zum MPR 300 *in vitro* durch den Zusatz divalenter Kationen steigern läßt [5] wird der MPR 46 auch als kationenabhängiger und der MPR 300 als kationenunabhängiger M6P-Rezeptor bezeichnet.

Beide Rezeptoren sind Typ I Transmembranproteine, deren luminale Domänen die Liganden-Bindungsstellen enthalten, während hauptsächlich die dem Cytoplasma zugewandten C-terminalen Domänen der Rezeptoren Signalstrukturen aufweisen, welche

die intrazellulären Transportrouten bestimmen. Dabei wird die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 als hinreichend angesehen, während im Falle des MPR 300 zusätzliche Signale im luminalen Bereich oder der Transmembrandomäne angenommen werden [6]-[8].

Beide MPR zirkulieren konstitutiv sowohl zwischen tGN und Endosomen als auch zwischen endosomalen Membranen und der Plasmamembran. Während der MPR 300 exogene, M6P-haltige Vorstufen lysosomaler Enzyme und IGF II an der Plasmamembran bindet und nach Rezeptor-vermittelter Endocytose zu den Lysosomen dirigiert, bindet und internalisiert der MPR 46 keine extrazellulären Liganden an der Plasmamembran [108].

Das Optimum der Ligandenbindung liegt *in vitro* bei dem MPR 300 zwischen pH 6,0-7,4 [5] und bei dem MPR 46 zwischen pH 6,0-6,3 [9], was Befunde unterstützt, wonach beide Rezeptoren Liganden im tGN, aber nur der MPR 300 Liganden an der Plasmamembran binden kann [9] [10].

Die subzelluläre Verteilung der MPR korrespondiert mit den Transportwegen lysosomaler Enzyme [11]. Die Gesamtmenge der MPR verteilt sich zelltypspezifisch auf Plasmamembran (3-20%), endosomale Membranen (40-60%) und tGN (20-40%) [12] [13]. In den Lysosomen konnten keine MPR nachgewiesen werden.

Aus Immundepletionsstudien schloß man, daß der MPR 46 eine untergeordnete Rolle für die Sortierung lysosomaler Hydrolasen besitzt [108]. Neuere Untersuchungen an Rezeptor-defizienten Mausfibroblasten zeigten jedoch, daß beide Rezeptoren unterschiedliche lysosomale Hydrolasen mit unterschiedlicher Effizienz sortieren [14]-[17].

1.2.1 Der MPR 300

Der MPR 300 ist ein monomeres Glykoprotein und besteht aus vier strukturellen Domänen von ähnlicher, Spezies-abhängiger Länge: einer N-terminalen Signalsequenz von 40-44 Aminosäuren, einer extracytoplasmatischen Domäne von 2264-2269 Aminosäuren, einer Transmembrandomäne, die 23 Aminosäuren umfaßt und einer C-terminalen cytoplasmatischen Domäne von 164 Aminosäuren. Die extracytoplasmatische Domäne ist aus 15 Wiederholungseinheiten von jeweils 147 Aminosäuren aufgebaut, die untereinander eine Homologie von 16-38 % besitzen. Von den 19 potentiellen N-Glycosylierungsstellen in der luminalen Domäne werden mindestens zwei genutzt und tragen ca. 20-30 kDa zum Molekulargewicht bei [18]. Der Rezeptor besitzt zwei M6P-Bindungsstellen in den

Wiederholungseinheiten 1-3 und 7-9 der luminalen Domäne [19], wobei die Argininreste 435 und 1334 essentiell für die Bindung sind [20], und kann damit zwei Mol eines monovalenten oder ein Mol eines divalenten Liganden pro Mol Rezeptor binden [5]. Neben M6P-haltigen lysosomalen Enzymen bindet auch die inaktive Vorstufe des transformierenden Wachstumsfaktors $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) über M6P-Reste an den MPR 300, was als Voraussetzung für dessen Aktivierung angesehen wird [21]. Die Bindungsstelle für IGF II umfaßt beim bovinen und humanen MPR 300 die N-terminalen Aminosäure (AS)-Reste 1508-1566 der Wiederholungseinheit 11 [22] [23], während bei einigen Spezies wie z. B. Huhn und Frosch diese Bindungsstelle fehlt [24] [25].

Zwei weitere Klassen von MPR 300-Liganden wurden beschrieben, deren Bindungsstellen sich von den bekannten M6P/IGF II-Bindungsstellen unterscheiden [26] [27]. Einer dieser Liganden, der Urokinasetyp-Plasminogen-Aktivator Rezeptor (uPAR), ist ein Glykosylphosphatidyl-inositol-verankertes Zelloberflächen-Adhäsionsprotein, das an der extrazellulären proteolytischen Aktivierung von Plasminogen und latentem TGF- $\beta 1$ beteiligt ist. Es wird angenommen, daß die uPA-unabhängige Bindung an den MPR 300 die subzelluläre Verteilung von uPAR ändert und es zum Lysosom dirigiert. Bei dem zweiten Liganden handelt es sich um Retinsäure, die das Zellwachstum während der Embryo- und Onkogenese beeinflusst und nach Bindung an den MPR 300 eine Umverteilung der Rezeptoren sowie der lysosomalen Protease Cathepsin B aus perinucleären in endosomale Strukturen induziert [26] [28].

1.2.2 Der MPR 46

Der MPR 46 besteht aus vier strukturellen Domänen von Spezies-abhängiger Länge: einer N-terminalen Signalsequenz von 21-28 Aminosäuren, einer extracytoplasmatischen Domäne von 159 Aminosäuren, einer Transmembrandomäne, die 25 Aminosäurereste umfaßt und einer C-terminalen cytoplasmatischen Domäne von 67 Aminosäuren. Die extracytoplasmatische Domäne des MPR 46 besitzt Sequenzhomologien von 14-28 % zu den einzelnen Wiederholungseinheiten des MPR 300. Vier der fünf potentiellen Glycosylierungsstellen der luminalen Domäne werden genutzt und die Oligosaccharidketten machen etwa 40 % des Molekulargewichtes aus [29]. Der MPR 46 besitzt eine M6P-Bindungsstelle [5] und kann als Mono-, Di- und Tetramer vorkommen [108] [30]. Dimere und Tetramere haben eine höhere Bindungsaffinität und stellen wahrscheinlich die

bindungsaktive Form dar. Es wird angenommen, daß ein Mol Homodimer des MPR 46 ein Mol Oligosaccharid das zwei M6P-Reste trägt, in ähnlicher Art und Weise zu binden vermag, wie ein Mol MPR 300 [18].

Dem MPR 46 wird bei der Sortierung neusynthetisierter lysosomaler Enzyme nur eine geringe Bedeutung zugesprochen. Der Vergleich von Zellen, die defizient für den MPR 46 oder MPR 300 bzw. doppelt defizient für beide MPR-Rezeptoren waren, ergab, daß der MPR 46 ca. 35-40 % der neusynthetisierten lysosomalen Enzyme zum Endosom transportiert, während der MPR 300 auch in Abwesenheit von MPR 46 die Gesamtheit neusynthetisierter lysosomaler Enzyme im tGN korrekt sortiert [31]. Außerdem werden in MPR 46-überexprimierenden BHK- und Maus L⁻-Zellen vermehrt lysosomale Enzyme sezerniert [32], während die Blockierung der Ligandenbindungsstelle des MPR 46 in diesen Zellen in einer verminderten Sekretion lysosomaler Hydrolasen resultierte.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß der MPR 46 eine Rolle bei der Sekretion neusynthetisierter lysosomaler Enzyme spielen könnte. Andere Gruppen [10] [33] wiesen durch eine Überexpression des MPR 46 in Maus L⁻-Zellen, die defizient für den MPR 300 sind, eine verbesserte Sortierung lysosomaler Enzyme nach.

1.3 Signalabhängiger Transport von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren

Für den gerichteten Transport der MPR entlang des Biosynthese- und Endocytoseweges sind Signalstrukturen (Tab. 1 und Tab. 2) verantwortlich, die hauptsächlich in den cytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren lokalisiert sind. Diese Signalstrukturen können mit Proteinen aus Cytosol oder Vesikelmembranen in Wechselwirkung treten, welche die Konzentrierung der MPR in bestimmten Membranbereichen, Anlagerung von Hüllproteinen, Abschnürung, Transport und Fusion MPR-haltiger Vesikel mit der Zielmembran begünstigen. Diese Signalstrukturen wurden u.a. durch *yeast-two-hybrid*-Analysen, Expressionsanalysen mutierter MPR und Plasmon-Resonanz-Bindungsstudien unter Verwendung synthetischer MPR-Peptide getestet. Die in der cytoplasmatischen Domäne des MPR 46 identifizierten Signalstrukturen sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Identifizierte Signalstrukturen in der cytoplasmatischen Domäne des MPR 46.

Angabe der Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code. AP=Adaptor-Protein, GGA=Golgi localized, gamma-ear-containing, ARF-binding proteins.

Sequenz	Modifikation	Funktion	Referenz
⁷ AKGMEQF ¹³	-	Internalisierung	[34]
		Bindung von AP-2	[35]
¹³ FPHLAF ¹⁸	-	Internalisierung	[36]
		Bindung von AP-2	
¹⁸ FW ¹⁹	-	Endosomale Sortierung für Rücktransport zum tGN	[37]
		Bindung von TIP 47	[38]
			[100]
³⁰ C/C ³⁴	Palmitoylierung	Endosomale Retention	[115]
			[39]
³⁴ CRSKPR ³⁹	-	Endosomale Retention	[40]
⁴⁵ YRGV ⁴⁸	-	Bindung von AP-1	[36]
		Bindung von AP-3	[41]
		Internalisierung	[36]
		Bindung von AP-2	
		Basolateraler Transport	[42]
		Bindung von AP-4	
⁵⁷ S	Phosphorylierung		[43]
		Bindung von AP-1	[44]
		Endosomale Sortierung	[45]
⁶⁴ LLPM ⁶⁷	-	Bindung von AP-1	[33]
		Bindung von AP-3	[41]
		Bindung von GGA1 und GGA3	[46]
		Internalisierung	[34]

Fortsetzung Tab. 1

Sequenz	Modifikation	Funktion	Referenz
C-terminales Cluster saurer Aminosäuren		Bindung von AP-2 und AP-3	[47][48]

In der cytoplasmatischen Domäne des MPR 300 sind weniger Signalstrukturen bekannt als in der des MPR 46. Bisher bestimmte Sequenzen der MPR 300-CD, welche die intrazellulären Transportrouten des Rezeptors bestimmen, sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: Identifizierte Signalstrukturen in der cytoplasmatischen Domäne des MPR 300.

Angabe der Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code. AP=Adaptor-Protein, CK2=Casein Kinase 2, GGA=Golgi localized, gamma-ear-containing, ARF-binding proteins, PKA= Protienkinase A.

Sequenz	Modifikation	Funktion	Referenz
²⁰ S	Phosphorylierung (PKA)	?	[49]
²⁴ YKYSKV ²⁹	-	Internalisierung	[50]
		Bindung von AP-2	[51]
			[52]
		Bindung von AP-1	[53]
⁸⁵ S	Phosphorylierung (CK2)	Sortierung am tGN	[54]
		Bindung von TIP 35	[99]
¹²³ R...K ¹³⁶	-	IGF-II induzierte	[55]
		Bindung von G _{i2}	[56]
¹⁵⁶ S	Phosphoryliert (CK2)	Sortierung am tGN Bindung von TIP 35	[57] [99]
¹⁶¹ LLHV ¹⁶⁴	-	Bindung von AP-1 Bindung von GGA1, GGA2, GGA3	[53] [46]

Fortsetzung Tab. 2

Sequenz	Modifikation	Funktion	Referenz
C-terminales Cluster saurer Aminosäuren	-	Bindung von PACS-1	[58]

1.3.1 Cytosolische Bindungspartner der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren

1.3.1.1 Adaptorproteine

Bis heute wurden vier Adaptorproteine (AP-1-AP-4) beschrieben, die an der Sortierung der MPR im tGN bzw. an deren Endocytose an der Plasmamembran beteiligt sind.

Die Verpackung der MPR in Clathrin-beschichtete Vesikel am tGN erfolgt unter Beteiligung des Adaptorkomplexes AP-1, der aus vier Untereinheiten zusammengesetzt ist: einem großen γ - und β 1-Adaptin (100 kDa), einer mittleren μ 1- (50 kDa) und einer kleinen σ 1- (20 kDa) Untereinheit [59]. Clathrin bindet an die β 1- Untereinheit [60], wobei eine Beteiligung der γ -Untereinheit wahrscheinlich erscheint [61]. Aus *yeast-two-hybrid*-Analysen [62] geht hervor, daß die μ 1-Untereinheit Tyrosin-haltige Internalisierungssequenzen vom Typ (YXX \emptyset) bindet, die in cytoplasmatischen Domänen endocytotischer Rezeptoren gefunden wurden. Kürzlich wurde eine Interaktion der γ -Untereinheit des AP-1-Komplexes mit Mikrotubuli beschrieben [63] wobei die Autoren eine Beteiligung des Typ1-Mikrotubuli-Assoziierten-Proteins (MAP) für diese Interaktion in Erwägung ziehen.

Die Defizienz von μ 1-Adaptin bei Mäusen ist embryonal letal am Tag 13,5 pc [64], wobei die eigentliche Todesursache noch ungeklärt ist. Die Defizienz von γ -Adaptin bei Mäusen ist bereits am Tag 3,5 pc letal [65]. Die Autoren schließen auf eine essentielle Bedeutung des γ -Adaptins für die Bildung des gesamte AP-1-Komplexes.

In $\mu 1$ -Adaptin-defizienten Mausfibroblasten sind die verbleibenden Untereinheiten des AP-1 Komplexes nicht fähig, an die tGN-Membran zu binden. Außerdem konnte bei diesen Fibroblasten eine Akkumulation der MPR in Endosomen beobachtet werden [64], was vermuten läßt, daß AP-1 eine Bedeutung im retrograden Transport der MPR von den Endosomen zum tGN zukommt. Polarisierete Nierenepithelzellen $\mu 1$ -defizienter Mausembryonen wiesen eine Bindung der γ -Untereinheit an Membranen auf, da diese Zellen über eine spezifische Isoform des AP-1-Komplexes, der eine $\mu 1B$ -Untereinheit enthält, verfügen [66]. γ -Adaptin defiziente Blastocysten waren nicht fähig, zu proliferieren [65].

Diese Befunde machen deutlich, daß AP-1 eine wesentliche Rolle am tGN oder Endosom spielt und nicht von den anderen Adaptoren oder noch nicht identifizierten Proteinen kompensiert werden kann.

Die Internalisierung der MPR durch Abschnürung Clathrin-beschichteter Vesikel an der Plasmamembran erfolgt unter Beteiligung des Adaptorkomplexes AP-2, der aus vier Untereinheiten besteht: einem großen α - und $\beta 2$ -Adaptin (100 kDa), einer mittleren $\mu 2$ - (50 kDa) und einer kleinen $\sigma 2$ - (17 kDa) Untereinheit [67]. Die Funktion dieses Adaptors wird in der Rekrutierung und Bindung von Clathrin und der Erkennung spezifischer Signalstrukturen (Tab. 1 und Tab. 2) in der cytoplasmatischen Domäne der MPR und andere Membranrezeptoren angesehen [68], wobei die $\mu 2$ -Untereinheit in Wechselwirkung mit den cytoplasmatischen Domänen zirkulierender Membranrezeptoren tritt und die $\beta 2$ -Untereinheit an Clathrin bindet [69]. AP-2 defiziente Mäuse sind embryonal letal (Dr. Peter Schu, Göttingen, persönliche Mitteilung).

Das Adaptorprotein AP-3 ist in den Transport zwischen tGN und Lysosomen/Melanosomen involviert [41]. Melanosomen sind spezialisierte Organellen in Melanocyten, in denen Pigmente synthetisiert werden und die bestimmte lösliche lysosomale Proteine enthalten. Biochemische, morphologische und genetische Studien erwiesen eine enge Verwandtschaft zwischen Melanosomen und Lysosomen [70]. AP-3 besteht aus vier Untereinheiten: einem großen δ - und $\beta 3$ -Adaptin (160 kDa), einer mittleren $\mu 3$ - (47 kDa) und einer kleinen $\sigma 3$ - (25 kDa) Untereinheit [71]. AP-3 ist am tGN, einem peripheren endosomalen Kompartiment und an Lysosomen detektierbar [72] [71] [73] [74]. Bei AP-3-defizienten humanen Fibroblasten konnte festgestellt werden, daß lysosomale Membranproteine (lamp-1, lamp-2, limp-2, CD63) vermehrt über die

Plasmamembran zirkulierten, ihre Verteilung im Gleichgewicht der Zelle war jedoch überwiegend lysosomal [75]-[77]. Hefezellen, die für die einzelnen Untereinheiten des AP-3-Komplexes defizient sind, weisen eine Fehlsortierung vacuolärer Hydrolasen (Alkaline Phosphatase und Vam3p) auf, die direkt vom Golgi zu der Vacuole transportiert werden. Hydrolasen (Carboxypeptidase Y), die über ein Endosomen-ähnliches Kompartiment zu der Vacuole transportiert werden, wurden dagegen richtig sortiert [78] [79]. Die Autoren nehmen an, daß der AP-3-vermittelte Transport direkt vom tGN zu Lysosomen/Vacuolen führt. Da AP-3 auch in peripheren endosomalen Kompartimenten lokalisiert wurde [71]-[74] liegt die Vermutung nahe, daß AP-3-vermittelte Transportrouten möglicherweise ein anderes endosomales Kompartiment als Zwischenstufe haben als für den konventionellen Transport vom tGN zum Lysosom beschrieben [46].

In der Ratte wurden zwei Isoformen dieses Proteins beschrieben, eine ubiquitär exprimierte Form mit einer μ 3A- und eine neuronale Form mit einer μ 3B-Untereinheit [80].

Zur Aufklärung der Funktion des AP-3 haben natürliche Mutanten beigetragen, die bei *Drosophila melanogaster*, Maus und Mensch bekannt sind und vor allem zu Pigmentierungsdefekten führen [41]. Vier *Drosophila*-Mutanten mit Pigmentstörungen der Augenfarbe sind beschrieben, *garnet*, *ruby*, *carmine* und *orange*, die Mutationen in den Genen, die für die δ -, β 3-, μ 3- σ 3-Untereinheit des AP-3-Komplexes codieren, aufweisen [71] [81]-[84]. Zwei Mausmodelle, *mocha* und *pearl*, mit Mutationen in den AP-3 δ - und β 3-Untereinheiten sind bekannt [85] [86] die einer Form des Hermansky-Pudlak-Syndrom (HPS) beim Menschen entsprechen [75] [86]. *Mocha* und *pearl* Mäuse sowie HPS-Patienten weisen eine Akkumulation lysosomaler Enzyme und Defekte in der Synthese und/oder Lagerung von Pigmenten auf. *Knock-out*-Mäuse, die für beide μ 3-Untereinheiten, die ubiquitäre μ 3A- und die neuronale μ 3B-Untereinheit, defizient sind, weisen den gleichen Phänotyp auf wie für die natürlichen Mutanten beschrieben [87].

Das Adaptorprotein AP-4 wird ubiquitär in den meisten Organismen mit Ausnahme von *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. AP-4 ist ein Heterotetramer das aus vier Untereinheiten besteht: einem großen ϵ - (140 kDa) und β 4- (80 kDa) Adaptin, einer mittleren μ 4- (50 kDa) und einer kleinen σ 4-(15 kDa) Untereinheit [88]. Aus *yeast-two-hybrid*-Analysen geht hervor, daß die μ 4-Untereinheit Konsensussequenzen vom Typ YXX \emptyset bindet [46], die auch in der cytoplasmatischen Domäne der MPR zu finden ist. Immunfluoreszenzmikroskopische

Analysen ergaben eine Lokalisation von AP-4 am tGN [88] [89], elektronenmikroskopische Analysen zeigten auch eine Assoziation von AP-4 mit Vesikeln, die nicht Clathrin-beschichtet waren [88]. Bestätigt wurde dieser Befund durch die Beobachtung, daß weder die ϵ - noch die β 4-Untereinheit Clathrin-bindende Motive aufweisen [46]. Neue Untersuchungen berichten von einer Beteiligung des AP-4-Komplexes am basolateralen Transport von Proteinen in Epithelzellen [89]. So wurde in MDCK-Zellen, bei denen die μ 4-Adaptin-Menge auf 20 % reduziert worden war, mehrere basolateral sortierte Proteine zu der apikalen Seite fehlsortiert [89].

1.3.1.2 GGAs

Kürzlich wurden drei neue humane Adaptor-ähnliche Proteine beschrieben (GGA1, GGA2 und GGA3 für Golgi localized, gamma-ear-containing, ARF-binding proteins), die mit den MPR in Wechselwirkung treten [90]-[92]. GGAs sind Monomere, die aus vier Domänen bestehen: einer N-terminalen VHS-Domäne (Vps27, Hrs und STAM, Lohi und Lehti, 1998), die als Erkennungsmodul für das Di-Leucin-Signal der MPR fungiert, einer GAT- (GGA and TOM) Domäne, welche die Interaktion mit GTP-gebundenem ARF gewährleistet und somit GGAs an der tGN-Membran verankert, einer *hinge*-Domäne, die putative Motive für die Bindung von Clathrin aufweist und einer GAE (gamma-adaptin ear)-Domäne, die γ -Synergine und Rabaptin 5 bindet, welche wahrscheinlich an der Bildung GGA-haltiger Hüllen beteiligt sind. [46] [93] [94].

Yeast-two-hybrid-Analysen ergaben, daß die cytoplasmatische Domäne des MPR 300 mit der VHS-Region der drei bisher bekannten GGAs in Wechselwirkung tritt, der MPR 46 hingegen nur mit der VHS-Domäne von GGA1 und, etwas schwächer, von GGA3 interagiert [93].

Kürzlich wurde die Interaktion von GGA1 und GGA2 mit der Vps10p-Domäne des sorLA-Rezeptors beschrieben, die nicht anhand eines Di-Leucin- sondern eines $\Psi\Psi\text{XX}\emptyset$ Motivs erfolgt (Ψ steht für D, E oder Phosphoserin, X für jede beliebige Aminosäure und \emptyset für eine hydrophobe Aminosäure) [95]. Die Kristallstruktur der VHS-Domäne von GGA1 im Komplex mit einem MPR-Peptid läßt eine Super-Helix, bestehend aus acht α -Helices, erkennen, wobei es zu elektrostatischen und hydrophoben Interaktionen zwischen den α -Helices 6 und 8 und dem Di-Leucin-Motiv des MPR 300 kommt [96]. Analysen der Kristallstruktur der VHS-Domäne von GGA3 läßt ebenfalls eine Super-Helix, bestehend

aus acht α -Helices, erkennen. Die Autoren zeigten für beide MPR, daß die Di-Leucin-Motive ihrer cytoplasmatischen Domänen an die 6. und 8. α -Helix der GGA3-VHS-Domäne binden [97].

Immunfluoreszenzmikroskopische Studien ergaben, daß sowohl GGA1 und GGA2 [90] als auch GGA3 [92] in perinucleären Strukturen, welche dem tGN entsprechen, lokalisiert sind.

Es wird vermutet, daß GGAs an der Sortierung intrazellulärer Ligand-Rezeptor-Komplexe von tGN zu den Endosomen beteiligt sind [98].

In Hefezellen wurden bisher zwei GGA-Proteine (GGA1 und GGA2, [90] [92] beschrieben. Hefen, bei denen beide GGA-Gene deletiert waren, wiesen eine Fehlsortierung vacuolärer Hydrolasen (CPY, PrA, ALP) und eine abnorme Morphologie der Vacuole auf [98].

1.3.1.3 TIPS und PACS

Für die MPR sind neben den bereits erwähnten Interaktionspartnern Proteine beschrieben, die mit den Signalstrukturen der cytoplasmatischen Domänen in Wechselwirkung treten.

So konnte die Bindung eines cytosolischen 35 kDa Proteins (TIP 35) unbekannter Funktion an die von der Casein Kinase 2 phosphorylierten Serinreste der cytoplasmatischen Domäne des MPR 300 gezeigt werden [99]. Die Interaktion mit zwei membranassoziierten 35 bzw. 91 kDa Proteinen (TIP 35-M und TIP 91-M) war dagegen unabhängig von der Phosphorylierung des Rezeptors [99]. Außerdem wurde mit Hilfe von *yeast-two-hybrid*-Analysen ein weiteres Adaptorprotein identifiziert (TIP 47), das direkt mit dem aromatischen Signal ¹⁸FW¹⁹ des MPR 46 und mit dem MPR 300 interagiert [100]. TIP 47 wiederum bindet an rab9 [101], das für den Rücktransport der MPR aus endosomalen Strukturen zum tGN essentiell ist [100].

Ein weiteres cytosolisches Protein, PACS-1 (Phosphofurin Acidic Cluster Sorting Protein-1), das zu der Gruppe cytosolischer „Connector“-Proteine gehört [58], bindet den C-terminal lokalisierten Cluster saurer Aminosäuren in der cytoplasmatischen Domäne des MPR 300 und dirigiert die Lokalisation des Rezeptors im tGN [58].

2 ZIELSETZUNG

Am Transport neusynthetisierter lysosomaler Enzyme zum Lysosom sind zwei spezifische Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR) beteiligt, die sich in der Art der Liganden, den Eigenschaften diese zu binden und in der intrazellulären Verteilung voneinander unterscheiden.

Für den gerichteten Transport der MPR entlang des Biosynthese- und Endocytoseweges sowie für die entsprechenden Recyclingwege sind verschiedene Signalstrukturen verantwortlich, die in den cytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren lokalisiert sind. Diese Signalstrukturen können mit cytosolischen Proteinen und mit Proteinen der Vesikelmembranen in Wechselwirkung treten, welche die Anlagerung von Hüllproteinen, die Abschnürung der Vesikel, den Transport und die Fusion mit Zielmembranen begünstigen.

Bisher sind zwei Klassen an cytosolischen Proteinen identifiziert worden, die mit den MPR spezifisch in Wechselwirkung treten können: Die Adaptoren AP-1-AP-4 und die Golgi localized, gamma-ear-containing, ARF-binding proteins (GGA1-GGA3). Diese Proteinen sind vor allem an der MPR-beteiligten Vesikelbildung im tGN und an der Plasmamembran involviert. Proteine, die für den Rücktransport vom Endosom zum tGN oder Plasmamembran bzw. Retention im Endosomen verantwortlich sind, sind unbekannt. Aus diesen Daten kann gefolgert werden, daß weitere cytosolische Proteine existieren, die durch direkte Bindung an die cytoplasmatischen Domänen der MPR deren Transportrouten und/oder Kinetik dirigieren.

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung neuer cytosolischer oder membranassoziierter Proteine, die mit der cytoplasmatischen Domäne des MPR 46 interagieren. Zu diesem Zweck sollten cDNA-Banken mit dem *yeast-two-hybrid*-System in der Hefe auf interagierende Proteine untersucht werden. Anschließend sollten durch affinitätschromatografische Aufreinigung die Protein-MPR 46-Interaktionen auf Proteinebene *in vitro* verifiziert und ihre Bedeutung für den Transport der Rezeptoren und neusynthetisierter lysosomaler Enzyme an kultivierten Zelllinien untersucht werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, analysenrein verwendet.

Acrylamid 30 % / Bisacrylamid 0,8 %	Roth, Karlsruhe
Agar	Sigma, Deisenhofen
Agarose für DNA-Gelelektrophorese	GIBCO/BRL, Eggenstein
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	BioRad, München
Coomassie R, Serva Blue	Serva, Heidelberg
DO-Zusatz für Hefemedien	Clontech, Palo Alto, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiotreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethanolamin	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure- Dinatriumsalz (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)- N-N-N'-N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma, Deisenhofen
ECL-Reagenz (Super Signal)	Pierce Rockford, IL, USA
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ficoll 400	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Material und Methoden

Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt
Glutathion-Agarose	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma, Deisenhofen
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat (KAc)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumcarbonat (K_2CO_3)	Merck, Darmstadt
Kupferchlorid ($CuCl_2$)	Merck, Darmstadt
Lithiumacetat (LiAc)	Merck, Darmstadt
Magnesiumacetat (MgAc)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Serva, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	BioRad, München
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pansorbin Zellen, Standardisiert	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Polyethylenglycol (PEG) 3.350	Sigma, Deisenhofen
Poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Saccharose	Merck, Darmstadt
Silbernitrat ($AgNO_3$)	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt

Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Serva, Heidelberg

3.1.2 Radioaktive Substanzen

[³⁵ S]-Methionin, 1000Ci/mmol	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
[¹²⁵ I]-Natriumjodid, trägerfrei in NaOH-Lösung pH 7-11, 100 mCi/ml	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

3.1.3 Geräte

Analysenwaagen Typ AC 100	Mettler Waagen Giessen
Analysenwaagen Typ BP 2100S	Sartorius, Göttingen
Brutschrank Innova 4230	New Brunswick Scientific, Nürtingen
DNA-Sequenzierer Typ	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler Gradient	
Drehrad für Eppendorfgefäße	Eigenbau, Werkstatt der Universität Göttingen
Drygalski-Spatel	Schütt Labortechnik, Göttingen
Eismaschine AF 10	Scotsman
Elektrophoresekammern für Agarosegele	BioRad, München
Elektrophoresekammern für Polyacrylamidgele	Hofer Scientific Instruments, USA
Filmentwicklungsmaschine	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Modell Gevomatic 60	
Gammastrahlenzähler, 1470 Wizard™	Wallac, Finnland
Gefrierschrank -80 °C	New Brunswick, Edison
Geltrockner, Modell Gel Air Dryer	BioRad Herkules, USA
Homogenisator Typ Tissue Tearor, Model 985-370	Biospec Products, France
Heizblock Modell Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler Modell G25	New Brunswick Sc., Edison
Magnetrührer Ika-Combimag Ret	Janke & Kunkel, Staufen

Mikroskope:

Phasenkontrastmikroskop, Modell ID 03	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen
Zusatzausstattung für das Axiovert 100:	
DP 50-Kamera	Olympus, Hamburg
Software: Analysis Soft Imaging System	
Fluoreszenzfilter für das Axiovert 100:	

Fluorochrom:	Anregungsfilter:	Farbteiler:	Emissionsfilter:
FITC, Cy2	BP 450-490	FT 510	LP 515-565
Texas-Rot, Cy3	BP 546	FT 580	LP 590

Mikrowellenherd	Bosch
Multipette, Combitips	Eppendorf, Hamburg
Blot-System, Transphor Typ SE 600	Hoefer Scientific Instruments, USA
Netzgerät Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Netzgerät EPS 1001	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pH-Meter Knick 647	Schütt, Göttingen
Photometer, Model RS 232 C	Eppendorf Hamburg
Sterilbank HS 12	Heraeus Osterode
Sterilfilter Minisart NML	Sartorius AG, Göttingen
Stickstoff-Einfriertank Typ Arpege 55	Air Liquide, Frankreich
UV-Handlampe (312 nm und 254 nm)	Bachofer, Reutlingen
Ultraschall-Desintegrator Sonifier W-450	Branson Ultrasonic SA, Carouge-Geneve, USA
Vakuum Konzentrator	Vacuubrand, Wertheim
Model Speed Vac SPD 111V	
Vortex-Genie	Bender & Hobein AG, Zürich
Wasserbad Typ HOR 7225	Köttermann, Häningsen
Zentrifugen	
Minifuge GL	Heraeus, Osterode
Eppendorf Kühlzentrifuge, Modell 5417	Eppendorf Hamburg
Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf Hamburg

Sorvall RC 5C PLUS	Kendro Laboratory Products, Newtown, Connecticut USA
Ultrazentrifuge Sorvall Discovery M120	Kendro Laboratory Products, Newtown, Connecticut USA
Rotoren für die Minifuge:	
F-45-30-11	Heraeus, Osterode
F-45-24-11	Heraeus, Osterode
Rotoren für die Sorvall-Zentrifugen:	
SS-34	Eppendorf Hamburg
SLA-3000	Eppendorf Hamburg
Rotor für die Ultrazentrifuge	
S 100 AT4	Kendro Laboratory Products, Newtown, Connecticut USA

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Gewebekulturflaschen 25 und 75 cm ²	Greiner, Nürtingen
Gewebekulturschalen, Ø 36 und 60 cm	Greiner, Nürtingen
Glasperlen, säuregewaschen, Ø 425-600 µm	Sigma, Deisenhofen
Immersionsöl 518 C	Zeiss, Oberkochen
Linspapier MN 10 B	Zeiss, Oberkochen
Nitrocellulose Blotting Membrane 0,2 µm	Bio-Rad, München
Objektträger und Deckgläser	Menzel Gläser
Röntgenfilme, XAR-5	Kodak, Stuttgart
Whatman GB002-Papier	Schleicher & Schüll, Dasse
Whatman GB003-Papier, extra dick	Schleicher & Schüll, Dassel
Zentrifugenbecher:	
SS-34 Polypropylen	Nalgene, München
JA-10 Polypropylen	Nalgene, München

3.1.5 Kits zur Bearbeitung von DNA und Proteinen

QIAquickgel Extraction	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification	Qiagen, Hilden
QIA Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIA Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden

3.1.6 Plasmide und DNA-Standards

pAS2	Clontech, Palo Alto, USA
pACT2	Clontech, Palo Alto, USA
pGAD10	Clontech, Palo Alto, USA
pGBT9	Clontech, Palo Alto, USA
pLamin	Clontech, Palo Alto, USA
pGEX 4T-1	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
DNA-Ladder	GIBCO/BRL, Eggenstein

3.1.7 cDNA-Banken

Matchmaker® Humane Hirn-cDNA-Bank	Clontech, Palo Alto, USA
Matchmaker® Rattenhirn-cDNA-Bank	Clontech, Palo Alto, USA

3.1.8 Enzyme und Nucleotide

DNase I	Merck, Darmstadt
dNTP-Set, ultrapure	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Lachssperma-DNA	Sigma, Deisenhofen
Lysozym	Merck, Darmstadt
<i>Pfu-Turbo</i> TM -Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
Phosphatase, alkalisch	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsendonucleasen	New England BioLabs, Bad Schwalbach
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

3.1.9 Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards

Jodacetamid (JAA)	Serva, Heidelberg
Leupeptin	Biomol, Hamburg
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma, Deisenhofen
Rainbow™-coloured Protein-Standard	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg

3.1.10 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Genotyp: F'/ <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ ,mK ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> , (NaI ^r), <i>relA1</i> , D(<i>lacZYA-argF</i>) _{U169} , (j80 <i>lacZDM15</i>)
<i>Escherichia coli</i> HB-101	Genotyp: Δ (<i>gpt-proA</i>)62, <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , <i>lacY1</i> , <i>hsdS_B20</i> , <i>recA</i> , <i>rpsL20</i> , (<i>Str</i> ^r), <i>ara-</i> 14, <i>galK2</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>supE44</i> , <i>mcrB_B</i>
<i>Escherichia coli</i> BL-21	Genotyp: F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal</i> (38, 39)

3.1.11 Hefestämme

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> HF7c	Genotyp: MATa, <i>ura 3-52</i> , <i>his 3-200</i> , <i>ade 2-</i> 101, <i>lys 2-801</i> , <i>trp 1-901</i> , <i>leu 2-3</i> , 112, <i>can</i> ^r , <i>gal 4-542</i> , <i>gal 80-538</i> , URA3: <i>GAL1-lacZ</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SFY 562	Reportergen: <i>lacZ</i> , HIS3 Genotyp: MATa, <i>ura 3-52</i> , <i>his 3-200</i> , <i>ade 2-</i> 101, <i>lys 2-801</i> , <i>trp 1-901</i> , <i>leu 2-3</i> , 112, <i>gal</i> 4-542, <i>gal 80-538</i> , LYS2: <i>GAL1-HIS3</i> , URA3: (GAL4 17- <i>mere</i>) ₃ -CYC1- <i>lacZ</i>
	Reportergen: <i>lacZ</i>

3.1.12 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
BHK MPR 46	BHK-21, stabil transfiziert mit der cDNA des humanen MPR 46	[43]
BHK MPR 300	BHK-21, stabil transfiziert mit der cDNA des humanen MPR 300	Bresciani, zur Verfügung gestellt
Glia C6	Ratten-Gliazellen	ATCC Nr. CCL-107
L-MPR 46	Mausfibroblasten, defizient für murinen MPR 300, stabil transfiziert mit der cDNA des humanen MPR 46	[43]
Ltk-ASA	Mausfibroblasten, defizient für die Thymidin Kinase, stabil transfiziert mit der cDNA der humanen ASA	[43]
SH-SY5Y	Humane Neuroblastoma-Zellen	Dr. D. Isbrand, ZMNH, Hamburg

3.1.13 Puffer, Medien und Lösungen

3.1.13.1 Medien zur Aufzucht von Bakterien und Hefen

Die verwendeten Puffer und Lösungen sowie die Medien für die Aufzucht von Bakterien und Hefen wurden, gemäß den Instruktionen der *Current Protocols in Molecular Biology (2000)*, *Harvard Medical School* angesetzt.

3.1.13.2 Zellkulturmedien

Dulbeccos (DMEM)	GIBCO/BRL, Eggenstein
Glutamax	GIBCO/BRL, Eggenstein
Fötale Kälberserum (FKS)	GIBCO/BRL, Eggenstein
PBS für Zellkultur	GIBCO/BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin (10.000 U)	Seromed/Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA-Lösung	GIBCO/BRL, Eggenstein

3.1.14 Antikörper

3.1.14.1 Primärantikörper

Antigen	Species	S/ mab	Referenz	Verdünnung			
				[¹²⁵ I]	IF	IPP	WB
Adaptin γ , Ratte	M	mab	Transduction Laboratories				1:5000
Adaptin α , Ratte	M	mab	Transduction Laboratories				1:5000
Annexin3, Human, Ratte	K	S	Prof. Dr. Gercke., Münster				1:1000
Aktin, Human, Ratte, Maus	Z	S	Santa Cruz Biotechnology				1:500
ASA, Human	K	S	[102]			1:500	
Cathepsin D, Maus	K	S	[103]			1:500	
GGA3, Human	K	S	[92]				1:500
MPR 46 (21-D3) Human, Luminale Domäne	M	mab	[32]	ca.300 cpm/ μ l			

Fortsetzung Primärantikörper

Antigen	Species	S/ mab	Referenz	Verdünnung			
				[¹²⁵ I]	IF	IPP	WB
MPR 46, Human, Luminale Domäne	K	S	[104]		1:50		
MPR 46, Human, Luminale Domäne	Z	S	[104]		1:50		
MPR 300, Human, Luminale Domäne	K	S	Aus Labor- beständen		1:50		
MyosinVII, Human	M	S	Prof. Dr. Wolfrum, Mainz		1:500		1:2000
Talin, Human, Ratte	Z	S	Santa Cruz Biotechnology		1:100		1:500
Tiam 1, Human, Ratte	K	S	Santa Cruz Biotechnology		1:100		1:500
Tubulin, Human, Ratte	M	mab	Santa Cruz Biotechnology		1:100		1:500

K: Kaninchen, M: Maus, Z: Ziege, mab: Monoklonaler Antikörper, S: Polyklonales Serum, IF: Immunfluoreszenz, IPP: Immunpräzipitation, WB: Westernblot

3.1.14.2 Sekundärantikörper

Kaninchen anti Ziege IgG, HRP-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Schaf anti Maus IgG, HRP-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Ziege anti Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Kaninchen anti Ziege IgG, FITC-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Phalloidin, Texas-Rot-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Schaf anti Maus IgG, Cy3-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Schaf anti Maus IgG, FITC-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Ziege anti Kaninchen IgG, Cy2-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Ziege anti Kaninchen IgG, Cy3-gekoppelt	Dianova, Hamburg

3.2 Methoden

Standardmethoden, die hier nicht ausführlich beschrieben werden, wurden gemäß den Instruktionen der *Current Protocols in Molecular Biology (2000), Harvard Medical School*, durchgeführt.

3.2.1 Molekulargentische Methoden

3.2.1.1 Methoden zur Arbeit mit Hefezellen

3.2.1.1.1 Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen

LiAc/TE-Puffer:	100 mM	LiAc
	10 mM	Tris/HCl pH 7,5
	1 mM	EDTA
PEG/LiAc/TE-Puffer:	40 %	Polyethylenglycol 3.350
	100 mM	LiAc
	10 mM	Tris/HCl pH 7,5
	10 mM	EDTA
TE-Puffer:	10 mM	Tris/HCl pH 7,5
	1 mM	EDTA
Träger-DNA:	10 mg/ml	Lachssperma-DNA, behandelt nach dem Protokoll von Schiestl & Gietz (1989)
SD/-W-Medium:	6,7 g/l	Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren
	0,62 g/l	DO-W-Zusatz
	2 %	Glucose
	ggf. 1 %	Agar
SD/-WL-Medium:	6,7 g/l	Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren

	0,62 g/l	DO-WL-Zusatz
	2 %	Glucose
	ggf. 1 %	Agar
SD/-HWL-Medium:	6,7 g/l	Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren
	0,62 g/l	DO-HWL-Zusatz
	2 %	Glucose
	ggf. 1 %	Agar
	5-20 mM	3-Aminotriazol

Zur Identifizierung von Bindungspartnern der cytoplasmatischen Domäne des MPR 46 wurde zuerst eine cDNA-Bank adulter Rattenhirne und anschließend eine adulte humane Gehirnbank im *yeast-two-hybrid*-System (*y2h*) durchsucht. Um eine möglichst hohe Transformationseffizienz zu erzielen, wurden die Hefezellen im ersten Schritt mit dem Sonden-Plasmid (cytoplasmatische Domäne des MPR 46 in pGBT9) und in einem zweiten Schritt mit dem Bank-Plasmid (im Vektor pACT2) transformiert.

6 ml YPD-Medium wurden mit einer Kolonie *S. cerevisiae* HF7c angeimpft und 14-17 h bei 30 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5 geschüttelt. Danach wurden 45 ml YPD-Medium mit der gesamten Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-0,9 kultiviert. Die Hefesuspension wurde 5 min bei 1.000 x g zentrifugiert und zweimal mit 50 ml LiAc/TE-Puffer gewaschen, wodurch die Zellen chemisch kompetent gemacht wurden (Ito et al., 1983). Das Pellet wurde in 2 ml LiAc/TE-Puffer resuspendiert. In einem Eppendorfgefäß wurden 1 µg Plasmid-DNA und 100 µg Lachssperma-DNA gemischt, 100 µl kompetente Hefezellen dazugegeben und mit 700 µl PEG/LiAc/TE Puffer vermengt. Dieser Ansatz wurde 45 min bei 30 °C und 220 rpm inkubiert, bevor ihm 88 µl DMSO hinzugefügt wurden, wonach die Zellen für 7 min einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen wurden. Nach rascher Abkühlung auf RT wurden die Hefezellen für 10 sec bei 14.000 rpm zentrifugiert und mit 1 ml TE-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl TE-Puffer resuspendiert. 100 µl und 200 µl wurden auf SD/-W-Agarplatten ausplattiert und für 72 h bei 30 °C inkubiert.

Fünfzehn ml SD/-W-Medium wurden mit einer transformierten Hefekolonie angeimpft und 24 h bei 30 °C 220 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 200 ml SD/-W-Medium mit der Vorkultur angeimpft und 24 h wie oben geschüttelt. Zuletzt wurden 800 ml YPD mit

den 200 ml Vorkultur angeimpft und bis zu einer $OD_{600} > 0,6$ geschüttelt. Die Hefesuspension wurde 15 min bei 1.000 x g zentrifugiert und 3 x mit 500 ml LiAc/TE-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Hefepellet in 20 ml LiAc/TE-Puffer aufgenommen. In einem Eppendorfgefäß wurden 300 µg Bank-Plasmide mit 20 mg Lachssperma-DNA vermischt und der Hefesuspension zugefügt, zusammen mit 140 ml PEG/LiAc/TE-Puffer. Dieser Ansatz wurde nach einer Inkubation von 40 min bei 30 °C mit 17,6 ml DMSO versetzt und für 7 min bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen. Die Hefezellen wurden 15 min bei 1.000 x g zentrifugiert, 2 x mit 200 ml TE-Puffer gewaschen und anschließend auf 4 x 250 ml YPD-Medium verteilt. Danach folgte eine Inkubation von 1 h bei 30 °C und 220 rpm. Anschließend wurden die Zellen geerntet, 10 min bei 1.000 x g pelletiert, 2 x mit 50 ml TE-Puffer gewaschen und zuletzt in 12 ml dieses Puffers resuspendiert. Je 200 µl der Suspension wurden auf SD/-HWL-Agarplatten (Ø 15 cm) ausgestrichen, die aufsteigende Konzentrationen an 3-Aminotriazol (3-AT) enthielten (5 mM, 10 mM, 15 mM und 20 mM) um primärpositive Transformanten mit beiden Plasmiden zu selektieren und deren Interaktionsstärke zu ermitteln. Um die Transformationseffizienz zu bestimmen, wurden 5 µl und 10 µl des Transformationsansatzes auf SD/-WL-Platten ausplattiert. Die Effizienz wurde nach folgender Formel bestimmt:

Kolonien/µg cDNA:

$$\frac{\text{Anzahl der Kolonien} \times \text{Gesamtvolumen } (\mu\text{l})}{\text{ausplattiertes Volumen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{cDNA } (\mu\text{g})}$$

Die Agarplatten wurden 4-6 Tage bei 30 °C inkubiert und die gewachsenen Kolonien anschließend einem β -Galactosidase-Test unterzogen.

3.2.1.1.2 Bestimmung von β -Galactosidase im Filtertest

Z-Puffer:	60 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
	40 mM	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
	10 mM	KCl
	1 mM	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
X-Gal-Stammlösung:	49 mM	5-Bromo-4-Chloro-Indolyl- β -D-Galactopyranosid in N,N-Dimethylformamid

X-Gal-Substratlösung:	100 ml	Z-Puffer
	1,67 ml	X-Gal-Stammlösung
	270 µl	β-Mercaptoethanol

Primärpositive Transformanten wurden im β-Galactosidase-Filtertest auf die Expression des lacZ-Reportergens hin untersucht. Dieses Gen katalysiert die Umsetzung des farblosen X-Gal in ein blaues Chlor-Indigo-Produkt. Die gewachsenen Transformanten-Kolonien wurden auf einen Whatman-Filter transferiert und für weitere 1-2 Tage auf neuen SD/-HWL-Agarplatten + 3-AT kultiviert. Die Filter wurden anschließend abgezogen, für 10 sec in flüssigen Stickstoff getaucht und bei RT wieder aufgetaut, um die Zellwände zu permeabilisieren. In einer Petrischale wurde ein Whatman-Filter in 1,5 ml X-Gal-Substratlösung getränkt, der aufgetaute Filter mit den Transformanten-Kolonien nach oben darauf gelegt und bei 30 °C inkubiert. Die Farbentwicklung wurde bis zu 24 h beobachtet. Positive Kolonien wurden von der ursprünglichen SD/-HWL-Agarplatte auf eine neue Agarplatte übertragen.

3.2.1.1.3 Plasmidisolierung aus Hefekulturen

Lysispuffer:	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA
	2 %	Triton-X 100
	1 %	SDS

Hefetransformanten wurden von SD/-HWL-Agarplatten gepickt, in 3 ml SD/-WL-Medium transferiert und für 48 h bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. 1,5 ml dieser Kulturen wurden in ein Eppendorfgefäß überführt, 1 min bei 14.000 rpm pelletiert und anschließend in 200 µl Lysispuffer resuspendiert. Diesem Ansatz wurden 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 300 µg säuregewaschene Glasperlen hinzugefügt. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch kräftiges Vortexen. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm wurde die wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die DNA erneut mit Chloroform extrahiert. Aus dem Überstand wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 3 M NaAc die DNA gefällt, bei 14.000 rpm pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in 20 µl A. bidest aufgenommen.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 DNA-Präzipitation mit Ethanol

Das Volumen der DNA-Lösung wurde bestimmt, die Konzentration auf 0,3 M NaAc eingestellt und mit 2 Volumen Ethanol versetzt. Die Präzipitation erfolgte 20 min bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die DNA wurde durch eine Zentrifugation für 10 min bei 14.000 rpm gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut 5 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend bei Raumtemperatur (RT) getrocknet.

3.2.2.2 DNA-Extraktion mit Phenol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol oder Chloroform

Die Extraktion von DNA mit Phenol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) oder Chloroform ist ein Standardmethode zur Entfernung von Proteinen aus Nucleinsäurepräparationen. Die zu extrahierende DNA-Lösung wurde mit einem Volumen der oben genannten Lösungen gemischt und 3 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die darin enthaltene DNA gefällt (3.2.2.1).

3.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

3.2.2.3.1 Photometrische Analyse

Die photometrische Messung von DNA erfolgte bei 260 nm in einer UV-Küvette gegen TE bzw. Aqua bidest. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA und 31 $\mu\text{g/ml}$ Oligonucleotiden.

3.2.2.3.2 Ethidiumbromid-Fluoreszenzmessung im Agarosegel

Diese Methode empfiehlt sich zur Konzentrationsbestimmung proteinhaltiger Lösungen. In einem 1 %-igen Agarosegel (0,5 μg Ethidiumbromid pro ml) wurde ein Aliquot der zu quantifizierenden DNA-Probe und in einer benachbarten Spur 400 ng einer λ -Phagen-DNA, die mit der Restriktionsendonuclease *Hind III* verdaut worden war, aufgetrennt. Die Fluoreszenzintensitäten der DNA-Probe und des Standards (die 2,3 kb Bande enthält 20 ng) wurden auf einem UV-Transilluminator verglichen und die DNA-Konzentration der Probe abgeschätzt.

3.2.2.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Restriktionsansatz:

DNA	10* Puffer (Hersteller)	Restriktions- endonuclease	ad A. bidest
x µg	2 µl	2*xU	20 µl

Für Restriktionsspaltungen wurden die vom Hersteller des Enzyms empfohlenen Reaktionsbedingungen beachtet.

3.2.2.5 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

3.2.2.5.1 Herstellung chemokompetenter Zellen

Die Erzeugung chemokompetenter Bakterien *E. coli* DH5α und *E. coli* BL21 wurde gemäß den Instruktionen der *Current Protocols in Molecular Biology (2000), Harvard Medical School* durchgeführt.

3.2.2.5.2 Transformation chemokompetenter Zellen

100 µl kompetenter Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 ng Vektor oder einem Teil des Ligationsansatzes gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 2 min bei 42 °C und weiteren 2 min auf Eis wurden 0,4 ml LB-Medium zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37 °C und 120 rpm geschüttelt. Ein Teil des Transformationsansatzes wurde auf eine LB-Agarplatte, die 100 µg/ml Ampicillin enthielt, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit den erhaltenen Kolonien wurden 5 ml LB-Medium, die ebenfalls 100 µg/ml Ampicillin enthielten, angeimpft. Diese Vorkultur wurde für die Präparation der Plasmide und zum Anlegen von Glycerolkulturen verwendet.

3.2.2.5.3 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Die Erzeugung elektrokompenter Bakterien *E. coli* HB 101 wurde gemäß den Instruktionen der *Current Protocols in Molecular Biology (2000), Harvard Medical School* durchgeführt.

3.2.2.5.4 Transformation elektrokompentener Zellen

Elektrokompente *E. coli* HB 101 wurden auf Eis aufgetaut. Pro Transformationsansatz wurden jeweils 40 μ l der elektrokompenten Zellen mit 1 μ l der aus Hefe isolierten Gesamtplasmid-DNA in einer gekühlten Elektroporationsküvette gemischt. Die Elektroporation der Zellen erfolgte bei einer Spannung von 2,5 kV, einer Kapazität von 25 μ F und dem Widerstand von max. 200 Ω , wobei die Impulsdauer 5 ms betrug. Nach einer einstündigen Inkubation der Bakterien in 0,8 ml SOC-Medium bei 37 °C wurden diese für 3 min bei 5.000 g pelletiert und einmal mit TE-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde in 100 μ l M9(-L)-Ampicillin-Medium aufgenommen, auf M9(-L)-Ampicillin-Agarschalen ausplattiert und für 48 h bei 37 °C inkubiert. Da *E. coli* HB 101 für Leucin auxotroph sind, konnten auf den Leucin-defizienten M9-Agarplatten nur Bakterien wachsen, die das pGAD10-Plasmid mit dem LEU2-Marker enthielten.

3.2.2.5.5 Anlegen einer Glycerol-Kultur

Vorkulturen mit einer OD₆₀₀ größer als 1 wurden mit 0,25 Volumen an 80 % Glycerol versetzt und bei -80 °C gelagert. Aus einer Glycerolkultur kann direkt eine Vorkultur angeimpft werden.

3.2.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

3.2.2.6.1 Schnelle Isolierung kleiner Mengen

Puffer P1	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	10 mM	EDTA
Puffer P2	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS
Puffer P3	3 M	NaAc pH 4,8

Zur Isolierung kleiner DNA-Mengen wurde das Verfahren nach Birnboim und Doly [105] angewandt.

3 ml LB/Ampicillin (100 μ g/ml)-Medium wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 1 min bei

14.000 rpm wurde der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 0,3 ml Puffer P1 resuspendiert, durch Zugabe von 0,3 ml Puffer P2 aufgeschlossen und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 0,3 ml Puffer P3 renaturiert. Die denaturierten Proteine wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 14.000 rpm sedimentiert. Der DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß transferiert und mit 0,66 ml 2-Propanol bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert, das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und in 30 µl TE-Puffer bzw. Wasser aufgenommen.

Alternativ wurde die DNA mit Hilfe des Qiaprep Spin Plasmid Kits (Qiagen) aus einer Bakteriensuspension von 1,5 ml, die über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert worden war, gewonnen. Dabei wurden die mitgelieferten Puffer verwendet und die Angaben des Herstellers berücksichtigt. Die isolierte DNA wurde in TE-Puffer bzw. Wasser gelöst und bei –20 °C gelagert.

3.2.2.6.2 Isolierung größerer Mengen

Größere Mengen bakterielle DNA wurden mittels des Plasmid-Midi-Kits (Qiagen) gewonnen, wobei die mitgelieferten Puffer verwendet und die Angaben des Herstellers befolgt wurden. Die DNA wurde in TE-Puffer bzw. Wasser gelöst und bei –20 °C gelagert.

3.2.2.7 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden 1-2 % (w/v) Agarosegele verwendet. Die erforderliche Agarosemenge wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, pH 8,0; 2mM EDTA) aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 55 °C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Die Proben wurden mit Ficoll-Marker (0,05 % Bromphenolblau; 0,05 % Xylencyanol; 15 Ficoll) versehen und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 3-4 V/cm durchgeführt. Durch das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht als Bande sichtbar. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel auf dem UV-Transilluminator mit einem Videosystem aufgenommen und ein Ausdruck des Bildes erstellt.

3.2.2.8 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

DNA wurde mit Hilfe des Qiaquick-Spin-Gel-Extraction Kits der Firma Qiagen nach Anweisung des Herstellers aus Agarose oder Lösungen extrahiert. Gleichzeitig wurde hierbei die DNA konzentriert.

3.2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Methode, um definierte DNA-Fragmente zu amplifizieren. Grundlage für diese Technik ist die Entdeckung und Isolierung einer thermostabilen DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (*Taq*) von Saiki et al. [106].

Die PCR basiert auf drei Schritten, die für jede DNA-Synthese nötig sind:

- Denaturierung der Ausgangs-DNA (Template) in Einzelstränge
- Bindung von Oligonucleotid-Primern an beide Einzelstränge (Annealing)
- Synthese der DNA ausgehend von den gebundenen Primern (Extension)

Durch die Verwendung der *Taq*-Polymerase können mehrere Zyklen dieser Schritte durchlaufen werden, da dieses Enzym auch die extremen Denaturierungstemperaturen von 96 °C ohne Aktivitätsverlust übersteht. Das gewünschte Fragment wird exponentiell amplifiziert, da neu synthetisierte DNA-Fragmente im nächsten Zyklus als Template verwendet werden. Faktoren, die den Erfolg der PCR beeinflussen können, sind die Auswahl und Konzentration der Oligonucleotid-Primer, die Qualität des Templates, die Pufferbedingungen und die Zeiten und Temperaturen der Zyklusschritte.

Als Template wurde DNA verwendet, die mittels der DNA-Präparations-Kits der Firma Qiagen isoliert worden war. Das dNTP-Set wurde auf 10 mM je Nucleotid verdünnt. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Thermocycler.

Folgendes PCR-Protokoll erwies sich als zuverlässig:

DNA-Template	Primer 3' und 5' (50 pmol/μl)	dNTP (10 mM je Nucleotid)	10 x PCR-Puffer	<i>Taq</i> - Polymerase (5U/μl)	ad H ₂ O
1 ng	je 0,7 μl	4 μl	2 μl	0,5 μl	20 μl

Bei jeder PCR wurden zwei Kontrollen mitgeführt. Es wurde jeweils eine Probe ohne DNA-Template und eine ohne Oligonucleotid-Primer angesetzt.

PCR-Programm für den Thermocycler:

Denaturierung	Annealing	Extension
1' 94 °C	15'' 56 °C	1' 72 °C

Es wurden 30 Zyklen durchgeführt.

Nach erfolgter PCR wurde die amplifizierte DNA auf 4 °C abgekühlt.

3.2.2.10 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Doppelstrang-DNA wurde im zentralen Servicelabor der Universitätsklinik Eppendorf durchgeführt. Es wurde die *Taq*-Cycle-Sequencing Methode des Herstellers (Applied Biosystem) angewandt, die auf der Methode nach Sanger et al. [107] beruht. Statt radioaktiv markierter wurden jedoch fluorochrom gekoppelte DidesoxyNucleotide eingesetzt. Dazu wurde das ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction-Produkt der Firma Perkin Elmer verwendet.

Die Sequenzierreaktion wurde wie folgt durchgeführt:

DNA	Premix	Primer	ad H ₂ O
1 µg	8 µl	5 pmol	20 µl

Zur Sequenzierung wurden folgende Oligonucleotide als Primer eingesetzt:

Bezeichnung	Leserichtung	Sequenz, angegeben in Richtung 5'→3'
PB6	5'→3'	TAC CAC TAC AAT GGA TG
PB7	3'→5'	GTT GAA GTG AAC TTG CGG CG
DBD	5'→3'	TCA TCG GAA GAG AGT AG

Es wurden 25 Reaktionszyklen in einem Thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf) durchgeführt, wobei folgendes Protokoll befolgt wurde:

Denaturierung	Annealing	Extension
10'' 96 °C	5'' 50 °C	4' 60 °C

Nach Abschluß der Reaktion wurde die Probe auf 4 °C abgekühlt. Die DNA wurde gefällt, pelletiert und gewaschen (3.2.2.1).

3.2.3 Zellbiologische Methoden

3.2.3.1 Kultivierung von Zelllinien

Immortalisierte Zellen wurden in DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C, 85 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert.

3.2.3.2 Trypsinieren von Zellen

Der Zellrasen wurde mit PBS gespült, um Trypsininhibitoren des FKS zu entfernen. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen mit 0,5 ml Trypsin (0,05 % w/v)/EDTA(0,02 % w/v) pro 25 cm²- Flasche für 2-5 min bei 37 °C inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von FKS-haltigem Mediums gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit einer Pipette vereinzelt und in der gewünschten Dichte ausgesät.

3.2.3.3 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse

Lösungen:	10 mM	PBS
	3 %	Paraformaldehyd (PFA) in PBS (w/v)
	0,1 mg/ml	Poly-L-Lysin in PBS
	50 mM	NH ₄ Cl in PBS
	0,5 %	Saponin in PBS

Sterile Deckgläschen wurden in eine 35 mm Gewebekulturschalen ausgesät und mit 200 µl Poly-L-Lysin für 1 h bei 37 °C beschichtet. Anschließend wurden die Deckgläschen 3 x mit PBS gespült.

Circa 500-1.000 Zellen wurden auf den beschichteten Deckgläschen über Nacht gezüchtet. Die Zellen wurden 3 x mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml 3 % PFA für 40 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen und für mindestens 10 min mit 2 ml NH₄Cl bei RT inkubiert, um überschüssiges Aldehyd zu entfernen. Durch 3 x Waschen mit PBS wurde die NH₄Cl-Lösung entfernt. Anschließend wurden die Zellen durch 3 x 5 min Saponin/PBS permeabilisiert. Da es sich bei der Permeabilisierung mit Saponin um einen reversiblen Prozeß handelt, wurden alle nachfolgenden Schritte ebenfalls in Saponin/PBS durchgeführt.

Die Deckgläschen, mit den Zellen nach oben, wurden auf einen Streifen Parafilm gelegt und 50 µl der Antikörperverdünnung als Tropfen darauf pipettiert. Eine mit feuchtem Filterpapier ausgekleidete Petrischale wurde als Verdunstungsschutz darüber gelegt. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte für 2 h bei RT. Im Anschluß daran wurden die Zellen dreimal 5 min mit 1 ml PBS-Saponin gewaschen. Die Bindung der Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte, wie für den Primärantikörper beschrieben, für 1 h bei RT unter Lichtausschluß. Danach wurden die Deckgläschen 3 x mit Saponin/PBS und dreimal mit A. bidest. gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Glycerol-Gelatine (Sigma) eingebettet und bei 4 °C gelagert.

Für Colokalisations-Studien wurden die Zellen simultan mit den jeweiligen Primärantikörpern, die in unterschiedlichen Spezies generiert worden waren, inkubiert. Durch geeignete Wahl der Sekundärantikörper konnten diese spezifisch dargestellt werden.

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 der Firma Zeiss, Oberkochen .

3.2.3.4 Metabolische Markierung von Zellen mit [³⁵S]-Methionin

Hungermedium:	DMEM ohne Methionin/ 0,1 % BSA
Pulse-Medium:	DMEM ohne Methionin/ 0,1 % BSA 60-80 µCi/ml [³⁵ S]-Methionin
Chase-Medium:	DMEM/ 0,1 % BSA/ ± Latrunculin A (5 µM) Mannose-6-Phospat-Natriumsalz (10 mM)

Konfluenten Zellen in einer 35 mm Gewebeplatte wurden mit PBS gewaschen und mit 700 μ l Hungermedium für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 700 μ l Pulse-Medium für 1 h bei 37 °C inkubiert und danach entweder sofort abgeerntet oder für weitere 6 h bei 37 °C einem Chase in An- und Abwesenheit von Latrunculin A (5 μ M) unterzogen. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen und abgeschabt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1.000 x g wurde das Pellet in Lysispuffer (3.2.3.5) resuspendiert. Vor und nach der Markierung der Zellen wurden die Radioaktivität im Medium und die proteingebundene Radioaktivität durch Flüssigkeitsszintillationszählung und Trichloressigsäure-Fällung bestimmt. Die Homogenate wurden zur Immunpräzipitation eingesetzt.

3.2.3.5 Immunpräzipitation von Cathepsin D und ASA

Lysispuffer

1 Teil Puffer A	50 mM	Tris/HCl, pH 7,0
	150 mM	NaCl
0,8 Teile Puffer B	0,2 %	SDS
	10 %	BSA
Protease-Inhibitoren	1 mM	EDTA in A. bidest.
	1 mM	PMSF in DMSO
	1 mM	JAA in A. bidest.
Neufeld-Puffer	10 mM	Tris/HCl, pH 8,5
	600 mM	NaCl
	0,1 %	SDS
	0,05 %	NP-40
Immunomix IMM	1 %	TX-100
	0,5	% Na-Desoxycholat in PBS

Material und Methoden

IMM/2 M KCl	1 %	TX-100
	0,5	% Na-Desoxycholat in PBS
	2 M	KCl

0,1 x PBS	15 mM	NaCl
	12 mM	KCl
	0,1 mM	Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,4

Pansorbin *Staphylococcus aureus*-Suspension

Pansorbin, gewaschen *Staphylococcus aureus*-Suspension, gewaschen nach dem
Protokoll von Lemansky et al. 1985

Das Medium der metabolisch mit [³⁵S]-Methionin markierten Zellen wurde abgenommen und für 5 min bei 1.000 x g zentrifugiert, um nicht adhärente Zellen zu sedimentieren. Der Überstand (700 µl) wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 560 µl Puffer B versetzt. Die Zellen wurden 3 x mit kaltem PBS auf Eis gewaschen, in PBS abgeschabt, für 5 min bei 1.000 x g pelletiert und anschließend in 1 ml Lysispuffer aufgenommen. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, um nicht solubilisierte Membran abzutrennen. Mit 2 µl des Zellüberstandes und 10 µl des Mediumüberstandes wurde eine TCA-Fällung durchgeführt. Die Überstände wurden mit 1 µl Präimmenserum und 40 µl Pansorbin versetzt und 1 h auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 2 min bei 14.000 rpm wurden die Überstände in neue Gefäße überführt und erneut zentrifugiert, um Reste an Pansorbin zu entfernen. Die Überstände wurden mit Anti-Cathepsin D-Antiserum (1:500) bzw. Anti-ASA-Antiserum (1:500) versehen und über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl gewaschenem Pansorbin und einer Inkubation für 1 h bei 4 °C auf dem Drehrad wurden die Immunkomplexe durch Zentrifugation für 2 min bei 14.000 rpm sedimentiert. Die Pansorbinpellets wurden nacheinander mit jeweils 1 ml Neufeld-Puffer, IMM, IMM/2 M KCl und 3 x 0,1 fach PBS gewaschen. Bei jedem Waschschrift wurden die Pellets resuspendiert, 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und die Überstände verworfen. Zuletzt wurden die Pellets in 60 µl A. reduzierendem Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95 °C

gekocht und 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurde durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert.

3.2.3.6 Endocytose des jodierten MPR 46 Antikörpers 21-D3

Saurer Waschpuffer: 0,5 M NaCl
 0,2 M HAc, pH 2,5

Um den Einfluß der Aktin-depolymerisierenden Droge Latrunculin A (Lat. A) auf die Zirkulation des MPR 46 über die Zelloberfläche zu untersuchen, wurden konfluente BHK MPR 46- bzw. SH-SY5Y-Zellen auf 35 mm Zellkulturschalen in An- und Abwesenheit von Lat. A (5 µM) mit [¹²⁵I]-21-D3 inkubiert. 21-D3 ist ein monoklonaler Antikörper gegen die luminale Domäne des humanen MPR 46 und kann demzufolge an der Plasmamembran internalisiert werden.

Die Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen und anschließend mit 700 µl DMEM/0,05 % BSA ± Lat. A (5 µM) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach 2 x Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 700 µl DMEM/0,05 % BSA ± Lat. A (5 µM), das ca. 200.000 cpm [¹²⁵I]-21-D3 enthielt, für 3 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen, die Zellen 5 x mit kaltem PBS auf Eis gewaschen und anschließend oberflächengebundene Antikörper durch zwei saure Waschschrte von 5 min entfernt. Nach einem weiteren Waschschrte mit PBS wurden die Zellen in 1 ml PBS abgeschabt und die zellassoziierte Radioaktivität im γ-Counter gezählt. Der Proteingehalt des Zellextraktes wurde bestimmt (3.2.4.1). Die Zellen wurde zentrifugiert und unter nicht reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

3.2.3.7 Endocytose der jodierten Arylsulfatase A

Medium für

Vorinkubation: DMEM
 0,05 % BSA
 5 µM ± Latrunculin A

Medium für		
Endocytose:		DMEM
	0.05 %	BSA
	5 µM	± Latrunculin A
	ca.300	
	cpm/µl	[¹²⁵ I]-ASA
	10 mM	± Mannose-6-Phosphat-Natriumsalz
Waschpuffer:	10 mM	PBS
	2 mM	Mannose-6-Phosphat-Bariumsalz

Um die Spezifität des Effektes von Lat. A auf internalisierte Rezeptoren zu untersuchen, wurde die Aufnahme des ¹²⁵I-markierten lysosomalen Enzyms Arylsulfatase A (ASA) unter gleichen Bedingungen wie für die [¹²⁵I]-21-D3 Endocytose gemessen. Da der MPR-46 keine M6P-haltigen Liganden internalisiert [108], wird die M6P-abhängige Aufnahme der ASA ausschließlich von dem MPR 300 vermittelt. Nach Vorinkubation der Zellen in An- und Abwesenheit von Lat. A (5 µM) wurde den Zellen Medium ± Lat. A angeboten, das ca. 200.000 cpm [¹²⁵I]-ASA enthielt. Die Endocytosezeit betrug 3 h bei 37 °C in An- und Abwesenheit des kompetitiven Inhibitors M6P-Natriumsalz (10 mM). Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen 5 x mit kaltem PBS auf Eis gewaschen und oberflächengebundene ASA durch 2 Waschschrte mit M6P-Bariumsalz (2 mM) für 5 min entfernt. Die weitere Analyse erfolgte wie unter (3.2.3.6) beschrieben.

3.2.4 Biochemische Methoden

3.2.4.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden in Doppelbestimmungen nach dem Protokoll von Lowry et al. (1951) ermittelt.

3.2.4.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach dem Protokoll von Laemmli [109] durchgeführt.

3.2.4.3 Färbung von Proteinen

3.2.4.3.1 Anfärbung mit Coomassie-Blue

Die Anfärbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Blue (0,05 %) wurde gemäß den Anleitungen der *Current Protocols in Molecular Biology (2000), Harvard Medical School* durchgeführt.

3.2.4.3.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung von Proteinen in Gelen erfolgte nach dem Protokoll von Blum et al. (1989).

3.2.4.3.3 Imprägnierung von Polyacrylamid-Gelen für die Fluorographie

Bei der Imprägnierung von Polyacrylamid-Gelen mit PPO (Diphenyloxazol in DMSO) zwecks Signalverstärkung wurde das Protokoll von Bonney und Laskey (1974) befolgt.

3.2.4.4 Westernblot Analyse

Blockpuffer:	10 mM	PBS
	3 %	BSA
	0,1 %	Tween 20

Waschpuffer:	10 mM	PBS
	0,1 %	Tween 20

Zur spezifischen Detektion und Semi-Quantifizierung von Proteinen wurden Westernblot-Analysen durchgeführt.

Der Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulose geht auf Towbin et al. (1979) zurück und wurde für 90 min bei 900 mA in einer Elektrobplot-Apparatur durchgeführt. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrocellulose über Nacht bei 4 °C in Blockpuffer inkubiert. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte für 2 h bei RT. Danach wurde die Nitrocellulose 3 x 5 min mit Waschpuffer gewaschen und für 1 h bei RT mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen

erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper mit Hilfe der enhanced chemoluminescent (ECL) -Methode (SuperSignal, Pierce Rockford, IL, USA).

3.2.4.5 TCA-Fällung radioaktiv markierter Proteine

Zur Bestimmung der Einbaurate von ³⁵S-Methionin in zelluläre Proteine wurden 2 µl Zellysat (von 1 ml) bzw. 10 µl Medium (von 700 µl) auf ein 1 cm² Whatman Filterpapier (3MM) als Doppelwert aufgetragen und getrocknet. Der Filter wurde zuerst für 5 min in eiskalte 10 %-ige TCA und anschließend für 5 min in kochende 5 %-ige TCA gelegt. Danach wurde der Filter in eiskalter 5 %-iger TCA und in Ether/Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die Filter wurden mit 2 ml Szintillationscocktail (Firma Roth) versetzt und die Radioaktivität im Szintillationszähler (1470 Wizard™, Wallac, Finnland) ermittelt.

3.2.4.6 Sequenzierung von Proteinen

Die Sequenzierung von Proteinen durch Edman-Abbau erfolgte kommerziell und wurde von der Sequenzierstelle der Universitätsklinik Eppendorf durchgeführt.

3.2.4.7 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen

Die massenspektrometrische Analyse von Proteinen erfolgte kommerziell und wurde von der Firma Megamedics in 22880 Wedel durchgeführt.

3.2.4.8 Expression und Aufreinigung von *Glutathion-S-Transferase*-Fusionsproteinen

IPTG-Stammlösung	100 mM	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid in A. bidest.
Lysispuffer:	10 mM	PBS
	25 %	Saccharose
	1 %	Triton X-100
	1 mg/ml	Lysozym
	1 mM	EDTA
	1 mM	PMSF

Waschpuffer: 10 mM PBS
 1 % Triton X-100
 1 mM PMSF

Glutathion- 41 mg Glutathion-Agarose wurden in 10 ml PBS
Agarose: suspendiert und nach einer Quellzeit von 2 h zweimal mit
 PBS gewaschen. Zuletzt wurden dem Ansatz 500 µl PBS
 hinzugefügt, um 1 ml einer 50 % (v/v) Glutathion-
 Agarose-Matrix zu erhalten.

Dialysepuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5
 150 mM NaCl
 0,1 % Triton X-100

100 ml LB-Ampicillin (100 µg/ml) Medium wurden mit einer Einzelkolonie von *E. coli* BL-21-Bakterien, transformiert mit dem pGEX 4T-1-Plasmid oder den Konstrukten pGEX 4T-1[MPR 46-CD] und pGEX 4T-1[MPR46-CD-Y⁴⁵,V⁴⁸→A], angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt; 900 ml LB/Ampicillin (100 µg/ml) Medium wurden 1:100 mit der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 geschüttelt. Nach Zugabe von 1 ml IPTG-Stammlösung (Endkonzentration 0,1 mM IPTG) und Inkubation für 4 h bei 37 °C und 220 rpm wurden die Bakterien in JA-10 Zentrifugenbecher überführt und für 10 min bei 5.000 x g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 40 ml Lysispuffer resuspendiert und für 30 min bei 4 °C auf dem Magnetrührer inkubiert. Die Zellyse wurde durch eine Ultraschallbehandlung von 3 x 10 sec auf Eis komplettiert. Nach Inkubation des Bakterienlysates mit DNase I (0,1 mg/ml) für 20 min bei 4 °C wurde dieses bei 10.000 x g für 10 min zentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde mit 1 ml 50 % Glutathion-Agarose für 1 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert und anschließend für 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Danach wurde die Glutathion-Agarose-Suspension mit 3 x 20 ml Waschpuffer gewaschen.

3.2.4.9 **Aufbereitung des Rattenhirns für Affinitätschromatographie**

Homogenisierungspuffer:

10 mM	PBS
2 mM	EDTA
1 x	Protease-Inhibitor-Cocktail

Waschpuffer:

10 mM	PBS
1 %	Triton X-100
1 mM	PMSF

Aus 2-3 Hirnen adulter Ratten (zw. 3-4,5 g), gelagert bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, wurde ein 30 % iges Homogenat in Homogenisierungspuffer mit Hilfe eines elektrischen Homogenisators (Typ Tissue Tearor Model 985-370, Biospec Products) gewonnen und anschließend für 1 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 45.000 x g zentrifugiert. Die durchschnittliche Proteinkonzentration des Überstandes lag zwischen $11-12\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Der Überstand wurde zuerst mit 1 ml 50 % (v/v) GST-Glutathion-Agarose (3.2.4.8) in einer 10 ml Säule (Mobitec, Göttingen) für 2 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf dem Drehrad inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Die nicht an die GST-Agarose gebundene Cytosolfraktion wurde anschließend in einer 10 ml Säule mit 1 ml 50 % (v/v) GST-MPR 46-CD-Glutathion-Agarose (3.2.4.8) für 2-3 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf dem Drehrad inkubiert. Nach Öffnen der Säule wurde die Durchlaufraction des Hirncytosols gesammelt und die Säule mit 50 ml Waschpuffer gewaschen. Um die Effizienz des Waschens zu beurteilen, wurde ein Aliquot des letzten ml Waschpuffers in der SDS-PAGE aufgetrennt und eventuell ausgewaschene Proteine mit Coomassie-Blau oder Silber angefärbt. Die Elution der Säule erfolgte, wie angegeben, entweder mit jeweils 1 ml diskontinuierlich ansteigenden NaCl-Konzentrationen (250 mM, 500 mM, 750 mM und 1 M) oder in einem Schritt mit 5-10 x 1 ml 1 M NaCl. Die Eluate wurden gegen 1mM PBS dialysiert (Roth, Porengröße 3,5 kDa). Um unspezifische Bindungen an die Membran der Dialyseschläuche zu vermeiden, wurden diese für 1 h in 1 M Glycin inkubiert mit A. bidest gewaschen. Anschließend wurden die Eluate lyophilisiert und in 1/10 des Volumens A. bidest aufgenommen. Aliquots der Säulen-Matrices, Eluate und Durchlaufractionen der GST- und GST-MPR 46-CD-Säulen sowie der gesammelte

Waschpuffer wurden anschließend durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen, Coomassie-Blau- oder Silberfärbung und Westernblot analysiert.

3.2.4.10 Copräzipitation von cytosolischen Proteinen mit GST-MPR 46-CD

Bindungspuffer:	50 mM	HEPES pH 7,4
	150 mM	NaCl
	10 mM	MgCl ₂
	1 mM	EGTA
	10 %	Glycerin
	1 %	Triton X-100
	0,1 %	BSA
	1 x	Protease-Inhibitor-Cocktail

Waschpuffer	50 mM	HEPES pH 7,4
	150 mM	NaCl
	10 mM	MgCl ₂
	1 mM	EGTA
	10 %	Glycerin
	1 %	Triton X-100
	1 x	Protease-Inhibitor-Cocktail

Rattenhirn-Cytosol wurde, wie unter (3.2.4.9) beschrieben, präpariert. 25 µl einer 50 % igen Glutathion-Agarose-Matrix, gekoppelt an GST bzw. GST-Fusionsproteine, wurden mit Rattenhirn-Cytosol (1 mg Protein) in 250 µl Bindungspuffer über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert und anschließend für 1 min bei 500 x g zentrifugiert. Die Glutathion-Agarose-Matrix wurde 3 x mit 1 ml Waschpuffer gewaschen und zentrifugiert. Zuletzt wurde die Matrix in reduzierendem Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95 °C gekocht und 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden für eine SDS-PAGE und anschließende Westernblots verwendet. Die Copräzipitation von Aktin und Tubulin mit GST- bzw. GST-MPR 46-CD erfolgte in Abwesenheit von MgCl₂ in Bindungs- und Waschpuffer.

4 ERGEBNISSE

4.1 Suche nach cytoplasmatischen Bindungspartnern für den MPR 46 im *yeast-two-hybrid*-System

Um neue Proteine zu identifizieren, die mit der cytoplasmatischen Domäne des MPR 46 interagieren, wurden cDNA-Banken aus humanem und Rattenhirn mit Hilfe des *yeast-two-hybrid*-Systems (*y2h*) durchsucht.

Das *y2h*-System ist ein genetischer Test zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in einem Hefesystem und wurde von Fields und Song entwickelt [110]. Das System kann zur Identifizierung neuer potentieller Bindungspartner eines bekannten Proteins (hier: MPR 46-CD) oder zur Charakterisierung bekannter Protein-Protein-Wechselwirkungen dienen (z.B. MPR 46-CD und die $\mu 2$ Untereinheit der AP-2 Adaptors). Ein wesentlicher Vorteil dieses Assays gegenüber biochemischen Methoden zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen besteht in seiner Empfindlichkeit und der sofortigen Verfügbarkeit der cDNA des interagierenden Proteins.

Das *y2h*-System basiert auf der modularen Struktur der Hefe-*Gal4*-Transkriptionsfaktors, der aus einer N-terminalen DNA-Bindungsdomäne (BD) und einer C-terminalen Aktivierungsdomäne (AD) zusammengesetzt ist [111]. Hierbei bindet die BD an die *Upstream Activating Sequence* (UAS) des Promotors, während die AD die Transkription der Reportergene *Gall* und *Gal10* aktiviert. Beide Domänen allein sind inaktiv, jedoch reicht die nicht-kovalente Bindung, die durch die Interaktion der zu untersuchenden AD- und BD-Fusionsproteine erfolgt aus, um einen funktionsfähigen Transkriptionsfaktor zu bilden.

Im *y2h*-System werden Hefestämme verwendet, bei denen die endogenen *Gal4*- und *Gal80*-Gene durch Deletion inaktiviert sind. Durch Deletion der TRP1-, LEU2- und HIS3-Gene resultiert ein Trp-, Leu- und His-auxotropher Phänotyp, der durch Selektionsmarker, die sich auf den Vektoren befinden, komplementiert werden kann. Die meisten Wirtsstämme enthalten das Hefe *HIS3*- und das *E. coli lacZ*-Reportergen, deren Transkription unter der Kontrolle des *Gall*-Promotors steht.

4.1.1 Untersuchung einer Rattenhirn cDNA-Bank

Die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 ist in allen bisher klonierten Spezies zu 100 % konserviert und konnte deshalb auch als Sonde für die Rattenhirn-cDNA-Bank eingesetzt werden.

Die 201 bp lange cDNA, die für die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 codiert, wurde über eingefügte *Bam*HI-Schnittstellen in den Hefe-Expressionsvektor pAS2 kloniert, [47] der die Expression eines Fusionsproteins induziert, das aus der N-terminal lokalisierten DNA-Bindungsdomäne des Hefe *Gal4*-Transkriptionsfaktors (*Gal4*-BD; aa 1-147) und der C-terminal lokalisierten MPR 46-CD zusammengesetzt ist. Die Korrektheit des inserierten Fragments und die Beibehaltung des Leserasters wurde durch DNA-Sequenzanalysen bestätigt.

Die cDNA-Bank aus Gehirnen 10-12 Wochen alter adulter Ratten (Clontech) wurde sowohl mit Hilfe statistisch zusammengesetzter Oligonucleotide als auch von Oligo(dT)-Nucleotiden synthetisiert. Sie enthält ungefähr 2×10^6 unabhängige Klone mit einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 1,7 kb, die ungerichtet über eingefügte *Eco*RI-Restriktionsschnittstellen in den Vektor pGAD10, der auch die Sequenz für die Aktivierungsdomäne (AD) beinhaltet, inkloniert sind. Der AD-Vektor induziert im Hefewirtstamm die Expression eines Fusionsproteins, das aus der N-terminal lokalisierten *Gal4*-Aktivierungsdomäne (*Gal4*-AD; aa 768-881) und dem C-terminal gelegenen Protein der cDNA-Bank zusammengesetzt ist.

Hefezellen des Reporterstammes *S. cerevisiae* HF7c wurden zunächst mit pAS2[MPR 46-CD] und anschließend mit pGAD[cDNA-Bank] sequentiell kotransformiert und auf SD/-HWL Agarschalen ausplattiert. Da der *HIS3*-Promotor im Hefestamm HF7c eine niedrige Expression des His3p-Proteins, selbst in Abwesenheit einer Protein-Protein-Interaktion zwischen den Fusionsproteinen, induziert, wurde den SD/-HWL-Agarplatten der kompetitive Inhibitor 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) in einer Konzentration von 5 mM hinzugefügt. Nach der Kotransformation von 300 µg pGAD[cDNA-Bank] wurden ca. 3×10^5 Klone erhalten. Die auf den SD/-HWL-Platten gewachsenen Klone wurden einem β -Galactosidase-Filtertest unterzogen. Es wurden 789 primärpositive Klone identifiziert. Von den 21 am stärksten interagierenden Klonen (als Auswahlkriterien galten Größe der Kolonie und Intensität der Blaufärbung) wurde die Gesamtplasmid-DNA isoliert und zwecks Amplifikation durch Elektroporation in den *E. coli* Stamm HB101 transformiert.

Die transformierten Bakterien wurden auf Leucin-defizienten M9-Agarplatten kultiviert. Das Hefegen *leu2* auf dem Vektor pGAD10 kann den *leuB*-Defekt der auxotrophen *E. coli* HB101 Bakterien komplementieren. Somit konnten auf den M9-Platten nur die Bakterienkolonien wachsen, die das pGAD10-Plasmid mit dem cDNA-Insert enthielten. Die isolierten AD-Plasmide wurden auf ihre Spezifität der Wechselwirkung mit der MPR 46-CD sowie dem Ausschluß einer autonomen Aktivierung des *HIS3*-Reportergens durch das AD-Plasmid hin analysiert. Zu diesem Zweck wurde der Hefestamm HF7c mit den jeweiligen AD-Plasmiden und folgenden Konstrukten kotransformiert [112]:

Tab. 3 Spezifität der Wechselwirkung der isolierten AD-Plasmide mit verschiedenen BD-Konstrukten.

AD-Plasmid	BD-Plasmid	Selektions- medium	Wachstum	β - Galactosidase
+	∅	SD/-L	-	-
+	pAS2	SD/-HWL	-	-
+	pLamin C	SD/-HWL	-	-
+	pAS2[MPR 46-CD]	SD/-HWL	+	+

Bei alleiniger Transformation der Hefezellen mit den 21 primärpositiven AD-Plasmiden wurde, bei fehlender β -Galactosidase-Expression der transformierten Hefezellen, eine autonome Aktivierung des *lacZ*-Reportergens durch das AD-Fusionsprotein bei allen 21 primärpositiven Klonen ausgeschlossen. Bei Kotransformationen der jeweiligen AD-Plasmide mit den BD-Konstrukten pAS2 konnte durch Selektion auf Histidin-freiem Nährmedium ausgeschlossen werden, daß die Wechselwirkung der 21 AD-Fusionsproteine mit der MPR 46-CD aufgrund der Bindung an die Gal4-BD erfolgte. Bei Kotransformation der AD-Plasmide mit dem BD-Konstrukt pLamin C war kein Wachstum auf Histidin-freiem Nährmedium festzustellen. Dadurch konnte eine unspezifische Wechselwirkung zwischen der MPR 46-CD und dem AD-Fusionsprotein ausgeschlossen werden, da Lamin C, ein Protein der Kernlamina, eine Reihe unspezifischer Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eingeht. Durch die Kotransformation des pAS2[MPR 46-CD]-Konstruktes mit den 21 primärpositiven AD-Plasmiden wurden die gefundenen Wechselwirkungen bestätigt.

Nach Restriktionsspaltung der 21 positiven AD-Plasmide konnten im Agarosegel identische Klone anhand des Restriktionsfragmentmusters identifiziert werden. Die Klone unterschiedlicher Länge (zwischen 2 und 0,4 bp) sind in Abb. 1 dargestellt.

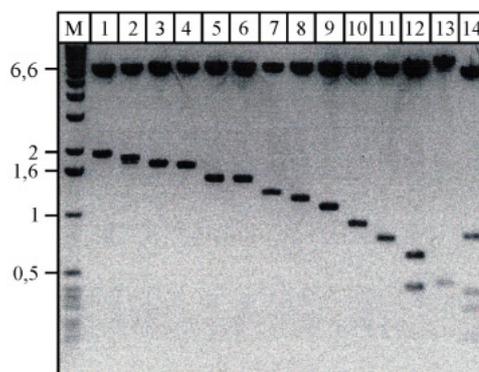


Abb. 1: Darstellung der unterschiedlichen positiven AD-Plasmide.

Eine adulte Rattenhirn-Bank wurde mit pAS2[MPR 46-CD] als Sonde nach potentiellen Bindungspartnern für die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 durchsucht. Von 789 gefundenen Klonen wurden 21 in einem β -Galactosidase-Assay positiv getestet. Nach einer Restriktionsspaltung wurden identische Klone bestimmt und ein Vertreter der jeweiligen Gruppen in einem Agarosegel (1 %) aufgetrennt. M=1 kb Marker.

Zur weiteren Charakterisierung der cDNA-Fragmente wurden alle 21 primärpositiven Klone einer Sequenzanalyse unterzogen. Dabei konnte festgestellt werden, daß in 18 der 21 sequenzierten Klone ein frühzeitiges Stopcodon vorzufinden war, weswegen diese Klone verworfen wurden. Die Sequenzanalyse der verbliebenen drei Klone ergab Homologien zu Proteinen (Pancreatic Elastase II, Vascular Endothelial Growth Factor-A144 und Mitochondrial Cytochrome Oxidase SU I, II, III), die wegen ihrer Lokalisation in der Zelle als potentielle Bindungspartner für die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 nicht weiter in Betracht gezogen wurden.

4.1.2 Untersuchung einer humanen Hirn-cDNA-Bank

Die 201 bp lange cDNA, die für die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 codiert, wurde über eingefügte *EcoRI*-Schnittstellen in den Hefe-Expressionsvektor pGBT9 kloniert. Der pGBT9-Vektor enthält, im Gegensatz zu dem pAS2-Vektor, keine sog. Spacersequenz zwischen der Gal4-BD und der einklonierten cDNA der MPR 46-CD. Da diese Sequenz evtl. für die falschpositiven Interaktionen bei der Untersuchung der Rattenhirn cDNA-Bank (4.1.1) verantwortlich gewesen sein könnte, wurde für die Untersuchung der humanen Hirn-cDNA-Bank mit der cDNA der MPR 46-CD der pGBT9-Vektor eingesetzt.

Die Korrektheit des inserierten Fragments und die Beibehaltung des Leserasters wurde durch DNA-Sequenzanalysen bestätigt.

Die cDNA-Bank wurde aus humanen adulten Gehirnen sowohl mit Hilfe statistisch zusammengesetzter Oligonucleotide als auch von Oligo(dT)-Nucleotiden synthetisiert (Clontech). Sie enthält ungefähr 5×10^6 unabhängige Klone mit einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 1,5 kb, die gerichtet über eingefügte *EcoRI* und *XhoI*-Restriktionschnittstellen in den Vektor pACT2, der auch die Sequenz für die Aktivierungsdomäne (AD) beinhaltet, inkloniert sind.

Auch bei diesem Ansatz wurden Hefezellen des Reporterstammes *S. cerevisiae* HF7c zunächst mit pGBT9[MPR 46-CD] und anschließend mit pACT2[cDNA-Bank] sequentiell kotransformiert und auf SD/-HWL+3-AT Agarschalen ausplattiert. Die Transformations-effizienz lag bei ca. $8,1 \times 10^6$ Kolonien/ μ g Bank-DNA. Die auf den SD/-HWL-Platten gewachsenen 41 Klone wurden auf Agarschalen mit aufsteigender 3-AT-Konzentration replattiert, wobei auf den Platten mit 10 mM 3-AT noch alle 41 Klone, auf 15 mM 3-AT 40 Klone und auf 20 mM 3-AT 36 Klone wuchsen. Die ursprünglichen 41 Klone wurden einem β -Galactosidase-Filtertest unterzogen. Es wurden drei primärpositive Klone identifiziert, die in zwei weiteren Replattierungsschritten auf SD/-WL-Agarplatten bis zur Homogenität vereinzelt wurden. Die Gesamtplasmid-DNA dieser drei Klone wurde isoliert und durch Elektroporation in den *E. coli* Stamm HB101 transformiert. Die transformierten Bakterien wurden auf Leucin-defizienten M9-Agarplatten kultiviert.

Zur weiteren Charakterisierung der drei primärpositiven cDNA-Fragmente wurden diese einer Sequenzanalyse unterzogen. Zwei cDNA-Sequenzen wiesen ein frühzeitiges Stopcodon auf und wurden deswegen verworfen. Die cDNA-Sequenz des dritten Klons konnte nach mehreren Versuchen, aufgrund vorzeitigen Abbruchs der Sequenzanalyse, nicht ermittelt werden.

Weitere Versuche, mit Hilfe des *y2h*-Systems neue interagierende cytosolische Proteine für den MPR 46 aus cDNA-Banken zu isolieren, wurden nicht durchgeführt.

4.2 MPR 46-CD Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von interagierenden Proteinen aus Rattenhirn

Um neue Proteine aus dem Cytosol des Rattenhirns zu isolieren, die Wechselwirkungen mit der MPR 46-CD eingehen, wurden affinitätschromatographische Untersuchungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine Affinitätsmatrix aus der cytoplasmatischen Domäne des humanen MPR 46 eingesetzt, an die, aufgrund der 100 % Konservierung innerhalb der Spezies, auch Proteine der Ratte binden sollten.

4.2.1 Expression der GST-Fusionsproteine

Sowohl die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 als auch deren Mutante MPR 46-CD-Y⁴⁵,V⁴⁸→A lagen in dem Vektor pGEX 4T-1 vor. Das Einfügen von *Bam*HI-Restriktionsschnittstellen unmittelbar nach der Transmembrandomäne und dem Stopcodon ermöglichte die Einklonierung der 210 bp Sequenz in pGEX 4T-1, der die Synthese eines Fusionsproteins aus *Glutathion-S-Transferase* (GST) und dem zu exprimierenden Protein ermöglicht. Dieses kann mit Hilfe von Glutathion-Agarose aufgereinigt werden.

E. coli BL-21 Bakterien wurden mit dem pGEX 4T-1-Plasmid und den Konstrukten pGEX 4T-1[MPR 46-CD] und pGEX 4T-1[MPR46-CD-Y⁴⁵,V⁴⁸→A] chemisch transformiert und auf LB/Ampicillin-Agarschalen ausplattiert. Die Expression des GST-Proteins und der GST-Fusionsproteine wurden überprüft, indem nach der Induktion der Synthese der GST-(Fusions)-Proteine für 4 h, nach jeder vollen Stunde, 25 µl Bakteriensuspension entnommen, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt wurde (Abb. 2).

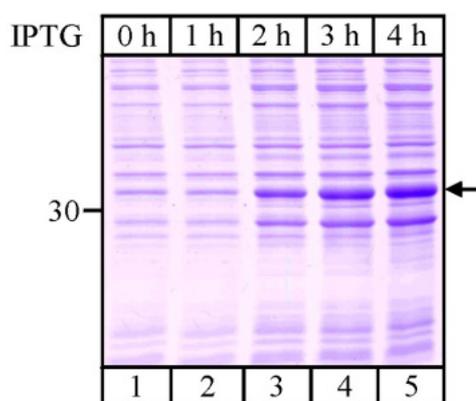


Abb. 2: Coomassie-Gel mit BL-21 Bakterien nach Induktion der Synthese des GST-MPR 46-CD-Fusionsproteins und aufgereinigtem GST-MPR 46-CD.

E. coli BL-21 Bakterien, transformiert mit dem Konstrukt pGEX 4T-1[MPR 46-CD], wurden in 500 ml Medium gezüchtet und die Synthese des GST-MPR 46-CD-Fusionsproteins mit IPTG für 4 h induziert. Nach jeder vollen Stunde wurden 25 µl der Bakteriensuspension entnommen, in einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Die Position des 30 kDa Molekulargewichtsmarkers ist angegeben.

In Abb. 2 ist, exemplarisch gezeigt an dem GST-MPR46-CD-Fusionsprotein, zu sehen, daß nach der Induktion der Synthese des Fusionsproteins (Bahn1) die Expression eines Proteins mit einer molaren Masse von 33 kDa über die 4 h hinweg kontinuierlich zunahm (Bahnen 2-5), wobei die Intensität anderer gefärbter Proteinbanden nahezu gleich bleibt. Bei dem 33 kDa Protein handelt es sich um GST-MPR 46-CD, wobei der GST-Anteil 28 kDa und die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 5-7 kDa betragen. Diese Zunahme konnte auch nach Induktion der Synthese des GST- (28 kDa) bzw. GST-MPR 46-CD- $Y^{45},V^{48} \rightarrow A$ (33 kDa) festgestellt werden (nicht gezeigt).

Die Reinigung der Fusionsproteine aus dem Bakterienlysat erfolgte anhand einer Glutathion-Agarose-Matrix. Die GST-MPR 46-CD- und GST-MPR46-CD- $Y^{45},V^{48} \rightarrow A$ -Fusionsproteine wurden in einer SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Blau-Färbung (nicht gezeigt) oder Silberfärbung (Abb. 3) analysiert.

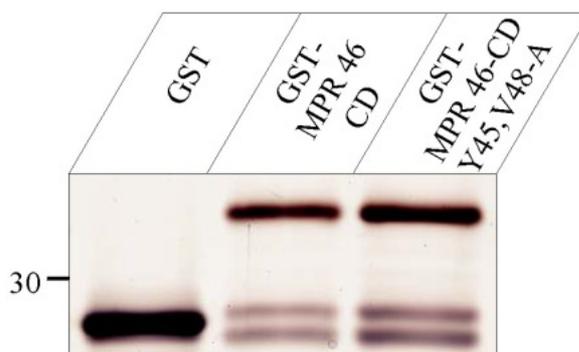


Abb. 3: Silbergel mit den GST-, GST-MPR 46-CD und GST-MPR 46-CD, $Y^{45},V^{48} \rightarrow A$ -Proteinen.

Jeweils 1/5.000 der Glutathion-Agarose-Matrix, nach Bindung des GST- bzw. GST-Fusionsproteins, aufgereinigt aus 500 ml *E. coli*-Suspension, wurden unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE aufgetrennt und einer Silberfärbung unterzogen.

In der SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung weist das GST-Protein erwartungsgemäß eine molare Masse von 28 kDa auf, die beiden Fusionsproteine können bei 33 kDa detektiert werden. Unterhalb der Fusionsproteine sind zwei Banden mit molaren Massen von ca. 27 kDa und 29 kDa zu erkennen, bei denen es sich wahrscheinlich um Abbauprodukte der Fusionsproteine handelt.

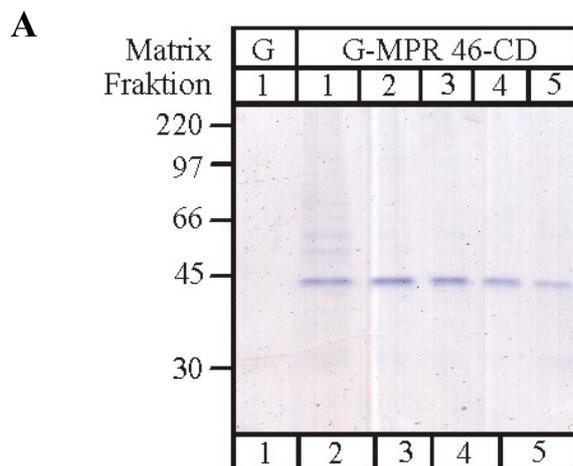
Um Proteine aus dem Cytosol des Rattenhirns zu isolieren, die Wechselwirkungen mit der MPR 46-CD eingehen, wurde zunächst nur das GST-MPR 46-CD Fusionsprotein und als Kontrolle die GST-Matrix eingesetzt. Die GST-Matrix diente dabei zur Eliminierung unspezifischer Bindungspartner, da das Cytosol des Rattenhirns zuerst mit der GST- und anschließend mit der GST-MPR 46-CD-Matrix inkubiert wurde.

Für jede Präparation cytosolischer Proteine wurden neue GST-, GST-MPR 46-CD- und GST-MPR46-CD-Y⁴⁵,V⁴⁸→A Matrices hergestellt, deren Intaktheit und Reinheit vor der affinitätschromatographischen Reinigung cytosolischer Proteine durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Blau- oder Silberfärbung überprüft wurde.

4.2.2 Aufreinigung potentieller MPR 46-CD-Bindungspartner aus Rattenhirn

Um Proteine aus dem Rattenhirn zu isolieren, die mit der MPR 46-CD in Wechselwirkung treten, wurde eine cytosolische Fraktion aus Hirnen adulter Ratten gewonnen und mit GST- und anschließend mit GST-MPR 46-CD für 2-3 h inkubiert. GST- und GST-MPR 46-CD waren an Glutathion-Agarose gekoppelt.

Nach extensivem Waschen der Glutathion-Agarose-Matrix wurden gebundene Proteine entweder mit diskontinuierlich ansteigenden NaCl-Gradienten (250 mM, 500 mM, 750 mM und 1 M) oder in einem Schritt mit 1 M NaCl eluiert. Aliquots der eluierten und dialysierten Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und einer Coomassie- oder Silberfärbung unterzogen (Abb. 4).



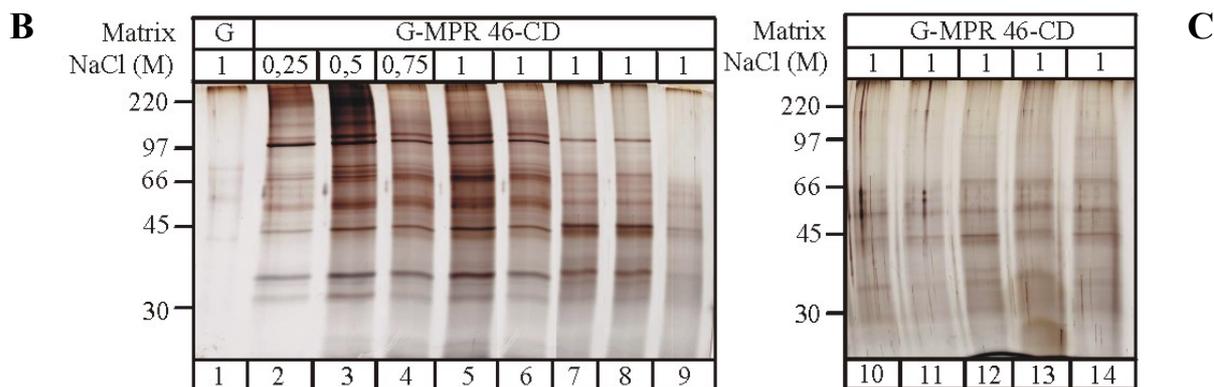


Abb. 4: Coomassie und Silberfärbungen der Eluate der GST- und GST-MPR 46-CD-Säulen

(A) Eine cytosolische Fraktion des Rattenhirns wurde zuerst mit GST- und anschließend mit GST-MPR 46-CD-Matrix für 2-3 h inkubiert. Beide Säulen wurden mit 5 x 1 ml 1 M NaCl eluiert. Jeweils 100 µl der einzelnen Eluatfraktionen wurden durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Da die fünf Fraktionen der GST-Säule das gleiche Ergebnis aufwiesen, wurde repräsentativ nur die erste Fraktion (G1) (Bahn 1) dargestellt. (B) und (C) Eine cytosolische Fraktion des Rattenhirns wurde zuerst mit GST- und anschließend mit GST-MPR 46-CD-Matrix inkubiert. Beide Säulen wurden mit jeweils 1 ml diskontinuierlich ansteigender NaCl-Konzentrationen (0,25 M, 0,5 M, 0,75 M) und anschließend mit 10 x 1 ml 1 M NaCl eluiert. Jeweils 18 µl der Eluatfraktionen wurden in einer SDS-PAGE (10 % Acrylamid) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und danach einer Silberfärbung unterzogen. Exemplarisch für die GST-Eluate, die alle das gleiche Bandenmuster aufwiesen, wurde in Bahn 1 die erste Fraktion, die mit 1 M NaCl eluiert wurde, aufgetragen. In den Bahnen 2-14 sind die Eluate der MPR 46-CD-Säule dargestellt. Die mit diskontinuierlich ansteigenden NaCl-Konzentrationen eluierten Fraktionen befinden sich in den Bahnen 2-4 die mit 1M NaCl erhaltenen Fraktionen in den Bahnen 5-14.

Nach Färbung mit Coomassie-Blau war im 1 M NaCl-Eluat der GST-Matrix kein Protein nachweisbar. Dagegen war in den 1 M NaCl-Eluaten der GST MPR 46-CD Säule ein Protein detektierbar, das eine molare Masse von 43 kDa aufwies. Die Menge dieses Proteins nahm in den aufeinanderfolgenden Eluatfraktionen ab (Abb. 4 A).

Die Anfärbung der Gele mit Silber (Abb. 4 B und C) zeigte, daß an der GST-Matrix nur Spuren cytoplasmatischer Proteine von 40 kDa, 58 kDa, 70 kDa und > 220 kDa enthalten waren (Abb. 4 B, Bahn 1). Dagegen sind in den Eluaten der GST-MPR 46-CD-Säule eine Vielzahl von Proteinen zwischen 30 und > 220 kDa enthalten. Die Zusammensetzung der Proteine, die mit diskontinuierlich aufsteigenden NaCl-Konzentrationen (0,25 M-1 M) eluiert wurden, waren sehr ähnlich (Abb. 4 B, Bahnen 2-5). Die prominenten Proteine weisen molare Massen von 30 kDa, 33 kDa, 43 kDa, 55 kDa, 66 kDa, 97 kDa und 99 kDa auf. Ein Proteintriolett von 43 kDa, 55 kDa und 66 kDa konnte noch nach 10 Elutionsschritten mit 1 M NaCl von der Säule abgelöst werden, während Proteine von 30 kDa, 33 kDa und > 97 kDa nach dem 4. Elutionsschritt mit 1 M NaCl nicht mehr detektierbar waren (Abb. 4 B, Bahnen 2-8).

Die Proteinmenge pro Fraktion nahm mit zunehmenden Elutionsschritten ab.

Die Coomassie-Blau angefärbte Proteinbande von 43 kDa wurde ausgeschnitten und durch Edman-Abbau analysiert. Die Sequenzanalyse dieses Proteins ergab, daß es sich dabei um β/γ Aktin handelt.

4.2.2.1 Westernblot-Analyse

Um das Ergebnis der Sequenzanalyse zu verifizieren, wurden Eluate der GST- und der GST MPR 46-CD-Säulen in gleichen Mengen durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran überführt (Abb. 5). Als Positivkontrolle wurde dabei das als Ausgangsmaterial dienende Cytosol des Rattenhirns eingesetzt.

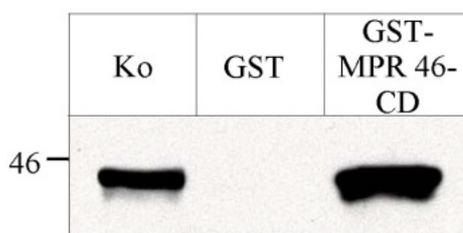


Abb. 5: Test der GST- und GST-MPR 46-CD-Eluate mit Antikörpern gegen Aktin im Westernblot.

Cytosol des Rattenhirns wurde zuerst mit GST- und anschließend mit GST-MPR 46-CD-Matrix inkubiert und gebundene Proteine mit 1 M NaCl eluiert. 20 % der Eluatfraktionen wurden in einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulose transferiert (2. und 3. Spur). In die 1. Spur wurden 11 μ g des Ausgangsmaterials (Rattenhirn-Cytosol) als Positivkontrolle aufgetragen. Nach der Inkubation mit anti-Aktin-Antiserum (1:500) für 2 h bei RT und HRP-gekoppelt Sekundärantikörper für 1 h bei RT erfolgte die Visualisierung der gebundenen Antikörper mit ECL-Reagenz.

In Abb. 5 ist zu sehen, daß der anti-Aktin-Antikörper ein Protein, mit einer molaren Masse vom 43 kDa, in dem Cytosol des Rattenhirns (1. Spur) und dem Eluat der GST-MPR 46-CD-Säule (3. Spur) detektierte. Im Eluat der GST-Säule (2. Spur) war dieses Protein nicht nachweisbar. Dieses Ergebnis war in allen weiteren chromatographischen Reinigungen reproduzierbar (nicht gezeigt).

4.2.3 Untersuchungen zu der physiologischen Bedeutung der Interaktion zwischen der MPR 46-CD und Aktin

Um die physiologische Bedeutung der Interaktion der MPR 46-CD mit dem Cytoskelett zu untersuchen, wurden verschiedene Transportschritte des MPR 46, wie die Internalisierung an der Plasmamembran oder Sortierung am *trans*-Golgi-Netzwerk (tGN), in Abhängigkeit von der Interaktion mit dem Aktin-Cytoskelett analysiert. Zu diesem Zweck wurde Latrunculin A (Lat. A) eingesetzt. Lat. A ist ein zellpermeables Toxin des Schwammes *Latrunculia magnifica*, daß in kultivierten Zellen durch die Bildung eines 1:1 Komplexes mit monomerem G-Aktin die Filamente des Aktin-Cytoskeletts depolymerisiert.

4.2.3.1 Beteiligung des Aktin-Cytoskeletts an der Internalisierung des MPR 46

Im Gleichgewicht sind circa 5 % der MPR 46 an der Plasmamembran lokalisiert und stehen im Austausch mit intrazellulären MPR 46. Diese Rezeptoren zirkulieren zwischen tGN, Endosomen und Plasmamembran. Die Internalisierung der MPR 46 von der Plasmamembran ist nicht mit der Aufnahme M6P-haltiger Liganden verbunden [108].

4.2.3.1.1 Optimierung des MPR 46-Endocytose-Assays

Der MPR 46-Endocytose-Assay basiert auf der Bindung von [¹²⁵I]-markiertem, monoklonalem 21-D3-Antikörpern an humane MPR 46, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind.

[¹²⁵I]-21-D3 wurden dem Zellkulturmedium bei 37 °C zugesetzt. Nach Bindung an die MPR 46 wurden die [¹²⁵I]-21-D3/MPR 46-Komplexe internalisiert und durch intrazelluläre MPR 46 ersetzt, die erneut [¹²⁵I]-21-D3 binden konnten. Die Aufnahme der Rezeptor-Antikörper Komplexe verhält sich proportional zu der Inkubationszeit und ist daher linear. Die am Ende der Endocytose noch an MPR 46 der Zellmembran gebundenen [¹²⁵I]-21-D3 wurden durch Waschen bei saurem pH und 4 °C entfernt und damit bei der Berechnung der internalisierten Antikörper ausgeschlossen.

Zunächst wurden die geeignete Konzentration und Inkubationszeit mit Lat. A an BHK MPR 46-Zellen ausgetestet. Die BHK MPR 46-Zellen wurden mit Lat. A-Konzentrationen zwischen 0,5 und 20 µM für 30 min-22 h inkubiert. Mikroskopische Beobachtungen

zeigten nach 1 h keinen erkennbaren Effekt bei BHK MPR 46-Zellen, die mit 0,5 μM Lat. A behandelt worden waren, während bei Konzentrationen zwischen 5-20 μM Lat. A bereits nach 30 min eine Abrundung der Zellen erkennbar war.

Mikroskopische Beobachtungen erbrachten, daß nach einer Inkubation über Nacht mit 5 μM Lat. A alle Zellen von den Kulturschalen abgelöst waren. Um diese Beobachtungen zu verifizieren wurden Endocytose-Assays mit unterschiedlichen Konzentrationen Lat. A (0,5-20 μM) und unterschiedlichen Inkubationszeiten (30 min-22h) durchgeführt und die Menge der internalisierten [^{125}I]-21-D3 ermittelt. Abb. 6 A läßt erkennen, daß nach 3 h Inkubation die Endocytoserate mit zunehmender Lat. A-Konzentration abnahm (n=3). Während die Zugabe von 0,5 μM Lat. A die aufgenommene [^{125}I]-21-D3-Menge kaum beeinflusste (93 % im Vergleich zu den Kontrollzellen), betrug sie bei 1 μM Lat. A 79 %, bei 5 μM 62 %, bei 10 μM 58 % und bei 20 μM 31 % der Kontrolle. Unter dem Einfluß von 20 μM Lat. A sank die zelluläre Gesamtproteinmenge auf 82 % im Vergleich zu den Kontrollzellen. Bei 0,5, 1, 5 und 10 μM Lat. A war die Gesamtproteinmenge der Zellen vergleichbar mit der unbehandelten Zellen. Alle weiteren Experimente wurden bei einer Konzentration von 5 μM Lat. A durchgeführt. Wenn BHK MPR 46-Zellen in An- und Abwesenheit von Lat. A (5 μM) für verschiedene Zeiten inkubiert wurden (n=3, Abb. 6 B), war zunächst bei den Kontrollzellen ein kontinuierlicher Anstieg der internalisierten MPR 46-Antikörper über die Zeit festzustellen. In Gegenwart von Lat. A sank nach 30 min Inkubationszeit die aufgenommene Menge an [^{125}I]-21-D3 auf 88 %, nach 1 h auf 76 %, nach 2 h auf 68 %, nach 3 h auf 63 % und nach 5 h auf 43 % im Vergleich zu den Kontrollzellen. Nach 5 h Inkubation mit 5 μM Lat. A war die Gesamtproteinmenge der Zellen auf 55 % reduziert im Vergleich zu den Kontrollzellen. Da nach 3 h Inkubation mit 5 μM Lat. A bei gleichbleibender Proteinmenge die geringste Endocytoserate zu vermerken war, wurden alle weiteren Endocytose-Assays für 3 h bei 5 μM Lat. A durchgeführt.

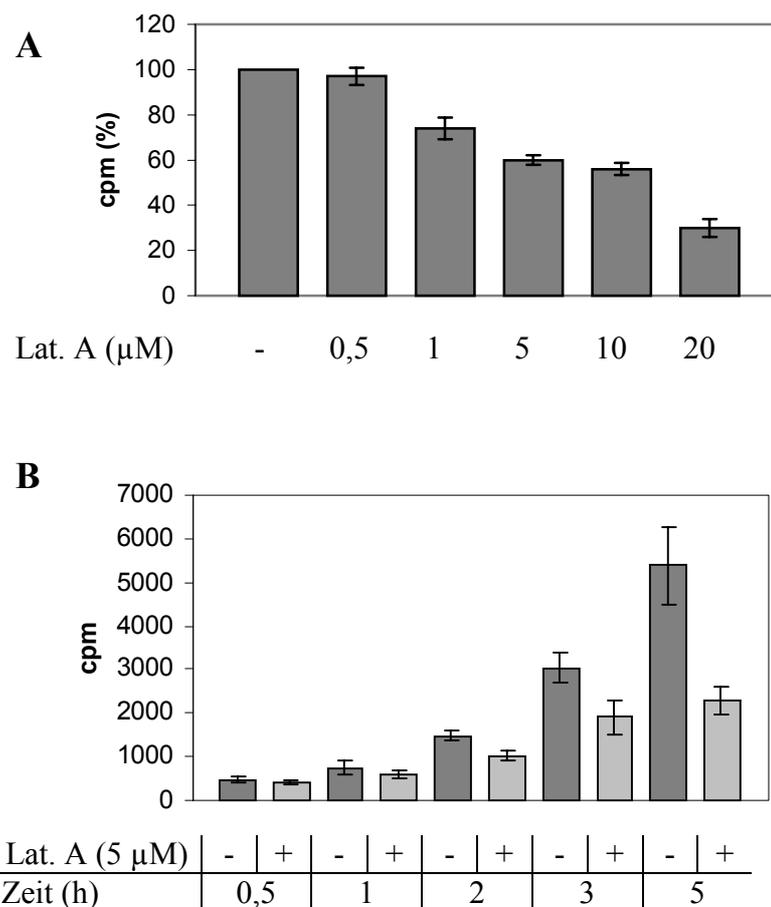


Abb. 6: Endocytose des MPR 46-Antikörpers [¹²⁵I]-21-D3 bei BHK MPR 46-Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen von Lat. A und unterschiedlichen Inkubationszeiten.

BHK MPR 46-Zellen wurden in Anwesenheit von 0,5 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM und 20 µM des Aktindepolymerisierenden Toxins Lat. A für 3 h mit dem jodierten monoklonalen MPR 46-Antikörper [¹²⁵I]-21-D3 inkubiert und anschließend die zellassoziierte Radioaktivität bestimmt. Kontrollzellen wurden in Abwesenheit von Lat. A inkubiert (A). BHK MPR 46-Zellen wurden in An- und Abwesenheit von Lat. A (5 µM) für 30 min, 1h, 2h, 3h und 5h mit dem jodierten monoklonalen MPR 46-Antikörper [¹²⁵I]-21-D3 inkubiert und danach die internalisierte Radioaktivität ermittelt (B).

4.2.3.1.2 Endocytose des MPR 46 in BHK MPR 46-Zellen

BHK MPR 46-Zellen, die zusätzlich zu dem endogenen den humanen MPR 46 überexprimieren, wurden für 3 h mit [¹²⁵I]-21-D3 in An- und Abwesenheit von 5 µM Lat. A inkubiert. Die internalisierten Antikörpermengen wurde bestimmt (Abb. 7A) und die Zellysate durch SDS-PAGE und Autoradiographie (Abb. 7 B) analysiert. Die zellassoziierte [¹²⁵I]-21-D3-Menge Lat. A behandelter Zellen wurde in jedem Experiment direkt zu den jeweils unbehandelten Kontrollzellen in Bezug gesetzt.

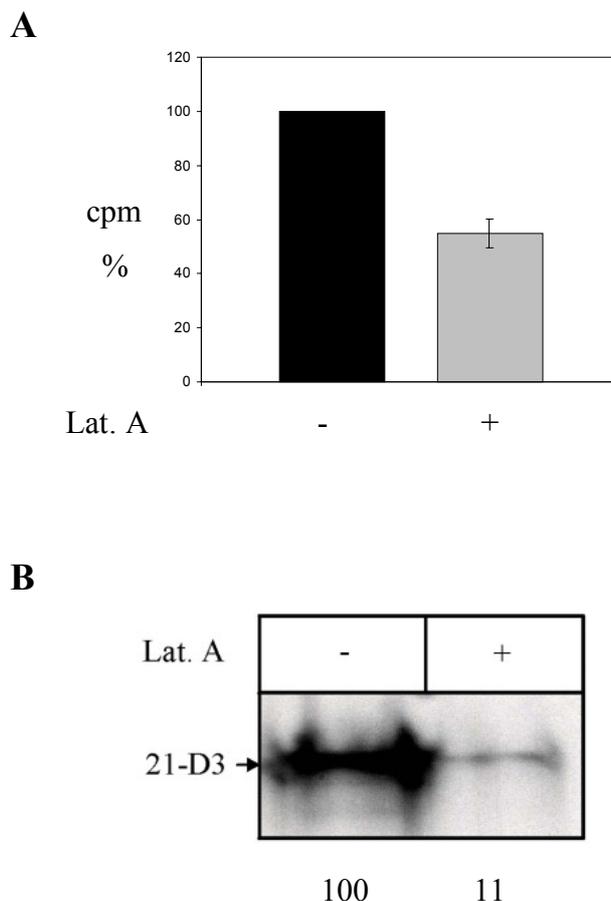


Abb. 7: Endocytose des MPR 46-Antikörpers [¹²⁵I]-21-D3 bei BHK MPR 46-Zellen in An- und Abwesenheit von Lat. A.

BHK MPR 46-Zellen wurden in An- und Abwesenheit der Aktin-depolymerisierenden Droge Lat. A (5 µM) für 3 h mit dem jodierten MPR 46-Antikörper [¹²⁵I]-21-D3 (300 cpm/µl) inkubiert und anschließend die zellassoziierte Radioaktivität bestimmt (**A**). Das Zellysate wurde durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert (**B**). Die Zahlen unter den Bahnen geben die internalisierte Radioaktivität in % wieder.

In Anwesenheit von Lat. A (5 µM) nahm die Endocytoserate des [¹²⁵I]-21-D3 auf 55 % ab (n=6). Die anschließende Analyse der Zellysate durch SDS-PAGE und Autoradiographie (Abb. 7 B) ergab nach densitometrischen Messungen, daß in Lat. A behandelten Zellen nur 11 % des intakten Antikörpers nachweisbar waren. Der Proteingehalt pro Zellplatte war bei Lat. A-behandelten und unbehandelten Zellen gleich.

Unter gleichen Bedingungen wurden [¹²⁵I]-21-D3-Endocytose-Assays mit Maus-Zellen durchgeführt, die keine MPR 300 exprimieren, aber zusätzlich zu dem endogenen den humanen MPR 46 (L-MPR 46) überexprimieren. Die Inkubation der Zellen mit Lat. A (5 µM) reduzierte die aufgenommene Menge an [¹²⁵I]-21-D3 auf 52 % der Kontrollzellen (n=2) (nicht gezeigt).

4.2.3.1.3 Endocytose von Arylsulfatase A in BHK MPR 46-Zellen

Um die Spezifität des Effektes von Lat. A für den MPR 46 zu untersuchen, wurde die Aufnahme des [125 I]-markierten lysosomalen Enzyms Arylsulfatase A (ASA) in Ab- und Abwesenheit des kompetitiven Inhibitors M6P unter gleichen Bedingungen wie für die [125 I]-21-D3 Endocytose gemessen. Da der MPR 46 keine M6P-haltigen Liganden internalisiert [108], wird die M6P-abhängige Aufnahme der ASA ausschließlich von dem MPR 300 vermittelt.

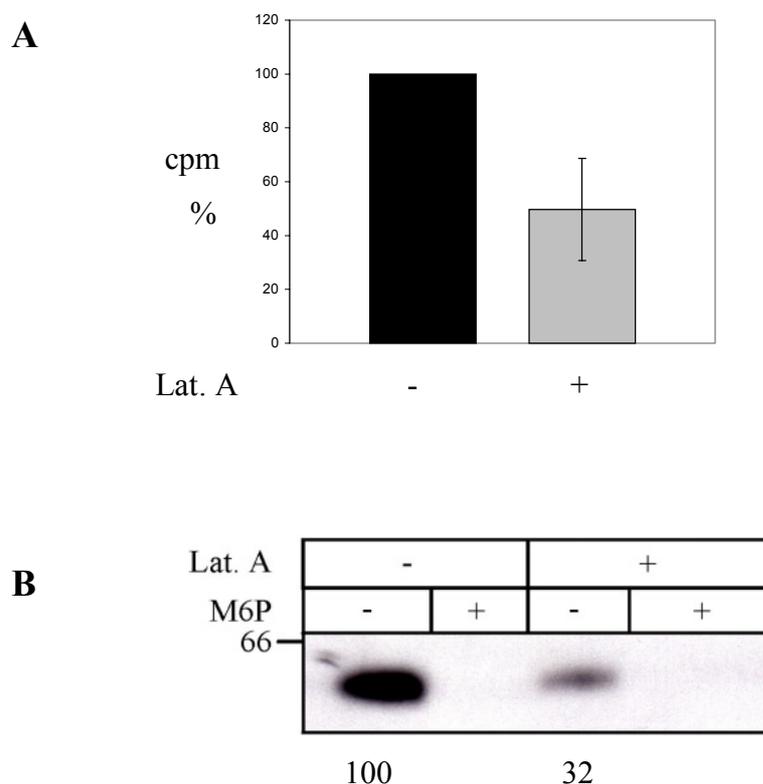


Abb. 8: Endocytose von [125 I]-ASA in BHK MPR 46- Zellen in An- und Abwesenheit von Lat. A.

BHK MPR 46-Zellen wurden in An- und Abwesenheit der Aktin-depolymerisierenden Droge Lat. A (5 μ M) und des kompetitiven Inhibitors M6P (10 mM) für 3 h mit [125 I]-ASA (300 cpm/ μ l) inkubiert. Nach Entfernung der an die Zelloberfläche gebundene ASA wurde die internalisierte Radioaktivität ermittelt und als % der unbehandelten Zellen angegeben (**A**). Die internalisierte Radioaktivität in Anwesenheit von M6P wurde von den jeweiligen Werten bei Kontroll- und Lat. A-behandelten Zellen subtrahiert. Zellysate wurden unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert (**B**). Die Zahlen unter den Bahnen geben die internalisierte Radioaktivität in % wieder.

In Abb. 8 A sind die Ergebnisse der [125 I]-ASA-Aufnahme in BHK MPR 46 Zellen in An- und Abwesenheit von Lat. A (5 μ M) dargestellt (n=5). Die Spezifität der Aufnahme von ASA über den MPR 300 wurde durch Zusatz des kompetitiven Inhibitors M6P (10 mM) bestimmt. Die zellassoziierte Radioaktivität in Anwesenheit von M6P wurde von den jeweiligen Werten bei Kontroll- und Lat. A-behandelten Zellen subtrahiert. Die

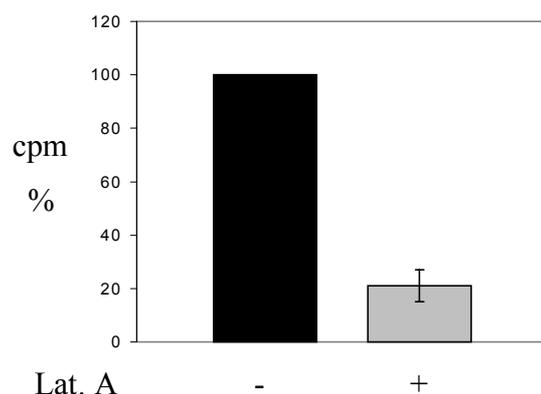
zellassoziierte Radioaktivität der unbehandelten Kontrollzellen wurde als 100 % gewertet und die gemessenen Werte der Lat. A-behandelten Zellen mit diesen verglichen. Lat. A-behandelte BHK MPR 46-Zellen reduzierten die Aufnahme von [125 I]-ASA auf 49 % im Vergleich zu Kontrollzellen. Die densitometrische Auswertung der [125 I]-ASA in dem Zellysatz nach SDS-PAGE und Autoradiographie (Abb. 8 B) ergab, daß von Lat. A-behandelten Zellen nur 32 % der Menge der Kontrollzellen aufgenommen wurden. In Anwesenheit von M6P wurde keine [125 I]-ASA internalisiert. Der Proteingehalt pro Zellplatte war bei Lat. A-behandelten und -unbehandelten Zellen gleich.

4.2.3.1.4 Endocytose von Arylsulfatase A in neuronalen Zelllinien

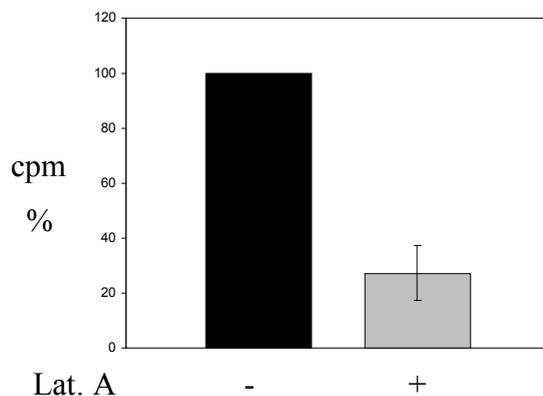
Die MPR 300-vermittelte Aufnahme von [125 I]-ASA wurde unter gleichen Bedingungen wie für BHK MPR 46-Zellen bei neuronalen Zelllinien (Ratten Glia C6- und Humane SH-SY5Y Neuroblastoma-Zellen) in An- und Abwesenheit von Lat. A analysiert.

A

Glia C6



SH-SY5Y



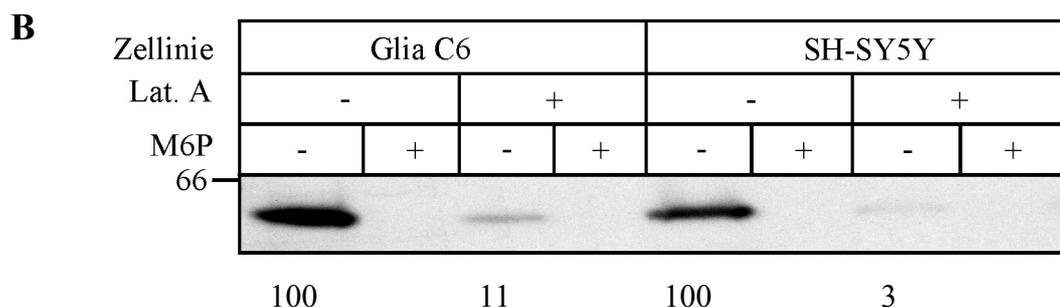


Abb. 9: Endocytose von [¹²⁵I]-ASA bei Glia C6 und SH-SY5Y- Zellen in An- und Abwesenheit von Lat. A.

Glia C6- (n=2) und SH-SY5Y-Zellen (n=4) wurden in An- und Abwesenheit von Lat. A (5 µM) und M6P (10 mM) für 3 h mit [¹²⁵I]-ASA inkubiert (300 cpm/µl). Die internalisierte Radioaktivität wurde bestimmt und die Werte in Anwesenheit von M6P von den jeweiligen Werten bei Kontroll- und Lat. A-behandelten Zellen subtrahiert. Die Daten Lat. A behandelten Zellen sind als % der unbehandelten Kontrollzellen angegeben (A) Die Zellysate wurden anschließend unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert und densitometrisch ausgewertet (B). Die Zahlen unter den Bahnen geben die internalisierte Radioaktivität in % wieder.

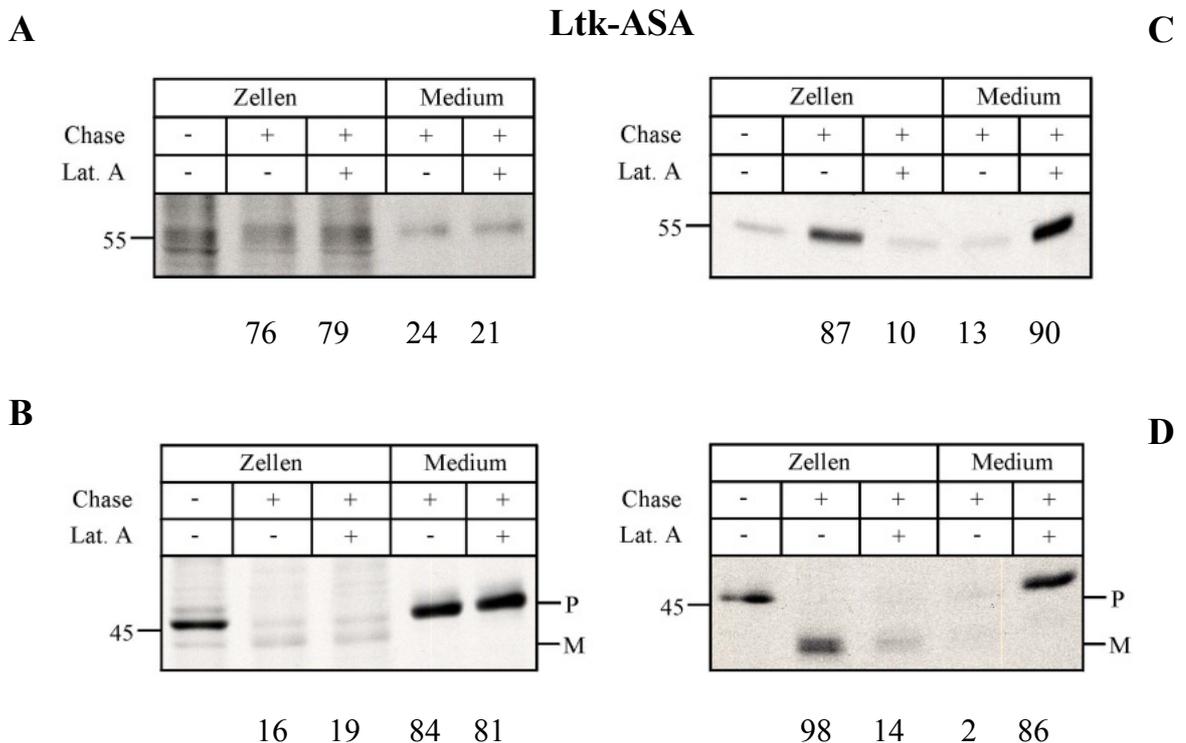
In Anwesenheit von Lat. A internalisierten Ratten Glia C6-Zellen 21 % der [¹²⁵I]-ASA im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 9 A). Dieses Ergebnis konnte durch SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie bestätigt werden (Abb. 9 B). Die densitometrische Auswertung der [¹²⁵I]-ASA in dem Zellysate nach SDS-PAGE und Autoradiographie ergab, daß von Lat. A-behandelten Glia C6-Zellen nur 11 % der Menge der Kontrollzellen aufgenommen wurden. Die zellassoziierte Radioaktivität bei unbehandelten Glia C6-Zellen konnte durch Zugabe von M6P vollkommen inhibiert werden (n=2).

Unter Einfluß von Lat. A internalisierten SH-SY5Y-Zellen 27 % [¹²⁵I]-ASA (n=4, Abb. 9 A) im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die anschließende Analyse der Zellysate durch SDS-PAGE und Autoradiographie (Abb. 9 B) ergab nach densitometrischen Messungen jedoch, daß in Lat. A behandelten Zellen 3 % der ASA im Vergleich zu unbehandelten Zellen nachweisbar waren. Auch hier wurde eine komplette Inhibition der [¹²⁵I]-ASA-Internalisierung bei Zugabe von M6P beobachtet. Der Proteingehalt pro Zellplatte war bei Lat. A-behandelten und unbehandelten Zellen gleich. Bei unbehandelten Glia C6-Zellen war die ASA-Aufnahme pro mg Protein fast doppelt so hoch (8672 cpm/mg) wie bei unbehandelten SH-SY5Y-Zellen (4667 cpm/mg). Glia C6-Zellen unter Einfluß von Lat. A wiesen 3346 cpm/mg Protein auf, Lat. A behandelte SH-SY5Y-Zellen 2174 cpm/mg Protein.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Depolymerisierung des Aktin-Cytoskeletts durch Lat. A sowohl die Internalisierung der MPR 46 (Messung der Aufnahme von [¹²⁵I]-21-D3 Antikörpern) als auch die des MPR 300 (Messung der M6P-abhängigen Aufnahme von [¹²⁵I]-ASA) stark reduziert und nicht spezifisch für den MPR 46 ist.

4.2.3.2 Sortierung neusynthetisierter lysosomaler Enzyme

Um zu untersuchen, ob der Transport der MPR vom tGN zu den Endosomen in Abhängigkeit von Aktin erfolgt, wurden die Sekretion und der Transport von ASA und Cathepsin D (Cath. D) in Mausfibroblasten, welche zusätzlich zu dem endogenen den humanen MPR 46 überexprimieren (L-MPR 46) bzw. in Mausfibroblasten, welche zusätzlich zu der endogenen die humane ASA überexprimieren (Ltk-ASA) bestimmt. Die Zellen wurden für 1 h metabolisch mit [³⁵S]-Methionin markiert (Pulse) und anschließend für 6 h in An- und Abwesenheit von Lat. A (5 μM) inkubiert (Chase). Dem Chase-Medium wurde M6P zugefügt, um eine Wiederaufnahme sezernierter Enzyme zu inhibieren. Zur Bestimmung der Ausgangsmenge neusynthetisierter lysosomaler Enzyme wurden Zellen direkt nach dem Pulse geerntet und für Immunpräzipitationen von ASA und Cath. D verwendet. Aus äquivalenten Mengen Zellextraktes und Mediumüberstandes wurden ASA und Cath. D sequenziell immunpräzipitiert und nach SDS-PAGE fluorographisch sichtbar gemacht.



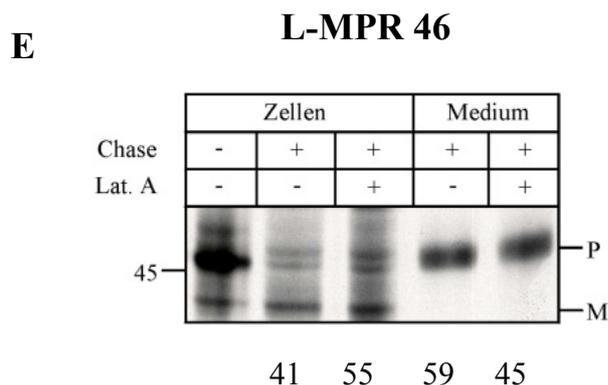


Abb. 10: Sortierung von Arylsulfatase A und Cathepsin D bei Ltk-ASA- und L-MPR 46-Zellen in An- und Abwesenheit von Lat. A.

Die angegebenen Zelllinien wurden für 1 h metabolisch markiert und für 6 h in An- und Abwesenheit von Lat. A (5 μ M) einem Chase unterzogen. ASA (A, C) und Cath. D (B, D, E) wurden aus äquivalenten Mengen Zellextraktes und Mediumüberstandes immunpräzipitiert, unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt und fluorographisch sichtbar gemacht. Die Zahlen unter den Bahnen geben die Menge an ASA bzw. Cath. D in % der gesamten neusynthetisierten ASA und Cath. D wieder. P=Precursor, M=mature Form.

In Abb. 10 sind Ergebnisse aus zwei Experimenten (von insgesamt sechs mit Ltk-ASA- bzw. vier mit L-MPR46-Zellen) dargestellt, welche die Variation des Effektes von Lat. A verdeutlichen.

Das erste Experiment (Abb. 10 A) zeigt, daß sowohl in Zellen (Ltk-ASA) mit intaktem als auch in denen mit depolymerisiertem Aktin-Cytoskelett [35 S]-ASA (54-57 kDa) in gleicher Menge präzipitiert werden konnte (76 % und 79 % der gesamten neusynthetisierten ASA) 24 % bzw. 21 % der ASA wurden in An- und Abwesenheit von Lat. A sezerniert. Die Immunpräzipitation von Cath. D, die aus den gleichen Zellen und Medien im Anschluß durchgeführt wurde, führte zu dem gleichen Ergebnis (Abb. 10 B). Auch hier war kein Unterschied zwischen Zellen zu erkennen die in An- und Abwesenheit von Lat. A analysiert wurden. Sowohl die Zellen mit intaktem als auch jene mit depolymerisiertem Aktin-Cytoskelett wiesen beide Formen von Cath. D auf (16 % und 19 % des gesamten neusynthetisierten Cath. D), das Precursor-Protein (P, 46 kDa) und die reife Form (M, 38 kDa), die ausschließlich in Endosomen und Lysosomen lokalisiert ist. Das zeigt, daß für den Transport des neusynthetisierten Cath. D vom tGN zum Endosom das Aktin-Cytoskelett nicht erforderlich war. Im Gegensatz zu ASA wurden ca. 83 % des neusynthetisierten Cath. D sezerniert. Dieser Prozentsatz war durch die Behandlung mit Lat. A nicht beeinflusst.

Im zweiten Experiment (Abb. 10 C und D) sind signifikante Unterschiede zwischen Ltk-ASA-Zellen mit intaktem bzw. depolymerisiertem Aktin-Cytoskelett zu erkennen. In unbehandelten Zellen verblieben 87 % der neusynthetisierten ASA intrazellulär und nur 13 % wurden sezerniert. In Gegenwart von Lat. A sezernierten die Ltk-ASA-Zellen jedoch mehr als 90 % dieses neusynthetisierten Enzyms. Die anschließende Immunpräzipitation von Cath. D aus den gleichen Zellen und Medien erbrachte das gleiche Ergebnis wie für die ASA beschrieben. In unbehandelten Zellen erreichten 98 % von Cath. D Endosomen und Lysosomen und 2 % wurden sezerniert. Zellen mit depolymerisiertem Aktin-Cytoskelett hingegen sezernierten 86 % und lediglich 14 % erreichten Endosom und Lysosomen.

Von sechs Experimenten war in Zweien die Sekretion von ASA durch Lat. A nicht beeinflusst (Abb. 10 A) wobei in vier Experimenten die Anwesenheit von Lat. A zu einer erhöhten Sekretion der neusynthetisierten ASA (Abb. 10 C) führte. Für das zweite untersuchte lysosomale Enzym, Cathepsin D ergab sich ein anderes Bild. In vier von sechs Experimenten war eine hohe Basalsekretion (ca. 80 % des neusynthetisierten Enzyms) zu bemerken, die nicht durch Lat. A beeinflusst wurde (Abb. 9 B). In zwei Experimenten induzierte Lat. A eine Fehlsortierung am tGN, die zu einer Sekretion der Mehrheit (> 80 %) des neusynthetisierten Cath. D führte (Abb. 10 D). Das in den Zellen verbliebene Cath. D wurde prozessiert und damit korrekt zu den Zielorganellen (Endosom und Lysosom) transportiert.

Der Effekt von Lat. A auf die Sortierung von neusynthetisiertem Cath. D wurde auch an L-MPR 46-Zellen untersucht, die neben dem endogenen MPR 46 den humanen MPR 46 überexprimieren. Aufgrund des Fehlens der MPR 300 werden, in Abhängigkeit des Expressionsgrades des MPR 46, zwischen 50-85 % neusynthetisierter lysosomaler Enzyme sezerniert [43] [45]. Abb. 10 E läßt erkennen, daß in An- und Abwesenheit von Lat. A etwa die gleiche Menge (41 % und 55 %) Cath. D die Endosomen und Lysosomen erreichten und vergleichbare Mengen (59 % und 45 %) sezerniert wurden. Dieses Ergebnis war in drei von vier Experimenten reproduzierbar.

Auch bei humanen SH-SY5Y-Zellen wurde die Sortierung von neusynthetisiertem Cath.D in An- und Abwesenheit von Lat. A untersucht (nicht gezeigt). Dabei konnte festgestellt werden, daß mehr als 90 % Cath. D sowohl in intakten Zellen als auch in solchen mit depolymerisiertem Aktin-Cytoskelett korrekt prozessiert wurden, die Beeinflussung der Sekretion durch Lat. A war vernachlässigbar.

4.2.3.3 Lokalisation von MPR 46 und Aktin in kultivierten Zellen

Die subzelluläre Lokalisation der MPR 46 und von Aktin-Filamenten wurde durch indirekte Doppel-Immunfluoreszenz-Färbung analysiert. Zu diesem Zweck wurden BHK MPR 46-Zellen, die zusätzlich zu dem endogenen den humanen MPR 46 überexprimieren, fixiert, permeabilisiert, simultan mit polyklonalen anti-MPR46-Antikörpern und Texas-Rot gekoppeltem Phalloidin und anschließend mit Cy2-gekoppeltem anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern inkubiert (Abb. 11 A-C).

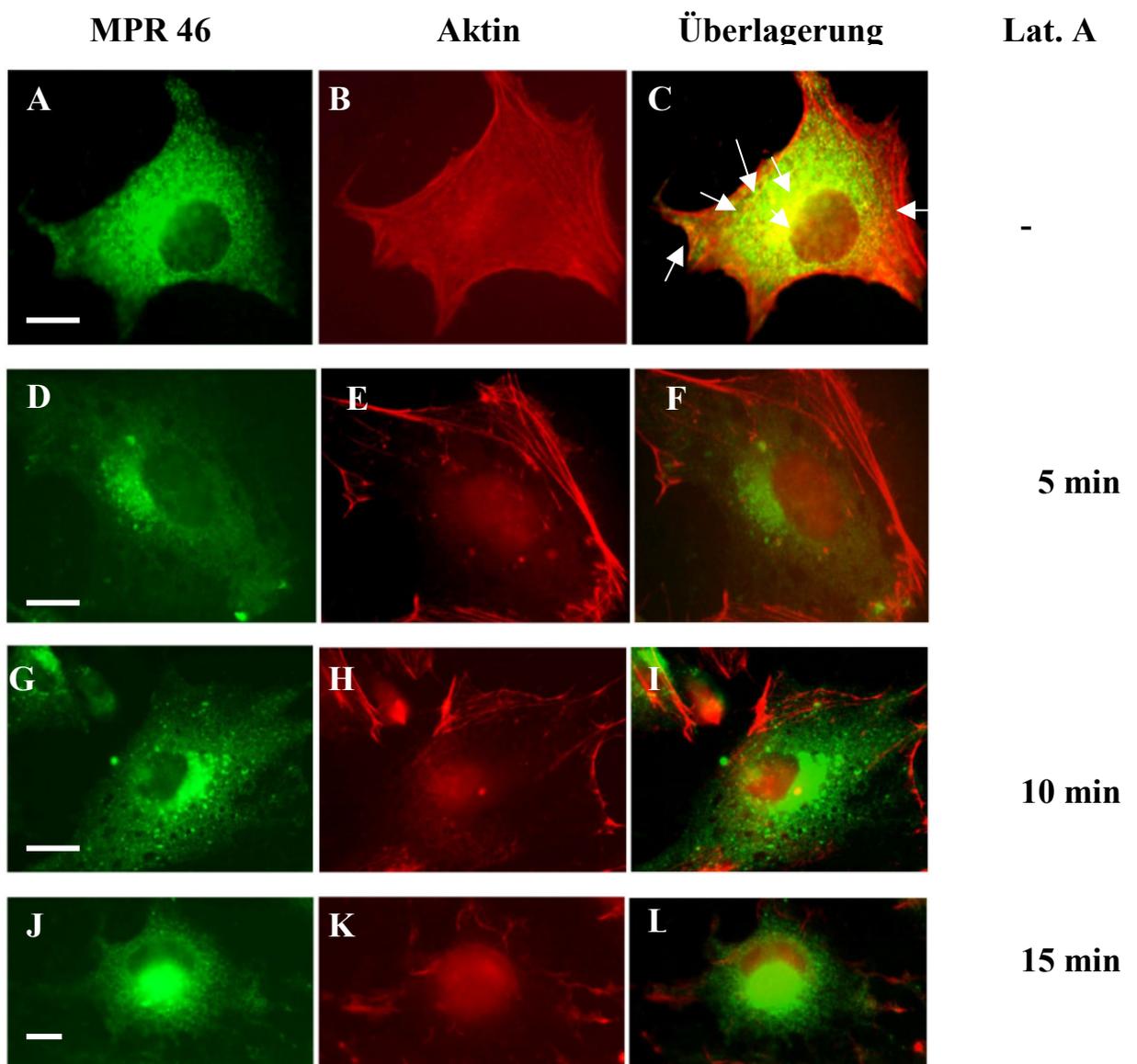


Abb. 11: Colokalisation von humanen MPR 46 und Aktin in permeabilisierten BHK MPR 46-Zellen.

Subkonfluente BHK MPR 46-Zellen wurden in Abwesenheit (A-C) und Anwesenheit von Lat. A für 5 min (D-F), 10 min (G-I) und 15 min (J-L) inkubiert, fixiert und permeabilisiert. Der MPR 46 wurde mit

polyklonalem Antiserum und Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper (A), (D), (G), (J) visualisiert. Aktin wurde durch Texa-Rot-gekoppeltes Phalloidin (B), (E), (H), (K) dargestellt. Die jeweiligen Überlagerungen sind in (C), (F), (I) und (L) dargestellt. (Balken \cong 10 μ m).

Im Gleichgewicht ist die Mehrheit der MPR 46 in perinucleären Strukturen nachweisbar, die nach Literaturangaben dem tGN zuzurechnen sind (Abb. 11 A). Zahlreiche MPR 46-haltige Vesikel sind nachweisbar, die endosomalen Membranen entsprechen.

Abb. 11 B zeigt das Aktin-Cytoskelett dieser Zellen. Es ist zu erkennen, daß Aktin-Filamente die gesamte Zelle durchziehen; Der Zellcortex ist klar abgezeichnet, da *stress fibres* an der Plasmamembran enden, wo sie Fokalkontakte bilden. Eine Überlagerung beider Bilder (Abb. 11 C) ergibt eine Colokalisation des MPR 46 mit Aktin (gelb), die sowohl im perinucleären Bereich als auch bei einzelnen Vesikeln festzustellen ist (Pfeile).

Indirekte Doppel-Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen mit Antikörpern gegen den MPR 46 und mit Phalloidin wurden auch mit BHK MPR 46-Zellen durchgeführt, bei denen für 5 min, 10 min und 15 min das Aktin-Cytoskelett mit Lat. A (5 μ M) depolymerisiert worden war (Abb. 11 D-L).

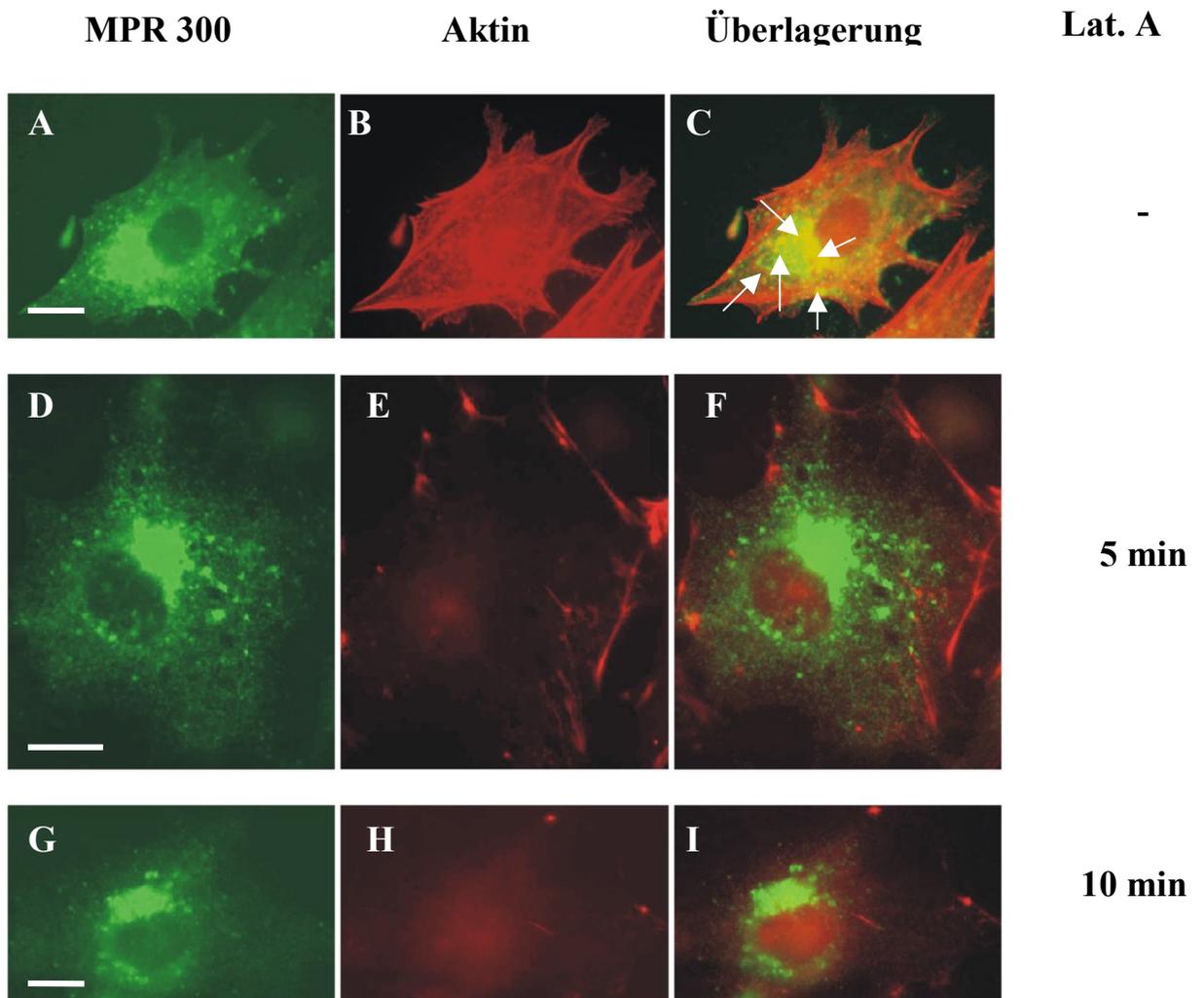
Nach 5 min Inkubation mit Lat. A (5 μ M) sind MPR 46 unverändert im perinucleären Bereich nachweisbar. Gleichzeitig ist eine beginnende Depolymerisierung der Aktin-Filamente (Abb. 11 E) festzustellen, wobei *stress fibres* vor allem am Zellcortex noch zu sehen sind. Die Überlagerung beider Bilder läßt keine Colokalisation mehr zwischen dem MPR 46 und dem Aktin-Cytoskelett erkennen (Abb. 10 F).

Auch nach einer Inkubation für 10 min mit Lat. A kann der MPR 46 im perinucleären Bereich festgestellt werden (Abb. 11 G), Aktin-Filamente sind nur noch bruchstückhaft und an Fokalkontakten zu erkennen (Abb. 11 H). Eine Colokalisation des MPR 46 mit Aktin ist nicht zu erkennen (Abb. 11 I).

Nach einer Inkubation für 15 min mit Lat. sind MPR 46 ebenfalls sowohl im perinucleären Bereich (Abb. 11 J) als auch im Cytosol detektierbar. Die depolymerisierten Aktin-Filamente sind nur noch als diffuser Pool zu erkennen (Abb. 11 K). Eine Colokalisation von MPR 46 und Aktin ist nicht festzustellen. (Abb. 11 L).

4.2.3.4 Lokalisation von MPR 300 und Aktin in kultivierten Zellen

Da die Wechselwirkung mit Aktin nicht spezifisch für den MPR 46 ist sondern auch für den MPR 300 festgestellt werden konnte (4.2.3.1.3), wurden Doppel-Immunfluoreszenz-mikroskopische Analysen durchgeführt, um die subzelluläre Lokalisation der MPR 300 und Aktin-Filamente zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden BHK MPR 300-Zellen, die zusätzlich zu dem endogenen auch den humanen MPR 300 überexprimieren, fixiert, permeabilisiert, simultan mit polyklonalen anti-MPR 300-Antikörpern und Texas-Rot gekoppeltem Phalloidin und anschließend mit FITC-gekoppelten Sekundärintikörpern inkubiert (Abb. 12 A-C)



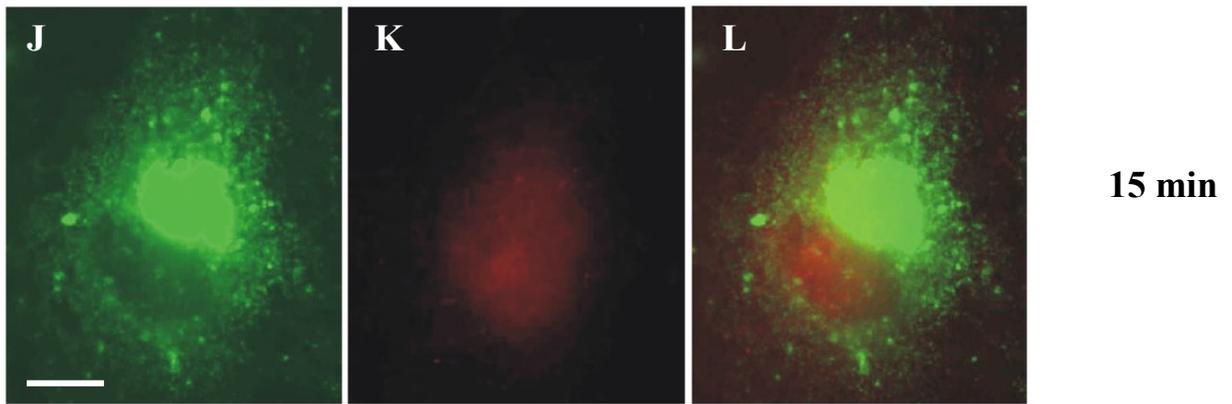


Abb. 12: Colokalisation von humanen MPR 300 und Aktin in BHK MPR 300-Zellen.

Subkonfluente BHK MPR 300-Zellen wurden in Abwesenheit (A-C) und Anwesenheit von Lat. A (μM) für 5 min (D-F), 10 min (G-I) und 15 min (J-L) inkubiert, fixiert und permeabilisiert. Der MPR 300 wurde mit polyklonalem Antiserum und FITC-gekoppelten Sekundärantikörper (A), (D), (G), (J) visualisiert. Aktin wurde durch Texas-Rot-gekoppeltes Phalloidin (B), (E), (H), (K) dargestellt. Die jeweiligen Überlagerungen sind in (C), (F), (I) und (L) dargestellt. (Balken $\cong 10 \mu\text{m}$).

Wie der MPR 46 ist im Gleichgewicht die Mehrheit der MPR 300 in perinucleären Strukturen, die dem tGN zuzurechnen sind und in Vesikeln, die dem endosomalen Kompartiment entsprechen, nachweisbar (Abb. 12 A). Das Aktin-Cytoskelett ist in der gesamten Zelle detektierbar (Abb. 12 B), zahlreiche *stress fibres* durchziehen die Zelle und enden am Zellcortex. Eine Colokalisation der MPR 300 mit Aktin (gelb) ist nach Überlagerung beider Bilder vor allem im perinucleären Bereich aber auch in einzelnen Vesikeln (Pfeile) zu erkennen (Abb. 12 C). Andere Kompartimente sind davon ausgespart und zeigen nur MPR 300-Immunreaktivität.

Doppel-Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen mit Antikörpern gegen MPR 300 und mit Phalloidin wurden auch bei BHK MPR-300-Zellen durchgeführt, die für 5 min, 10 min und 15 min mit dem Aktin-depolymerisierenden Toxin Lat. A ($5 \mu\text{M}$) behandelt worden waren (Abb. 12, D-L).

Zu allen Zeitpunkten der Inkubation mit Lat. A war der MPR 300 unverändert in perinucleären Strukturen und im endosomalen Kompartiment nachweisbar (Abb. 12 D, G, J). Dagegen weisen bereits nach 5 min die Zellen unter Lat. A-Behandlung ein weitestgehend depolymerisiertes Aktin-Cytoskelett auf, Aktin-Filamente sind nur noch vereinzelt am Zellcortex zu erkennen (Abb. 12 E). Nach 10 min und 15 min Inkubation mit Lat. A ist Aktin nur noch als unklarer Hintergrund in den Zellen zu bemerken (Abb. 12 H, K). Die Überlagerungen der einzelnen Bilder nach Behandlung der Zellen mit Lat. A (Abb. 12 F, I, L) läßt keinen Colokalisation der MPR 300 mit Aktin erkennen.

4.2.4 Erweiterte Suche nach MPR 46-CD-interagierenden Proteinen

Wenn die Fraktionen, die von der GST-MPR 46-Matrix mit 1 M NaCl eluiert wurden (Abb. 4 A) durch SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert werden, sind in Abhängigkeit von der Eluatfraktion unterschiedliche Proteinbanden darstellbar (Abb. 13).

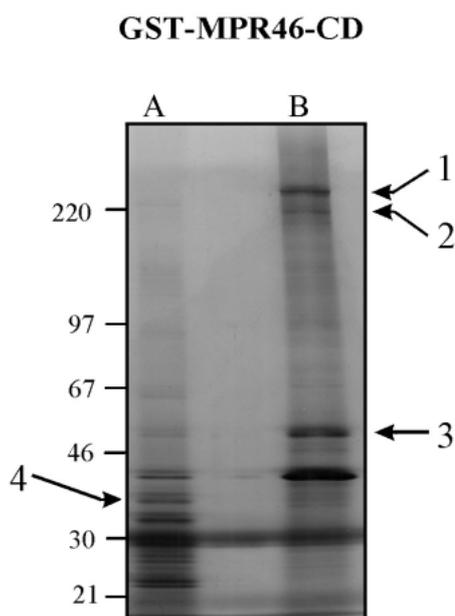


Abb. 13: Silberfärbung zweier Eluatfraktionen der GST-MPR 46-Säule.

Die cytosolische Fraktion adulter Rattenhirne wurde zuerst mit GST- und anschließend mit GST-MPR 46-CD-Matrix für 3 h inkubiert. Beide Säulen wurden mit 1 M NaCl eluiert. 1/10 der 3. (Spur A) bzw. 1/2 der 7. (Spur B) Eluatfraktion der GST-MPR 46-CD-Säule wurden durch SDS-PAGE (5-15 % Acrylamid) und anschließender Silberfärbung analysiert. Die mit Pfeilen markierten Banden wurden massenspektrometrisch analysiert. Die Positionen des Proteinstandards sind gekennzeichnet.

In der 3. Eluatfraktion (A) sind niedermolekulare Proteine von 25-40 kDa nachweisbar, während sich in der 7. Eluatfraktion (B) die Zahl und die Zusammensetzung der Proteine davon unterscheidet. Es sind trotz der 5-fach höheren Auftragsmenge der eluierten Fraktion 7 vor allem zwei Proteine von 43 und 55 kDa und zwei hochmolekulare Proteine von ca. 200 und 240 kDa sichtbar. Die vier mit Pfeilen gekennzeichneten Proteinbanden wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Kriterien für die Datenbanksuche waren die Spezies und das Molekulargewicht der Proteine. Die massenspektrometrische Analyse erbrachte 18 Proteine, von denen 13 (z.B. ATP Synthase, mitochondrial Precursor; α -Untereinheit eines Natrium-Kanals; Transkriptionsfaktor IIF, Testis-spezifisches T-Box-Protein1, DNA-Topoisomerase II, 2,3-Bisphosphoglycerat Mutase) für weitere Untersuchungen nicht in Betracht gezogen wurden wegen ihrer Lokalisation in der Zelle (ATP Synthase: Mitochondrien, 2,3-Bisphosphoglycerat Mutase: Erythrocyten), weil sie für bestimmte Organe spezifisch sind (T-Box-Protein1: Testis) oder

weil es sich dabei nicht um cytosolische sondern membranständige Proteine handelt (Natrium-Kanal, Insulin-Rezeptor, Sortilin-Related Receptor Precursor).

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse, die für weitere Untersuchungen in Betracht gezogen wurden, sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Tab. 4: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der ausgeschnittenen Proteinbanden.

Nr.	Protein	Molekulare Masse (kDa)	Spezies	Masses matched (%)
1	Talin	269	Maus	8
	Myosin VII	230	Maus	10
2	Tiam 1	205	Maus	9
3	Tubulin	55	Ratte	10
4	Annexin III	33	Ratte	6

4.2.4.1 Westernblot-Analyse

Um die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse zu verifizieren wurden Eluate (jeweils die 1. Fraktion) der GST- und GST-MPR 46 Säulen in gleichen Mengen durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und anschließend mit polyklonalen Antikörpern gegen Talin, Myosin VII, Tiam 1, Annexin III und einem monoklonalen Maus-anti-Tubulin Antikörper im Westernblot getestet. Als Positivkontrollen dienten jeweils 9 µg des Ausgangsmaterials. Die Ergebnisse der Westernblot-Analyse sind in Abb. 14 zusammengefaßt.

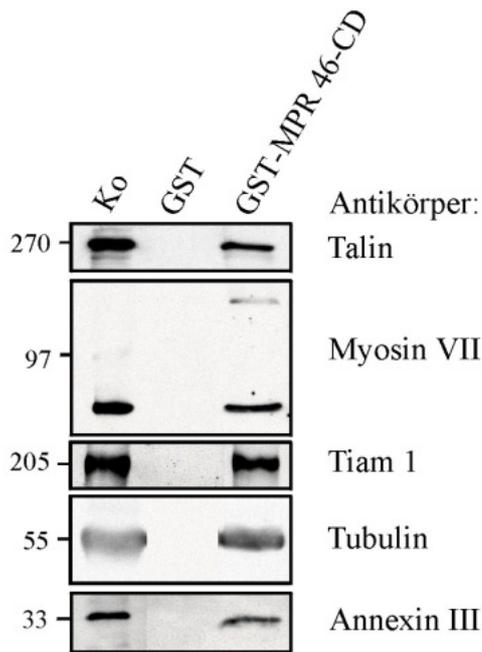


Abb. 14: Westernblot-Analyse verschiedener Antigene in MPR 46-CD-bindenden Proteinfraktionen.

20 % der Eluatfraktionen der GST- und GST-MPR 46-CD-Säulen wurden unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulose transferiert. Als Positivkontrolle (Ko) wurden 9 µg des Ausgangsmaterials (Rattenhirn-Cytosol) aufgetragen. Nach Inkubation mit polyklonalen Antikörpern gegen Talin (1:500), Tiam (1:500), Myosin VII (1:200) und Annexin III (1:1000) und einem monoklonalen Antikörper gegen Tubulin (1:500) für 2 h bei RT und HRP-gekoppelten Sekundäntikörper für 1 h bei RT erfolgte die Visualisierung der gebundenen Antikörper mit ECL-Reagenz. Die Positionen des Proteinstandards sind gekennzeichnet.

Die MPR 46-CD bindende Proteinfraktion enthält Talin (269 kDa)-, Tiam 1 (205 kDa)-, Tubulin (55 kDa)- und Annexin III (33 kDa)- immunreaktives Material der zu erwartenden molaren Masse. Diese Proteine wurden auch in dem Ausgangsmaterial (Cytosol des Rattenhirns), das als Positivkontrolle (Ko) diente, detektiert, jedoch nicht in Eluatfraktionen der GST-Säule. Annexin III aus der MPR 46-CD bindenden Proteinfraktion zeigt ein unterschiedliches Laufverhalten in der SDS-PAGE im Vergleich zu Annexin III im Ausgangsmaterial. Bei der zu erwartenden Größe von 230 kDa war keine Immunreaktion mit dem Antikörper gegen Myosin VII feststellbar, dafür aber bei ~120 kD und 85 kDa.

Die Eluate der GST- und GST-MPR 46-CD-Säulen wurden auch auf bereits bekannte Interaktionspartner für die MPR 46-CD (Adaptoren AP-1 und AP-2, GGA 3) im Westernblot getestet (Abb. 15).

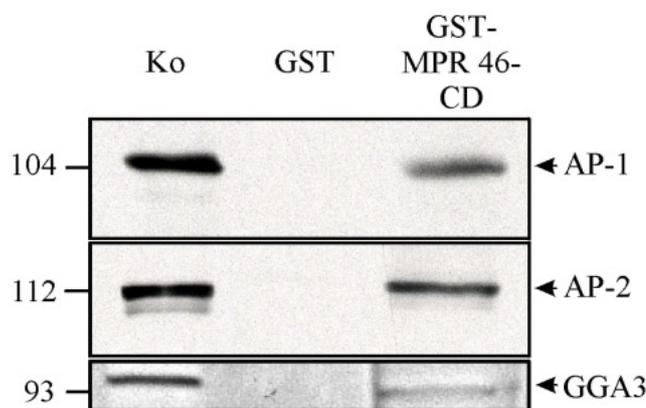


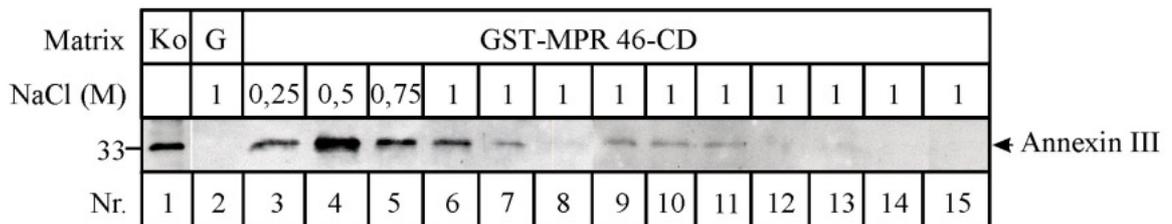
Abb. 15: Präsenz bekannter cytoplasmatischer Adaptorproteine in der MPR 46-CD bindenden Proteinfraktion.

20 % der Eluatfraktion der GST- und GST-MPR 46-CD-Säulen wurden nach SDS-PAGE und Transfer auf Nitrocellulose mit einem monoklonalen anti γ AP-1- und anti α AP-2 und einem polyklonalen anti GGA3 Antikörper inkubiert und anschließend durch HRP-gekoppelte Sekundäntikörper und ECL sichtbar gemacht. Als Positivkontrolle (Ko) dienten 11 µg des Ausgangsmaterials. Die Positionen des Proteinstandards sind gekennzeichnet.

In Abb. 15 ist zu sehen, daß sowohl γ AP-1- und α AP-2- als auch GGA 3-immunreaktives Material in dem Eluat der GST-MPR 46-CD-Säule und der Positivkontrolle (Cytosol des Rattenhirns) detektiert wurden, nicht jedoch in dem Eluat der GST-Säule. Dabei ist festzustellen, daß GGA 3 aus der MPR 46-CD bindenden Proteinfraction ein anderes Laufverhalten in der SDS-PAGE aufweist als GGA 3 aus dem Ausgangsmaterial.

Da in Abb. 13 bei 25-40 kDa Unterschiede zwischen der 3. und 7. Eluatfraktionen zu erkennen sind, wurden Westernblot-Analysen durchgeführt, um das Vorkommen der fünf genannten Proteine (Tab. 4) in den einzelnen Eluatfraktionen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden 1/3 jeder Eluatfraktion und GST-MPR 46-CD-Säulen und repräsentativ 1/3 einer Eluatfraktion der GST-Säule elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und die Verteilung von Talin, Myosin VII, Tiam 1, Tubulin, Aktin und Annexin III im Westernblot getestet. In Abb. 16 sind repräsentativ Westernblot-Analysen für Annexin III (33 kDa) aus dem niedermolekularen Bereich und Talin (269 kDa) aus dem hochmolekularen Bereich dargestellt.

A



B

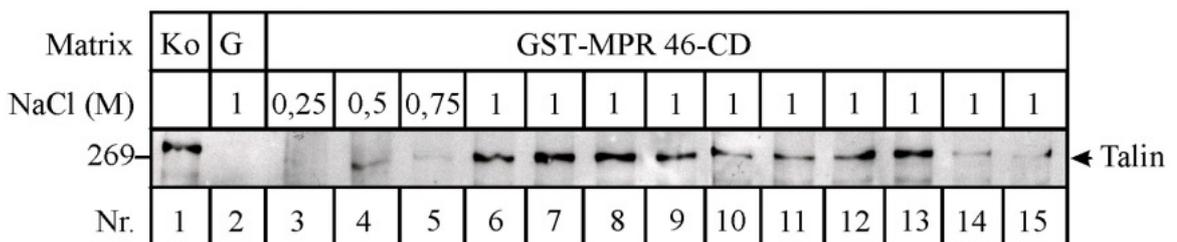


Abb. 16: Verteilung von Annexin III und Talin in verschiedenen Eluatfraktionen einer GST-MPR 46-Säule.

Cytosol des Rattenhirns wurde zuerst mit GST- und anschließend mit GST-MPR 46-CD-Matrix inkubiert und gebundene Proteine mit 1 ml diskontinuierlich ansteigenden NaCl-Konzentrationen und 10 x 1 ml 1M NaCl eluiert. 1/3 jeder Eluatfraktion der GST-MPR 46-CD-Säule und repräsentativ einer Eluatfraktion der GST-Säule (G) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Als Positivkontrolle (Ko) wurden 11 μ g des Ausgangsmaterials aufgetragen. Der Nachweis von Annexin III und Talin erfolgte durch Westernblot und ECL.

In Abb. 16 A ist zu sehen, daß Annexin III in den ersten fünf Eluatfraktionen detektiert werden konnte (Bahnen 3-7). Bereits mit 0,25 M NaCl konnte Annexin III von der GST-MPR 46-CD-Säule eluiert werden (Bahn 3). In der Fraktion, die mit 0,5 M NaCl erhalten wurde, war die höchste Menge Annexin III nachweisbar (Bahn 4) die in den nachfolgenden eluierten Fraktionen kontinuierlich abnahm. In der 7.- 10. Fraktion war Annexin III nur noch in Spuren zu erkennen (Bahnen 12-15). Im gepoolten Eluat (1M NaCl) der GST-Säule war Annexin III erwartungsgemäß nicht feststellbar (Bahn 2).

Die Westernblot-Analyse der gleichen Eluatfraktionen der GST-MPR 46-CD-Säule mit polyklonalem Antiserum gegen Talin (Abb. 16 B) zeigte, daß dieses Protein, im Gegensatz zu Annexin III, nur in Spuren mit 0,5 und 0,75 M NaCl eluiert werden konnte. In den ersten acht Fraktionen, die mit 1 M NaCl eluiert wurden (Bahnen 6-13), war Talin detektierbar, während die 9. und 10. Fraktion (Bahnen 14 und 15) nur noch in Spuren Talin aufweisen. Im Eluat der GST-Säule konnte Talin nicht festgestellt werden (Bahn 2).

Die repräsentativ gezeigten Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen Annexin III und Talin bestätigen das Ergebnis der Silberfärbung (Abb. 13). Annexin III konnte bereits mit niedrigen NaCl-Konzentrationen (0,25 und 0,5 %) von der GST-MPR 46-CD eluiert werden und war aus diesem Grund in früheren Eluatfraktionen (Abb. 13 A) sichtbar als z. B. Talin das noch in der 8. Eluatfraktion deutlich detektiert werden konnte.

4.2.5 Copräzipitations-Analysen

Mit einem zweiten, unabhängigen Ansatz, sollte die Interaktion der bisher charakterisierten Proteine (Talin, Myosin VII, Tiam 1, Tubulin, Aktin und Annexin III) nachgewiesen werden. Dazu wurde GST bzw. GST-MPR 46-CD an Glutathion-Agarose-Matrix gekoppelt, mit der cytosolischen Rattenhirnfraktion inkubiert und die mit der Matrix copräzipitierten Proteine durch Westernblot-Analyse charakterisiert.

Für einige Copräzipitations-Analysen wurde ein mutiertes Fusionsprotein, in dem das Tyrosinhaltige Internalisierungssignal (⁴⁵YRGV⁴⁸, Johnson et al., 1990) gegen (⁴⁵ARGA⁴⁸) ausgetauscht worden war (GST-MPR 46-CD-Y⁴⁵,V⁴⁸→A, Abb. 3) eingesetzt. Als Positivkontrolle diente Cytosol des Rattenhirns. Die Präzipitation erfolgte bei einer Salzkonzentration von 150 mM NaCl in Anwesenheit von 1 % Triton X-100.

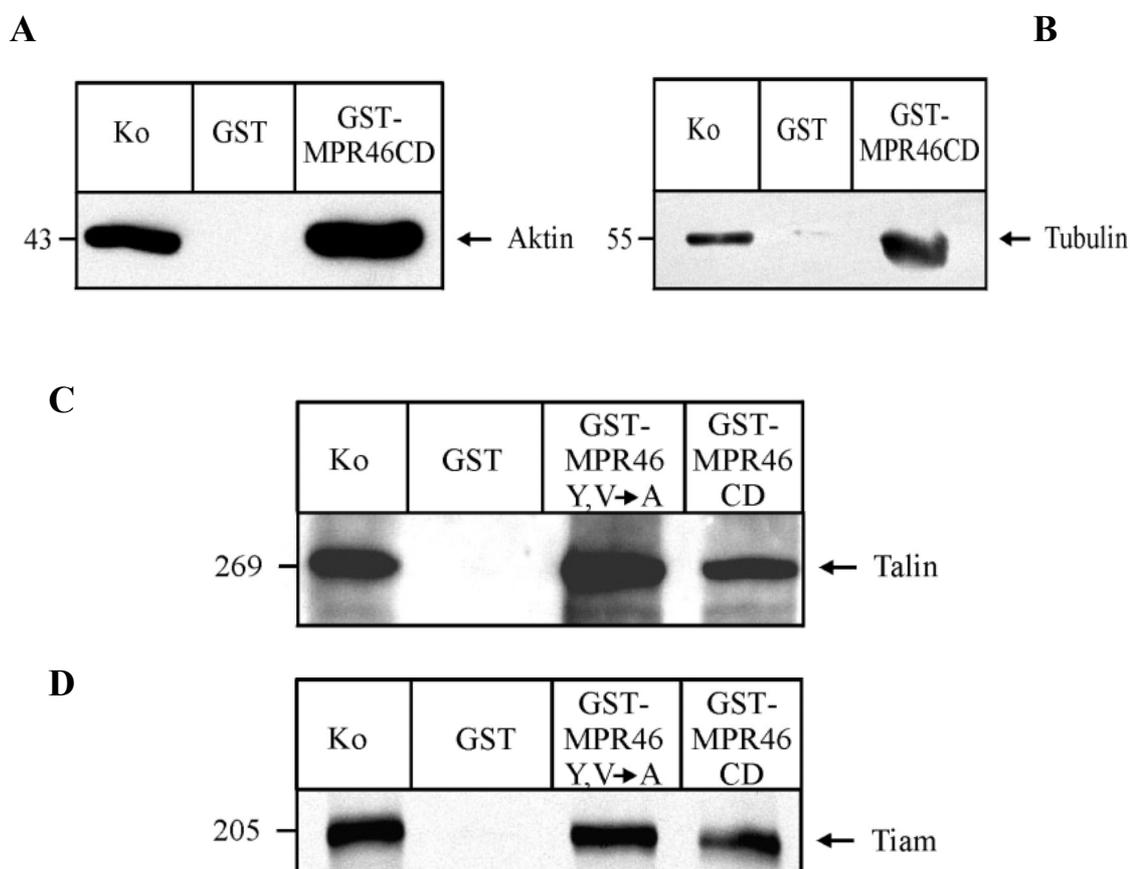


Abb. 17: Westernblot-Analysen nach Copräzipitation cytoplasmatischer Proteine aus Rattenhirn mit Wildtyp- und mutierter GST-MPR 46-CD.

25 μ l einer 50 % igen Glutathion-Agarose-Matrix, gebunden an GST bzw. an die Fusionsproteine GST-MPR 46-CD und GST-MPR46 CD-Y⁴⁵,V⁴⁸→A wurden mit Rattenhirn-Cytosol (Ko, 1 mg Protein) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Glutathion-Agarose-Matrix wurde gewaschen, die gebundenen Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Der Gehalt an Talin, Myosin VII, Tiam 1, Aktin und Annexin III wurde durch Westernblot-Analyse und ECL bestimmt.

In Abb. 17 A und B ist zu sehen, daß die beiden cytoskelettalen Proteine Aktin und Tubulin sowohl in der Positivkontrolle (Cytosol des Rattenhirns) als auch nach Präzipitation mit GST-MPR 46-CD, nicht jedoch mit GST, detektiert werden konnten.

Talin und Tiam 1 wurden sowohl mit dem GST-MPR 46-CD- als auch mit GST-MPR46 CD-Y⁴⁵,V⁴⁸→A-Fusionsprotein präzipitiert (Abb. 17 C und D). GST zeigt erwartungsgemäß keine Bindung an Talin oder Tiam 1. Die Interaktion mit der mutierten cytoplasmatischen Domäne des MPR 46, GST-MPR46 CD-Y⁴⁵,V⁴⁸→A, war nicht beeinträchtigt im Vergleich zu dem Wildtyp-GST-MPR46 CD-Protein.

Der zur Verfügung stehende polyklonale Kaninchen-anti-Annexin III Antikörper kreuzreagierte im Westernblot auch mit GST- (28 kDa), GST-MPR46 CD- und GST-MPR46 CD-Y⁴⁵,V⁴⁸→A (je 33 kDa). Ein spezifischer Nachweis von Annexin III war

daher nach der Copräzipitations-Analyse nicht möglich. Aus diesem Grund wurde eine Copräzipitation mit jodiertem rekombinantem Annexin III und Glutathion-Agarosegekoppeltem GST- bzw. GST-MPR 46-CD mit anschließender SDS-PAGE und Autoradiographie durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, daß [¹²⁵I]-Annexin sowohl mit GST- als auch mit GST-MPR 46-CD präzipitiert wurde (nicht gezeigt).

Myosin VII konnte nach Copräzipitations-Analysen mit GST-MPR46 CD nicht im Westernblot nachgewiesen werden.

4.2.6 Indirekte Immunfluoreszenz-Analysen an kultivierten Zellen

Um die subzelluläre Lokalisation der MPR 46 und Talin, Myosin VII, Tiam 1, Tubulin und Annexin III zu analysieren, wurden indirekte Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt. Da nur Antikörper gegen humanes Talin, Tiam 1, Myosin VII und Annexin III zur Verfügung standen, wurde die humane SH-SY5Y Neuroblastoma-Zelllinie ausgewählt. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden diese simultan mit polyklonalen anti-MPR 46 aus Kaninchen oder Ziege und polyklonalen anti-Talin, Tiam 1, Myosin VII bzw. Annexin III inkubiert. Für Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen von MPR 46- und Tubulin wurden BHK MPR 46-Zellen eingesetzt. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte mit fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern.

SH-SY5Y Neuroblastoma-Zellen

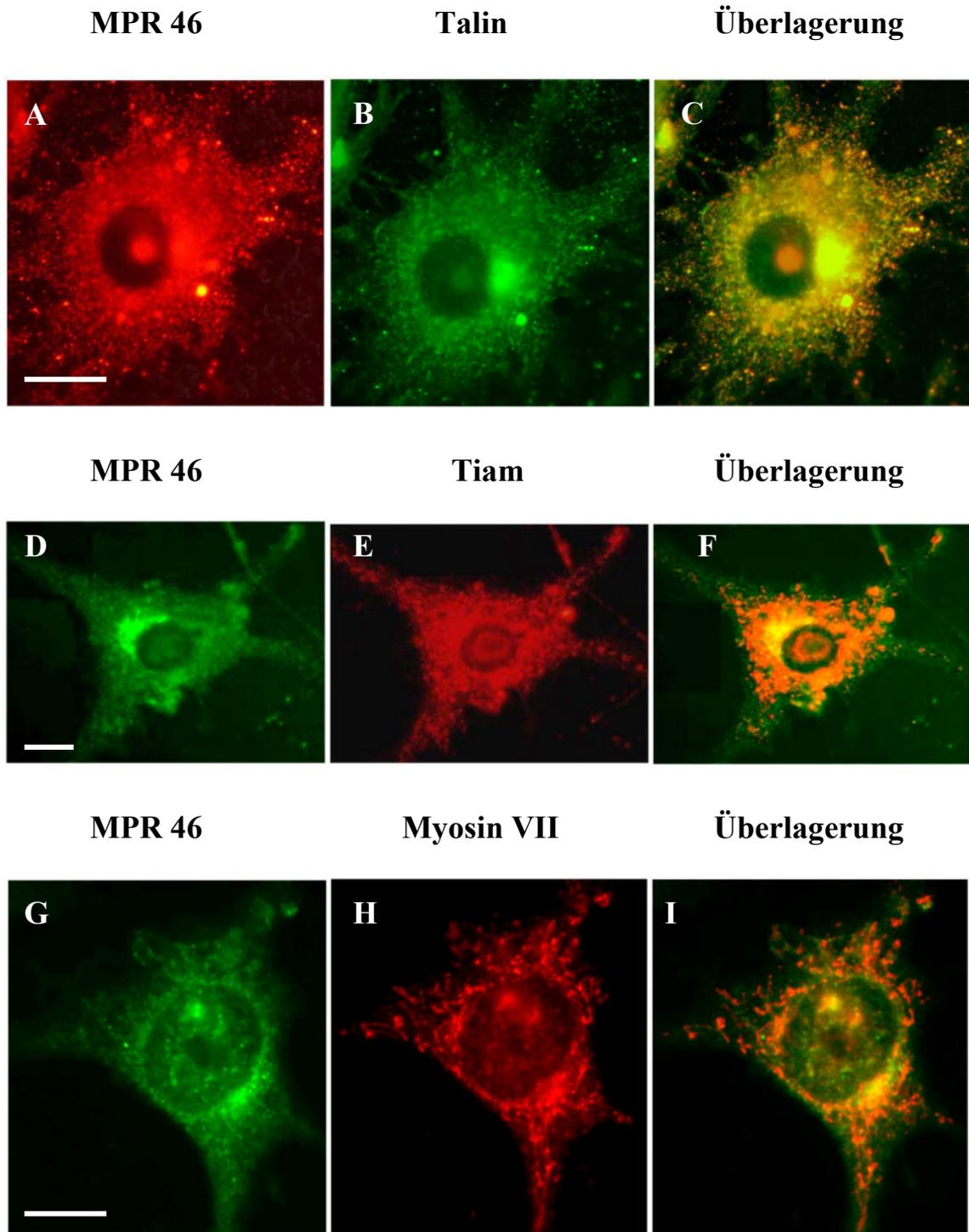


Abb. 18: Colokalisation von MPR 46 und Talin, Myosin VII, Tiam 1 und Tubulin in humanen SH-SY5Y Neuroblastoma-Zellen.

Subkonfluente SH-SY5Y Neuroblastoma-Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und simultan mit polyklonalen Kaninchen-anti-MPR 46- und Ziege-anti-Talin- (A-C), Maus-anti-MPR 46 (21D3)- und Kaninchen-anti-Tiam 1 (D-F), Kaninchen-anti-MPR 46- und Maus-anti-Myosin VII-Antikörpern (G-I) inkubiert. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte mit folgenden fluoreszenzgekoppelten Sekundär-

antikörpern: MPR 46: Ziege-anti-Kaninchen Cy3 (rot, A); Talin: Kaninchen-anti-Ziege FITC (grün, B); MPR 46: Schaf-anti-Maus FITC (grün, D); Tiam 1: Ziege-anti-Kaninchen Cy3 (rot, E); MPR 46: Ziege-anti-Kaninchen Cy2 (grün, G); Myosin VII: Schaf-anti-Maus-Cy3 (rot, H). Die jeweiligen Überlagerungen sind in (C), (F) und (I) dargestellt. (Balken \cong 10 μ m).

Auch die humanen SH-SY5Y Neuroblastoma-Zellen weisen nach Detektion des MPR 46 eine Färbung im perinucleären Bereich auf (Abb. 18 A), die allerdings, im Vergleich zu BHK MPR 46-Zellen, nicht so deutlich zu sehen ist. Zahlreiche MPR 46-haltige Vesikel sind detektierbar. Der polyklonale Antikörper gegen Talin färbt ebenfalls den perinucleären Bereich und zahlreicher Vesikel an (Abb. 18 B). Eine Überlagerung beider Bilder zeigt eine hochgradige Colokalisation zwischen MPR 46 und Talin, die nicht nur im perinucleären Bereich sondern auch in einzelnen Vesikeln zu erkennen ist (Abb. 18 C).

Die Immunfluoreszenz-Färbung mit dem monoklonalen MPR 46- Antikörper 21-D3 und einem polyklonalen Tiam 1-Antikörpern ist in Abb. 18 D-F zu sehen. Tiam 1 ist in der gesamten Zelle in vesikulären Strukturen nachweisbar, wobei eine Verdichtung um den Nucleus herum bemerkt werden kann (Abb. 18 E). Eine Überlagerung beider Bilder zeigt eine Colokalisation der Antigene im perinucleären Bereich, jedoch nicht in einzelnen Vesikeln an der Zellperipherie (Abb. 18 F).

Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen mit polyklonalen anti-MPR 46- und anti-Myosin VII-Antikörpern sind in Abb. 18 G-I gezeigt. Myosin VII weist eine perinucleäre Lokalisation auf (Abb. 18 H), ist aber auch in Vesikeln detektierbar. Eine Überlagerung mit dem MPR 46 (Abb. 18 G) zeigt eine Colokalisation im perinucleären Bereich, jedoch nicht in einzelnen Vesikeln (Abb. 18 I).

Lokalisations-Analysen nach Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen bei SH-SY5Y-Neuroblastoma-Zellen für MPR 46 und Annexin III-Antikörpern waren nicht möglich, da der zur Verfügung stehende anti-Annexin III-Antikörper keine Färbung des Antigens erlaubte.

BHK MPR 46-Zellen

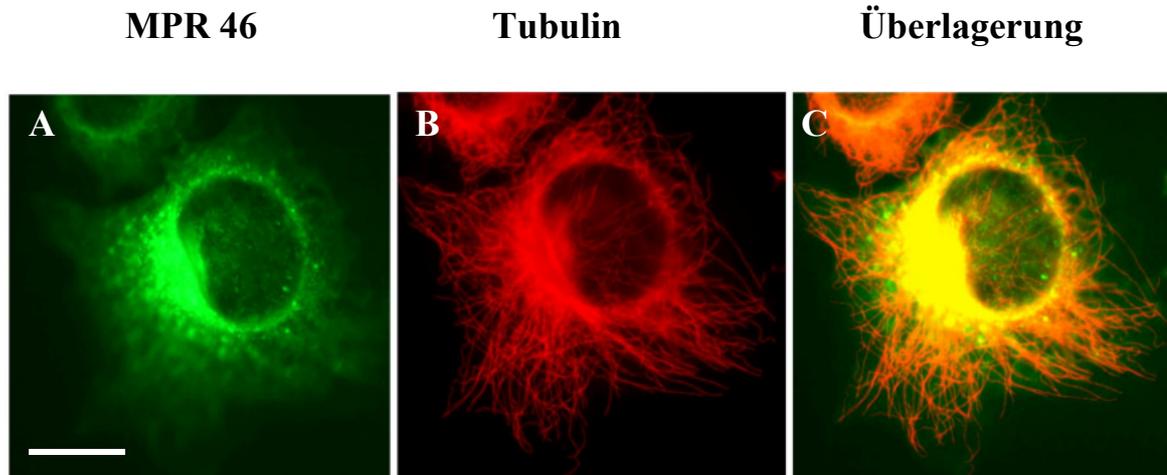


Abb. 19: Colokalisation von MPR 46 und Tubulin in BHK MPR 46-Zellen.

Subkonfluente BHK MPR 46-Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und simultan mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-MPR 46- und einem monoklonalen anti-Tubulin-Antikörper inkubiert. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte mit Ziege-anti-Kaninchen Cy2 (grün, A) und Schaf-anti-Maus-Cy3 (rot, B) Sekundärantikörpern. Die Überlagerungen beider Bilder ist in (C) dargestellt. (Balken $\cong 10 \mu\text{m}$).

In Abb. 19 A ist bei BHK MPR 46-Zellen eine perinucleäre Struktur zu sehen, welche die Mehrheit der MPR 46 enthält und dem tGN entspricht. Zahlreiche MPR 46-haltige Vesikel, die endosomalen Membranen entsprechen, sind detektierbar. In Abb. 19 B sind die Mikrotubuli dieser Zelle zu sehen. Das Centrosom der Mikrotubuli, das in der Nähe des Nucleus liegt, ist klar zu erkennen. Eine Überlagerung beider Bilder (Abb. 19 C) zeigt eine deutliche Colokalisation des MPR 46 mit Tubulin im perinucleären Bereich (gelb). Außerhalb dieses Bereiches sind MPR 46-haltige Vesikel zu erkennen, die nicht mit Tubulin colokalisieren (grün).

5 DISKUSSION

5.1 Suche nach Interaktionspartnern für die cytoplasmatische Domäne des 46 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptors

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neue cytosolische bzw. membranassoziierte Proteine gesucht, die mit der cytoplasmatischen Domäne (CD) des MPR 46 interagieren. Zu diesem Zweck wurden zwei Hirn-cDNA-Banken (Ratte und Mensch) mit Hilfe des *yeast-two-hybrid*-System untersucht. Anschließend wurden potentielle Bindungspartner der MPR 46-CD aus der cytosolischen Fraktion des Rattenhirns durch Affinitätschromatographie aufgereinigt und durch Massenspektrometrie analysiert. Die Daten wurden durch Copräzipitations-Analysen und Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen verifiziert. Die physiologische Bedeutung eines der Interaktionspartner, Aktin, für den Transport neusynthetisierter lysosomaler Enzyme wurde durch Untersuchung der Endocytoserate des MPR 46 und der MPR 46-vermittelten Sortierung lysosomaler Enzyme im tGN an kultivierten Zellen mit intaktem und depolymerisiertem Aktin-Cytoskelett getestet und die Spezifität der gefundenen Interaktion überprüft.

5.1.1 Das *yeast-two-hybrid*-System

Mit dem *yeast-two-hybrid*-System können potentielle Bindungspartner für ein bereits bekanntes Protein identifiziert werden. Ein Vorteil dieses Systems ist seine außerordentliche Sensitivität, die es erlaubt, selbst schwache Bindungen nachzuweisen. Ein weiterer Vorteil ist, daß die Interaktion der Proteine in Hefezellen stattfindet, wo die Bedingungen, auch wenn sie nicht in jeder Hinsicht den nativen entsprechen, doch den Proteinen eher angemessen sind, als sie *in vitro* geschaffen werden könnten. Ebenfalls vorteilhaft ist die sofortige Verfügbarkeit der cDNA des interagierenden Proteins [113].

Nachteilig an diesem System sind mögliche Detektionen falschpositiver Interaktionen, die darauf zurückzuführen sind, daß die Reportergene autonom transkribiert werden. Dabei kommt es zu bislang ungeklärten Interaktionen des Aktivierungsdomäne-Hybridproteins

mit Transkriptionsfaktoren oder dem Promotor des Reportergens. Die falschpositiven Interaktionspartner können weitestgehend durch Kotransformation der Fusions-Plasmide in einen anderen Hefestamm, dessen Reportergene unter der Kontrolle eines anderen Promotors stehen, ausgesondert werden, oder indem dem Wachstumsmedium der kompetitive Inhibitor 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) hinzugefügt wird.

Auch wird durch dieses System nicht bewiesen, daß detektierte Interaktionen zwischen Proteinen tatsächlich *in vivo* stattfinden, da diese Proteine möglicherweise in unterschiedlichen Stadien der Ontogenese exprimiert werden oder räumlich voneinander getrennt sind, so daß sie nicht in Kontakt zueinander treten können [114]. Die hohe Sensitivität des *yeast-two-hybrid*-Systems hat den Nachteil, daß diese Bindungen oft schwerlich durch andere Testverfahren bestätigt werden können.

Da bei *yeast-two-hybrid*-Analysen die Interaktion der Proteine im Nucleus der Hefezellen stattfindet, können Wechselwirkungen, die auf posttranslationalen Modifikationen beruhen, nicht detektiert werden. Die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 ist am ^{57}S phosphoryliert (β -Turn-Struktur) und an den $^{30}\text{C}/\text{C}^{34}$ -Reste palmitoyliert (Loop-Bildung), wobei gezeigt werden konnte, daß die Loop-Bildung und -Länge entscheidend für die Stabilität des MPR 46 ist [39] [115].

Auch sind die Bedingungen im Nucleus unterschiedlich zu denen im Cytoplasma. Dieser Nachteil könnte minimiert werden, indem man ein *yeast-two-hybrid*-System einsetzt, bei dem die Wechselwirkungen der Proteine im Cytoplasma der Hefezellen stattfinden (Firma Stratagene). Wegen der genannten Nachteile ist es erforderlich, die im *yeast-two-hybrid* System detektierten Interaktionen durch weitere Testverfahren, wie Affinitätschromatographie, Coimmunpräzipitation und immunfluoreszenzmikroskopische Analysen zu überprüfen.

Ein kritischer Punkt bei der Analyse von Proteininteraktionen mit dem *yeast-two-hybrid*-System ist die Auswahl geeigneter Bindungsdomäne-Vektoren. Die Interaktion zwischen dem MPR 46-CD und den $\mu 2$ - und $\mu 3\text{A}$ -Adaptor-Untereinheiten konnte nur unter Verwendung des BD-Vektors pAS2 nachgewiesen werden, während mit den BD-Vektoren pGBT9 und pAS2-1 kein Histidin-unabhängiges Wachstum der kotransformierten Hefezellen beobachtet wurde (Storch,1999). Im Gegensatz zu den Vektoren pGBT9 und pAS2-1 induziert der Vektor pAS2 die Expression von Fusionsproteinen, die zwischen der Gal4-BD und dem Sondenprotein eine eingefügte Sequenz von 26 Aminosäuren enthalten. Ohno et al.[116] konnten zeigen, daß der Abstand

des Tyrosin-haltigen Internalisierungssignals des TGN38-CD von der Gal4-BD die Stärke der Wechselwirkung mit den μ 1- und μ 2-Untereinheiten beeinflusst. Möglicherweise blockiert die Gal4-BD bei Verwendung des Vektors pGBT9 und pAS2-1 die Wechselwirkung von N-terminalen Sequenzen der MPR 46-CD mit den μ 2- und μ 3-Untereinheiten.

Die Auswahl der geeigneten cDNA-Bank ist ebenfalls ein entscheidender Faktor für den erfolgreichen Einsatz des *yeast-two-hybrid*-Systems. Da die mRNA zur Herstellung der Rattenhirn- und der humanen Hirn-Bank mit Oligo-dT-Primern transkribiert wurde, besitzen alle cDNA-Sequenzen den kompletten 3'-nicht-translatierten Bereich, so daß bei einer durchschnittlichen cDNA-Länge von 1,7 bzw. 1,5 kb N-terminale Domänen möglicher größerer interagierender Fusionsproteine (>400-500 Aminosäuren) oder solche, die über N-terminale Domänen mit der MPR 46-CD interagieren könnten, nicht repräsentiert sind. Ferner ist zu bedenken, daß die Gesamtheit der amplifizierten cDNA-Sequenzen der Rattenhirn-Bank an *EcoRI*-Adaptoren und der humanen Hirn-Bank an *XhoI/EcoRI*-Adaptoren legiert war, so daß nur 1/6 der Rattenhirn-Bank eine korrekte Orientierung und den richtigen Leserahmen bzw. 1/3 der humanen Hirn-Bank den richtigen Leserahmen bezüglich der Gal4-AD besitzen [117].

Weitere kritische Punkte, die vor der Anwendung des *yeast-two-hybrid*-Systems geklärt werden müssen, sind die Expression, Stabilität und Nicht-Toxizität des Sondenproteins sowie die Unfähigkeit desselben zur autonomen Transaktivierung der Reporter gene.

Nach Untersuchung einer Rattenhirn-Bank mit der MPR 46-CD als Sonde, einkloniert in den Vektor pAS2, wurden 789 His⁺- und lacZ⁺-Klone isoliert. Einundzwanzig dieser Klone zeigten innerhalb der ersten 30 min eine intensive Blaufärbung im β -Galactosidase-Test und wurden weiteren Analysen unterzogen. Nach Restriktionsspaltung der 21 Klone wurden anhand des Restriktionsfragmentmusters 14 unterschiedliche Klone identifiziert (Abb. 1). Nach DNA-Sequenzierung und Vergleich der cDNA-Sequenzen unter Verwendung des NCBI-BLAST-Programms wiesen alle Klone bis auf drei ein frühzeitiges Stopcodon auf. Die drei gefundenen, mit der cytoplasmatischen Domäne des MPR 46 interagierenden, Proteine (Pancreatic Elastase II, Vascular Endothelial Growth Factor-A144 und Mitochondrial Cytochrome Oxidase SU I, II, III) erschienen nicht sinnvoll, da die Pankreas-Elastase, eine Serin-Protease, in sekretorischen Organellen lokalisiert ist und somit nur mit der luminalen und nicht mit der cytoplasmatischen Domäne des MPR 46 in

Kontakt treten könnte. Der Endotheliale Wachstumsfaktor ist ein extrazelluläres Protein und somit auch kein geeigneter Interaktionspartner für die MPR 46-CD. Cytochrom Oxidase ist in Mitochondrien lokalisiert, was eine Wechselwirkung mit der MPR 46-CD aus räumlichen Gründen unmöglich macht.

Um auszuschließen, daß die eingefügte Spacer-Sequenz von 26 Aminosäuren zwischen der Gal4-BD und dem Sondenprotein, die der Vektor pAS2 bei der Expression von Fusionsproteinen induziert, für die hohe Zahl unspezifischer Interaktionen nach Untersuchung der Rattenhirn-Bank verantwortlich war, wurde eine humane Hirnbank mit der MPR 46-CD, einkloniert in den Vektor pGBT9, untersucht. Das von diesem Vektor exprimierte Fusionsprotein bestand aus der Gal4-BD, die übergangslos mit dem Sondenprotein (MPR 46-CD) verbunden war. Ein Vorteil der humanen Hirn- im Vergleich zu der Rattenhirn-Bank war, daß die cDNA-Sequenzen an *XhoI/EcoRI*-Adaptoren ligiert und somit gerichtet einkloniert waren. Eine falschpositive Interaktion mit AD-Fusionsproteinen aufgrund einer falschen Orientierung der cDNA konnte somit ausgeschlossen werden.

Nach Untersuchung der humanen Hirn-Bank mit pGBT9-MPR 46-CD als Sonde wurden 41 His⁺- Klone isoliert, von denen 3 (7,3 %) einen lacZ⁺- Phänotyp zeigten. Eine Sequenzanalyse der drei cDNA-Sequenzen ergab ein frühzeitiges Stopcodon bei zwei Klonen. Die cDNA-Sequenz des dritten Klons konnte nach mehreren Versuchen aufgrund vorzeitigen Abbruchs der Sequenzanalyse, vermutlich durch eine 5'-GC-reiche Region, nicht ermittelt werden. Möglicherweise wäre eine Analyse dieses Klons nach Abspaltung dieser Sequenz erfolgreich.

In beiden *yeast-two-hybrid*-Analysen konnte eine autonome Aktivierung der Reportergene ausgeschlossen werden, da Hefezellen, die nur mit den positiv interagierenden AD-Plasmiden transformiert worden waren, keine β -Galactosidase-Expression aufwiesen. Auch eine Wechselwirkung der AD-Plasmide mit der Gal4-Domäne des BD-Vektors schien unwahrscheinlich, da nach Kotransformation der AD-Plasmide mit den Konstrukten pAS2 bzw. pGBT9 in Abwesenheit der MPR 46-CD kein Wachstum auf His-freiem Medium festzustellen war. Eine unspezifische Bindung zwischen der MPR 46-CD und dem AD-Fusionsprotein wurde durch Kotransformation mit pLamin C ausgeschlossen, da Lamin C, ein Kernlamina-Protein, eine Vielzahl unspezifischer Bindungen mit anderen Proteinen eingeht.

Zur Minimierung falschpositiver Wechselwirkungen wurde die Analyse in Gegenwart des kompetitiven Inhibitors 3-AT durchgeführt. Weitere Kontrollen zur Expression, Stabilität und Toxizität des MPR 46-CD-Sondenproteins wurden in früheren Arbeiten durchgeführt [47] und die autonome Transaktivierung der Reportergene durch die MPR 46-CD wurde parallel bei jeder Analyse ausgeschlossen.

Zusammenfassend wurden bei der Untersuchung einer Rattenhirn-Bank mit der MPR 46-CD-cDNA, inkloniert in den Vektor pAS2, 789 primärpositive Klone identifiziert, von denen 21 sequenziert wurden. Bei der Untersuchung einer humanen Hirnbank mit dem Vektor pGBT9-MPR46-CD wurden 41 Klone detektiert, von denen drei einer Sequenzanalyse unterzogen wurden. Keine der sequenzierten cDNA-Klone kodierte für einen sinnvollen potentiellen Interaktionspartner der MPR 46-CD.

Andere cDNA-Banken wurden aus Zeitgründen nicht mehr untersucht. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt wurden in der Literatur keine erfolgreichen *yeast-two-hybrid*-Analysen mit der cDNA des MPR 46-CD als Sonde beschrieben. Mit der MPR 300-CD als Sonde konnte im *yeast-two-hybrid*-System TIP 47 als Interaktionspartner für die cytoplasmatische Domäne des MPR 300 ermittelt werden [100].

5.1.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung MPR 46-CD-bindender Proteine

In einem zweiten Ansatz wurden affinitätschromatographische Untersuchungen durchgeführt, um aus dem Cytosol des Rattenhirns Proteine zu isolieren, die mit der MPR 46-CD in Wechselwirkung treten können.

Da die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 innerhalb der bisher klonierten Spezies zu 100 % konserviert ist, war zu erwarten, daß auch Proteine der Ratte an die eingesetzte MPR 46-CD, die von der humane MPR 46-CD-cDNA codiert wurde, binden und keine Spezies-bedingten Schwierigkeiten auftreten würden. Der Vorteil bei dem Einsatz des Rattenhirns war, daß relativ schnell große Mengen einer frischen cytosolischen Fraktion präpariert werden konnten und daß die Datenbank bisher identifizierter Proteine der Ratte sehr umfangreich ist. Die Spezifität der Bindung potentieller Interaktionspartner an die GST-MPR 46-CD-Säule wurde dadurch gewährleistet, daß das Rattenhirn-Cytosol zuerst mit einer GST-Matrix inkubiert wurde, um unspezifisch bindende Proteine zu eliminieren.

Die Elution gebundener Proteine begann erst, nachdem durch Waschpuffer keine unspezifisch gebundenen Proteine mehr entfernt werden konnten.

Die eluierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und einer Coomassie-Blue- oder Silberfärbung unterzogen. Angefärbte Proteinbanden wurden massenspektrometrisch analysiert oder direkt nach Coomassie-Blue-Färbung durch Edman-Abbau ansequenziert.

Um ein möglichst breites Spektrum potentieller Interaktionspartner analysieren zu können, wurde eine Gradienten-SDS-PAGE (5-15 % Acrylamid) durchgeführt. Bei der anschließenden Silberfärbung wurden ca. 24 Proteinbanden detektiert, von denen ca. 30 % eine molekulare Masse kleiner als 30 kDa aufwiesen (Abb. 13). Vier prominente Proteinbanden unterschiedlicher Größe wurden aus dem Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Eine prominente Proteinbande bei 43 kDa wurde nach SDS-PAGE (10 % Acrylamid) und anschließender Coomassie-Blue-Färbung (Abb. 4 A) aus dem Gel ausgeschnitten und durch Edman-Abbau ansequenziert.

Bei der massenspektrometrischen Analyse wurden die im Gel enthaltenen Proteine zunächst tryptisch in Peptide gespalten und anschließend die Massen der einzelnen Peptide im entstandenen Fragmentgemisch gemessen. Das Massenspektrum des Peptidgemisches lieferte für jedes Protein einen spezifischen „Fingerabdruck“. Nachfolgend konnten die Proteine durch eine Suche in einer aktuellen SwissProt-Datenbank mit einer Liste der Peptidmassen identifiziert werden, wobei als Suchparameter die Spezies und das durch SDS-PAGE ermittelte Molekulargewicht verwendet wurden. Bei der Identifizierung wurden die experimentell ermittelten Peptidmassen mit den entsprechenden Werten aus einer theoretischen Fragmentierung aller in den Datenbanken erfaßten Proteine verglichen. Jeder erzielte Treffer spiegelt daher eine bestimmte Wahrscheinlichkeit wider, daß es sich um das angegebene Protein handelt.

Die massenspektrometrische Analyse erbrachte mehrere Treffer für jede der ausgeschnittenen Proteinbanden, was zum einen damit zu erklären ist, daß erzielte Treffer unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten aufwiesen und zum anderen, daß diese Banden mehrere Proteine mit annähernd gleichem Molekulargewicht beinhalten können. Die Kriterien, die angewandt wurden, um Proteine als potentielle Interaktionspartner der MPR 46-CD weiter in Betracht zu ziehen bzw. zu verwerfen, waren zum einen die angegebenen „Matched Masses (%)“, die den Anteil der mit der theoretischen Fragmentierung des Treffers übereinstimmenden Massen an allen im Massenspektrum detektierten Massen angibt. Ein weiteres Kriterium war die Lokalisation der Kandidaten-Proteine in der Zelle.

Als Ausgangsmaterial diente die cytosolische Fraktion des Rattenhirns, weswegen integrale Membranproteine, die bei der Datenanalyse angegeben wurden, wie Natrium-Kanal, Insulin-Rezeptor, Sortilin-Related Receptor Precursor, für weitere Analysen nicht einbezogen wurden. Auch ermittelte Proteine, die in Organellen lokalisiert sind, wo sie aus räumlichen Gründen nicht mit dem MPR 46 interagieren können, oder die organspezifisch exprimiert werden, z.B. die mitochondriale ATP-Synthase, 2,3-Bisphosphoglycerat-Mutase aus Erythrocyten, oder das Testis-spezifische T-Box-Protein1, wurden für anschließende Untersuchungen nicht in Betracht gezogen. Desweiteren traten bei der Analyse Proteine auf, die für den Transport des MPR 46 nicht relevant sind, z.B. Transkriptionsfaktor IIF und DNA-Topoisomerase II, die ebenfalls verworfen wurden. Vor allem aber wurden Literaturangaben beachtet, um festzustellen, ob die angegebene Proteine in Prozesse wie Vesikelbildung, -transport oder -fusion involviert sind oder ob eine Interaktion mit cytoplasmatischen Domänen anderer Rezeptoren beschrieben ist. Aus den genannten Gründen wurden folgende Proteine weiterführenden Analysen unterzogen: Talin (269 kDa), Myosin VII (230 kDa), Tiam 1 (205 kDa), Tubulin (55 kDa), Aktin (43 kDa) und Annexin III (33 kDa).

Der Nachweis von immunreaktivem γ AP-1 und α AP-2, Untereinheiten der Adaptorproteine AP-1 und AP-2, sowie von GGA3 im Eluat der GST-MPR 46-CD-Säule bestätigt die Spezifität und funktionelle Relevanz der gebundenen Proteine und kann gleichzeitig als Kriterium für eine erhöhte Wahrscheinlichkeit gelten, daß eluierte Proteine, die durch Antikörperreaktion nachweisbar sind, echte Interaktionspartner der MPR 46-CD sind.

Da jeder Treffer nur eine Wahrscheinlichkeit widerspiegelte, mit der es sich tatsächlich um das angegebene Protein handelt, mußte die Relevanz der Treffer durch weitere Testverfahren beurteilt werden. Zu diesem Zweck wurden die Eluate der GST- und GST-MPR 46-CD-Säulen einer Westernblot-Analyse unterzogen (Abb. 14). In den Eluaten der GST-MPR 46-CD-Säule wurde Talin-, Myosin VII-, Tiam 1-, Tubulin- Aktin- und Annexin III-immunreaktives Material detektiert, wodurch die Treffer der massenspektrometrischen Analyse, die für weitere Untersuchungen in Betracht gezogen worden waren, bestätigt wurden. Im Eluat der GST-Säule waren diese Proteine nicht nachweisbar.

Da gebundene Proteine anfangs mit ansteigenden NaCl-Konzentrationen eluiert worden waren, konnten Rückschlüsse auf die Stärke der ionischen Wechselwirkungen zwischen der MPR 46-CD und dem interagierenden Protein gezogen werden. Danach geht Talin eine stärkere Wechselwirkung mit der MPR 46-CD ein als Annexin III (Abb. 16). Annexin III

wurde bereits mit 0.5 M NaCl eluiert und konnte somit in früheren Fraktionen detektiert werden als Talin, das erst mit 1 M NaCl von der MPR 46-CD-Säule gelöst werden konnte.

Die potentiellen Bindungspartner der MPR 46-CD, die im Rahmen dieser Arbeit affinitätschromatographisch aufgereinigt wurden, sind im Folgenden einzeln beschrieben.

5.1.2.1 Aktin und die Endocytose von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren

Alle Eukaryonten-Arten enthalten Aktin. In vielen eukaryontischen Zellen ist dieser Bestandteil des Cytoskeletts das häufigste Protein, das über 5 % der gesamten Proteinmenge in der Zelle ausmacht. Jedes Aktin-Molekül ist ein Polypeptid aus 375 Aminosäuren, das ein eng gebundenes ATP-Molekül trägt. Bei allen höheren Eukaryonten gibt es mehrere Aktin-Isoformen, die man in drei verschiedene Klassen teilen kann. Die α -Aktine kommen in den verschiedenen Muskelgeweben vor, β - und γ -Aktine sind die wichtigsten Bausteine in Nicht-Muskelzellen. Die einzelnen Aktin-Isoformen unterscheiden sich nur geringfügig, und alle lagern sich zu Filamenten zusammen. Die Polymerisation gereinigten Aktins *in vitro* erfordert ATP sowie ein- und zweiwertige Ionen, gewöhnlich K^+ und Mg^{2+} . Aktin-Filamente können in den Zellen sowohl stabile als auch labile Strukturen ausbilden. Stabile Aktin-Filamente bilden den Kern der Mikrovilli und sind ein entscheidender Bestandteil des kontraktiven Apparats in Muskelzellen. Viele Zellbewegungen beruhen jedoch auf labilen Strukturen aus Aktin-Filamenten [118].

Ein Großteil des vesikulären Transportes verläuft anhand von Aktin-Filamenten. Für den Transport entlang der Aktin-Filamente sind Motorproteine erforderlich, die zu der Familie der Myosine gehören. Myosine enthalten eine N-terminale Motor-Domäne, die in Abhängigkeit von ATP an Aktin bindet und einen C-Terminus, der mit Vesikeln, die für die jeweilige Myosin-Klasse spezifisch sind [203] interagiert.

Das Aktin-Cytoskeletts spielt auch bei endocytotischen Vorgängen eine wichtige Rolle. Für die meisten tierischen Zellen werden spezifische Makromoleküle aus dem extrazellulären Raum nach Bindung an entsprechende Rezeptoren über Clathrin-umhüllten aufgenommen - ein Vorgang, den man als Rezeptor-vermittelte Endocytose bezeichnet und der eine kritische Bedeutung für eine Vielzahl zellulärer Funktionen spielt. Dabei binden Makromoleküle an komplementäre Zelloberflächen-Rezeptoren, sammeln sich in *Coated Pits* und gelangen als Rezeptor-Ligand-Komplex in Clathrin-beschichteten Vesikeln in die

Zelle. An der Clathrin-abhängigen Endocytose sind mehrere Proteine beteiligt. Dazu gehört der heterotetramere Adaptor AP-2, dem eine Schlüsselstellung bei diesen Prozessen zukommt [67]. AP-2 bindet mit seiner μ 2-Untereinheit an das YXX \emptyset - bzw. NPXY-Internalisierungssignal (X steht für jede beliebige Aminosäure, \emptyset steht für hydrophobe Reste) in cytoplasmatischen Domänen zirkulierender Rezeptoren [62] [119], und mit seiner β 2-Untereinheit an Clathrin, der Hauptkomponente der Vesikel-Hülle, und spielt somit eine wichtige Rolle bei der direkten und indirekten Rekrutierung akzessorischer bzw. regulatorischer Proteine wie z.B. Amphiphysin und Dynamin [120]. Dabei bindet die SH3-Domäne von Amphiphysin die Prolin-reiche Region von Dynamin, das an der Abschnürung der Vesikel beteiligt ist.

Die Entstehung von Vesikeln bei der Rezeptor-vermittelten Endocytose beinhaltet weitere komplexe Proteininteraktionen, die bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht völlig geklärt sind. Dazu gehört auch die Rolle des Aktin-Cytoskeletts. In *S. cerevisiae* konnte durch genetische Analysen gezeigt werden, daß Rezeptor-vermittelte Endocytose entscheidend vom Aktin-Cytoskelett abhängt [121]-[123]. In Säugerzellen sind die Indizien dafür heterogen. Hier konnte nach Einsatz Aktin-depolymerisierender Substanzen [124] eine Inhibition endocytotischer Prozesse in einigen Zelltypen festgestellt werden, jedoch nicht in allen [125]-[128]. So war z.B. bei CHO-Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Toxinen, welche die Dynamik des Aktin-Cytoskeletts stören (Cytochalasin D, Latrunculin A und Jasplakinolid), eine Inhibition der Endocytose zu bemerken [128], während Cos-7- oder humane erythroleukämische K562-Zellen unter diesen Bedingungen keine Veränderung in endocytotischen Prozessen zeigten [128].

Für das Aktin-Cytoskelett werden verschiedenartige Funktionen bei endocytotischen Vorgängen diskutiert. So könnten Aktin-Filamente eine physikalische Barriere an der Plasmamembran bilden, die eine vorschnelle Invagination der Membran verhindert. Gaidarov et al. [129] beobachteten nach Behandlung von Zellen mit Latrunculin B, eine erhöhte Anzahl und laterale Mobilität von *Clathrin-coated Pits*, was auf die depolymerisierte Aktin-Barriere am Zellcortex zurückgeführt werden könnte.

Das Aktin-Cytoskelett könnte auch bei der Invagination von Vesikeln an der Plasmamembran selber eine Rolle spielen, wobei denkbar wäre, daß eine lokale Regulation der Aktin-Polymerisation eine Krümmung an der Membran zur Folge hat, die eine Anlagerung der erforderlichen Hüllproteine erleichtert [61] [130].

Eine drittes Denkmodell legt die Möglichkeit nahe, daß das cortikale Cytoskelett zu rigide ist um endocytotische Prozesse zu erlauben und deswegen erst „umgelagert“ werden muß [131]. Für diese Hypothese sprechen Beobachtungen die ergaben, daß die unmittelbare Umgebung von *Clathrin-coated Pits* nahezu frei von Aktin-Filamenten ist [128]. Aktin kann jedoch nicht ausschließlich eine Rolle bei der negativen Regulation der Endocytose spielen, da in polarisierten Epithelzellen gezeigt werden konnte, daß an der apikalen Oberfläche die Endocytose nach Aktin-Depolymerisierung komplett inhibiert wurde, die Stabilisierung dieser Filamente mit Jasplakinolid jedoch keinen Effekt auf die Endocytose hatte [125] [132].

Eine vierte potentielle Rolle des Aktin-Cytoskeletts wird bei der Abschnürung der Vesikel vermutet. Dabei wird postuliert, daß Aktin-Polymerisation in der *Neck*-Region der Vesikel die treibende Kraft für die Vesikelabschnürung bzw. -ablösung ist [130]. Dafür würde sprechen, daß eine Aktin-Depolymerisierung mit Latrunculin A bei A431-Zellen eine Inhibition der Rezeptor-vermittelten Endocytose im Stadium der Invagination zur Folge hatte [127].

Ein fünftes Denkmodell legt eine Beteiligung des Aktin-Cytoskeletts an dem Transport endocytotischer Vesikel durch das viskose Cytoplasma nahe. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, daß bei Endosomen, Pinosomen, Clathrin-beschichteten und sekretorischen Vesikeln ein Aktin-„Schweif“ (*Actin Comet Tail*) beobachtet wurde [133-135], der auch *in vitro* bei Endosomen und Lysosomen bemerkt werden kann [136]. Dieser Aktin-„Schweif“ ist vergleichbar mit dem einiger pathogener Organismen wie *Listeria monocytogenes* und *Shigella flexneri*, die sich mit Hilfe dieses „Schweifes“ propellerartig durch das Cytoplasma der infizierten Wirtzelle bewegen [137].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Aktin an die MPR 46-CD-Affinitätssäule bindet. Die Ergebnisse der Edman-Sequenzanalyse wurden durch Westernblot-Analysen verifiziert (Abb. 5), bei denen Aktin im Eluat der GST-MPR 46-CD- aber nicht im Eluat der GST-Säule detektiert werden konnte. Copräzipitations-Analysen erbrachten das gleiche Ergebnis: Hier konnte Aktin mit der MPR 46-CD aber nicht mit GST allein präzipitiert werden (Abb.17 A).

Um die physiologische Bedeutung dieser Interaktion zu ermitteln, wurde der Transport des MPR 46 bei Zellen mit intaktem und depolymerisiertem Aktin-Cytoskelett untersucht. Die Inkubation von Zellen mit Latrunculin A (Lat. A), einem zellpermeablen Toxin des Schwammes *Latrunculia magnifica*, führt zu einer Depolymerisierung des Aktin-

Cytoskeletts durch die Bildung eines 1:1 Komplexes mit monomerem Aktin. Dadurch sind die Aktin-Monomere nicht mehr in der Lage, zu polymerisieren. Alternativ benutzen andere Autoren Jasplakinolid, ein Toxin des Schwammes *Jaspis johnstoni*, das durch Bindung an Aktin-Filamente diese stabilisiert. Dadurch wird die Dynamik des Aktin-Cytoskeletts unterbunden. Die beiden Toxine können unterschiedliche Wirkungen auf endocytotische Prozesse haben [132].

Die Internalisierung von MPR 46, die an der Plasmamembran lokalisiert sind, konnte nur mit Hilfe des jodierten monoklonalen Antikörpers [¹²⁵I]-21-D3 untersucht werden, da der MPR 46 im Gegensatz zu dem MPR 300 keine M6P-haltigen Liganden an der Oberfläche binden kann [138]. Die MPR 46 zirkulieren konstitutiv und werden ständig von MPR 46 aus den Endosomen ersetzt. Die Bindung, Internalisierung und intrazelluläre Akkumulation des [¹²⁵I]-21-D3 ist entsprechend ein Maß für den Transport und Austausch des MPR 46 über die Zelloberfläche. Ein Gleichgewicht wird erreicht, wenn die Zahl der freien, noch nicht mit Antikörpern besetzten Rezeptoren an der Oberfläche, gleich ist mit der Anzahl der Rezeptoren, die durch die Bindung der Antikörpers dem lysosomalen Abbau zugeführt werden.

Da die Zahl der MPR 46, die im Gleichgewicht an der Zelloberfläche lokalisiert sind, sehr gering ist, wurden für diese Experimente BHK MPR 46-Zellen hinzugezogen, die zusätzlich zu dem endogenen den humanen MPR 46 überexprimieren.

Bei Depolymerisierung des Aktin-Cytoskeletts nahm die Endocytoserate der MPR 46 signifikant ab im Vergleich zu intakten Zellen (Abb. 7 A, B). In Abhängigkeit von der Art der Messungen des internalisierten [¹²⁵I]-21-D3, d.h. entweder durch Bestimmung der intrazellulär akkumulierten Radioaktivität im γ -Counter oder durch SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie und densitometrische Auswertung, sank die Endocytoserate des MPR 46 bei Zellen mit depolymerisiertem Aktin-Cytoskelett auf 55 % bzw. 11 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen ab. Die Schwankungen dieser Werte sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß freies [¹²⁵I] an die Zellmembran angelagert war und bei der Analyse im γ -Counter mit erfaßt wurde, während bei der elektrophoretischen Auftrennung nur der intakte [¹²⁵I]-21-D3 ausgewertet wurde. Die Endocytoserate des MPR 46 konnte nur nach Überexpression des Rezeptors nachgewiesen werden.

Daß die Interaktion mit Aktin nicht spezifisch für den MPR 46 ist, konnte durch einen vergleichbaren experimentellen Ansatz ermittelt werden, bei dem die Endocytoserate des

MPR 300 in An- und Abwesenheit von Lat. A gemessen wurde. Zu diesem Zweck wurde jodierte Arylsulfatase A [¹²⁵I]-ASA, ein lysosomales M6P-haltiges Enzym, eingesetzt. Auch hier konnte eine signifikante Abnahme der MPR 300-Endocytoserate zwischen 49 % und 32 % bei Zellen mit depolymerisiertem Aktin-Cytoskelett festgestellt werden (Abb. 8). Die Abnahme der Endocytoserate nach Depolymerisierung des Aktin-Cytoskeletts ist Zelltyp-abhängig. Lat. A-behandelte Ratten-Glia C6-Zellen zeigten bei densitometrischen Messungen eine Abnahme der Endocytoserate auf 11 % im Vergleich zu intakten Zellen. Bei humanen SH-SY5Y Neuroblastoma-Zellen war sogar eine nahezu komplette Inhibition der MPR 300-Endocytose nach Lat. A-Behandlung zu bemerken. Nur 3 % [¹²⁵I]-ASA im Vergleich zu Kontrollzellen wurde internalisiert (Abb. 9).

In allen Experimenten war der Proteingehalt pro Zellplatte bei Lat. A-behandelten und unbehandelten Zellen gleich, womit ausgeschlossen wurde, daß die beobachtete Abnahme der Endocytoserate bei Zellen mit depolymerisiertem Aktin-Cytoskelett auf eine Reduktion der Zellzahl zurückzuführen ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Abnahme des internalisierten jodierten MPR 46-Antikörpers bzw. der spezifisch von MPR 300 internalisierten [¹²⁵I]-ASA bei Zellen mit depolymerisiertem Aktin-Cytoskelett macht deutlich, daß die Endocytose der MPR in Abhängigkeit von Aktin erfolgt. Die eingesetzte Konzentration von 5 µM Lat. A und die Inkubationszeit von 3 h, die in Vorexperimenten an BHK MPR 46-Zellen ermittelt und mit Literaturangaben verglichen worden waren, erwiesen sich als optimal, da es unter diesen Bedingungen zu keiner Ablösung der kultivierten Zellen kam, dabei aber der Effekt dieses Toxins auf die Endocytose der MPR deutlich sichtbar gemacht werden konnte. In welchem Stadium die Endocytose der MPR durch die Depolymerisierung der Aktin-Filamente gestört wird, bleibt dabei unklar. Dies könnte bereits bei der Invagination der Fall sein, wo die Aktin-Polymerisation und die damit verbundene Anlagerung der erforderlichen Hüllproteine, inhibiert ist. Möglich wäre auch, daß die Depolymerisierung des bei Clathrin-beschichteten Vesikeln beobachteten Aktin-„Schweifs“ die Navigation MPR-haltiger Vesikel erschwert und für die Abnahme der MPR-Endocytoserate verantwortlich ist. Da bisher noch keine direkte Interaktion zwischen Aktin-Filamenten und cytoplasmatischen Domänen endocytierter Rezeptoren beschrieben wurde, wäre auch denkbar, daß die Verankerung der MPR mittels eines potentiellen Linkerproteins an Aktin-Filamente durch deren Depolymerisierung unterbleibt. Eine Rolle bei der negativen Regulation der MPR-Endocytose scheint dem Aktin-Cytoskelett nicht zuzukommen, da

eine Abnahme der Endocytoserate gemessen wurde. Daß die Abnahme der Endocytoserate Zelltyp-abhängig ist, könnte darauf zurückzuführen sein, daß die MPR in unterschiedlichen Zelllinien unterschiedlich exprimiert werden oder nicht mit der gleichen Kinetik zirkulieren.

Um zu ermitteln, ob ein intaktes Aktin-Cytoskelett auch für den Transport der MPR vom tGN zu den Endosomen erforderlich ist, wurden die Sekretion und der Transport von metabolisch [³⁵S]-markierter ASA und Cathepsin D (Cath. D) in humanen SH-SY5Y-Neuroblastoma-Zellen und in Mausfibroblasten, die zusätzlich zu der endogenen die humane ASA (Ltk-ASA) bzw. den humanen MPR 46 (L-MPR 46) überexprimieren, untersucht. Dabei wurden die Zellen, nach metabolischer Markierung mit [³⁵S]-Methionin, einem *Chase* von 6 h in An- und Abwesenheit von Lat. A unterzogen. Anschließend wurden aus gleichen Mengen Zellextraktes und Mediumüberstandes ASA und Cath. D sequenziell immunpräzipitiert.

Die vorgestellten Ergebnisse lassen mehrere Aussagen zu. In einigen Experimenten (6 von insgesamt 16) waren signifikante Unterschiede zwischen Ltk-ASA-Zellen mit intaktem bzw. depolymerisiertem Aktin-Cytoskelett zu erkennen (Abb. 10 C und D). So sezernierten Lat. A- behandelte Ltk-ASA-Zellen 90 % der neusynthetisierten ASA. In unbehandelten Zellen verblieben hingegen 87 % der neusynthetisierten ASA intrazellulär und 13 % wurden sezerniert. Nach Immunpräzipitation von Cath. D war der gleiche Effekt von Lat. A auf dies Zellen zu erkennen. In unbehandelten Zellen wurden 98 % des neusynthetisierten Cath. D korrekt prozessiert und nur 2 % sezerniert. Zellen mit depolymerisiertem Aktin-Cytoskelett sezernierten jedoch 86 % und nur 14 % wurden korrekt prozessiert. Bei diesen Experimenten konnte eine Reduktion des ASA- bzw. Cath. D-Transportes zu Endosomen/Lysosomen und eine Mehrsekretion dieser Enzyme nach Behandlung mit Lat. A festgestellt werden.

Die Mehrheit der Ergebnisse läßt jedoch keinen Unterschied in der Sortierung bzw. Sekretion neusynthetisierter lysosomaler Enzyme bei Zellen mit intaktem bzw. depolymerisiertem Aktin-Cytoskelett erkennen (Abb. 10 A und B). Zehn von 16 Experimenten zeigten, daß sowohl bei intakten Zellen als auch bei solchen mit depolymerisiertem Aktin-Cytoskelett die gleichen Mengen ASA intrazellulär verblieben (zwischen 75 % und 79 %). Die gleiche Beobachtung konnte auch nach Immunpräzipitation von Cath. D gemacht werden. Auch hier war bei Zellen mit intaktem bzw. depolymerisiertem Aktin-Cytoskelett kein Unterschied zu erkennen, da 16 % bzw. 19 %

korrekt prozessiert wurden. In L-MPR 46-Zellen konnte die Beobachtung bestätigt werden, daß die Depolymerisierung der Aktin-Filamente keinen Effekt auf die Sortierung lysosomaler Enzyme hat. Auch hier wurden etwa die gleichen Mengen Cath. D korrekt zu den Endosomen/Lysosomen transportiert (41 % bzw. 55 %), da sowohl die Precursor-Protein als auch die reife Form dieses Enzyms, die ausschließlich in Endosomen und Lysosomen lokalisiert ist, präzipitierbar waren. Bei humanen SH-SY5Y-Zellen konnte ebenfalls kein Unterschied in An- und Abwesenheit von Lat. A auf den Transport neusynthetisierter lysosomaler Enzyme festgestellt werden (nicht gezeigt). Mehr als 90 % des Cath. D wurden sowohl in intakten Zellen als auch in solchen mit depolymerisiertem Aktin-Cytoskelett korrekt prozessiert, die Beeinflussung der Sekretion durch Lat. A war marginal.

Die vorgestellten Ergebnisse lassen vermuten, daß die Sortierung neusynthetisierter lysosomaler Enzyme nicht in Abhängigkeit von Aktin erfolgt, was in 10 von 16 Experimenten gezeigt werden konnte. Die Heterogenität der Ergebnisse ist möglicherweise auf die experimentellen Bedingungen, die für die Endocytose-Assays optimiert, aber auch auf die Pulse/Chase-Experimente angewandt wurden, zurückzuführen. So könnte es sich bei den eingesetzten 5 μ M Lat. A um eine kritische Konzentration handeln, die für den Zeitraum der Endocytose (3 h) jedoch nicht für den des Chase (6 h) angemessen war. Außerdem könnten Sekundäreffekte wie Alter und Wachstumsphase der kultivierten Zellen eine Rolle spielen. Daß die Sortierung neusynthetisierter lysosomaler Enzyme wahrscheinlich nicht in Abhängigkeit von Aktin-Filamenten erfolgt, wurde durch Untersuchungen an humanen Hautfibroblasten bestätigt. Bei Einsatz von Cytochalasin B (einem Aktin-depolymerisierenden Toxin) und Nocodazol (einem Mikrotubuli-depolymerisierenden Toxin) konnte eine Beeinträchtigung der Prozessierung und ein verlangsamter Transport zu Lysosomen sowie eine Mehrsekretion von Cathepsin D gezeigt werden, wobei die alleinige Anwendung von Cytochalasin B keinen Effekt auf die Sortierung neusynthetisierter lysosomaler Enzyme hatte (T. Braulke, Hamburg, persönliche Mitteilung). Bei Untersuchungen an humanen Fibroblasten war eine Inhibition um den Faktor fünf des lysosomalen Enzymtransportes bei Behandlung der Zellen mit Nocodazol feststellbar [139], was darauf hindeutet, daß der Transport neusynthetisierter lysosomaler Enzyme entlang von Mikrotubuli erfolgt. Da jüngere Untersuchungen ein sogenanntes „Duales Transportsystem“ beschreiben, bei dem Aktin-Filamente und Mikrotubuli kooperieren und die Störung eines Systems Dysfunktionen des anderen zur Folge

haben kann [140], wäre denkbar, daß die Unterschiede zwischen den Lat. A-behandelten und unbehandelten Zellen in der Sortierung neusynthetisierter lysosomaler Enzyme, wie sie in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurden, darauf zurückzuführen sind, daß die Depolymerisierung des Aktin-Cytoskeletts Störungen des Transportes entlang der Mikrotubuli zur Folge hatte. Daß der Transport neusynthetisierter lysosomaler Enzyme nicht oder nicht hauptsächlich entlang von Aktin-Filamenten erfolgt, wird durch die Ergebnisse der immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen bestätigt, da nach Depolymerisierung des Aktin-Cytoskeletts keine Veränderung in der Lokalisation von MPR 46 in perinucleären Strukturen, die dem tGN entsprechen, feststellbar sind. Die hochgradige Colokalisation von Aktin und MPR in immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß der retrograde Transport der MPR von Endosomen zum tGN in Abhängigkeit von Aktin erfolgt. Für den vesikulären Transport vom Golgi Apparat zum Endoplasmatischen Reticulum wurde bereits eine Beteiligung des Aktin-Cytoskeletts nachgewiesen [141]. Da im der vorliegenden Arbeit auch Tubulin im Eluat der GST-MPR 46-CD-Säule detektiert wurde, wären weitere Untersuchungen zu der Bedeutung der Mikrotubuli an der Sortierung der MPR nötig. Zu diesem Zweck könnten z.B. immunfluoreszenzmikroskopische Analysen mit Zellen, deren Mikrofilament-System durch Nocodazol depolymerisiert wurde, durchgeführt werden, um die Verteilung der MPR zu ermitteln.

5.1.2.2 Talin

Talin ist ein 269 kDa cytoskelettales Protein [142] das eine N-terminale globuläre Kopf-Domäne (AS-Reste 1-433, ~50 kDa) und eine C-terminale Rod-Domäne (~220 kDa) besitzt [143] über die es antiparallele Homodimere bilden kann [144].

In der Kopfdomäne bilden die Aminosäure (AS)-Reste 86-410 eine FERM-Struktur [143], deren Name sich von anderen Proteinen mit homologer Domäne (Band 4.1, Ezrin, Radixin und Moesin [145]) ableitet. Die FERM-Domäne von Talin kann an die cytoplasmatische Domäne der β_1 -, β_2 - und β_3 -Untereinheit von Integrinen binden [146] [149], an die Fokale Adhäsions Kinase (FAK) [150], an Layilin [150] [151] und an F-Aktin [152] [156]. Plasmon-Resonanz-Analysen zeigten, daß die Kopf-Domäne von Talin eine sechsfach höhere Bindung an die cytoplasmatische Domäne von β_1 -Integrin aufweist als das gesamte Protein [153], was auf die Maskierung des FERM-Motives durch den C-Terminus von Talin zurückzuführen ist. Die proteolytische Abspaltung der Talin-Kopf-Domäne durch

Calpain II könnte daher Aktivierung und *Clustering* der Integrine einleiten [153]-[155]. Die Talin-Rod-Domäne enthält eine zweite Integrin-Bindungsstelle [148], eine hochkonservierte C-terminale Aktin-Bindungsstelle (AS-Reste 2345-2541) [156] und drei Bindungsstellen für das cytoskelettale Protein Vinculin. Die Bindung von Vinculin an Talin kann durch Phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphat reguliert werden [157]. Diese Daten lassen vermuten, daß Talin eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Zellform, bei Adhäsions- und Migrationsprozessen zukommt, die durch Vinculin moduliert werden können [158]. Zusätzlich kommt Talin, neben der indirekten Funktion bei der Verpackung von Integrinen in COP I-umhüllte Vesikel im ER [159] auch eine Rolle bei Prozessen der Phagozytose in *Dictyostelium discoideum* [160] und der Endocytose in Macrophagen [161] zu. Studien zur Wechselwirkung zwischen Talin, der cytoplasmatischen Domäne von β_3 -Integrin und Layilin zeigten, daß die FERM-Domäne an YXXØ bzw. NPXY (X steht für jede beliebige Aminosäure) bindet [148] [150]. Das YXXØ-Motiv ist essentiell für die Clathrin-abhängige Endocytose des MPR 46 und die Bindung der μ_2 Untereinheit von AP-2 [36] [50]-[52].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, daß Talin eines der cytoplasmatischen Proteine aus Rattenhirn ist, das spezifisch von einer Affinitätsmatrix der MPR 46-CD eluiert werden kann. Die Bindung an die cytoplasmatische Domäne ist sehr stark, da sie nur durch 1 M NaCl gelöst werden kann. Ob Talin direkt mit der cytoplasmatischen Domäne des MPR 46, und im Speziellen mit dem $^{45}\text{YRGV}^{48}$ -Motiv, welches dem YXXØ-Motiv entspricht, interagiert, konnte im Rahmen der Arbeit nicht ermittelt werden. Da eines der prominenten Proteine im Eluat der MPR 46-CD-Säule Aktin war, kann aber auch angenommen werden, daß Talin als Linkerprotein zwischen dem MPR 46 und dem Aktin-Cytoskelett fungiert. Der unveränderte Anteil von Talin, der mit der Wildtyp MPR 46-CD und einer mutierten MPR 46-CD, bei der ^{45}Y und V^{48} gegen A ausgetauscht worden war, copräzipitierbar ist, deutet darauf hin, daß Talin, wenn überhaupt, nicht ausschließlich das $^{45}\text{YRGV}^{48}$ -Motiv bindet. Bindungsstudien zwischen der cytoplasmatischen Domäne des MPR 46 und den μ_2 - und μ_3 -Untereinheiten bzw. AP-2 und AP-3 haben gezeigt, daß für die effiziente Protein-Protein-Wechselwirkung mehrere Signalstrukturen (Tyrosin-haltiges Signal, Di-Leucin-Motiv, Cluster saurer Aminosäuren) in kooperativer Weise notwendig sind [47] [48]. Um die direkte Wechselwirkung sowie den interagierenden Bereich der MPR 46-CD zu bestimmen und einzugrenzen, sind weitere Studien sowohl mit Austausch- oder Deletionsmutanten und trunkierten Formen der MPR 46-CD als auch mit

rekombinanten, gereinigten Talin-Domänen erforderlich. Die hochgradige Colokalisation von Talin mit dem MPR 46 sowohl in perinucleären Strukturen, die dem tGN entsprechen, als auch in einzelnen Vesikeln bei humanen SH-SY5Y-Neuroblastoma-Zellen läßt jedoch auch eine Beteiligung von Talin an Sortierung und Transport neusynthetisierter lysosomaler Enzyme vermuten.

Die Konzentration der MPR 46 an der Plasmamembran ist zu niedrig (5 % der Gesamtmenge der Rezeptoren) um da Colokalisations-Studien mit Talin zu erlauben. Eine Funktion von Talin für die Verankerung der MPR 46 an der Plasma- oder anderen internen Membranen kann wahrscheinlich ausgeschlossen werden, da die MPR 46 zwischen den Membranen ständig mit hoher Kinetik zirkulieren [162]. Daher sind weitere Untersuchungen der potentiellen Linkerfunktion von Talin zwischen MPR 46 und Aktin-Cytoskelett erforderlich sowie weitere Daten zu der Verteilung von Talin in Zellen mit depolymerisiertem Aktin-Cytoskelett. Außerdem müßte die Spezifität der Interaktion von Talin mit der cytoplasmatischen Domäne des MPR 46 im Vergleich mit cytoplasmatischen Domänen anderer Sortierungsrezeptoren in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

5.1.2.3 Myosin VII

Die Familie der Myosine enthält 15 bisher bekannte Klassen, die neben den konventionellen Skelettmuskel- auch unkonventionelle Myosine beinhaltet (Review [163]). Allen gemeinsam ist, daß sie auf Aktin basierende molekulare Motoren sind, die eine hochkonservierte Kopf- oder Motor-Domäne und eine für jede Klasse einmalige C-terminale *Tail*-Region aufweisen, die von einer *Neck*-Region mit einer variablen Zahl an Isoleucin/Glutamin (IQ)-Motiven getrennt sind [164]. Die IQ-Domäne bindet vermutlich Calmodulin.

Während die Motor-Domäne in Abhängigkeit von ATP an Aktin bindet, interagiert der C-Terminus mit Vesikeln, die für die jeweilige Klasse spezifisch sind [203].

Myosine sind an Entstehung, Erhalt und/oder Dynamik Aktin-reicher Strukturen beteiligt, die in Prozesse wie Endocytose, Zellmigration und sensorische Transduktion involviert sind [179] [203].

Myosin VII (230 kDa) besitzt eine N-terminale Kopf-Domäne (AS-Reste 1-729) mit den konservierten Bindungsstellen für ATP und Aktin, eine *Neck*-Region (AS-Reste 730-855), die fünf IQ-Motive aufweist und eine lange C-terminalen *Tail*-Region (AS-Reste 856-

2215) [165] [166]. Diese besteht aus einer kurzen *coiled-coil*-Domäne (79 AS-Reste), die für die Bildung von Homodimeren verantwortlich ist [167], gefolgt von zwei Regionen, die jeweils ein FERM-Motiv enthalten [168] und eine dazwischen liegende SH3-Domäne [166] [169]. Myosin VII ist an der Verankerung der Stereocilien an die Tectorialmembran im Cortischen Organ beteiligt [170]-[173] es spielt eine Rolle bei der korrekten Positionierung von Melanosomen in Retinalen Pigment Epithelzellen [174] und dem Transport von Opsin entlang der Photorezeptorcilien [174] und kommt im Testis vor [171]. Bisher sind drei natürliche Mutationen bei der Maus bekannt (*shaker-1* Maus), die alle die Kopf-Domäne von Myosin VII betreffen [175]. *Shaker-1* Mäuse weisen eine progressive Degeneration des Neuroepithels im Cortischen Organ auf, was zu Gleichgewichtsstörungen und Taubheit führt [175]. Beim Menschen ist das *Usher Syndrom*, das mit Taubheit und Blindheit bzw. schweren Sehstörungen einhergeht, auf eine Mutation im Myosin VII- Gen zurückzuführen [176]. *Usher 1*-Patienten weisen eine vestibuläre Dysfunktion und Degeneration von Photorezeptorzellen auf [176].

In *yeast-two-hybrid*-Analysen wurde ein Transmembran-Protein, Vezantin, identifiziert, das mit der C-terminalen FERM-Domäne von Myosin VII interagiert. Vezantin kommt in adhärennten Zell-Zell-*junctions* vor, wo es mit Cadherin-Catenin-Komplexen und Myosin VII in Wechselwirkung tritt [177] und somit ein Bindeglied zwischen Adhäsionsstellen und dem Aktin-Cytoskelett bildet. Die FERM-Domäne von Myosin VII bindet an die regulatorische Untereinheit (RI α) der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) [178], die physiologische Bedeutung dieser Wechselwirkung ist jedoch unklar. Weiterhin weisen Untersuchungen an Myosin VII-defiziente *Dictyostelium discoideum* Zellen auf eine Rolle von Myosin VII bei frühen Schritten der Phagozytose hin [179].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Myosin VII nach massenspektrometrische Analyse als potentieller Interaktionspartner für die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 identifiziert. In Westernblot-Analysen von Eluatzen der GST-MPR 46-CD-Säulen waren zwei Proteinbanden mit molaren Massen von ~120 kDa und ~85 kDa zu sehen (Abb.14). Bei der erwarteten Größe von 230 kDa war kein immunreaktives Material feststellbar. Bei den beiden Proteinbanden handelt es sich sehr wahrscheinlich um Degradationsprodukte, die z.B. keine Motor-Domäne besitzen (U. Wolfrum, Mainz, persönliche Mitteilung). Überraschenderweise war auch in dem Ausgangsmaterial, Cytosol des Rattenhirns, das als Positivkontrolle diente, nur die ~ 85 kDa Proteinbande zu sehen. Myosin VII konnte aus bisher ungeklärten Gründen nicht mit dem GST-MPR 46-CD-Fusionsprotein copräzipitiert

werden. Möglicherweise müssen die Bindungs- und Waschbedingungen optimiert werden, um diese Interaktion zu verifizieren.

Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen bei permeabilisierten SH-SY5Y-Neuroblastomazellen (Abb. 18 G-I) zeigen eine Lokalisation von Myosin VII sowohl im perinucleären Bereich als auch in einzelnen Vesikeln. Eine Colokalisation von Myosin VII mit MPR 46 war jedoch nur in perinucleären Strukturen nachweisbar. Da über die Funktion von Myosin VII erst sehr wenig bekannt ist, kann über die physiologische Bedeutung der möglichen Wechselwirkung zwischen Myosin VII und der cytoplasmatischen Domäne des MPR 46 nur spekuliert werden. Daher sollten sich zunächst Experimente zu dem Transport neusynthetisierter lysosomaler Enzyme und zu der Lokalisation des MPR 46 in Myosin VII-defizienten Zellen, kultiviert z.B. aus *shaker*-Mäusen anschließen. Außerdem bieten das *yeast-two-hybrid*-System und Copräzipitations-Analysen mit aufgereinigtem Myosin VII die Möglichkeit, die direkte Interaktion zwischen beiden Proteinen zu belegen.

5.1.2.4 Annexin III

Annexine sind eine Familie strukturell verwandter cytoplasmatischer Proteine, die in Abhängigkeit von Calcium Phospholipide binden [180]-[182]. Die Beteiligung von Annexinen an Signaltransduktion, DNA-Replikation, Bildung von Ionenkanälen und Apoptose wird kontrovers diskutiert [180] [181]. Eine wichtige Rolle hingegen kommt Annexinen bei dem Transport von Vesikeln, und zwar speziell bei Membran-Membran- bzw. Membran-Cytoskelett-Interaktionen zu [180] [181].

Annexin III (33kDa) wird vor allem in Leukocyten und Macrophagen exprimiert [183] und weist in diesen Zellen eine gleichmäßige cytoplasmatische Verteilung auf. Während der Phagozytose wird Annexin III in die Umgebung von Phagosomen dirigiert [184]. Diese Beobachtungen wurden durch Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen an Macrophagen bestätigt [185].

In der vorliegenden Arbeit unterstützte zunächst die im Westernblot gezeigte Präsenz von Annexin III im Eluat der GST-MPR 46-CD das Resultat der massenspektrometrischen Analyse. Dabei wies Annexin III aus der MPR 46-CD-bindenden Fraktion (ca. 30 kDa) allerdings eine andere apparente Masse in der SDS-PAGE auf als Annexin III aus dem Ausgangsmaterial (33 kDa). Ein Grund für diesen Unterschied könnten z.B. unterschiedliche Phosphorylierungszustände von Annexin III sein, wie sie z.B. für

Annexin I, -II und -XI beschrieben sind [186]. Phosphorylierte Proteine weisen eine verringerte Laufgeschwindigkeit in der SDS-PAGE auf als ihre nicht phosphorylierte Form [204]. Möglicherweise traten Dephosphorylierungen während der Aufreinigung und Dialyse auf, die bei dem frisch isolierten cytosolischen Ausgangsmaterial unterbunden sind. Bei Elution gebundener Proteine mit diskontinuierlich ansteigenden NaCl-Konzentrationen konnte festgestellt werden, daß Annexin III bereits mit 0,25 M und ein Großteil mit 0,5 M NaCl von der GST-MPR 46-CD-Säule eluiert werden konnte (Abb. 16 A), was auf schwache ionische Wechselwirkungen zwischen Annexin III und der MPR 46-CD schließen läßt. Das Ergebnis der Westernblot-Analyse konnte nach Copräzipitations-Untersuchungen nicht bestätigt werden, da der zur Verfügung stehende Antikörper gegen Annexin III (33 kDa) sowohl mit GST (28 kDa) als auch mit GST-MPR 46-CD (33 kDa) kreuzreagierte. Um diese Kreuzreaktion zu umgehen, wurden Copräzipitationen von jodiertem, in *E. coli* exprimiertem rekombinantem Annexin III mit GST und GST-MPR 46-CD durchgeführt (nicht gezeigt). Es konnten jedoch keine spezifische Annexin III-Präzipitate mit der GST-MPR 46-CD erzielt werden. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß Annexin III nicht direkt an den MPR 46-CD binden kann. Da kein spezifischer Bindungspartner von Annexin III bekannt ist (V. Gerke, Münster, persönliche Mitteilung), konnte in diesem Copräzipitationsexperiment keine Positivkontrolle mitgeführt werden, die ausschließt, daß die Jodierung potentielle Bindungsregionen in Annexin III maskiert. Deswegen sollten Copräzipitations-Analysen in An- und Abwesenheit cytosolischer Proteine durchgeführt werden, die einen Hinweis auf indirekte Bindung von Annexin III geben könnten. Außerdem sollte nicht-radioaktives rekombinantes Annexin III in Copräzipitations-Analysen eingesetzt und anschließend im Westernblot analysiert werden, um Jodierungs-bedingte Artefakte auszuschließen.

Der für diese Arbeit zur Verfügung gestellte anti-Annexin III-Antikörper zeigte in den verwendeten SH-SY5Y-Neuroblastoma-Zellen kein signifikantes Immunfluoreszenz-Signal, was wahrscheinlich auf die niedrige Expression in diesen Zellen zurückzuführen ist. Colokalisations-Studien von Annexin III mit MPR 46 sollten deswegen in Macrophagen [185] durchgeführt werden, für die der Annexin III-Nachweis mit diesem Antikörper geführt wurde (V. Gerke, Münster, persönliche Mitteilung). In ersten Westernblot-Studien an isolierten Phagosomen aus Macrophagen konnte kein immunreaktives MPR 46 nachgewiesen werden (V. Gerke, Münster, persönliche Mitteilung).

Weiterführende Experimente mit Annexin III erscheinen lohnenswert, weil die Präsenz dieses Proteins an Phagosomen auf eine mögliche Beteiligung an phagocytotischen bzw. endocytotischen Prozessen schließen läßt. Für Annexin wurde XIIIb festgestellt, daß dieses Protein in MDCK-Zellen ein Bestandteil von Vesikeln ist, die vom tGN zu der apikalen Membran transportiert werden [187]. Annexin VI wurde eine Rolle bei der Sprossung von *Clathrin-coated Pits* zugeschrieben [188]. Für Annexin I und II, die an frühen und Annexin V, das an späten Endosomen lokalisiert [185] ist, wird eine Beteiligung an endocytotischen Prozessen vermutet.

5.1.2.5 Tiam 1

Tiam 1 (T-Lymphoma and Metastasis 1 Protein, 205 kDa) ist ein GEF (Guanosine Nucleotide Exchange Factor) für Rac 1, eine kleine GTPase, wobei GTP-gebundenes Rac 1 die aktivierte Form darstellt die mit anderen Proteinen interagieren und zelluläre Antworten auslösen kann [189] [190]. Tiam 1 wird vor allem im sich entwickelnden Gehirn exprimiert [190] [191] und ist sowohl im Cytosol als auch an der Membran der Zellen lokalisiert.

Alle GEFs besitzen eine DH (Dbl-homology)-Domäne, die nur geringfügig konserviert ist (10-30%) und den Austausch von GDP mit GTP katalysiert, und mindestens eine PH (Pleckstrin homology)-Domäne, die eine Rolle bei dem subzellulären *targeting* zu spielen scheint, wahrscheinlich durch Interaktion mit Lipiden [192]-[194]. Tiam 1 weist eine DH- und zwei PH-Domänen auf, wobei der DH-Domäne die GEF-Funktion bezüglich Rac 1 zukommt und die PH-Domänen für die Rekrutierung des Proteins an die Membran verantwortlich ist [195]. Tiam 1 wird durch die Proteinkinase A (PKA) und die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CamK II) phosphoryliert [196]-[198], wobei die Phosphorylierung durch die CamK II die Aktivität von Tiam 1 bezüglich des Nucleotid-Austausches bei Rac 1 steigert [198] und auch bei der Translokation an die Membran eine Rolle zu spielen scheint [199].

Rac 1 gehört zu den GTPasen der Rho-Familie, die der Superfamilie der monomeren Ras-GTPasen zuzurechnen ist [190]. GTPasen der Rho-Familie dirigieren vielfältige zelluläre Prozesse wie Proliferation, Fusionen an der Plasmamembran und Zellmotilität durch modulierendes Einwirken auf das cortikale Aktin-Cytoskelett [189]. Der Funktionsmechanismus der Rac 1-GTPasen ist weitestgehend ungeklärt, jedoch konnte eine Interaktion mit Synaptojanin 2, einer poly-Phosphoinositid-Phosphatase nachgewiesen

werden, die in Abhängigkeit von GTP erfolgt [200]. GTP-gebundenes Rac 1 bewirkt die Translokation von Synaptojanin 2 aus dem Cytoplasma an die Plasmamembran. Synaptojanin 2 wiederum ist in der Lage, Adaptoren und Clathrin zu binden. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl aktiviertes Rac1 als auch membrangebundenes Synaptojanin 2 die Endocytose des EGF- und Transferrin-Rezeptors inhibiert. Die Überexpression von Synaptojanin 2 alleine hatte keine Auswirkungen auf endocytotische Prozesse, möglicherweise bedingt durch mangelhafte Membran-Anlagerung des überexprimierten Synaptojanin 2, weswegen vermutet wird, daß Synaptojanin 2 ein Vermittler für den inhibitorischen Effekt von Rac 1 ist [200]. Aktiviertes Rac 1 ist außerdem für die Stimulation der Aktin-Polymerisation wichtig [201], was durch Beobachtungen bestätigt wird, daß Tiam 1 eine Rolle bei der Ausbildung von Axonen zukommt [202].

Tiam 1 wurde in der vorliegenden Arbeit als potentieller Bindungspartner der MPR 46-CD identifiziert und konnte anschließend sowohl im Ausgangsmaterial als auch in der Eluatfraktion der GST-MPR 46-CD-, aber nicht im Eluat der GST-Säule durch Westernblot-Analysen nachgewiesen werden (Abb. 14). Bestätigt wurde dieses Ergebnis auch durch Copräzipitation von Tiam 1 mit der MPR 46-CD (Abb. 17 D). Doppel-Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen mit Tiam 1- und MPR 46-Antikörpern bei humanen SH-SY5Y-Neuroblastoma-Zellen (Abb. 18 D-F) ließen eine Verteilung von Tiam 1 im gesamten Cytosol erkennen, wobei eine Verdichtung um den Nucleus herum bemerkt werden konnte. Eine Colokalisation beider Antigene war jedoch nur im perinucleären Bereich und nicht in einzelnen Vesikeln feststellbar (Abb. 18 F). Es wäre denkbar, daß Tiam 1 die Verankerung von Hüllproteinen, die bei der Abschnürung dieser Vesikel eine Rolle spielen, reguliert, da Tiam 1 zwei PH-Domänen besitzt, die an Membranlipide binden können [192]-[194].

Um die Rolle von Tiam 1 bei dem Transport von MPR 46 genauer zu definieren, wurden in einem ersten Schritt Copräzipitations-Analysen mit einer MPR 46-CD-Substitutionsmutanten durchgeführt, bei der die essentiellen Aminosäurereste ⁴⁵Y und V⁴⁸ innerhalb des Endocytose- und Sortierungssignals ⁴⁵YRGV⁴⁸ gegen A ausgetauscht worden waren. Das Ergebnis der Präzipitations-Analyse (Abb. 17 D) ließ jedoch keinen Unterschied zwischen der Tiam 1-Bindung an die Wildtyp- bzw. an die mutierte Form der MPR 46-CD erkennen, was vermuten läßt, daß dieses Motiv keine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit Tiam 1 spielt.

In weiteren experimentellen Ansätzen müßte, z.B. durch Copräzipitations-Analysen mit aufgereinigtem rekombinanten Protein, ermittelt werden, ob die Wechselwirkung zwischen Tiam 1 und der MPR 46-CD direkt oder über ein bisher nicht identifiziertes Linkerprotein erfolgt. Es wäre auch interessant herauszufinden, ob der MPR 46 mit Rac 1, dem Tiam 1-Substrat, im perinucleären Bereich colokalisiert und ob eine Inhibition von Tiam 1 bzw. Rac 1, z.B. durch Injektion der jeweiligen Antikörper in die Zelle, die Verteilung der MPR 46 verändert. Weiterhin könnte Tiam 1 in kultivierten Zellen überexprimiert werden um zu ermitteln, ob die Endocytose der MPR 46 inhibiert wird, wie für den EGF- und Transferrin-Rezeptor beschrieben [201].

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden analytischen Ergebnisse, daß neben bekannten cytosolischen Proteinen, die mit dem MPR 46 interagieren (AP-1-AP-4, GGA1 und GGA3), verschiedene andere Proteine an die cytoplasmatische Domäne des Rezeptors binden, die vor allem an der Regulation der Dynamik des Aktin-Cytoskeletts beteiligt sind (Talin, Tiam 1). Die Depolymerisierung des Aktin-Cytoskeletts des Aktin-Cytoskeletts führt zur Beeinträchtigung eines Transportweges des MPR 46: der Internalisierung von der Plasmamembran. Möglicherweise sind die Aktin-Motorproteine Myosin VII und Annexin III an dem Transport MPR 46-haltiger Vesikel entlang der Aktin-Filamente von Bedeutung.

Da Aktin selbst in den Eluaten der Affinitätsmatrix zu finden ist, kann davon ausgegangen werden, daß die Bindung von Aktin an die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 nicht direkt sondern unter Vermittlung von Linkerproteinen (evtl. Talin, Tiam 1 u.a.) erfolgt. Da es sich bei den eluierten Proteinen um ein Gemisch der interagierenden Proteine handelt, reflektieren die bisher identifizierten Proteine möglicherweise Mitglieder unterschiedlicher Regulationswege, welche die Internalisierung der MPR 46 hemmen (Tiam 1 → Rac 1 → Synaptojanin) oder stimulieren können (Talin → Aktin/Myosin).

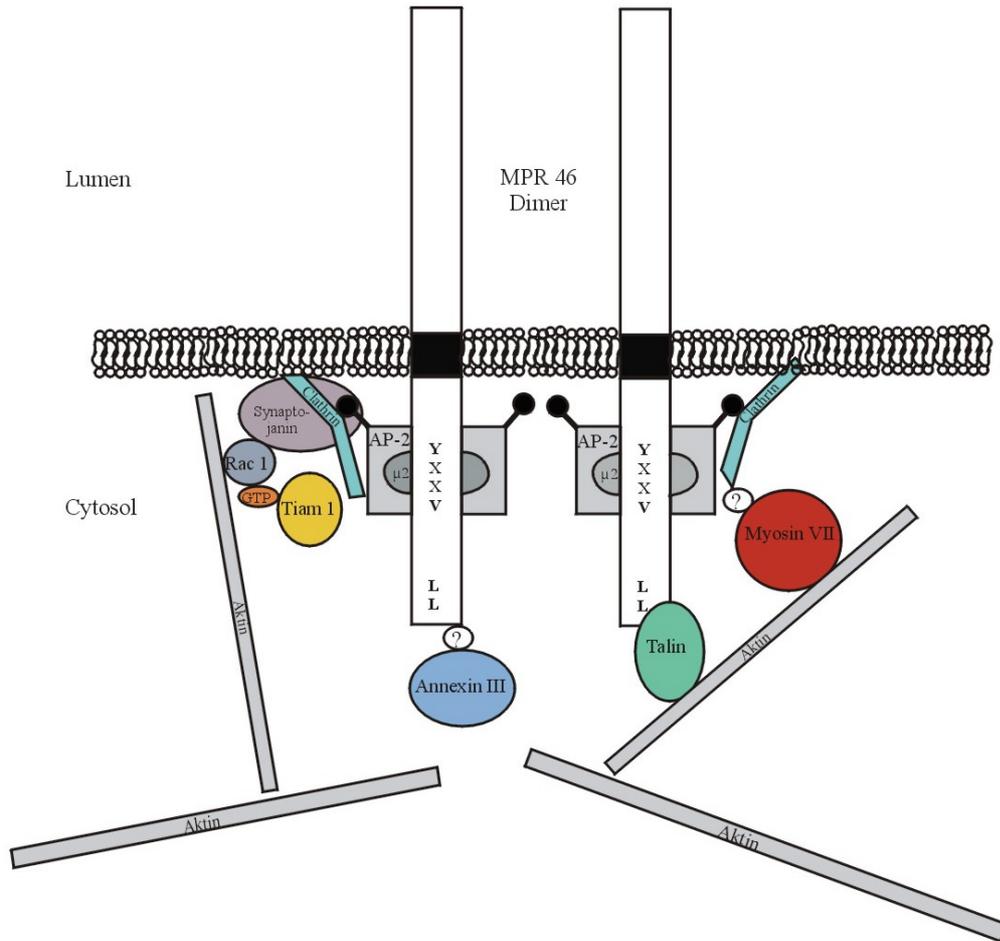


Abb. 20: Schematische Darstellung möglicher Protein-Protein-Interaktionen an der cytoplasmatischen Domäne des MPR 46.

Aus der vorliegenden Arbeit könnte sich obiges schematisch dargestellte Denkmodell ergeben, wobei eventuell vorhandene Linkerproteine mit Fragezeichen angegeben sind.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Für den gerichteten intrazellulären Transport des 46 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptors (MPR 46) entlang des Biosynthese- und Endocytoseweges sowie für die entsprechenden Recyclingwege sind verschiedene Signalstrukturen verantwortlich, die in der cytoplasmatischen Domäne des Rezeptors lokalisiert sind und bei Sortierungsprozessen in bestimmten zellulären Kompartimenten selektiv mit cytosolischen und membranständigen Proteinen wie den Adaptoren AP-1- AP-4, den Adaptor-ähnlichen Proteinen GGA1 und GGA3 und mit TIP 47 interagieren.

Im ersten Teil der Arbeit wurden mit Hilfe des *yeast-two-hybrid*-Systems eine Rattenhirn- und eine humane Hirn-cDNA-Bank nach potentiellen Interaktionspartner für die cytoplasmatische Domäne des 46 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptors (MPR46) durchsucht. Nach Untersuchung der Rattenhirn-Bank wurden 789 Klone identifiziert, die auf Histidin-Mangelmedium wuchsen und im β -Galactosidase-Test $lacZ^+$ waren. Von 21 Klonen, die sequenziert wurden, wiesen 18 ein frühzeitiges Stopcodon auf. Bei den verbliebenen drei Klonen handelte es sich um funktionell irrelevante Proteine (Pancreas-Elastase, Endotheliales Wachstumsfaktor und Mitochondriale Cytochrom Oxidase).

Bei Untersuchung der humanen Hirnbank wuchsen 41 Klone auf Histidin-Mangelmedium, von denen drei einen $lacZ^+$ -positiven Phänotyp zeigten. Zwei dieser Klone wiesen nach Sequenzierung ein frühzeitiges Stopcodon auf, die cDNA-Sequenz des dritten Klons konnte, infolge eines wiederholten vorzeitigen Abbruchs der Sequenzanalyse, vermutlich wegen einer 5'-GC-reicher Region, nicht ermittelt werden.

Die Suche nach potentiellen Interaktionspartnern für die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 mit Hilfe des *yeast-two-hybrid*-Systems wurde danach nicht weitergeführt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden durch affinitätschromatographische Aufreinigung der cytosolischen Fraktion des Rattenhirns sechs Proteine durch massenspektrometrische Analysen bzw. Edman-Abbau identifiziert und durch Westernblot-Analysen bestätigt, die spezifisch mit der cytoplasmatischen Domäne des MPR 46 interagieren: Talin (269 kDa), Myosin VII (230 kDa), Tiam 1 (205 kDa), Tubulin (55 kDa), Aktin (43 kDa) und Annexin III (33 kDa). Die gefundenen Interaktionen wurden durch Copräzipitations-Analysen verifiziert.

Durch Copräzipitation mit der mutierten cytoplasmatischen Domäne des MPR 46 konnte festgestellt werden, daß für die Wechselwirkung des MPR 46 mit Talin und Tiam 1 das Tyrosin-Signal (⁴⁵YRGV⁴⁸) nicht von entscheidender Bedeutung ist, da, bei Substitution der kritischen ⁴⁵Y und V⁴⁸ durch A keine Veränderung der Interaktion feststellbar war. Schließlich wurde die Lokalisation der identifizierten Proteine in Relation zu MPR 46 nach doppelimmun-fluoreszenzmikroskopischen Färbungen an MPR 46-überexprimierenden BHK- und an humanen SH-SY5Y-Neuroblastoma-Zellen verifiziert.

Aufgrund der beschriebenen Bedeutung einzelner Proteine bei der Modulation des Aktin-Cytoskeletts wurde die Abhängigkeit des intrazellulären Transportes der MPR von Aktin-Filamenten näher untersucht.

Bei Inkubation von MPR 46-überexprimierenden BHK-Zellen mit Latrunculin A, einem Aktin-depolymerisierenden Toxin, wurde die Endocytoserate der MPR 46 Konzentrations- und Zelltyp-abhängig um 45 %-90 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen reduziert. Die Endocytoserate des MPR 300 in BHK-Zellen, die diesen Rezeptor überexprimieren, sank auf 49 %-32 % nach Depolymerisierung des Aktin-Cytoskeletts im Vergleich zu intakten Kontrollzellen, was darauf hinweist, daß Aktin-Cytoskelett auch für die Internalisierung der MPR 300 erforderlich ist.

Dagegen erfolgt die MPR-vermittelte Sortierung neusynthetisierter lysosomaler Enzyme am *trans*-Golgi-Netzwerk unabhängig vom Aktin-Cytoskelett.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. von Figura K, Hasilik A., *Lysosomal enzymes and their receptors*. Annu Rev Biochem, 1986. **55**:167-93.
2. Kornfeld S, Mellman I., *The biogenesis of lysosomes*. Annu Rev Cell Biol, 1989. **5**: 483-525.
3. Ludwig T, Le Borgne R., Hoflack B, *Roles for mannose-6-phosphate receptors in lysosomal enzyme sorting, IGF-II-binding and clathrin-coat assembly*. Trends Cell Biol., 1995. **5**:202-206.
4. MacDonald RG, Pfeffer S, Coussens L, Tepper MA, Brocklebank CM, Mole JE, Anderson JK, Chen E, Czech MP, and Ullrich A., *A single receptor binds both insulin-like growth factor II and mannose-6-phosphate*. Science, 1988. **239**:1134-1137
5. Tong PY, Gregory W, Kornfeld S, *Ligand interactions of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. The stoichiometry of mannose 6-phosphate binding*. J Biol Chem, 1989. **264**:7962-7969.
6. Dintzis SM, Pfeffer S, *The mannose 6-phosphate receptor cytoplasmic domain is not sufficient to alter the cellular distribution of a chimeric EGF receptor*. EMBO J, 1990. **9**:77-84.
7. Dintzis SM, Velculescu V, Pfeffer SR, *Receptor extracellular domains may contain trafficking information. Studies of the 300-kDa mannose 6-phosphate receptor*. J Biol Chem, 1994. **269**:12159-12166.
8. Conibear E, Pearse B, *A chimera of the cytoplasmic tail of the mannose 6-phosphate/IGF-II receptor and lysozyme localizes to the TGN rather than prelysosomes where the bulk of the endogenous receptor is found*. J Cell Sci, 1994. **107**:923-932.
9. Tong PY, Kornfeld S, *Ligand interactions of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Comparison with the cation-independent mannose 6-phosphate receptor*. J Biol Chem, 1989. **264**:7970-7975.
10. Watanabe H, Grubb JH, Sly WS, *The overexpressed human 46 kDa mannose-6-phosphate receptor mediates endocytosis and sorting of β -glucuronidase*. Proc. Nat. Acad. Sci., 1990. **87**:8036-8040.

11. Bleekemolen JE, Stein M, von Figura K, Slot JW, Geuze HJ, *The two mannose 6-phosphate receptors have almost identical subcellular distributions in U937 monocytes*. Eur J Cell Biol, 1988. **47**:366-372.
12. Griffiths G, Matteoni R, Back R, Hoflack B, *Characterization of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor-enriched prelysosomal compartment in NRK cells*. J Cell Sci, 1990. **95**:441-461.
13. Klumperman J, Hille A., Veenendaal T, Oorschot V, Stoorvogel W, von Figura K, Geuze HJ, *Differences in the endosomal distributions of the two mannose 6-phosphate receptors*. J Cell Biol, 1993. **121**:997-1010.
14. Koster A, Saftig P, Matzner U, von Figura K, Peters C, Pohlmann R., *Targeted disruption of the M(r) 46,000 mannose 6-phosphate receptor gene in mice results in misrouting of lysosomal proteins*. EMBO J, 1993. **12**:5219-5223.
15. Ludwig T, Ovitt C, Bauer U, Hollinshead M, Remmler J, Lobel P, Ruther U, Hoflack B, *Targeted disruption of the mouse cation-dependent mannose 6-phosphate receptor results in partial missorting of multiple lysosomal enzymes*. EMBO J, 1993. **12**:5225-5235.
16. Kasper D, Dittmer F, von Figura K, Pohlmann R, *Neither type of mannose 6-phosphate receptor is sufficient for targeting of lysosomal enzymes along intracellular routes*. J Cell Biol, 1996. **134**:615-23.
17. Pohlmann R, Boeker M, von Figura K, *The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins*. J Biol Chem, 1995. **270**:27311-27318.
18. Braulke T, *Origin of lysosomal proteins*. Subcell Biochem, 1996. **27**:15-49.
19. Westlund B, Dahms N, Kornfeld S, *The bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. Localization of mannose 6-phosphate binding sites to domains 1-3 and 7-11 of the extracytoplasmic region*. J Biol Chem, 1991. **266**:23233-23239.
20. Dahms NM, Rose P, Molkentin JD, Zhang Y, Brzycki MA, *The bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. The role of arginine residues in mannose 6-phosphate binding*. J Biol Chem, 1993. **268**:5457-5463.
21. Dennis PA, Rifkin D, *Cellular activation of latent transforming growth factor beta requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**:580-584.

22. Schmidt B, Kiecke-Siensen C, Waheed A, Braulke T, von Figura K, *Localization of the insulin-like growth factor II binding site to amino acids 1508-1566 in repeat II of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor*. J Biol Chem, 1995. **270**:14975-14982.
23. Garmroudi F, Devi G, Slentz DH, Schaffer BS, MacDonald RG, *Truncated forms of the insulin-like growth factor II (IGF-II)/mannose 6-phosphate receptor encompassing the IGF-II binding site: characterization of a point mutation that abolishes IGF-II binding*. Mol Endocrinol, 1996.**10**:642-651.
24. Canfield WM, Kornfeld S, *The chicken liver cation-independent mannose 6-phosphate receptor lacks the high affinity binding site for insulin-like growth factor II*. J Biol Chem, 1989. **264**:7100-7103.
25. Clairmont KB, Czech M., *Chicken and Xenopus mannose 6-phosphate receptors fail to bind insulin-like growth factor II*. J Biol Chem, 1989. **264**:16390-16392.
26. Kang JX, Bell J, Leaf A, Beard RL, and Chandraratna RA, *Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II factor II receptor and lysosomal enzymes*. PNAS, 1998. **95**:13671-13676
27. Nykjaer A, Christensen E, Vorum H, Hager H, Petersen CM, Roigaard H, Min HY, Vilhardt F, Moller LB, Kornfeld S, Gliemann J., *Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor targets the urokinase receptor to lysosomes via a novel binding interaction*. J Cell Biol, 1998. **141**:815-828.
28. Kang JX, Bell J, Leaf A, Beard RL, Chandraratna RA., *Retinoic acid alters the intracellular trafficking of the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor and lysosomal enzymes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**:13687-13691.
29. Wendland M, Waheed A., von Figura K, Pohlmann R, *Mr 46,000 mannose 6-phosphate receptor. The role of histidine and arginine residues for binding of ligand*. J Biol Chem, 1991. **266**:2917-2923.
30. Waheed A, von Figura K, *Rapid equilibrium between monomeric, dimeric and tetrameric forms of the 46-kDa mannose 6-phosphate receptor at 37 degrees C. Possible relation to the function of the receptor*. Eur J Biochem, 1990. **193**:47-54.
31. Pohlmann R, Wendland M, Boecker C, von Figura K, *The two mannose-6-phosphate-receptors transport distinct complements of lysosomal enzymes*. J. Biol. Chem., 1995. **270**:27311-27318.

32. Chao HH, Waheed A, Pohlmann R, Hille A, von Figura K, *Mannose 6-phosphate receptor dependent secretion of lysosomal enzymes*. EMBO J, 1990. **9**:3507-3513.
33. Johnson KF, Kornfeld S, *A His-Leu-Leu sequence near the carboxyl terminus of the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is necessary for the lysosomal enzyme sorting function*. J Biol Chem, 1992. **267**:17110-17115.
34. Denzer K, Weber B, Hille-Rehfeld A, von Figura K, Pohlmann R, *Identification of three internalization sequences in the cytoplasmic tail of the 46 kDa mannose 6-phosphate receptor*. Biochem J, 1997. **326**: p. 497-505.
35. Honing S, Sosa M, Hille-Rehfeld A, von Figura K, *The 46-kDa mannose 6-phosphate receptor contains multiple binding sites for clathrin adaptors*. J Biol Chem, 1997. **272**:19884-19890.
36. Johnson KF, Chan W, Kornfeld S, *Cation-dependent mannose 6-phosphate receptor contains two internalization signals in its cytoplasmic domain*. Proc Natl Acad Sci USA, 1990. **87**:10010-10014.
37. Schweizer A, Kornfeld S, Rohrer J, *Proper sorting of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor in endosomes depends on a pair of aromatic amino acids in its cytoplasmic tail*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**:14471-14476.
38. Diaz E, Schimmoller F, Pfeffer SR, *A novel Rab9 effector required for endosome-to-TGN transport*. J Cell Biol, 1997. **138**:283-90.
39. Breuer P, Braulke T, *Stabilization of mutant 46-kDa mannose 6-phosphate receptors by proteasomal inhibitor lactacystin*. J Biol Chem, 1998. **273**:33254-8.
40. Rohrer J, Schweizer A, Johnson KF, Kornfeld S, *A determinant in the cytoplasmic tail of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor prevents trafficking to lysosomes*. J Cell Biol, 1995. **130**:1297-1306.
41. Odorizzi G, Cowles C, Emr SD, *The AP-3 complex: a coat of many colours*. Trends Cell Biol, 1998. **8**:282-288.
42. Stephens DJ, Banting G, *Specificity of interaction between adaptor-complex medium chains and the tyrosine-based sorting motifs of TGN38 and lgp120*. Biochem J, 1998. **335**:567-572.
43. Hemer F, Korner C, Braulke T, *Phosphorylation of the human 46-kDa mannose 6-phosphate receptor in the cytoplasmic domain at serine 56*. J Biol Chem, 1993. **268**:17108-17113.

44. Mauxion F, Le Borgne R., Munier-Lehmann H, Hoflack B, *A casein kinase II phosphorylation site in the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor determines the high affinity interaction of the AP-1 Golgi assembly proteins with membranes.* J Biol Chem, 1996. **271**:2171-2178.
45. Breuer P, Korner C, Boker C, Herzog A, Pohlmann R, Braulke T, *Serine phosphorylation site of the 46-kDa mannose 6-phosphate receptor is required for transport to the plasma membrane in Madin-Darby canine kidney and mouse fibroblast cells.* Mol Biol Cell, 1997. **8**:567-576.
46. Robinson MS, Bonifacino J, *Adaptor-related proteins.* Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**:444-453.
47. Storch S, Braulke T, *Multiple C-terminal motifs of the 46-kDa mannose 6-phosphate receptor tail contribute to efficient binding of medium chains of AP-2 and AP-3.* J Biol Chem, 2001. **276**:4298-4303.
48. Honing S, Sandoval I, von Figura K, *A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3.* EMBO J, 1998. **17**:1304-1314.
49. Rosorius O, Mieskes G, Issinger OG, Korner C, Schmidt B, von Figura K, Braulke T, *Characterization of phosphorylation sites in the cytoplasmic domain of the 300 kDa mannose-6-phosphate receptor.* Biochem J, 1993. **292**:833-838.
50. Lobel P, Fujimoto K, Ye RD, Griffiths G, Kornfeld S, *Mutations in the cytoplasmic domain of the 275 kd mannose 6-phosphate receptor differentially alter lysosomal enzyme sorting and endocytosis.* Cell, 1989. **57**:787-796.
51. Canfield WM, Johnson K, Ye RD, Gregory W, Kornfeld S, *Localization of the signal for rapid internalization of the bovine cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor to amino acids 24-29 of the cytoplasmic tail.* J Biol Chem, 1991. **266**:5682-5688.
52. Jadot M, Canfield W, Gregory W, Kornfeld S, *Characterization of the signal for rapid internalization of the bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor.* J Biol Chem, 1992. **267**:11069-77.
53. Johnson KF, Kornfeld S, *The cytoplasmic tail of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor has two signals for lysosomal enzyme sorting in the Golgi.* J Cell Biol 1992. **119**:249-257.

54. Meresse S, Ludwig T, Frank R, Hoflack B, *Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the bovine cation-independent mannose 6-phosphate receptor. Serines 2421 and 2492 are the targets of a casein kinase II associated to the Golgi-derived HAI adaptor complex.* J Biol Chem, 1990. **265**:18833-18842.
55. Nishimoto I, Ogata E, Okamoto T, *Guanine nucleotide-binding protein interacting but unstimulating sequence located in insulin-like growth factor II receptor. Its autoinhibitory characteristics and structural determinants.* J Biol Chem, 1991. **266**:12747-12751.
56. Korner C, Nurnberg B, Uhde M, Braulke T, *Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor fails to interact with G-proteins. Analysis of mutant cytoplasmic receptor domains.* J Biol Chem, 1995. **270**:287-295.
57. Hoflack B, Fujimoto K, Kornfeld S, *The interaction of phosphorylated oligosaccharides and lysosomal enzymes with bovine liver cation-dependent mannose 6-phosphate receptor.* J Biol Chem, 1987. **262**:123-129.
58. Wan L, Molloy S, Thomas L, Liu G, Xiang Y, Rybak SL, Thomas G, *PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization.* Cell, 1998. **94**:205-216.
59. Le Borgne R, Hoflack B, *Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells.* Biochim Biophys Acta, 1998. **1404**:195-209.
60. Gallusser A, Kirchhausen T, *The beta 1 and beta 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components.* EMBO J, 1993. **12**:5237-5244.
61. Schmidt, A, Hannah, MJ, and Huttner, WB, *Synaptic-like microvesicles of neuroendocrine cells originate from a novel compartment that is continuous with the plasma membrane and devoid of transferrin receptor.* J. Cell Biol, 1997. **137**:445-458.
62. Ohno H, Stewart J, Fournier MC, Bosshart H, Rhee I, Miyatake S, Saito T, Gallusser A, Kirchhausen T, Bonifacino JS, *Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins.* Science, 1995. **269**:1872-1875.
63. Orzech E, Livshits L, Leyt J, Okhrimenko H, Reich V, Cohen S, Weiss A, Melamed-Book N, Lebendiker M, Altschuler B and Aroeti Y, *Interactions between adaptor protein-1 of the clathrin coat and microtubules via type 1a microtubule-associated proteins.* J Biol Chem, 2001. **276**:31340-31348.

64. Meyer C, Eskelinen E, Guruprasad MR, von Figura K, Schu P, *Mu1A deficiency induces a profound increase in MPR300/IGF-II receptor internalization rate.* J Cell Sci, 2001. J Cell Sci 2001. **114**:4469-4476.
65. Zizioli D, Meyer C., Guhde G, Saftig P, von Figura K, Schu P., *Early embryonic death of mice deficient in gamma-adaptin.* J Biol Chem, 1999. **274**:5385-5390.
66. Folsch H, Pypaert M., Schu P, Mellman I, *Distribution and function of AP-1 clathrin adaptor complexes in polarized epithelial cells.* J Cell Biol, 2001. **152**:595-606.
67. Hirst J, Robinson M., *Clathrin and adaptors.* Biochim Biophys Acta, 1998. **1404**:173-193.
68. Kirchhausen T, Bonifacino J, Riezman H, *Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins.* Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**:488-495.
69. Rapoport I, Miyazaki M, Boll W, Duckworth B, Cantley LC, Shoelson S, Kirchhausen T., *Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complexes.* EMBO J, 1997. **16**:2240-2250.
70. Orlow S J, J. Invest. Dermatol., 1995. **105**:3-7.
71. Simpson F, Christopoulou L, Robinson MS., *Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3.* J Cell Biol, 1997. **137**: 835-845.
72. Simpson F, Bright N, West MA, Newman LS, Darnell RB, Robinson MS, *A novel adaptor-related protein complex.* J Cell Biol, 1996. **133**:749-760.
73. Dell'Angelica EC, Ohno H, Ooi CE, Rabinovich E, Roche KW, Bonifacino JS, *AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression.* EMBO J, 1997. **16**:917-928.
74. Dell'Angelica EC, Klumperman ., Stoorvogel W, Bonifacino JS, *Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin.* Science, 1998. **280**:431-434.
75. Dell'Angelica EC, Shotelersuk V, Aguilar RC, Gahl WA, Bonifacino JS., *Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor.* Mol Cell, 1999. **3**:11-21.
76. Le Borgne R, Alconada A, Bauer U, Hoflack B, *The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins.* J Biol Chem, 1998. **273**:29451-61.
77. Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S, Bonifacino JS, *Lysosome-related organelles.* FASEB J, 2000. **14**:1265-78.

78. Cowles CR, Odorizzi G, Payne GS, Emr SD, *The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole.* Cell, 1997. **91**:109-118.
79. Stepp JD, Huang K, Lemmon SK, *The yeast adaptor protein complex, AP-3, is essential for the efficient delivery of alkaline phosphatase by the alternate pathway to the vacuole.* J Cell Biol, 1997. **139**:1761-1774.
80. Newman LS, McKeever M, Okano HJ, Darnell RB, *Beta-NAP, a cerebellar degeneration antigen, is a neuron-specific vesicle coat protein.* Cell, 1995. **82**:773-783.
81. Ooi CE, Moreira J, Dell'Angelica EC, Poy G, Wassarman DA, Bonifacino JS, *Altered expression of a novel adaptin leads to defective pigment granule biogenesis in the Drosophila eye color mutant garnet.* EMBO J, 1997. **16**:4508-4518.
82. Mullins C, Hartnell M, Wassermann DA, Bonifacino JS, *Defective expression of the $\mu 3$ subunit of the Ap-3 adaptor complex in the Drosophila pigmentation mutant carmine.* Mol. Gen. Genet., 1999. **262**: 401-412.
83. Mullins C, Hartnell M, Bonifacino JS, *Distinct requirements for the AP-3 adaptor complex in pigment granule and synaptic vesicle biogenesis in Drosophila melanogaster.* Mol. Gen. Genet., 2000. **263**:1003-1014.
84. Kretzschmar D, Poeck B, Roth H, Ernst R, Keller A, Porsch M, Strauss R, Pflugfelder GO, *Defective pigment granule biogenesis and aberrant behavior caused by mutations in the Drosophila AP-3 β -adaptin gene ruby.* Genetics, 2000. **155**: 213-223.
85. Kantheti P, Qiao X, Diaz ME, Peden AA, Meyer GE, Carskadon SL, Kampfhauer D, Sufalko D, Robinson MS, Noebels JL, Burmeister M, *Mutation in AP-3 in the mocha mouse links endosomal transport to storage deficiency in platelets, melanosomes, and synaptic vesicles.* Neuron, 1998. **21**:111-122.
86. Feng L, Seymour B, Jiang S, To A, Peden AA, Novak EK, Zhen L, Rusiniak ME, Eicher EM, Robinson MS, *The $\beta 3A$ subunit gene of the Ap-3 adaptor-complex is altered in the mouse hypopigmentation mutant pearl, a model for Hermansky-Pudlak syndrome and night blindness.* Hum. Mol. Genet, 1999.**8**:323-330.
87. Blumstein J, Nakatsu F, Saito T, Ohno H, Kelley R, *The neuronal form of Adaptor Protein-3 is required for synaptic vesicle formations from endosome.* J. Neuroscience, 2001. **21**:8034-8042.
88. Hirst J, Bright N, Rous B, Robinson MS, *Characterization of a fourth adaptor-related protein complex.* Mol Biol Cell, 1999.**10**:2787-2802.

89. Simmen T, Honing S, Icking A, Tikkanen R, Hunziker W, *AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells*. Nat Cell Biol, 2002. **4**:154-159.
90. Hirst J, Lui W, Bright N, Totty N, Seaman M, Robinson MS, *A family of proteins with gamma-adaptin and VHS-domains that facilitate trafficking between the trans-Golgi network and the vacuole/lysosome*. J Cell Biol, 2000. **149**:67-79.
91. Boman A, *GGA proteins: new players in the sorting game*. J Cell Sci, 2001. **114**:3413-3418.
92. Dell'Angelica EC, Puertollano R, Mullins C, Aguilar RC, Vargas JD, Hartnell LM, Bonifacino JS, *GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex*. J Cell Biol, 2000. **149**:81-94.
93. Puertollano R, Aguilar R, Gorshkova I, Crouch R, Bonifacino J, *Sorting of mannose-6-phosphate receptors mediated by the GGAs*. Science, 2001. **292**:1712-1715.
94. Tooze, *GGAs tie up loose ends*. Science, 2001. **292**:1663-1665.
95. Jacobson L, Madsen P, Nielsen MS, Geraerts WP, Gliemann J, Smit AB, Petersen CM, *The sorLA cytoplasmic domain interacts with GGA1 and -2 and defines minimum requirements for GGA binding*. FEBS Lett, 2002. **511**:155-158.
96. Shiba T, Takatsu H, Matsugaki N, Kawasaki M, Igarashi N, Suzuki M, Kato R, Earnest T, Nakayama K, Wakatsuki S, *Structural basis for recognition of acidic-cluster dileucine sequence by GGA1*. Nature, 2002. **415**:937-941.
97. Misra S, Puertollano R, Kato Y, Bonifacino JS, Hurley JH, *Structural basis for acidic-cluster-dileucine sorting-signal recognition by VHS domains*. Nature, 2002. **415**:933-937.
98. Mullins C, Bonifacino JS, *Structural requirements for function of yeast GGAs in vacuolar protein sorting, alpha-factor maturation, and interactions with clathrin*. Mol Cell Biol, 2001. **21**:7981-7994.
99. Rosorius O, Issinger O, Braulke T, *Phosphorylation of the cytoplasmic tail of the 300-kDa mannose 6-phosphate receptor is required for the interaction with a cytosolic protein*. J Biol Chem, 1993. **268**:21470-21473.
100. Diaz E, Pfeffer S, *TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking*. Cell, 1998. **93**:433-443.
101. Carroll KS, Simon I, Krise J, Barbero P, Pfeffer SR, *Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47*. Science, 2001. **292**:1373-6.

102. Waheed A, Hasilik A, von Figura K, *Synthesis and processing of arylsulfatase A in human skin fibroblasts*. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1982. **363**:425-430.
103. Claussen M, Kubler B, Wendland M, Neifer K, Schmidt B, Zapf J, Bräulke T, *Proteolysis of insulin-like growth factors (IGF) and IGF binding proteins by cathepsin D*. Endocrinology, 1997. **138**:3797-803.
104. Wenk J, Hille A, von Figura K, *Quantitation of Mr 46,000 and Mr 300,000 mannose-6-phosphate receptor in human cells and tissues*. Biochem Int., 1991. **23**:723-732.
105. Birnboim HC, Doly J, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**:1513-1523.
106. Saiki RK, Gelfand D, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**:487-491.
107. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**:5463-5467.
108. Stein M, Zijderhand-Bleekemolen JE, Geuze H, Hasilik A, von Figura K, *Mr 46.000 mannose-6-phosphate specific receptor: It's role in targeting of lysosomal enzymes*. EMBO, 1987. **368**:927-936.
109. Laemmli U, *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**:680-685.
110. Fields S, Song O, *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. Nature, 1989. **340**:245-246.
111. Keegan L, Gill G, Ptashne M, *Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein*. Science, 1986. **231**:699-704.
112. Bartel P, Chien C, Sternglanz R, Fields S, *Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system*. Biotechniques, 1993. **14**:920-924.
113. Yang M, WZ, Fields S, *Protein-peptide interactions analyzed with the yeast two-hybrid system*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**:1152-1156.
114. Allen JB, Wu M, Edwards MC, Elledge SJ, *Finding prospective partners in the library: the two-hybrid system and phage display find a match*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**:511-516.
115. Schweizer A, Kornfeld S, Rohrer J, *Cysteine³⁴ of the cytoplasmic tail of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is reversibly palmitoylated and required for normal trafficking and lysosomal enzyme sorting*. J Cell Biol, 1996. **132**:577-584.

116. Ohno H, Fournier M, Poy G, Bonifacino JS, *Structural determinants of interaction of tyrosine-based sorting signals with the adaptor medium chains*. J Biol Chem, 1996. **271**:29009-29015.
117. Fields S, Song R, *The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions*. Trends Genet, 1994. **10**:286-292.
118. Alberts B, Bray D, Lewis L, Raff M, Roberts K, Watson J, *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, 1994. 3. Edition.
119. Bonifacino JS, Dell'Angelica E, *Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals*. J Cell Biol, 1999. **145**:923-926.
120. Owen DJ, Luzio P, *Structural insights into clathrin-mediated endocytosis*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**:467-474.
121. Kuebler E. and Riezman H, *Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast*. EMBO J, 1993. **12**:2855-2862.
122. Benedetti H., Raths S, Crausaz F and Riezman H, *The END3 gene encodes a protein that is required for the internalization step of endocytosis and for actin cytoskeleton organization in yeast*. Mol. Biol. Cell, 1994. **5**:1023-1037.
123. Munn AL, Stevenson BJ, Gelei MI, and Riezman H, *end5, end6, and end7: mutations that cause actin delocalization and block the internalization step of endocytosis in Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. Cell, 1995. **6**:1721-1742.
124. Geli MI, and Riezman H, *Endocytic internalization in yeast and animal cells: similar and different*. J. Cell Sci., 1998. **111**:1031-1037.
125. Gottlieb TA, Ivanov IE, Adesnik M, and Sabatini, DD, *Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical, but not the basolateral surface of polarized epithelial cells*. J. Cell Biol., 1993. **120**:695-710.
126. Jackman MR, Shurety W, Ellis JA, and Luzio JP, *Inhibition of apical but not basolateral endocytosis of ricin and folate in Caco-2 cells by cytochalasin D*. J. Cell Sci., 1994. **107**:2547-2556.
127. Lamaze C, Fujimoto LM, Yin HL, and Schmid SL, *The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells*. Biol. Chem., 1997. **272**:20332-20335.
128. Fujimoto LM, Roth R, Heuser JE, Schmidt, SL, *Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells*. Traffic, 2000. **1**:161171.

129. Gaidarov I, Santini F, Warren RA, and Keen, JH, *Spatial control of coated-pit dynamics in living cells*. Nature Cell Biol, 1999. **1**:1-7.
130. Qualmann B, Kessels M, Kelly RB, *Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton*. J Cell Biol, 2000. **150**: 111-116.
131. Trifaró JM, and Vitale ML, *Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release*. Trend Neurosci, 1993. **16**:466-472.
132. Shurety W, Stewart NL, and Stow JL, *Fluid-phase markers in the basolateral endocytic pathway accumulate in response to the actin assembly-promoting drug Jasplakinolide*. Mol. Biol. Cell, 1998. **9**:957-975.
133. Frischknecht F, Cudmore S, Moreau V, Reckmann I, Röttger S, and Way M, *Tyrosine phosphorylation is required for actin-based motility of vaccinia but not Listeria or Shigella*. Curr. Biol., 1999. **9**:89-92.
134. Merrifield CJ, Moss SE, Ballestrem C, Imhof BA, Giese G, Wunderlich I, and Almers W, *Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells*. Nat. Cell Biol, 1999. **1**:72-74.
135. Rozelle AL, Machesky LM, Yamamoto M, Driessens MHE., Insall RH, Roth MG, Luby-Phelps K, Marriott G, Hall A, and Yin HL, *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3*. Curr. Biol., 2000. **10**:311-320.
136. Taunton J, Rowning BA, Coughlin ML, Wu M, Moon RT, Mitchison TJ, and Larabell CA, *Actin-dependent propulsion of endosomes and lysosomes by recruitment of N-WASP*. J. Cell Biol., 2000. **148**:519-530.
137. Machesky L, *Rocket-based motility: a universal mechanism?* Nat Cell Biol, 1999. **1**:29-31.
138. Stein M, Zijderhand-Bleekemolen J, Geuze H, Hasilik A, von Figura K, *Mr 46,000 mannose 6-phosphate specific receptor: its role in targeting of lysosomal enzymes*. EMBO J, 1987. **6**:2677-2681.
139. Scheel J, MR, Ludwig T, Hoflack B, Kreis TE, *Microtubule depolymerization inhibits transport of cathepsin D from the Golgi apparatus to lysosomes*. J Cell Sci, 1990.**96**:711-720.
140. Goode B, Drubin D, Barnes G, *Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**:63-71.

141. Valderrama F, Duran J, Babia T, Barth H, Renau-Piqueras J, and Egea G, *Actin Microfilaments Facilitate the Retrograde Transport from the Golgi Complex to the Endoplasmic Reticulum in Mammalian Cells*. *Traffic*, 2001. **2**:717-726.
142. Horwitz A, Duggan K, Buck C, Beckerle MC, Burridge K, *Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage*. *Nature*, 1986. **320**:531-533.
143. Rees DJ, Ades S, Singer SJ, Hynes RO, *Sequence and domain structure of talin*. *Nature*, 1990. **347**:685-689.
144. Jockusch BM, Bubeck P, Giehl K, Kroemker M, Moschner J, Rothkegel M, Rudiger M, Schluter K, Stanke G, and Winkler J, *The Molecular Architecture of Focal Adhesions*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1995. **11**:379-416.
145. Bretscher A, Chambers D, Nguyen R, and Reczek D, *ERM-Merlin and EBP50 Protein Families in Plasma Membrane Organization and Function*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2000. **16**:113-143.
146. Pfaff M, Liu S, Erle DJ, and Ginsberg MH, *Integrin beta-Cytoplasmic Domains Differentially Bind to Cytoskeletal Proteins*. *J. Biol. Chem.*, 1998. **273**:6104-6109.
147. Sampath R, Gallagher P, Pavalko FM, *Cytoskeletal interactions with the leukocyte integrin beta2 cytoplasmic tail. Activation-dependent regulation of associations with talin and alpha-actinin*. *J Biol Chem*, 1998. **273**:33588-33594.
148. Calderwood DA, Zent R, Grant R, Rees DJ, Hynes RO, Ginsberg MH, *The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation*. *J Biol Chem*, 1999. **274**:28071-28074.
149. Patil S, Jedsadayanmata A, Wencel-Drake JJ, Wang W, Knezevic I, and Lam SCT, *Identification of a Talin-binding Site in the Integrin beta 3 Subunit Distinct from the NPLY Regulatory Motif of Post-ligand Binding Functions*. *J. Biol. Chem.*, 1999. **274**:28575-28583.
150. Borowsky ML, Hynes R. *Layilin, a novel talin-binding transmembrane protein homologous with C-type lectins, is localized in membrane ruffles*. *J Cell Biol*, 1998. **143**:429-442.
151. Bono P, Rubin K, Higgins JM, Hynes RO, *Layilin, a novel integral membrane protein, is a hyaluronan receptor*. *Mol Biol Cell*, 2001. **12**:891-900.
152. Muguruma M, Matsumura S, and Fukazawa T, *Direct interactions between talin and actin*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990. **171**: 1217-1223.

153. Yan B, Calderwood D, Yaspan B, Ginsberg MH, *Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain*. J Biol Chem, 2001. **276**:28164-28170.
154. Croce K, Flaumenhaft R, Rivers M, Furie BC, Herman IM, and Potter DA, *Inhibition of Calpain Blocks Platelet Secretion, Aggregation, and Spreading*. J. Biol. Chem., 1999. **274**:36321-36327.
155. Azam M, Andrabi SS, Sahr KE, Kamath L, Kuliopulos A, and Chishti AH, *Disruption of the Mouse μ -Calpain Gene Reveals an Essential Role in Platelet Function*. Mol. Cell. Biol., 2001. **21**:2213-2220.
156. Hemmings L, Rees D, Ohanian V, Bolton SJ, Gilmore AP, Patel B, Priddle H, Trevithick JE, Hynes RO, Critchley DR., *Talin contains three actin-binding sites each of which is adjacent to a vinculin-binding site*. J Cell Sci, 1996. **109**:2715-2726.
157. Gilmore AP, Burridge K, *Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate*. Nature, 1996. **381**:531-535.
158. Bass MD, Smith B, Prigent SA, Critchley DR, *Talin contains three similar vinculin-binding sites predicted to form an amphipathic helix*. Biochem J, 1999. **341**:257-263.
159. Martel V, Vignoud L, Dupe S, Frachet P, Block MR, Albiges-Rizo C, *Talin controls the exit of the integrin alpha 5 beta 1 from an early compartment of the secretory pathway*. J Cell Sci, 2000. **113**:1951-1961.
160. Niewohner J, Weber I, Maniak M, Muller-Taubenberger A, Gerisch G, *Talin-null cells of Dictyostelium are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis*. J Cell Biol, 1997. **138**:349-361.
161. Drickamer K., *Calcium-dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins*. Curr. Opin. Struct. Biol., 1993. **3**:393-400.
162. Hille-Rehfeld A, *Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1241**:177-194.
163. Hasson T, Cheney R, *Mechanisms of motor protein reversal*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**:29-35.
164. Cope MJ, Whisstock J, Rayment I, Kendrick-Jones J, *Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function*. Structure, 1996. **4**:969-987.
165. Weil D, Levy G, Sahly I, Levi-Acobas F, Blanchard S, El-Amraoui A, Crozet F, Philippe H, Abitbol M, Petit C, *Human myosin VIIA responsible for the Usher 1B*

- syndrome: a predicted membrane-associated motor protein expressed in developing sensory epithelia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**:3232-3237.
166. Chen ZY, Hasson T., Kelley PM, Schwender BJ, Schwartz MF, Ramakrishnan M, Kimberling WJ, Mooseker MS, and Corey DP, *Molecular cloning and domain structure of human myosin-VIIa, the gene product defective in Usher syndrome 1B.* Genomics, 1996. **36**:440-448.
167. Weil D, Kussel P, Blanchard S, Levy G, Levi-Acobas F, Drira M, Ayadi H, Petit C, *The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene.* Nat Genet, 1997. **16**:191-193.
168. Chishti AH, Kim A, Marfatia SM, Lutchman M, Hanspal M, Jindal H, Liu SC, Low PS, Rouleau GA, Mohandas N, Chasis JA, Gascard P, Takakuwa Y, Huang SC, Benz EJ Jr, Bretscher A, Fehon RG, Gusella JF, Ramesh V, and M.V. Solomon F, Tsukita S, Tsukita S, Hoover KB, et al., *The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane.* Trends Biochem Sci, 1998. **23**:281-282.
169. Mburu P, Liu X, Walsh J, Saw D Jr, Cope MJ, Gibson F, Kendrick-Jones J, Steel KP, Brown SD, *Mutation analysis of the mouse myosin VIIA deafness gene.* Genes Funct, 1997. **1**:191-203.
170. Hasson T, Walsh J, Cable J, Mooseker MS, Brown SD, Steel KP, *Effects of shaker-1 mutations on myosin-VIIa protein and mRNA expression.* Cell Motil Cytoskeleton, 1997. **37**:127-138.
171. Hasson T, Gillespie P, Garcia JA, MacDonald RB, Zhao Y, Yee AG, Mooseker MS, Corey DP, *Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia.* J Cell Biol, 1997. **137**:1287-1307.
172. Redowicz M, *Myosins and deafness.* Muscle Res Cell Motil, 1999. **20**:241-8.
173. Friedman TB, Sellers J, Avraham KB, *Unconventional myosins and the genetics of hearing loss.* Am J Med Genet, 1999. **89**:147-157.
174. Liu X, Udovichenko I, Brown SD, Steel KP, Williams DS, *Myosin VIIa participates in opsin transport through the photoreceptor cilium.* J Neurosci, 1999. **19**:6267-6274.
175. Gibson F, Walsh J., Mburu P, Varela A, Brown KA, Antonio M, Beisel KW, Steel KP, Brown SD., *A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1.* Nature, 1995. **374**:62-64.

176. Weil D, Blanchard S, Kaplan J, Guilford P, Gibson F, Walsh J, Mburu P, Varela A, Levilliers J, Weston MD, et al., *Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B*. Nature, 1995. **374**:60-61.
177. Kussel-Andermann P, El-Amraoui A., Safieddine S, Nouaille S, Perfettini I, Lecuit M, Cossart P, Wolfrum U, Petit C., *Vezatin, a novel transmembrane protein, bridges myosin VIIA to the cadherin-catenins complex*. EMBO J, 2000. **19**:6020-6029.
178. Kussel-Andermann P, El-Amraoui A., Safieddine S, Hardelin JP, Nouaille S, Camonis J, Petit C., *Unconventional myosin VIIA is a novel A-kinase-anchoring protein*. J Biol Chem, 2000. **275**:29654-29659.
179. Titus M, *The role of unconventional myosins in Dictyostelium endocytosis*. J Eukaryot Microbiol, 2000. **47**:191-196.
180. Creutz C, *The annexins and exocytosis*. Science, 1992. **258**:924-931.
181. Raynal P, Pollard H, *Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1197**:63-93.
182. Gerke V, and Moss SE, Biochem.Biophys. Acta, 1997. **1357**:129-154,.
183. Hofmann A, Raguene-Nicol C, Favier-Perron B, Mesonero J, Huber R, Russo-Marie F, Lewit-Bentley A., *The annexin A3-membrane interaction is modulated by an N-terminal tryptophan*. Biochemistry, 2000.**39**:7712-7721.
184. Ernst J, *Annexin III translocates to the periphagosomal region when neutrophils ingest opsonized yeast*. J Immunol, 1991. **146**:3110-3114.
185. Diakonova M, Gerke V, Ernst J, Liautard JP, van der Vusse G, Griffiths G., *Localization of five annexins in J774 macrophages and on isolated phagosomes*. Science, 1997. **110**:1199-1213.
186. Mizutani A, Tokumitsu H, Kobayashi R, and Hidaka H, *Phosphorylation of Annexin XI (CAP-50) in SR-3YI Cells*. J. Biol. Chem., 1993. **268**:15517-15522.
187. Fiedler K, Lafont F, Parton RG and Simons K, *Annexin XIIIb: a novel epithelial specific annexin is implicated in vesicular traffic to the apical plasma membrane*. J Cell Biol, 1995. **120**:1043-1053.
188. Lin HC, Südhof T, and Anderson RGW, *Annexin VI is required for Budding of Clathrin-Coated Pits*. Cell, 1992. **70**:283-291.
189. Bogusky MS, McCormick F, *Protein regulating Ras and its relatives*. Nature, 1993. **366**:643-654.

190. Habets GG, Scholtes E, Zuydgeest D, van der Kammen RA, Stam JC, Berns A, Collard JG, *Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins.* Cell, 1994. **77**:537-549.
191. Habets GG, van der Kammen R, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Hagemeyer A, Collard JG, *The invasion-inducing TIAM1 gene maps to human chromosome band 21q22 and mouse chromosome 16.* Cytogenet Cell Genet, 1995. **70**:48-51.
192. Fleming IN, Gray A., Downes CP, *Regulation of the Rac1-specific exchange factor Tiam1 involves both phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent components.* Biochem J, 2000. **351**:173-182.
193. Rameh LE, Arvidsson A, Carraway KL 3rd, Couvillon AD, Rathbun G, Crompton A, VanRenterghem B, Czech MP, Ravichandran KS, Wang DS, Chen CS, and Cantley LC, *A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains.* J Biol Chem, 1997. **272**:22059-22066.
194. Han J, Luby-Phelps K., Das B, Shu X, Xia Y, Mosteller RD, Krishna UM, Falck JR, White MA, Broek D, *Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav.* Science, 1998. **279**:558-560.
195. Stam JC, Sander E, Michiels F, van Leeuwen FN, Kain HE, van der Kammen RA, Collard JG, *Targeting of Tiam1 to the plasma membrane requires the cooperative function of the N-terminal pleckstrin homology domain and an adjacent protein interaction domain.* J Biol Chem, 1997. **272**:28447-28454.
196. Fleming IN, Elliott C, Collard JG, Exton JH, *Lysophosphatidic acid induces threonine phosphorylation of Tiam1 in Swiss 3T3 fibroblasts via activation of protein kinase C.* J Biol Chem, 1997. **272**:33105-33110.
197. Fleming IN, Elliott C, Exton JH, *Phospholipase C-gamma, protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II are involved in platelet-derived growth factor-induced phosphorylation of Tiam1.* FEBS Lett, 1998. **429**:229-233.
198. Fleming IN, Elliott C, Buchanan FG, Downes CP, Exton JH, *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates Tiam1 by reversible protein phosphorylation.* J Biol Chem, 1999. **274**:12753-12758.sss

199. Buchanan FG, Elliott C, Gibbs M, Exton JH, *Translocation of the Rac1 guanine nucleotide exchange factor Tiam1 induced by platelet-derived growth factor and lysophosphatidic acid.* J Biol Chem, 2000. **275**:9742-9748.
200. Malecz N, McCabe P, Spaargaren C, Qui RG, Chuang Y, and Symons M, *Synaptojanin 2, a novel Rac1 effector that regulates clathrin-mediated endocytosis.* Curr Biol, 2000. **10**:1383-1386.
201. Machesky L and Insall RH., *Signaling to actin dynamics.* J Cell Biol, 1999. **146**:267-272.
202. Kunda P, Paglin IG, Quiroga S, Kosik K, and Cáceres A, *Evidence for the Involvement of Tiam1 in Axon Formation.* The Journal of Neuroscience, 2001. **21**:2361-2372.
203. Mermall V, Post PL, and Mooseker MS, *Unconventional Myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction.* Science, 1998. **279**:527-533.
204. Morrison D, Kaplan D, Rapp U, and Roberts T, *Signal transduction from membrane to cytoplasm: Growth factors and membrane-bound oncogene products increase Raf-1 phosphorylation and associated protein kinase activity.* Proc. Natl.Acad. Sci. USA, 1988. **85**:8855-8859

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
A. bidest	Doppelt destilliertes Wasser
AD	Aktivierungsdomäne
AP	Adaptorprotein
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
AT	Aminotriazol
ASA	Arylsulfatase A
BD	Bindungsdomäne
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
Cath. D	Cathepsin D
CD	Cytoplasmatische Domäne
cDNA	Copy-DNA (zu der mRNA komplementäre DNA)
CK2	Casein Kinase 2
cpm	Impulse pro Minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
et al.	et alii (und andere)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
GDP	Guanosindiphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
M	Molar
M6P	Mannose-6-Phosphat

Abkürzungsverzeichnis

MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MPR46	46 kDa MPR
MPR 300	300 kDa MPR
MPR 46-CD	Cytoplasmatische Domäne des MPR 46
MPR 300-CD	Cytoplasmatische Domäne des MPR 300
mRNA	Messenger RNA
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
SD-Medium	Synthetic Dropout-Medium
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
tGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp

Bei einigen Begriffen, wie z.B. Blot oder Chase, wurden die englischen Fachtermini verwendet, da auch in der deutschsprachigen Fachliteratur eine Übersetzung unüblich ist.

9 ANHANG

Ein Teil der vorliegenden Ergebnisse wurden bereits vorgestellt:

- Wissenschaftliches Kolloquium des SFB 470 „Biologische Wirkung von Glycostrukturen“, Borstel, 9.11.2001, Vortrag: Dr. Stephan Storch: *Identifizierung von Proteinen, die mit der cytoplasmatischen Domäne des 46 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptors interagieren.* s
- Symposium des SFB 470 „Glycostructures in Biological Systems VII“, Hamburg, 10.-11.12.2001

Abstracts:

- S. Storch, K. Fritsch, and T. Braulke. 1999. Multiple motifs of the 46 kDa mannose-6-phosphate-receptor tail contribute to efficient binding of medium chains of AP-2 and AP-3. Jahrestagung der GBM, München
- T. Braulke, K. Fritsch, and S. Storch. 2002. Identification of proteins interacting with the cytoplasmic domain of the 46-kDa mannose-6-phosphate receptor. ELSO Meeting, Nice

Lebenslauf

Karin Fritsch

Persönliche Daten: geb. am 01. 05. 1969 in Hermannstadt, Rumänien,
deutsche Staatsangehörigkeit

Schulbildung

1975-1983 Allgemeinschule in Hermannstadt
1983- 1987 Gymnasium in Hermannstadt, Abschluß: Abitur
1992- 1993 Sonderlehrgang bei der Otto- Benecke- Stiftung zwecks
Erlangen der deutschen Hochschulreife, Abschluß: Abitur

Studium

1994-1999 Studiengang Biologie an der Freien Universität Berlin, Diplom
1999-2002 Promotion im Biochemischen Labor der Kinderklinik,
Universitätskrankenhaus Eppendorf, Universität Hamburg
Unter der Leitung von Prof. Dr. T. Braulke

Wissenschaftliche

Mitarbeitern

Jun.- Okt. 1995 FU- Berlin, Institut für Neurobiologie,
Prof. Dr. R. Menzel
„Lernen und Gedächtnis“

Jun.- Aug. 1996 FU- Berlin, Institut für Neurobiologie,
Prof. Dr. R. Menzel
„Regelwissen und Regellernen in biologischen Systemen“

Okt.- Dez. 1996 FU- Berlin, Institut für Neurobiologie
Prof. Dr. J. Pflüger
„Mechanismen entwicklungs- und erfahrungsabhängiger
Plastizität des Nervensystems“

Jan.- Mrz. 1998 Max-Delbrück-Centrum, Berlin
Prof. Dr. F. Rathjen
„Embryonalentwicklung des Nervensystems“

Danksagung

Ich möchte Prof. Dr. T. Braulke für die Vergabe des Themas und die Betreuung dieser Arbeit danken.

Ferner danke ich Prof. Dr. E. Partje für die Bereitschaft, die vorliegende Arbeit ebenfalls zu begutachten.

Ich danke Stephan Storch für Vektoren, cDNAs und ein offenes Ohr für Fragen über Bakterien und Hefen, vorzugsweise über solche, die nicht wachsen wollen...

Mein besonderer Dank gilt Bernd Kübler, der mir mehr als einmal gezeigt hat wie man eine Graphik, die sich irgendwo zwischen Bits, Bites und dem Jupiter befindet, wieder auf den Monitor locken kann. Und für die vielen Antworten über Proteine und über männliche Sichtweisen im Allgemeinen und im Speziellen. Jetzt weiß ich mehr.

Ich danke Claudia Heine für die vielen Sätze, die häufig mit: „Ach komm, Karin....“ anfangen und meistens mit „...das ist wirklich ein guter Film.“ endeten.

Oder wahlweise mit „...nur *ein* schnelles Bier.“ Soso.

Mein Dank sei aus ähnlichem Grund auch Sabrina Jabs ausgesprochen und auch dafür, daß sie niemals aufgehört hat, mich ins Theater zu peitschen.

Ich danke Lili und Sanna für bulgarische und finnische Einschläge, die sie meiner ohnehin schon arg gebeutelten „englischen“ Aussprache verpaßt haben. Jetzt ist sie ganz ruiniert!

Dank sei auch Nicola, Sandra und Stephan für die vielen, vielen Buchstaben, die sie in diese Arbeit eingefügt oder daraus entfernt habe, häufig murmelnd: „Ich glaube, dieses Wort gibt es nicht.“

Ich danke Chris dafür, daß er für mich d. t. R. w. hat. Er weiß schon.

*

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die während dieser Zeit mit mir gekämpft und mich begleitet hat.