

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

Arbeitsbereich Molekularbiologie

Prof. Dr. rer. nat. T. Braulke

## **Untersuchungen zur Interaktion des krankheitsrelevanten CLN6-Proteins mit der Inositollipidphosphatase TPIP**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

**Marta Krzoska**

aus Laura-Hütte (Polen)

Hamburg 2010

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät am:**

**Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. T. Brulke**

**Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. H. J. Kreienkamp**

**Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. E. Kramer**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zielsetzung</b> .....	5
<b>2. Einleitung</b> .....	6
<b>2.1 Die Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen</b> .....	6
2.1.1 CLN6-Indisch-iberische spätinfantile NCL-Variante .....	10
<b>2.2 Biogenese von Lysosomen</b> .....	11
2.2.1 Synthese und Transport lysosomaler Proteine .....	11
2.2.2 Endocytose-Mechanismus der Lysosomen .....	13
<b>2.3 Inositolphosphate</b> .....	14
2.3.1 Inositolphosphate und Endocytose .....	14
2.3.2 Struktur und Nomenklatur von Inositolphosphaten .....	15
2.3.3 Inositolphosphat metabolisierende Enzyme .....	15
2.3.4 Inositolphosphat-Kinasen .....	16
2.3.4.1 Ins(1,3,4,5,6)P <sub>5</sub> -2-Kinase (Inositolphosphat5-2Kinase[IP5-2K]) .....	17
2.3.4.2 Inositolphosphatmultikinase (IPMK) .....	17
2.3.5 Inositolphosphate zur Signaltransduktion .....	17
<b>2.4 TPIP eine Inositolipidphosphatase als Interaktionspartner von CLN6</b> .....	19
<b>3. Material und Methoden</b> .....	21
<b>3.1 Material</b> .....	21
3.1.1 Geräte .....	21
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien .....	22
3.1.3 cDNA .....	22
3.1.4 Vektoren .....	23
3.1.5 Zelllinien .....	24
3.1.6 Bakterienstamm .....	24
3.1.7 Antikörper .....	24
3.1.8 Verwendete Kids .....	25
3.1.9 Radioaktiver Ligand .....	25
<b>3.2 Molekularbiologische Methoden</b> .....	25
3.2.1 Photometrische DNA-Konzentrationsmessung .....	25
3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	25
3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	26
3.2.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus den Agarose-Gelen .....	26
3.2.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	27
3.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten .....	27
3.2.7 Präparation von chemokompetenten <i>E.coli</i> -Zellen .....	27
3.2.8 Transformation chemokompetenter Bakterien .....	29
3.2.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	29
3.2.10 DNA-Sequenzierung .....	29
<b>3.3 Proteinbiochemische Methoden</b> .....	30
3.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	30
3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	30
3.3.3 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen .....	32
3.3.4 Westernbolt-Analysen .....	32

3.3.5 Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen .....	33
3.3.6 Overlay-Assay .....	36
3.3.7 <i>Pull-down</i> -Experimente mit aufgereinigten Fusionsproteinen .....	36
<b>3.4 Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>37</b>
3.4.1 Kultivierung von Zellen .....	37
3.4.2 Kultivierung stabiler Zelllinien .....	37
3.4.3 Trypsinieren von Zellen .....	38
3.4.4 Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen .....	38
3.4.5 Transiente Transfektion von HEK293 mit Lipofectamin <sup>TM</sup> 2000.....	38
3.4.6 Ernten von Zellen .....	39
3.4.7 Zellpräparation für Inositolphosphat-Analytik .....	39
3.4.8 Endocytose von [ <sup>125</sup> J]-Arylsulfatase B.....	40
3.4.9 „Pulse/Chase“ .....	41
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
<b>4.1 Direkte Interaktion zwischen TPIP<math>\beta</math> und CLN6</b> .....	<b>43</b>
4.1.1 Klonierung von TPIP $\beta$ in pQE-32 .....	43
4.1.2 Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine für einen <i>Overlay</i> -Assay.....	44
4.1.3 Strategie des <i>Pull-down</i> -Experiments .....	47
4.1.4 Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine für <i>Pull-down</i> -Experimente .....	48
4.1.5 Nachweis der Direkten Interaktion zwischen TPIP $\beta$ und CLN6 mit <i>Pull-down</i> -Assays .....	49
<b>4.2 Einfluss von TPIP<math>\alpha</math> und TPIP<math>\beta</math> auf die Proteinexpression von CLN6 und AP-2</b> .....	<b>50</b>
<b>4.3 Einfluss von TPIP<math>\alpha</math> und TPIP<math>\beta</math> auf die M6P-abhängige Endocytose von [<sup>125</sup>J]-Arylsulfatase B</b> .....	<b>51</b>
<b>4.4 Veränderung der Inositolphosphat-Spiegel in IP5-2K- und IPMK-überexprimierenden HEK293-Zellen</b> .....	<b>52</b>
<b>4.5 Einfluss der IPMK- und IP5-2K-Expression auf die M6P-abhängige Endocytose von [<sup>125</sup>J]-Arylsulfatase B</b> .....	<b>55</b>
<b>4.6 Prozessierung, Abbau und Akkumulation von radioaktiv markierter Arylsulfatase B</b> .....	<b>56</b>
4.6.1 „Pulse/Chase“ in stabil transfizierten und untransfizierten HEK293-Zellen .....	56
4.6.2 Endocytose, Prozessierung und Abbau von Arylsulfatase B in humanen Hautfibroblasten und HEK293-Zellen.....	59
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>62</b>
<b>5.1 Direkte Interaktion zwischen TPIP<math>\beta</math> und CLN6 <i>in vitro</i></b> .....	<b>62</b>
<b>5.2 Einfluss von TPIP<math>\alpha</math> und TPIP<math>\beta</math> auf den AP-2-abhängigen Transport von Rezeptoren</b> .....	<b>64</b>
<b>5.3 Phosphatidylinositolphosphate und Endocytose</b> .....	<b>67</b>
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>70</b>
<b>7. Abkürzungen</b> .....	<b>72</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>75</b>
<b>9. Anhang</b> .....	<b>86</b>

# 1. Zielsetzung

Die Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen (NCL) stellen die größte Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen im Kindesalter dar, die zu den lysosomalen Speichererkrankungen gezählt werden. Die NCLs lassen sich genetisch und klinisch in 8 CLN-Formen einteilen. Wie Defekte des im Endoplasmatischen Reticulum (ER) lokalisierten CLN6 Membranprotein zu lysosomalen Dysfunktionen und somit zur spätinfantilen varianten Form der NCL (CLN6) führen, ist unbekannt. Es wird vermutet, dass Störungen im intrazellulären Transport lysosomaler Enzyme zur Dysfunktion der Lysosomen beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, die direkte Interaktion von CLN6 mit einem in Vorarbeiten identifizierten potentiellen Interaktionspartner, der Phosphatidylinositol-3-Phosphatase TPIP $\beta$ , mittels *Overlay*- und *Pulldown*-Experimenten zu verifizieren. Zusätzlich soll der Einfluss von TPIP $\alpha$  und TPIP $\beta$  auf die Expression des endogenen CLN6 und des Adaptorproteins AP-2, das an der Endocytose beteiligt ist, untersucht werden. Da Phosphatidylinositolphosphate und AP-2 an der Rezeptor-vermittelten Endocytose von Liganden beteiligt sind, soll die Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-abhängige Internalisierung der lysosomalen Arylsulfatase B und ihre proteolytische Aktivierung in Lysosomen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen getestet werden.

Schließlich sollte auch der Einfluss veränderter zellulärer Inositolphosphat-Spiegel, wie sie im Hirn von CLN6-defekten Mäusen gemessen wurden, auf den Transport der Arylsulfatase B entlang des endocytotischen Weges zum Lysosomen ermittelt werden. Diese Versuche sollen an HEK293-Zellen durchgeführt werden, die die Inositolphosphatmultikinase (IPMK) und Inositolphosphat5-2Kinase (IP5-2K) überexprimieren.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Die Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen**

Die Gruppe der lysosomalen Speichererkrankungen umfasst mehr als 50 Krankheiten, die in Mucopolysaccharidosen, Glycogenosen, Lipidosen und Neuronale Ceroid Lipofuszinosen unterteilt werden. Die am weitesten verbreitete Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter stellen die Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen (NCL) dar. Dabei handelt es sich um lysosomale Speichererkrankungen, die mit einer weltweiten Inzidenz von 1:30.000 Lebendgeborenen autosomal rezessiv vererbt werden (Goebel & Wisniewski, 2004). Der Fachausdruck Neuronale Ceroid Lipofuszinose wurde 1969 eingeführt, obwohl der erste klinische Fall bereits 1826 von Stengel beschrieben wurde. Die Erkrankung besitzt zwei Hauptmerkmale, die vom Terminus erfasst werden: die Beteiligung der Neurone und des lysosomalen Speichermaterials an dieser neurodegenerativen Erkrankung. Dabei ähnelt das Speichermaterial in Hinblick auf die Autofluoreszenz und die histologischen Färbungseigenschaften den Lipopigmenten Ceroid und Lipofuszin (Zeman & Dyken, 1969), wobei die Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase die Hauptkomponente des Speichermaterials bei den meisten NCL-Gendefekten darstellt. Die Speicherung findet in vielen Organen und Geweben statt, die nur im zentralen Nervensystem (ZNS) und der Retina zum Verlust von Neuronen führt. Bei der CLN1-Defizienz sind die Sphingolipid-Aktivator Proteine A und D die Hauptproteine, die akkumulieren (Tyynelä, 2004). Diese neurodegenerative Erkrankung geht mit folgenden klinischen Symptomen einher: Demenz, Gehirnatrophie, Visusverlust durch Retinopathie, motorische Störungen und Epilepsie. Die NCLs führen zum vorzeitigen Tod der Patienten.

Die verschiedenen NCL-Formen wurden anfänglich auf der Grundlage des Erkrankungsbeginns in infantile, spätinfantile, juvenile, adulte und kongenitale Formen unterteilt (Dyken, 1989). Seit 2000 wurden die NCLs aufgrund des betroffenen Genlokus mit CLN1-10 benannt (Tab. 1). Die bekannten Gene kodieren für lösliche lysosomale Enzyme (CLN1, CLN2, CLN5 und CLN10) und polytope Membranproteine, die im späten Endosom (CLN6), späten Endosom/Lysosom (CLN3 und CLN7) und im endoplasmatischen Reticulum (CLN6 und CLN8) lokalisiert sind (Kytälä *et al.*, 2006; Siintola *et al.*, 2007). Die Existenz der bisher nicht

identifizierten Gene CLN4 und CLN9 wird aufgrund des Fehlens von Mutationen in bekannten NCL-Genen bei bestimmten Patienten mit adulter NCL (CLN4) und juveniler (CLN9) vorhergesagt.

**Tab. 1: Gruppe der Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen**

<b>CLN</b>	<b>Genprodukt</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Klinische Verlaufsform(en)</b>
<b>1</b>	Palmitoyl-Protein Thioesterase 1	spätes Endosom/Lysosom	infantil, adult
<b>2</b>	Tripeptidylpeptidase 1	spätes Endosom/Lysosom	spätinfantil
<b>3</b>	CLN3-Membranprotein	spätes Endosom/Lysosom	juvenil
<b>4</b>	unbekannt	unbekannt	adult
<b>5</b>	CLN5	spätes Endosom/Lysosom	spätinfantil (finnische Variante)
<b>6</b>	CLN6-Membranprotein	endoplasmatisches Reticulum	spätinfantil (indisch-iberische Variante)
<b>7</b>	CLN7-Membranprotein	spätes Endosom/Lysosom	spätinfantil (türkische Variante)
<b>8</b>	CLN8-Membranprotein	endoplasmatisches Reticulum/ERGIC	nordische Epilepsie
<b>9</b>	unbekannt	unbekannt	juvenil
<b>10</b>	Cathepsin D	spätes Endosom/Lysosom	kongenital, juvenil
<b>n.b.*</b>	CIC-6-Membranprotein	spätes Endosom	mild

\*n.b. nicht bezeichnet

Mutationen des **CLN1**-Gens verursachen eine sehr rasch fortschreitende Gehirnerkrankung, die gegen Ende des ersten Lebensjahres beginnt (infantile NCL) und einen frühen Tod des Patienten im Alter von 10-12 Jahren zur Folge hat. Einige Mutationen verursachen Krankheitsbilder, die erst später in der Kindheit und Jugend, oder sogar erst im Erwachsenenalter beginnen (spätinfantile, juvenile, adulte Formen) (Haltia, 2003; Goebel & Wisniewski, 2004). CLN1 ist häufig in Finnland, kommt aber, jedoch seltener, in anderen Ländern vor. Die Mutationen führen zum Aktivitätsverlust der lysosomalen Palmitoylprotein-Thioesterase I (PPT I), die als Vorläuferpolypeptid (Proform) bestehend aus 306 Aminosäuren am Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, anschließend prozessiert, glycosyliert, über den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6P)-abhängigen Weg zum

Lysosom transferiert und dort zum aktiven 38kDa-Protein gespalten wird. Die Aufgabe der PPT I besteht in der Hydrolyse von Fettsäureketten (C14-C18) von Cysteinresten posttranslational modifizierter Proteine wie Ha-Ras und Peptiden neurospezifischer Proteine wie Gap43 (Kyttälä *et al.*, 2006).

**CLN2** beginnt in typischen Fällen um das dritte Lebensjahr und wird daher traditionell als klassische spätinfantile NCL bezeichnet, die sich jedoch auch juvenil manifestieren kann (Wisniewski *et al.*, 2001). In der Regel werden die Patienten nicht älter als 10 bis 15 Jahre, während atypische Mutationen mit einem verzögerten Verlauf einhergehen können. Mutationen im CLN2-Gen führen zum Aktivitätsverlust der lysosomalen Tripeptidylpeptidase I (TPP I), die als Proform von 563 Aminosäuren am ER synthetisiert, anschließend glykosyliert und im Lysosom zum aktiven 46kDa-Protein prozessiert wird (Lin *et al.*, 2001; Golabek *et al.*, 2003). Dieses Enzym katalysiert die Abspaltung N-terminaler Tripeptide von Polypeptiden (Vines, 1999).

**CLN3**-Mutationen verursachen die sog. Batten Disease, die nach den Autoren der Erstbeschreibung auch als Spielmeyer-Vogt-Sjögren-Disease bezeichnet wird. Die Erkrankung manifestiert sich im Alter von 5 bis 8 Jahren. Trotz des Verfalls aller Leistungen überleben die Patienten bis zur dritten oder vierten Lebensdekade. Diese als klassische juvenile NCL bezeichnete neurodegenerative Erkrankung zeichnet sich durch eine Mutation im CLN3-Gen aus, das für ein hydrophobes Protein mit 6 Transmembrandomänen und einer molaren Masse von 43kDa kodiert. Die genaue Funktion des CLN3-Membranproteins und die spezifische Bedeutung der Defizienz für neuronale Zellfunktionen sind weitgehend unbekannt. 2005 wurde von Ramirez-Montealegre & Pearce beschrieben, dass CLN3 an dem ATP-abhängigen Arginin-Transport beteiligt ist. Außerdem weist es eine Homologie mit dem Hefeprotein btn1 auf, das bei der Aufrechterhaltung des vakuolären pH-Wertes mitwirkt (Pearce & Sherman, 1997; Pearce *et al.*, 1999). Sowohl in neuronalen als auch in nicht-neuronalen Zellen konnte überexprimiertes sowie endogenes CLN3 in der Leber der Maus in späten Endosomen/Lysosomen nachgewiesen werden (Janes *et al.*, 1996). Der Transport von CLN3 zum Lysosom erfolgt M6P-unabhängig über ein komplexes Sortierungssignal (Storch *et al.*, 2004; Kyttälä *et al.*, 2004).

Bei **CLN4** spricht man von Kufs-Disease oder auch adulter NCL. NCL-Krankheiten, die im Erwachsenenalter beginnen, sind sehr selten und nicht klar definiert. Der für die NCL-Formen typische Visusverlust tritt hier nicht auf und auch sonst zeichnet sich

die adulte NCL durch einen milden Krankheitsverlauf aus. Das betroffene Gen konnte noch nicht identifiziert werden (Goebel & Wisniewski, 2004).

**CLN5**, eine seltene, spätinfantile NCL, die sich auf einen Defekt im CLN5-Gen zurückführen lässt. CLN5 kodiert ein glykosyliertes Protein von 407 Aminosäuren mit noch unbekannter Funktion, das in nicht-neuronalen Zellen im Lysosom lokalisiert ist. CLN5 soll in löslichen Formen (44kDa, 41kDa und 39kDa) und in membrangebundener Form (47kDa) vorkommen, wobei das 47kDa-Protein mit den NCL-Proteinen CLN2 (TPP I) und CLN3 eine Wechselwirkung eingehen soll. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass die TPP I-Aktivität in Fibroblasten von CLN5-Patienten erhöht ist (Isosomppi *et al.*, 2002; Vesa *et al.*, 2002).

Gendefekte im **CLN7** liegen bei der türkischen spätinfantilen Variante der NCLs zugrunde. Bei dem Genprodukt handelt es sich um ein Membranprotein, das zur Familie der Major facilitator superfamily (MFS) gehört, dessen Substratspezifität jedoch unbekannt ist. CLN7 ist im späten Endosom/Lysosom lokalisiert (Siintola *et al.*, 2007; Steenhuis *et al.*, 2010).

Im **CLN8**-Gen können unterschiedliche Mutationen zwei Krankheitsbilder hervorrufen: zum einen die türkische spätinfantile variante Form mit einem rasch fortschreitenden Krankheitsverlauf und zum anderen eine progressive Epilepsie-Form mit mentaler Retardierung (EPMR), oder auch nordische Epilepsie, die vor allem in der finnischen Bevölkerung auftritt und durch einen eher milden Phänotyp charakterisiert ist (Ranta *et al.*, 1999; Ranta *et al.*, 2004). Das 33 kDa-Transmembranprotein (CLN8-Produkt) konnte in nicht-neuronalen Zellen sowohl im ER als auch im ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) und in neuronalen Zellen im ER nachgewiesen werden (Lonka *et al.*, 2000; Lonka *et al.*, 2004). Da es zu der TLC- (TRAM, Lag1p, CLN8) Familie gezählt wird, werden Funktionen von CLN8 bei der Translokation neusynthetisierter Transmembranproteine und der Ceramidsynthese diskutiert (Winter & Ponting, 2002; Guillas *et al.*, 2003).

Unter **CLN9** werden Patienten mit einer juvenilen klinischen Verlaufsform eingruppiert, die keine Mutationen in den klassischen CLN-Genen aufweisen (Schulz *et al.*, 2006). In Fibroblasten dieser Patienten sind Veränderungen im Ceramid-, Dihydroceramid- und Sphingomyelin-Stoffwechsel beschrieben worden. Defekte der lysosomalen Protease Cathepsin D, die auf Mutationen im **CLN10**-Gen zurückzuführen sind, führen zur schweren kongenitalen NCL bzw. spätinfantilen Form der NCL (Siintola, 2006; Steinfeld, 2006).

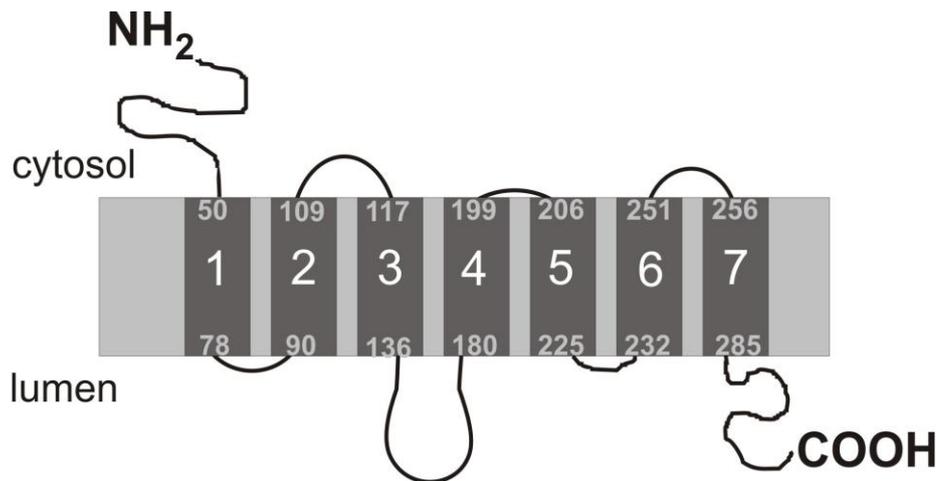
Eine milde Verlaufsform der NCL, die nicht näher bezeichnet ist, ist assoziiert mit Mutationen in einem polytopen Membranprotein, dem Chlorid-Kanal-6 (CLC-6), der im späten Endosom lokalisiert ist (Poët *et al.*, 2006).

### **2.1.1 CLN6-Indisch-iberische spätinfantile NCL-Variante**

**CLN6**-Mutationen verursachen die spätinfantile variante Form der NCLs, sowie die frühjuvenile Verlaufsform dieser Erkrankung (Lake-Cavanagh-Disease; Williams *et al.*, 1999). Die Krankheit kann sich zwischen dem 18. Lebensmonat und dem 8. Lebensjahr manifestieren. Die Patienten, deren Krankheitsverlauf sich durch progressive Visusverschlechterung bis zur Erblindung, epileptische Anfälle und Verlust der motorischen Fähigkeiten auszeichnet, überleben bis zur zweiten oder dritten Lebensdekade. Diese Patienten zeigen je nach Organ und Gewebetyp ein unterschiedliches Speichermuster der ATP-Synthase Untereinheit c (Goebel & Wisniewski, 2004).

Das CLN6-Gen ist auf Chromosom 15q23 lokalisiert. CLN6-Transkripte von 2,4kb und 3,7kb kommen ubiquitär vor (Wheeler *et al.*, 2002). CLN6 kodiert ein 28kDa nicht-glykosyliertes Protein von 311 Aminosäuren mit 7 Transmembrandomänen, das im ER lokalisiert ist (Gao *et al.*, 2002; Wheeler *et al.*, 2002; Heine *et al.*, 2004). Der C-Terminus des CLN6-Proteins orientiert sich dabei mit 26 Aminosäuren luminal, die N-terminale Domäne mit 49 Aminosäuren zytosolisch (Heine *et al.*, 2007) (Abb.1). CLN6 besitzt keine Homologien zu anderen bekannten Proteinen oder zu bekannten funktionellen Domänen. Die Funktion des CLN6-Proteins ist unbekannt. Es konnte gezeigt werden, dass CLN6 Homodimere bilden kann (Heine *et al.*, 2004).

Bisher sind 20 verschiedene Mutationen im CLN6-Gen nachgewiesen worden, wobei bestimmte Mutationen gehäuft in Familien des gleichen Ursprungs auftreten, zu denen z. B. eine 3 Basen Deletion zählt (c.460\_462del ATC), die zum Verlust der Aminosäure Isoleucin 154 führt (Teixeira *et al.*, 2003; Sharp *et al.*, 2003; Siintola *et al.*, 2005). Es gibt zwei natürliche Tiermodelle, das *OCLE6*-Schaf und die *nclf*-Maus, die eine ähnliche Symptomatik wie bei der menschlichen CLN6-Krankheit aufweisen.



### Abb. 1: CLN6-Protein als schematische Darstellung

Diese schematische Darstellung des CLN6 zeigt seine 7 Transmembrandomänen (1-7), wobei jeweils die erste und letzte Aminosäure einer Transmembrandomäne nummeriert sind. Der C-Terminus orientiert sich ins Lumen, der N-Terminus ragt ins Zytosol des ER.

Die beiden CLN6-Schaf-Modelle sind zum einen das South Hampshire Schaf aus Neuseeland, zum anderen das australische Merino-Schaf (Tammen *et al.*, 2006). Bereits 12 Tage nach der Geburt können im okzipitalen und somatosensorischen Cortex aktivierte Astrozyten und aktivierte Mikroglia nachgewiesen werden (Oswald *et al.*, 2005). Es folgen Neurodegeneration und progressive Astrozytose, Verhaltens- und motorische Störungen, Sehverlust und der vorzeitige Tod mit ca. 27 Monaten (Mayhew *et al.*, 1985; Cook *et al.*, 2002).

Bei *nclf*-Mäusen ist bereits 11 Tage nach der Geburt Speichermaterial (sub c) in allen Hirnregionen nachzuweisen. Es folgen Retinopathie, reaktive Gliose, progressive Lähmungserscheinungen an den Hinterläufen bis hin zu völliger Lähmung und schließlich Krämpfe, die das Ende der Erkrankung um den 12. Lebensmonat prognostizieren (Bronson *et al.*, 1998).

## 2.2 Biogenese von Lysosomen

### 2.2.1 Synthese und Transport lysosomaler Proteine

Lysosomen sind 0,25-0,5µm große, membranumschlossene Zellorganellen, in denen zelleigene und zellfremde Makromoleküle wie Lipide, Proteine, komplexe Kohlenhydratverbindungen und Nukleinsäuren in ihre Bausteine zerlegt und wiederverwertet werden. Mit Hilfe zahlreicher saurer Hydrolasen wird der Abbau dieser Verbindungen, die entweder über Endocytose aus dem Extrazellularraum,

über den Biosyntheseweg oder durch Fusion mit Phagosomen oder Autophagosomen zum Lysosom befördert werden, katalysiert. Innerhalb des Lysosomen herrscht ein saures Milieu ( $\text{pH} < 5$ ), das durch ATP-getriebene Protonenpumpen, V-Typ- $\text{H}^+$ -ATPasen, aufrechtgehalten wird. Die Hälfte der Proteine der lysosomalen Membran machen die Lysosomen-assoziierten Membranproteine I und II (LAMP-I und II) und das lysosomale integrale Membranprotein II (LIMP-II) aus. Die lysosomale Membran dient somit der Aufrechterhaltung des pH-Gradienten, dem selektiven Transport von Abbauprodukten ins Zytosol durch spezifische Transporter und dem Schutz der luminalen Membranproteindomänen vor Degeneration durch die hochglykosylierten LAMPs und LIMPs (Eskelinen *et al.*, 2005). Zur Aufrechterhaltung der Integrität bereits bestehender Lysosomen ist ein kontinuierlicher Ersatz lysosomaler Enzyme und Membranproteine erforderlich. Mehr als 50 Hydrolasen sind am geordneten lysosomalen Abbau von Makromolekülen beteiligt (Lübke *et al.*, 2009). Diese löslichen Proteine werden an den Ribosomen des ER mit einer N-terminalen Signalsequenz synthetisiert, die zur Steuerung der Translokation durch die ER-Membran erforderlich ist. Nach Abspaltung der Signalsequenz durch eine Signalpeptidase werden Dolicholphosphat-aktivierte Oligosaccharide kotranslational auf spezifische Asparaginreste innerhalb einer der Konsensus-Sequenz (Asn-X-Thr/Ser, wobei das X für jede beliebige Aminosäure steht), übertragen. Nach Prozessierung der Oligosaccharidketten werden die lysosomalen Proteine in Transportvesikel verpackt, die mit dem *cis*-Kompartiment des Golgi-Apparates verschmelzen. Im Golgi-Apparat werden einige Oligosaccharidketten durch Übertragung weiterer Zuckerreste, wie Galactose, Fucose, Sialinsäure, *N*-Acetylglucosamin, vom „high mannose type“ zum komplexen Typ modifiziert (Kornfeld & Mellman, 1989). In einer zwei-Schritt-Reaktion können an ausgewählte „high mannose“-Typ Oligosaccharidketten Phosphatreste von UDP-*N*-Acetylglucosamin auf C6-Position bestimmter Mannosereste transferiert werden. Diese Phosphomannosyl-Reste (Mannose-6-Phosphat Erkennungsmarker) vermitteln die Segregation der neusynthetisierten lysosomalen Enzyme von der sekretorischen Route durch Bindung an Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR) im *trans*-Golgi-Netzwerk (tGN). Diese Ligand-Rezeptor-Komplexe werden in Clathrin-beschichtete Vesikel verschnürt, die nach Entfernung der Clathrinhülle mit endosomalen Organellen verschmelzen, wo es aufgrund des sauren pH zur Dissoziation des MPR-Ligand-Komplexes kommt. Die MPR rezirkulieren zum tGN

und stehen somit für neue Transportrunden zur Verfügung (Bräulke & Bonifacio, 2009). Ob die M6P-haltigen lysosomalen Enzyme in endosomalen Organellen durch Verschmelzung mit bestehenden Lysosomen, oder durch vesikulären Transport zu Lysosomen gelangen, ist wenig charakterisiert (Ghosh *et al.*, 2003).

### **2.2.2 Endocytose-Mechanismus der Lysosomen**

Ein Teil M6P-haltiger neusynthetisierter lysosomaler Enzyme bindet am tGN nicht an MPR und wird sezerniert. Diese Enzyme können durch 300kDa-MPR (MPR300) an der Zelloberfläche gebunden und durch Clathrin-vermittelte Endocytose den Lysosomen zugeführt werden. Die zelluläre Maschinerie der Clathrin-abhängigen Endocytose ist für viele Rezeptoren an der Zelloberfläche, wie z.B. den Transferrin-Rezeptor (TFR), gleich. Die an der Plasmamembran entstehenden entsprechenden Rezeptor-Ligand-Komplexe bewegen sich durch laterale Diffusion zu sogenannten „coated Pit“-Bereichen, wobei sich die „Clathrin coated Pits“ (CcP) durch Interaktion des Adaptor-Proteins 2 (AP-2) mit dem spezifisch in der Plasmamembran angereicherten Phospholipid Phosphatidylinositol (4,5) bisPhosphat (PI(4,5)P<sub>2</sub>) und Clathrin bilden. AP-2 bindet Dileucin- und Tyrosin-basierte Signalpeptide in den zytoplasmatischen Domänen der Rezeptor-Ligand-Komplexe und festigt so die CcP (Haucke, 2005). Die CcP vergrößern sich und schnüren sich durch Einstülpung in das Zytoplasma ab. Dieses „budding“ bzw. Abschnüren der Invaginationsvesikel wird durch die PI(4,5)P<sub>2</sub>-bindende GTPase Dynamin ermöglicht. Durch die Hydrolyse des GTP wird eine Konformationsänderung verursacht, die zum Abschüren („budding“) von Clathrin-umschlossenen Vesikeln („Clathrin coated vesicles“, CcV) führt (Takei *et al.*, 2005). Nach dem „budding“ wird die Clathrin-Hülle durch die ATPase HSC 70 („heat-shock-cognate 70“) und das Co-Chaperon Auxilin entfernt (Ghosh *et al.*, 2003; Neubrand *et al.*, 2005). Das Verschmelzen der endocytierten Vesikel mit frühen endosomalen Kompartimenten wird durch das kleine G-Protein Rab 5, durch SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein receptors) und durch EEA1 („early endosomal antigen“) induziert (Mills *et al.*, 1999; Selak *et al.*, 2000). Die Rezeptor-Ligand-Komplexe werden dann in den frühen endosomalen Kompartimenten für bestimmte Transportrouten sortiert, so dass z.B. der MPR300-Ligand-Komplex für den Transport zu späten endosomalen Kompartimenten innerhalb der frühen endosomalen Membran sortiert wird (Gruenberg & Stenmark, 2004), während der TFR-Ligand-Komplex in „Recycling Endosomen“ gelangt, in denen das

gebundene  $\text{Fe}^{3+}$  des Transferrins abdissoziiert. Der entstehende Apo-Transferrin-TFR-Komplex rezirkuliert zur Plasmamembran und gibt dort das Apo-Transferrin ab (Zerial & Mc Bride, 2001). Die MPR werden vom späten Endosom aus entweder in Rab 9/TIP 47-abhängiger Weise zum tGN oder zur Plasmamembran transportiert um dort für neue Transportrunden zur Verfügung zu stehen (Braulke & Bonifacino, 2009).

Neben der Clathrin-abhängigen Endocytose existieren Mechanismen, die Clathrin-unabhängige Aufnahme von Makromolekülen aus dem Extrazellularraum ermöglichen. Diese Form der Endocytose wird über sogenannte Lipid-Raft-Bereiche in der Plasmamembran katalysiert. Bei den Lipid-Raft-Bereichen handelt es sich um spezialisierte, dynamische Membranbereiche, die viel Cholesterol, Glycosphingolipide und Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine enthalten (Wrana & Le Roy, 2005). Die Lipid-Raft-abhängige Endocytose kann wiederum in Caveolin- und Dynamin-abhängige bzw. -unabhängige Prozesse eingeteilt werden. Dabei lassen sich die Caveolin- und Dynamin-abhängige Mechanismen bisher nur in spezifischen Zelltypen, wie Endothelzellen, Adipozyten, glatten Muskelzellen und Fibroblasten, nachweisen. Es existieren außerdem Dynamin-abhängige Endocytosemechanismen über Lipid-Rafts, die Caveolin-unabhängig funktionieren (Sauvonnet *et al.*, 2005).

## **2.3 Inositolphosphate**

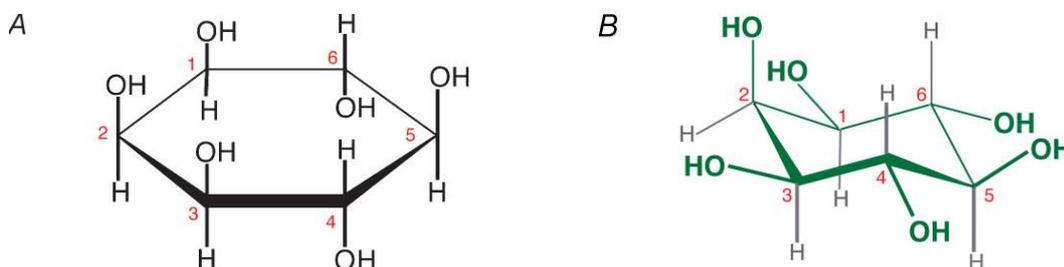
### **2.3.1 Inositolphosphate und Endocytose**

Inositolpyrophosphate haben eine Schlüsselrolle bei der Regulation zellulärer Prozesse, wie z.B. dem Vesikeltransport. Es konnte gezeigt werden, dass  $\beta$ -Zellen des Pankreas eine hohe Konzentration des Diphosphoinositolpentakisphosphates ( $\text{InsP}_7$  oder  $\text{IP}_7$ ) enthalten, das die Exocytose des Insulins beeinflusst (Illies *et al.*, 2007). Inositolhexakisphosphat ( $\text{InsP}_6$  oder  $\text{IP}_6$ ) dient als Signal zur Stimulation der Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas durch Aktivierung potentialabhängiger L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Des Weiteren unterstützt  $\text{InsP}_6$  die Dynamin I-vermittelte Endocytose in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas durch eine Calcineurin-induzierte Dephosphorylierung und Aktivierung von Proteinkinase C und Inhibierung von Phosphoinositolphosphatase Synaptojanin (Hoy *et al.*, 2002).  $\text{InsP}_6$  bindet mit hoher

Affinität an eine Vielzahl von Proteinen (u.a. AP-2), die an der Exo- und Endocytose-Maschinerie beteiligt sind. So wird u.a. Pacsin/Syndapin I, ein synaptisches vesikelgebundenes Protein, durch eine InsP<sub>6</sub>-regulierte Kinase phosphoryliert, wodurch die Interaktion mit Dynamin I ermöglicht wird (Hilton *et al.*, 2001).

### 2.3.2 Struktur und Nomenklatur von Inositolphosphaten

Inositolphosphate sind seit über 80 Jahren bekannt. Die Entdeckung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (vereinfacht Inositoltrisphosphat, IP<sub>3</sub>) als Calcium-mobilisierender „second messenger“, der bei der Signalübertragung in Zellen eine wichtige Rolle spielt, führte innerhalb kürzester Zeit zur Identifizierung weiterer Inositolphosphat (InsP)-Isomere, deren Funktionen in vielen Fällen unklar sind (Irvine & Schell, 2001). Die Inositolphosphate bestehen aus einem Inositolring (Shears, 2004), der eine variable Anzahl an Phosphatgruppen besitzen kann. Inositolphosphate sind wasserlöslich (Irvine & Schell, 2001). Die Grundstruktur der Inositolphosphate ist die thermodynamisch stabile Sesselkonformation des myo-Inositols (Shears, 2004) (Abb. 2).



**Abb. 2: InsP Nomenklatur**

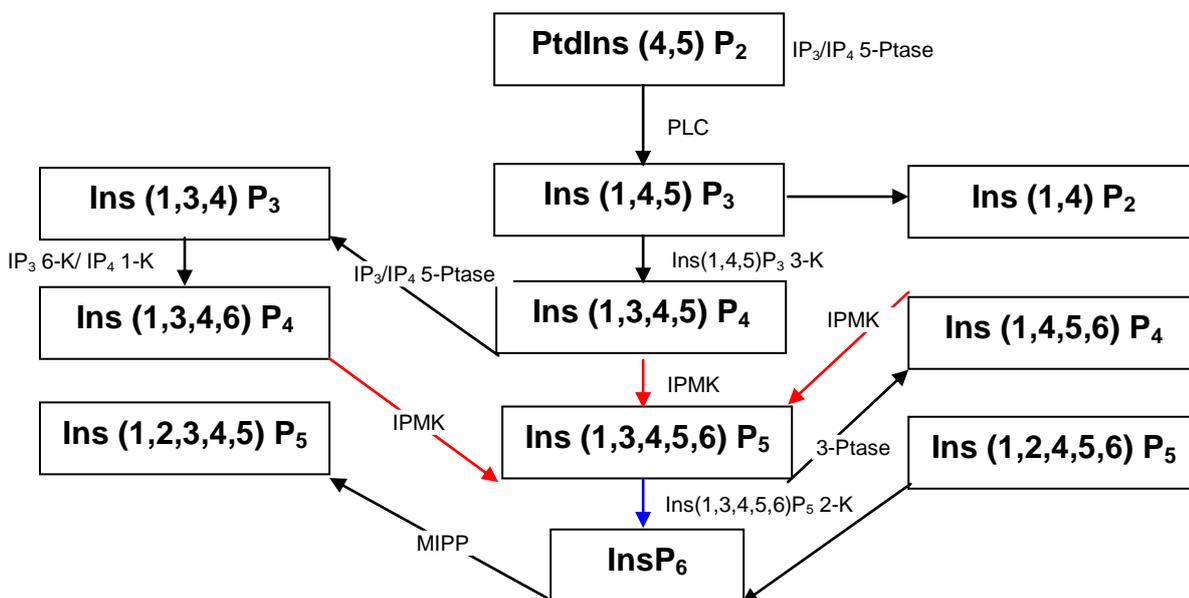
Dargestellt sind planare Konformation (A) und die thermodynamisch stabile Sesselkonformation des myo-Inositols (B).

Mathematisch sind 63 Inositolmonophosphate möglich, wobei diese Anzahl durch das Anfügen von Pyrophosphatgruppen anstelle von Monophosphaten erweitert werden kann (Irvine & Schell, 2001).

### 2.3.3 Inositolphosphat metabolisierende Enzyme

Der InsP-Metabolismus wird durch eine Vielzahl von InsP-Kinasen und Phosphatasen gesteuert, zu denen die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase, die IPMK, die Ins(1,3,4,5,6)P<sub>4</sub>-2-Kinase, die InsP<sub>6</sub>-Kinase sowie die Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>-5/6 Kinase/

Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>-1-Kinase zählen, wobei die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3-Kinase, die IPMK und die InsP<sub>6</sub>-Kinase zur PDKG-Familie (**P**-C-[VI]-[ML]-**D**-X-**K**-[MI]-**G**), zusammengefasst werden (Bertsch *et al.*, 2000). Die Kinasen enthalten im C-Terminus Bindungsstellen für ATP und InsP-Substrate. Der N-Terminus dieser InsP-Kinasen hingegen weist Unterschiede in der Länge auf und ist in die zelluläre Zielsteuerung und Regulation der Aktivität involviert. 5-Phosphatase, multiple Inositolpolyphosphat-Phosphatase und Diphosphoinositol-Polyphosphat-Diphosphatase zählen zu den wichtigsten Phosphatasen im InsP-Stoffwechsel.



### Abb. 3: Inositolphosphat-Metabolismus

Durch Rezeptor-vermittelte Aktivierung wird PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> von einer Phosphoinositol-spezifischen Phospholipase C hydrolysiert unter Bildung des second messenger myo-Inositol(1,4,5)triphosphats. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> kann dann weiter phosphoryliert werden zu Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> oder dephosphoryliert zu Ins(1,4)P<sub>2</sub>. Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> kann ebenfalls durch eine 5-Phosphatase zu Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> dephosphoryliert und anschließend zu Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> durch eine Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>-5/6-Kinase phosphoryliert werden. Unter Mitwirkung von Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>2K (IP5-2K) können in der Zelle aus Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> Ins(1,2,3,4,5,6)P<sub>6</sub> (Inositolhexakisphosphate) gebildet werden. In rot ist der Schritt markiert, der durch die IPMK katalysiert wird, und in blau die Reaktion der IP5-2K, die beide Gegenstand der Experimente dieser Doktorarbeit sind.

### 2.3.4 Inositolphosphat-Kinasen

In Folgenden werden einige Inositolphosphat-Kinasen näher besprochen, die für die vorgelegten experimentellen Arbeiten von Bedeutung sind.

#### **2.3.4.1 Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase (Inositolphosphat5-2Kinase [IP5-2K])**

Das auf Chromosom 9 lokalisierte Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase-Gen kodiert ein 56kDa-Protein, das aus 491 Aminosäuren besteht. In der Zelle können aus Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> mit Hilfe der IP5-2K Ins(1,2,3,4,5,6)P<sub>6</sub> (Inositolhexakisphosphate) gebildet werden. Die Expression dieses Enzyms konnte im Gehirn, Herz, Hoden und in der Plazenta nachgewiesen werden (Verbsky *et al.*, 2002). Die kürzlich identifizierte murine Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-Kinase, die die Bildung von Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> ermöglicht, wird im Cortex, Hippocampus, in Purkinje-Zellen des Kleinhirns und im Hoden exprimiert (Verbsky *et al.*, 2005).

#### **2.3.4.2 Inositolpolphosphatmultikinase (IPMK)**

Die IPMK ist ein zentrales Enzym bei der Synthese von höher phosphorylierten Inositolphosphaten und katalysiert eine Vielzahl von Reaktionen im InsP-Stoffwechsel. IPMK katalysiert die Reaktion von Ins(4,5)P<sub>2</sub> zu Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> sowie von Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> zu (PP)-InsP<sub>4</sub> (Saiardi *et al.*, 2001). Außerdem phosphoryliert sie Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> an der 3 und 6 Position, so dass Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> entsteht. Dieses Enzym kann des Weiteren die Umwandlung von Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> in Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> (*in vitro*) katalysieren (Chang & Majerus, 2006). Kloniert werden konnte dieses Enzym u.a. aus *Homo sapiens*, Ratte, Hefe und Pflanzen. Die humane IPMK wird hauptsächlich in der Leber und im Skelettmuskel, die der Ratte im Hirn und in den Nieren exprimiert. Das humane IPMK-Gen ist auf Chromosom 10 lokalisiert und kodiert für ein 47kDa-Protein, das aus 416 Aminosäuren besteht. Neben den InsP- und ATP-Bindungsstellen wurde eine SSSL-Domäne (**S**erin, **S**erin, **L**euclin, **L**euclin) identifiziert. Ein Kernlokalisierungssignal (NLS) ist zusätzlich vorhanden (Nalaskowski *et al.*, 2002). Weiterhin reguliert die Kinase Cl<sup>-</sup>-Kanäle und den Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>-Spiegel (Chang & Majerus, 2006). Aurintricarbonsäure (ATA) wurde als potentieller Inhibitor der IPMK identifiziert (Mayr *et al.*, 2005).

#### **2.3.5 Inositolphosphate zur Signaltransduktion**

Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> ist ein „second messenger“, der mit der zellulären Calcium (Ca<sup>2+</sup>)-Regulation assoziiert ist und u.a. Muskelkontraktion, Zellproliferation, Gentranskription sowie synaptische Aktivität kontrolliert (Berridge, 1998; Bootman *et al.*, 2001).

Der putative „second messenger“  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  ist ebenfalls an der Regulation des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels beteiligt (Lockyer *et al.*, 1999). Es gibt Hinweise, dass  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$   $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Plasmamembran von Neuronen und Endothelzellen aktiviert (Irvine & Schell, 2001).

Neben  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  sind noch weitere  $\text{InsP}_4$ -Isomere wie  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  und  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  in der Zelle beschrieben. Das  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  ist an der Modulation von Chlorid-Kanälen ( $\text{Cl}^-$ -Kanälen) beteiligt. In Endothelzellen wirkt es als Inhibitor von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Kinase II (CaMK II) aktivierten  $\text{Cl}^-$ -Kanälen (Nilius *et al.*, 1998; Ho *et al.*, 2001). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten  $\text{Cl}^-$ -Kanäle sind für die Salz- und Flüssigkeitsregulation sowie die Kontrolle der Membranerregung zuständig. Über die Funktionen von  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  ist dagegen wenig bekannt. Es wurde berichtet, dass eine Infektion von Epithelzellen des Darms durch Salmonellen zu einer 14-fachen Erhöhung des  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ -Spiegels führt, die auf eine Inhibition der EGF (epidermaler Wachstumsfaktor)-stimulierten Phosphatidylinositol-3-Kinase zurückgeführt wurde (Eckmann *et al.*, 1997).

Im  $\text{InsP}$ -Stoffwechsel werden die  $\text{InsP}_4$ -Isomere durch verschiedene Kinasen zum  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  metabolisiert.  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  ist das am häufigsten vertretene  $\text{InsP}_5$ -Isomer in den Säugetierzellen und fungiert als metabolisches Zentrum im  $\text{InsP}$ -Stoffwechsel (Irvine & Schell, 2001). Es beeinflusst u.a. die zelluläre Proliferation (Orchiston *et al.*, 2004) und reguliert die Apoptose (Piccolo *et al.*, 2004). Des Weiteren moduliert  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  das virale „assembly“, das Chromatin „remodelling“ und die Aktivität von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen (Riley *et al.*, 2006; Deleu *et al.*, 2006).

$\text{InsP}_6$  kontrolliert verschiedene physiologische Prozesse. Es besitzt ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierende Eigenschaften in hippocampalen Neuronen (Yang *et al.*, 2001) und in  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Barker & Berggren, 1999). Weiterhin ist  $\text{InsP}_6$  in nukleäre Vorgänge, wie RNA-Export, DNA-Reparatur und Rekombination, involviert (Shears, 2001). Außerdem wird  $\text{InsP}_6$  die Beteiligung an der Endo- und Exocytose zugesprochen, da  $\text{InsP}_6$  die Bindung an eine Vielzahl von Proteinen, die mit der Regulation des Vesikeltransports assoziiert sind, nachgewiesen wurde (Shears, 2001). Die Interaktion von  $\text{InsP}_6$  mit Synaptotagmin, einem sogenannte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor, der an der Steuerung exocytotischer Prozesse zur Neurotransmitter-Freisetzung beteiligt ist (Chapman, 2002), induziert dessen Funktions-Hemmung (Irvine & Schell, 2001). Zusätzlich erwähnt werden sollte, dass Phosphatidylinositol-4,5-Phosphat

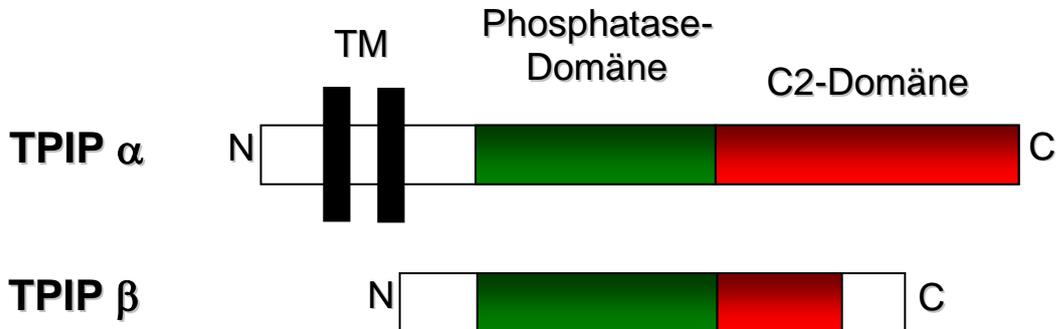
(PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) und Phosphatidylinositol-3,4,5-Phosphat (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) eine stärkere Bindung mit Synaptotagmin aufweisen. So könnten die Phosphatidylinositole die eigentlichen Regulatoren der Endo- und Exocytose sein (Irvine & Schell, 2001). Des Weiteren interagiert InsP<sub>6</sub> mit den Adaptor-Proteinen AP-2 (Voglmaier *et al.*, 1992) und AP-180 (Norris *et al.*, 1995; Ye *et al.*, 1995), die beide die Bildung von Clathrin-umhüllten Vesikeln („Clathrin coated Pits“ (CcP)) fördern (2.2.2) und somit die Endocytose beeinflussen (Shears, 1998).

## **2.4 TPIP eine Inositollipidphosphatase als Interaktionspartner von CLN6**

Um die Funktion von CLN6 aufzuklären, wurden Interaktionspartner gesucht, deren Funktion möglicherweise Aufschluss über die Rolle von CLN6 in diesem Prozess gibt. So wurden in Vorarbeiten von Dr. Quitsch (Kinderklinik, Abteilung Biochemie, UKE Hamburg) mittels Co-Immunpräzipitation die Untereinheit  $\beta$  der TPTE und PTEN homologen Inositollipidphosphatase (TPIP $\beta$ ) identifiziert, die an die zytoplasmatische N-terminale Domäne von CLN6 bindet.

TPIP ist eine TPTE (transmembrane phosphatase with tensin homology) und PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) homologe Inositollipidphosphatase, die Phosphatidylinositol-3,4,5-Phosphat (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) als Substrat benutzen kann und an der Synthese von Phosphatidylinositol-4,5-Phosphat (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) beteiligt ist. Das TPIP-Gen ist auf Chromosom 13 lokalisiert. Exprimiert wird dieses Protein v.a. in den Testes, im Hirn und Magen (Walker, Leslie & Downes, unveröffentlichte Ergebnisse). TPIP kommt in mehreren unterschiedlichen Spleißvarianten vor, wobei nur zwei davon, nämlich TPIP $\alpha$  und TPIP $\beta$ , die aus 445 bzw. 326 Aminosäuren bestehen, funktionell von Bedeutung sind (Walker *et al.*, 2001). TPIP $\alpha$  ist im ER und TPIP $\beta$  im Zytosol lokalisiert. TPIP $\alpha$  besitzt zusätzlich zur Phosphatase- und C2-Domäne zwei bis drei N-terminale Transmembrandomänen (Abb. 4). Bisher ist unklar, ob sich die Phosphatase-Domäne ins Zytosol oder ins ER-Lumen orientiert. TPIP $\beta$  enthält neben der Phosphatase eine verkürzte C2-Domäne, während Transmembrandomänen fehlen (Abb. 4) (Walker *et al.*, 2001). Phosphatase-Aktivität (*in vitro*) konnte bei TPIP $\alpha$  jedoch nicht bei TPIP $\beta$  nachgewiesen werden. Während die homologe PTEN-Phosphatase die

phosphorylierte Proteinkinase B (PKB) als Substrat nutzen kann, reguliert weder  $\text{TPIP}\alpha$  noch  $\text{TPIP}\beta$  den Phosphorylierungszustand der PKB (Walker *et al.*, 2001). Die zellbiologische Bedeutung der Interaktion von  $\text{TPIP}\beta$  und CLN6 ist unklar.



**Abb. 4: Schematische Darstellung von  $\text{TPIP}\alpha$  und  $\text{TPIP}\beta$**

Diese schematische Darstellung zeigt den C-Terminus (C) und den N-Terminus (N) von  $\text{TPIP}\alpha$  und  $\text{TPIP}\beta$ .  $\text{TPIP}\alpha$  ist im ER und das  $\text{TPIP}\beta$  im Zytosol lokalisiert. Beide Proteine weisen eine Phosphatase-Domäne und eine C2-Domäne auf, wobei bei  $\text{TPIP}\beta$  die C2-Domäne verkürzt ist. Über eine Phosphatase-Aktivität (*in vitro*) und zusätzlich 2 bis 3 Transmembrandomänen (TM) verfügt nur  $\text{TPIP}\alpha$ .

# 3. Material und Methoden

## 3.1 Material

### 3.1.1 Geräte

**Tab. 2: Geräte und Hersteller**

Analysewaagen Typ AC 100	Mettler Waagen, Giessen
Analysewaagen Typ BP 2100 S	Sartorius, Göttingen
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik, Deutschland
Blot-System, Transphor Typ SE 600	Hofer Scientific Instruments, USA
Co <sub>2</sub> -Inkubator	Kendro Laboratory Products, USA
1470 Wallac Wizard gamma counter	Wallac, USA
Drucker DPU-414 Thermal Printer	Seiko Instruments Inc., Japan
Elektrophoresekammer für Polyacrylamidgele	Hofer Scientific Instruments, USA
Eppendorf Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Pipetten (0,5-1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Filmentwicklungsmaschine	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Gammastrahlzähler, 1470 Wizard	Wallac, Finnland
Geltrockner Modell Gel Air Dryer	BioRad Herkules, USA
GeneAmp PCR System 2400	Biometra®, Göttingen
Genetic Analyzer 3100	APPLIED Biosystems
Heizblock Modell Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler Modell G25	News Brunswick Sc., USA
Kippschwenker Rocky® 1020	Labortechnik Fröbel GmbH, Deutschland
Magnetrührer Ika-Combimag Ret	Janke & Kunkel, Staufen
Nalgene® Cyro 1°C Freezing Container	Nagane, Rochester, USA
Phasenkontrastmikroskop Modell ID 03	Zeiss, Oberkochen
pH-Messgerät MP 220	Mettler Toledo GmbH, Schweiz
pH-Meter Knick 647	Schütt, Göttingen
Photometer (BioPhotometer)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Promicro Mikrowellenherd	Whirlpool, USA
Reine-Werkbank	Thermo Scientific, Deutschland
Thermo-Schüttelinkubator innova 4230	New Brunswick Scientific, USA
Schüttelinkubator innova 4080	New Brunswick Scientific, USA
Sorvall® RC 5C Plus	Kendro Laboratory Products, USA
Sterilbank HS 12	Heraeus, Osterode
Stickstoff-Einfriertank Typ Arpege 55	Air Liquide, Frankreich
Ultraschallstab	Hielscher Ultrasonics GmbH, Deutschland

UV-Lampe	Schütt, Göttingen
Versa Fluor™ Fluorometer	BioRad Herkules, USA
Volt- und Ampere Messgerät	Biometra®, Göttingen
Vortex Genie® 1 Touch Mixer	Scientific Industrie Inc., USA
Wasserbad C10	Schütt, Göttingen
Zentrifugen: Minifuge GL Eppendorf Kühlzentrifuge Modell 5417 Eppendorf Tischzentrifuge Modell 5415 D Eppendorf Tischzentrifuge Modell 5702 R Kühlzentrifuge Sorvall® Evolution RG Speed-Vac®	Heraeus, Osterode Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Kendro Laboratory Products, USA Thermo Scientific Savant, Deutschland

### 3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

**Tab. 3: Chemikalien und Hersteller**

Acrylamid 30%/ Bisacrylamid 0,8 %	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, USA
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA („bovine serum albumin“)	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Coomassie® Blue G	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DNA-Molekulargewichtsmarker (1kB Ladder)	Invitrogen, USA
DTT	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
FKS (Fötales Kälberserum)	PAA, Österreich
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Gentamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutathion-Sepharose™	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Lipfectamin™2000	Invitrogen, USA
Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Mannose-6-Phosphat Bariumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mannose-6-Phosphat Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt

Milchpulver	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdeoxycholat	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriothiosulfat	Merck, Darmstadt
Ni-NTA Agarose (Nickel-Nitrilotriessigsäure)	Invitrogen, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>n</i> -Octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside	Calbiochem, Schwalbach
Penicillin/ Streptomycin-Lösung (Pen/Strep)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyphenylenoxid (PPO)	Merck, Darmstadt
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein-A-Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein-Molekulargewichtsmarker: Broad Range High Range Rainbow Marker	New England Biolabs <sup>®</sup> Inc., USA Amersham Biosciences, Freiburg
Restriktionspuffer	New England Biolabs <sup>®</sup> Inc., USA
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs <sup>®</sup> Inc., USA
TCA	Merck, Darmstadt
TEMED	BioRad Herkules, USA
Tris	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin	GIBCO/BRL
Tween 20	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt

Alle Chemikalien, soweit nicht anders vermerkt, wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Invitrogen, Promega, Merck, Amersham Biosciences oder Roth in p.A. Qualität verwendet.

### 3.1.3 cDNA

**Tab. 4 Übersicht über die verwendeten cDNAs**

cDNA	Quelle
CLN6	Dr. Heine (UKE)
TPIP $\alpha$ und TPIP $\beta$	Dr. Leslie (U. Dundee)
Inositolphosphatmultikinase (IPMK)	Dr. Mayr (UKE)
Inositolphosphat5-2Kinase (IP5-2K)	Dr. Mayr (UKE)

### 3.1.4 Vektoren

Tab. 5: Verwendete Plasmide und Verwendungszweck

Verwendung	Bezeichnung	Herkunft
Subklonierung	pGEM <sup>®</sup> -T Easy	Promega
Proteinexpression Bakterien	pQE-32 pGEX-4T1	Qiagen Amersham Biosciences
Proteinexpression eukaryontischer Zellen	pEGFP-C1 pCDNA-T7 pCDNA3.1	Clontech Invitrogen Invitrogen

### 3.1.5 Zelllinien

Für die im Rahmen der Doktorarbeit durchgeführten Versuche wurden HEK293-Zellen (ATCC) sowie humane Hautfibroblasten verwendet.

### 3.1.6 Bakterienstamm

Es wurden *E.coli* BL21 (Invitrogen) für die im Rahmen der Doktorarbeit durchgeführten Versuche eingesetzt.

### 3.1.7 Antikörper

Tab. 6: Übersicht über alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und deren Verdünnung im Westernblot

Antikörper gegen	Quelle	Western-Blot
mCLN6 (Aff.)	Sara Mole (UCL)	1:500
myc	Sigma-Aldrich	1:10.000
GST	Dr. Storch (UKE)	1:5.000
GFP	Sigma-Aldrich	1:2.000
Penta His	Dr. Kreienkamp (UKE)	1:2.000
AP-2	BD Bioscience	1:1.000
Actin	Santa Cruz	1:250
Sekundärantikörper		
ZαK	Dianova	1:5.000
KαZ	Dianova	1:5.000
Gαm	Dianova	1:5.000

### **3.1.8 Verwendete Kits**

Folgende Kits von Qiagen wurden verwendet: QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraktion Kit, Plasmid Midi Kit, Plasmid Mini Kit.

### **3.1.9 Radioaktiver Ligand**

Für die Versuche stand jodierte Arylsulfatase B ( $[^{125}\text{J}]\text{ASB}$ ) (spezifische Aktivität: 5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ; Prof. Braulke) zur Verfügung.

## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 Photometrische DNA-Konzentrationsmessung**

Die photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte im Photometer (BioPhotometer, Eppendorf) in einer UV-Küvette (Eppendorf) gegen Aqua dest. bei 260nm. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  doppelsträngiger DNA.

### **3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR ist eine Methode, um definierte DNA-Fragmente mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (*Taq*) zu amplifizieren (Saiki *et al.*, 1988). Die Polymerase-Kettenreaktion diente der Vervielfältigung von DNA-Fragmenten, die zur Klonierung von Vektor-Konstrukten eingesetzt wurden. Einem Reaktionsansatz von 50 $\mu\text{l}$  bei einer Template-Menge von 5-100ng wurden Primer in einer Endkonzentration von 10-100nM zugesetzt. Der Ansatz enthielt zudem 500 $\mu\text{M}$  Desoxyribonukleotide, 1,5mM CaCl<sub>2</sub>, 1-3U Polymerase und 5 $\mu\text{l}$  10xPCR-Puffer. Für die Reaktion wurde *Taq* DNA-Polymerase (Invitrogen) verwendet. Im GeneAmp PCR System 2400 (Biomtra<sup>®</sup> Tpersonal) erfolgte die Durchführung der Amplifikation. Nach der Denaturierung der DNA, die bei 94°C für 5 Min. stattfand, folgten 25 Zyklen mit folgenden Schritten:

Denaturierung: 94°C für 30 Sek.

Primer-Anlagerung (Annealing): 55-60°C für 30 Sek.

Elongation: 72°C für 1 Min. pro Kilobase

Die Anlagerungstemperatur der Primer wurde annähernd wie folgt bestimmt:

$$T_m = 4 \times N_{(G+C)} + 2 \times N_{(A+T)}$$

Beendet wurde die PCR mit einer Elongationsphase für 7 Min. bei 72°C.

Die PCR-Produkte wurden anschließend im Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (3.2.3) und nach erfolgter Aufreinigung (3.2.4) in pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor subkloniert.

### 3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

#### TAE-Puffer:

- 40mM Tris/Acetat, pH 8,3
- 20mM Essigsäure
- 2mM EDTA

#### 5XProbenpuffer:

- 30% (v/v) Glycerin
- 40mM Tris/HCl, pH8
- 0,25% (w/v) Bromphenolblau

Die zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe verwendete Agarose (Invitrogen) wurde in einer Konzentration von 1% in TAE-Puffer im Mikrowellenherd aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 55°C mit 0,2µg/ml Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich) versetzt. Zu analysierende DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt und auf das erkaltete Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 80-100V durchgeführt. Mit Hilfe von UV-Licht ließen sich die DNA-Fragmente durch das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid sichtbar machen und dokumentieren. Zur Bestimmung der Größe des Fragments wurde ein DNA-Molekulargewichtsmarker (Invitrogen), 1kB Ladder, mit aufgetragen.

### 3.2.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Dazu wurde das DNA-Fragment zunächst auf dem UV-Tisch mit dem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Die Isolierung und Aufreinigung des

entsprechenden Fragments wurde mit dem *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen) laut Herstellerprotokoll durchgeführt.

### **3.2.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen** (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs) spalten DNA in Bereichen, die spezifische kurze Nukleotidsequenzen tragen, die von diesen Enzymen erkannt werden. Für den Restriktionsverdau wurde dem Ansatz mit der Plasmid-DNA 2 bis 5U des Restriktionsenzym und 1/10 Volumen des entsprechenden Reaktionspuffers (10fache Konzentration) der Firma New England Biolabs zugegeben, um die optimalen Bedingungen für das jeweils benutzte Enzym zu schaffen. Bei der Reaktionstemperatur wurde der Ansatz für eine Stunde inkubiert.

Wurde eine DNA mit zwei Restriktionsenzymen gespalten, die verschiedene Reaktionsbedingungen benötigten, so wurde ein Restriktionspuffer ausgesucht, in dem beide Enzyme laut Herstellerangaben eine hohe Spaltaktivität zeigen.

Die Analyse der DNA-Fragmente fand in der Agarose-Gelelektrophorese statt (siehe 3.2.3). Im Anschluss wurden die entsprechenden Fragmente für eine Ligation aus dem Gel extrahiert (siehe 3.2.4).

### **3.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten**

Bei der Ligation werden zwei DNA-Moleküle miteinander verbunden. Das gespaltene DNA-Fragment (Vektor-DNA) und die Insert-DNA wurden entsprechend eines molekularen Verhältnisses von 1:3 vermengt und nach Zugabe von 1 U T4 DNA-Ligase in einem Reaktionspuffer (Promega) für eine Stunde bei Raumtemperatur ligiert.

### **3.2.7 Präparation von chemokompetenten *E. coli*-Zellen**

**Tfbl-Lösung :**

- 100mM RbCl
- 30mM Kac
- 50mM MnCl<sub>2</sub> 4xH<sub>2</sub>O
- 15% [w/v] Glycerin
- 10mM CaCl<sub>2</sub>

→ Substanzen in 25, 50 oder 90ml lösen und mit 0,2M Essigsäure auf pH 5,8 einstellen, anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 30, 60 oder 100ml auffüllen

#### **TfblI-Lösung:**

- 10mM RbCl
- 10mM MOPS
- 15% [w/v] Glycerin
- 75mM CaCl<sub>2</sub>

→ Substanzen lösen in 5, 20 oder 40ml und mit NaOH auf pH 7 einstellen, anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 10, 25 oder 50ml auffüllen

#### **LB-Medium:**

- 10g/l Bacto-Pepton
- 10g/l NaCl
- 5g/l Hefeextrakt

Für die Herstellung chemokompetenter BL21-*E. coli*-Zellen wurde die Rubidiumchlorid-Methode eingesetzt. Hierfür wurden zunächst Kolben und Zentrifugenbecher autoklaviert. Tfbl- und TfblI-Lösung wurden frisch angesetzt und mit einer Spritze und einem Filter steril filtriert. Die Lösungen wurden anschließend auf Eis gelagert (4°C). 10ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie *E. coli* BL21 von einer Stammplatte (LB-Agarplatte, ohne Antibiotikum) angeimpft und bis zur OD<sub>600</sub> von 0,3 auf einem Schüttler im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert. 1ml der Vorkultur wurde in einem sterilen 1l Schüttelkolben mit 200ml LB-Medium angeimpft und für 2 bis 2,5 Stunden im Schüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 bei 37°C erneut inkubiert, wobei ca. stündlich die OD kontrolliert wurde. Nach dem Erreichen der OD von 0,3 wurde die Kultur für 10 Min. auf Eis abgekühlt. Die anschließende Zentrifugation wurde in einem sterilen GSA-Zentrifugenbecher für 5 Min. bei 3.000rpm und 4°C durchgeführt. Die darauffolgenden Schritte erfolgten nun immer auf Eis. Die Pellets wurden in 30ml Tfbl-Lösung resuspendiert (ohne Vortex-Rührer) und für 5 Min bei 3.000rpm und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in je 4ml TfblI-Lösung aufgenommen und resuspendiert. Aliquots von 100µl wurden in flüssigem Stickstoff sofort eingefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Bestimmung der Kompetenz wurden 100µl der kompetenten Bakterien mit 0,1ng Plasmid-DNA transformiert (siehe 3.2.8) und die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Die Kompetenz sollte mind. bei  $10^6$  Transformanden/µg Plasmid-DNA liegen.

### **3.2.8 Transformation chemokompetenter Bakterien**

Zu 100µl chemokompetenter Bakterien (*E. coli* BL21), die auf Eis aufgetaut wurden, wurden 10µl eines Ligationsansatzes oder 10 bis 50ng Vektor-DNA gegeben und für 20 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock im Wasserbad für 60 bis 75 Sek. bei 42°C und eine weitere Inkubation für 5 Min. auf Eis. Nach Zugabe von 200µl vorgewärmten LB-Mediums (siehe 3.2.7) wurden die Bakterien für 30 Min. bei 37°C geschüttelt. Auf einem LB-Selektionsagar, dem ein entsprechendes Antibiotikum (100µg/ml Ampicillin oder 50µg/ml Kanamycin) zugegeben wurde, konnten die Zellen ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert werden.

### **3.2.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Mittels des *Plasmid Midi Kits* (für 20-100µg DNA) und *Plasmid Mini Kits* (bis 20µg DNA) wurden Plasmid Midi- und Minipräparationen nach Herstellerprotokoll (Qiagen) durchgeführt.

### **3.2.10 DNA-Sequenzierung**

Alle Sequenzierungen von Plasmid-DNA wurden am 3100 Genetic Analyzer (APPLIED Biosystems) im Sequenzierlabor der Abteilung für molekulare Pathologie des Instituts für Pathologie im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf durchgeführt. Die automatische Sequenzierung von DNA-Proben erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.*, 1977. Hierzu wurde zunächst ein 20µl-Sequenzierungsansatz bestehend aus 2µl Big Dye 1.1 Terminator Premix (APPLIED Biosystems), 6µl Half Term Buffer (APPLIED Biosystems), Template (dsDNA 0,25-0,5µg), Primer (dsDNA 10pmol) (MWG) und entsprechender Menge  $H_2O_{dd}$  hergestellt. Im Eppendorf Master Cycler Gradient wurden nach 5 Min. Denaturierung bei 96°C folgende Bedingungen gewählt:

- Denaturierung: 10 Min. → 96°C
- Anlagerung: 5 Min. → 50°C
- Elongation: 4 Sek. → 60°C  
je 25 Zyklen
- Endphase bei 4°C

Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung des Sequenzierungsansatzes. Zuerst wurden 2µl 3 M Na-Acetat (pH 4,6) und 50µl Ethanol (95%) vorgelegt und anschließend der Ansatz dazugegeben und für 15 Min. bei Raumtemperatur gefällt. Es folgte eine zwanzigminütige Zentrifugation in der Eppendorf-Tischzentrifuge (Typ 5415D) bei 13.000rpm. Der Überstand wurde komplett abgezogen, damit keine nichtinkorporierten Dye-Terminatoren zurückbleiben. Mit 250µl Ethanol (70%) wurde das Sediment gewaschen, resuspendiert, erneut für 10 Min. zentrifugiert und der Überstand abgezogen. Das Pellet wurde für 30 Min. bei Raumtemperatur oder für 10 Min. im Trockenschrank bei 37°C getrocknet, d.h. von Ethanolresten befreit und anschließend sequenziert.

### **3.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford mittels der Protokollvorlage aus „Current Protocols in Molecular Biology“, Kapitel 10.1.4 (Ausubel *et al.*, 2000) bestimmt.

#### **3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

##### **Trenngel:**

- 5-15% Acrylamid
- 0,375M Tris/HCl, pH8,8
- 0,1% SDS
- 0,8% APS
- 0,08% TEMED

**Sammelgel:**

- 4% Acrylamid
- 0,12 Tris/HCl, pH6,8
- 0,1% SDS
- 0,33% APS
- 1% TEMED

**Solubilisierungspuffer:**

Endkonzentration:

- 250mM Tris/HCl, pH 6,8
- 2% SDS
- 20% Glycerin
- 100mM DTT
- 0,012% Coomassie<sup>®</sup> Blue G

**Kathodenpuffer:**

- 50mM Tris/HCl, pH 8,6
- 192mM Glycin
- 0,1% SDS

**Anodenpuffer:**

- 50mM Tris/HCl, pH 8,6
- 192mM Glycin

Die Proteine wurden gemäß ihrer molaren Masse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die hierzu angefertigten Gele hatten eine Größe von 8cm x 7,3cm x 0,15cm. Das Verhältnis von Sammelgel zu Trenngel betrug 1:4. Die Trenngele wurden in einer Konzentration von 10-12,5% hergestellt. Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und nach erfolgter Polymerisation mit dem Sammelgel überschichtet. Vor Polymerisation des Sammelgels wurde ein Teflonkamm (Hofer) zur Formung der Auftragsaschen eingesetzt. Die Proteinproben wurden in reduzierendem Solubilisierungspuffer aufgenommen und für 5 Min. bei 95°C aufgeköcht um anschließend auf das Gel aufgetragen zu werden. Die Elektrophorese wurde in einer Elektrophoresekammer (Hofer), die mit Kathoden- und Anodenpuffer gefüllt wurde, bei 120-180V für 1-2 Stunden durchgeführt. Zur

Größenbestimmung diente ein Protein-Molekulargewichtsmarker (Broad-Range, New England Biolabs).

### 3.3.3 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

#### **Coomassie<sup>®</sup> Blue-Lösung:**

- 40% [v/v] Methanol
- 10% [v/v] Essigsäure
- 0,1% [w/v] Coomassie<sup>®</sup> Blue

#### **Entfärberlösung:**

- 50% [v/v] Methanol
- 10% [v/v] Essigsäure

Die Anfärbung von aufgetrennten Proteinen in Polyacrylamid-Gelen erfolgte mit Coomassie<sup>®</sup> Blue-Lösung für 20 Min. schwenkend. Anschließend wurde mit Hilfe der Entfärberlösung gewaschen.

### 3.3.4 Westernblot-Analysen

#### **Transferpuffer:**

- 25mM Tris/HCl, pH 7,5
- 20% [v/v] Methanol
- 192mM Glycin

#### **ECL-Reagenz:**

Ansatz I:

- 100µl 250 mM Luminol
- 44µl 90 mM p-Cumaricacid
- 0,5ml 1M Tris/HCl, pH 8,5
- 4,5ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Ansatz II:

- 0,5ml 1M Tris/HCl, pH 8,5
- 10µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 4,5ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Zur Detektion spezifischer Proteine wurden Westernblot-Analysen durchgeführt. Vor der Übertragung auf die Nitrozellulose-Membran (Schleicher & Schuell) wurden die Proteine mittels SDS-PAGE (siehe 3.3.2) entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Das Trenngel wurde vor dem Blotvorgang kurz in Transferpuffer gelegt und anschließend luftblasenfrei auf die Nitrozellulose-Membran zwischen zwei Lagen Whatman-Papier (Whatman) und je einem Schwammfilter platziert. Der Transfer erfolgte in der Elektroblo-Apparatur (Hofer) in Transferpuffer, wobei die Dauer in Abhängigkeit von der molaren Masse der jeweiligen Proteine für 1 bis 2 Std. bei 120V und maximaler Amperezahl gewählt wurde. Anschließend wurde die Blotmembran in PBS-T (PBS, 0,1% Tween-20) gespült und für 1 Stunde oder über Nacht bei 4°C in einer Blockierlösung bestehend aus 5% fettfreiem Milchpulver in PBS-T (10mM PBS, 0,05% Tween-20) inkubiert, um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran zu verhindern. Der Primärantikörper wurde entsprechend seines Verhältnisses zur Blockierlösung verdünnt (siehe 3.1.6) und für 2 Std. mit der Blotmembran inkubiert. Danach wurde die Blotmembran 3mal alle 15 Min. mit PBS-T (10mM PBS, 0,05% Tween-20) gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde anschließend verdünnt in PBS-T (siehe 3.1.6) für 1 Stunde mit der Blotmembran inkubiert. Erneut erfolgte 3maliges Waschen mit PBS-T für jeweils 15 Min. Mittels ECL-Reagenz wurden die Proteine detektiert und mit Hilfe von Röntgenfilmen (Kodak) sichtbar dargestellt.

### **3.3.5 Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen**

#### **Expression von Fusionsproteinen**

Für die Expression von Fusionsproteinen fanden die Vektoren pGEX-4T2 (Amersham Biosciences) und pQE-32 (Qiagen) Verwendung (siehe 3.1.4). Der entsprechende Sequenzbereich für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurde in den Vektor pGEX-4T2 und für die Expression von (His)<sub>6</sub>-Fusionsproteine in den Vektor pQE-32 kloniert. Die zu exprimierenden Fusionsproteine enthielten entweder Glutathion S-Transferase (GST) oder ein N-terminales (His)<sub>6</sub>-Peptid. Die Konstrukte wurden in chemokompetente *E. coli* BL21-Zellen transformiert. Zur Kontrolle der Expression in BL21-Zellen wurden jeweils vor und nach der Induktion der verwendeten Konstrukte mit IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid), Proben entnommen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie<sup>®</sup> Blue gefärbt. Im

Anschluss wurde eine Kolonie in 5ml LB-Medium (+ 100µg/ml Ampicillin) transferiert und über Nacht bei 37°C im Thermoschüttler inkubiert. Zu dieser Vorkultur wurden am nächsten Tag 200ml LB/Amp-Medium zugesetzt und im Thermoschüttler bei 37°C inkubiert. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurde 1mM IPTG und somit die Proteinexpression induziert. Die Inkubationszeit im Thermoschüttler betrug 2-4 Std. bei 37°C. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 15 Min. bei 4°C und 5.000rpm. Bis zur Reinigung der Proteine konnte das Zellpellet bei -20°C verwahrt werden.

### **Aufreinigung von GST- Fusionsproteinen**

Die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurde mittels *Glutathion-Sepharose*<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich) durchgeführt. Folgende Puffer wurden verwendet:

STE-Puffer:

- 150mM NaCl
- 10mM Tris/HCl, pH 8
- 1mM EDTA

Elutionspuffer :

- 50mM Tris/HCl, pH 8
- 10mM reduziertes Glutathion

Das Pellet transformierter Bakterien aus der Proteinexpression wurde zunächst mit 10ml STE-Puffer gewaschen, anschließend für 15 Min. bei 4°C und 5.000rpm zentrifugiert um erneut in 10ml STE-Puffer resuspendiert zu werden. Es folgte die Zugabe von 10ml Lysozym (10mg/ml) und Protease-Inhibitoren (10µg/ml Leupeptin, 2µg/ml Pepstatin A, 50µg/ml Pefabloc) und eine zwanzigminütige Inkubation auf Eis. Die Probe wurde bei -20°C über Nacht eingefroren und am darauffolgenden Tag mit 2ml Triton X-100 (10% in PBS) versetzt. Nach einer erneuten zwanzigminütigen Inkubation des Lysats auf Eis wurde diese für 15 Min. bei 4°C und 15.000rpm sedimentiert. Nachdem die Glutathion-Agarose mit STE-Puffer gewaschen wurde, wurde der Überstand der Probe zu 1ml Glutathion-Agarose zugegeben und 30 Min. bei 4°C im Rotator geschüttelt. Die Probe wurde dann 5mal mit STE-Puffer gewaschen und danach mit 1ml Elutionspuffer für 30 Min. bei 4°C im Rotator inkubiert. Der Elutionspuffer hatte die Aufgabe das Protein von der Matrix zu entkoppeln. Die Expression und die richtige molare Masse wurden mittels SDS-

PAGE und Westernblot (siehe 3.3.4) sowie Coomassie<sup>®</sup> Blue-Färbung des Gels bestimmt.

### **Aufreinigung von (His)<sub>6</sub>- Fusionsproteinen**

Die Aufreinigung der (His)<sub>6</sub>-Fusionsproteine erfolgte unter nativen Bedingungen mittels der Ni-NTA Agarose (Invitrogen). Es wurden folgende Puffer benötigt:

Lysispuffer (pH8):

- 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 300mM NaCl
- 10mM Imidazol

Waschpuffer (pH8):

- 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 300mM NaCl
- 20mM Imidazol

Elutionspuffer (pH8):

- 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 300mM NaCl
- 250mM Imidazol

Um der Proteindegeneration vorzubeugen wurden allen Puffern Protease-Inhibitoren (10µg/ml Leupeptin, 2µg/ml Pepstatin A, 50µg/ml Pefabloc) zugesetzt. Die sedimentierten Zellen wurden mit 10ml Lysispuffer und 100mg Lysozym versetzt und resuspendiert. Es wurde eine dreißigminütige Inkubation auf Eis durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen durch Ultraschall für ca. 5x10 Sek. aufgebrochen und für 15 Min. bei 4°C und 10.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 2ml Ni-NTA Agarose zugegeben, die zuvor in 2ml Lysispuffer äquilibriert wurde. Der Zellextrakt wurde bei 4°C für 2 Stunden auf einem Rotator gemischt und die nichtgebundenen Proteine im Überstand abzentrifugiert. Die Matrix wurde danach 5mal mit 1ml Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 2ml Elutionspuffer versetzt und für weitere 30 Min. bei 4°C rotiert. Nach erneutem Zentrifugieren für 1 Min. bei 4°C und 1.500rpm wurde die Analyse der Expression und der richtigen molaren Masse des Proteins mit Hilfe von SDS-PAGE, Westernblot und Coomassie<sup>®</sup> Blue-Färbung des Gels durchgeführt.

### 3.3.6 *Overlay-Assay*

Um Protein-Protein-Interaktion zu analysieren, wurden u.a. *in vitro Overlay-Assays* mit aufgereinigten Fusionsproteinen (CLN N-Terminus 1-49-myc mit TPIP-GST) (siehe 3.3.5) durchgeführt. Zellysat, Ni-NTA-Überstand und Eluat der (His)<sub>6</sub>-Fusionsprotein-Aufreinigung wurden auf das Gel aufgetragen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie<sup>®</sup> Blue-Färbung detektiert. Das GST-Fusionsproteinhaltige Eluat (1ml) wurde dann dialysiert. Der Dialyseschlauch (VISKING Typ 8138 [Porengröße 14 kDa] von Roth) wurde für 10 Min. in 1M Glycinlösung gelegt und 3mal mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gespült. Die Dialyse erfolgte über Nacht unter Rühren in 1l PBS bei 4°C um einen Pufferaustausch zu ermöglichen. Für den *Overlay-Assay* wurde die Nitrozellulose-Membran im Anschluss an den Westernblot entlang des Proteinmarkers geteilt und in 3%iger BSA (Rinder Serum Albumin)-Lösung inkubiert, um die direkte Bindung von Antikörpern an die Membran zu verhindern. Die andere Hälfte wurde wie in 3.3.4 in 5%ige Milchpulver-Blockierlösung über Nacht bei 4°C gelegt. Um eine ausgeglichene Proteinmenge der interagierenden Proteine für den *Overlay-Assay* zu gewährleisten, wurde die Proteinkonzentration der (His)<sub>6</sub>-Fusionsproteine bestimmt (Bradford siehe 3.3.1). Ca. 50µg des Proteins wurden in 10ml 0,3% BSA in PBS-T vermischt und damit die Nitrozellulose-Membran über Nacht bei 4°C überschichtet. Die Membran wurde dann für 10 Min. mit PBS-T gewaschen und anschließend gebundene (His)<sub>6</sub>-Fusionsproteine mit Antikörpern gegen Penta His und ECL nachgewiesen.

### 3.3.7 *Pulldown-Experimente mit aufgereinigten Fusionsproteinen*

Um Protein-Protein-Interaktion zwischen CLN6 und TPIP mit einer zweiten Methode zu analysieren, wurden *in vitro Pulldown-Experimente* mit aufgereinigten Fusionsproteinen (siehe 3.3.5) durchgeführt. HEK293 wurden hierfür mit (His)<sub>6</sub>-CLN6 cDNA in pCDNA-T7 transient transfiziert (siehe 3.4.5) und am darauffolgenden Tag geerntet. Hierzu wurden die Zellen in PBS gewaschen, trypsinisiert und in DMEM (Invitrogen) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen für 5 Min. bei 1.500rpm und Raumtemperatur sedimentiert und erneut in PBS gewaschen und zentrifugiert. Die Zellen wurden in Lysispuffer (siehe 3.3.5) mit 0,1% Triton X-100 und Protease-Inhibitoren (siehe 3.3.5) resuspendiert und danach durch Ultraschall für 5x5 Sek. aufgeschlossen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 Min. bei 10.000rpm und 4°C wurden die HEK293-Lysate zur Ni-NTA Agarose, die vorher mit Lysispuffer

gewaschen wurde, zugegeben und für 2 Std. auf dem Rotator bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde Ni-NTA-Matrix 5mal in Waschpuffer (siehe 3.3.5) gespült. Um eine ausgeglichene Proteinmenge der interagierenden Proteine zu gewährleisten, wurde die Proteinkonzentration der Eluate (siehe 3.3.5) mittels Bradford (siehe 3.3.1) bestimmt, ggf. ausgeglichen indem die Eluate in PBS verdünnt wurden um auf die Ni-NTA-(His)<sub>6</sub>-CLN6-Matrix gegeben zu werden. Danach wurde der Probeninhalt erneut für 2 Stunden auf dem Rotator bei 4°C inkubiert, dann für 1 Min. bei 3.000rpm und 4°C zentrifugiert und abschließend 5mal in PBS gewaschen. Zur Bestimmung der Reinheit und Menge des Proteins wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Westernblot-Analyse und eine Coomassie<sup>®</sup> Blue-Färbung des Gels durchgeführt.

## **3.4 Zellbiologische Methoden**

### **3.4.1 Kultivierung von Zelllinien**

Zur Kultivierung von Zellen wurden sterile Medien, Lösungen und Materialien eingesetzt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die folgenden Zelllinien verwendet: humane embryonale Nierenzellen HEK293 (ATCC) und humane Hautfibroblasten (Patienten). Die Kultivierung der HEK293-Zelllinie erfolgte in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Invitrogen), dem 10% fötales Kälberserum (FKS, PAA) und 1% Penicillin/Streptomycin (GIBCO/BRL) zugesetzt wurden. Die humanen Hautfibroblasten wurden in RPMI 1640 (GIBCO/BRL) mit 20% fötalem Kälberserum und 1% Pen/Strep kultiviert. Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 85% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **3.4.2 Kultivierung stabiler Zelllinien**

Zur Kultivierung stabil transfizierter Zelllinien für die Inositolphosphat-Analytik, Endocytose- sowie für „Pulse/Chase“-Experimente wurden zusätzlich zu der unter 3.4.1 aufgeführten Vorgehensweise 300µg/ml Geneticin (GIBCO/BRL) zugefügt.

### **3.4.3 Trypsinieren von Zellen**

#### **Trypsin-Lösung:**

- 0.05% Trypsin
- 0,02% EDTA

Die kultivierten Zellen (Plattengröße von 35-60mm) wurden zunächst mit PBS gespült und mit 0,5 bis 1ml Trypsin-Lösung für 2-5 Min. inkubiert und anschließend von der Zellkulturschale gelöst. Durch Zugabe von FKS-haltigem Medium wurde die Trypsin-Reaktion inhibiert und die Zellen durch mehrmaliges Aufsaugen mit einer Pipette vereinzelt. Die Zellen wurden mit dem frischem Medium 1:10 verdünnt und auf neue Kulturschalen verteilt. Das Umsetzen der HEK293-Zellen erfolgte 2mal pro Woche. Die Fibroblasten wurden einmal wöchentlich mit neuem Medium versorgt.

### **3.4.4 Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen**

Zur Gefrierkonservierung wurden die Zelllinien zunächst in PBS gewaschen, dann trypsiniert (siehe 3.4.3), anschließend in FKS-haltigem Medium aufgenommen und für 5 Min. bei 1.000rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden nach Abnehmen des Überstandes in Einfriermedium (10% DMSO, 20% FKS in DMEM) resuspendiert und in 1ml-Einfrierröhrchen überführt. Dieses wurde in einem Einfrierbehälter, der mit Isopropanol gefüllt war, eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Revitalisierung wurden die Zelllinien im Einfrierröhrchen bei Raumtemperatur für ca. 1 Min. angetaut und dann im Wasserbad bei 37°C so weit aufgetaut, dass ein kleiner Eiskern übrig blieb. Die Zellsuspension wurde in 5ml kaltem Medium (DMEM, 10% FKS und 1% Pen/Strep) aufgenommen und bei 1.000rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 5ml Medium resuspendiert und in eine 60mm-Kulturschale gesetzt.

### **3.4.5 Transiente Transfektion von HEK293 mit Lipofectamin™2000**

Für die transiente Transfektion von Zelllinien wurde zunächst Lipofectamin™2000 (Invitrogen) in Optimem®-1 (GIBCO/BRL) gemischt und für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde DNA in Optimem®-1 gegeben. Beide Ansätze wurden miteinander vermengt und bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde der Ansatz zu den Zellen gegeben, die nach 18-48 Stunden analysiert wurden.

**Tab. 7: Transiente Transfektion mit Lipofectamin™2000**

Kulturschale	DNA in Optimem®-1	Lipofectamin™2000 in Optimem®-1
35mm	4,0µg in 250µl	10µl in 250µl
60mm	8,0µg in 500µl	20µl in 500µl

### 3.4.6 Ernten von Zellen

#### RIPA-Puffer:

- 50mM Tris/HCl, pH 8
- 150mM NaCl
- 1% NP-40
- 0,5% Natriumdeoxycholat
- 0,1% SDS
- 5mM EDTA

Das Kultivierungsmedium wurde abgesaugt und die Zellen in PBS gewaschen. Anschließend wurde die 60mm-Kulturschale auf Eis gestellt und 500µl RIPA und 10µl und Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich) zugegeben. Nach einer Inkubation von 2 Min. wurden die Zellen abgeschabt und für 5 Min. bei 4°C und 10.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde für das weitere Vorgehen eingesetzt.

### 3.4.7 Zellpräparation für Inositolphosphat-Analytik

#### TCA-Lösung:

- 1ml TCA [w/v =8%]
- 15µl 0,2M EDTA
- 10µl 0,1M NaF

Im Rahmen der Doktorarbeit standen stabil IPMK (Inositolphosphatmultikinase)- und IP5-2K (Inositolphosphat-5-2-Kinase; Klon 2)-exprimierende sowie nicht transfizierte HEK293-Zellen zur Verfügung. Zusätzlich wurden von beiden Kinasen pEGFP-

markierte Konstrukte in stabilen HEK293-Zellen überexprimiert. Die Expression und die molare Masse wurden mittels SDS-PAGE mit anschließender Westernblot-Analyse bestimmt. Für die IP-Analytik wurden die Zellen wie folgt aufgearbeitet: Hek293-Zellen wurden in einer 15cm-Kulturschale bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert. Die Schalen wurden auf Eis gestellt, das Kultivierungsmedium abgesaugt (innerhalb von 30 Sek.), 2mal mit eisgekühltem PBS gewaschen und sofort in 1ml TCA-Lösung inkubiert, die vorher frisch angesetzt wurde. Nach der raschen und gleichmäßigen Verteilung der TCA-Lösung über alle Zellen, wurde die Zellsuspension mittels einer abgeschnittenen Pipettenspitze einschließlich des Präzipitats in ein vorgekühltes 12ml-Röhrchen, das zuvor Tara gewogen und dokumentiert wurde, zur Zentrifugation überführt. Zum Zellaufschluss wurden die Zellen in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren, im Wasserbad bei 37°C wieder aufgetaut und kurz gerührt. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Bei 4°C und 4.000rpm für 5 Min. wurden die Proben sedimentiert. Diese Bearbeitung samt der Zentrifugation durfte nach TCA-Zugabe maximal 30 Min. dauern. Der TCA-Überstand, der Inositolphosphate enthielt, wurde vollständig abgenommen und in neue vorgewogene 15ml-Polypropylen-Tube mit PP-Stopfen auf Eis überführt. Das Gewicht der Pellets in den Zentrifugenröhrchen, die die Proteine, Lipide und damit auch die Phosphoinositolphosphate enthielten, wurde noch einmal bestimmt. Der TCA-Überstand wurde für 30 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert und im Anschluss auf Eis abgekühlt. Die Inositolphosphate wurden dann 3mal mit je 3ml H<sub>2</sub>O-gesättigtem eiskaltem Diethylether (zweifaches TCA-Volumen) extrahiert, wobei für ca. 60 Sek. intensiv in der Hand geschüttelt und kurz bis auf 4.000rpm zentrifugiert wurde. Die obere Phase wurde dann vorsichtig abgesaugt und der Vorgang erneut wiederholt. Es folgte eine Kontrolle des pH-Werts, der u.U. mit 1M TEA (Triethanolamin) auf pH 6-7 eingestellt wurde. In der Speed-Vac<sup>®</sup> (Savant) wurde für ca. 1,5 Std. der restliche Diethylether abgedampft und dann das Volumen der Proben bestimmt. Anschließend wurden die Proben Dr. H. Lin (AG Prof. Dr. G. W. Mayr im Institut für Biochemie, UKE Hamburg) zur HPLC-Analytik übergeben.

### **3.4.8 Endocytose von [<sup>125</sup>J]-Arylsulfatase B**

Zellen wurden in 35mm-Kulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert. Die Zellen wurden einmal in PBS gewaschen und für 1 Stunde in serumfreien Medium (DMEM, 0,1% BSA) vorinkubiert. Nach erneutem PBS-Wash

wurden die Zellen in 700µl [<sup>125</sup>J]-Arylsulfatase B-haltigen Medium (DMEM, 0,1% BSA, 400.000cpm) für angegebene Zeiten bei 37°C in An- und Abwesenheit des kompetitiven Inhibitors Mannose-6-Phosphat (M6P)-Na-Salz (10mM) inkubiert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen auf Eis 3mal mit kaltem PBS gewaschen und oberflächengebundene ASB durch 2 Waschschrte mit M6P-Ba-Salz (2mM) in PBS für 5 Min. entfernt. Nach 3 weiteren PBS-Waschschrten wurden die Zellen in 2x600µl 0,32M Saccharose/50mM Tris/HCL (pH 7,4) aufgenommen, für 5 Min. bei 4°C und 3.800rpm sedimentiert, der Überstand verworfen und die Pellets solubilisiert. Zellassozierte Radioaktivität wurde bestimmt und die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt. Auf das getrocknete Gel wurden Röntgenfilme (Kodak) gelegt und für 10-72 Std. bei -80°C exponiert. Die Autoradiogramme wurden densitometrisch quantifiziert.

### **3.4.9 „Pulse/Chase“**

Für „Pulse/Chase“-Versuche wurden HEK293-Zellen, die IPMK und IP5-2K (3.4.5) stabil überexprimieren, sowie nicht transfizierte HEK293-Zellen verwendet. Hierzu wurden die HEK293-Zellen in einer 35mm-Kulturschale (jeweils 2 Kulturschalen pro Klon) bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert. Nach dem Vorinkubieren der Zellen im serumfreien Medium folgte die Inkubation für eine weitere Stunde in [<sup>125</sup>J]-Arylsulfatase B-haltigen Medium („Pulse“; 400.000cpm/0,7ml). Die Zellen einer Kulturschale wurden nach dem „Pulse“ direkt auf Eis, 3mal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend 2mal für 5 Min. mit Waschpuffer (PBS, 2mM M6P) versetzt, um oberflächengebundene [<sup>125</sup>J]-ASB zu entfernen. Danach wurden die Zellen in 2x600µl 0,32M Saccharose/50mM Tris (pH 7,4) aufgenommen, für 5 Min. bei 4°C und 3.800rpm sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden schließlich in 75µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> resuspendiert. Von den Zellen der anderen Kulturschale wurde nach dem „Pulse“ das radioaktive Medium abgenommen, mit vorgewärmtem PBS gewaschen und für 2 Std. im serumfreien DMEM/0,1% BSA inkubiert („Chase“). Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Alle Proben wurden zusätzlich mit je 1µl 50 x IC, 1,8µl Benzonase (Merck) für 3 Min. bei Raumtemperatur und danach mit je 1µl Protaminsulfat (3mg/100µl) (Sigma-Aldrich) für 10 Min. auf Eis inkubiert, um DNA abzubauen bzw. zu fällen. Anschließend folgte eine Zentrifugation in der Eppendorf-Tischzentrifuge für 10 Min. bei 4°C und 13.000rpm. Die Radioaktivität im Überstand wurde bestimmt und die Proben durch

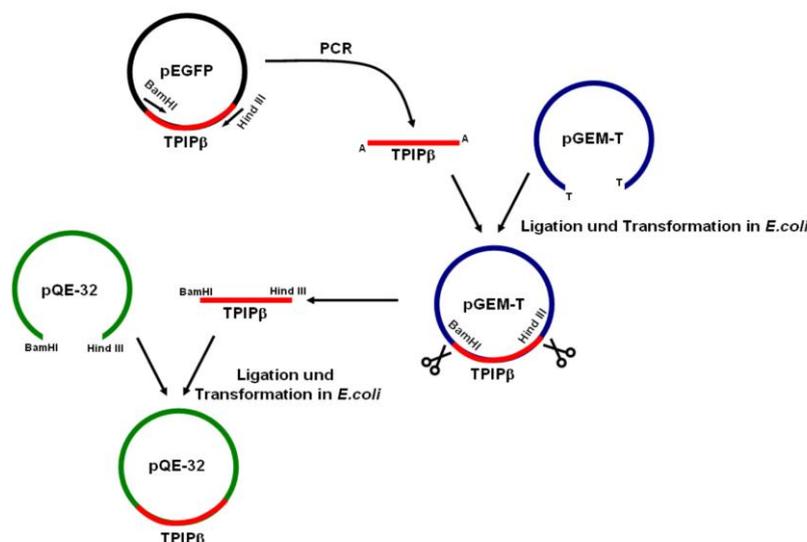
SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Größenbestimmung diente ebenfalls der Protein-Molekulargewichtsmarker (High Range Rainbow Molecular Weight Marker, Amersham Biosciences). Nach Auftrennung der Proteine wurde [ $^{125}\text{J}$ ]-ASB durch Autoradiographie sichtbar gemacht und die Autoradiogramme desitometrisch analysiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Direkte Interaktion zwischen TPIPβ und CLN6

#### 4.1.1 Klonierung von TPIPβ in pQE-32

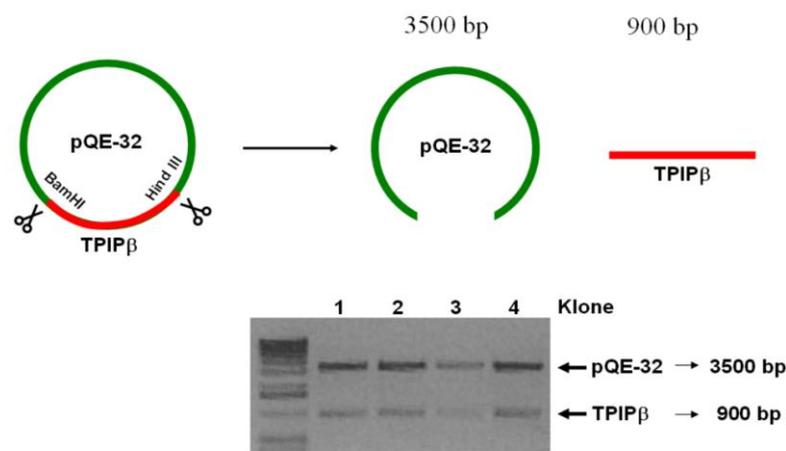
Um eine direkte *in vitro* Interaktion zwischen TPIPβ und CLN6 zu belegen, sollten Proteinbindungs-Experimente in Form von *Overlays* und *Pulldowns* durchgeführt werden mit Hilfe von *in vitro* aufgereinigten His- und GST-markierten Fusionsproteinen. Dazu musste zunächst die kodierende Sequenz von TPIPβ in den bakteriellen Expressionsvektor pQE-32 kloniert werden. Mit Hilfe von zwei spezifischen Primern, denen Restriktionsschnittstellen für BamHI und HindIII angefügt wurden, wurde eine PCR durchgeführt und die amplifizierte TPIPβ cDNA zunächst in den Vektor pGEM-T<sup>®</sup> mit Hilfe des A-Überhangs subkloniert. Anschließend wurde das Insert mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII aus pGEM-T<sup>®</sup> ausgeschnitten und in den Zielvektor pQE-32 ligiert (siehe Abb. 5).



**Abb. 5: Strategie für die Klonierung von TPIPβ in den Zielvektor pQE-32**

Die kodierende Sequenz von TPIPβ wurde mit Hilfe einer PCR amplifiziert und über den Vektor pGEM-T<sup>®</sup> in den Zielvektor pQE-32 kloniert.

Nach Transformation von BL21-Zellen wurden vier von 16 positiven Klonen analysiert. Die Klonierung wurde mit Hilfe eines Restriktionsverdau mit BamHI und HindIII kontrolliert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung konnten der Vektor pQE-32 (3.500bp) und die kodierende Sequenz für TPIP $\beta$  (900bp) in allen Klonen im Gel nachgewiesen werden (siehe Abb. 6). Zusätzlich wurde eine Sequenzierung zur Analyse des Konstrukts durchgeführt, die eine erfolgreiche Klonierung des TPIP $\beta$  bestätigte.



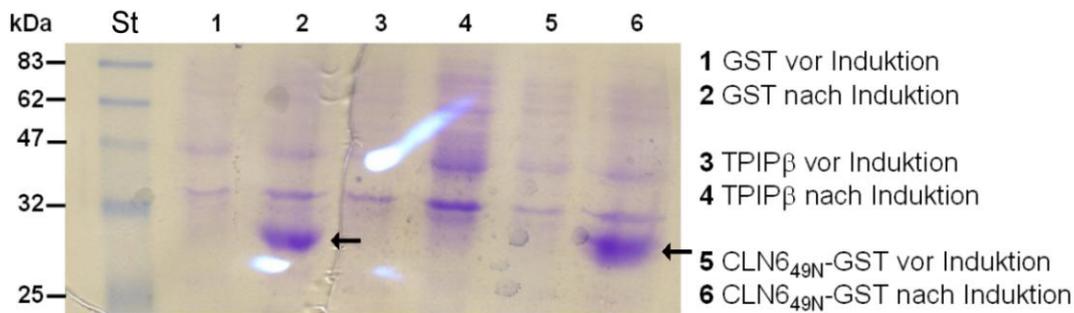
**Abb. 6: Diagnostischer Verdau von TPIP $\beta$  im Vektor pQE-32**

Es wurden vier Klone mit Hilfe der Restriktionsenzyme BamHI und HindIII verdaut. Nach der elektrophoretischen Auftrennung konnten im Agarose-Gel je zwei Banden nachgewiesen werden, von denen die eine dem Vektor pQE-32 (3.500bp) und die andere der kodierenden Sequenz von TPIP $\beta$  (900bp) entsprachen.

#### 4.1.2 Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine für einen *Overlay*-Assay

Zur Expression des TPIP $\beta$ -(His) $_6$ -Fusionsproteins wurde das Konstrukt zunächst in BL21-Zellen transformiert. Außerdem wurden die 49 Aminosäuren, die die N-terminale zytoplasmatische CLN6-Domäne bilden, als GST-Fusionsprotein in pGEX-4T2 kloniert. Mit dem pGEX-4T2-Vektor allein wurden außerdem BL21-Zellen als Kontrolle der Expression von GST transformiert. Zum Nachweis der Expression der Proteine in BL21-Zellen wurden jeweils vor und nach der Induktion der Konstrukte mit IPTG Proben entnommen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie<sup>®</sup> Blue gefärbt. Dabei konnte eine gute Induktion der GST-Fusionsproteine entsprechend der erwarteten molaren Masse von 28kDa (GST allein) und 30kDa (CLN6 $_{49N}$ -GST) nachgewiesen werden (Bahn 2 und 6, Abb.7). Nach der Induktion

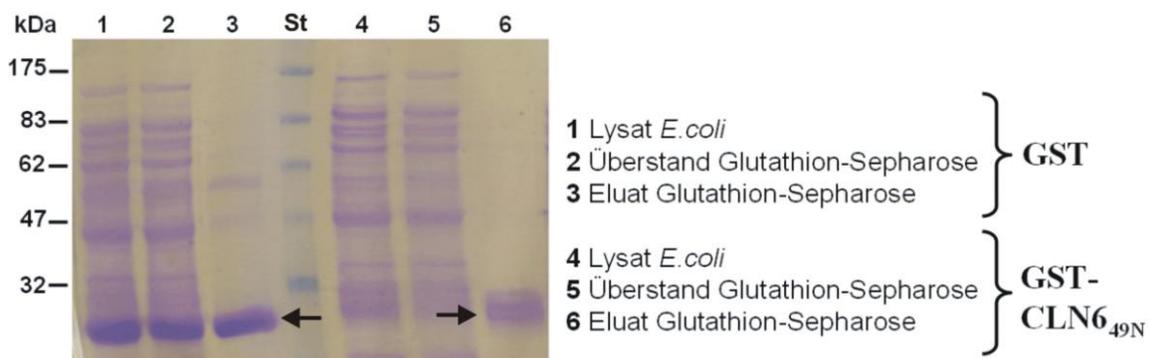
des TPIP $\beta$ -(His) $_6$ -Fusionsproteins konnte kein exprimiertes TPIP $\beta$ -(His) $_6$ -Fusionsprotein, bei der erwarteten Größe von 30kDa, nachgewiesen werden (Bahn 4, Abb.7).



**Abb. 7: Proteinexpression der Fusionsproteine für das Overlay-Experiment**

Zur Analyse der Induktion der Proteinexpression wurden die Fusionsproteine im SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie<sup>®</sup> Blue gefärbt. Für die Fusionsproteine und GST allein wurden Proben vor und nach der Induktion analysiert. In Bahn 2, die dem GST-Protein nach der Induktion entsprach, war eine deutliche Polypeptidbande bei 28kDa zu sehen, was für eine erfolgreiche Induktion sprach. Auch Bahn 6 (nach der Induktion) zeigte eine deutliche Polypeptidbande bei 30kDa, die dem CLN $_{6_{49N}}$ -Fusionsprotein entsprach. Hingegen war in Bahn 4 (nach der Induktion) das zu erwartende Bandensignal für das TPIP $\beta$ -(His) $_6$ -Fusionsprotein bei 30kDa nicht zu sehen. St., Molekulargewichtsmarker.

Die Aufreinigung von GST und GST-Fusionsprotein erfolgte mit Hilfe von Glutathion-Sepharose. Es wurden jeweils Aliquots von Bakterienlysaten, Überständen nicht gebundener Proteine der Glutathion-Sepharose und Eluaten der Glutathion-Sepharose durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie<sup>®</sup> Blue-Färbung sichtbar gemacht, um zu veranschaulichen, dass die Proteine nach jedem Schritt der Proteinaufreinigung nachzuweisen waren.

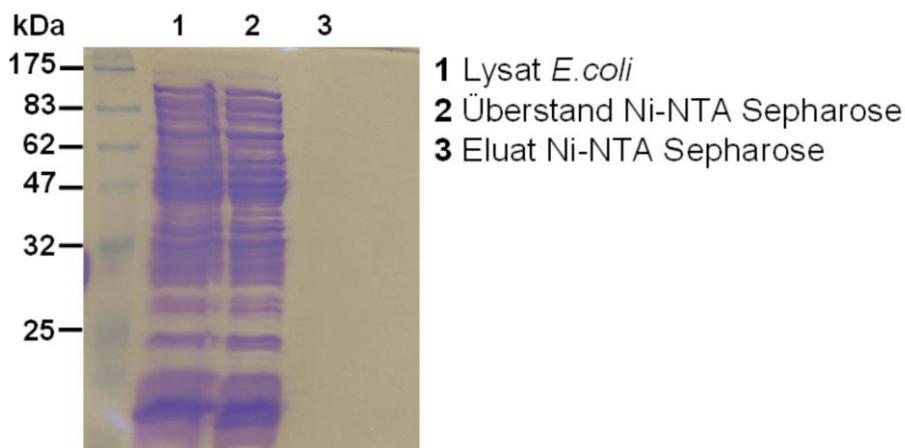


**Abb. 8: Aufreinigung der GST-Fusionsproteine**

Für den Nachweis einer erfolgreichen Aufreinigung von GST und den GST-CLN $_{6_{49N}}$ -Fusionsproteinen wurden Aliquots der Bakterienlysate, der Überstände nicht gebundener Proteine der Glutathion-Sepharose und der Eluate der Glutathion-Sepharose im SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie<sup>®</sup> Blue gefärbt. GST ließ sich als 28kDa Protein im Eluat nachweisen (Bahn 3) und CLN $_{6_{49N}}$ -GST erschien bei 30kDa.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl GST als auch das CLN6<sub>49N</sub>-GST-Fusionsprotein mit Erfolg aufgereinigt werden konnten. GST ließ sich im Coomassie® Blue gefärbten Gel als Bande bei 28kDa nachweisen (Abb. 8, Bahn 3), während CLN6<sub>49N</sub>-GST als ca. 30kDa Protein erschien (Abb. 8, Bahn 6).

TIPIPβ-(His)<sub>6</sub> wurde mittels Ni-NTA Agarose aufgereinigt. Obwohl beim TIPIPβ-(His)<sub>6</sub>-Fusionsprotein nach der Induktion kein Bandensignal zu sehen war, wurde die Aufreinigung des Proteins durchgeführt, da davon ausgegangen wurde, dass die Proteinmengen des His-markierten Proteins eventuell sehr gering waren und sich dieses bei der Aufreinigung anreichern könnte. Im Gegensatz zu GST und CLN6<sub>49N</sub>-GST konnte im Eluat von Ni-NTA Agarose kein TIPIPβ-(His)<sub>6</sub>-Fusionsprotein nachgewiesen werden (Abb. 9, Bahn 3). Dies kann auf eine fehlende Expression oder den Einschluss des TIPIPβ-(His)<sub>6</sub>-Fusionsproteins in bakterielle „inclusion bodies“ hindeuten, die die weitere Aufarbeitung erheblich erschweren würden.

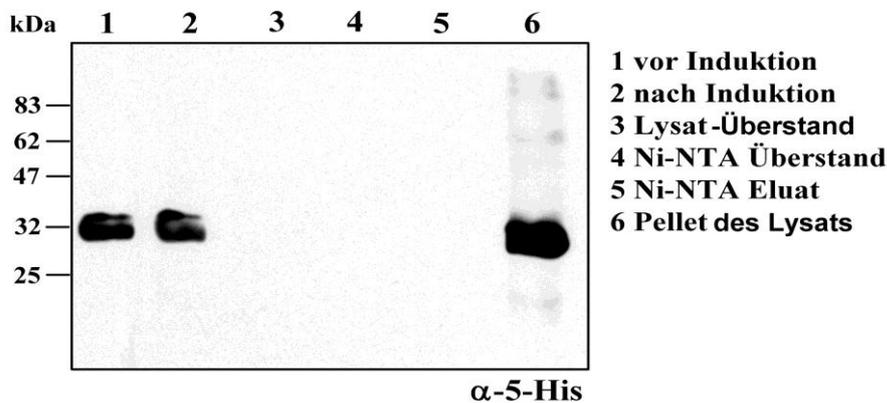


**Abb. 9: Analyse von *E. coli*-Lysaten nach Induktion des TIPIP(His)<sub>6</sub>-Fusionsproteins**

Bakterienlysat, Überstand Ni-NTA Sepharose und Eluat der Ni-NTA Sepharose wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie® Blue-Färbung analysiert.

Um zu untersuchen, ob der Mangel an TIPIPβ-(His)<sub>6</sub> auf eine fehlende Expression oder Verluste während der Aufreinigung zurückzuführen ist, wurde ein Westernblot durchgeführt. Dabei konnte exprimiertes TIPIPβ mit Hilfe eines monoklonalen anti□(His)<sub>6</sub> Antikörpers in den Gesamtprotein-Fractionen vor und nach Induktion nachgewiesen werden (Abb. 10, Bahn 1 und 2). Nach der Lyse der Bakterien wurde ein Lysat-Überstand und ein Membranpellet durch Zentrifugation präpariert. TIPIPβ war ausschließlich im Pellet nachweisbar, was auf einen Einschluss des Proteins in bakterielle „inclusion bodies“ hindeutete (Abb. 10, Bahn 6). Weder im Lysat-

Überstand noch im Eluat der Ni-NTA Sepharose konnte deshalb TPIP $\beta$  nachgewiesen werden. Es wurden keine weiteren Versuche zur Solubilisierung des TPIP $\beta$  aus den „inclusion bodies“ vorgenommen, sondern ein alternativer experimenteller Ansatz gewählt.



**Abb. 10: Westernblot zur Detektion von TPIP $\beta$ -(His) $_6$ -Fusionsproteinen in verschiedenen Lysaten und Fraktionen der Bakterien**

Zur Detektion von TPIP $\beta$ -(His) $_6$ -Fusionsproteinen wurden Gesamtprotein-Fractionen vor und nach IPTG-Induktion (Bahn 1 und 2) und Proteinaufreinigung (Bahn 3-5) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe eines antiHis $_6$ -Westernblots analysiert.

#### 4.1.3 Strategie des *Pulldown*-Experiments

Als neuer experimenteller Ansatz für die Analyse der direkten Interaktion zwischen TPIP $\beta$  und CLN6 sollte ein *Pulldown*-Assay durchgeführt werden (Abb.11). Für das Experiment wurden HEK293 mit dem „full length“ CLN6-(His) $_6$ -Konstrukt in pCDNA-T7 transfiziert. Das CLN6-(His) $_6$ -Fusionsprotein wurde in HEK293-Zellen überexprimiert, die Zellen wurden lysiert und mit Ni-NTA Sepharose inkubiert. Parallel wurde das TPIP $\beta$ , wie bereits bei 4.1.1 beschrieben, über den Zwischenvektor pGEM-T<sup>®</sup> Easy in pGEX-4T1 mit Hilfe der Restriktionsenzyme BamHI und EcoRI kloniert. Auch hier wurde die Klonierung mit Hilfe eines Restriktionsverdau mit BamHI und EcoRI, nachfolgender elektrophoretischer Auftrennung und Sequenzierung kontrolliert. Anschließend wurden das TPIP $\beta$ -GST-Fusionsprotein und GST allein als Negativkontrolle in BL21-Zellen exprimiert und mittels Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Um den *Pulldown* durchzuführen, sollte das aufgereinigte GST bzw. das TPIP $\beta$ -GST-Fusionsprotein zum mit der Ni-NTA Matrix gekoppelten CLN6-(His) $_6$ -Fusionsprotein zugegeben werden (Abb. 11).

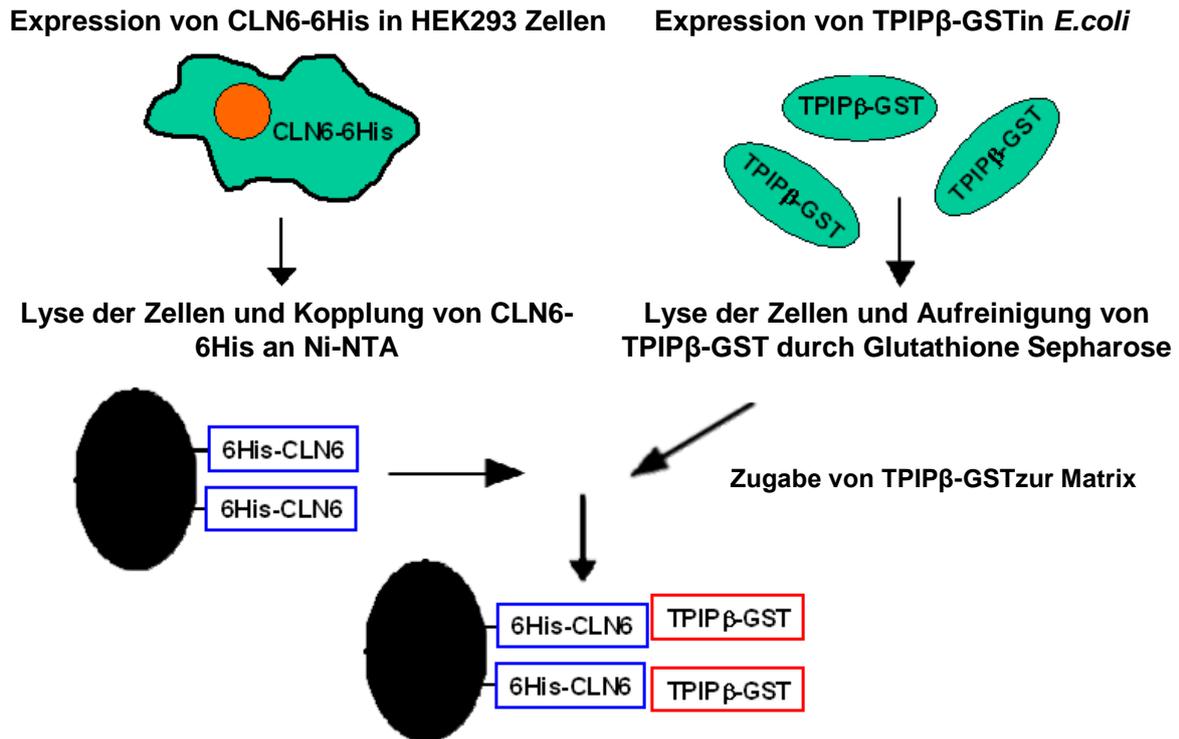


Abb. 11: Strategie zur Analyse der Interaktion zwischen TPIPβ und CLN6 mit einem *Pull-down*-Assay

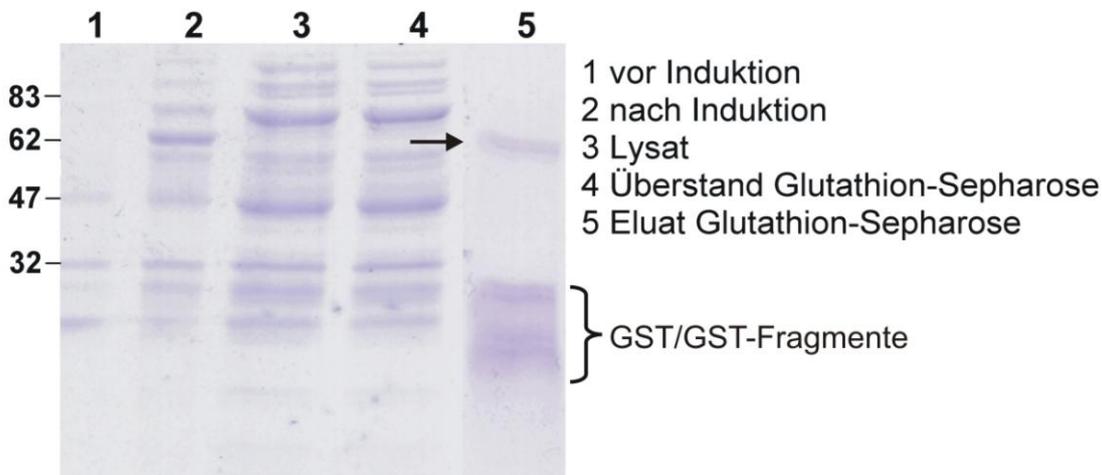
#### 4.1.4 Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine für *Pull-down*-Experimente

Zur Expression von GST und TPIPβ-GST-Fusionsproteinen wurden BL21-Zellen mit dem entsprechenden Expressionsvektor transformiert. Um die Expression der Proteine in BL21-Zellen zu kontrollieren, wurden Gesamtprotein-Fractionen vor und nach der Induktion mit IPTG Proben entnommen.

Die Aufreinigung von GST und des TPIPβ-GST-Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe von Glutathion-Sepharose. Nach der Lyse der Bakterien wurde ein Lysat-Überstand durch Zentrifugation präpariert. Die Aliquots der Bakterienlysate, der Glutathion-Sepharose-Überstände der nicht gebundenen Proteine und der Eluate der Glutathion-Sepharose, als auch die Proben vor und nach Proteinexpression wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie® Blue-Färbung sichtbar gemacht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass TPIPβ-GST nach der Induktion mit IPTG im Coomassie® Blue-Gel als ca. 65kDa Protein nachgewiesen werden konnte (Abb.12, Bahn 2). Das Fusionsprotein ließ sich durch Glutathion-Sepharose-Chromatographie erfolgreich aufreinigen und war im Eluat der Glutathion-Sepharose im Coomassie®

Blue-Gel nachweisbar (Bahn 5). Allerdings waren im Eluat der Glutathion-Sepharose auch mehrere Banden kleiner als 30kDa detektierbar, was auf einen schnellen Abbau des Fusionsproteins hindeutete.

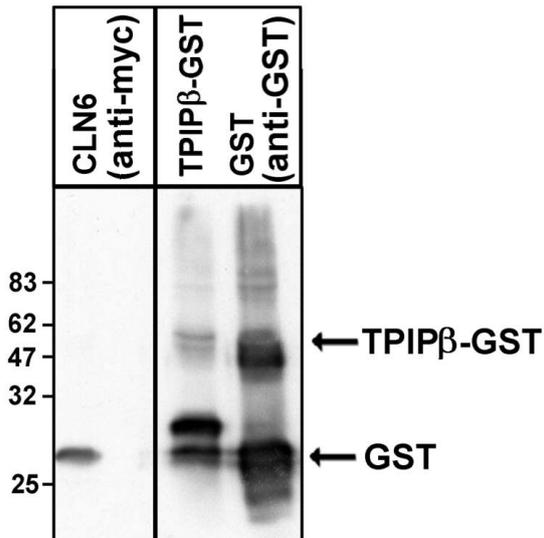


**Abb. 12: Expression und Aufreinigung des TPIPβ-GST-Fusionsproteins**

Zur Analyse der Expression und Aufreinigung des TPIPβ-GST-Fusionsproteins wurden die Proben vor und nach der Induktion (Bahn 1 und 2), sowie die Proben der Proteinaufreinigung Bakterienlysate, Überstand der Glutathion-Sepharose und Eluat der Glutathion-Sepharose (Bahn 3, 4 und 5) durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie® Blue gefärbt. Der Pfeil zeigt das exprimierte TPIPβ-GST-Fusionsprotein. Abbaubanden des GST sind markiert.

#### 4.1.5 Nachweis der direkten Interaktion zwischen TPIPβ und CLN6 mit *Pulldown*-Assays

Im Folgenden wurde mit Hilfe des aufgereinigten TPIPβ-GST-Fusionsproteins ein *Pulldown*-Assay durchgeführt. Zuerst wurde vollständige CLN6 kodierende Sequenz im Vektor pCDNA3.1 transient in HEK293-Zellen transfiziert und die Zellen nach 24 Stunden geerntet. Über den C-terminalen (His)<sub>6</sub>-Tag am CLN6 konnte das Protein anschließend aus Zellysaten mit Hilfe von Ni-NTA Agarose aufgereinigt werden. Für den *Pulldown*-Assay wurde erstens gebundenes CLN6 an Ni-NTA Agarose verwendet. Im Westernblot war das aufgereinigte CLN6-Protein mit Hilfe eines anti myc Antikörpers nachweisbar. Für den *Pulldown*-Assay wurde zweitens das aufgereinigte TPIPβ-GST-Fusionsprotein bzw. GST als Negativkontrolle zur Ni-NTA Matrix mit dem gekoppelten CLN6-(His)<sub>6</sub>-Fusionsprotein zugegeben. An CLN6 gebundenes TPIPβ-GST wurde anschließend mit Hilfe eines anti GST-Westernblots identifiziert. Westernblot-Analysen zeigten, dass keine spezifische Bindung zwischen CLN6 und TPIPβ stattfand, da auch GST an CLN6-(His)<sub>6</sub> gebunden wurde.



**Abb. 13: Pull-down-Assay mit CLN6 und TPIP $\beta$**

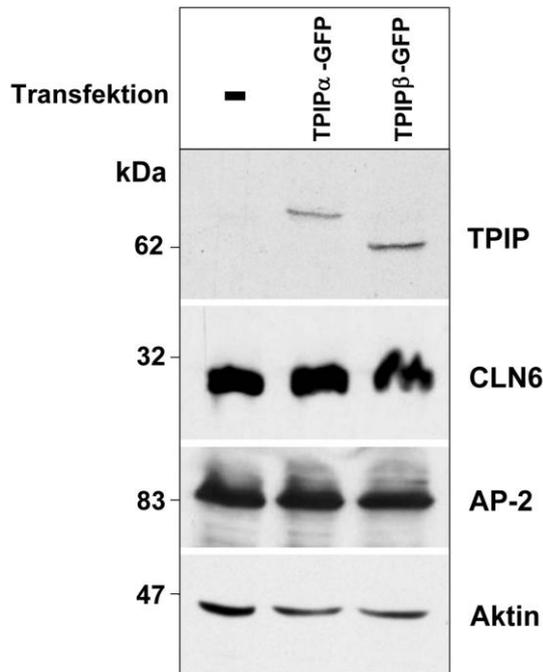
HEK293-Zellen wurden mit CLN6 im Vektor pCDNA3.1 transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und CLN6 mit Hilfe des fusionierten (His)<sub>6</sub>-Tags an Ni-NTA Agarose gekoppelt. Die Agarose wurde mit aufgereinigtem TPIP $\beta$ -GST oder GST inkubiert. Die Ni-NTA Komplexe wurden gewaschen und gebundene Proteine durch SDS-PAGE getrennt und anschließend durch anti GST-Westernblots analysiert. CLN6 wurde mit Hilfe von anti (His)<sub>6</sub> im Westernblot detektiert.

## 4.2 Einfluss von TPIP $\alpha$ und TPIP $\beta$ auf die Protein-expression von CLN6 und AP-2

In nicht veröffentlichten Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass TPIP $\alpha$  und TPIP $\beta$  mit dem N-Terminus von CLN6 interagieren konnten. TPIP ist eine Phosphoinositol-3-phosphatase und ist an der Synthese von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> beteiligt (Walker *et al.*, 2001), das an der Adaptorprotein-2 (AP-2) vermittelten Endocytose mitwirkt. Es sollte daher der Einfluss von TPIP $\alpha$  und TPIP $\beta$  auf die Expression des endogenen CLN6 und des Adaptorproteins AP-2 untersucht werden. Dazu wurden HEK293-Zellen mit TPIP $\alpha$  und TPIP $\beta$  im Vektor pEGFP-C1 transient transfiziert. Als Kontrolle dienten untransfizierte HEK293-Zellen. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Westernblot auf die Anwesenheit von TPIP $\alpha$  und TPIP $\beta$  (als pEGFP-Fusionsproteine) mit Antikörpern gegen GFP und CLN6, die Untereinheit  $\alpha$  von AP-2 und Aktin mit entsprechenden Antikörpern analysiert. Aktin fungierte als Ladekontrolle.

Im anti GFP-Westernblot waren Polypeptidbanden bei 65kDa und 62kDa nachweisbar, die TPIP $\alpha$  und TPIP $\beta$  zugeordnet werden konnten und für eine erfolgreiche Überexpression in HEK293-Zellen sprachen. In den untransfizierten

HEK293-Zellen war kein Signal detektierbar. Endogenes CLN6 ließ sich als ca. 28kDa Polypeptid detektieren, während die  $\alpha$ -Untereinheit von AP-2 bei ca. 83kDa nachweisbar war. Durch die Überexpression von TPIP $\alpha$  und TPIP $\beta$  wurde die endogene Menge dieser beiden Proteine nicht beeinflusst. Mit Aktin als Ladekontrolle konnte gezeigt werden, dass gleiche Proteinmengen der Proben eingesetzt wurden.



**Abb. 14: Einfluss von TPIP $\alpha$  und TPIP $\beta$  auf die Proteinexpression von endogenem CLN6 und AP-2 in HEK293-Zellen**

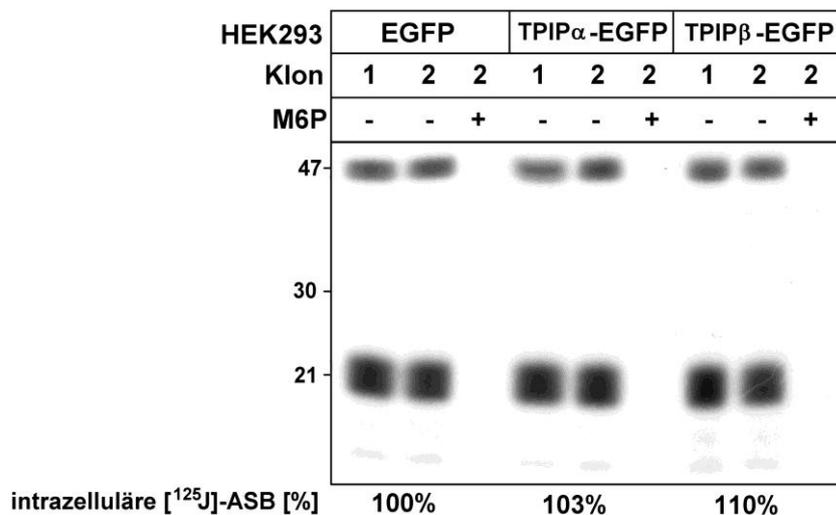
HEK293-Zellen wurden transient mit TPIP $\alpha$ -pEGFP oder TPIP $\beta$ -pEGFP transfiziert. Nach der Lyse der Zellen wurden gleiche Proteinmengen im Westernblot auf die Expression von endogenem CLN6 und AP-2 analysiert. Als Ladekontrolle diente Aktin.

### **4.3 Einfluss von TPIP $\alpha$ und TPIP $\beta$ auf die M6P-abhängige**

#### **Endocytose von [ $^{125}$ J]-Arylsulfatase B**

HEK293-Zellen wurden mit pEGFP, TPIP $\alpha$ -pEGFP und TPIP $\beta$ -pEGFP transient transfiziert, wobei für das Experiment je Konstrukt zwei unabhängige Ansätze durchgeführt wurden. 24 Stunden nach der Transfektion wurde die Expression der Konstrukte an Hand der pEGFP-Fluoreszenz überprüft. HEK293-pEGFP-, HEK293-TPIP $\alpha$ -pEGFP- und HEK293-TPIP $\beta$ -pEGFP-Zellen wurden mit [ $^{125}$ J]-Arylsulfatase B (400.000cpm/0,7ml) in An- und Abwesenheit von M6P (10mM) für 90 Min. bei 37°C inkubiert. Abbildung 15 zeigt, dass die [ $^{125}$ J]-ASB-Aufnahme spezifisch war und durch einen Überschuss von M6P vollständig gehemmt wurde. Nach dem Entfernen der an die Plasmamembran gebundenen [ $^{125}$ J]-ASB wurden die Zellextrakte unter

reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert.



**Abb. 15: Endocytose von [ $^{125}$ J]-Arylsulfatase B (ASB) in pEGFP, TPIP $\alpha$ -pEGFP und TPIP $\beta$ -pEGFP transfizierten HEK293-Zellen**

HEK293-Zellen wurden transient mit pEGFP, TPIP $\alpha$ -pEGFP oder TPIP $\beta$ -pEGFP transfiziert. Anschließend wurde eine 90minütige Endocytose mit [ $^{125}$ J]-ASB in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von M6P durchgeführt und die Zellextrakte mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Autoradiogramme wurden densitometrisch ausgewertet und die Gesamtmenge der aufgenommenen [ $^{125}$ J]-ASB in % der Kontrollzellen angegeben. Die 47kDa [ $^{125}$ J]-ASB-Bande stellt die reife Form (*Mature*) der ASB und die 21kDa-Bande die prozessierte Form der [ $^{125}$ J]-ASB dar.

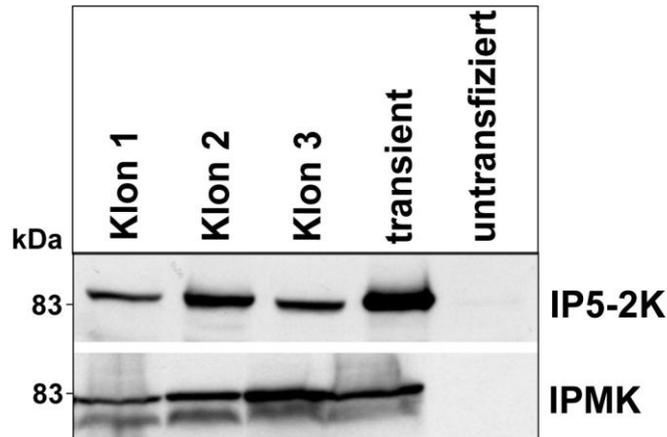
Die densitometrische Analyse der über M6P-abhängige Endocytose intrazellulär aufgenommenen [ $^{125}$ J]-ASB ergab eine nicht signifikant erhöhte Aufnahme von [ $^{125}$ J]-ASB, bei TPIP $\alpha$ -überexprimierenden Zellen um 3% ( $\pm 9\%$  bei  $n=4$ ) und für TPIP $\beta$ -überexprimierenden Zellen um 10% ( $\pm 24\%$  bei  $n=4$ ) im Vergleich zu den pEGFP transfizierten HEK293-Kontrollzellen (Abb. 15). Die Daten zeigen, dass die Überexpression TPIP $\alpha$  und TPIP $\beta$  keinen signifikanten Einfluss auf die M6P-vermittelte Endocytose von lysosomalen Enzymen in HEK293-Zellen hat.

#### **4.4 Veränderung der Inositolphosphat-Spiegel in IP5-2K- und IPMK- überexprimierenden HEK293-Zellen**

In Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass im Gehirn von *nclf*-Mäusen verschiedene Inositolphosphate, wie Ins(1,4,5)P $_3$ , Ins(1,3,4,6)P $_4$ , Ins(1,4,5,6)P $_4$ , Ins(1,3,4,5)P $_4$ , Ins(1,2,3,4,6)P $_5$ , Ins(1,2,4,5,6)P $_5$ , Ins(1,2,3,4,5)P $_5$ , Ins(1,3,4,5,6)P $_5$ , InsP $_6$  und InsP $_7$  erhöht auftraten (T. Braulke, persönliche Mitteilung). Im Gehirn von *nclf*-Mäusen sind außerdem Veränderungen von Komponenten der

vesikulären Endocytose-Maschinerie festgestellt worden, wie AP-2 oder Epsin. Deshalb sollte in den folgenden Experimenten versucht werden, die Inositolphosphat-Spiegel in HEK293-Zellen als Modellsystem durch stabile Überexpression von verschiedenen Inositolphosphat-Kinasen gezielt zu verändern, um ihren Einfluss auf Endocytosemechanismen zu untersuchen. Im Rahmen der Doktorarbeit standen für diese Experimente bereits stabile IPMK (Inositolphosphatmultikinase)- und IP5-2K (Inositolphosphat5-2Kinase)-überexprimierende HEK293-Zellen zur Verfügung, wobei beide Kinasen als pEGFP-C1-markierte Konstrukte exprimiert wurden. Um die Expression dieser Kinasen nachzuweisen, wurden von beiden stabilen Zelllinien je drei Klone ausgesucht und die Zelllysate analysiert. Zum Vergleich wurden in HEK293-Zellen IPMK-pEGFP und IP5-2K-pEGFP transient exprimiert. Die Proteinproben wurden im SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend mittels Westernblot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit anti GFP-Antikörper nachgewiesen. Untransfizierte HEK293-Zellen dienten als weitere Kontrollen.

Wie in Abb. 16 zu sehen ist, wurden in den ausgewählten Zellklonen sowohl IPMK als auch IP5-2K stabil exprimiert. Die höchste Expression des IP5-2K-pEGFP-Proteins wurde in Klon 2, die höchste des IPMK-pEGFP-Proteins in Klon 3 beobachtet. In den transient transfizierten HEK293-Zellen war die Expression der IP5-2K höher als in den stabil exprimierenden Zellen. Das IP5-2K-pEGFP-Protein hat eine molekulare Masse von 84kDa und die der IPMK-pEGFP beträgt 83kDa. In untransfizierten HEK293-Zellen war im Westernblot wie erwartet für keine der Kinasen immunreaktives Material nachweisbar. IPMK-Klon 3 und IP5-2K-Klon 2 wurden für die Messung der Inositolphosphat-Spiegel weiterverwendet und pEGFP-exprimierende Zellen dienten als Kontrolle.



**Abb. 16.: Westernblot zur Analyse der Überexpression von IP5-2K und IPMK in stabilen und transient transfizierten HEK293-Zellen**

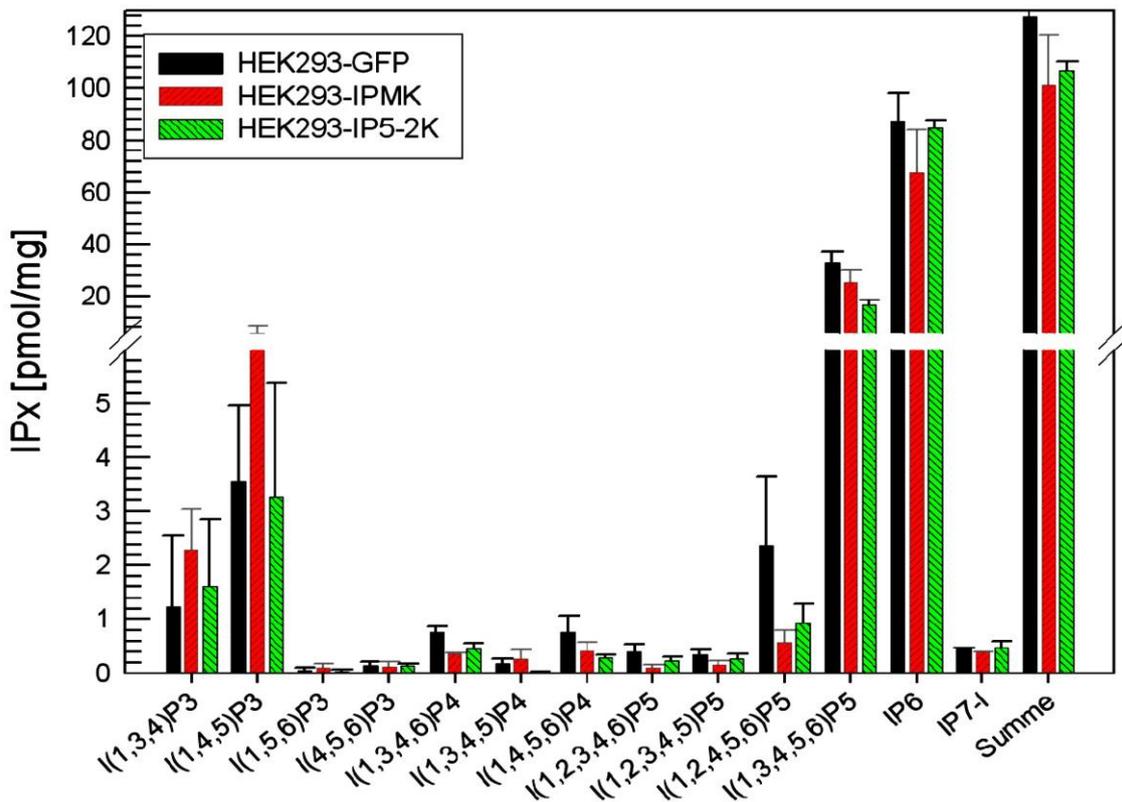
Zellextrakte von untransfizierten, transient und stabil IP5-2K und IPMK überexprimierenden HEK293-Zellen wurden durch SDS-Page aufgetrennt und im Westernblot mit anti GFP-Antikörper analysiert.

Von jedem Klon wurden je vier Ansätze verwendet. Die Untersuchung der aufgearbeiteten Proben wurde von Dr. H. Lin (AG Prof. Dr. G. W. Mayr im Institut für Biochemie, UKE Hamburg) mittels der MDD-HPLC-Analytik durchgeführt.

Die Gesamtmenge der Inositolphosphate war sowohl in HEK293-pEGFP als auch in HEK293-IPMK und HEK293-IP5-2K vergleichbar. Dabei machen den größten Anteil an IPs  $IP(1,3,4,5,6)P_5$  und  $IP_6$  aus. Der geringste Spiegel an IPs ist bei  $IP(1,5,6)P_3$  zu beobachten.

Es stellte sich für  $Ins(1,3,4)P_3$  bei beiden stabil in HEK293 überexprimierenden Kinasen eine Erhöhung der Gesamtmenge gegenüber der HEK293-pEGFP-Kontrolle dar. Für HEK293-IPMK betrug der Mittelwert 2,3pmol/mg des TCA-Pellets bei einer Standardabweichung von  $\pm 0,8$ pmol/mg und für HEK293-IP5-2K 1,6 pmol/mg des TCA-Pellets bei einer Standardabweichung von  $\pm 1,3$ pmol/mg. Eine Erhöhung des Wertes gegenüber der Kontrolle konnte auch bei  $Ins(1,4,5)P_3$  insbesondere in HEK293-IPMK, der bei ca. 6pmol/mg des TCA-Pellets (Mittelwert) ( $\pm 2,4$ pmol/mg) lag, gezeigt werden. Hingegen erniedrigten beide stabil transfizierten Kinasen den Wert für  $Ins(1,2,4,5,6)P_5$  im Vergleich zu den Kontrollzellen. Der Mittelwert betrug für die Kontrollzellen 2,4pmol/mg des TCA-Pellets bei einer Standardabweichung von  $\pm 1,3$ pmol/mg, für HEK293-IPMK 0,6pmol/mg des TCA-Pellets ( $\pm 0,2$ pmol/mg) und für HEK293-IP5-2K 0,9pmol/mg des TCA-Pellets ( $\pm 0,3$ pmol/mg) (Abb. 17).

Die stabile Überexpression von IPMK und IP5-2K führte in HEK293-Zellen mit Ausnahme von  $Ins(1,2,4,5,6)P_5$  zu keiner signifikanten Veränderung der Inositolphosphat-Spiegel.

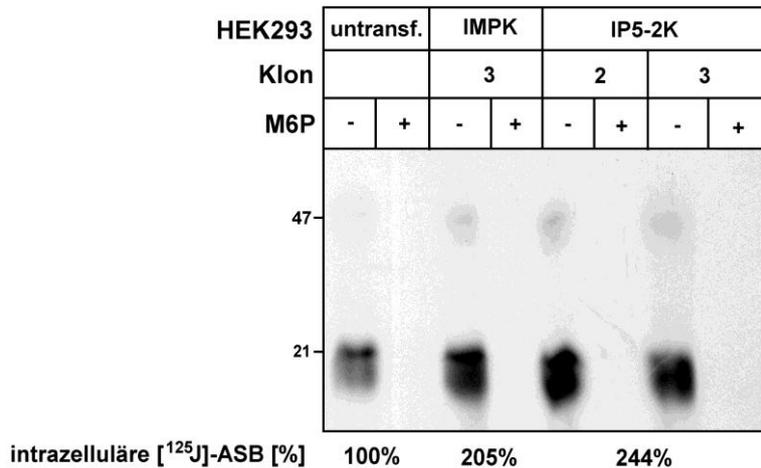


**Abb. 17: IP-Spiegel in [pmol/mg des TCA-Pellets] gemessen in stabil IPMK und IP5-2K transfizierten sowie in transient pEGFP transfizierten HEK293-Zellen**

Die Grafik zeigt die Menge [pmol/mg] verschieden phosphorylierter Inositolphosphate in den stabil IPMK- und IP5-2K-überexprimierenden (roter und grüner Balken) sowie in den pEGFP transient transfizierten HEK293-Zellen als Kontrolle (schwarzer Balken). Die Summe aller gemessenen Inositolphosphate wurde rechts in der Grafik aufgezeigt.

## **4.5 Einfluss der IPMK- und IP5-2K-Expression auf die M6P-abhängige Endocytose von [<sup>125</sup>J]-Arylsulfatase B**

Stabil überexprimierende IPMK- und IP5-2K-HEK293-Zellen wurden für 1 bzw. 5 Std. mit [<sup>125</sup>J]-ASB in An- und Abwesenheit von M6P (10mM) inkubiert und die Radioaktivität in den Zellextrakten bestimmt und danach durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Aufnahme von [<sup>125</sup>J]-ASB war spezifisch und konnte durch einen Überschuss an M6P komplett gehemmt werden (Abb.18).



**Abb. 18: Endocytose von [<sup>125</sup>J]-Arylsulfatase B (ASB) in untransfizierten und IPMK- und IP5-2K-exprimierenden HEK293-Zellen**

Die HEK293-Kontrollzellen, HEK293-IPMK- und HEK293-IP5-2K-Zellen wurden in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von M6P (10mM) mit [<sup>125</sup>J]-ASB (400.000cpm/0.7ml) für 1 Std. bei 37 °C inkubiert. Nach dem Entfernen der an die Plasmamembran gebundenen [<sup>125</sup>J]-ASB wurden die Zellextrakte unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Auswertung der Autoradiogramme erfolgte densitometrisch und ist als Prozent der [<sup>125</sup>J]-ASB der untransfizierten HEK293-Kontrollzellen angegeben. Die 47kDa [<sup>125</sup>J]-ASB-Bande stellt die reife Form (*Mature*) der ASB und die 21kDa-Bande die prozessierte Form [<sup>125</sup>J]-ASB dar.

Die densitometrische Analyse ergab für die Endocytose von 1 Std., dass IPMK (Klon 3) 105% (n=1) und IP5-2K (Klon 2 und 3) durchschnittlich 144% ( $\pm 2,1\%$ ; n=2) mehr [<sup>125</sup>J]-ASB als nicht-transfizierten HEK293-Zellen akkumulierten (siehe Abb. 18).

Bei der fünfstündigen M6P-abhängigen Endocytose von [<sup>125</sup>J]-ASB zeigte die densitometrische Auswertung eine erniedrigte Menge an intrazellulärer [<sup>125</sup>J]-ASB im Vergleich zur akkumulierten Menge nach einstündiger Endocytose. Hier lag die durchschnittliche Menge für [<sup>125</sup>J]-ASB in IPMK überexprimierenden HEK293-Zellen 8% ( $\pm 0,8\%$ ; n=2) und in IP5-2K überexprimierenden Zellen 7% ( $\pm 12\%$ ; n=2) höher als bei den HEK293-Kontrollzellen.

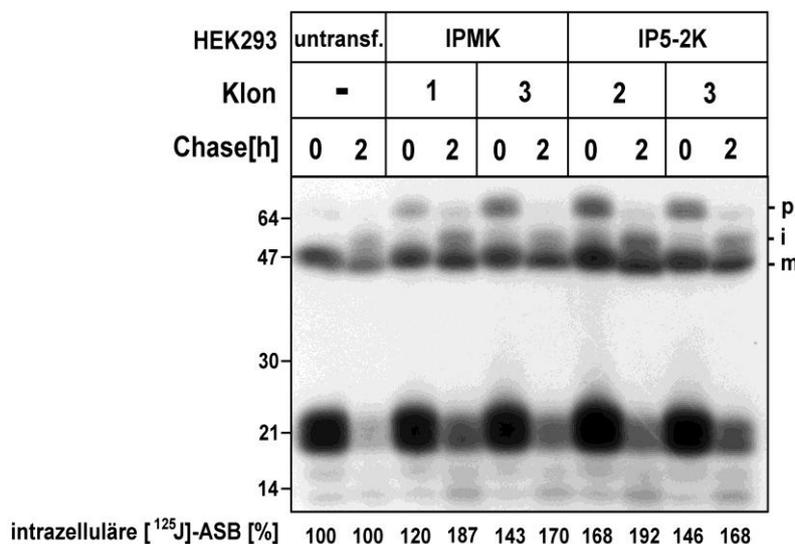
## 4.6 Prozessierung, Abbau und Akkumulation von radioaktiv markierter Arylsulfatase B

### 4.6.1 „Pulse/Chase“ in stabil transfizierten und untransfizierten HEK293-Zellen

Um die Endocytose, die Prozessierung und den Abbau der endocytierten [<sup>125</sup>J]-Arylsulfatase B detaillierter zu untersuchen, wurden nicht-transfizierten und IPMK- und

IP5-2K-exprimierende HEK293-Zellen für 1 Std. mit [<sup>125</sup>J]-ASB inkubiert („Pulse“). Danach wurden die Zellen entweder direkt abgeerntet oder nach Entfernung des radioaktiven Mediums für 2 weitere Stunden in nicht radioaktivem Medium („Chase“) weiter inkubiert. Die intrazelluläre [<sup>125</sup>J]-ASB wurde durch SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie nachgewiesen, densitometrisch ausgewertet und quantifiziert.

Die proArylsulfatase B (64kDa Vorläufer-Protein = p) wird in den Lysosomen in die reife 47kDa-Form der Arylsulfatase B und in ein 18-22kDa-Spaltprodukt prozessiert (Peters, 1990). Endocytose und Transport der ASB zu den Lysosomen ist M6P-Rezeptor abhängig.



**Abb. 19: Prozessierung von [<sup>125</sup>J]-ASB anhand eines „Pulse/Chase“ in HEK293-Kontrollzellen sowie in stabil transfizierten IPMK- und IP5-2K-HEK293-Zellen dargestellt**

Nicht-transfizierte Kontrollzellen, IPMK und IP5-2K stabil exprimierende HEK293-Zellen wurden mit [<sup>125</sup>J]-ASB (400.000cpm/0.7ml) für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Die Zellextrakte wurden entweder sofort (0) oder nach 2stündigem „Chase“ (2) und nach Entfernung der oberflächengebundenen [<sup>125</sup>J]-ASB präpariert und unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Autoradiogramme wurden densitometrisch ausgewertet und die Akkumulation von [<sup>125</sup>J]-ASB als Prozent der nach Endocytose bzw. 2 h „Chase“ in Kontroll- bzw. stabil exprimierenden HEK293-Zellen enthaltenen [<sup>125</sup>J]-ASB angegeben. Die 64kDa [<sup>125</sup>J]-ASB-Bande entspricht dem Vorläuferprotein (*Precursor*), das i steht für die intermediäre Form (*Intermediate*) der [<sup>125</sup>J]-ASB, die eine molare Masse von 54-62kDa besitzt. Die 47kDa [<sup>125</sup>J]-ASB-Bande entspricht der reifen Form (*Mature*) der Arylsulfatase B.

Abbildung 19 zeigt, dass die Gesamtmenge intrazellulärer nachweisbarer [<sup>125</sup>J]-ASB in den stabil IPMK und IP5-2K transfizierten HEK293-Zellen nach der Endocytoseperiode („Pulse“; „Chase“ = 0h) im Vergleich zu den Kontrollzellen um ca. 31% (Mittelwert aus IPMK Klon 1 und 3) bzw. 57% (Mittelwert aus IP5-2K Klon 2 und 3) erhöht war.

Das Muster der [<sup>125</sup>J]-ASB-Fragmente nach einstündiger Endocytosezeit („Chase“ = 0h) unterschied sich geringfügig von dem in Abb. 18 gezeigten Autoradiogramm und spiegelt die Variabilität zwischen den verschiedenen Experimenten wieder und ist zum Teil in unterschiedlicher Dichte der Zellen bzw. Zeit zwischen Ausplattierung und Durchführung des Experiments begründet.

Der Abbau von [<sup>125</sup>J]-ASB betrug in den Kontrollzellen nach 2stündigem „Chase“ 57%, d.h. nach einstündiger Endocytoseperiode waren nur 43% der intrazellulär detektierten [<sup>125</sup>J]-ASB verblieben. In den IPMK-Zellen waren durchschnittlich 41% (Klon 1: 33%, Klon 3: 48%) und in den IP5-2K-Zellen durchschnittlich 50,5% (Klon 2: 51%, Klon 3: 50%) der intrazellulären [<sup>125</sup>J]-ASB abgebaut (Tab. 8).

**Tab. 8: Abbau der [<sup>125</sup>J]-ASB in HEK293-Kontrollzellen und stabil transfizierten IPMK- und IP5-2K-HEK293-Zellen**

Angegeben wurden die densitometrischen Werte für die stabil transfizierten und untransfizierten Zellen vor und nach der 2stündigen Chaseperiode, sowie der jeweilige prozentuale Anteil an [<sup>125</sup>J]-ASB in diesen Zellen.

	HEK293	IPMK (1)	IPMK (3)	IP5-2K (2)	IP5-2K (3)
Chase (0 h)	3821769	4597827	5479130	6435182	5590418
Chase (2 h)	1650171	3079212	2798088	3169385	2772397
ASB in %	43	67	52	49	50

Aus Tabelle 9 lässt sich entnehmen, dass nach einstündiger Endocytose das Vorläufer-Protein (64kDa) in den Kontrollzellen kaum noch detektierbar war. Nach zweistündigem „Chase“ entstand eine intermediäre 54-62kDa-Form, die ca. 18% an der Gesamtmenge nachweisbarer ASB ausmacht. Für die IPMK- und die IP5-2K-exprimierenden Zellen war dagegen nach 1 Std. noch ein signifikanter Anteil an ASB als *Precursor*-Polypeptid sichtbar. Bei der intermediären Form (54-62kDa) hingegen konnte in allen Zellen ein Anstieg des prozentualen Anteils um 12% (im Durchschnitt) nach dem „Chase“ nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil der reifen 47kDa-Form stieg sowohl bei den HEK293-Kontrollzellen, als auch bei den stabil transfizierten HEK293-Zellen nach dem „Chase“ um 14% (im Durchschnitt) an. Nach einstündiger Endocytose sind in den Kontrollzellen 24%, in den IPMK-Zellen 20% (Klon 1) bzw. 18% (Klon 3), d.h. durchschnittlich 19%, und in beiden IP5-2K-Klonen 19% zur reifen 47kDa-Form prozessiert worden. Nach 2stündigem Chase betrug der Anteil der *Mature*-Form in den Kontrollzellen 38%, in den IPMK-Zellen 31% (Klon1) bzw. 33% (Klon 3), d.h. durchschnittlich 32% und in den IP5-2K-Zellen 35% (Klon 2) bzw. 33% (Klon 3), d.h. durchschnittlich 34% (Tab. 9). Das bei der proteolytischen

Reifung entstehende 18-22 kDa ASB-Spaltprodukt ist sehr instabil und wird während der 2stündigen „Chase“-Zeit präferentiell abgebaut.

**Tab. 9: Prozessierung endocytierter [<sup>125</sup>J]-ASB in HEK293-Kontrollzellen und stabil transfizierten IPMK- und IP5-2K-HEK293-Zellen**

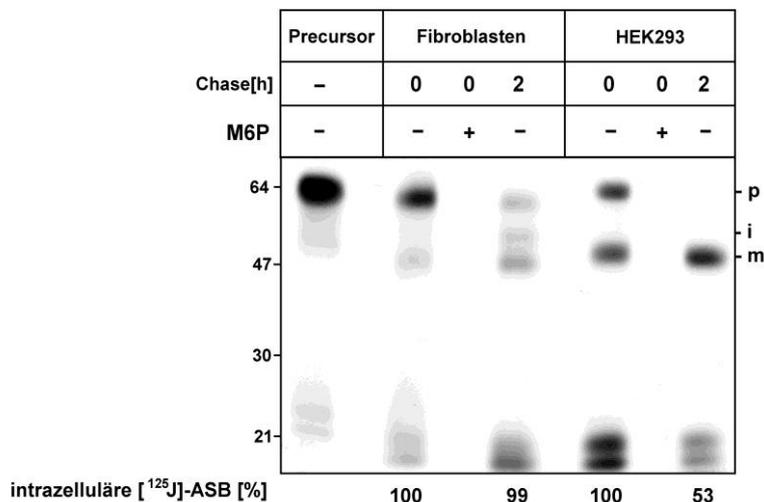
Nach densitometrischer Quantifikation wurden die prozentualen Werte für die Vorläufer-64kDa-Form (*Precursor* = p), die intermediäre 54-62kDa-Form (*Intermediate* = i), die reife 47kDa-Form (*Mature* = m) und zusätzlich das 21kDa Abbauprodukt und deren prozentuale Summe angegeben.

Klon	HEK (-)	HEK (-)	IPMK (1)	IPMK (1)	IPMK (3)	IPMK (3)	IP5-2K (2)	IP5-2K (2)	IP5-2K (3)	IP5-2K (3)
Chase	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2
64 kDa in % (p)	0	0	5	3	9	2	11	3	9	2
(i) in %	0	18	5	16	7	15	7	15	5	14
47 kDa in % (m)	24	38	20	31	18	33	19	35	19	33
21 kDa in %	76	44	70	50	66	50	63	47	67	51
Σ in %	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

#### 4.6.2 Endocytose, Prozessierung und Abbau von Arylsulfatase B in humanen Hautfibroblasten und HEK293-Zellen

Um zu untersuchen, ob Prozessierung, Akkumulation und Abbau von endocytierter Arylsulfatase B in anderen Zelllinien ähnlich wie in HEK293-Zellen ablaufen, wurden humane Hautfibroblasten einem [<sup>125</sup>J]-ASB-Endocytose-„Pulse“/„Chase“-Versuch unterworfen. HEK293-Zellen und Hautfibroblasten eines gesunden Patienten wurden 1 Std. bei 37°C mit [<sup>125</sup>J]-ASB inkubiert, die Zellextrakte entweder sofort („Chase“ = 0) oder nach 2stündigem „Chase“ präpariert und unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Autoradiogramme wurden densitometrisch ausgewertet. Die Spezifität der ASB-Aufnahme wurde durch Zugabe eines Überschusses an M6P (10mM) zu den Zellen belegt, wodurch sich die [<sup>125</sup>J]-ASB-Aufnahme vollständig inhibieren ließ (Abb. 20). Mit dem Experiment konnte nachgewiesen werden, dass die Gesamtmenge endocytierter [<sup>125</sup>J]-ASB in Fibroblasten nach Endocytose nur 60% der aufgenommenen Menge in HEK293-

Zellen entsprach. Nach 2stündigem „Chase“ waren noch 99% der intrazellulären [<sup>125</sup>J]-ASB in den Fibroblasten nachweisbar, während in den HEK293-Zellen nur noch 53% des Ausgangsmaterials sichtbar waren. Das zeigt, dass endocytierte ASB in HEK293-Zellen schneller abgebaut wird als in Fibroblasten. Zusätzlich ist der Abb. 20 zu entnehmen, dass bei der proteolytischen Reifung der [<sup>125</sup>J]-ASB in HEK293-Zellen keine intermediäre Form (54-62kDa) auftrat.



**Abb. 20: Prozessierung, Akkumulation und Abbau von endocytierter [<sup>125</sup>J]-ASB in Fibroblasten und HEK293-Zellen**

Fibroblasten und HEK293-Zellen wurden in Ab- und Anwesenheit von M6P (10mM) mit [<sup>125</sup>J]-ASB (400.000cpm/0,7ml) für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Die Zellextrakte wurden entweder sofort („Chase“ = 0) oder nach 2stündigem „Chase“ und nach Entfernung der oberflächengebundenen [<sup>125</sup>J]-ASB geerntet und unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Autoradiogramme wurden desitometrisch ausgewertet und quantifiziert. Die Akkumulation von [<sup>125</sup>J]-ASB wurde als Prozent der nach Endocytose bzw. 2 Std. „Chase“ in Fibroblasten bzw. HEK293-Zellen enthaltenen [<sup>125</sup>J]-ASB angegeben.

Die Abb. 20 zeigt, dass die Prozessierung von endocytierter [<sup>125</sup>J]-ASB in den HEK293-Zellen im Vergleich zu den Fibroblasten schneller vorstatten ging. Aus Tabelle 10 lässt sich entnehmen, dass nach einstündiger Endocytose („Chase“ = 0) das *Precursor*-Protein (64kDa) in den Kontroll-Fibroblasten 58% der Gesamtmenge ausmachte, wohingegen bei den HEK293-Zellen für das Vorläufer-Protein ein prozentualer Gesamtwert von 20% ermittelt wurde. Die ausgereifte Form (47kDa) der ASB machte nach einstündiger Endocytose („Chase“ = 0) in den Fibroblasten einen prozentualen Anteil von 9% aus, der bei den HEK293-Zellen etwa 19% betrug. Nach 2stündigem „Chase“ verringerte sich die Menge des *Precursors* in den Fibroblasten erwartungsgemäß auf 14% und in den HEK293-Zellen war der *Precursor* kaum noch nachweisbar. Der prozentuale Anteil der *Mature*-Form nahm bei beiden Zelllinien zu.

Bei den Fibroblasten betrug er nach 2 Std. „Chase“ 17% und bei den HEK293-Zellen lag er bei 45% (siehe Tab. 10).

**Tab. 10: Prozessierung endocytierter [<sup>125</sup>J]-ASB in Kontroll-Fibroblasten und HEK293-Kontrollzellen**

Nach densitometrischer Quantifikation wurden die prozentualen Werte für die Vorläufer-64kDa-Form (*Precursor* = p), die intermediäre 54-62kDa-Form (*Intermediate* = i), die reife 47kDa-Form (*Mature* = m) und zusätzlich das 21kDa Abbauprodukt und deren prozentuale Summe angegeben.

	Fibroblasten	Fibroblasten	HEK293	HEK 293
Chase	0	2	0	2
64 kDa in % (p)	58	14	20	2
(i) in %	6	11	0	0
47 kDa in % (m)	9	17	19	45
21 kDa in %	27	58	61	53
Σ in %	100	100	100	100

## **5. Diskussion**

### **5.1 Direkte Interaktion zwischen TPIP $\beta$ und CLN6 *in vitro***

Die Funktion des ER-residenten CLN6-Proteins ist unklar. Eine Möglichkeit der Funktion des CLN6 näher zu kommen, ist die Identifizierung von anderen Proteinen, die mit CLN6 in Wechselwirkung treten können. Bei Transmembran-Proteinen kommen für diese möglichen Wechselwirkungen entweder luminaire oder zytoplasmatische Domäne(n) in Frage. CLN6 enthält eine N-terminale Domäne, die aus 49 Aminosäuren besteht und dem Zytoplasma zugewandt ist. Die C-terminale Domäne aus 26 Aminosäuren, ist dem Lumen des Endoplasmatischen Reticulums zugewandt (Heine *et al.*, 2007). Diese zwei Domänen bieten sich aufgrund ihrer Länge als Bereiche für Protein-Protein-Wechselwirkungen an.

In Vorarbeiten von Dr. Quitsch (Kinderklinik, Abteilung Biochemie, UKE Hamburg) wurde mittels Co-Immunpräzipitation unter Benutzung eines die N-terminalen 49 Aminosäuren von CLN6 enthaltenen Fusionsproteins die Spleißvariante  $\beta$  der TPTE und PTEN homologen Inositollipidphosphatase (TPIP $\beta$ ) als potentieller zytosolischer Interaktionspartner identifiziert. TPIP kommt in mehreren unterschiedlichen Spleißvarianten vor, wobei nur zwei davon, nämlich TPIP $\alpha$  und TPIP $\beta$ , die aus 445 bzw. 326 Aminosäuren bestehen, funktionell von Bedeutung sind (Walker *et al.*, 2001). TPIP ist eine Phosphoinositol-3-phosphatase, die Phosphatidylinositol-3,4,5-Phosphat (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) als Substrat benutzen kann und an der Synthese von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> beteiligt ist (Walker *et al.*, 2001), das wiederum an der Adaptorprotein-2 (AP-2)-vermittelten Endocytose mitwirkt. TPIP $\beta$  enthält neben der Phosphatase eine im Vergleich zum TPIP $\alpha$  verkürzte C2-Domäne und keine Transmembrandomäne (2.4; Abb. 4) (Walker *et al.*, 2001). *In vitro* konnte eine Phosphatase-Aktivität bei TPIP $\alpha$ , jedoch nicht bei TPIP $\beta$  nachgewiesen werden (Walker *et al.*, 2001). Aus unveröffentlichten Daten zur Lokalisation mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnte entnommen werden, dass TPIP $\beta$  nach Überexpression in HEK293-Zellen im Zytoplasma lokalisiert ist. In doppelt transfizierten HEK293-Zellen induzierte die Expression von CLN6 eine Umverteilung von TPIP $\beta$  an die Membranen des Endoplasmatischen Reticulums.

Das Ziel dieser Doktorarbeit lag in der Verifizierung und Charakterisierung der Interaktion zwischen TPIP $\beta$  und CLN6 mit Hilfe von *Overlay*- und *Pulldown*-Experimenten (4.1). Nach erfolgreicher Klonierung der kodierenden Sequenz von TPIP $\beta$  in den bakteriellen Expressionsvektor pQE-32 für einen *Overlay*-Assay, wurde die Expression und Aufreinigung des TPIP $\beta$ -(His)<sub>6</sub>-Fusionsproteins und des Fusionproteins aus den N-terminalen 49 Aminosäuren von CLN6 und GST (CLN6<sub>49N</sub>-GST) durchgeführt. Im Coomassie<sup>®</sup> Blue gefärbten Gel konnte gezeigt werden, dass das CLN6<sub>49N</sub>-GST-Fusionsprotein mit Erfolg aufgereinigt werden konnte, während das TPIP $\beta$ -(His)<sub>6</sub>-Fusionsprotein nicht nachweisbar war. Westernblot-Untersuchungen belegten dann, dass das TPIP $\beta$  nicht unter Standardbedingungen aus den *E. coli*-Zellen solubilisierbar war, was auf einen Einschluss des Proteins in bakterielle „inclusion bodies“ hindeutete (4.1.2). Es wurden keine weiteren Versuche zur Solubilisierung des TPIP $\beta$  aus den „inclusion bodies“ vorgenommen, sondern ein alternativer experimenteller Ansatz im Sinne eines *Pulldown*-Experiments gewählt (4.1.3). Für den *Pulldown*-Assay wurden an Ni-NTA Agarose gebundenes CLN6-(His)<sub>6</sub>-Fusionsprotein und aufgereinigtes TPIP $\beta$ -GST-Fusionsprotein bzw. GST als Negativkontrolle inkubiert. Auch mit diesem experimentellen Ansatz konnte eine direkte Interaktion von TPIP $\beta$  mit CLN6 nicht bestätigt werden. Westernblot-Analysen zeigten, dass keine spezifische Bindung zwischen CLN6 und TPIP $\beta$  stattfand, weil auch GST an CLN6-(His)<sub>6</sub> mit ähnlicher Intensität gebunden wurde (4.1.5).

Die hier dargelegten Versuche, die Interaktion der N-terminalen Domäne von CLN6 mit TPIP $\beta$  zu belegen, müssen als vorläufig und unvollständig angesehen werden. So sollten in weiterführenden Arbeiten Bedingungen getestet werden, um das TPIP $\beta$ -(His)<sub>6</sub>-Fusionsprotein aus den „inclusion bodies“ der exprimierenden *E. coli*-Zellen effektiv zu solubilisieren und *Overlay*-Versuche ausführen zu können. Zum anderen sollten auch die Bedingungen des *Pulldown*-Experiments optimiert werden. So wäre es sinnvoller, nur die N-terminale CLN6-Domäne anstatt des gesamten CLN6-Proteins einzusetzen, da möglicherweise aufgrund der 6 hydrophoben Transmembrandomänen im detergenzhaltigen Puffer, die hydrophoben Epitope, die für spezifische Protein-Protein-Wechselwirkung notwendig sind, nicht zugänglich sind. Zusätzlich können Absättigungsschritte der Agarose-Matrix mit BSA oder Waschschrte mit unterschiedlichen Salzen und/oder Detergenzkonzentrationen erfolgen, die die unspezifische Bindung z.B. mit GST minimieren. Alternativ sind andere Verfahren zum Nachweis von Interaktionen zwischen CLN6 und TPIP $\beta$  zu

diskutieren. Dazu zählen mikroskopische Verfahren wie Fluorescence resonance energy transfer (FRET), bei dem direkt durch Auslöschung von Fluoreszenzsignalen co-exprimierter CLN6 und TPIP $\beta$ -Fusionsproteine z.B. pEGFP bzw. Cherry-red, die Interaktion in der Zelle nachweisbar ist. Ein weiteres Verfahren, das die Interaktion von TPIP $\beta$  mit CLN6 untermauern könnte, wäre das Two-Hybrid System in Hefen.

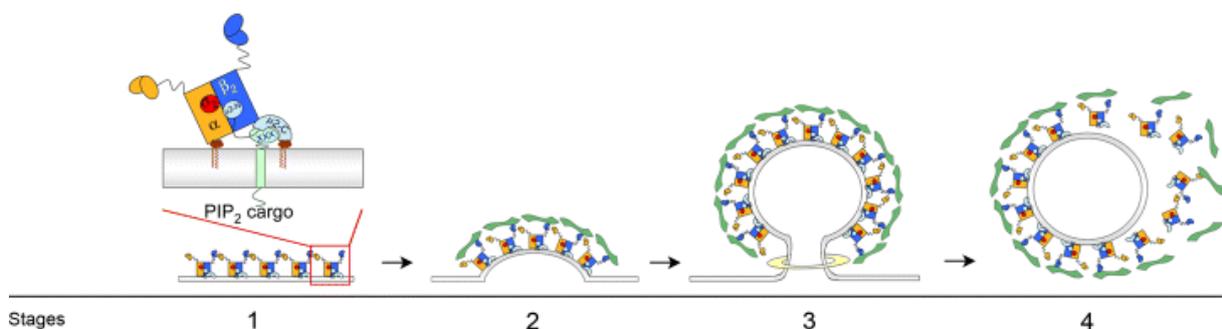
## **5.2 Einfluss von TPIP $\alpha$ und TPIP $\beta$ auf den AP-2-abhängigen Transport von Rezeptoren**

TPIP ist eine TPTE (transmembrane phosphatase with tensin homology) und PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) homologe Phosphoinositol-3-phosphatase, die an der Synthese von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> beteiligt ist (Walker *et al.*, 2001). PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> kann direkt an das zytosolische Adaptorprotein-2 (AP-2) binden, das für die Endocytose von Cargo-Rezeptoren der Plasmamembran wichtig ist. In der vorgelegten Doktorarbeit sollte der Einfluss einer TPIP $\alpha$ - und TPIP $\beta$ -Überexpression auf den AP-2-abhängigen Transport von Rezeptoren untersucht werden.

Aus Vorarbeiten von Dr. Quitsch und Dr. Heine (Kinderklinik, Abteilung Biochemie, UKE Hamburg) konnte entnommen werden, dass der mRNA-Spiegel von AP-2 im Cortex von 4 Wochen alten CLN6-defizienten Mäusen (*nc1f*-Mäusen) stark erniedrigt war.

AP-2 ist eines von vier heterotetrameren Adaptorkomplexen: AP-1 (Ahle *et al.*, 1988), AP-2 (Ahle und Ungewickell, 1989), AP-3 (Dell'Angelica *et al.*, 1997; Panek *et al.*, 1997; Simpson *et al.*, 1997) und AP-4 (Dell'Angelica *et al.*, 1999; Hirst *et al.*, 1999). Alle heterotetrameren AP-Komplexe bestehen aus zwei großen Untereinheiten ( $\beta$ 1-4 und  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  oder  $\epsilon$ ; 100-120kDa), einer mittleren Untereinheit ( $\mu$ 1-4; ~ 50kDa) und einer kleinen Untereinheit ( $\sigma$ 1-4; 15-20kDa). Die AP-Komplexe sind an der Sortierung von Transmembranproteinen in der Zelle beteiligt und spielen eine zentrale Rolle bei der Bildung von „Clathrin coated vesicles“ (CcV) (2.2.2). AP-2 ist ausschließlich an der Clathrin-vermittelten Endocytose von Cargo-Rezeptoren von der Plasmamembran zum Endosomen beteiligt, während AP-1, AP-3 und AP-4 verschiedene, z.T. noch nicht belegte, Sortierfunktionen am *trans*-Golgi-Netzwerk (tGN) und/oder den Endosomen haben (Hirst & Robinson, 1998). Die Clathrin-abhängige Endocytose ist ein ubiquitär vorkommender Prozess, der in allen Zelltypen

stattfindet und Möglichkeiten zur Internalisierung von z.B. extrazellulären Hormonen und Signalfaktoren bietet (Jung & Haucke, 2007). Die effiziente Internalisierung einer Vielzahl von Transmembranrezeptoren, die in der Plasmamembran lokalisiert sind, benötigt zunächst die Konzentrierung in „Clathrin coated Pits“ (CcP) durch Interaktion zwischen Membrankomponenten, Rezeptorprotein, Adaptorprotein und Clathrin (Wendland, 2002). Es wird vermutet, dass Clathrin zur Verformung der Plasmamembran benötigt wird, um letztendlich ein Vesikel abzuschneiden (Abb. 21). AP-2 besitzt Eigenschaften, die auf eine Selektion von Membrankomponenten, die an der Vesikelbildung beteiligt sind, hindeuten. AP-2 kann durch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) gleichzeitig an Sortierungsmotive in den zytoplasmatischen Domänen von Cargo-Membranrezeptoren sowie an Clathrin und andere zytosolische Komponenten der Endocytose-Maschinerie binden (Wendland, 2002). Phosphatidylinositolphosphate (PIs) sind wichtige Regulatoren des intrazellulären Transports und der Zellsignalvermittlung. Während des Adaptor-vermittelten Transports bilden Phosphatidylinositolphosphate einen Teil des zellulären Detektionsystems, das für die Selektion intrazellulärer Transportwege notwendig ist (Krauss & Haucke, 2007).



**Abb. 21: Clathrin-vermittelte Endocytose am Beispiel einer synaptischen Membran**

Die Clathrin-vermittelte Endocytose wird durch Rekrutierung von AP-2 und möglicherweise anderer heterotetramerer Adaptorkomplexe mit Hilfe von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat initiiert (stage 1). Die Montage des Clathrin-Gitters und die Membranwölbung (stage 2) bereiten entstehende Vesikel auf die bevorstehende Dynamin-vermittelte Invagination vor (stage 3). Anschließend kommt es zur Entfernung des Clathrin-Mantels (uncoating) (stage 4). Schließlich werden die endocytotischen Vesikel stromabwärts zu den Endosomen befördert (Jung & Haucke, 2007).

Da die Endocytose von Cargo-Rezeptoren Adaptorkomplex- bzw. AP-2-abhängig ist, liegt es nahe, dass die Konsequenz eines erniedrigten mRNA- und Protein-Spiegels von AP-2 in einer verminderten Endocytoserate in CLN6-defizienten Zellen liegen würde. Ziel der vorgelegten Untersuchungen war es, den Einfluss einer

Überexpression von TPIP $\alpha$  und TPIP $\beta$  auf die zellulären Spiegel von AP-2 und CLN6 und somit auch auf die Endocytose zu charakterisieren und zu verifizieren.

Um den Einfluss von TPIP $\alpha$  und TPIP $\beta$  auf die Expression des endogenen CLN6 und des Adaptorproteins AP-2 zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen transient mit TPIP $\alpha$ -pEGFP bzw. TPIP $\beta$ -pEGFP transfiziert. Als Kontrollen dienten untransfizierte HEK293-Zellen. Westernblot-Analysen zeigten, dass TPIP $\alpha$  und TPIP $\beta$  als 65kDa- und 62kDa-Fusionsproteine exprimiert wurden (4.2; Abb. 14). In den untransfizierten HEK293-Zellen war erwartungsgemäß kein Signal sichtbar. Endogenes CLN6 ließ sich als ca. 28kDa Polypeptid detektieren, während die  $\alpha$ -Untereinheit von AP-2 die molare Masse von 83kDa aufwies (4.2; Abb. 14). Da die Defizienz einer Adaptoruntereinheit den Abbau der anderen 3 Untereinheiten induziert (Dell'Angelica *et al.*, 1999), stellt der Nachweis einer Adaptor-spezifischen Untereinheit ein Maß für die Expression des gesamten AP-Komplexes dar. Die endogene Menge von CLN6 und AP-2 wurde durch die Überexpression von TPIP $\alpha$  und TPIP $\beta$  nicht beeinflusst. Bisher ist auch in der Literatur keine transkriptionelle Regulation von Adaptorproteinen durch veränderte PtdIns-Phosphat-Spiegel beschrieben worden.

Um die funktionelle Konsequenz eventuell veränderter PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Spiegel zu bestimmen, wurde der Einfluss von TPIP $\alpha$  und TPIP $\beta$  auf die Mannose-6-Phosphat(M6P)-Rezeptor-abhängige Endocytose von [<sup>125</sup>J]-Arylsulfatase B (ASB) untersucht. Hierzu wurden TPIP $\alpha$ -pEGFP und TPIP $\beta$ -pEGFP in HEK293-Zellen exprimiert und mit [<sup>125</sup>J]-Arylsulfatase B inkubiert. In Anwesenheit eines molaren Überschusses an M6P (10mM) war die Endocytose des Liganden komplett hemmbar, was die Spezifität des Endocytoseprozesses belegt. Nach dem Entfernen der an die Plasmamembran gebundenen [<sup>125</sup>J]-ASB wurde die Aufnahme des Liganden durch die Bestimmung der intrazellulären Radioaktivität, durch SDS-PAGE und mittels Densitometrie quantifiziert. Weder durch die Überexpression von TPIP $\alpha$  noch von TPIP $\beta$  konnte die M6P-Rezeptor-abhängige Endocytose eines lysosomalen Enzyms signifikant im Vergleich zu den HEK293-Kontrollzellen erhöht werden (4.3; Abb. 15).

Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen zur Endocytose von [<sup>125</sup>J]-ASB wird der M6P-Rezeptor-abhängige Transport des Liganden von der Plasmamembran bis zum Lysosom erfasst, was sich an der proteolytischen Reifung der ASB, die nur im lysosomalen Kompartiment stattfindet, ablesen lässt (4.3., Abb. 15). Der PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-abhängige Prozess der Endocytose betrifft aber nur stage 1 (Abb. 21),

d.h. die Bildung von „Clathrin coated Pits“ und den Einschluss von Cargo-Rezeptoren. Daher müssten weiterführende Untersuchungen, kürzere Endocytoseperioden von 1-2 Min. in Abhängigkeit von TPIP $\alpha$  und/oder TPIP $\beta$  erfassen. □ Dazu ist jedoch ein sensitiveres Detektionssystem als die [<sup>125</sup>J]-ASB-markierte Ligand-Aufnahme notwendig. So stellt die Aufnahme von Fluoreszenzmarkierten CD4-Antikörpern für 5 Min. in CD4-Rezeptorchimerkonstrukt-exprimierenden Zellen, mit anschließender konfokaler Fluoreszenzmikroskopie und Quantifizierung von markierten Vesikeln ein sensitiveres System dar (Steenhuis *et al.*, 2010).

### **5.3 Phosphatidylinositolphosphate und Endocytose**

Wie Defekte im ER-residenten CLN6-Protein zu lysosomalen Dysfunktionen führen ist unbekannt. Es wurde jedoch berichtet, dass in CLN6-defizienten Fibroblasten verschiedener Herkunft (Fibroblasten aus Mensch, Schaf und Maus) die Endocytose Mannose-6-Phosphat-haltiger lysosomaler Enzyme verändert ist (Heine *et al.*, 2004). Ähnliche Befunde liegen für CLN1- und CLN3-defekte Zellen (Uusi-Rauva *et al.*, 2008) sowie von Hefezellen, denen das CLN3 homologe btn1 fehlt, vor (Codlin *et al.*, 2008).

Die Rezeptor-vermittelte Endocytose von Liganden und ihr Transport zum Lysosomen ist ein komplexer Prozess, der sowohl durch Proteine der vesikulären Transportmaschinerie, als auch durch das Zytoskelett und durch die Lipidzusammensetzung der Membran verschiedener Organellen entlang des Endocytoseweges bestimmt wird (2.2.2). Phosphoinositole (PtdIns) spielen dabei eine wichtige Rolle. So dient PtdIns(3)P in frühen Endosomen als Erkennungsmarker für die Bindung der GTPase Rab5, die für die Rekrutierung der PtdIns-3-P-Kinase verantwortlich ist und die PtdIns(5,4)-Phosphatase stimuliert (Shin *et al.*, 2005). PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> dagegen ist an der Plasmamembran der meisten Zellen, einschließlich von Neuronen, lokalisiert. An Synapsen werden außerdem verschiedene Schritte im Cycling der synaptischen Vesikel durch PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> beeinflusst. PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> spielt darüber hinaus eine aktive Rolle bei der Konformationsänderung des heterotetrameren AP-2-Komplexes, der für die Interaktion mit Sortierungssignalen von Transmembranproteinen notwendig ist (Höning *et al.*, 2005). Die Bildung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> wiederum wird durch einen positiven Feedback-Mechanismus direkt durch die AP-2-vermittelte Interaktion mit der PtdIns(4)P-Kinase reguliert (Krauss *et*

*al.*, 2006). Diese wenigen Beispiele belegen bereits die komplexe Regulation der Sortierungs-, Membranabschnürungs- und Fusionsprozesse zwischen Plasmamembran und Endosomen.

Andererseits kommt den  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  eine zentrale Funktion bei der Signaltransduktion zu. Durch Rezeptor-vermittelte Aktivierung wird  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  von einer Phosphoinositol-spezifischen Phospholipase C hydrolysiert unter Bildung der second messenger  $\text{InsP}_3$  ( $\text{IP}_3$ ) (myo-Inositol(1,4,5)triphosphat) und Diacylglycerol (DAG) (Diaz Anel, 2007).  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  kann dann weiter phosphoryliert werden zu  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  oder dephosphoryliert zu  $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ .  $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$  kann ebenfalls durch eine 5-Phosphatase zu  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  dephosphoryliert und anschließend zu  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$  durch eine  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ -5/6-Kinase phosphoryliert werden. Unter Mitwirkung von Ins-5- und Ins-2-Kinase ( $\text{IP}_5$ -2-Kinase) können in der Zelle  $\text{Ins}(1,2,3,4,5,6)\text{P}_6$  (Inositolhexakisphosphate) gebildet werden. In Säugerzellen können mehrere dieser Schritte durch ein Schlüsselenzym, der Inositolphosphatmultikinase (IPMK) katalysiert werden (Verbsky *et al.*, 2005).

$\text{InsP}_6$  ist reichhaltig in Zellen nachweisbar (15-100 $\mu\text{M}$ ) und es wird angenommen, dass es an verschiedenen biologischen Prozessen, wie der Metallionenchelatierung während der DNA-Reparatur, Aktivierung spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, Exocytose oder an der Rezeptor-Endocytose und Rezeptor-Signaltransduktion beteiligt ist (Larsson *et al.*, 1997; Hoy & Berggren, 2003). Dabei bindet  $\text{InsP}_6$  mit hoher Affinität an AP-2-Komplexe, inhibiert die Zusammensetzung der Clathrinhülle und blockiert die Arrestin-Bindung an Rezeptoren und Ionen-Kanälen (Hoy *et al.*, 2002; Gaidarov & Chen, 1996; Milano & Kim, 2006).

Die Analyse vom Hirngewebe von *nclf*-Mäusen mit defektem CLN6 ergab starke Veränderungen in den Inositolphosphat-Spiegeln, wobei  $\text{InsP}_6$  besonders stark erhöht war. Es gibt keine weiteren vergleichbaren Analysen an anderen Modellen neurodegenerativer Erkrankungen bzw. NCL-Modellen.

Daraus leiteten sich in der vorgelegten Doktorarbeit die Versuche ab, die Inositolphosphat-Spiegel durch stabile Überexpression von Schlüsselenzymen, wie IPMK (Inositolphosphatmultikinase) und  $\text{IP}_5$ -2K (Inositolphosphat5-2Kinase), experimentell zu verändern. Hierfür standen bereits stabile IPMK- und  $\text{IP}_5$ -2K-überexprimierende HEK293-Zellen zur Verfügung, wobei die Überexpression dieser Enzyme durch Westernblot hier in dieser Arbeit verifiziert wurde. Die  $\text{InsP}$ -Spiegelmessung ergab für  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  bei beiden stabil in HEK293

überexprimierenden Kinasen eine Verdopplung der Gesamtmenge gegenüber der HEK293-pEGFP-Kontrolle. Eine Erhöhung des Wertes gegenüber der Kontrolle konnte auch bei Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> insbesondere in HEK293-IPMK gezeigt werden. Hingegen erniedrigten beide stabil transfizierten Kinasen den Wert für Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> im Vergleich zu den Kontrollzellen um ca. 75% (4.4; Abb. 17). Die stabile Überexpression von IPMK und IP5-2K führte in HEK293-Zellen mit Ausnahme von Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> zu keiner signifikanten Veränderung der Inositolphosphat-Spiegel. In diesen Zellen war die Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-vermittelte Endocytose von [<sup>125</sup>J]-ASB aber nur marginal auf 105-131% bzw. 144-157% von nicht-transfizierten Kontrollzellen erhöht. Weiterführende Arbeiten konnten ausschließen, dass unterschiedliche Abbauraten des [<sup>125</sup>J]-ASB-Liganden die marginalen Unterschiede in der Endocytose des Liganden überdecken.

Die Auswertung der proteolytischen Reifung des endocytierten 64kDa-Vorläuferproteins [<sup>125</sup>J]-ASB in die lysosomale 47kDa-Form und in 18-22kDa-Spaltprodukte (Peters *et al.*, 1990) ergab, dass in IPMK- und IP5-2K-überexprimierenden Zellen die Proteolyse der 64kDa-Vorläufer-ASB langsamer als in Kontrollzellen verläuft. Die entstehenden 18-22kDa-ASB-Polypeptide sind in den Zelllinien instabil und werden schnell abgebaut. Weiterführende Studien sollten klären, dass die verzögerte Reifung des 64kDa-Vorläuferproteins auf eine verzögerte Transportkinetik in IPMK und IP5-2K überexprimierenden Zellen zurückzuführen ist. Möglicherweise ist die Sortierung der M6P-Rezeptor-ASB-Komplexe in Endosomen durch die veränderten Inositolphosphatspiegel verändert, was sekundär die proteolytische Aktivierung in Lysosomen beeinflusst.

## 6. Zusammenfassung

Die Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen (NCL) stellen die größte Gruppe autosomal rezessiv vererbter, neurodegenerativer Erkrankungen im Kindesalter dar. Die NCLs lassen sich genetisch und klinisch in 8 Formen (CLN1-3, CLN5-8 und CLN10) einteilen und zählen zu den lysosomalen Speichererkrankungen. Der zugrunde liegende Pathomechanismus der Neurodegeneration ist weitgehend unbekannt. Defekte im CLN6-Gen, das für ein ER-ständiges polytopes Transmembranprotein unbekannter Funktion kodiert, führen spezifisch zum Untergang der neuronalen Zellen und somit zur Manifestation der spätinfantilen varianten Form der NCL.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von *Overlay*- und *Pulldown*-Experimenten versucht die direkte Interaktion von CLN6 mit bereits in Vorarbeiten identifizierten potentiellen Interaktionspartnern, wie der Phosphatidylinositolphosphatase TPIP $\beta$ , mittels verschiedener biochemischer und zellbiologischer Methoden zu bestätigen.

Außerdem sollte der Einfluss einer TPIP $\alpha$ - und TPIP $\beta$ -Überexpression auf die Expression des endogenen CLN6 und des Adaptorproteins AP-2 sowie der Einfluss von TPIP $\alpha$  und TPIP $\beta$  auf die Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-abhängige Endocytose des lysosomalen Enzyms [ $^{125}$ J]-Arylsulfatase B untersucht werden.

In Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass im Gehirn von *nclf*-Mäusen die Spiegel verschiedener Inositolphosphate erhöht auftraten. Deshalb sollte in den folgenden Experimenten versucht werden die Inositolphosphat-Spiegel in HEK293-Zellen durch stabile Überexpression von verschiedenen Inositolphosphat-Kinasen (Inositolphosphatmultikinase [IPMK] und Inositolphosphat5-2Kinase [IP5-2K]) gezielt zu verändern und den Einfluss des defekten CLN6 auf die M6P-abhängige Endocytose zu verifizieren.

Um die Endocytose, die Prozessierung und den Abbau der endocytierten [ $^{125}$ J]-Arylsulfatase B detaillierter zu untersuchen, wurden „Pulse“/„Chase“-Experimente durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass

- nach erfolgreicher Klonierung der kodierenden Sequenz von TPIP $\beta$  in den bakteriellen Expressionsvektor pQE-32 für einen *Overlay*-Assay das CLN6<sub>49N</sub>-GST-Fusionsprotein mit Erfolg aufgereinigt werden konnte, während das TPIP $\beta$ -(His)<sub>6</sub>-Fusionsprotein nicht nachweisbar war. Westernblot-

Untersuchungen belegten dann, dass das TPIP $\beta$  nicht unter Standardbedingungen aus den *E. coli*-Zellen solubilisierbar war, was auf einen Einschluss des Proteins in bakterielle „inclusion bodies“ hindeutete.

- *Pulldown*-Experimente keine spezifische Bindung zwischen CLN6-(His)<sub>6</sub> und TPIP $\beta$ -GST ergaben, weil auch GST an CLN6-(His)<sub>6</sub> mit ähnlicher Intensität gebunden wurde.
- die endogene Menge von CLN6 und AP-2 durch die Überexpression von TPIP $\alpha$  und TPIP $\beta$  nicht beeinflusst wurde.
- die M6P-Rezeptor-abhängige Endocytose eines lysosomalen Enzyms weder durch die Überexpression von TPIP $\alpha$  noch von TPIP $\beta$  signifikant im Vergleich zu den HEK293-Kontrollzellen erhöht werden konnte.
- die stabile Überexpression von IPMK (Inositolphosphatmultikinase) und IP5-2K (Inositolphosphat5-2Kinase) in HEK293-Zellen mit Ausnahme von Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> und Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> zu keiner signifikanten Veränderung der Inositolphosphat-Spiegel führte.
- in IPMK und IP5-2K überexprimierenden Zellen die veränderten Inositolphosphat-Spiegel nur zu einer marginal erhöhten M6P-abhängigen Endocytose von [<sup>125</sup>J]-ASB führten.
- in IPMK und IP5-2K überexprimierenden Zellen die proteolytische Aktivierung der endocytierten, inaktiven 64kDa-Vorläufer-ASB in den Lysosomen verzögert war.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene experimentelle Ansätze benutzt, um die direkte Interaktion der N-terminalen, cytoplasmatischen Domäne des CLN6 Membranproteins mit einer Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Phosphatase zu verifizieren und ihre mögliche funktionelle Bedeutung zu belegen. Die Ergebnisse deuten an, dass die veränderten Inositolphosphat-Spiegel als Phosphatidylinositolphosphat-Spiegel lysosomale Funktionen, z.B. über veränderte intrazelluläre Transportraten, beeinflussen können.

## 7. Abkürzungen

Neben den hier aufgeführten Abkürzungen wurden die gängigen chemischen Formeln und SI-Einheiten verwendet. Alle englischen und lateinischen Abkürzungen und Wörter, deren Übersetzung nicht gebräuchlich ist, sind in Anführungszeichen bzw. kursiv aufgeführt.

**Tab. 11: Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
ASB	Arylsulfatase B
AP	<u>A</u> daptorprotein
APS	<u>A</u> mmoniumperoxodisulfat
ATP	<u>A</u> denosintri <sup>ph</sup> osphat
bp	<u>B</u> asenpaare
BSA	" <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin"
CcP	"Clathrin coated Pits"
Ccv	"Clathrin coated vesicles"
CLN	<u>N</u> euronale <u>C</u> eroid <u>L</u> ipofuszinose
cpm	"counts per minute"
DMEM	" <u>D</u> ulbeccos <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium"
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> uclein <u>a</u> cid
c	<u>c</u> omplementary
ds	<u>d</u> oppelsträngige
DTT	1,4- <u>D</u> ithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	" <u>e</u> nhanced <u>c</u> hemiluminescence"
EDTA	<u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etra <u>a</u> ccetat
EEA1	" <u>e</u> arly <u>e</u> ndosomal <u>a</u> ntigen"
EGF	" <u>e</u> pidermal <u>g</u> rowth <u>f</u> actor"
ER	<u>E</u> ndoplasmatisches <u>R</u> eticulum
ERGIC	<u>E</u> ndoplasmatisches <u>R</u> eticulum- <u>G</u> olgi- <u>I</u> ntermediär- <u>k</u> ompartiment
FKS	<u>F</u> ötale <u>K</u> älberserum
GST	<u>G</u> lutathion- <u>S</u> - <u>T</u> ransferase
HEK	" <u>H</u> uman <u>E</u> mbyronic <u>K</u> idney"
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	doppelt destilliertes Wasser
IC	<u>I</u> nhibitor <u>c</u> ocktail
IP oder InsP	<u>I</u> nositol <u>ph</u> osphat
IPMK	<u>I</u> nositol <u>ph</u> osphat <u>m</u> ulti <u>k</u> inase
IP(5-2)Kinase	<u>I</u> nositol <u>ph</u> osphat(5-2)- <u>K</u> inase
IPTG	<u>I</u> sopropyl $\beta$ -D- <u>T</u> hiogalactopyranosid

kB	<u>K</u> ilobasenpaare
kDa	<u>K</u> ilo <u>D</u> alton
LAMP	<i>Lysosomal-associated membrane protein</i>
LIMP	<i>Lysosomal-integrated membrane protein</i>
Min.	Minuten
MOPS	4- <u>M</u> orpholinopropansulfonsäure
M6P	<u>M</u> annose- <u>6</u> - <u>P</u> hosphat
M6PR	<u>M</u> annose- <u>6</u> - <u>P</u> hosphat- <u>R</u> ezeptor
NCL / <i>nclf</i>	<u>N</u> euronale <u>C</u> eroid <u>L</u> ipofuszinosen
Ni-NTA	<u>N</u> ickel- <u>N</u> itrioltriessigsäure
NLS	<u>N</u> ucleuslokalisierungss <u>s</u> ignal
NP-40	<u>N</u> onidet <u>P</u> 40
OD	<u>O</u> ptische <u>D</u> icht
PAGE	<u>P</u> olyacrylamid- <u>G</u> eleelektrophorese
PBS	"phosphate- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline"
PCR	"polymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction"
PKB	<u>P</u> rotein <u>k</u> inase <u>B</u>
PLC	<u>P</u> hospho <u>l</u> ipase <u>C</u>
PtdIns	Phosphatidylinositolphosphat
PTEN	"phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10"
RIPA	"modified <u>r</u> adioimmunoprecipitation"
rpm	" <u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute"
SDS	" <u>s</u> odium <u>D</u> edecyl <u>s</u> ulphate"
Sek.	Sekunden
SNARE	" <u>s</u> oluble <u>N</u> -ethylmaleimide-sensitive fusion <u>a</u> ttachment protein <u>r</u> eceptor"
Std.	Stunde(n)
STE	Natrium/Tris/EDTA ("Sodium/Tris/EDTA")
Tab.	Tabelle
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>E</u> DTA
<i>Taq</i>	<i><u>T</u>hermophilus <u>a</u>quaticus</i>
TCA	"trichloroacetic <u>a</u> cid"
TEMED	N, N, N', N', -Tetra-methyl-ethylendiamin
Tfb	" <u>t</u> ransfection <u>b</u> uffer"
TFR	<u>T</u> rans <u>f</u> errin
tGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
TPIP	<u>T</u> PIPE und <u>P</u> TEN homologe <u>I</u> nositolphosphatase
TPTE	"transmembrane phosphatase with tensin homology"
TM	<u>T</u> rans <u>m</u> embrandomänen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX-100	<u>T</u> riton <u>X</u> -100
U	" <u>u</u> nits"
UV	<u>u</u> ltraviolett

V	Volt
[v/v]	Volumenprozent
[w/v]	Gewichtsprozent
X	beliebige Aminosäure
ZNS	<u>Z</u> entrales <u>N</u> ervensystem
α	anti

## 8. Literaturverzeichnis

**Ahle, S.; Mann, A.; Eichelsbacher, U.; Ungewickell, E. (1988)**

Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane; *EMBO J.* **7**, 919-929

**Ahle, S.; Ungewickell, E. (1989)**

Identification of a clathrin binding subunit in the HA2 adaptor protein complex; *J. Biol. Chem.* **264**, 20089-20093

**Barker, C.J.; Berggren, P.O. (1999)**

Inositol hexakisphosphate and beta-cell stimulus-secretion coupling; *Anticancer. Res.* **19**, 3737-3741

**Barriere, H.; Nemes, C.; Lechardeur, D.; Khan-Mohammad, M.; Fruh, K.; Lukacs, G.L. (2006)**

Molecular Basis of Oligoubiquitin-Dependent Internalization of Membrane Proteins in Mammalian Cells

**Berridge, M.J.; Bootman, M.D.; Lipp, P. (1998)**

Calcium - a life and death signal; *Nature* **395**, 645-648

**Bootman, M.D.; Collins, T.J.; Peppiatt, C .M.; Prothero, L.S.; MacKenzie, L.; De Smet, P.; Travers, M.; Tovey, S.C.; Seo, J.T.; Berridge, M.J.; Ciccolini, F; Lipp, P. (2001)**

Calcium signalling – an overview; *Semin. Cell. Dev. Biol.* **12**, 3-10

**Bertsch, U.; Deschermeier, C.; Fanick, W.; Girkontaite, I.; Hillemeier, K.; Johnen, H.; Weglöhner, W.; Emmrich, F.; Mayr, G.W. (2000)**

The second messenger binding site of inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase is centered in the catalytic domain and related to the inositol triphosphate receptor site; *J. Biol. Chem.* **275**, 1557-1564

**Braulke, T.; Bonifacino, J.S. (2009)**

Sorting of lysosomal proteins; *Biochem. Biophys. Acta.* **4**, 605-614

**Bronson, R.T.; Donahue, L.R.; Johnson, K.R.; Tanner, A.; Lane, P.W.; Faust, J.R. (1998)**

Neuronal ceroid lipofuscinosis (nclf), a new disorder of the mouse linked to chromosome 9; *Am. J. Med. Genet.* **77**, 289-297

**Chang, S.C.; Majerus, P.W. (2006)**

Inositol polyphosphate multikinase regulates inositol1,4,5,6-tetrakisphosphate; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **339**, 209-216

**Chapman, E.R. (2002)**

Synaptotagmin: A Ca<sup>2+</sup> sensor that triggers exocytosis?; *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 498-508

**Codlin, S.; Haines, R.L.; Mole, S.E. (2008)**

Btn1 affects endocytosis, polarization of sterol-rich membrane domains and polarized growth in *Schizosaccharomyces pombe*; *Traffic*. **9**, 936-950

**Deleu, S.; Choi, K.; Pesesse, X.; Cho, J.; Sulis, M.L.; Parsons, R.; Shears, S.B. (2006)**

Physiological levels of PTEN control the size of the cellular Ins(1,3,4,5,6)P5 pool; *Cell. Signal*. **18**, 488-498

**Dell'Angelica, E.C.; Ohno, H.; Ooi, C.E.; Rabinovich, E.; Roche, K.W.; Bonifacino, J.S. (1997)**

AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression; *ENBO J*. **16**, 917-928

**Dell'Angelica, E.C.; Mullins, C.; Bonifacino, J.S. (1999)**

AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors; *J. Biol. Chem*. **274**, 7278-7285

**Dell'Angelica, E.C.; Shotelersuk, V.; Aguilar, R.C.; Gahl, W.A.; Bonifacino, J.S. (1999)**

Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the  $\beta$ 3A subunit of the AP-3 adaptor; *Mol. Cell* **3**, 11-21

**Diaz Anel, A.M. (2007)**

Phospholipase C beta3 is a key component in the Gbetagamma/PKCeta/PKD-mediated regulation of trans-Golgi network to plasma membrane transport; *Biochem. J*. **406**, 157-165

**Dyken, P.R. (1989)**

The neuronal ceroid lipofuscinoses; *J Child Neurol*. **4**, 165-174

**Eckmann, L.; Rudolf, M.T.; Ptasznik, A.; Schultz, C.; Jiang, T.; Wolfson, N.; Tsien, R.; Fierer, J.; Shears, S.B.; Kagnoff, M.F.; Traynor-Kaplan, A.E. (1997)**

D-myo-Inositol 1,4,5,6-tetrakisphosphate produced in human intestinal epithelial cells in response to *Salmonella* invasion inhibits phosphoinositide 3-kinase signalling pathways; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14456-14460

**Eskelinen, E.L.; Cuervo, A.M.; Taylor, M.R.; Nishino, I.; Blum, J.S.; Dice, J.F., Sandoval, I.V.; Lippincott-Schwartz, J.; August, J.T.; Saftig, P. (2005)**

Unifying nomenclature for the isoforms of the lysosomal membrane protein LAMP-2; *Traffic*. **6**, 1058-1061

**Gaidarov, I.; Chen, Q.; Falck, J.R.; Reddy, K.K.; Keen, J.H. (1996)**

A functional phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate/phosphoinositide binding domain in the clathrin adaptor AP-1 alpha subunit. Implications for endocytic pathway; *J. Biol. Chem*. **271**, 20922-20929

**Gao, H.; Boustany, R.M.; Espinola, J.A.; Cotman, S.L.; Srinidhi, L.; Antonellis, K.A.; Gillis, T.; Qin, X.; Liu, S.; Donahue, L.R.; Bronson, R.T.; Faust, J.R.; Stout, D.; Haines, J.L.; Lerner, T.J.; MacDonald, M.E. (2002)**

Mutations in a novel CLN6-encoded transmembrane protein cause variant neuronal ceroid lipofuscinosis in man and mouse; *Am. J. Hum. Genet.* **70**, 324-335

**Ghosh, P.; Dahms, N.M.; Kornfeld, S. (2003)**

Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale; *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 202-212

**Golabek, A.A.; Kida, E.; Walus, M.; Wujek, P.; Mehta, P.; Wisniewski, K.E. (2003)**

Biosynthesis, glycosylation, and enzymatic processing in vivo of human tripeptidyl-peptidase I ; *J. Biol. Chem.* **278**, 7135-7145

**Goebel, H.H.; Wisniewski, K.E. (2004)**

Current state of clinical and morphological in human NCL; *Brain pathology* **14**, 61-69

**Gruenberg, J.; Stenmark, H. (2004)**

The biogenesis of multivesicular endosomes; *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**, 317-323

**Guillas, I.; Jiang, J.C.; Vionnet, C.; Roubaty, C. ; Uldry, D. ; Chuard, R.; Wang, J.; Jazwinski, S.M.; Conzelmann, A. (2003)**

Human homologues of LAG1 reconstitute Acyl-CoA-dependent ceramide synthesis in yeast; *J. Biol. Chem.* **278**, 37083-37091

**Haltia, M. (2003)**

The neuronal ceroid-lipofuscinoses; *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 1-13

**Haucke, V. (2005)**

Phosphoinositide regulation of clathrin-mediated endocytosis; *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1285-1289

**Heine, C.; Koch, B.; Storch, S.; Kohlschütter, A.; Palmer, D.N.; Braulke, T. (2004)**

Defective endoplasmic reticulum-resident membrane protein CLN6 affects lysosomal degradation of endocytosed arylsulfatase; *J. Biol. Chem.* **279**, 22347-22352

**Heine, C.; Quitsch, A.; Storch, S.; Martin, Y.; Lonka, L.; Lehesjoki, A.E.; Mole, S.E.; Braulke, T (2007)**

Topology and endoplasmic reticulum retention signals of the lysosomal storage disease-related membrane protein CLN6; *Mol. Membr. Biol.* **24**, 74-87

**Hilton, J.M.; Plomann, M.; Ritter, B.; Modregger, J.; Freeman, H.N.; Falck, J.R.; Krishna, U.M.; Tobin, A.B. (2001)**

Phosphorylation of a synaptic vesicle-associated protein by an inositol hexakisphosphate-regulated protein kinase; *J. Biol. Chem.* **276**, 16341-16347

**Hirst, J.; Robinson, M.S. (1998)**

Clathrin and adaptors; *Biochem. Biophys. Acta.* **1404**, 173-193

**Hirst, J.; Bright, N.A.; Rous, B.; Robinson, M.S. (1999)**

Characterization of a fourth adaptor-related protein complex; *Mol. Biol. Cell* **10**, 2787-2802

**Ho, M.W.; Kaetzel, M.A.; Armstrong, D.L.; Shears, S.B. (2001)**

Regulation of a human chloride channel. A paradigm for integrating input from calcium, type ii calmodulin-dependent protein kinase, and inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate; *J. Biol. Chem.* **276**, 18673-18680

**Höning, S.; Ricotta, D.; Krauss, M.; Späte, K.; Spolaore, B.; Motley, A.; Robinson, C.; Haucke, V.; Owen, D.J. (2005)**

Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP-2; *Mol. Cell.* **18**, 519-531

**Hoy, M.; Efanov, A.M.; Zaitsev, S.V.; Olsen, H.L.; Bokvist, K.; Leibiger, I.B.; Zwiller, J.; Berggren, P.O.; Gromada, J. (2002)**

Inositol hexakisphosphate promotes dynamin I-mediated endocytosis; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 6773-6777

**Hoy, M.; Efanov, A.M.; Bertorello, A.M.; Zaitsev, S.V.; Olsen, H.L.; Bokvist, K.; Leibiger, B.; Leibiger, I.B.; Zwiller, J.; Berggren, P.O.; Gromada, J. (2002)**

Inositol hexakisphosphate promotes dynamin I-mediated endocytosis; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 6773-6777

**Hoy, M.; Berggren, P.O.; Gromada, J. (2003)**

Involvement of protein kinase C-epsilon in inositol hexakisphosphate-induced exocytosis in mouse pancreatic beta-cells; *J. Biol. Chem.* **278**, 35168-35171

**Illies, C.; Gromada, J.; Fiume, R.; Leibiger, B.; Yu, J.; Juhl, K.; Yang, S.N.; Barma, D.K.; Falck, J.R.; Saiardi, A.; Barker, C.J.; Berggren, P.O. (2007)**

Requirement of inositol pyrophosphates for full exocytic capacity in pancreatic beta cells; *Science*. **318**, 1299-1302

**Irvine, R.F.; Schell, M.J. (2001)**

Back in the water: the return of the inositol phosphates; *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 327-338

**Isosomppi, J.; Vesa, J.; Jalanko, A.; Peltonen, L. (2002)**

Lysosomal localization of the neuronal ceroid lipofuscinosis CLN5 protein; *Hum. Mol. Genet.* **11**, 885-891

**Janes, R.W.; Munroe, P.B.; Mitchison H.M.; Gardiner, R.M.; Mole, S.E.; Wallace, B.A. (1996)**

A model of Batten disease protein CLN3 : functional implications from homology and mutations ; *FEBS Lett.* **399**, 75-77

**Jung, N.; Haucke, V. (2007)**

Clathrin-mediated endocytosis at synapses; *Traffic.* **8**, 1129-1136

**Kornfeld, S.; Mellman, I. (1989)**

The biogenesis of lysosomes; *Annu. Rev. Cell. Biol.* **5**, 483-525

**Krauss, M.; Kukhtina, V.; Pechstein, A.; Haucke, V. (2006)**

Stimulation of phosphatidylinositol kinase type I-mediated phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate synthesis by AP-2mu-cargo complexes; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 11934-11939

**Krauss, M.; Haucke, V. (2007)**

Phosphoinositides: regulators of membrane traffic and protein function; *FEBS Lett.* **581**, 2105-2111

**Kyttälä, A.; Ihrke, G.; Vesa, J.; Schell, M.J.; Luzio, J.P. (2004)**

Two motifs target Batten disease protein CLN3 to lysosomes in transfected nonneuronal and neuronal cells ; *Mol. Biol. Cell.* **15**, 1313-1323

**Kyttälä, A.; Lahtinen, U.; Braulke, T.; Hofmann, S.L. (2006)**

Functional biology of the neuronal ceroid lipofuscinoses (NCL) proteins; *Biochem. Biophys. Acta.* **1762**, 920-933

**Larsson, O.; Barker, C.J.; Sjöholm, A.; Carlqvist, H.; Michell, R.H.; Bertorello, A.; Nilsson, T.; Honkanen, R.E.; Mayr, G.W.; Zwiller, J.; Berggren, P.O. (1997)**

Inhibition of phosphatases and increased Ca<sup>2+</sup> channel activity by inositol hexakisphosphate; *Science.* **278**, 471-474

**Lin, L.; Lobel, P. (2001)**

Production and characterization of recombinant human CLN6 protein for enzyme-replacement therapy in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis; *Biochem. J.* **357**, 49-55

**Lockyer, P.J.; Vanlingen, S.; Reynolds, J.S.; McNulty, T.J.; Irvine, R.F.; Parys, J.B.; Cullen, P.J. (1999)**

Tissue-specific expression and endogenous subcellular distribution of the inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate-binding proteins GAP1 (IP4BP) and GAP1 (m); *Biochem. Biophys. Res. Commun* **255**, 421-426

**Lonka, L.; Kyttälä, A.; Ranta, S.; Jalanko, A.; Lehesjoki, A.E. (2000)**

The neuronal ceroid lipofuscinosis CLN8 membrane protein is a resident of the endoplasmatic reticulum ; *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1691-1697

**Lonka, L.; Salonen, T.; Siintola, E.; Kopra, O.; Lehesjoki, A.E.; Jalanko, A. (2004)**

Localization of wild-type and mutant neuronal ceroid lipofuscinosis CLN8 proteins in non-neuronal and neuronal cells; *J. Neurosci. Res.* **76**, 862-871

**Lübke, T.; Lobel, P.; Sleat, D.E. (2009)**

Proteomics of the lysosome; *Biochem. Biophys. Acta.* **4**, 625-635

**Mayhew, I.G.; Jolly, R.D.; Pickett, B.T.; Slack, P.M. (1985)**

Ceroid-lipofuscinosis (Batten's disease): pathogenesis of blindness in the ovine model; *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **11**, 273-290

**Mayr, G.W.; Windhorst, S.; Hillemeier, K. (2005)**

Antiproliferative plant and synthetic polyphenolics are specific inhibitors of vertebrate inositol-1,4,5-triphosphate 3-kinases and inositol polyphosphate multikinase; *J. Biol. Chem.* **280**, 13229-13240

**Milano, S.K.; Kim, Y.M.; Stefano, F.P.; Benovic, J.L.; Brenner, C. (2006)**

Nonvisual arrestin oligomerization and cellular localization are regulated by inositol hexakisphosphate binding; *J. Biol. Chem.* **281**, 9812-9823

**Mills, I.G.; Jones, A.T.; Clague, M.J. 1999**

Regulation of endosome fusion; *Mol. Membr. Biol.* **16**, 73-79

**Nalaskowski, M.M.; Deschermeier, C.; Fanick, W., Mayr, G.W. (2002)**

The human homologue of yeast ArgR111 protein is an inositol phosphate multikinase with predominantly nuclear localization; *Biochem. J.* **366**, 549-556

**Neubrand, V.E.; Will, R.D.; Möbius, W.; Poustka, A.; Wiemann, S.; Schu, P.; Dotti, C.G.; Pepperkok, R.; Simpson, J.C. (2005)**

Gamma-BAR, a novel AP-1-interacting protein involved in post-Golgi trafficking; *EMBO J.* **24**, 1122-1133

**Nilius, B.; Prenen, J.; Voets, T.; Eggermont, J.; Bruzik, K.S.; Shears, S.B.; Droogmans, G. (1998)**

Inhibition by inositol tetrakisphosphates of calcium- and volume-activated Cl-currents in macrovascular endothelial cells; *Pflugers. Arch* **435**, 637-644

**Norris, F.A.; Ungewickell, E.; Majerus, P.W. (1995)**

Inositol hexakisphosphate binds to clathrin assembly protein 3 (AP-3/AP180) and inhibits clathrin cage assembly in vitro; *J. Biol. Chem.* **270**, 214-217

**Orchiston, E.A.; Bennett, D.; Leslie, N.R.; Clarke, R.G.; Winward, Downes, C.P.; Safrany, S.T. (2004)**

PTEN M-CBR3, a versatile and selective regulator of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate (Ins(1,3,4,5,6)P5). Evidence for Ins(1,3,4,5,6)P5 as a proliferative signal; *J. Biol. Chem.* **279**, 1116-1122

**Oswald, M.J.; Palmer, D.N.; Kay, G.W.; Shemilt, S.J.; Rezaie, P.; Cooper, J.D. (2005)**

Glial activation spreads from specific cerebral foci and precedes neurodegeneration in presymptomatic ovine neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN6); *Neurobiol. Dis.* **20**, 49-63

**Panek, H.R.; Stepp, J.D.; Engle, H.M.; Marks, K.M.; Tan, P.K.; Lemmon, S.K.; Robinson, L.C. (1997)**

Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex; *EMBO J.* **16**, 4194-4204

**Pearce, D.A.; Sherman, F. (1997)**

BTN1, a yeast gene corresponding to the human gene responsible for Batten's disease, is not essential for viability, mitochondrial function, or degradation of mitochondrial ATP synthase; *Yeast.* **13**, 691-997

**Pearce, D.A.; Nosel, S.A.; Sherman, F. (1999)**

Studies of pH regulation by BTN1, the yeast homolog of human CLN3p; *Mol. Genet. Metab.* **66**, 320-323

**Peters, C.; Schmidt, B.; Rommerskirch, W.; Rupp, K.; Zühlsdorf, M.; Vingron, M.; Meyer, H.E.; Pohlmann, R.; von Figura, K. (1990)**

Phylogenetic conservation of arylsulfatases. cDNA cloning and expression of human arylsulfatase B; *J. Biol. Chem.* **265**, 3374-3381

**Piccolo, E.; Vignati, S.; Maffucci, T.; Innominato, P.F.; Riley, A.M.; Potter, B.V.; Pandolfi, P.P.; Broggin, M.; Iacobelli, S.; Innocenti, P.; Falasca, M. (2004)**

Inositol pentakisphosphate promotes apoptosis through the PI 3-K/Akt pathway; *Oncogene.* **23**, 1754-1765

**Poët, M.; Kornak, U.; Schweizer, M.; Zdebik, A.A.; Scheel, O.; Hoelter, S.; Wurst, W.; Schmitt, A.; Fuhrmann, J.C.; Planells-Cases, R.; Mole, S.E.; Hübner, C.A.; Jentsch, T.J. (2006)**

Lysosomal storage disease upon disruption of the neuronal chloride transport protein CIC-6; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 13854-13859

**Ramirez-Montealegre, D.; Pearce, D.A. (2005)**

Defective lysosomal arginine transport in juvenile Batten disease; *Hum. Mol. Genet.* **14**, 3759-3773

**Ranta, S.; Zhang, Y.; Ross, B.; Lonka, L.; Takkunen, E.; Messer, A.; Sharp, J.; Wheeler, R.; Kusumi, K.; Mole, S.; Liu, W.; Soares, M.B.; Bonaldo, M.F.; Hirvasniemi, A.; de la Chapelle, A.; Gilliam, T.C.; Lehesjoki, A.E. (1999)**

The neuronal ceroid lipofuscinoses in human EPMR and *mnd* mutant mice are associated with mutations in CLN8; *Nat. Genet.* **23**, 233-236

**Ranta, S.; Topcu, M.; Tegelberg, S.; Tan, H.; Ustübütün, A.; Saatci, I.; Dufke, A.; Enders, H.; Pohl, K.; Alembik, Y.; Mitchell, W.A. Mole, S.E.; Lehesjoki, A.E. (2004)**

Variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis in a subset of Turkish patients is allelic to Northern epilepsy; *Hum. Mutat.* **23**, 300-305

**Riley, A.M.; Trusselle, M.; Kuad, P.; Borkovec, M.; Cho, J.; Choi, J.H.; Qian, X.; Shears, S.B.; Spiess, B.; Potter, B.V. (2006)**

Scyllo-inositol pentakisphosphate as an analogue of myo-inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate: chemical synthesis, physicochemistry and biological applications; *Chembiochem.* **7**, 1114-1122

**Saiardi, A.; Nagata, E.; Luo, H.R.; Sawa, A.; Luo, X.; Snowman, A.M.; Snyder, S.H. (2001)**

Mammalian inositol polyphosphate multikinase synthesizes inositol 1,4,5-triphosphate and an inositol pyrophosphate; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 2306-2311

**Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989)**

Molecular cloning: Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY

**Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. (1977)**

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467

**Sauvonnet, N.; Dujeancourt, A.; Dautry-Varsat, A. (2005)**

Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gamma-cytokine receptor; *J. Cell. Biol.* **168**, 155-163

**Schulz, A.; Mousallem, T.; Venkataramani, M.; Persaud-Sawin, D.A.; Zucker, A.; Luberto, C.; Bielawska, A.; Bielawski, J.; Holthuis, J.C.; Jazwinski, S.M.; Kozhaya, L.; Dbaibo, G.S.; Boustany, R.M. (2006)**

The CLN9 protein, a regulator of dihydroceramide synthase, *J. Biol. Chem.* **281**, 2784-2794

**Selak, S.; Woodman, R.C.; Fritzler, M.J. (2000)**

Autoantibodies to early endosome antigen (EEA1) produce a staining pattern resembling cytoplasmic anti-neurophil cytoplasmic antibodies (C-ANCA); *Clin. Exp. Immunol.* **122**, 493-498

**Sharp, J.D.; Wheeler, R.B.; Parker, K.A.; Gardiner, R.M.; Williams, R.E.; Mole, S.E. (2003)**

Spectrum of CLN6 mutations in variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis; *Hum. Mutat.* **22**, 35-42

**Shears, S.B. (1998)**

The versatility of inositol phosphates as cellular signals; *Biochem. Biophys. Acta.* **1436**, 49-67

**Shears, S.B. (2001)**

Assessing the omnipotence of inositol hexakisphosphate; *Cell. Signal.* **13**, 151-158

**Shears, S.B.; Yang, L.; Qian, X. (2004)**

Cell signaling by a physiologically reversible inositol phosphate kinase/phosphatase; *Adv. Enzyme. Regul.* **44**, 265-277

**Shin, H.W.; Hayashi, M.; Christoforidis, S.; Lacas-Gervais, S.; Hoepfner, S.; Wenk, M.R.; Modregger, J.; Uttenweiler-Joseph, S.; Wilm, M.; Nystuen, A.; Frankel, W.N.; Solimena, M.; De Camilli, P.; Zerial, M. (2005)**

An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway; *J. Cell. Biol.* **170**, 607-618

**Siintola, E.; Topcu, M.; Kohlschütter, A.; Salonen, T.; Joensuu, T.; Anttonen, A.K.; Lehesjoki, A.E. (2005)**

Two novel CLN6 mutations in variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis patients of Turkish origin; *Clin. Genet.* **68**, 167-173

**Siintola, E.; Partanen, S.; Strömme, P.; Haapanen, A.; Haltia, M.; Maehlen, J.; Lehesjoki, A.E.; Tyynelä, J. (2006)**

Cathepsin D deficiency underlies congenital human neuronal ceroid lipofuscinosis; *Brain.* **129**, 1438-1445

**Siintola, E.; Topcu, M.; Aula, N.; Lohi, H.; Minassian, B.A.; Paterson, A.D.; Liu, X.Q.; Wilson, C.; Lahtinen, U.; Anttonen, A.K.; Lehesjoki, A.E. (2007)**

The novel neuronal ceroid lipofuscinosis gene MFSD8 encodes a putative lysosomal transporter; *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 136-146

**Simpson, F.; Peden, A.A.; Christopoulou, L.; Robinson, M.S. (1997)**

Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3; *J. Cell. Biol.* **137**, 835-845

**Steenhuis, P.; Herder, S.; Gelis, S.; Braulke, T.; Storch, S. (2010)**

Lysosomal targeting of the CLN7 membrane transport via the plasma membrane require; *Traffic.* **20**, 406-422

**Steinfeld, R.; Reinhardt, K.; Schreiber, K.; Hillebrand, M.; Kraetzner, R.; Bruck, W.; Saftig, P.; Gartner, J. (2006)**

Cathepsin D deficiency is associated with a human neurodegenerative disorder; *Am. J. Hum. Genet.* **78**, 988-998

**Storch, S.; Pohl, S.; Braulke, T. (2004)**

A dileucine motif and a cluster of acidic amino acids in the second cytoplasmic domain of the batten disease-related CLN3 protein are required for efficient lysosomal targeting; *J. Biol. Chem.* **279**, 53625-53634

**Takei, K.; Yoshida, Y.; Yamada, H. (2005)**

Regulatory mechanisms of dynamin-dependent endocytosis; *J. Biochem.* **137**, 243-247

**Tammen, I.; Houweling, P.J.; Frugier, T.; Mitchell, N.L.; Kay, G.W.; Cavanagh, J.A.L.; Cook, R.W.; Raadsma, H.W.; Palmer, D.N. (2006)**

A missense mutation (c.184C>T) in ovine CLN6 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in Merino sheep whereas affected South Hampshire sheep have reduced levels of CLN6 mRNA; *Biochem. Biophys. Acta.* **10**, 898-905

**Teixeira, C.A.; Espinola, J.; Huo, L.; Kohlschütter, J.; Persaud Sawin, D.A.; Minassian, B.; Bessa, C.J.; Guimaraes, A.; Stephan, D.A., Sa Miranda, M.C.; MacDonald, M.E.; Ribeiro, M.G.; Boustany, R.M (2003)**

Noval mutations in the CLN6 gene causing a variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis; *Hum. Mutat.* **21**, 502-508

**Tyynelä, J. ; Cooper, J.D.; Khan, M.N.; Shemilts, S.J.; Haltia, M. (2004)**

Hippocampal pathology in the human neuronal ceroid lipofuscinoses : distinct patterns of storage deposition, neurodegeneration and glial activation ; *Brain Pathol.* **14**, 349-357

**Uusi-Rauva, K.; Luiro, K.; Tanhuanpää, K.; Kopra, O.; Martin-Vasallo, P.; Kyttälä, A.; Jalanko, A. (2008)**

Novel interactions of CLN3 protein link Batten disease to dysregulation of fodrin-Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase complex; *Exp. Cell. Res.* **314**, 2895-2905

**Verbsky, J.W.; Wilson, M.P.; Kisseleva, M.V.; Majerus, P.W.; Wente, S.R. (2002)**  
The synthesis of inositol hexakisphosphate. Characterization of human inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase; *J. Biol. Chem.* **277**, 31857-31862

**Verbsky, J.; Lavine, K.; Majerus, P.W. (2005)**  
Disruption of the mouse inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase gene, associated lethality, and tissue distribution of 2-kinase expression; *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **102**, 8448-8453

**Vesa, J.; Chin, M.H.; Oelgeschläger, K.; Isosomppi, J.; Dell'Angelica, E.C.; Jalanko, A.; Peltonen, L. (2002)**  
Neuronal ceroid lipofuscinoses are connected at molecular level : interaction of CLN5 protein with CLN2 and CLN3 ; *Mol. Biol. Cell.* **13**, 2410-2420

**Vines, D.J.; Warburton, M.J. 1999**  
Classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinoses fibroblasts are deficient in lysosomal tripeptidyl-peptidase I ; *FEBS Lett.* **443**, 131-135

**Voglmaier, S.M.; Keen, J.H.; Murphy, J.E.; Ferris, C.D.; Prestwich, G.D.; Snyder, S.H.; Theibert, A.B. (1992)**  
Inositol hexakisphosphate receptor identified as the clathrin assembly protein AP-2; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 158-163

**Walker, S.M.; Downes, C.P.; Leslie, N.R. (2001)**  
TPIP: a novel phosphoinositide 3-phosphatase; *Biochem. J.* **360**, 277-283

**Wendland, B. (2002)**  
Epsins: adaptors in endocytosis?; *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 971-977

**Wheeler, R.B.; Sharp, J.D.; Mitchell, W.A.; Bate, S.L.; Williams, R.E.; Lake, B.D.; Gardiner, R.M. (1999)**  
A new locus for variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis-CLN7; *Mol. Genet. Metab.* **66**, 337-338

**Wheeler, R.B.; Sharp, J.D.; Schultz, R.A.; Joslin, J.M.; Williams, R.E.; Mole, S.E. (2002)**  
The gene mutated in variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN6) and in nclf mutant mice encodes a novel predicted transmembrane protein ; *Am. J. Hum. Genet.* **70**, 537-542

**Winter, E.; Ponting, C.P. (2002)**  
TRAM, LAG1 and CLN8: members of a novel family of lipid-sensing domains?; *Trends. Biochem. Sci.* **27**, 381-383

**Wisniewski, K.E.; Kida, E.; Golabek, A.A.; Kaczmarek, W.; Connell, F.; Zhong, N. (2001)**  
Neuronal ceroid lipofuscinoses : classification and diagnosis ; *Adv. Genet.* **45**, 1-34

**Wrana, J.L. ; Le Roy, C. (2005)**  
Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling ; *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**, 112-126

**Yang, S.N.; Yu, J.; Mayr, G.W.; Hofmann, F.; Larsson, O.; Berggren, P.O. (2001)**  
Inositol hexakisphosphate increases L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity by stimulation of adenylyl cyclase; *FASEB. J.* **15**, 1753-1763

**Ye, W.; Ali, N.; Bembenek, M.E.; Shears, S.B.; Lafer, E.M. (1995)**  
Inhibition of clathrin assembly by affinity binding of specific inositol polyphosphate to the synapse-specific clathrin assembly protein AP-3; *J. Biol. Chem.* **270**, 1564-1568

**Zeman, W.; Dyken, P. (1969)**  
Neuronal ceroid-lipofuscinosis (Batten's disease): relationship to amaurotic family idiocy?; *Pediatrics* **44**, 570-583

**Zerial, M.; McBride, H. (2001)**  
Rab proteins as membrane organizers; *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 107-117

## **9. Anhang**

Für die Bereitstellung des Themas gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. rer. nat. T. Braulke, der mich mit viel Zeit und Geduld unterstützt hat.

Bei Dr. rer. nat. A. Quitsch möchte ich mich für die Begleitung durch den experimentellen Teil der Arbeit bedanken.

Desweiteren möchte ich meinen Dank der gesamten Abteilung für Molekularbiologie der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin zusprechen.

## **Lebenslauf**

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Prüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.