

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium

**Funktionelle Analyse von
Modulstrukturen der
N-Acetylglukosamin-1-Phosphotransferase**

vorgelegt von

Katrin Marschner

beim Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

Hamburg 2011

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 2007 bis April 2011 extern an der Abteilung Biochemie/Molekularbiologie der Kinderklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Braulke angefertigt. Prof. Dr. Ulrich Hahn betreute diese Arbeit am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Hahn
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Braulke

Tag der Disputation: 24.06.2011

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....	v	
1	Einleitung	1
1.1	Zellkompartimente des frühen sekretorischen Weges und des endo- somalen/lysosomalen Systems	1
1.1.1	Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Komplex	1
1.1.2	Endosomales-Lysosomales System.....	2
1.2	Co- und posttranslationale Modifikationen an Proteinen	3
1.2.1	Proteolytische Spaltung.....	4
1.2.2	Synthese und Funktion von <i>N</i> -Glykanen.....	5
1.2.3	Bildung von Mannose-6-Phosphat-Resten.....	7
1.3	Mannose-6-Phosphat-abhängiger Transport von löslichen lysosomalen Enzymen	8
1.4	Aufbau und Funktion der GlcNAc-1-Phosphotransferase.....	9
1.4.1	Modulare Struktur des α/β -Vorstufenproteins der GlcNAc-1- Phosphotransferase	11
1.4.2	Defekte der GlcNAc-1-Phosphotransferase	13
2	Zielstellung	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Material	16
3.1.1	Geräte	16
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	18
3.1.3	Chemikalien, Reagenzien und Kits	19
3.1.4	Bakterienstämme	23
3.1.5	Vektoren	24
3.1.6	Zellen und Zellkulturmedien	24
3.1.7	Antikörper	25
3.1.8	siRNA-Konstrukte, Primer und Sonden	26
3.1.9	Software.....	26
3.2	Methoden.....	27
3.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	27

3.2.1.1	<i>E. coli</i> -Stammhaltung	27
3.2.1.2	Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i>	27
3.2.1.3	Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i>	27
3.2.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	29
3.2.1.5	Restriktion von DNA	29
3.2.1.6	Dephosphorylierung von DNA	30
3.2.1.7	DNA-Ligation	30
3.2.1.8	Agarosegelelektrophorese	31
3.2.1.9	Polymerasekettenreaktion	31
3.2.1.10	Sequenzierung von DNA	34
3.2.1.11	Extraktion von RNA aus kultivierten Zellen	34
3.2.1.12	cDNA-Synthese	34
3.2.1.13	Quantitative Realtime-PCR	34
3.2.2	Zellbiologische Methoden	36
3.2.2.1	Allgemeines	36
3.2.2.2	Kultivierung von Zelllinien	36
3.2.2.3	Rekultivierung und Kryokonservierung von Zellen	36
3.2.2.4	Kultivierung und Selektion von Site-1-Protease defizienten Zellen	37
3.2.2.5	Konditionierung von Medien	39
3.2.2.6	Transiente Transfektion von Zellen	39
3.2.2.7	Transfektion von siRNA in Hela-Zellen	39
3.2.2.8	Metabolische Markierung von Proteinen mit [³⁵ S]-Methionin	40
3.2.2.9	Fluoreszenzmikroskopie	40
3.2.3	Biochemische Methoden	41
3.2.3.1	Ernten von Zellen und Herstellung von Lysaten	41
3.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen	41
3.2.3.3	Deglykosylierung von Proteinen	42
3.2.3.4	SDS-PAGE	42
3.2.3.5	Fluorographie	43
3.2.3.6	Proteinfärbung mit Coomassie	44
3.2.3.7	Westernblot-Analyse	44
3.2.3.8	Immunpräzipitation von metabolisch markierten Proteinen	46

3.2.3.9	Präzipitation von Proteinen durch Bindung an <i>Reactive Green-19</i> -Agarose.....	46
3.2.3.10	Präzipitation von Proteinen durch Bindung an UDP-Hexanolamin-Agarose.....	47
3.2.3.11	Bindung von [¹²⁵ I]-markiertem UDP-Hexanolamin-BSA	47
3.2.3.12	Dialyse von Proteinlösungen.....	48
3.2.3.13	Gewinnung und Aufreinigung von Antikörpern	48
3.2.3.14	Messung von Enzymaktivitäten	49
3.2.4	Statistische Auswertung der Messdaten	50
4	Ergebnisse	51
4.1	Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der N-terminalen Domäne der GlcNAc-1-Phosphotransferase	51
4.1.1	Erstellen von geeigneten Konstrukten.....	51
4.1.2	Strukturelle Analyse der N-terminalen Domäne	53
4.1.2.1	N-Glykosylierung	53
4.1.2.2	Dimerisierung.....	56
4.1.3	Funktionelle Analyse der N-terminalen Domäne.....	59
4.1.3.1	Untersuchung der Substratbindung mit <i>Reactive Green-19</i> -Agarose.....	59
4.1.3.2	Untersuchung der Substratbindung mit UDP-Hexanolamin.....	61
4.2	Identifizierung der α/β-Vorstufenprotein-spaltenden Protease.....	64
4.2.1	Generierung von polyklonalen Antikörpern zum Nachweis des α/β -Vorstufenproteins.....	64
4.2.2	Erstellen von geeigneten Konstrukten.....	67
4.2.3	Untersuchungen zur proteolytischen Spaltung des α/β -Vorstufenproteins	70
4.2.3.1	Hemmung der Spaltung durch Proteaseinhibitoren.....	70
4.2.3.2	Lokalisation der Protease	71
4.2.3.3	Mutation der Spaltstelle im α/β -Minikonstrukt.....	72
4.2.3.4	N-Glykosylierung und Lokalisation nicht-spaltbarer α/β -Minikonstrukte.....	74
4.2.4	Identifizierung der Site-1-Protease.....	76
4.2.4.1	<i>Knock-down</i> der Site-1-Protease mittels siRNA	77
4.2.4.2	Untersuchungen an Site-1-Protease-defizienten Zellen	79

4.2.5	Strukturelle Analyse der proteolytischen Spaltung des α/β - Vorstufenproteins	81
4.2.6	Funktionelle Analyse der proteolytischen Spaltung des α/β - Vorstufenproteins	82
4.2.6.1	Bildung von M6P-Resten	83
4.2.6.2	Sortierung lysosomaler Enzyme.....	84
5	Diskussion.....	87
5.1	Bindung von UDP-GlcNAc an den N-terminalen Bereich des α/β-Vorstufenproteins	87
5.2	Identifizierung der Protease	89
5.2.1	Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase durch Site-1-Protease- vermittelte Spaltung	94
5.2.2	Defekte der Site-1-Protease.....	97
5.3	Strukturelle Analysen des α/β-Vorstufenproteins.....	100
6	Zusammenfassung	103
7	Summary	105
8	Literatur	107
9	Anhang	119
	Publikationen und Tagungsbeiträge.....	128
	Danksagung.....	130

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

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 kursiv dargestellt.

ALLN	N-Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal
anti β -UE	Antikörper gegen die β -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumpersulfat
ATF	<i>activating transcription factor</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotropic factor</i>
BFA	Brefeldin A
BHK	Zelllinie aus Hamster-Nieren (<i>baby hamster kidney</i>)
BIP	<i>binding immunoglobulin protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHO-7	Zelllinie aus Hamster-Ovarien (<i>chinese hamster ovary</i>)
CREB	<i>cAMP-response element-binding protein</i>
C _T	<i>cycle of threshold</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMAPI	<i>DNA methyltransferase 1-associated protein 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNMT1	<i>DNA methyltransferase 1</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E64	<i>trans</i> -Epoxysuccinyl-L-leucyl-amido-(4-guanidino)-butan
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
Endo H	Endoglykosidase H

ER	endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
FKS	Fötale Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
$\times g$	Vielfaches der Erdbeschleunigung ($g = 9,78 \text{ m/s}^2$)
β -Gal	β -Galaktosidase
GFP	grün-fluoreszierenden Protein
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GM130	Golgi-Matrixprotein 130
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GST	Glutathion-S-Transferase
Ham's F12	Spezialmedium (F-12 <i>Nutrient Mixture</i> Ham)
HDAC2	<i>histone deacetylase 2</i>
Hela	humane Zelllinie eines Zervixkarzinoms (von Patientin Henrietta Lacks)
β -Hex	β -Hexosaminidase
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
ki	<i>knock in</i>
LB	Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien (Luria-Bertani)
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LIMP-2	<i>lysosomal integral membrane protein 2</i>
M6P	Mannose-6-Phosphat
α -Man	α -Mannosidase
ML	Mukopolidose
MnSOD	Mangan-abhängigen Superoxiddismutase
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NBKS	Neugeborenen-Kälberserum
NP-40	Nonidet P-40
OASIS	<i>old astrocyte specifically induced substance</i>
OD	optische Dichte
P/S	Penicillin/Streptomycin

PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNGase F	Peptid- <i>N</i> -Glykosidase F
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
SCAP	SREBP <i>cleavage-activating protein</i>
scFv M6P-1	<i>single chain fragment</i> -Antikörper, der spezifisch M6P-Reste erkennt
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SRD-12B	Site-1-Protease-defiziente CHO-K1-Zellen (Ovarienzellen des chinesischen Hamsters)
SRE	<i>sterol regulatory element</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
SRP	<i>signal recognition particle</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	ultraviolett
wt	Wildtyp
ZMNH	Zentrum für Molekulare Neurobiologie

1 EINLEITUNG

1.1 Zellkompartimente des frühen sekretorischen Weges und des endosomalen/lysosomalen Systems

Eukaryotische Zellen sind etwa 10 bis 100 µm groß und werden von einer Plasmamembran umschlossen. In den Zellen gibt es verschiedene membranumschlossene Zellkompartimente (Organellen), wie den Zellkern, die Mitochondrien, das glatte und raue endoplasmatische Retikulum (ER), den Golgi-Apparat, die Endosomen und die Lysosomen. Diese Kompartimentierung dient der Schaffung von Reaktionsräumen, in denen verschiedene zelluläre Vorgänge getrennt voneinander ablaufen können. Über komplex aufgebaute Transportsysteme werden Proteine und andere Moleküle gezielt von einem Kompartiment zu einem anderen transportiert.

1.1.1 Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Komplex

Das ER besteht aus einem weitverzweigten Membrannetzwerk aus Röhren und Zisternen und erstreckt sich durch die gesamte Zelle. Das raue ER enthält auf seiner dem Zytosol zugewandten Seite viele Ribosomen, an denen die Synthese von Membranproteinen und ein großer Anteil der Synthese von löslichen Proteinen abläuft. Dazu gehören lösliche sekretorische Proteine, ER-residente Proteine und Proteine des Golgi-Apparates, der Endosomen, der Lysosomen und der Plasmamembran. Nur Proteine mit einer speziellen ER-Signalsequenz werden in das ER importiert. Diese enthält eine Abfolge aus 7 - 12 hydrophoben Aminosäuren (AS) und befindet sich am N-Terminus der Proteins (Blobel & Dobberstein, 1975; Rapoport, 2008). Die Signalsequenz wird vom Signalerkennungspartikel (*signal recognition particle*, SRP) erkannt, das dann die wachsende Peptidkette zusammen mit dem Ribosom zum SRP-Rezeptor auf der zytosolischen Seite der rauhen ER-Membran dirigiert. Die neusynthetisierte Polypeptidschleife wird durch eine hydrophile Pore (Sec61-Komplex) durch die ER-Membran transloziert. Während lösliche Proteine gänzlich in das ER gebracht werden, bleiben Transmembranproteine in der ER-Membran verankert indem sie lateral aus dem Sec61-Komplex diffundieren. Das Translokationssignal ist hier ein hydrophober Teil des Proteins von etwa 20 AS, die Transmembrandomäne (Rapoport, 2008).

Im Lumen des ER finden neben der Abspaltung der Signalsequenz durch die Signalpeptidase, die Faltung der neusynthetisierten Proteine und verschiedene posttranslationale Modifikationen statt. Im ER werden die Lipide und Sterole für die restliche Zelle synthetisiert (van Meer, 2005). Eine weitere Aufgabe des ER ist die Speicherung von Ca^{2+} -Ionen und die Regulation des intrazellulären Calciumhaushalts (Koch, 1990).

Nicht-ER-residente Proteine werden nach ihrer Synthese und Modifizierung in COPII-umhüllte Transportvesikel verpackt und zum Golgi-Apparat transportiert. Diese Proteine besitzen Exit-Signale, die von komplementären Rezeptor-Proteinen erkannt werden, die in die Vesikel eingeschlossen werden. COPI-umhüllte Vesikel sind dagegen am Recycling von Proteinen vom Golgi-Apparat zum ER verantwortlich (Nickel *et al.*, 1998).

Der Golgi-Apparat besteht aus parallel angeordneten Zisternen. Die stapelförmige, polarisierte Struktur wird in *cis*-, *medial*- und *trans*-Golgi eingeteilt. Im Golgi-Apparat finden weitere posttranslationale Modifikationen an Glykoproteinen und Lipiden statt und er dient der Sortierung von Proteinen zur Plasmamembran, zu Lysosomen und zu sekretorischen Vesikeln (Griffiths *et al.*, 1989). Im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) werden die Proteine schließlich in Transportvesikel verpackt und zu ihren Bestimmungsorten in der Zelle gebracht.

1.1.2 Endosomales-Lysosomales System

Komponenten des endosomalen-lysosomalen Systems sind frühe Endosomen (Zellperipherie), späte Endosomen (perinuclear) und Lysosomen, die für Transport und Abbau von endozytierten Molekülen verantwortlich sind. Lysosomen tragen außerdem zum Abbau zellulärer Makromoleküle wie Proteine, Lipide und Kohlenhydrate bei, die durch Autophagozytose zu den Lysosomen gelangen, und sind damit wichtig für das Recycling und die Sortierung von Molekülen (de Duve, 1983; Kornfeld & Mellman, 1989).

Intralysosomal befindet sich eine Vielzahl verschiedener hydrolytischer Enzyme, wie z. B. Proteinasen, Nukleasen, Glykosidasen, Lipasen, Phospholipasen und Sulfatasen, die ihre optimale Wirkung in saurem Milieu ($\text{pH} \leq 5,0$) ausüben. Die Erhaltung des sauren Milieus wird durch ATP-getriebene, membranständige Protonenpumpen gewährleistet (vakuoläre Protonenpumpe, V-Typ H^+ -ATPase) (Cuppoletti *et al.*, 1987). Man kennt bisher 63 lösliche lysosomale Proteine und 46 lysosomale intergrale Membranproteine (Schröder *et al.*, 2010). Proteomanalysen zeigen jedoch, dass wahrscheinlich noch weitaus mehr Proteine in

Lysosomen lokalisiert sind, deren Funktion noch bestätigt werden muss (Schröder *et al.*, 2010). Während lösliche lysosomale Hydrolasen am Abbau zelleigener und zellfremder Makromoleküle beteiligt sind, sind lysosomale Membranproteine u. a. für den selektiven Transport von Abbauprodukten ins Zytosol und die Interaktion mit Endosomen und Autophagosomen notwendig (Ruivo *et al.*, 2009). Lysosomen sind außerdem fähig, ihren Inhalt nach der Fusion mit der Plasmamembran zumindest teilweise zu sezernieren. Dieser Prozess ist z. B. wichtig für die Ca^{2+} -regulierte Exozytose von Lysosomen bei der Membranreparatur/Wundheilung (Reddy *et al.*, 2001) sowie beim Abbau der Knochenmatrix (Stenbeck, 2002) und der Exozytose von Melanin durch die lysosomenähnlichen Melanosomen (Stinchcombe *et al.*, 2004). Viele lysosomale Membranproteine sind zum Schutz vor Abbau durch lysosomale Hydrolasen hoch-glykosyliert (Kundra & Kornfeld, 1999).

Eine kontinuierliche Substitution löslicher lysosomaler Enzyme und lysosomaler Membranproteine zur Aufrechterhaltung der Integrität bereits bestehender Lysosomen ist essentiell. Neusynthetisierten lysosomale Proteine werden hierfür vom Ort ihrer Synthese, dem ER, über den Golgi-Apparat und Endosomen zum Lysosom transportiert (Braulke & Bonifacino, 2009; van Meel & Klumperman, 2008). Defekte im intrazellulären Transport, der Stabilität oder der Aktivität einzelner oder multipler lysosomaler Proteine führt zu verschiedenen Erkrankungen, die allgemein als lysosomale Speichererkrankungen bezeichnet werden (Ballabio & Gieselmann, 2009).

1.2 Co- und posttranslationale Modifikationen an Proteinen

Eine große Anzahl von Proteinen einer Zelle wird co- oder posttranslational modifiziert. Viele Proteine werden als inaktive Vorläuferpeptide synthetisiert, die erst durch proteolytische Entfernung des Propeptids aktiviert werden. Intra- und intermolekulare Disulfidbrückenbindungen stellen wichtige Schritte für die Faltung und Reifung von Proteinen dar. Wichtige posttranslationale Modifikationen sind die *N*- und *O*-Glykosylierung von Proteinen. Des Weiteren können an N-terminale Glycin- oder Cysteinreste Acylreste angehängt werden (*N*-Myristylierung, *S*-Palmitinylierung). Bei Prenylierungen werden Farnesyl- oder Geranyl-Geranyl-Reste kovalent an Proteine gehängt. Ein Glykosylphosphatidylinositol (GPI) kann ebenfalls mit Proteinen verknüpft werden. Diese Fettsäure-, Prenyl- und GPI-Modifikationen dienen der Verankerung bzw. Assoziation in der Membran. Andere

posttranslationale Veränderungen betreffen die Methylierung, Phosphorylierung, Carboxymethylierung, Hydroxylierung oder Acetylierung (Walsh *et al.*, 2005).

1.2.1 Proteolytische Spaltung

Während die meisten posttranslationalen Veränderungen an Proteinen umkehrbar sind, ist die proteolytische Spaltung irreversibel und nimmt daher eine zentrale Stellung unter den Proteinmodifikationen ein. Die dafür verantwortlichen Proteasen katalysieren einerseits die unspezifische Hydrolyse und damit den Abbau von Proteinen, andererseits können sie aber auch hochselektiv spezifische Substrate spalten und viele biologische Prozesse regulieren. Die Proteolyse umfasst sowohl die Entfernung von C- bzw. N-terminalen AS, die Entfernung von Signalpeptiden, die proteolytische Aktivierung von Vorstufenproteinen als auch den gezielten Abbau zur Entfernung von Proteinen an Proteasomen oder in Lysosomen (Ehrmann & Clausen, 2004)

Puente *et al.* haben beschrieben, dass 553 Gene im humanen Genom für Proteasen kodieren. Ein Anteil von 22 % (125) der Proteasen sind membrangebunden (Puente *et al.*, 2003). Basierend auf dem Katalysemechanismus werden Proteasen in fünf verschiedene Klassen eingeteilt: Aspartyl-, Metallo-, Cystein-, Serin- und Threoninproteasen. Von den im humanen Genom kodierten Proteasen gehören die meisten der Gruppe der Metallo- (186), der Serinproteasen (176) und der Cysteinproteasen (143) an. Von den Threonin- und Aspartylproteasen gibt es nur wenige Vertreter (27 und 21), da sie hochspezialisierte Proteasen darstellen (Puente *et al.*, 2003). Alle Proteasen hydrolysieren Peptidbindungen über einen ähnlichen katalytischen Mechanismus, wobei die Polarisierung der Bindung durch einen nukleophilen Angriff auf den Carbonylkohlenstoff bewirkt wird. Unterschiede bestehen bei der Ausbildung der nukleophilen Gruppe. Serin-, Threonin- und Cysteinproteasen nutzen direkt den Hydroxylrest bzw. die Thiolgruppe der AS des aktiven Zentrums als Nukleophil, während Aspartyl- und Metalloproteasen über ein aktiviertes Wassermolekül wirken (Powers *et al.*, 2002; Rawlings & Barrett, 1993).

Zur Beschreibung des Substrats werden die AS-Reste des Substrats mit P_i , ..., P_3 , P_2 , P_1 , P_1' , P_2' , P_3' , ..., P_i' bezeichnet. Die Spaltung des Substrats erfolgt dabei zwischen P_1 und P_1' (Schechter & Berger, 1967).

1.2.2 Synthese und Funktion von *N*-Glykanen

Die Struktur von Asparagin-verknüpften Glykanen (*N*-Glykanen) an Proteinen kann sehr unterschiedlich aussehen, je nachdem welche Funktion das Protein hat und inwieweit die *N*-Glykosylierungen zu dessen Funktion beitragen. Die verschiedenen *N*-Glykane werden aus einem Glykan-Grundgerüst gebildet, das zunächst an der zytoplasmatischen Seite des ER an einem Dolicholphosphat gebildet wird (Helenius & Aebi, 2001). Unter Vermittlung einer „Flippase“ werden die Dolicholphosphat-verknüpften Glykanstrukturen auf die luminalen Seite der ER transloziert, wo sieben weitere Zuckerreste angefügt werden (Abbildung 1.1).

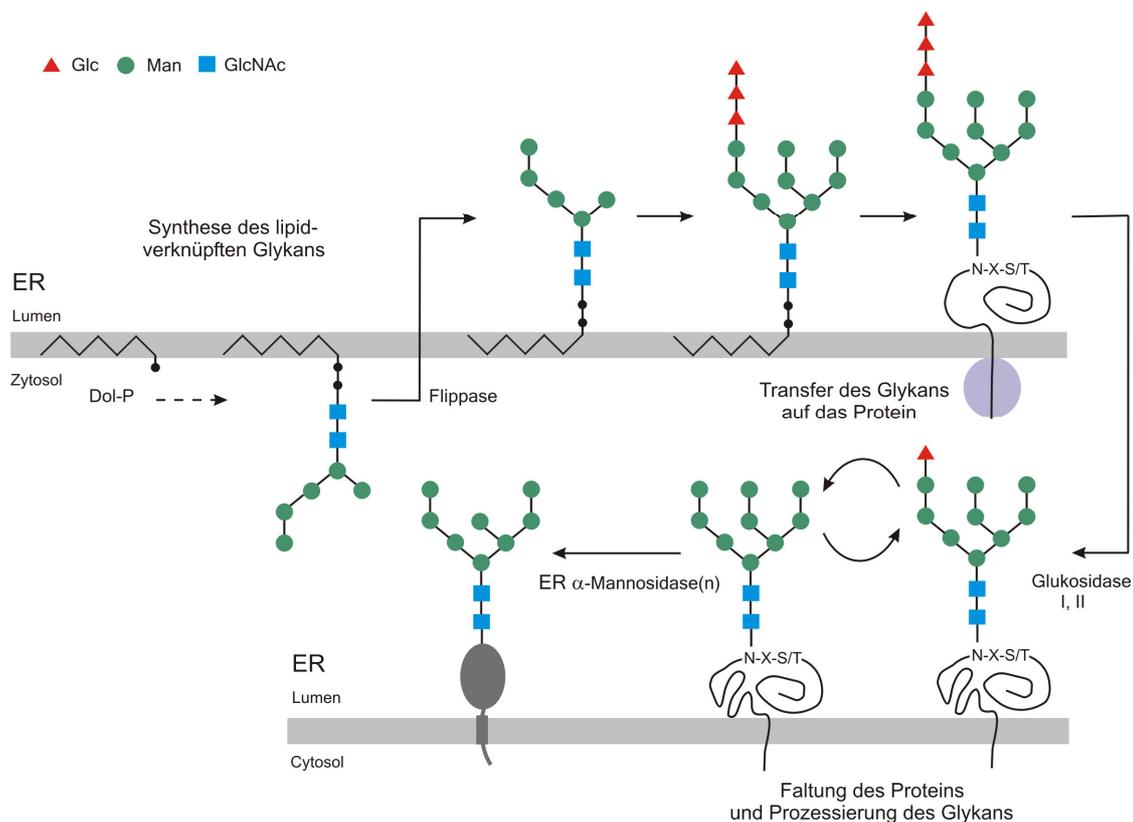


Abbildung 1.1: Synthese und Transfer des Glykan-Grundgerüsts, aus dem alle *N*-Glykane gebildet werden können. Der Aufbau von $(\text{Glc})_3\text{-(Man)}_9\text{-(GlcNAc)}_2$ erfolgt an einem Dolicholphosphat und wird anschließend auf einen Asparaginrest der Sequenz Asn-X-Ser/Thr an Proteinen übertragen. (Abkürzungen: Glc = Glukose, Man = Mannose, GlcNAc = N-Acetylglucosamin, Dol-P = Dolicholphosphat)

Nach der Übertragung der letzten drei Glukosereste wird die Glykan-Grundstruktur auf einen Asparaginrest innerhalb der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr ($X =$ alle AS außer Prolin) des noch wachsenden Peptids durch eine Oligosaccharidtransferase übertragen (Shakin-Eshleman *et al.*, 1996; Silberstein & Gilmore, 1996). Danach werden drei

Glukosereste durch Glukosidase I und II entfernt bevor die Oligosaccharidkette durch ER α -Mannosidasen weiter modifiziert wird (Kornfeld & Kornfeld, 1985). Eine Glukosyltransferase kann an glukosefreie Oligosaccharidketten wieder Glukosereste anfügen. Der Deglykosylierungs-/Reglykosylierungszyklus kontrolliert zusammen mit verschiedenen Chaperonen und den Lektinen Calnexin und Calreticulin den Faltungszustand der Glykoproteine. Nach vollständiger Faltung der Glykoproteine können sie zum Golgi-Apparat transportiert und dort weiter modifiziert werden (Ellgaard & Frickel, 2003).

Im Golgi-Apparat entfernt zunächst die Golgi-Mannosidase I drei Mannosereste, gefolgt von der Anheftung eines N-Acetylglukosamins (GlcNAc) durch die GlcNAc-Transferase I, was dann der Mannosidase II ermöglicht, zwei weitere Mannosereste zu entfernen (Helenius & Aebi, 2001). In diesem Stadium wird die Bindung zwischen den beiden GlcNAc-Resten widerstandsfähig gegenüber der Spaltung durch Endoglykosidase H (Endo H). Da alle Strukturen im weiteren Verlauf des Reaktionsweges ebenfalls Endo H-resistent sind, kann Endo H benutzt werden, um komplexe und mannosereiche Oligosaccharide zu unterscheiden (Trimble & Maley, 1984).

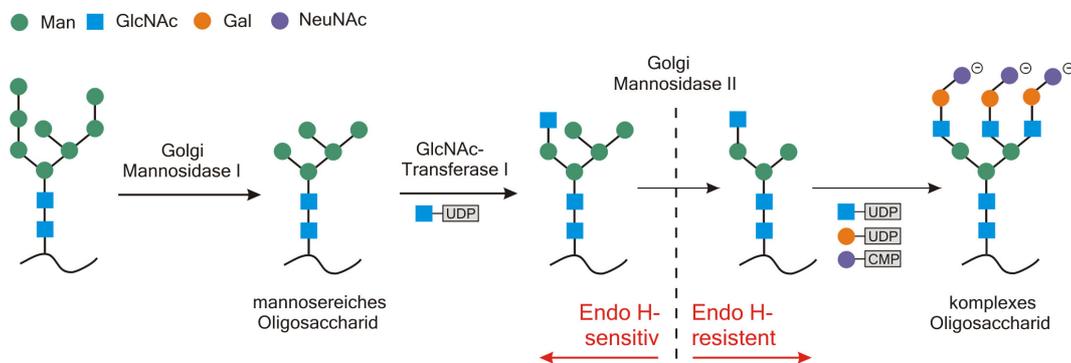


Abbildung 1.2: Bildung komplexer Oligosaccharide aus mannosehaltigen Zuckerketten im Golgi-Apparat. Nucleotid-aktivierte Zucker dienen als Substrate für den Aufbau komplexer Oligosaccharide. Endo H spaltet nur mannosehaltige und hybride Oligosaccharide. (Abkürzungen: Gal = Galactose, GlcNAc = N-Acetylglukosamin, Man = Mannose und NeuNAc = N-Acetylneuraminsäure)

Es können nun weitere Zucker angeheftet werden (z. B. GlcNAc, Fucose, Galactose und Sialinsäure). Als Substrate dienen Nucleotid-aktivierte Zucker (Abbildung 1.2). Dabei tragen verschiedene Glykosyltransferasen zum Aufbau der Oligosaccharide mit variabler Anzahl und Art der Zuckerverknüpfungen bei (Helenius & Aebi, 2001).

1.2.3 Bildung von Mannose-6-Phosphat-Resten

Bei neusynthetisierten lysosomalen Enzymen werden spezielle Mannosereste an den *N*-Glykanen mit Phosphatresten versehen. Diese Mannose-6-Phosphat (M6P)-Reste dienen als Erkennungsmarker für den Transport zum Lysosom (Pohl *et al.*, 2009a). Zunächst überträgt im *cis*-Golgi-Apparat die UDP-N-Acetylglukosamin (UDP-GlcNAc): lysosomales Enzym N-Acetylglukosamin-1-Phosphotransferase (EC 2.7.8.17., GlcNAc-1-Phosphotransferase) GlcNAc-1-Phosphat auf C6-Hydroxylgruppen von bestimmten Mannoseresten mannosereicher Oligosaccharide von lysosomalen Enzymen unter Ausbildung eines Phosphodiesteres als Zwischenprodukt (Lazzarino & Gabel, 1989). In einem zweiten Schritt wird im TGN der GlcNAc-Rest durch die GlcNAc-1-Phosphodiester- α -N-Acetylglukosaminidase (EC 3.1.4.45, GlcNAc-1-Phosphodiesterase, auch *uncovering enzyme* genannt) entfernt (Abbildung 1.3).

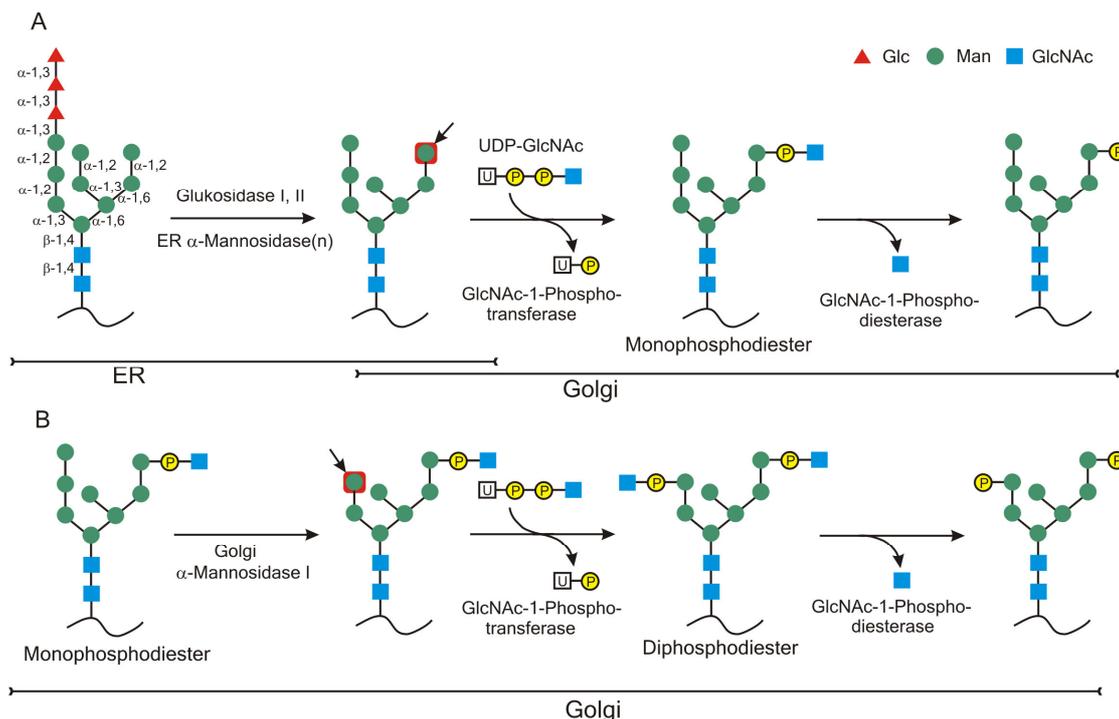


Abbildung 1.3: Bildung von Mannose-6-Phosphatresten an lysosomalen Enzymen (Pohl *et al.*, 2009a).

(A) Mannosereiche Oligosaccharide werden zunächst im ER durch Glukosidase I, II, und ER α -Mannosidase(n) modifiziert. Anschließend fügt im *cis*-Golgi-Apparat die GlcNAc-1-Phosphotransferase im α -1,6-Zweig des *N*-Glykans ein GlcNAc-1-Phosphat an einen Mannoserest an. GlcNAc wird schließlich im TGN durch die GlcNAc-1-Phosphodiesterase entfernt, was zur Freilegung des M6P-Restes führt. (B) Eine zweite Phosphorylierung kann im α -1,3-Zweig der *N*-Glykankette erfolgen. (Abkürzungen: Glc = Glukose, GlcNAc = N-Acetylglukosamin, Man = Mannose, P = Phosphat, U = Uridin)

Die GlcNAc-1-Phosphodiesterase ist ein 68 kDa Typ I-Transmembranprotein, das Tetramere bildet (Kornfeld *et al.*, 1999). Die *N*-Glykane lysosomaler Enzyme können strukturell verschieden sein und ein oder auch zwei Phosphatgruppen enthalten. Der erste Mannoserest, der phosphoryliert wird, befindet sich im α -1,6-Zweig, die zweite Phosphorylierung ist in beiden α -1,3-Zweigen möglich (Abbildung 1.3) (Goldberg & Kornfeld, 1981; Varki & Kornfeld, 1983). Die Phosphorylierung der Mannosereste lysosomaler Enzyme erfolgt bevor die Oligosaccharide durch die Golgi-Mannosidase I und weitere Enzyme des Golgi-Apparates zu komplexen Oligosacchariden prozessiert werden können. Daher sind die *N*-Glykane an lysosomalen Enzymen meist mannosereiche Oligosaccharide und seltener liegen *N*-Glykane des hybriden oder komplexen Typs vor (Hasilik & von Figura, 1981; Lazzarino & Gabel, 1989; Varki & Kornfeld, 1983).

Der Vorgang der Bildung von M6P-Resten setzt die spezifische Erkennung der lysosomalen Hydrolasen durch die GlcNAc-1-Phosphotransferase voraus. Das Erkennungssignal besteht aus einer Gruppe benachbarter Lysinreste auf der Oberfläche der Hydrolasen, die ein dreidimensionales Strukturmotiv bilden (Cuozzo *et al.*, 1995).

1.3 Mannose-6-Phosphat-abhängiger Transport von löslichen lysosomalen Enzymen

Im TGN werden Proteine in Vesikel verpackt und zu ihren verschiedenen Zielorten gebracht. M6P-markierte Proteine werden im TGN von M6P-Rezeptoren (MPR) erkannt, die den Transport zu Lysosomen vermitteln.

Zwei verschiedene MPR sind bekannt: der 46 kDa Kationen-abhängige MPR46 und der 300 kDa multifunktionelle Kationen-unabhängige MPR300 (Dahms *et al.*, 2008; Ghosh *et al.*, 2003). MPR erkennen und binden M6P-modifizierte lysosomale Proteine und befördern sie in Clathrin-umschlossenen Vesikeln zu Endosomen. Dort dissoziieren die MPR aufgrund des niedrigen pH-Wertes von den lysosomalen Enzymen und kehren zum TGN zurück, wo sie erneut lysosomale Enzyme binden und transportieren können (Braulke & Bonifacino, 2009).

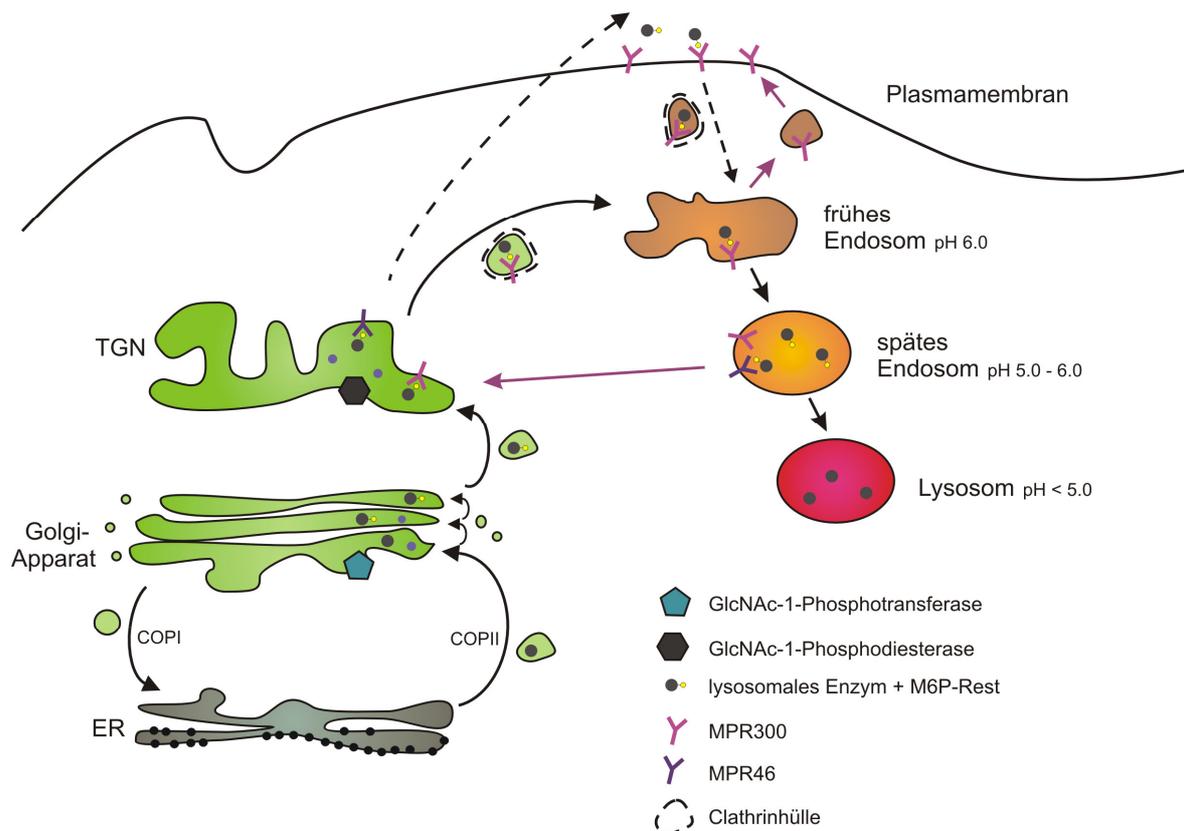


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des M6P-abhängigen Transports von löslichen lysosomalen Enzymen. Neusynthetisierte lysosomale Enzyme erhalten im Golgi-Apparat M6P-Reste, die durch MPR im TGN erkannt werden. Durch vesikulären Transport gelangen die MPR-gebundenen Enzyme zu frühen Endosomen und werden von dort weiter zu den Lysosomen transportiert. MPR300 an der Plasmamembran können ebenfalls M6P-haltige Proteine binden und zu Endosomen befördern.

Einige M6P-haltigen Proteine binden nicht im Golgi-Apparat an MPR und werden fehl-sortiert und aus der Zelle herausbefördert. Sezernierte, extrazelluläre M6P-haltige Proteine können jedoch an MPR300 binden, die auch an der Plasmamembran lokalisiert sind, und werden über frühe und späte Endosomen zu Lysosomen transportiert (Abbildung 1.4). MPR46 sind nicht an der Internalisierung von lysosomalen Enzymen an der Plasmamembran beteiligt (Hille-Rehfeld, 1995).

1.4 Aufbau und Funktion der GlcNAc-1-Phosphotransferase

Die GlcNAc-1-Phosphotransferase ist ein hexamerer Enzymkomplex bestehend aus jeweils zwei membrangebundenen α - und β -Untereinheiten und zwei löslichen γ -Untereinheiten ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) (Bao *et al.*, 1996a). Die humane γ -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase kodiert ein lösliches Protein von 305 AS mit zwei *N*-Glykosylierungsstellen. Die γ -Unter-

einheit wird durch das Gen *GNPTG* mit der chromosomalen Lokalisation 16p13.3 kodiert (Raas-Rothschild *et al.*, 2000). Die α - und β -Untereinheit werden durch das gemeinsame Gen *GNPTAB* mit der chromosomalen Lokalisation 12q23.2 kodiert. Sie werden als gemeinsames Typ III-Membranprotein synthetisiert und von einer bisher unbekannt Protease zur reifen α - und β -Untereinheit gespalten (Kudo *et al.*, 2005; Tiede *et al.*, 2005b). Die α - und β -Untereinheiten sollen das katalytische Zentrum der GlcNAc-1-Phosphotransferase beinhalten (Kudo *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007). Die proteolytische Spaltung ist essentiell für die katalytische Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase (Kudo & Canfield, 2006). Die γ - und α -Untereinheiten bilden über Disulfidbrücken Homodimere (Abbildung 1.5) (Bao *et al.*, 1996a).

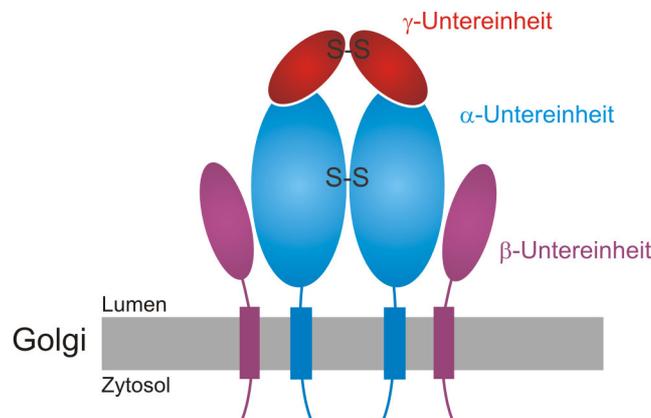


Abbildung 1.5: Modell zum Aufbau des GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplexes. Der hexamere Komplex ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) ist über die Transmembrandomänen der α - und β -Untereinheiten in den Membranen des *cis*-Golgi-Apparates verankert. Die α - und γ -Untereinheiten sind über Disulfidbrücken verknüpft. Wie die γ -Untereinheiten mit den α - und β -Untereinheiten assoziiert sind, ist nicht bekannt.

Die GlcNAc-1-Phosphotransferase muss drei Substrat-Bindestellen beinhalten: i) für den Phosphatdonor UDP-GlcNAc, ii) für mannosereiche Oligosaccharide lysosomaler Enzyme, die mit M6P-Resten modifiziert werden müssen und iii) für die spezifische Bindungsstelle lysosomaler Proteine.

Es wurde zunächst angenommen, dass die γ -Untereinheit die Erkennungsdomäne für lysosomale Enzyme beinhaltet (Bao *et al.*, 1996b; Kornfeld & Sly, 2001). Jedoch wurde in verschiedenen experimentellen Ansätzen keine Bindung der γ -Untereinheit mit lysosomalen Enzymen nachgewiesen (Pohl *et al.*, 2009b; Tiede *et al.*, 2005b). Stattdessen wird der γ -Untereinheit eine regulatorische Funktion zugeschrieben (Pohl *et al.*, 2010).

1.4.1 Modulare Struktur des α/β -Vorstufenproteins der GlcNAc-1-Phosphotransferase

Das α/β -Vorstufenprotein besteht aus 1256 AS und besitzt zwei Transmembrandomänen. Der N- und C-Terminus ragen ins Cytosol. Die große luminaire Domäne des α/β -Vorstufenproteins hat eine komplexe modulare Struktur aus mindestens sechs Domänen unbekannter Funktion (Abbildung 1.6). Diese haben Ähnlichkeiten zu Kapselbiosyntheseproteinen, Lin-12/Notch-repeat-ähnlichen und DMAP1-Bindungs-ähnlichen Domänen. Die modulare Organisation des α/β -Vorstufenproteins ist in äquivalenten Proteinen bei Maus, Ratte, Hund, Huhn und Zebrafisch konserviert. Die Schwarzbäuchige Taufliege, auch als Fruchtfliege bezeichnet, (*Drosophila melanogaster*) besitzt ein ähnliches Protein (CG8027), das keine Zwischendomäne in der luminalen N-terminalen Kapselbiosyntheseprotein-ähnlichen Domäne, nur eine Lin-12/Notch-Repeat-ähnliche Domäne und keine DMAP1-Bindungs-ähnliche Domäne beinhaltet (Tiede *et al.*, 2005b).

Das α/β -Vorstufenprotein besitzt zwei kurze zytoplasmatische Domänen (N-terminal 19 AS, C-terminal 21 AS), zwei Transmembrandomänen (N- und C-terminal je 23 AS) und eine große luminaire Schlaufe (1170 AS).

Die luminaire Schlaufe besitzt N-terminal einen Bereich (AS 60-430), der Homologie zu Kapselbiosyntheseproteinen von einzelligen Amöben (*Dictyostelium discoideum*, *Entamoeba histolytica*) und Bakterien (*Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria meningitidis*) besitzt. Da diese Kapselbiosyntheseproteine, wie das *Serogroup X Capsule Biosynthesis Proteins A* (XcbA) aus *Neisseria meningitidis*, UDP-GlcNAc binden und am Transfer von GlcNAc-1-Phosphat in die Bakterienkapsel involviert sind (Tzeng *et al.*, 2003), wird angenommen, dass die N-terminale luminaire Domäne der α -Untereinheit (AS 60-430) die Bindungsstelle für UDP-GlcNAc beinhaltet. Die Kapselbiosyntheseprotein-ähnliche Domäne enthält eine große Insertion (AS 102-324), die in den Kapselbiosyntheseproteinen von Amöben und Bakterien und in GC8027 von *Drosophila melanogaster* nicht vorkommt. Diese Domäne ist spezifisch für Säugetiere und besitzt keine Homologien zu Proteinen mit bekannter Funktion.

Die Kapselbiosyntheseprotein-ähnliche Domäne wird gefolgt von zwei Lin-12/Notch-Repeat-ähnlichen Domänen (AS 430-472 und AS 473-539). Lin-12/Notch-Repeat-Module werden in der Notch-Rezeptorfamilie gefunden, wo sie die Liganden-induzierte Proteolyse des Notch-Rezeptors regulieren (Kimble & Simpson, 1997). Proteine der Notch-Rezeptor-

familie enthalten jeweils drei dieser Lin-12/Notch-Repeat-Module, die sich in direkter Nachbarschaft befinden. Ein Modul enthält sechs Cysteinreste, die an der Bildung von drei Disulfidbrücken beteiligt sind, und drei Aspartat- und Asparaginreste, die wichtig für die Bindung von Ca^{2+} sind und dadurch zur Faltung des Proteins beitragen (Aster *et al.*, 1999; Vardar *et al.*, 2003). In den zwei Lin-12/Notch-Repeat-Domänen des α/β -Vorstufenproteins befinden sich jeweils sechs Cystein-, vier Asparagin- und vier Aspartatreste.

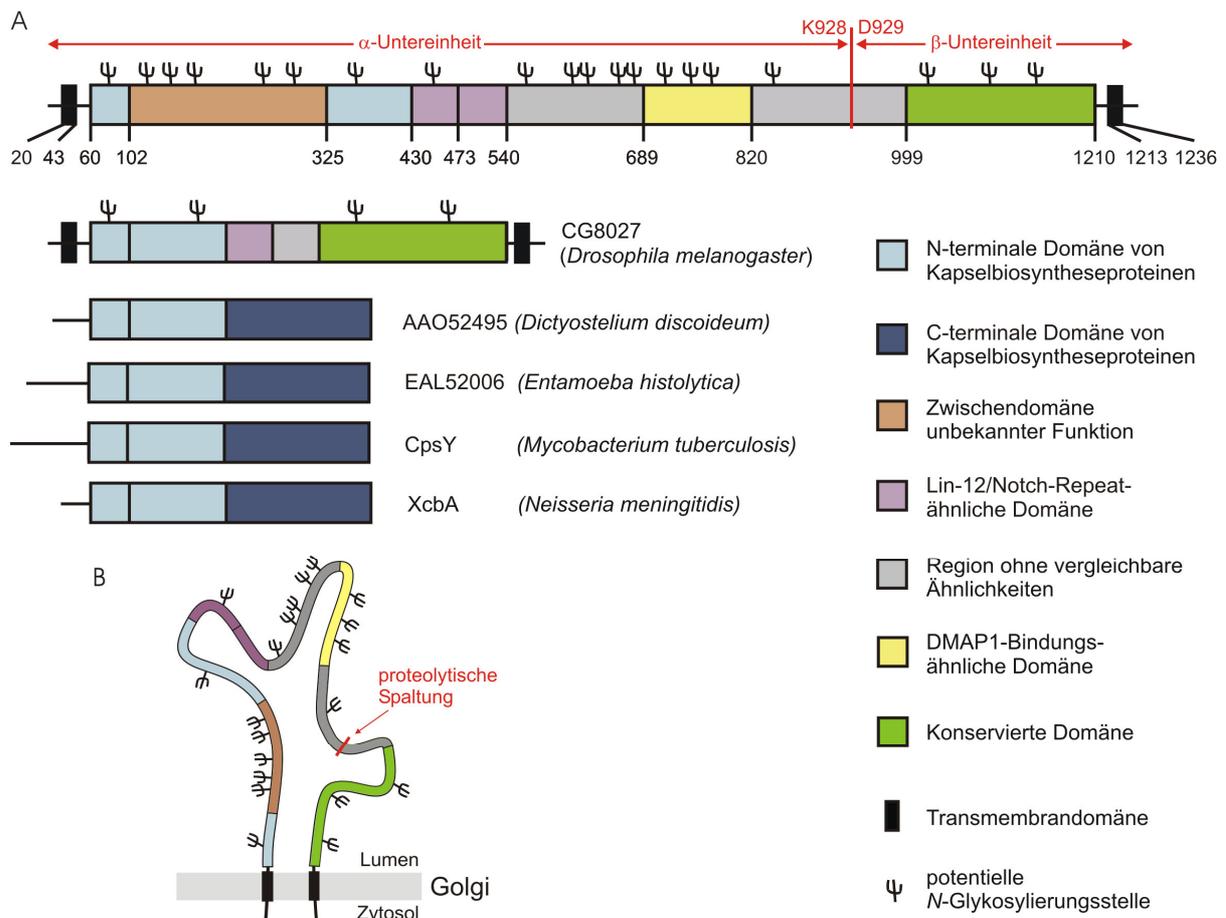


Abbildung 1.6: Domänen-Organisation des α/β -Vorstufenproteins. (A) Die Zahlen der domänenbegrenzenden AS, potentielle N-Glykosylierungsstellen und die proteolytische Schnittstelle (rot) sind angegeben. Vergleiche mit *Drosophila* CG8027 und Kapsel-Biosyntheseproteinen verschiedener Organismen sind angezeigt. (B) Die angenommene Topologie bei Insertion in die Membranen des Golgi-Apparates ist verdeutlicht.

An die zwei Lin-12/Notch-Repeat-ähnlichen Domänen schließt sich eine große Domäne an, die keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen zeigt und die nicht konserviert zu anderen Spezies ist (AS 540-998). Unterbrochen wird die nicht-konservierte Domäne durch eine Domäne, die Ähnlichkeiten zu DMAP1-Bindungsdomänen zeigt (AS 689-819). DMAP1

(*DNA methyltransferase 1-associated protein 1*) ist involviert in die Regulation der Transkription. Es bindet an DNMT1 (*DNA methyltransferase 1*), HDAC2 (*histone deacetylase 2*) und den transkriptionellen Corepressor TSG101. Damit ist DMAP1 selbst ein Corepressor der Transkription und erhöht durch Interaktion mit anderen Proteinen deren Aktivität als Repressoren (Rountree *et al.*, 2000). Die Funktion der DMAP1-Bindungsähnlichen Domäne für die Phosphorylierung von lysosomalen Proteinen ist unklar.

Die Spaltstelle ist zwischen AS K928 und D929 lokalisiert und liegt damit in der nicht-konservierten Domäne (Kudo & Canfield, 2006).

Das α/β -Vorstufenprotein enthält außerdem 20 potentielle *N*-Glykosylierungsstellen, 17 davon in der α -Untereinheit und drei in der β -Untereinheit. Diese hohe Glykosylierung ist eher ungewöhnlich für ein Golgi-Apparat-residentes Protein und wird sonst eher bei lysosomalen Proteinen gefunden und dient dort dem Schutz vor Degradation durch saure Hydrolasen (Kundra & Kornfeld, 1999).

1.4.2 Defekte der GlcNAc-1-Phosphotransferase

Lysosomale Speichererkrankungen werden von genetischen Defekten verursacht, die meist eine oder mehrere lysosomale Hydrolasen betreffen. Eine sehr schwere Form einer lysosomalen Speicherkrankheit liegt bei der seltenen Mukopolidose II (I-Cell-Disease, ML II, MIM# 252500) vor, die durch Mutationen im *GNPTAB*-Gen hervorgerufen wird. Eine mildere Form der Erkrankung ist die Mukopolidose III (pseudo-Hurler-Polydystrophie, ML III, MIM# 252600), die auf Mutationen im *GNPTG*-Gen zurückzuführen ist (Braulke *et al.*, 2008; Kornfeld & Sly, 2001). Bei vollständigem Verlust der GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität (ML II) können keine M6P-Sortierungssignale an lysosomalen Proteinen synthetisiert werden, was die Bindung der lysosomalen Proteine im TGN an die M6P-Rezeptoren verhindert und zu einer verstärkten Sekretion führt (Hasilik *et al.*, 1981; Reitman & Kornfeld, 1981). Die Folge sind Zelltyp-abhängige Dysfunktionen der Lysosomen, die zur Akkumulation von nicht-abbaubaren Makromolekülen in Lysosomen und zu schwerwiegenden Organversagen führen. In Fibroblasten von Patienten mit ML II zeigt sich das Speichermaterial als zytoplasmatische Einschlüsse (*inclusions*), was der Krankheit den Namen „*inclusion cell*-, I-Cell-Disease“ gab (Leroy *et al.*, 1972). ML II-Patienten sind äußerlich charakterisiert durch vergrößerte Gesichtszüge, stark reduziertes Körperwachstum sowie skelettale Abnormalitäten, hervorgerufen durch eine schwere

Dysostosis multiplex. Hinzu kommen zunehmende psychomotorische Retardierung, generalisierte Hypotonie und kardiorespiratorische Komplikationen, was letztendlich mit einem frühzeitigen Tod zwischen dem fünften und achten Lebensjahr einhergeht (Kornfeld & Sly, 2001; Spranger *et al.*, 2002).

Im Arbeitskreis von Prof. T. Braulke, UKE wurde ein *knock in* (ki) Mausmodell für ML II generiert (Kollmann *et al.*, 2010). In Anlehnung an eine bekannte humane Mutation in *GNPTAB* (c.3145insC), die einen kompletten Aktivitätsverlust der GlcNAc-1-Phosphotransferase zeigte (Tiede *et al.*, 2005b), wurde in das murine *Gnptab* die Mutation c.3082insC eingefügt. Diese frameshift Mutation erzeugte ein verkürztes α/β -Vorstufenprotein (p.G1028RfsX16). An embryonalen Mausfibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts*, MEF) dieser Tiere konnte gezeigt werden, dass keine M6P-Reste gebildet werden und es zu einer Fehlsortierung löslicher lysosomaler Enzyme kommt. Die ML II-Mäuse zeigten zelluläre Einschlüsse, starke Knochenveränderungen und eine progressive Neurodegeneration (Dr. K. Kollmann, unveröffentlichte Daten).

2 ZIELSTELLUNG

Die GlcNAc-1-Phosphotransferase ist ein hexamerer Enzymkomplex ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$), der den ersten Schritt bei der Bildung von Mannose-6-Phosphatresten (M6P) an den Zuckerketten von löslichen lysosomalen Enzymen katalysiert. M6P-Reste sind in vielen Zellen für den rezeptorabhängigen Transport lysosomaler Enzyme zum Lysosom essentiell. Defekte in den Genen der GlcNAc-1-Phosphotransferase-Untereinheiten führen zu schweren lysosomalen Speichererkrankungen, die biochemisch durch Fehlsortierung lysosomaler Enzyme und lysosomale Dysfunktion gekennzeichnet sind. Die α - und β -Untereinheit werden als gemeinsames Transmembran-Typ III-Vorstufenprotein synthetisiert und durch proteolytische Spaltung durch eine bisher unbekannte Protease aktiviert. Das α/β -Vorstufenprotein enthält verschiedene modulare Domänen, deren Bedeutung für die GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität unbekannt ist.

- (A) Zunächst sollten verschiedene Konstrukte der Domäne des α/β -Vorstufenproteins, die als UDP-GlcNAc-Bindungsstelle vermutet wurde (AS 60-430), als Fusionsproteine generiert werden, die Bindungs- und Copräzipitationsstudien erlauben, um die Bindungsstelle für das Substrat UDP-GlcNAc zu identifizieren. Die α -Untereinheit ist in der Lage Dimere zu bilden. Der Cysteinrest, der für die Dimerisierung verantwortlich ist, sollte identifiziert werden.
- (B) Die Identifizierung der Protease, die das α/β -Vorstufenprotein spaltet und damit die GlcNAc-1-Phosphotransferase aktiviert, stand im Mittelpunkt dieser Arbeit. Es sollten dazu zunächst polyklonale Antikörper gegen die α - und β -Untereinheiten der GlcNAc-1-Phosphotransferase hergestellt werden, die den Expressionsnachweis des α/β -Vorstufenproteins und deren Aktivitätszustand (inaktive Vorstufe vs. reife Untereinheitsprodukte) ermöglichen. Der Identifizierung der Protease sollten sich Untersuchungen zum Einfluss der Spaltung auf die Aktivität des GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplexes und die Sortierung von lysosomalen Enzymen anschließen.

Da das α/β -Vorstufenprotein eine ungewöhnlich hohe Anzahl an potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen enthält, sollten tatsächlich genutzte *N*-Glykosylierungsstellen verschiedener Domänen identifiziert und ihre Rolle für bestimmte Eigenschaften der GlcNAc-1-Phosphotransferase-Domänen untersucht werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Autoklav	5050ELC und 3850EL	Systemec GmbH, Wettenberg
CO ₂ -Inkubator	InCu Safe Mco-17AIC	Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf
	Innova [®] CO-170P-230	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
	Heraeus B5060 EC-CO2	Heraeus Holding GmbH, Hanau
β-Counter	TRI-CARB 2900TR	Canberra Packard Central Europe GmbH, Schwadorf (Österreich)
γ-Counter	1470 Wizard	PerkinElmer, Inc., Waltham (USA)
Drehrad	Rotator 2-1175	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
	Rotavapor-R	Büchi Labortechnik AG, Flawil (Schweiz)
Einfrierhilfe	Cryo 1 °C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Roskilde (Dänemark)
Eismaschine	AF10	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills (USA)
Elektrophoresekammer (Agarosegele)	Agagel Midi Wide	Biometra GmbH, Göttingen
	40-0911 und 40-1214	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophorese- <i>Power Supply</i>	EPS 1001	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Nürnbergrecht
	Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen
Gelkammer (SDS-PAGE)	SE600-1S-1.5 und SE250-10A-.75	Hofer, Inc., Holliston (USA)
Geltrockner	GelAir Dryer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heizblock	MHR23	HLC Bio Tech, Bovenden
	BT100	Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden
	Rotilabo [®] -Block Heater H250	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Imager	Molecular Imager [®] / ChemiDoc [™] XRS	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Kontaminationsmonitor	CoMo 170	Graetz Strahlungsmeßtechnik GmbH, Altena
Magnetrührer	MAG-H	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter
	MR 80 und MR Hei-Mix-L	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim
Mikroskop	Lichtmikroskop Zeiss Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen
	Konfokales Fluoreszenzmikroskop Leica DMIRE2	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Mikrowelle	Whirlpool Promicro 825	Bauknecht Hausgeräte GmbH, Stuttgart
pH-Meter	MP220	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
	Ultrospec 1100pro	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Nürnberg
Pipetten	<i>Research und Reference</i> verschiedener Größen	Eppendorf AG, Hamburg
	<i>Pipetman</i> verschiedener Größen	Gilson Inc., Middleton (USA)
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Röntgenfilm-Entwicklermaschine	Optimax Typ TR, Modell 1170-1-0000	Protec Medizintechnik GmbH & Co. KG, Oberstenfeld
Sterilbank	HeraSafe KS12	Heraeus Holding GmbH, Hanau
	Typ BSB3A (1986)	Gelaire® Flow Laboratories GmbH, Meckenheim
Schüttler	Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
	Rocky	Fröbel Labortechnik GmbH, Wasserburg
Schüttelinkubator	Innova™ 4230 und Innova™ 4080	New Brunswick Scientific, Edison (USA)
Stickstofftank	Airpege 55	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf
Thermocycler	RealTime MX3000P®	Stratagene Europe, Amsterdam (Niederlande)
	Tpersonal	Biometra GmbH, Göttingen
	Mastercycler und Mastercycler, Gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Transferkammer	TE62 und TE22	Hoefer, Inc., Holliston (USA)

Ultraschallgerät	Sonopuls HD60	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin
UV-Transilluminator	Darkroom Evo III	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt
Vortex Mixer	Genie 1/2 7-2020	Scientific Industries, Inc., New York (USA) neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Waage	AC100 (Feinwaage) BP2100 S und TE2101 OLX-3000	Mettler-Toledo GmbH, Gießen Sartorius AG, Göttingen Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG, Bremen
Wasserbad	C10 GFL [®] 1086	Schuett-Biotec GmbH, Göttingen Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Vakuumpumpe	PC 2004 VARIO	Vacuubrand GmbH + Co KG, Wertheim
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R, 5417 R, 5424, 5702 R und 5804 R MC6 Centrifuge Ultrazentrifuge Discovery M120	Eppendorf AG, Hamburg Sarstedt AG & Co., Nümbrecht Kendro Laboratory Products International Sales, Hanau

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Aktivkohle-Filterpapiere Rotilabo [®] Ø 90 cm	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Deckgläschen	Glaswarenfabrik Karl Heckt KG, Sondheim
Einmalhandschuhe (Latex, Nitril)	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Einwegpipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Einwegzellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Eppendorf-Reaktionsgefäße 0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Frischhaltefolie	Ecopla, Le Touvet (Frankreich)
Kanülen	Becton Dickensen GmbH, Heidelberg
Kryoröhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Linsenpapier MN 10 B	Carl Zeiss AG, Oberkochen

Nitrocellulosemembran	Whatman GmbH, Daßel
Miracloth [®]	Merck KGaA, Darmstadt
Objektträger	Engelbrecht, Kassel
Parafilm [®]	Pechiney Plastic Packaging, Chicago (USA)
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
PD-10-Ionenaustauschersäule	GE Healthcare, München
Petrischalen Ø 3,5 cm; 6 cm; 10 cm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen verschiedener Größe	Eppendorf AG, Hamburg Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter verschiedener Größe	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht Sorenson Bioscience, Salt Lake City (USA)
Röntgenfilme (Amersham Hyperfilm [™] MP)	GE Healthcare, München
Säulen, leer (5 ml) mit Verschlüssen	MoBiTec GmbH, Göttingen
Skalpelle	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritzen 5 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritzen 1 ml	Becton Dickensen GmbH, Heidelberg
Sterilfilter	VWR International GmbH, Darmstadt
<i>Stripes</i> /Deckel für Realtime-PCR	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Darmstadt
Szintillationsröhrchen	PerkinElmer, Inc., Waltham (USA)
UV-Küvetten	Eppendorf AG, Hamburg
Blottingpapier (0,35 mm)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Zellkulturflaschen 25 cm ² und 75 cm ²	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturplatten 6/12 <i>well</i>	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster (Österreich)

3.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Aceton	Merck KGaA, Darmstadt
Acrylamid (Rotiphorese [®] Gel 30)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Affigel 10	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Agar	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Agarose, für präparative Gele	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
für analytische Gele	AppliChem GmbH, Darmstadt
N-Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal (ALLN)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Amphotericin B	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Bicine	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Bradford-Reagenz (Roti [®] Quant)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Brefeldin A (BFA)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
<i>BugBuster[®] Protein Extraction-Reagenz</i>	Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt
Carbenicillin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Chloroform	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Cholesterol	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Coomassie [®] Brilliant blue R	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
2,5-Diphenyloxazol (PPO)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dithiotreitol (DTT)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l D-Glucose; L-Glutamin; ohne Pyruvat	Invitrogen GmbH, Darmstadt
<i>trans</i> -Epoxysucciny-L-leucyl-amido-(4-guanidino)-butan (E64)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol, absolut (≥ 99,9 %)	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Ethanol (99 %), vergällt mit 1 % Methylethylketon	Walter-CMP GmbH & Co. KG, Kiel
Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
F-12 Nutrient Mixture Ham (Ham's F12) mit L-Glutamine	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Ficoll	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
GFP-Trap [®] -Agarose	ChromoTek GmbH, Martinsried
GlutaMAX [™] -I (100 ×)	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt

Glycin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
HEPES	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
jetPEI TM DNA Transfektionsreagenz	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Kaliumacetat (KAc)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
N-Laurylsarcosin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
<i>low density lipoprotein</i> (LDL), human in Kaliumbromid (KBr)-Lösung	J. Heeren, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, UKE Hamburg
Leupeptin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Lipofectamine TM LTX und Plus TM Reagenz	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Lithiumchlorid (LiCl)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Luminol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Methanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim
L-Methionin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Mevalonolacton	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Milchpulver (<i>blotting grade</i>)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Mowiol [®] 4-88	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat (NaAc)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumcyanoborhydrid (NaCNBH ₃)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Natriumdeoxycholat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Neugeborenen-Kälberserum (NBKS)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
4-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
4-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
4-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Nonidet P-40 (NP-40)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Natriumoleat	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen

OptiMEM® I Reduced Serum Medium mit L-Glutamine, HEPES, ohne Phenolrot	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
PBS 7,4 (10 ×) ohne CaCl ₂ , MgCl ₂	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Pefabloc	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml) (P/S)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Pepstatin A	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Phenol-Lösung, pH 7.9 ± 0.2	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Proteaseinhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Protein G-Sepharose	GE Healthcare, München
Proteinstandard (2 mg/ml BSA)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
<i>Reactive Green-19</i> -Agarose	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
RNase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Rotizint® eco plus	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
[³⁵ S]-Methionin (1000 Ci/mmol)	Hartmann Analytics GmbH, Braunschweig
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Trisma® Base (Tris)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Trypsin/EDTA 0,05 %	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tween-20	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
UDP-Hexanolamin	Glycoteam GmbH, Hamburg
Wasserstoffperoxid, 30 %	Merck KGaA, Darmstadt
Xylencyanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Enzyme und Molekulargewichtstandards

DNA-Standard, 1 kb-Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DNA-Standard, 100 bp-Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DNA-Standard, <i>FastRuler™ Middle Range</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Endoglykosidase H (Endo H)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

<i>FastAP</i> TM Alkalische Phosphatase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>FastDigest</i> [®] Restriktionsenzyme	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Full-Range Rainbow</i> TM Protein-Standard	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Nürnberg
Lysozym	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
<i>Maxima</i> TM Probe qPCR Master Mix	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
N-Glykosidase F (PNGase F)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>Page Ruler</i> TM Protein-Standard	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Phusion</i> [®] -Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
RNase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Kits

GeneJET TM Gel Extraction Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
GeneJET TM Plasmid MiniPrep Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
GeneJET TM RNA Purification Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
High Capacity cDNA ReverseTranscription Kit	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
pcDNA TM 3.1 Directional TOPO [®] Expression Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TaqMan [®] Gene Expression Assay	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt

3.1.4 Bakterienstämme

Tabelle 3.1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 nupG recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16 rpsL</i>(Str^R) <i>endA1</i> λ⁻</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>E. coli</i> BL21	<i>B dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i>	Merck KGaA, Darmstadt

3.1.5 Vektoren

Tabelle 3.2: Verwendete Vektoren und cDNA-Konstrukte

Plasmid	Eigenschaften	Bezugsquelle
pcDNA TM 3.1D/V5-His TOPO [®]	eukaryotischer Expressionsvektor	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pEGFP-N1	eukaryotischer Expressionsvektor mit cDNA von GFP	Promega GmbH, Mannheim
pGEX 4T-1	prokaryotischer Expressionsvektor mit cDNA von GST	GE Healthcare, München
pET28a(+)	prokaryotischer Expressionsvektor	Novagen (Merck KGaA, Darmstadt)
pCMV6 Entry <i>MBTPS1</i>	eukaryotischer Expressionsvektor mit cDNA der S1P mit C-terminalem DDK- und c-Myc-tag	OriGene Technologies, Rockville (USA)
pcDNA TM 6/V5-His <i>GNPTAB</i> -Myc	eukaryotische Expressionsvektoren mit cDNA des GlcNAc-1-Phosphotransferase α/β -Vorstufenproteins mit C-terminalem c-Myc-tag	wurden von der Arbeitsgruppe bereitgestellt
pEF5/FRT/V5-D <i>GNPTAB</i> -Myc		

3.1.6 Zellen und Zellkulturmedien

Es wurden für die jeweiligen Zelllinien optimierte Medien verwendet, um ein ideales Wachstum der Zellen zu erreichen.

Tabelle 3.3: Verwendete Zelllinien

Name	Kulturmedium	Ursprung	Bezugsquelle
BHK	DMEM + 10 % FKS + 1 % P/S	Babyhamster-Nierenzellen	ATCC, Rockville (USA)
Hela	DMEM + 10 % FKS + 1 % P/S	humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms	ATCC, Rockville (USA)
CHO-7	DMEM/Ham's F12 (1:1) + 5 % FKS + 1 % P/S	Ovarienzellen des chinesischen Hamsters	Goldstein & Brown, Texas (USA)
SRD-12B	DMEM/Ham's F12 (1:1) + 5 % FKS + 1 % P/S + 50 μ M NaMevalonat + 20 μ M NaOleat + 5 μ g/ml Cholesterol	CHO-K1 (Ovarienzellen des chinesischen Hamsters), Site-1-Protease-defizient	Goldstein & Brown, Texas (USA) (Rawson <i>et al.</i> , 1998)

3.1.7 Antikörper

Westernblot

	Verdünnung	Herkunft/Referenz
<i>Primärantikörper (Spezies)</i>		
α GFP (Maus)	1:1.000	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
α MnSOD (Kaninchen)	1:1.000	Upstate (Millipore GmbH, Schwalbach/Ts.)
<i>single chain fragment</i> α M6P - scFv M6P-1	1:1.000	Müller-Loennies <i>et al.</i> , 2010
α c-Myc (Maus)	1:1.000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
α GlcNac-1-Phosphotransferase β -Untereinheit (Kaninchen)	1:500	Generierung im Rahmen dieser Arbeit (Pohl <i>et al.</i> , 2010)
<i>Sekundärantikörper</i>		
Ziege α Maus IgG HRP	1:6.000	Dianova GmbH, Hamburg
Ziege α Kaninchen IgG HRP	1:10.000	Dianova GmbH, Hamburg

Immunpräzipitation

	Verdünnung	Herkunft/Referenz
α Cathepsin Z (Maus)	1:50	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt

Immunfluoreszenzmikroskopie

	Verdünnung	Herkunft/Referenz
<i>Primärantikörper (Spezies)</i>		
α PDI (Maus)	1:500	Stressgen, Ann Arbor (USA)
α GM130 (Maus)	1:250	BD Biosciences, San Jose (USA)
α GlcNac-1-Phosphotransferase β -Untereinheit (β -UE) (Kaninchen)	1:100	Generierung im Rahmen dieser Arbeit (Pohl <i>et al.</i> , 2010)
<i>Sekundärantikörper</i>		
Ziege α Maus Alexa Fluor [®] 546	1:400	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ziege α Kaninchen Alexa Fluor [®] 488	1:400	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.1.8 siRNA-Konstrukte, Primer und Sonden

Die siRNA-Konstrukte wurden von Invitrogen synthetisiert und als Lyophilisate geliefert. Sie wurden nach Herstellerangaben gelöst und bei -20 °C gelagert. Als Kontrolle diente eine universelle Kontroll-siRNA mit hohem GC-Gehalt.

Tabelle 3.4: Verwendete siRNA-Konstrukte

siRNA	Sequenz 5' → 3'
siRNA <i>MBTPS1</i>	s: CAGAUGUGCUCUGGCAGAUGGGGAUA as: UAUCCCAUCUGCCAGAGCACAUUCUG

(s = *sense*, as = *antisense*)

Für die Realtime-PCR wurden vorgefertigte TaqMan[®]-Primer bzw. -Sonden von der Firma Applied Biosystems verwendet. Die Oligonukleotidsequenzen sind nicht erhältlich.

Tabelle 3.5: Verwendete TaqMan[®]-Primer bzw. -Sonden

Gen (Produkt)	Spezies	Assay (Sonde + Primer)
<i>MBTPS1</i> (S1P)	human	Hs00186886_m1
<i>ACTB</i> (β-Aktin)	human	Hs99999903_m1
<i>Actb</i> (β-Aktin)	Maus	Mm00607939_s1

Zur Klonierung und Sequenzierung verwendete Primer wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang in Tabelle 8.1 bis 8.10 zu finden.

3.1.9 Software

Tabelle 3.6: Verwendete Software

Name	Anwendung	Version	Firma
Adobe Photoshop	Immunfluoreszenz-Auswertungen	7.0	Adobe Systems, München
Leica Confocal Software	Bedienung Konfokal-Mikroskop	2.61	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Office 2000	Textverarbeitung, statistische Berechnungen	9.0	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Quantity One	Westernblot-Auswertungen	2.61	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CorelDraw [®]	Anfertigen von Grafiken	11.6	Corel Cooperation, Unterschleißheim
MxPro	Realtime-PCR	4.6.1	Stratagene Europe, Amsterdam (Niederlande)

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 *E. coli*-Stammhaltung

LB-Medium:	LB-Platten:
10 g Trypton/Pepton	15 g/l Agar in LB-Medium
5 g Hefeextrakt	in Ø 10 cm Kulturschalen
10 g NaCl	

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht im Schüttelinkubator bei 250 Upm und 37 °C. Für die Plasmidselektion wurden die Antibiotika Carbenicillin bei Ampicillin-Resistenz (100 mg/l) und Kanamycin (50 mg/l) verwendet. Zur kurzzeitigen Lagerung der Bakterienklone bei 4 °C wurden LB-Agarplatten mit Antibiotikum verwendet. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden so genannte Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden 300 µl Glycerin (50 %) mit 700 µl einer Übernachtskultur gemischt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.2.1.2 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

Chemokompetente *E. coli* TOP10 oder BL21 (100 µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 µg Plasmid-DNA bzw. dem Ligationsansatz gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30 s bis 1 min bei 42 °C und einer weiteren Inkubation von 5 min auf Eis wurden 500 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz 20 min bei 37 °C und 250 Upm geschüttelt. Ein Teil des Transformationsansatzes wurde auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.3 Plasmid-Isolierung aus *E. coli*

Plasmidisolierung über eine Säule (*GeneJET*TM *Plasmid MiniPrep*)

Bakterien des gewünschten Stammes wurden in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht angezogen. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem *GeneJET*TM *Plasmid MiniPrep Kit* nach Herstellerangaben.

Plasmidisolierung im Midi-Maßstab (Birnboim & Doly, 1979)

Midi I:	Midi II:	Midi III:
50 mM Tris/HCl (pH 8)	0,2 M NaOH	2,5 M KAc
	1 % SDS	11,5 % Essigsäure

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden Bakterien in 50 ml LB-Medium über Nacht angezogen. Die Zellen wurden bei $4.500 \times g$ für 15 min zentrifugiert und das Zellpellet in 4,5 ml Midi I resuspendiert. Es wurden 0,5 ml Lysozym (10 mg/ml) zugeben und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml Midi II wurde die Suspension vorsichtig gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert, wobei ein klares Lysat entstand. Zur Neutralisation wurden 7,5 ml Midi III zugegeben und wiederum vorsichtig invertiert, wobei sich ein weißer Niederschlag bildete. Durch anschließende Zentrifugation ($4.500 \times g$, 15 min, 4°C) wurden die Zelltrümmer sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen durch Miracloth[®] filtriert. Die anschließende Zugabe von 0,6 Vol Isopropanol und eine 10-minütige Inkubation auf Eis bewirkte die Fällung vorhandener Nukleinsäuren. Diese wurden bei $4.500 \times g$, 4°C und 20 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Midi I gelöst und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Die folgende Zugabe von 1 ml 4 M LiCl und Zentrifugation ($20.000 \times g$, 0°C , 20 min) führte zur Fällung von RNA. Der Überstand wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, 5 ml eiskaltes Ethanol dazugegeben und die DNA bei -20°C über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation ($4.500 \times g$, 4°C , 20 min) wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 500 μl Midi I aufgenommen und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Zugabe von 10 μl RNase A (10 mg/ml) und eine Inkubation für 30 min bei 37°C entfernte restliche RNA. Proteine wurden mittels einer Phenolextraktion aus der wässrigen DNA-Lösung entfernt. Hierfür wurde die DNA-Lösung mit dem gleichen Volumen Phenol (pH 7,6) versetzt und auf dem Vortex 10 s gut gemischt. Nach Zugabe des gleichen Volumen Chloroform und 10 s vortexen wurde erneut zentrifugiert ($20.000 \times g$, 5 min). Der größte Teil der jetzt denaturierten Proteine sammelte sich in der Interphase. Die obere, wässrige Phase enthielt die DNA und wurde sorgfältig abgezogen. Die Phenol/Chloroform-Extraktion wurde so lange wiederholt bis keine Interphase mehr zu erkennen war. Anschließend wurde noch einmal nur mit Chloroform ausgeschüttelt, um vorhandenes Phenol zu entfernen. Durch Zugabe von 1/10 Vol 3 M NaAc (pH 5) und 2 Vol eiskaltem Ethanol und Inkubation bei -20°C über Nacht wurde die Plasmid-DNA gefällt. Nach

Zentrifugation ($20.000 \times g$, 30 min) wurde das Pellet einmal mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und schließlich in dest. Wasser gelöst. Durch diese Methode konnten je nach Plasmid bis zu 1 mg DNA gewonnen werden.

3.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die photometrische Messung von Nukleinsäurelösungen erfolgte bei 260 nm in einer UV-Küvette gegen dest. Wasser. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA bzw. von 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Reine DNA besitzt einen $OD_{260/280}$ -Quotienten von 1,8 und reine RNA einen $OD_{260/280}$ -Quotienten von 2,0.

3.2.1.5 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische kurze Nukleotidsequenzen und spalten die DNA in diesem Bereich. Die Restriktionsspaltung wurde einerseits als Methode zur Analyse von Plasmid-DNA und andererseits als vorbereitenden Schritt für eine anschließende Ligation verwendet.

Die Restriktion wurde nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

1 μg - 2,5 μg	Plasmid-DNA in dest. Wasser
$\times \mu\text{l}$	dest. Wasser
2 $\mu\text{l}/5 \mu\text{l}$	Reaktionspuffer ($10 \times$)
<u>1 $\mu\text{l}/2 \mu\text{l}$</u>	<u>FastDigest[®] Restriktionsendonuklease(n)</u>
Σ 20/50 μl	

Die Endkonzentration des Puffers im Ansatz soll normalerweise $1 \times$ betragen, in einigen Fällen auch weniger (z. B. bei einer Restriktion direkt nach einer PCR). Laut Hersteller kann 1 μl des entsprechenden Restriktionsenzym etwa 1 μg DNA schneiden. Je nachdem wie viel Plasmid-DNA verdaut werden sollte, musste die entsprechende Menge an FastDigest[®] Restriktionsendonuklease(n) zugegeben werden. Fehlende Volumina wurden mit dest. Wasser ausgeglichen. Der Ansatz wurde 15 min bei 37 °C inkubiert.

In einigen Fällen mussten die Restriktionsenzyme nach Beendigung der Spaltung inaktiviert und aus dem Ansatz entfernt werden. Dies erfolgte durch Aufreinigung mittels des *GeneJET[™] PCR Purification Kit* nach Herstellerangaben.

3.2.1.6 Dephosphorylierung von DNA

Vor einer Ligation kann es hilfreich sein den Vektor zusätzlich zu dephosphorylieren, um ein Schließen des Vektors ohne Einbau des Inserts zu verhindern. Die Ligase kann die komplementären Enden nicht mehr zusammenfügen, d. h. der Vektor kann nicht religieren und lineare DNA wird bei der Transformation zwar aufgenommen, aber von der Wirtszelle umgehend abgebaut. Das Insert, das die Phosphatgruppen am 5'-Ende noch besitzt, kann mit dem Vektor ligieren, wobei ringförmige DNA (Plasmid) entsteht, welche vor den Abbau-Enzymen der Wirtszelle geschützt ist.

Die Dephosphorylierung wurde mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase (FastAP[®]) durchgeführt, die die Phosphatgruppe am 5'-Ende abspaltet.

Pipettierschema für die Dephosphorylierung:

1 µg - 2,5 µg	DNA in dest. Wasser
× µl	dest. Wasser
2 µl/5 µl	Puffer für FastAP [®] (10 ×)
1 µl/2,5 µl	FastAP [®] (1 Unit/µl)
Σ 20/50 µl	

Der Ansatz wurde 10 min bei 37 °C inkubiert.

In einigen Fällen wurde die Phosphatase direkt zum Restriktionsansatz pipettiert. Die Verwendung des FastAP[®] Puffers entfiel in diesem Fall.

3.2.1.7 DNA-Ligation

Bei der Ligation können komplementäre kohäsive oder glatte Enden von DNA-Strängen mit der T4-DNA-Ligase verbunden werden. Dieses Enzym knüpft eine Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylresten. Das Insert muss in jedem Fall im Überschuss zugesetzt werden, dabei kommen Verhältnisse von Vektor zu Insert von 1:3 oder höher zum Einsatz.

Pipettierschema für die Ligation:

50 ng	Vektor in dest. Wasser
150 ng	Insert in dest. Wasser
× µl	dest. Wasser
2 µl	Puffer für die T4-DNA-Ligase (10 ×)
1 µl	T4-DNA-Ligase (1 Unit/µl)
Σ 20 µl	

Der Ansatz wurde gemischt und dann 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz direkt für die Transformation in *E. coli* eingesetzt (3.2.1.2).

Eine zweite Methode ein Insert in einen Vektor zu ligieren besteht darin, dass man einen bereits linearisierten Vektor mit gekoppelter Topoisomerase verwendet. Man kann dabei ein PCR-Produkt mit glatten Enden ligieren. Die Ligationen wurden gemäß den Herstelleranweisungen mit dem *pcDNATM3.1 Directional TOPO[®] Expression Kit* durchgeführt.

3.2.1.8 Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer:

40 mM Tris/HCl (pH 8,5)
20 mM Essigsäure
2 mM EDTA

DNA-Probenpuffer (5 ×):

0,05 % Bromphenolblau
0,05 % Xylencyanol
15 % Ficoll

Es wurde mit 1 - 2 %igen Agarosegelen mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) und 1 × TAE-Puffer als Elektrophoresepuffer gearbeitet. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit DNA-Probenpuffer versetzt. Als Längenstandard wurde *FastRulerTM Middle Range* oder 1 kb/100 bp-*Ladder* verwendet. Die angelegte Spannung betrug 10 V/cm Gel. Die Interkalation von EtBr in die DNA ermöglichte die Detektion der DNA-Banden durch Fluoreszenz mit UV-Licht (320 nm). Die Gele wurden mit dem UV-Transilluminator und einer Digitalkamera fotografisch dokumentiert.

Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Im Agarosegel aufgetrennte DNA wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des *GeneJETTM Gel Extraction Kit* nach Anweisung des Herstellers extrahiert.

3.2.1.9 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird zur Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen verwendet. In etwa 30 Zyklen aus (1) Denaturierung, (2) *Annealing* der sequenzspezifischen Primer und (3) Elongation werden eine Vielzahl von Kopien des gewünschten DNA-Fragments synthetisiert. Die PCR-Bedingungen müssen dem jeweiligen System angepasst werden, um eine optimale Amplifikation zu gewährleisten.

Richtwerte für die *Annealing*-Temperatur der Primer, MgCl₂/MgSO₄-Konzentration, Primer- und Enzymmengen wurden zunächst aus optimierten Protokollen übernommen und nur dann variiert, wenn unspezifische Banden auf dem Agarosegel zu erkennen waren.

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit der DNA-Polymerase *Phusion*[®] gearbeitet.

Der PCR-Ansatz enthält folgende Komponenten:

30,5 µl dest. Wasser
2 µl DNA in Lösung (50 ng/µl)
10 µl HF- oder GC-Reaktionspuffer (5 ×)
1 µl DMSO (bei Bedarf)
2 µl dNTP-Mix (20 mM)
2 µl Primer 1 (<i>forward</i> , 10 pmol/µl)
2 µl Primer 2 (<i>reverse</i> , 10 pmol/µl)
<u>0,5 µl <i>Phusion</i>[®]-DNA-Polymerase</u>
Σ 50 µl

Temperaturprogramm:

98 °C, 5 min	} 30 ×
98 °C, 45 s	
zw. 40-70 °C, 30 s	
72 °C, 1 min/1 kb	
72 °C, 15-30 min	

Zur Überprüfung der Produkte wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

Kolonie-PCR

Für die Kolonie-PCR wurde die *Taq*-DNA-Polymerase verwendet. Es wurden 10 µl steriles dest. Wasser in 50 µl Eppendorfgefäßen vorgelegt und einige Zellen mit einer sterilen Spitze von Einzelkolonien abgenommen und in dem vorgelegten Wasser resuspendiert. Der osmotische Druck, der dabei auf die Zellen wirkt, bringt diese zum Platzen, die DNA wird freigelegt.

PCR-Ansatz pro Kolonie:

14,9 µl dest. Wasser
2 µl Puffer (10 ×)
0,4 µl MgCl ₂ (50 mM)
0,5 µl Primer 1 (<i>forward</i> , 10 pmol/µl)
0,5 µl Primer 2 (<i>reverse</i> , 10 pmol/µl)
0,5 µl dNTP-Mix (20 mM)
<u>0,2 µl <i>Taq</i>-Polymerase (5 U/µl)</u>
Σ 19 µl

Temperaturprogramm:

94 °C, 3 min	} 30 ×
94 °C, 45 s	
zw. 40-70 °C, 30 s	
72 °C, 1 min/1 kb	
72 °C, 15-30 min	

Alle Komponenten wurden auf Eis pipettiert. Dazu wurde anschließend je 1 µl der in Wasser suspendierten Zellen gegeben. Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese getrennt.

Ortsspezifische Mutagenese

Bei der ortsspezifischen Mutagenese werden gezielt einzelne Basen ausgetauscht. Dafür wurden zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide verwendet, die beide die

gewünschte Mutation enthielten. In einer PCR-ähnlichen Reaktion wurde die Template-DNA kopiert, so dass Plasmide mit der neuen Sequenz synthetisiert wurden.

Allgemeines Pieltierschema:

31,5 µl dest. Wasser
 1 µl Plasmid in Lösung (50 ng/µl)
 10 µl Reaktionspuffer (5 ×)
 1 µl DMSO
 2 µl dNTP-Mix (20 mM)
 2 µl Primer 1 (*forward*, 10 pmol/µl)
 2 µl Primer 2 (*reverse*, 10 pmol/µl)
0,5 µl Phusion[®]-DNA-Polymerase
 Σ 50 µl

Temperaturprogramm:

98 °C, 5 min	} 18 ×
98 °C, 45 s	
52 °C, 30 s	
72 °C, 1 min/1 kb	
72 °C, 30 min	

Anschließend wurde die parentale, methylierte Plasmid-DNA 20 min bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym *DpnI* abgebaut. Danach wurde die mutierte, einzelsträngige, zirkuläre DNA in *E. coli* TOP10 transformiert und dort zur doppelsträngigen Plasmid-DNA vervollständigt. Zur Bestätigung der erfolgreichen Mutagenese wurde die DNA anschließend sequenziert.

Overlap Extension PCR

Mit Hilfe der *Overlap Extension* PCR lassen sich unterschiedliche DNA-Sequenzen miteinander verknüpfen (Abbildung 3.1).

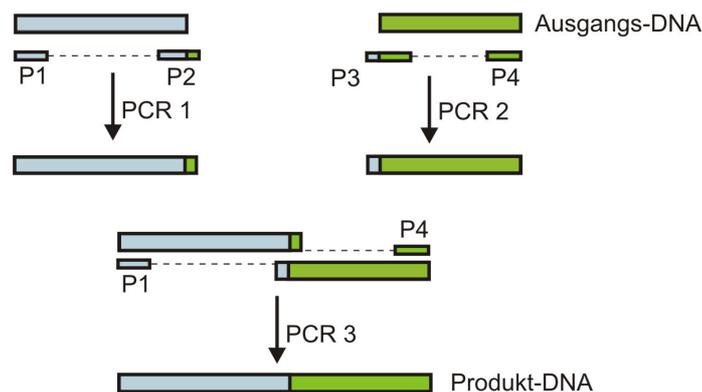


Abbildung 3.1: Overlap Extension PCR. In PCR 1 und 2 werden die zwei Regionen amplifiziert, die verknüpft werden sollen. Da sich Teile der Sequenzen der Primer 2 und 3 überlappen, können sich die PCR-Produkte 2 und 3 aneinander anlagern. In einer dritten PCR-Reaktion kann mit P1 und P4 das Endprodukt erzeugt werden, in dem Region 1 und 2 miteinander verknüpft sind. (P = Primer)

Es wurden zunächst die Regionen mittels PCR amplifiziert, die nachher verknüpft werden sollten, wobei die Primer P2 und P3 so entworfen wurden, dass die Enden der PCR-Frag-

mente komplementär zueinander waren. Somit konnte dann in einer dritten PCR-Reaktion mit den zwei PCR-Produkten und Primern in den Anfangs- und Endregionen (P1 und P4) die zwei PCR-Produkte miteinander verknüpft werden.

3.2.1.10 Sequenzierung von DNA

Alle erstellten Konstrukte wurden sequenziert. Dies erfolgte kommerziell durch die Firma SeqLab, Göttingen.

3.2.1.11 Extraktion von RNA aus kultivierten Zellen

Das Medium von Zellen einer \varnothing 3,5 cm-Kulturschale wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Präparation der RNA wurde mit Hilfe des *GeneJET™ RNA Purification Kit* nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 30 μ l DEPC-Wasser. Die Quantität der RNA wurde photometrisch und die Qualität durch Auftrennung im Agarosegel überprüft.

3.2.1.12 cDNA-Synthese

RNA kann im Rahmen einer PCR nicht amplifiziert werden, da sie keine geeignete Matrize für die Polymerase darstellt. Es ist daher nötig, in einem Zwischenschritt mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase), zuerst eine zur RNA komplementäre cDNA zu synthetisieren. Die cDNA-Synthese aus RNA erfolgte mittels des *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* nach Angaben des Herstellers. Die entstandene cDNA diente als Ausgangsmatrize für die Amplifikation über Realtime-PCR.

3.2.1.13 Quantitative Realtime-PCR

Für die quantitative Analyse der RNA-Expression wurde der *TaqMan® Gene Expression Assay* verwendet. Dieser Assay enthält vorgefertigte Primer und Sonden. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff, 6-Carboxyfluorescein (FAM), markiert, während das 3'-Ende den fluoreszierenden Quencher-Farbstoff Tetramethylrhodamin (TAMRA) trägt. Um die Extension der Sonde zu verhindern, ist das 3'-Ende zusätzlich mit einem Phosphatrest blockiert.

Liegt der Quencher in ausreichender Nähe zu dem Reporterfarbstoff (max. 17 - 20 Basen entfernt), wird die Energie des Reporterfarbstoffs nach Anregung bei 488 nm direkt an den

Quencher weitergeleitet (Cardullo *et al.*, 1988) und nur das Fluoreszenzspektrum des Quenchers emittiert. Dieser Mechanismus wird als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnet. Während der Extension des Primers trifft die *Taq*-Polymerase auf die Sonde und beginnt diese zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'→3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase aktiviert wird. Die Aktivierung bewirkt die Hydrolyse der Sonde. Die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher wird aufgehoben und das entstehende Fluoreszenzsignal kann detektiert werden. Der Anstieg der Fluoreszenz ist proportional zum Anstieg der Konzentration des Amplifikationsproduktes. Die gemessene Fluoreszenz bleibt jedoch für eine gewisse Anzahl an Zyklen unverändert, da die entstehenden Produktmengen zu gering sind. In der exponentiellen Anstiegsphase wird der so genannte *cycle of threshold* (C_T) gesetzt. Der C_T -Wert einer Probe entspricht der Zahl der Zyklen der PCR, bei dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Dieser Wert ist die Grundlage für die weitere Auswertung.

Zuerst wurde die Differenz zwischen dem C_T -Wert des zu untersuchenden Gens und dem Kontrollgen (β -Aktin) gebildet. Die relative Expression wurde aus dem Vergleich der einzelnen Gruppen (Probe gegen Kontrolle) nach der folgenden Gleichung ermittelt (Schmittgen & Livak, 2008):

$$2^{-\Delta\Delta C_T} \quad \text{mit} \quad \Delta C_T = C_{T \text{ Gen}} - C_{T \text{ Kontrollgen}}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Probe}} - \Delta C_{T \text{ Kontrolle}}$$

Für die graphische Auswertung wurde $\Delta C_{T \text{ Kontrolle}}$ gleich 1 gesetzt.

Die PCR erfolgten in einem 20 μ l PCR-Ansatz, wobei alle PCR-Produkte dreifach bestimmt wurden. Der Nachweis erfolgte mit dem Fluoreszenzdetektor MX3000PTM.

Allgemeines Pieltierschema:

10 μ l MaximaTM Probe qPCR Master Mix (2 \times)
 7 μ l dest. Wasser
 1 μ l TaqMan[®] Gene Expression Assay
2 μ l Template-cDNA
 20 μ l

Temperaturprogramm:

95 °C 10 min
 95 °C 30 sec
 60 °C 1 min } 40 Zyklen

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Allgemeines

Für die sterile Kultivierung der Zelllinien wurden alle Arbeitsschritte unter der Sterilbank durchgeführt. Durch sorgfältiges Reinigen der Arbeitsflächen und Werkzeuge mit 70 %igem vergällten Ethanol wurde einer eventuellen Kontamination durch Bakterien und Pilze vorgebeugt. Es wurden nur sterile Glaswaren, Pipettenspitzen und Lösungen verwendet.

3.2.2.2 Kultivierung von Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in 25 cm² (75 cm²) Zellkulturflaschen bei 37 °C und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre bei einem CO₂-Partialdruck von 5 % kultiviert. Es wurden für die jeweiligen Zelllinien optimierte Medien verwendet, um ein ideales Wachstum der Zellen zu erreichen (Tabelle 3.3). Je nach Wachstumsgeschwindigkeit und mit der Hilfe eines Mikroskops beurteilten Konfluenz (80 - 100 %) wurden die Zellen 1 - 2 × wöchentlich passagiert. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen 2 × mit 3 ml (5 ml) PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml (2 ml) Trypsin/EDTA in die Kulturflasche gegeben. Die Kulturflasche wurde geschwenkt, so dass das Trypsin/EDTA den Zellrasen vollständig benetzte und bis zu 3 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden in 5 ml (10 ml) frischem Zellkulturmedium mit FKS aufgenommen und lagen als Suspension in der Kulturflasche vor. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde bis zu einem Endvolumen von 5 ml (10 ml) mit Medium aufgefüllt und weiter kultiviert, die restliche Zellsuspension wurde verworfen. Ein Mediumwechsel war alle 2 bis 3 Tage notwendig. Nach Absaugen des verbrauchten Mediums wurde dieses durch frisches, bei 37 °C vorgewärmtes Medium ersetzt.

3.2.2.3 Rekultivierung und Kryokonservierung von Zellen

Um einen ständigen Vorrat an verschiedenen Zellen verfügbar zu haben und diese über einen längeren Zeitraum ohne Veränderung zu lagern, wurden Kryokonserven von Zellen angelegt und diese je nach Bedarf wieder rekultiviert.

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden aufgetaut und sofort in ein 15 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurden langsam 5 ml des jeweiligen Zellkulturmediums zu der Zellsuspension getropft, dabei wurde das Röhrchen vorsichtig geschüttelt. Nach dem

Zentrifugieren (5 min, $800 \times g$) wurde der Überstand abgossen, das Zellpellet in neuem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (5 min, $800 \times g$), anschließend im Einfriermedium (10 % DMSO, 20 % FKS) resuspendiert und je 1 ml der Zellsuspension in ein Kryoröhrchen gegeben. Die Kryoröhrchen wurden in einem mit Isopropanol gefüllten *Cryo 1 °C Freezing Container* mindestens einen Tag bei -80 °C gelagert und anschließend in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

3.2.2.4 Kultivierung und Selektion von Site-1-Protease defizienten Zellen

Kulturmedium:

- 1:1 DMEM and Ham's F12
- 1 % P/S
- 5 % FKS
- 50 μM NaMevalonat
- 20 μM NaOleat
- 5 $\mu\text{g/ml}$ Cholesterol

LDL-haltiges Medium:

- 1:1 DMEM und Ham's F12
- 1 % P/S
- 10 % NBKS
- 10 mg/ml humanes LDL

Selektionsmedium:

- 1:1 DMEM und Ham's F12
- 1 % P/S
- 1 % lipoproteinarmes NBKS
- 50 mg/ml Amphotericin B

Die Site-1-Protease spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Lipidmetabolismus und der Cholesterolhomöostase durch die Spaltung der Transkriptionsfaktoren *sterol regulatory element binding proteins* SREBP (Abbildung 3.2) (Brown & Goldstein, 1999; Sakai *et al.*, 1998). Die proteolytische Aktivierung der SREBPs resultiert in einer Steigerung der LDL-Rezeptor-vermittelten Cholesterolaufnahme in die Zelle und in einer Steigerung der Cholesterolbiosynthese (Brown & Goldstein, 1997). Site-1-Protease-defiziente CHO-Zellen (SRD-12B) sind daher auxotroph für Cholesterol und ungesättigte Fettsäuren. Diese Zellen benötigen Cholesterol, Oleat und Mevalonat in ihrem Kulturmedium. In Abwesenheit dieser Substanzen sterben die Zellen in wenigen Tagen.

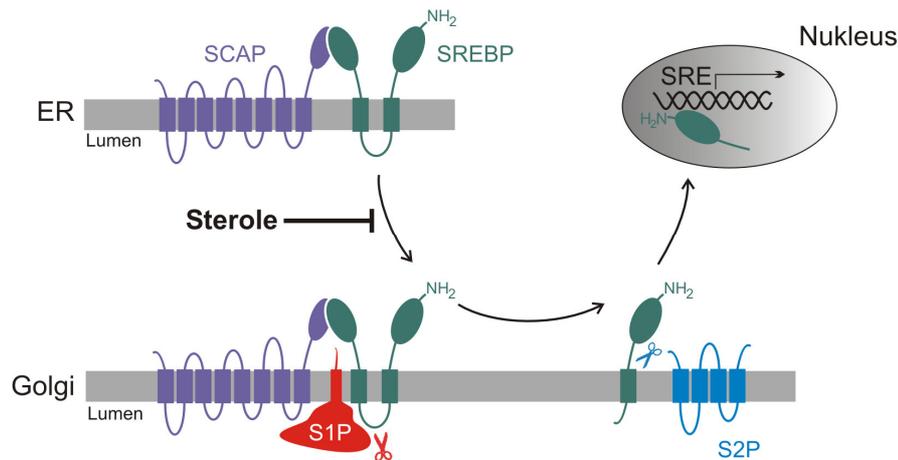


Abbildung 3.2: Site-1-Protease ist an der Freisetzung von Transkriptionsfaktoren aus SREBPs beteiligt.

SREBPs werden als Membran-verankerte Vorstufenproteine synthetisiert. Bei einem intrazellulären Mangel an Sterolen (z. B. Cholesterol) transportiert SCAP (SREBP cleavage-activating protein) die SREBP-Vorstufenproteine vom ER zum Golgi-Apparat. Dort wird die Freisetzung von SREBPs von der Membran durch die Spaltung der Site-1-Protease (S1P) initiiert. Anschließend spaltet eine zweite Protease, Site-2-Protease (S2P), innerhalb der Transmembrandomäne. Die N-terminale Domäne verlässt die Membran und tritt in den Nukleus ein, wo es relevante Gene regulieren kann. (SRE = sterol regulatory element)

Zur Herstellung der 1 M NaMevalonat-Lösung wurden 2,5 g Mevalonolaktone in 15 ml dest. Wasser gegeben. Unter Rühren wurden 2 ml 10 M NaOH-Lösung tropfenweise zugeben (1,2 M Endkonzentration) und die Lösung für weitere 30 min gerührt. Die exotherme Säure/Base-Reaktion stellte dabei die Hitze, die zum Lösen des Mevalonolaktone notwendig war. Danach wurde der pH-Wert mit HCl auf 7,5 eingestellt. Das Endvolumen betrug 19,2 ml. Die Lösung wurde steril filtriert und Aliquote bei -20 °C eingefroren.

Um den Phänotypen zu erhalten, musste wöchentlich eine Selektion mit Amphotericin B erfolgen (Rawson *et al.*, 1998). Zwei Tage vor der Selektion wurden die Zellen ausgesät, so dass am Tag 3 eine Konfluenz von 80 % erreicht wurde. Am Tag 2 wurden die Zellen mit LDL-haltigem Medium gefüttert. Humanes LDL liegt zur langfristigen Lagerung in KBr-Lösung vor. Das KBr musste vor Verwendung aus der Lösung über eine PD-10-Ionenaustauschersäule entfernt werden. Das Waschen der Säule und die Elution von LDL erfolgten dabei mit PBS. Am Tag 3 wurden die Zellen 2 × mit PBS gewaschen und anschließend mit Selektionsmedium für 2 - 5 h inkubiert. Nur Zellen mit sterolhaltigen Membranen können Amphotericin B aufnehmen (Cohen, 2010). Zellen, die die Site-1-Protease enthalten und damit Sterole bilden können, nehmen das Amphotericin B auf, schwellen an und lösen

sich von der Kulturflasche ab. Site-1-Protease-defiziente Zellen können keine Sterole bilden und nehmen daher kein Amphotericin B auf. Sie bleiben an der Kulturflasche haften. Nach $2 \times$ Waschen mit PBS wurden die Zellen wieder mit Kulturmedium versorgt.

3.2.2.5 Konditionierung von Medien

Für einige Experimente, z. B. die Messung von Enzymaktivitäten, wurden die Zellen in Kulturschalen (\varnothing 3,5 cm, \varnothing 6 cm) für 48 h mit OptiMEM[®] I (1,5 ml, 3 ml) anstelle des Kulturmediums inkubiert.

3.2.2.6 Transiente Transfektion von Zellen

Zur transienten Transfektion wurden Zellen in Kulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80 - 90 % kultiviert. Für die DNA-Transfektion wurde jetPEI[™] nach Herstellerangaben verwendet. Die eingesetzte Menge an Plasmid-DNA und Transfektionsreagenz richtete sich nach der Größe der Kulturschale.

Kulturschale	DNA	jetPEI [™]
12 well	2 μ g	4 μ l
\varnothing 3,5 cm	2,5 μ g	5 μ l
\varnothing 6 cm	5 μ g	10 μ l
\varnothing 10 cm	10 μ g	20 μ l

Cotransfektionen, bei denen gleichzeitig zwei verschiedene Plasmide in die Zellen eingebracht werden sollten, wurden mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin[®]LTX und dem zugehörigen Plus[®]-Reagenz nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden \varnothing 6 cm-Kulturschalen verwendet. Die Cotransfektion wurde im Verhältnis 1:1 der zwei verschiedenen Plasmide durchgeführt.

3.2.2.7 Transfektion von siRNA in Hela-Zellen

Hela-Zellen wurden in \varnothing 3,5 cm-Kulturschalen ausgesät, bis zu einer Konfluenz von ca. 60 % kultiviert und anschließend mit 125 pmol (6,25 μ l) der jeweiligen siRNA und 10 μ l Lipofectamin[®]2000 nach Herstellerangaben transfiziert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und nach weiteren 24 h wurden die Zellen erneut mit der jeweiligen siRNA transfiziert und nach einem Mediumwechsel für weitere 24 h in Kultur behalten. Die Analyse der Zellen erfolgte 96 h nach der ersten Transfektion.

3.2.2.8 Metabolische Markierung von Proteinen mit [³⁵S]-Methionin

Hungermedium:

DMEM ohne Methionin und Glutamin
1 × GlutaMaxTM-I

Pulse-Medium:

DMEM ohne Methionin und Glutamin
1 × GlutaMaxTM-I
150 µCi/ml [³⁵S]-Methionin

Chase-Medium:

DMEM
4 % hitzeinaktiviertes, dialysiertes FKS
250 µg/ml Methionin
10 mM M6P-Na-Salz
1 × GlutaMaxTM-I

Als metabolische Markierung bezeichnet man den Einbau radioaktiver AS in neusynthetisierte Proteine. Dazu wurden in Ø 3,5 cm-Kulturschalen kultivierte Zellen 3 × mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend für 1 h mit Hungermedium inkubiert. Das Medium wurde gegen 0,75 ml *Pulse*-Medium ausgetauscht. Der Einbau des [³⁵S]-Methionins in neusynthetisierte Proteine erfolgte für 1 h (*Pulse*). Zur Bestimmung der Sortierung und Prozessierung von Proteinen wurde das *Pulse*-Medium abgenommen und durch 750 µl *Chase*-Medium ersetzt. Die Zellen wurden dann für weitere 4 bis 5 h inkubiert (*Chase*). Die Zellen wurden anschließend 2 × mit PBS gewaschen und zur Immunpräzipitation eingesetzt (0).

3.2.2.9 Fluoreszenzmikroskopie

Mowiol[®]-Einbettmittel:

0,1 M Tris/HCl (pH 8,5)
6,0 g Glycerin
2,4 g Mowiol[®] 4-88

Sterile Deckgläschen wurden in eine 12 *well*-Platte gegeben, Zellen ausgesät und für 16 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen transfiziert. Nach 24 h wurde von den Deckgläschen das Medium abgenommen und die Zellen 3 × mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 15 min bei RT mit 4 % PFA fixiert und danach nochmals 3 × mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Proben 10 min mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert. Zur Reduktion von unspezifischen Proteinwechselwirkungen folgte eine einstündige Inkubation mit 1 % BSA in PBS (BSA/PBS) bei RT. Die

Deckgläschen wurden auf einen Parafilm[®]-Streifen überführt und anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper in BSA/PBS inkubiert. Für Colokalisationsstudien wurden die Zellen simultan mit zwei Primärantikörpern aus unterschiedlichen Spezies inkubiert. Nach Waschen der Zellen für 3 × 5 min mit PBS folgte die Inkubation mit fluorchromgekoppelten Sekundärantikörpern in PBS für 1 h bei RT unter Lichtausschluss. Die Proben wurden erneut 3 × für 5 min mit PBS gewaschen. Um Salze zu entfernen, wurden die Zellen schließlich 2 × mit dest. Wasser gewaschen. Mit Hilfe des Mowiol[®]-Einbettmittels wurden die Deckgläschen luftblasenfrei auf Objektträger gebracht und über Nacht bei RT getrocknet. Die Ränder der Deckgläser wurden mit Nagellack verschlossen und die Proben unter dem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop (Vergrößerung: 63 ×, Leica DMIRE2) untersucht. Bei Doppel-Immunfluoreszenzanalysen erfolgte nach Einzelaufnahme der Fluoreszenzsignale eine Überlagerung der digitalen Bilder (Adobe Photoshop 7.0).

3.2.3 Biochemische Methoden

3.2.3.1 Ernten von Zellen und Herstellung von Lysaten

PBS (pH 7,4):

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
1,76 mM KH₂PO₄

Triton X-100-Lysispuffer:

50 mM Tris/HCl (pH 7,5)
1 mM EDTA
1 % Triton X-100

Verwendete Zellen auf Ø 3,5 cm- oder Ø 6 cm-Kulturschalen wurden 2 × mit kaltem PBS gewaschen und in PBS abgeschabt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 800 × g, 4 °C) sedimentiert. Das Zellpellet konnte bei -20 °C eingefroren und somit zwischengelagert werden. Das Zellpellet wurde in 100 - 500 µl Triton X-100-Lysispuffer mit 1 × Proteaseinhibitorcocktail resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 20.000 × g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und das Pellet verworfen.

3.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen

Die Bestimmung der Proteinmenge in den Lysaten erfolgte mit dem Bradford-Reagenz von Roth (Roti[®]Quant) nach Herstellerangaben. Zur Konzentrationsbestimmung war eine Kalibrierung notwendig, die mit einer Standard-BSA-Lösung durchgeführt wurde.

3.2.3.3 Deglykosylierung von Proteinen

Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F)

Das Enzym PNGase F spaltet *in vitro* N-glykosidische Bindungen an Glykoproteinen. Dazu wurden 75 µg zelluläres Protein in 100 µl Lysispuffer mit 2 µl 10 % SDS versetzt und für 10 min bei 70 °C erhitzt. Anschließend wurden 10 µl 10 % NP-40 und 2 µl PNGase F (2 U) hinzugefügt und die Proben, wenn nicht anders angegeben, 1 h bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurden Proben unter den gleichen Bedingungen, ohne PNGase F inkubiert.

Endoglykosidase H (Endo H)

Das Enzym Endo H spaltet *in vitro* mannosereiche Glykane von Glykoproteinen. Dazu wurden 75 µg zelluläres Protein in 45 µl Lysispuffer mit 5 µl 5 × Denaturationspuffer versetzt und für 10 min bei 99 °C erhitzt. Anschließend wurden 10 µl G6-Puffer, 38 µl dest. Wasser und 2 µl Endo H (0,01 U) hinzugefügt und die Proben, wenn nicht anders angegeben, 1 h bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurden Proben unter den gleichen Bedingungen ohne Endo H inkubiert. Die Puffer wurden mit dem Enzym (New England Biolabs) mitgeliefert, die Zusammensetzung ist nicht bekannt.

3.2.3.4 SDS-PAGE

Die Proteine wurden nach ihrer molaren Masse durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem diskontinuierlichen Puffersystem getrennt. Die Acrylamidkonzentration der Trenngele variierte von 8-12,5 %.

Trenngel:

8-12,5 %	Acrylamid
375 mM	Tris/HCl (pH 8,8)
0,1 %	SDS
0,08 %	APS
0,08 %	TEMED

Sammelgel:

4 %	Acrylamid
125 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
0,1 %	SDS
0,1 %	APS
0,1 %	TEMED

Solubilisierungspuffer (Endkonzentration):

50 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
4 %	SDS
12 %	Glycerin
	Coomassie [®] Blue R

+/-100 mM DTT (reduzierende/nicht-reduzierende Bedingungen)

Anodenpuffer:

25 mM	Tris/HCl (pH 8,6)
192 mM	Glycin

Kathodenpuffer:

25 mM	Tris/HCl (pH 8,6)
192 mM	Glycin
0,1 %	SDS

Vorbereiten der Gele

Zuerst wurde das Trenngel zusammenpipettiert, in die vorbereiteten Glasplatten eingefüllt und sofort mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgenommen und die Lösung für das Sammelgel auf das Trenngel aufgegeben. Der Kamm für die Probenaschen wurde in das noch flüssige Sammelgel eingeführt.

Probenvorbereitung

Auf das Gel wurden 25 - 150 µg Protein aufgetragen, gegebenenfalls mussten die Proben mit Lysispuffer oder dest. Wasser verdünnt werden. Je nach Experiment wurden die aufzutragenden Proben zuvor in Solubilisierungspuffer aufgenommen. Das Endvolumen des Probenansatzes betrug für große Gele bis zu 200 µl, für kleine Gele bis zu 50 µl. Die Proben wurden kurz gevortext, anzentrifugiert und anschließend für 5 min bei 95 °C erhitzt. Sie wurden erneut anzentrifugiert und in die Geltaschen eingefüllt.

Elektrophorese

Die Gele in den Glasplatten wurden in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Probenauftragung konnte nach Spülung der Taschen erfolgen. Die Kammer wurde an ein Spannungsgerät angeschlossen und eine maximale Stromstärke von 60 mA bei großen Gelen eingestellt. Bei kleinen Gelen wurden die Proben zunächst 20 min bei 85 V und schließlich bei 180 V aufgetrennt. Der Lauf war beendet, sobald die Coomassie-Front aus dem Gel herausgelaufen war.

3.2.3.5 Fluorographie

Zur Signalverstärkung wurde nach geoelektrophoretischer Auftrennung von radioaktiv-markierten Proteinen in Gelen eine Fluorographie angeschlossen. Die Gele wurden zunächst für 3 × 20 min in DMSO gewässert. Anschließend wurden die Gele über Nacht in 20 % PPO/DMSO leicht geschwenkt. Dann wurde das in die Gele diffundierte PPO durch Wässern der Gele 3 × 20 min ausgefällt. Die Trocknung der Gele zwischen Cellophan-Folien erfolgte für 2 h in einem Gelrockner. Auf die getrockneten Gele wurden Röntgenfilme aufgelegt und bis zur Entwicklung (1 bis 7 Tage) bei -80 °C gelagert.

3.2.3.6 Proteinfärbung mit Coomassie

Färbelösung:

50 % Methanol
10 % Essigsäure
0,05 % Coomassie® Blue R

Entfärbelösung:

50 % Methanol
10 % Essigsäure

Das Trenngel wurde in der Färbelösung für mindestens 20 min auf einem Horizontal-schüttler inkubiert und im Anschluss für 3×20 min in Entfärbelösung gelegt. Die Gele konnten nach einstündiger Wässerung in Folie eingeschweißt und getrocknet werden.

3.2.3.7 Westernblot-Analyse

Transferpuffer:

25 mM Tris
192 mM Glycin
20 % Methanol

TBS:

25 mM Tris/HCl (pH 7,4)
137 mM NaCl
2,7 mM KCl

Blockpuffer:

PBS	bzw.	TBS
0,1 % Tween 20		0,1 % Tween 20
5 % Milchpulver		1 % BSA

Waschpuffer:

PBS bzw. TBS
0,1 % Tween 20

ECL-1:

100 mM Tris /HCl (pH 8,5)
2,7 mM Luminol
0,44 mM p-Cumarinsäure

ECL-2:

100 mM Tris/HCl (pH 8,5)
0,02 % H₂O₂

Beim Westernblot wird ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Somit werden die Proteine aus dem Gel auf eine Membran übertragen. An der Membranoberfläche bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten, die Proteine sind dann für die Antikörper-Bindung zugänglich.

Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen aus dem Gel erfolgte auf Nitro-cellulosemembran für 1,5 - 2 h bei 900 mA für große Gele und für 1 h bei 400 mA für kleine Gele. Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulosemembran zur Absättigung unspezifischer Bindungen 1 h in Blockpuffer inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper (in Blockpuffer verdünnt, siehe 3.1.7) für 1 - 3 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Die Membran wurde dann $3 \times$ für 10 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend für 1 h mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten sekundären

Antikörper (in Blockpuffer verdünnt) unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. Nach $3 \times$ Waschen für jeweils 10 min mit Waschpuffer erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper durch eine *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Reaktion. Dafür wurden 5 ml der beiden ECL-Lösungen gemischt und 30 s auf der Membran inkubiert. Dies konnte anschließend entweder auf Röntgenfilmen entwickelt oder mit dem BioRad-Molecular Imager[®]/ChemiDoc[™]XRS mit eingebauter Digitalkamera aufgenommen werden. Die Exposition lag bei beiden Methoden zwischen 10 s und 5 min. Die verwendeten Wasch- und Blockpuffer sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

Durch die vollständige Entfernung von Antikörpern konnten Nitrocellulosemembranen mehrfach für Antikörper-Bindungen verwendet werden. Dazu wurde die Membran $1 \times$ mit Waschpuffer gewaschen und anschließend in 0,2 M Natronlauge für 2 bis 5 min inkubiert. Danach wurde die Membran $3 \times$ für 5 min mit dest. Wasser gewaschen, bevor sie erneut mit dem Blockpuffer inkubiert wurde.

Die Detektion M6P-markierter Proteine im Westernblot ermöglicht ein *single chain fragment*-Antikörper (scFv M6P-1), der spezifisch M6P-Reste erkennt (Müller-Loennies *et al.*, 2010). Der Antikörper wiederum lässt sich über einen fusionierten *c-Myc-tag* nachweisen. Die Durchführung entspricht der für Westernblot-Analysen, die Detektion erfolgte über drei Antikörper. Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C mit dem in Blockpuffer verdünnten scFv M6P-1 inkubiert. Anschließend wurde die Membran $3 \times$ für 10 min mit Waschpuffer gewaschen und dann 1 h bei RT mit einem monoklonalen anti *c-Myc*-Antikörper inkubiert. Es folgten drei Waschschritte und die Inkubation mit α Maus-HRP-Antikörpern für 1 h. Nachdem die Membran erneut gewaschen wurde, folgte die Entwicklung über ECL.

Tabelle 3.7: In der Westernblot-Analyse verwendete Wasch- und Blockpuffer

zu detektierendes Protein/tag	verwendeter Wasch- und Blockpuffer
anti β -UE	TBS/T, 1 % BSA in TBS/T
anti MnSOD	PBS/T, 5 % Milchpulver in PBS/T
anti GFP	PBS/T, 5 % Milchpulver in PBS/T
anti <i>c-Myc</i>	PBS/T, 5 % Milchpulver in PBS/T
scFv M6P-1 + anti <i>c-Myc</i>	TBS/T, 1 % BSA in TBS/T

3.2.3.8 Immunpräzipitation von metabolisch markierten Proteinen

Neufeld-Puffer:	IMM-Puffer:	IMM-CD-Puffer:
10 mM Tris/HCl (pH 8,5)	PBS	IMM
0,6 M NaCl	1 % Triton X-100	0,5 % SDS
0,1 % SDS	0,5 % NaDesoxycholat	2 % BSA
0,05 % NP-40		

Zu den *Chase*-Medien (siehe 3.2.2.8) wurde 500 µl IMM-CD-Puffer und Proteaseinhibitorcocktail gegeben. Die Zellpellets wurden in 800 µl Lysispuffer-Puffer (IMM-CD : PBS = 4:5) mit 1 × Proteaseinhibitorcocktail resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate für 10 min bei 20.000 × *g* und 4 °C zentrifugiert. Die Zelllysate wurden mit 2 µl Präimmenserum aus Kaninchen und 50 µl Protein G-Sepharose versetzt und für 1 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Protein G-Sepharose und daran gebundene unspezifische Proteine wurden für 30 s bei 1.000 × *g* und 4 °C abzentrifugiert. Zum Überstand wurde der Primärantikörper gegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Protein G-Sepharose zu den Proben pipettiert und nochmals für 1 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden abzentrifugiert (30 s, 1.000 × *g*, 4 °C) und wie folgt gewaschen:

- 1 × 1 ml Neufeld-Puffer
- 1 × 1 ml IMM-Puffer
- 1 × 1 ml IMM-Puffer + 2 M KCl
- 1 × 1 ml 0,1 × PBS

Anschließend wurden die präzipitierten Proteine durch 5-minütiges Erhitzen in Solubilisierungspuffer bei 95 °C von der Protein G-Sepharose gelöst. Es folgte eine Auftrennung mittels SDS-PAGE mit anschließender Fluorographie (3.2.3.4).

3.2.3.9 Präzipitation von Proteinen durch Bindung an *Reactive Green-19*-Agarose

BHK-Zellen in Ø 6 cm-Kulturschalen wurden transfiziert. Die Zellpellets wurden anschließend in 500 µl Triton X-100-Lysispuffer lysiert. Die Inkubation der Lysate mit 50 µl *Reactive Green-19*-Agarose erfolgte über Nacht bei 4 °C, anschließend wurden die Agarose-beads gewaschen (2 × Triton X-100-Lysispuffer, 1 × 0,1 PBS) und die gebundenen Proteine durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min in Solubilisierungspuffer von den Agarose-

beads gelöst. Es folgte eine Auftrennung mittels SDS-PAGE mit anschließender Westernblot-Analyse.

3.2.3.10 Präzipitation von Proteinen durch Bindung an UDP-Hexanolamin-Agarose

Die Kopplung von UDP-Hexanolamin erfolgte an Affigel 10 (Agarose) bei 4 °C. Dafür wurde 1 ml Affigel 10 mit 3 Vol Isopropanol und 3 Vol dest. Wasser gewaschen und anschließend in eine leere 5 ml-Säule gegeben. Es folgte die Zugabe von 0,2 ml 0,5 M HEPES (pH 7,5) und 22 mg UDP-Hexanolamin in 0,8 ml dest. Wasser und eine Inkubation für 24 h im Drehrad bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen. Freie Bindungen am Affigel 10 wurden durch eine einstündige Inkubation mit 0,2 M Ethanolamin in 0,1 M HEPES (pH 7,5) abgesättigt. Die UDP-Hexanolamin-gekoppelte Agarose wurde anschließend mit 10 ml PBS gewaschen. Die Aufbewahrung erfolgte in PBS mit 0,02 % NaAzid. Vor Gebrauch wurde die UDP-Hexanolamin-gekoppelte Agarose mit 5 Vol Triton X-100-Lysispuffer gewaschen.

BHK-Zellen in Ø 6 cm-Kulturschalen wurden transfiziert. Die Zellpellets wurden anschließend in 500 µl Triton X-100-Lysispuffer lysiert. Die Inkubation der Lysate (100 µl) mit 30 µl UDP-Hexanolamin-gekoppelter Agarose erfolgte über Nacht bei 4 °C, anschließend wurden die präzipitierten Proteine gewaschen (2 × 1 ml Triton X-100-Lysispuffer, 1 × 1 ml 0,1 PBS) und durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min in Solubilisierungspuffer von der Agarose gelöst. Es folgte eine Auftrennung mittels SDS-PAGE mit anschließender Westernblot-Analyse.

3.2.3.11 Bindung von [¹²⁵I]-markiertem UDP-Hexanolamin-BSA

NP-40-Lysispuffer:

- 10 mM Tris/HCl (pH 7,5)
- 150 mM NaCl
- 0,5 mM EDTA
- 0,5 % NP-40

Zur Kopplung von UDP-Hexanolamin an BSA wurden 50 µl 200 mM Bicinepuffer (pH 9,0) mit 22 mg UDP-Hexanolamin in 50 µl Wasser, 3 mg BSA in 50 µl Wasser und 50 µl 640 mM NaCNBH₃ für 72 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit

600 µl 50 mM Tris/HCl (pH 7,4) abgestoppt. Die Proteinlösung wurde gegen 10 mM Tris/HCl (pH 7,4) dialysiert und bei -80 °C gelagert.

Die Markierung von UDP-Hexanolamin-BSA mit [¹²⁵I] wurde freundlicherweise von Prof. T. Braulke, UKE durchgeführt.

BHK-Zellen in Ø 6 cm-Kulturschalen wurden transfiziert. Die Zellpellets wurden anschließend in 300 µl NP-40-Lysispuffer für 1 h bei 4 °C lysiert. Unlösliche Komponenten wurden bei 16.000 × g abgetrennt. Die Inkubation der Lysate mit 20 µl GFP-Trap[®]-Agarose erfolgte für 2 h bei 4 °C, anschließend wurden die GFP-Trap[®]-Agarose-beads 2 × mit NP-40-Lysispuffer und 1 × mit 0,1 × PBS gewaschen. Zu den GFP-Trap[®]-Agarose-beads wurden 400 µl NP-40-Lysispuffer mit oder ohne 50 µM UDP-GlcNAc und 500.000 cpm [¹²⁵I]-markiertes UDP-Hexanolamin-BSA gegeben und für 2 h bei 4 °C im Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die GFP-Trap[®]-Agarose-beads 2 × mit NP-40-Lysispuffer und 1 × mit 0,1 × PBS gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min in Solubilisierungspuffer von den GFP-Trap[®]-Agarose-beads gelöst, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Autoradiografie analysiert.

3.2.3.12 Dialyse von Proteinlösungen

Zur Dialyse von Proteinlösungen gegen verschiedene Puffer wurden Dialyseschläuche mit unterschiedlichen Porendurchmessern verwendet, die zunächst für eine Stunde in 1 M Glycin-Lösung blockiert wurden. Die Dialyse erfolgte bei 4 °C unter Rühren über Nacht gegen ein bis zu 2000-faches Volumen des neuen Puffers, wobei der Puffer 1 - 2 × gewechselt wurde.

3.2.3.13 Gewinnung und Aufreinigung von Antikörpern

Es wurden zwei Regionen des α/β-Vorstufenproteins als GST-Fusionsprotein kloniert (AS 400-600, AS 929-1209). Für die Reinigung wurden die Proteine in *E. coli* BL21 exprimiert. Zellpellets wurden mit dem *BugBuster*[®] Protein Extraction-Reagenz nach Herstellerangaben zur Reinigung von *inclusion bodies* aufgearbeitet. Die gereinigten *inclusion bodies* wurden dann in PBS mit 3 % Laurylsarcosine gelöst. Es erfolgte eine Proteinbestimmung und eine Reinheitsbestimmung mittels SDS-PAGE. Im Anschluss wurde das Protein über eine Glutathion-Agarose-Säule gereinigt. Dies war für beide Proteine aus unbekanntem Grund nicht erfolgreich, weshalb die gelösten *inclusion bodies* zur Immunisierung

verwendet wurden. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte mit je 150 µg Protein durch die Versuchstierhaltung des Uniklinikums Hamburg-Eppendorf. Die Antikörper wurden anschließend über zwei Säulen affinitätschromatographisch gereinigt. Zur Vorbereitung der Säulen wurden zu 2 ml Affigel 10 500 µg Protein (GST, α 400-600, β 929-1209) in 1 ml PBS bzw. PBS/Laurylsarcosine geben und 24 h bei 4 °C im Drehrad inkubiert. Anschließend wurden freie Bindungen durch Inkubation mit 0,25 M Ethanolamin in PBS für 1 h bei 4 °C abgesättigt. Über die so vorbereiteten Säulen wurden 2 ml Serum gereinigt. Es wurde zunächst über die GST-Säule gegeben und anschließend über die Säule mit dem jeweiligen rekombinanten Protein (α 400-600 bzw. β 929-1209), mit dem das Kaninchen immunisiert wurde. Die Elution erfolgte mit Glycinpuffer (pH 2,5) in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße in denen Tris-Lösung (pH 8,5) zur Neutralisation vorgelegt wurde.

3.2.3.14 Messung von Enzymaktivitäten

Reaktionspuffer:

- 0,1 M NaCitrat (pH 4,6)
- 0,4 % BSA
- 0,2 % Triton X-100

β-Hexosaminidase-Substratpuffer:

- 10 mM 4-Nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glukosaminid in Reaktionspuffer

β-Galaktosidase-Substratpuffer:

- 10 mM 4-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid in Reaktionspuffer

α-Mannosidase-Substratpuffer:

- 5 mM 4-Nitrophenyl-α-D-mannopyranosid in Reaktionspuffer

α-Fukosidase-Substratpuffer:

- 10 mM 4-Nitrophenyl-α-L-fukopyranosid in Reaktionspuffer

Stoppuffer:

- 0,4 M Glycin/NaOH (pH 10,4)

Pro Ansatz wurden 20 µg des zu messenden Zellysates in 100 µl Triton X-100-Lysispuffer bzw. 100 µl konditioniertes Medium eingesetzt. Nach Zugabe von 100 µl Substratpuffer folgte eine Inkubation von 45 min bis 16 h bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 800 µl Stoppuffer beendet und die Absorption des entstandenen p-Nitrophenolats bei 405 nm gemessen. Pro Probe wurden je zwei Messungen bei E_{405} durchgeführt und der Mittelwert berechnet. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ für p-Nitrophenolat beträgt

18.500 l/mol·cm. Das Gesamtvolumen betrug 1 ml, die Schichtdicke 1 cm. Die Einheit U ist definiert als die Menge an Enzym, die 1 µmol Substrat pro Minute bei Standardbedingungen umsetzt. Daher berechnet sich die Aktivität des Enzyms nach der Formel:

$$\text{Aktivität [mU]} = \frac{E_{405} \times \text{Gesamtvolumen [ml]} \times 1000}{\varepsilon \times \text{Probenvolumen [ml]} \times \text{Inkubationszeit [min]} \times \text{Schichtdicke [cm]}}$$

3.2.4 Statistische Auswertung der Messdaten

Die statistische Analyse der erhaltenen Daten erfolgte mit dem Programm Microsoft® Excel 2000, Version 9.0. Bei Mehrfachbestimmungen wurde als Ergebnis das arithmetische Mittel dargestellt und die Standardabweichung angegeben. Als Nachweis für die Signifikanz der Unterschiede zweier verschiedener Datengruppen wurde der T-Test angewendet. Ab einem p-Wert < 0,05 wurde die Korrelation oder Änderung als statistisch signifikant eingestuft. Es erfolgte eine Unterteilung in drei Signifikanzniveaus: p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), und p < 0,005 (***).

4 ERGEBNISSE

4.1 Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der N-terminalen Domäne der GlcNAc-1-Phosphotransferase

Aus Sequenzanalysen ist bekannt, dass die luminaire Region mit den AS 60-430 des α/β -Vorstufenproteins Ähnlichkeiten zu dem N-terminalen Teil von Kapselbiosyntheseproteinen von Bakterien und Amöben aufweist (Abbildung 1.6) (Tiede *et al.*, 2005b). Diese Proteine binden UDP-GlcNAc und übertragen GlcNAc-1-Phosphat, um das Kapselpolymer aus ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-verknüpften GlcNAc-1-Phosphaten zu bilden (Tzeng *et al.*, 2003). Daher wird angenommen, dass die N-terminale Region (AS 60-430) des α/β -Vorstufenproteins für die Bindung des UDP-GlcNAc verantwortlich ist, das den Phosphatdonor für die M6P-Synthese darstellt. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte diese Hypothese sowie strukturelle Eigenschaften dieser Domäne experimentell untersucht werden.

4.1.1 Erstellen von geeigneten Konstrukten

Zur Untersuchung der N-terminalen Domäne der α -Untereinheit (AS 60-430) wurden zwei Konstrukte hergestellt, die C-terminal mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) fusioniert waren (Abbildung 4.1 A).

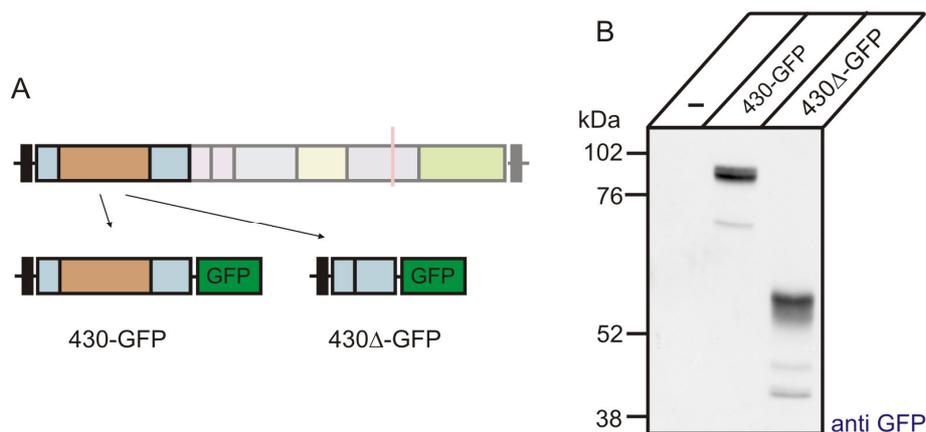


Abbildung 4.1: GFP-Konstrukte des N-terminalen Teils der α -Untereinheit. (A) Schematische Darstellung der GFP-Konstrukte des N-terminalen Teils der α -Untereinheit (430-GFP und 430 Δ -GFP). (B) SDS-PAGE und anti GFP-Westernblot-Analyse von BHK-Zellen, die mit 430-GFP und 430 Δ -GFP transfiziert wurden. Die molaren Massen von Markerproteinen sind in kDa angegeben.

Zum einen wurde der N-terminale Teil der α -Untereinheit (AS 1-430) amplifiziert und in den Expressionsvektor pEGFP-N1 kloniert, so dass die Domäne einen C-terminalen GFP-*tag* erhielt (430-GFP). Zwischen den zwei Domänen, die Ähnlichkeit zu Kapselbiosyntheseproteinen zeigen, ist eine Domäne eingefügt, die spezifisch nur in Säugetieren vorkommt (Tiede *et al.*, 2005b), deren Funktion jedoch nicht bekannt ist. Im zweiten Konstrukt wurden in einer *Overlap Extension*-PCR die säugerspezifische Domäne (AS 102-324, Abbildung 4.1 A, dargestellt in braun) deletiert und das PCR-Endprodukt wiederum in den Vektor pEGFP-N1 kloniert (430 Δ -GFP).

In nicht-transfizierten BHK-Zellen zeigten sich keine immunreaktiven Banden, was die spezifische Antikörperbindung belegt. Der Antikörper detektierte eine immunreaktive Bande für das 430-GFP-Konstrukt mit einer molaren Masse von 90 kDa und für das 430 Δ -GFP-Konstrukt von 55 kDa (Abbildung 4.1 B). Diese Banden wurden in einigen Fällen auch als gut erkennbare Doppelbanden aufgetrennt (siehe Abbildung 4.3).

Um die intrazelluläre Lokalisation der GFP-Konstrukte zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenzmikroskopien durchgeführt (Abbildung 4.2).

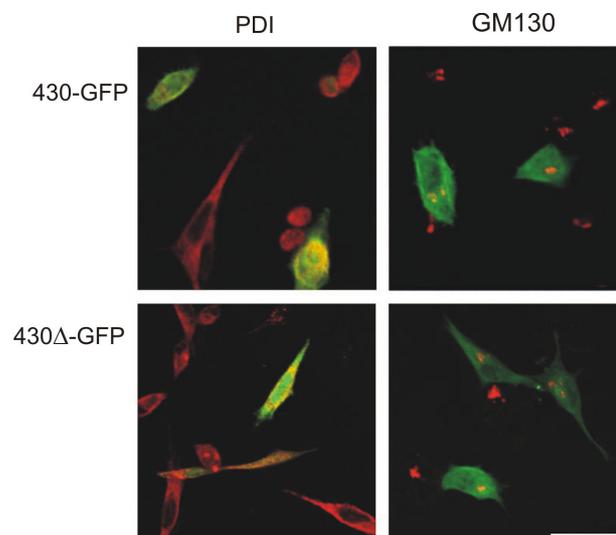


Abbildung 4.2: Lokalisation der Konstrukte 430-GFP und 430 Δ -GFP. Die Konstrukte 430-GFP und 430 Δ -GFP wurden in BHK-Zellen überexprimiert, die Zellen auf Glasplättchen fixiert und mittels Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Markiert wurden der *cis*-Golgi-Apparat mit anti GM130 bzw. das ER mit anti PDI (rot). Die transfizierten Konstrukte ließen sich über den grün-fluoreszierenden GFP-*tag* nachweisen; gelb zeigt die Kokoloration; der Balken entspricht 20 μ m.

Da GFP bei Anregung grün fluoresziert, kann die Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen direkt in der Immunfluoreszenzmikroskopie detektiert werden (Chalfie *et al.*, 1994). Das

ER-Markerprotein Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) und das *cis*-Golgi-Apparat-Markerprotein Golgi-Matrixprotein 130 (GM130) wurden indirekt über primäre und fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper nachgewiesen. Es zeigte sich, dass beide Konstrukte den Golgi-Apparat nicht erreichen, sondern im ER lokalisiert sind (Abbildung 4.2).

4.1.2 Strukturelle Analyse der N-terminalen Domäne

4.1.2.1 N-Glykosylierung

Basierend auf Sequenzanalysen enthält die N-terminale Domäne der α -Untereinheit (AS 1-430) sieben potentielle N-Glykosylierungsstellen mit der Konsensussequenz Asn-X-Thr/Ser. Zwei befinden sich in der Domäne mit Homologie zu Kapselbiosyntheseproteinen (N83 und N376, Abbildung 4.13 A, in blau dargestellt) und fünf in der eingefügten Domäne (N114, N148, N179, N250 und N287; Abbildung 4.13 A, in braun dargestellt).

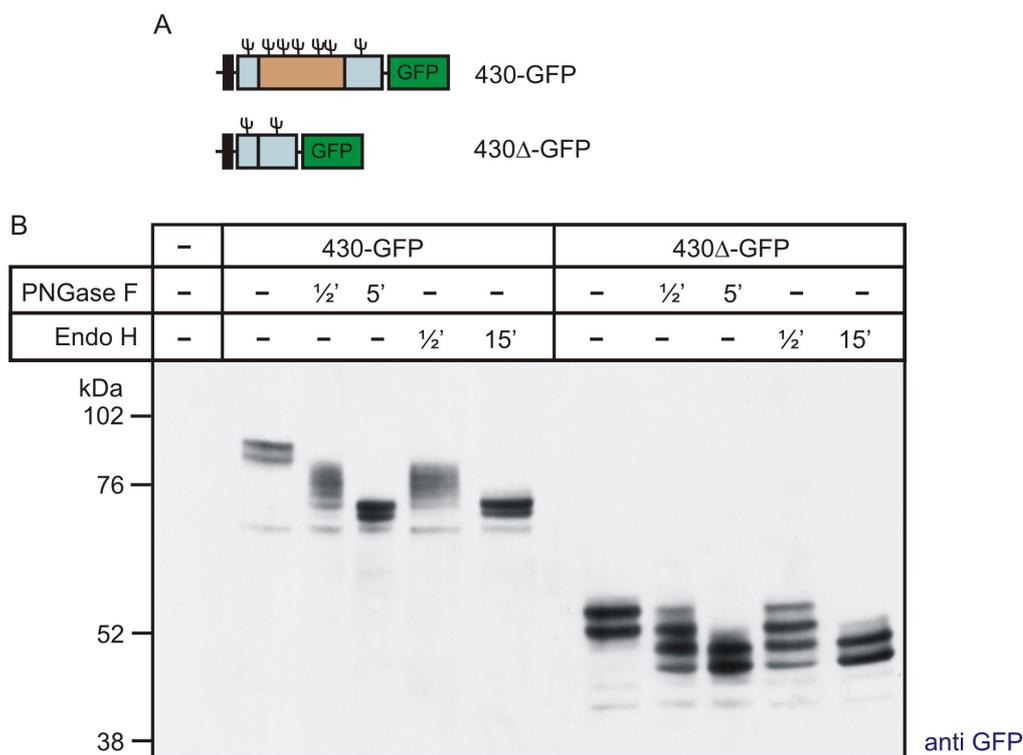


Abbildung 4.3: N-Glykosylierungen von 430-GFP und 430Δ-GFP. (A) Schematische Darstellung der für die Transfektion verwendeten GFP-Konstrukte mit potentiellen N-Glykosylierungsstellen. (B) BHK-Zellen wurden mit den Konstrukten 430-GFP und 430Δ-GFP transfiziert und die Lysate für verschiedene Zeiten (30 s, 5 min, 15 min) mit PNGase F oder Endo H behandelt. Es folgte eine Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE und die Analyse im anti GFP-Westernblot.

Um die *N*-Glykosylierung der N-terminalen Domäne zu untersuchen, wurden Lysate aus transfizierten BHK-Zellen für unterschiedliche Zeiten mit Endo H- bzw. PNGase F behandelt (Abbildung 4.3 B). Auf der linken Seite des Westernblots konnte eine Doppelbande bei ca. 90 kDa nachgewiesen werden, bei der es sich um die glykosylierte Form des 430-GFP-Konstruktes handelt. Nach Behandlung mit PNGase F für 30 s wurden die *N*-Glykane nur teilweise entfernt und es ergaben sich mehrere nicht voneinander unterscheidbare Banden zwischen 75 und 85 kDa. Die Behandlung mit PNGase F für 5 min führte zur vollständigen Deglykosylierung und einer Doppelbande bei ca. 73 kDa. Die Behandlung mit Endo H für 30 s führte wieder zu einer unvollständigen Deglykosylierung mit Banden zwischen 75 und 85 kDa. Die Behandlung für 15 min führte zu einer Doppelbande, die identisch zu der unter PNGase F-Behandlung war. Auf der rechten Seite des Westernblots wurden Lysate mit dem transfizierten 430Δ-GFP-Konstrukt unter gleichen Bedingungen behandelt. Das glykosylierte Protein konnte bei ca. 55 kDa detektiert werden. Auch hier liefert die vollständige Deglykosylierung mit PNGase F (5 min) und Endo H (15 min) identische Banden. Bei unvollständiger Behandlung mit PNGase F bzw. Endo H für 30 s konnten vier verschiedene Banden unterschieden werden. Je zwei davon fanden sich in nicht-behandelten Proben und in vollständig deglykosylierten Proben wieder (5 min PNGase F bzw. 15 min Endo H). Daraus kann geschlossen werden, dass beide Konstrukte nur mannosereiche und keine komplexen Oligosaccharide enthalten.

Um zu untersuchen, welche *N*-Glykosylierungsstellen im Konstrukt 430-GFP *in vivo* genutzt werden, wurden einzelne oder simultan mehrere Asparagin-Reste der *N*-Glykosylierungsstellen durch Glutamin-Reste substituiert. Die Konstrukte sind nachfolgend tabellarisch aufgeführt (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Auflistung der *N*-Glykosylierungsmutanten von 430-GFP. Neben der Nummer des Konstruktes sind die enthaltenen Mutationen mit + angegeben.

Nr.	N83Q	N114Q	N148Q	N179Q	N250Q	N287Q	N376Q
1	+	-	-	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-	-
4	+	+	+	+	-	-	-
5	+	+	+	+	+	-	-
6	+	+	+	+	+	+	-
7	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	-	+	+

Nach Überexpression dieser Mutanten in BHK-Zellen und anschließender Deglykosylierung mit PNGase F wurden die Proteinextrakte im Westernblot analysiert (Abbildung 4.4). Es konnte eine stufenweise Verringerung der molaren Masse von dem 430-GFP-Konstrukt (wt) zu Mutante 4 und dann von Mutante 5 zu 7 beobachtet werden. Keine Verringerung der molaren Masse konnte bei Mutante 5 (zusätzliche Mutagenese von N250) detektiert werden. Durch Behandlung von Mutante 7 mit PNGase F konnte die molare Masse nicht weiter verringert werden. Die gleichen Banden wurden erhalten, wenn N250 nicht mutiert wurde (Mutante 8), PNGase F-Behandlung hatte hier ebenfalls keinen Einfluss auf das elektrophoretische Laufverhalten. Somit konnte gezeigt werden, dass 6 der 7 potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen *in vivo* benutzt werden (N83, N114, N148, N179, N287 und N376), während der Asparaginrest an Position 250 nicht glykosyliert wird (Abbildung 4.4).

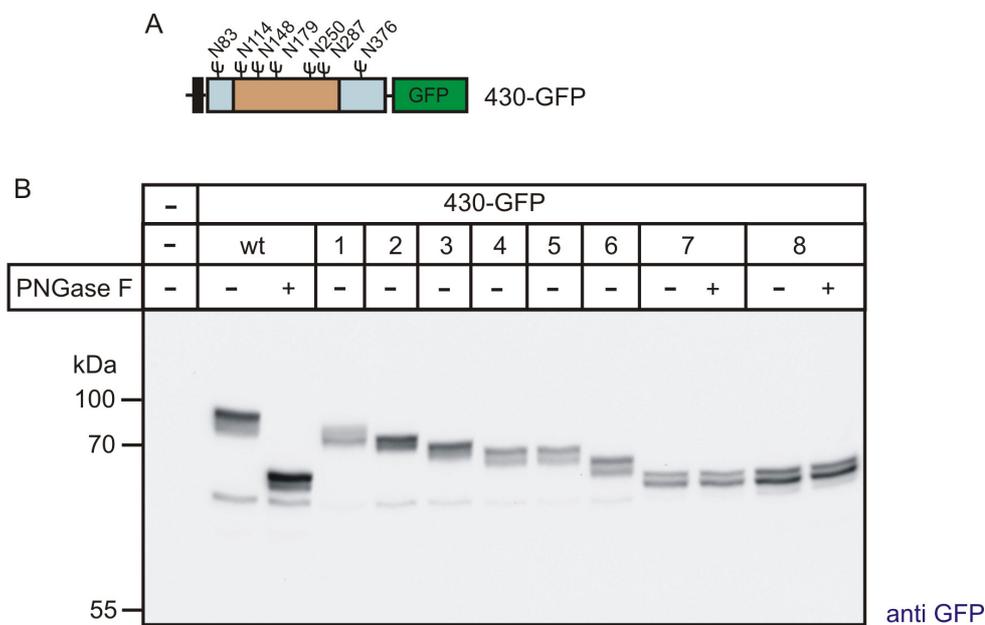


Abbildung 4.4: Glykosylierung der sieben potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen im Konstrukt 430-GFP. (A) Schematische Darstellung des verwendeten GFP-Konstruktes 430-GFP und der darin enthaltenen sieben potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen. (B) An dem Konstrukt 430-GFP erfolgten ortsspezifische Mutagenesen der sieben potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen. Die Mutationen und ihre Kombinationen können in Tabelle 4.1 verfolgt werden. Die Konstrukte wurden transient in BHK-Zellen transfiziert, die Zellysate mit oder ohne PNGase F behandelt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot analysiert.

Anschließend wurde das Konstrukt 430Δ-GFP, das zwei potentielle *N*-Glykosylierungsstellen enthält, untersucht (Abbildung 4.5 A). Die Asparaginreste N83 und N376 wurden durch ortsspezifische Mutagenese zu Glutaminen mutiert, in BHK-Zellen exprimiert und die

Lysate mit PNGase F behandelt (Abbildung 4.5 B). Im Westernblot konnte für beide Mutationen (N83Q und N376Q) eine Verringerung der molaren Masse im Vergleich zum 430Δ-GFP-Konstrukt (wt) festgestellt werden. Für beide Konstrukte führte die PNGase F-Behandlung zu einer Bande mit geringerer molarer Masse, was auf weitere *N*-Glykosylierungen schließen lässt. Das Konstrukt, das beide Mutationen enthält (N83, 376Q), gab eine immunreaktive Bande bei ca. 49 kDa. Durch PNGase F-Behandlung konnte die molare Masse nicht weiter verringert werden. Daraus kann man schließen, dass beide *N*-Glykosylierungsstellen *in vivo* genutzt werden. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit den Ergebnissen der Mutagenese von Konstrukt 430-GFP (Abbildung 4.4).

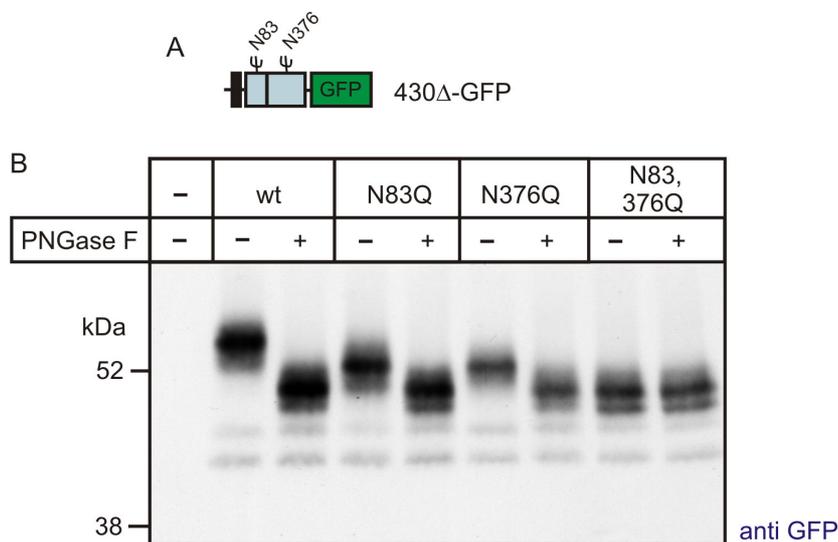


Abbildung 4.5: Glykosylierung der zwei potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen im Konstrukt 430Δ-GFP. (A) Schematische Darstellung des Konstruktes 430Δ-GFP und der zwei darin enthaltenen potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen. (B) Durch ortsspezifische Mutagenese wurden die zwei potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen des Konstruktes 430Δ-GFP einzeln oder simultan substituiert. Die Konstrukte wurden transient in BHK-Zellen transfiziert, die Zelllysate mit oder ohne PNGase F behandelt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot analysiert.

4.1.2.2 Dimerisierung

Es wurde bereits beschrieben, dass die α -Untereinheiten über Disulfidbrücken Homodimere bilden (Bao *et al.*, 1996a). Es sollte untersucht werden, ob der N-terminale Teil der α -Untereinheit an der Dimerisierung beteiligt ist und wenn ja, welche Cysteine involviert sind.

Dazu wurden Lysate von 430-GFP- und 430Δ-GFP-exprimierenden BHK-Zellen unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt und im anti GFP-Western-

blot analysiert. Das Konstrukt 430-GFP konnte als monomere (90 kDa) und dimere Form (180 kDa) nachgewiesen werden (Abbildung 4.6). Auch das Konstrukt 430Δ-GFP konnte als monomere (55 kDa) und dimere Form (110 kDa) detektiert werden. Die Behandlung der Lysate mit PNGase F zeigte, dass die Dimere N-glykosyliert sind.

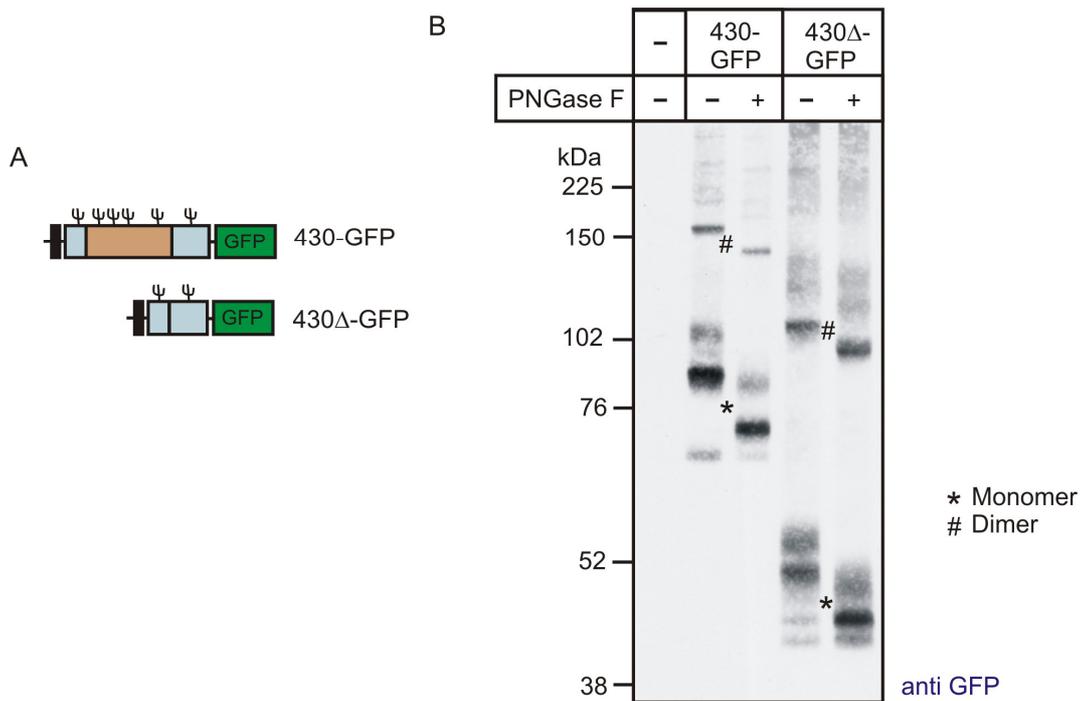


Abbildung 4.6: Dimerisierung der Konstrukte 430-GFP und 430Δ-GFP. (A) Schematische Darstellung der für die Transfektion verwendeten GFP-Konstrukte. (B) Lysate von 430-GFP- und 430Δ-GFP-überexprimierenden BHK-Zellen wurden mit oder ohne PNGase F behandelt, mittels SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend im anti GFP Westernblot analysiert. Die Positionen der monomeren (*) und dimeren Formen (#) ist angezeigt.

Die N-terminale Domäne der α -Untereinheit enthält fünf Cysteinreste (C13, C23, C70, C128 und C130), die an der Dimerisierung beteiligt sein könnten (Abbildung 4.7 A). Cystein C13 in der zytosolischen Domäne und C23 in der Transmembrandomäne wurden aus topologischen Gründen für die Ausbildung von Homodimeren ausgeschlossen. Da auch das Konstrukt 430Δ-GFP Dimere bilden kann, wurden die Cysteinreste C128 und C130 in der eingefügten säugerspezifischen Domäne ebenfalls ausgeschlossen.

Der verbliebene Cysteinrest C70 wurde in den Konstrukten 430-GFP und 430Δ-GFP zu Serin mutiert. Die Konstrukte wurden in BHK-Zellen exprimiert, mittels SDS-PAGE unter reduzierenden und unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und im anti GFP-

Westernblot analysiert (Abbildung 4.7 B und C). Unter reduzierenden Bedingungen konnten die Konstrukte 430-GFP und 430 Δ -GFP als monomere Formen von ~90 und ~55 kDa nachgewiesen werden. Die gleichen molaren Massen wurden beim Austausch C70S beobachtet (Abbildung 4.7 B). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen konnten für beide nicht-mutierten Konstrukte die schon in Abbildung 4.6 beschriebenen monomeren und dimeren Formen detektiert werden. Die Mutation des Cysteinrestes C70 verhinderte in beiden Konstrukten die Dimerisierung (Abbildung 4.7 C). Die Daten zeigen, dass der Cysteinrest C70 an der Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken und der Dimerisierung der α -Untereinheit beteiligt ist.

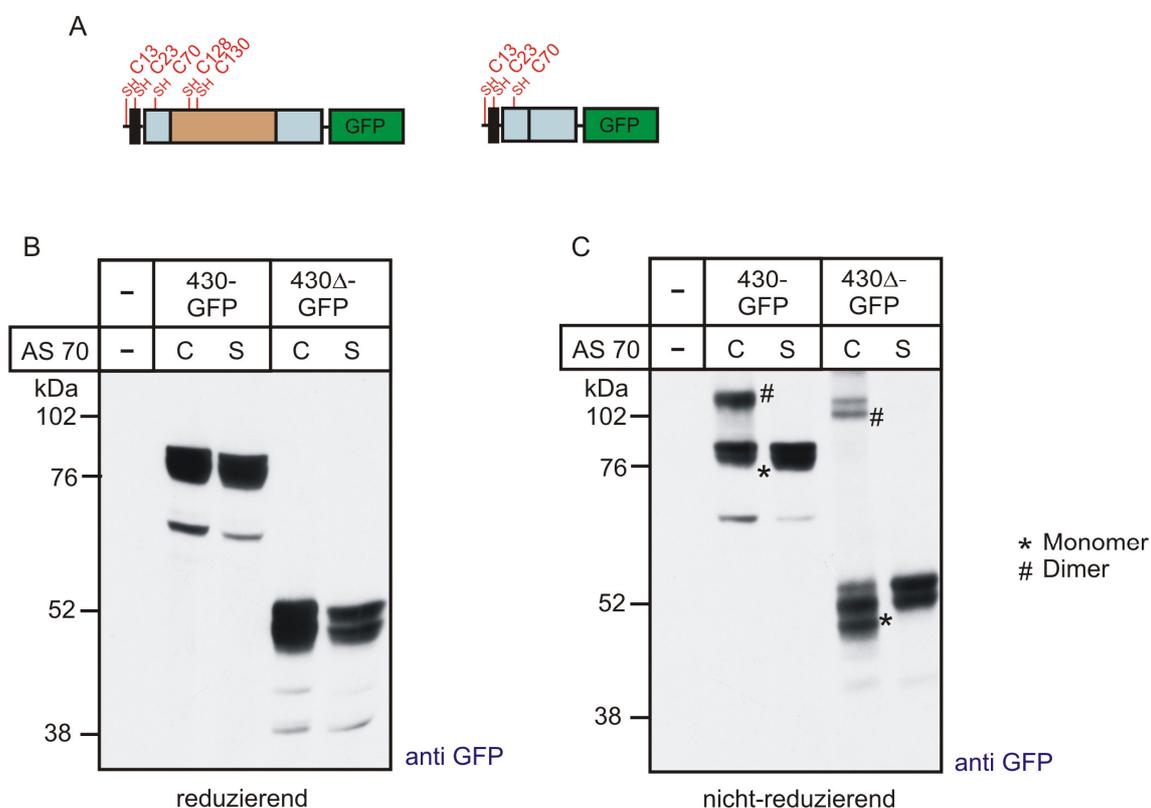


Abbildung 4.7: Analyse der Ausbildung von intermolekularen Cysteinbrücken. (A) Schematische Darstellung der Cystein-Reste in der N-terminalen Domäne des α/β -Vorstufenproteins anhand der verwendeten GFP-Konstrukte. (B) Ortsspezifische Mutagenese des Cystein-Restes (C) an Position 70 zu Serin (S), SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen und anschließende anti GFP-Westernblot-Analyse. (C) Die gleichen Proben, wie unter B beschrieben, wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und durch anti GFP-Westernblot untersucht.

4.1.3 Funktionelle Analyse der N-terminalen Domäne

Nach der strukturellen Analyse sollte die funktionelle Analyse des N-terminalen Teils des α/β -Vorstufenproteins erfolgen. Unter der Annahme, dass der luminaire Bereich (AS 60 - 430) für die Bindung an UDP-GlcNAc verantwortlich ist, wurde die Bindung an *Reactive Green-19*-Agarose, einem Farbstoff, der strukturelle Ähnlichkeiten zu Nukleotiden aufweist, untersucht. Des Weiteren wurde die Bindung des an Hexanolamin gebundenen UDP analysiert. Der Einfluss der identifizierten N-Glykosylierungsstellen auf die Bindung sollte ebenfalls geprüft werden.

4.1.3.1 Untersuchung der Substratbindung mit *Reactive Green-19*-Agarose

Es ist bekannt, dass sogenannte „reaktive Farbstoffe“ (*reactive dyes*) an Proteine binden, die Affinitäten zu verschiedenen Nukleotiden haben (Stead, 1987). Bei der biochemischen Reinigung der bovinen GlcNAc-1-Phosphotransferase wurde u. a. die Bindung an *Reactive Green-19*-Agarose ausgenutzt (Bao *et al.*, 1996a).

Um zu untersuchen, ob die luminaire, N-terminale Domäne der α -Untereinheit (AS 60 - 430) die UDP-GlcNAc-Substratbindungsstelle enthält, wurden BHK-Zellen mit den Konstrukten 430-GFP und 430 Δ -GFP transfiziert und die Lysate mit *Reactive Green-19*-Agarose inkubiert. Als Kontrolle diente GFP, das keine Bindung an *Reactive Green-19*-Agarose zeigen sollte. Der Überstand, die an die Agarose-*beads* gebundenen Proteine sowie ein Aliquot der für die Bindung eingesetzten Lysate wurden im Westernblot analysiert (Abbildung 4.8). GFP wurde sehr hoch exprimiert und konnte im Lysat als 27 kDa immunreaktive Bande nachgewiesen werden. Die Konstrukte 430-GFP und 430 Δ -GFP wurden schwächer exprimiert und waren in den Lysaten als schwache Banden bei 90 kDa und 55 kDa nachweisbar. Nach der Inkubation mit *Reactive Green-19*-Agarose-*beads* konnte der Hauptteil des GFP im Überstand nachgewiesen werden. Die Proteine 430-GFP und 430 Δ -GFP waren in den Überständen nicht nachweisbar, sie wurden als intensive Banden in der Fraktion mit den an die Agarose-*beads* gebundenen Proteinen nachgewiesen.

Beide Konstrukte des N-terminalen Bereichs des α/β -Vorstufenproteins (430-GFP und 430 Δ -GFP), nicht aber GFP, binden an *Reactive Green-19*-Agarose. Die densitometrische Auswertung des Westernblots zeigte, dass 1 % von GFP, 83 % von 430-GFP und 93 % von

430Δ-GFP an *Reactive Green-19*-Agarose gebunden wurden. Diese Experimente geben einen ersten Hinweis darauf, dass die Bindung von UDP-GlcNAc tatsächlich an die N-terminale Domäne des α/β-Vorstufenproteins (AS 60-430) erfolgt.

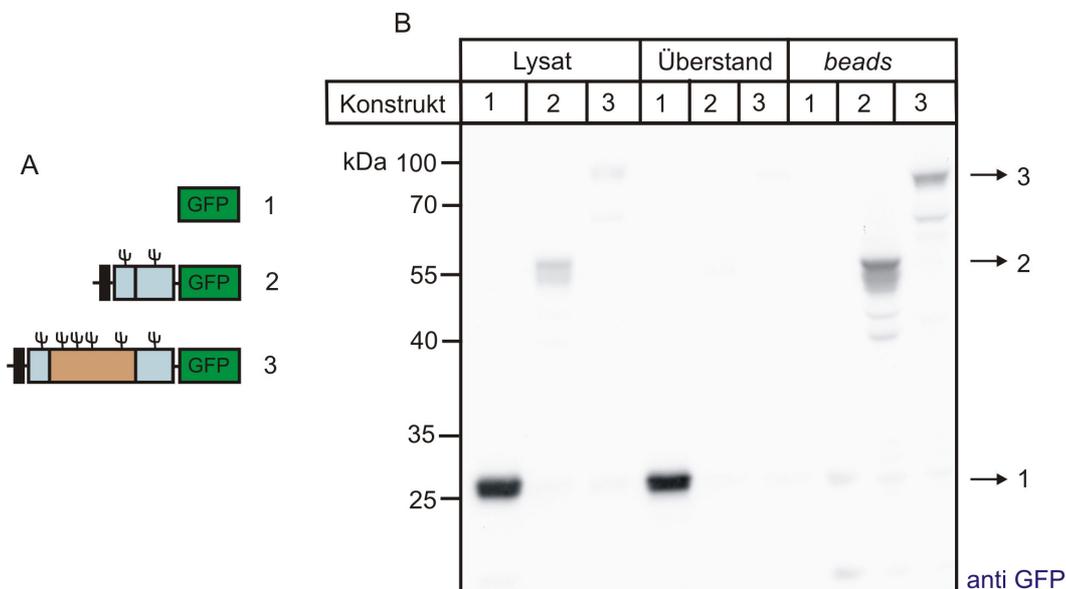


Abbildung 4.8: Bindung der Konstrukte 430-GFP und 430Δ-GFP an *Reactive Green-19*-Agarose. (A) Schematische Darstellung der verwendeten GFP-Konstrukte 1 - 3. (B) Die GFP-Konstrukte 1, 2 oder 3 wurden transient in BHK-Zellen transfiziert und die Lysate für Bindungsexperimente an *Reactive Green-19*-Agarose eingesetzt. Nach der Inkubation wurden die Agarose-*beads* durch Zentrifugation vom nicht-gebundenem Material abgetrennt. Aliquote der Lysate vor der Inkubation (10 % von total), des Überstandes nach der Inkubation (10 %) und die an die Agarose-*beads* gebundenen Proteine (*beads*, 100 %) wurden anschließend solubilisiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und im anti GFP-Westernblot analysiert.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob die *N*-Glykane der N-terminalen Domäne einen Einfluss auf die Bindung an *Reactive Green-19*-Agarose haben. Dazu wurden die unter 4.1.2.1 erstellten Konstrukte verwendet, in denen die *N*-Glykosylierungsstellen mutiert wurden. Als Kontrolle wurden im selben Experiment die *N*-glykosylierten Konstrukte eingesetzt (Abbildung 4.9 A). In diesem Experiment konnten die N-terminalen GFP-Konstrukte in geringen Mengen auch im Überstand nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass entweder die Menge der *Reactive Green-19*-Aragose nicht ausreichte alle N-terminalen GFP-Konstrukte zu binden, oder dass ein Teil der N-terminalen Konstrukte aufgrund der hohen Überexpression noch nicht ausreichend gefaltet war, um eine Bindung an *Reactive Green-19*-Agarose zu ermöglichen. Der Hauptanteil konnte jedoch in der

Fraktion gebundener Proteine angereichert werden. GFP war wieder hauptsächlich im Überstand und nur in geringem Maß in der Fraktion der gebundenen Proteine nachweisbar. Konstrukte bei denen die benutzten *N*-Glykosylierungsstellen (N83, N114, N148, N179, N287 und N376) durch Glutamin ausgetauscht wurden, zeigten ebenfalls eine Bindung an *Reactive Green 19*-Agarose. Die Resultate lassen vermuten, dass die *N*-Glykosylierungen in diesem Bereich des α/β -Vorstufenproteins nicht für die Bindung von UDP-GlcNAc benötigt werden (Abbildung 4.9 B).

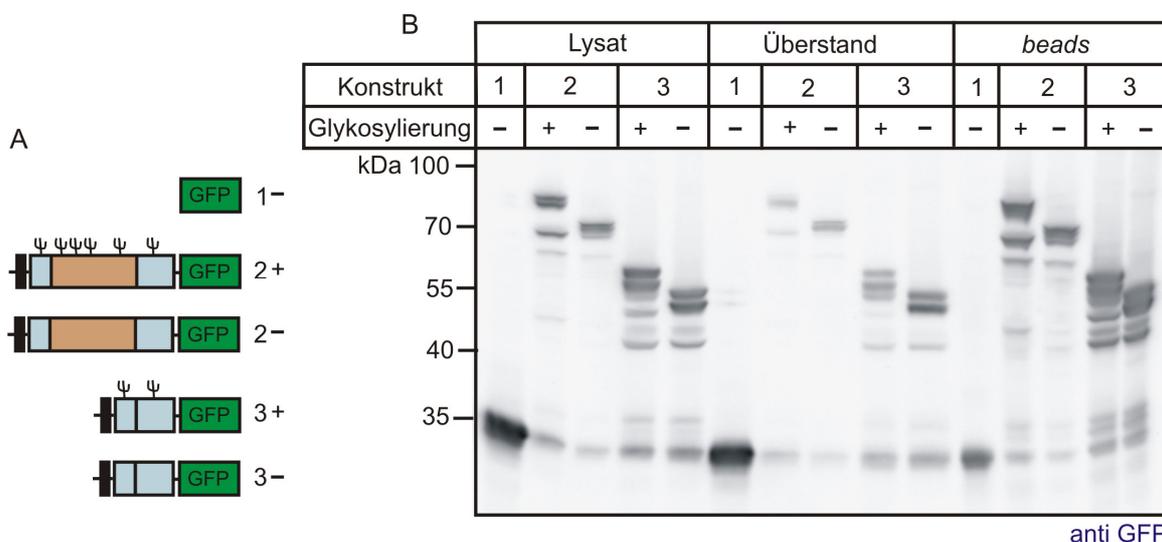


Abbildung 4.9: Bindung der deglykosylierten N-terminalen GFP-Konstrukte an *Reactive Green-19*-Agarose. (A) Schematische Darstellung der verwendeten GFP-Konstrukte. Es wurden neben den glykosylierten Konstrukten (+) auch Konstrukte eingesetzt, bei denen die *N*-Glykosylierungen durch ortsspezifische Mutagenen entfernt wurden (-). (B) Die unter A angegebenen Konstrukte wurden in BHK-Zellen exprimiert, die Lysate, wie in der Legende der Abbildung 4.8 beschrieben, für Bindungsexperimente an *Reactive Green-19*-Agarose eingesetzt und im anti GFP-Westernblot analysiert.

4.1.3.2 Untersuchung der Substratbindung mit UDP-Hexanolamin

Um die Bindungsstudien mit *Reactive Green-19*-Agarose zu verifizieren, wurde die Bindung an UDP-Hexanolamin untersucht. Die Bindung von UDP-Hexanolamin an Proteine, die UDP-aktivierte Zucker als Substrat für enzymatische Reaktionen nutzen, konnte für mehrere Proteine nachgewiesen werden (Oguri *et al.*, 1997; Sadler *et al.*, 1981; Sadler *et al.*, 1979).

Zunächst wurde die Bindung der N-terminalen Konstrukte des α/β -Vorstufenproteins (430-GFP und 430 Δ -GFP) an UDP-Hexanolamin-gekoppelte Agarose untersucht. In BHK-

Zellen wurden GFP und das Konstrukt 430-GFP exprimiert und die Lysate anschließend mit UDP-Hexanolamin-gekoppelter Agarose inkubiert. Die Lysate, Überstände und die an die Agarose-gebundene Fraktion wurden im Westernblot untersucht. Als Kontrolle für die Bindung wurde die Inkubation von GFP- und 430-GFP-transfizierten Lysaten mit *Reactive Green-19*-Agarose aufgetragen (Abbildung 4.10).

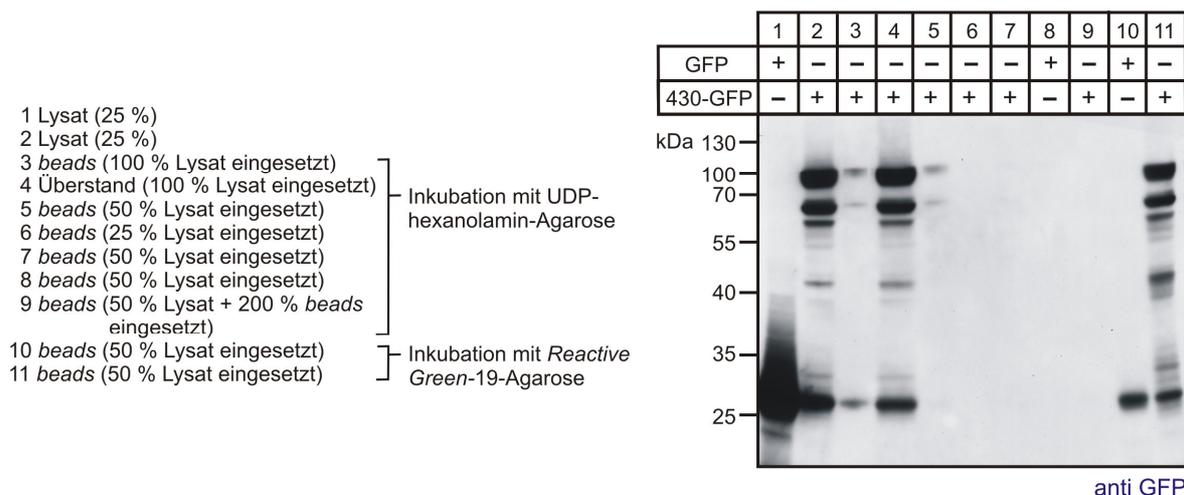


Abbildung 4.10: Bindung des N-terminalen Konstrukts 430-GFP an UDP-Hexanolamin-Agarose. GFP und das Konstrukt 430-GFP wurde transient in BHK-Zellen exprimiert, die Lysate über Nacht bei 4 °C mit UDP-Hexanolamin- bzw. *Reactive Green-19*-Agarose inkubiert und Aliquote der Lysate vor der Inkubation (25 %; 1, 2), die Überstände nach der Inkubation (4) und die an die Agarose-*beads* gebundene Fraktion (*beads*; 3, 5-11) mittels SDS-PAGE im angegebenen Auftragschema aufgetrennt und durch anti GFP-Westernblot analysiert.

Es konnte unter verschiedenen Inkubationsbedingungen, im Vergleich zu der Bindung an *Reactive Green-19*-Agarose, keine signifikante Bindung von 430-GFP an UDP-Hexanolamin-Agarose nachgewiesen werden.

In einem zweiten Versuchsansatz wurde UDP-Hexanolamin an BSA gekoppelt und dieses anschließend mit [¹²⁵I] markiert. In BHK-Zellen wurden 430-GFP und 430Δ-GFP exprimiert und die Konstrukte an GFP-Trap[®]-Agarose gebunden. Die Bindung von GFP, 430-GFP und 430Δ-GFP an GFP-Trap[®]-Agarose wurde in einem Vorexperiment bestätigt (Daten nicht gezeigt). Anschließend erfolgte die Inkubation mit [¹²⁵I]-markiertem UDP-Hexanolamin-BSA. Die an GFP-Trap[®]-Agarose gebundene Fraktion wurde im γ-Counter

4.2 Identifizierung der α/β -Vorstufenprotein-spaltenden Protease

Das α/β -Vorstufenprotein der GlcNAc-1-Phosphotransferase ist ein Typ III-Membranprotein, das aus 1256 AS besteht und 20 potentielle *N*-Glykosylierungsstellen enthält (Abbildung 1.6; Tiede *et al.*, 2005b). Erst nach proteolytischer Spaltung in die α - und β -Untereinheit erlangt die GlcNAc-1-Phosphotransferase ihre Aktivität (Kudo & Canfield, 2006). Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die proteolytische Spaltung untersucht werden.

4.2.1 Generierung von polyklonalen Antikörpern zum Nachweis des α/β -Vorstufenproteins

Der Nachweis des α/β -Vorstufenproteins sowie der gespaltenen α - und β -Untereinheit konnte bisher nur über Fusionsproteine geführt werden, da kommerziell keine Antikörper erhältlich waren. Zum direkten Nachweis des α/β -Vorstufenproteins im Westernblot und in der Immunfluoreszenzmikroskopie sollten daher Antikörper gegen die α - und die β -Untereinheit hergestellt werden.

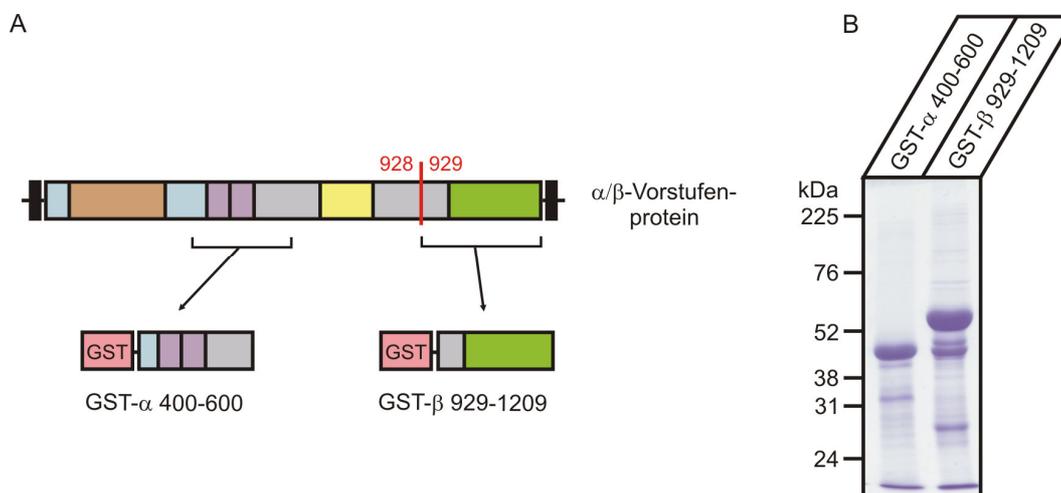


Abbildung 4.12: GST-Fusionsproteine für die Immunisierung von Kaninchen zur Antikörpergewinnung. (A) Schematische Darstellung des α/β -Vorstufenproteins (Tiede *et al.*, 2005b) und der für die Antikörpergewinnung ausgewählten Domänen, die als GST-Fusionsproteine kloniert wurden. (B) Die GST-Fusionsproteine wurden in *E. coli* exprimiert und aus den Lysaten gereinigt. Anschließend wurden 25 μ g der gereinigten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt.

Dazu wurden zwei Regionen des α/β -Vorstufenproteins ausgewählt: AS 400 bis 600 (entspricht einem luminalen Teil der α -Untereinheit) und AS 929 bis 1209 (entspricht dem

luminalen Anteil der β -Untereinheit). Die ausgewählten Bereiche wurden über PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pGEX 4T-1 kloniert, so dass die Domänen einen N-terminalen GST-*tag* erhielten (GST- α 400-600, GST- β 929-1209; Abbildung 4.12 A). Die GST-Fusionsproteine wurden in *E. coli* BL21 exprimiert, aus den Extrakten gereinigt (Abbildung 4.12 B) und für die Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Anschließend wurden die Antikörper affinitätschromatographisch aus den gewonnenen Antiseren gereinigt.

Extrakte aus nicht-transfizierten BHK-Zellen und aus BHK-Zellen, die mit der cDNA des humanen α/β -Vorstufenproteins transfiziert wurden, dienten der Testung der Antikörper im Westernblot. Antikörper gegen die β -Untereinheit (anti β -UE) erkannten das 190 kDa α/β -Vorstufenproteins und die 45 kDa gesplattene β -Untereinheit, die in nicht-transfizierten Zellen nicht vorhanden waren (Abbildung 4.13 A, B). Nach Behandlung der Extrakte mit PNGase F waren ein 170 kDa und ein 38 kDa Polypeptid nachweisbar, bei denen es sich um die entsprechenden deglykosylierten Formen handelte. Während PNGase F alle *N*-glykosidischen Bindungen hydrolysiert, spaltet Endo H nur mannosereiche Oligosaccharide und resultiert in zwei Banden für die β -Untereinheit (40 und 42 kDa) und in einer 170 kDa-Bande für das α/β -Vorstufenprotein. Diese Daten zeigen, dass das α/β -Vorstufenprotein nur mannosereiche Oligosaccharide enthält, während die β -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase sowohl mit mannosereichen als auch komplexen Oligosacchariden modifiziert ist.

Die endogene β -Untereinheit konnte bisher nur in primär kultivierten humanen Makrophagen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Brand, UKE) detektiert werden, und wies die gleiche molare Masse auf wie in überexprimierenden BHK-Zellen (Abbildung 4.13 C). Nach PNGase F-Behandlung war die nicht-glykosylierte β -Untereinheit ebenfalls als 38 kDa Protein nachweisbar. Das α/β -Vorstufenprotein konnte in humanen Makrophagen nicht detektiert werden.

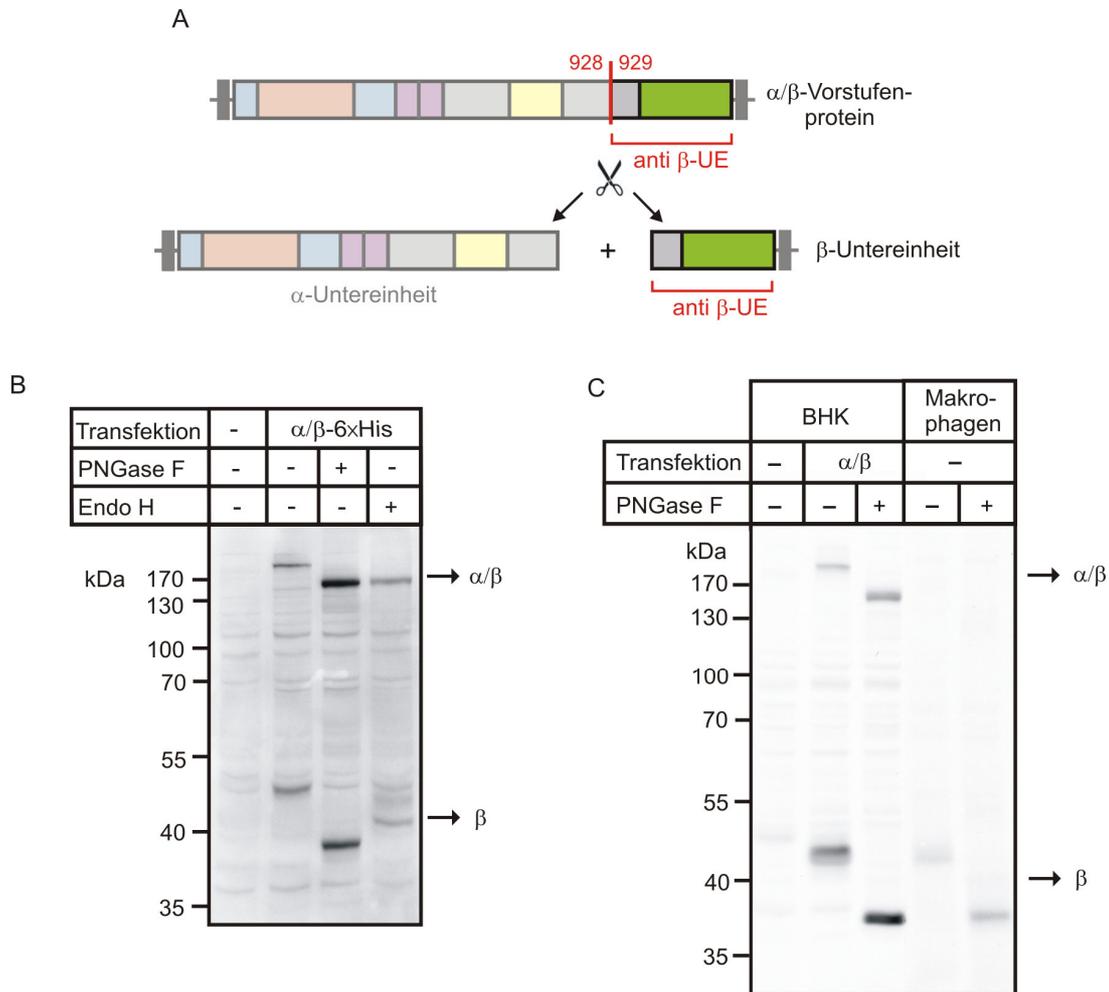


Abbildung 4.13: Einsatz des generierten anti β -UE Antikörpers in Westernblot-Analysen. (A) Schematische Darstellung des α/β -Vorstufenproteins und der gespaltenen α - und β -Untereinheiten. Der generierte Antikörper ist gegen den luminalen Anteil der β -Untereinheit gerichtet (rot markiert). (B) BHK-Zellen wurden mit dem *full length* α/β -Vorstufenprotein-6xHis transfiziert, Aliquote der Lysate mit PNGase F oder Endo H behandelt und im Westernblot analysiert. Nicht transfizierte Zellen (-) dienten als Kontrolle. (C) Westernblot-Analyse von Lysaten aus transfizierten BHK-Zellen und nicht-transfizierten Makrophagen. Aliquote der Lysate wurden mit PNGase F behandelt.

Die GlcNAc-1-Phosphotransferase ist im *cis*-Golgi-Apparat lokalisiert (Tiede *et al.*, 2005b). Um zu überprüfen, ob der generierte Antikörper auch in der Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet werden kann, wurden Lokalisationsanalysen an transfizierten BHK-Zellen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die β -Untereinheit mit dem *cis*-Golgi-Apparat-Marker GM130 colokalisierte, aber nicht mit dem ER-Markerprotein PDI (Abbildung 4.14).

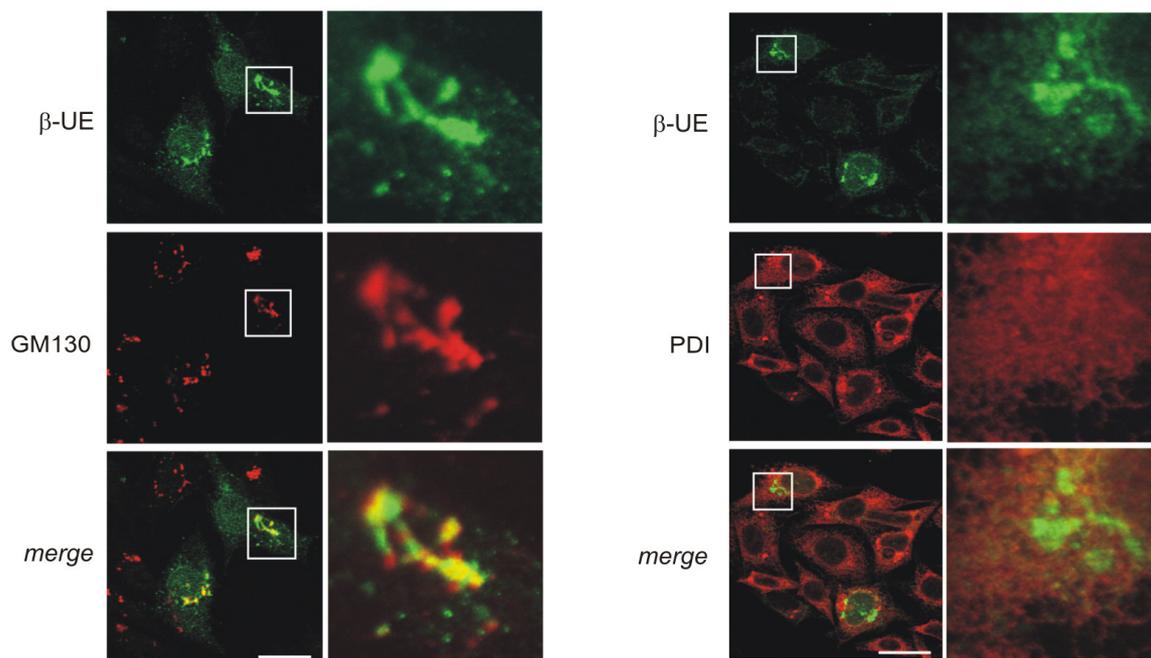


Abbildung 4.14: Einsatz des generierten anti- β -UE Antikörpers in Doppelimmunfluoreszenzmikroskopien. Das α/β -Vorstufenprotein wurde in BHK-Zellen überexprimiert, die Zellen auf Glasplättchen fixiert und mittels Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Markiert wurde der *cis*-Golgi-Apparat mit anti GM130- bzw. das ER mit anti PDI-Antikörpern (rot) und das transfizierte α/β -Vorstufenprotein bzw. die daraus gebildete β -Untereinheit mit dem generierten Antikörper (anti β -UE, grün); gelb zeigt die Colokalisation; der Balken entspricht 20 μ m.

Der Antikörper gegen den ausgewählten luminalen Bereich der α -Untereinheit zeigte weder im Westernblot noch in Immunfluoreszenzmikroskopien spezifische Signale für das überexprimierte oder endogene α/β -Vorstufenprotein bzw. die α -Untereinheit (Daten nicht gezeigt) und wurde daher nicht weiterverwendet.

4.2.2 Erstellen von geeigneten Konstrukten

Die Spaltstelle, die das α/β -Vorstufenprotein in die reife α - und β -Untereinheit teilt, liegt in einer nicht-konservierten Domäne, die die AS 820 - 998 umfasst. Um eine hohe Transfektionseffizienz zu erreichen und Mutationsanalysen zu erleichtern, wurden verkürzte Konstrukte hergestellt, um die strukturellen Voraussetzungen für die Proteolyse des α/β -Vorstufenproteins zu analysieren (Abbildung 4.15 A). Die Konstrukte 2, 3, 4 und 6 wurden mittels *Overlap Extension* PCR hergestellt (Abbildung 3.1), indem zwei normalerweise nicht verbundene Regionen des α/β -Vorstufenproteins miteinander verknüpft wurden.

Bei Konstrukt 2 wurden die Regionen AS 1 - 430 und AS 919 - 1256, bei Konstrukt 3 die Regionen AS 1 - 430 und AS 821 - 1256 miteinander verknüpft. Bei Konstrukt 4 wurde der N-Terminus und die Transmembrandomäne (AS 1 - 59) mit den AS 820 - 1256 verknüpft. Das Konstrukt 5 kodiert die AS 820 - 1256. In Konstrukt 6 wurde der N-Terminus mit der Transmembrandomäne (AS 1 - 59) mit den AS 820 - 1212 verknüpft, wobei die C-terminale Transmembrandomäne und der C-Terminus deletiert wurden.

Alle Konstrukte wurden transient in BHK-Zellen transfiziert und die Lysate im Westernblot analysiert (Abbildung 4.15 B). Das Konstrukt 2, bei dem 10 AS vor der Spaltstelle erhalten wurden, wurde nicht gespalten und ist damit nicht für die Untersuchungen der Spaltung geeignet. Das Konstrukt 3, bei dem die 109 AS der nicht-konservierten Domäne vor der Spaltstelle erhalten wurden, wurde gespalten. Die Konstrukte 4, 5 und 6 konnten im Westernblot nicht detektiert werden (nicht gezeigt).

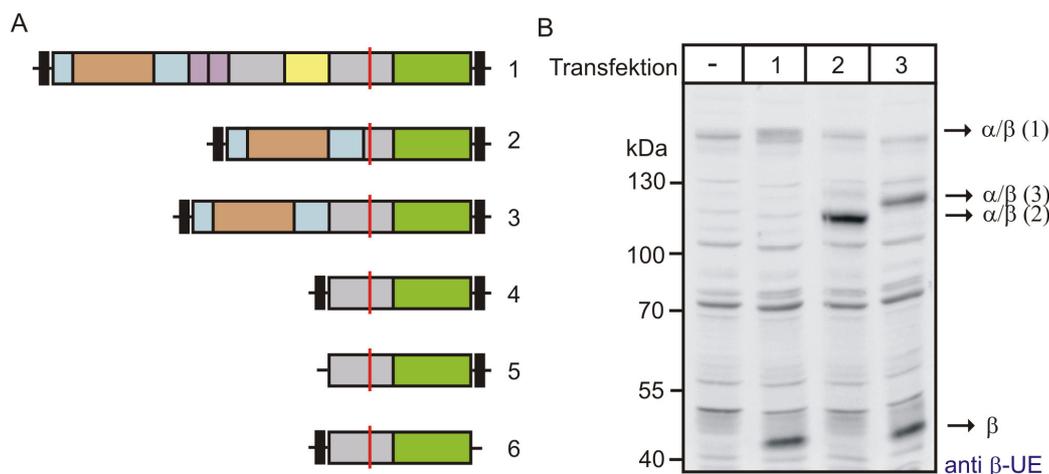


Abbildung 4.15: Konstrukte zur Analyse der Spaltung des α/β -Vorstufenproteins. (A) Schematische Darstellung des α/β -Vorstufenproteins (1) und der erstellten Konstrukte (2 - 6). (B) SDS-PAGE und anschließende anti β -UE Westernblot-Analyse von Lysaten aus BHK-Zellen, die mit dem α/β -Vorstufenprotein und den Konstrukten 2 und 3 transfiziert wurden.

Ausgehend von Konstrukt 2 und 3, bei denen 10 bzw. 109 AS der nicht-konservierten Domäne der α -Untereinheit vor der Spaltstelle erhalten wurden (Abbildung 4.15 A), wurden weitere Konstrukte erstellt, die schrittweise N-terminal zur Spaltstelle verkürzt waren (80, 40, 20 AS). Die Konstrukte wurden in BHK-Zellen exprimiert und im anti β -UE Westernblot analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass aus der nicht-konservierten Domäne

mindestens 20 AS vor der potentiellen Spaltstelle für die Erkennung durch die bisher unbekannte Protease notwendig waren. Eine effektive Spaltung erfolgt, wenn 80 AS vor der Spaltstelle erhalten blieben (Konstrukt 7 in Abbildung 4.16). Dieses Konstrukt wurde daher für alle weiteren Experimente verwendet und wird im Folgenden mit α/β -Minikonstrukt bezeichnet.

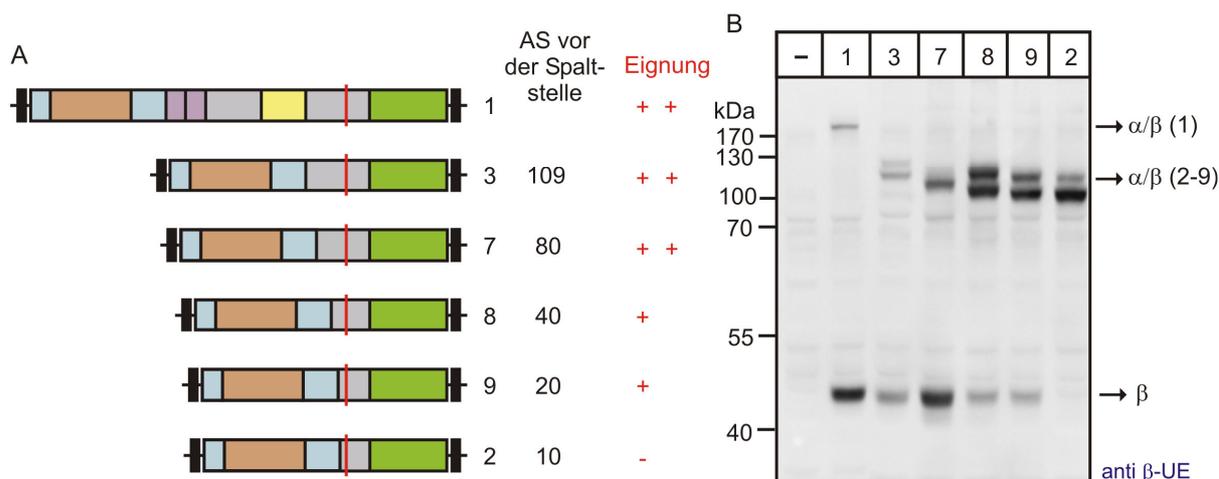


Abbildung 4.16: Optimierung der Konstrukte zur Analyse der Spaltung des α/β -Vorstufenproteins. (A) Schematische Darstellung des α/β -Vorstufenproteins (1) und der erstellten Konstrukte (2, 3, 7-9), die Anzahl der AS der α -Untereinheit N-terminal zur Spaltstelle und die Angabe zur Eignung als Substrat (++ gut, + ausreichend, - ungeeignet) sind angegeben. (B) SDS-PAGE und anschließende anti β -UE Westernblot-Analyse von Lysaten aus BHK-Zellen, die mit den in A dargestellten Konstrukten transfiziert wurden.

Um zu untersuchen, ob die Deletion von AS 431 bis 848 einen Einfluss auf die Lokalisation des α/β -Minikonstruktes hat, wurden Immunfluoreszenzmikroskopien durchgeführt. Transfizierte BHK-Zellen wurden fixiert und mit dem anti β -UE, sowie mit einem Antikörper gegen das *cis*-Golgi-Apparat-Protein GM130 bzw. gegen das ER-Protein PDI inkubiert (Abbildung 4.17). Wie für das unverkürzte α/β -Vorstufenprotein (Vgl. Abbildung 4.14) konnte auch für das α/β -Minikonstrukt eine Lokalisation im *cis*-Golgi-Apparat nachgewiesen werden (gelbe Färbung). Das Konstrukt zeigte keine Colokalisation mit dem ER-Marker PDI.

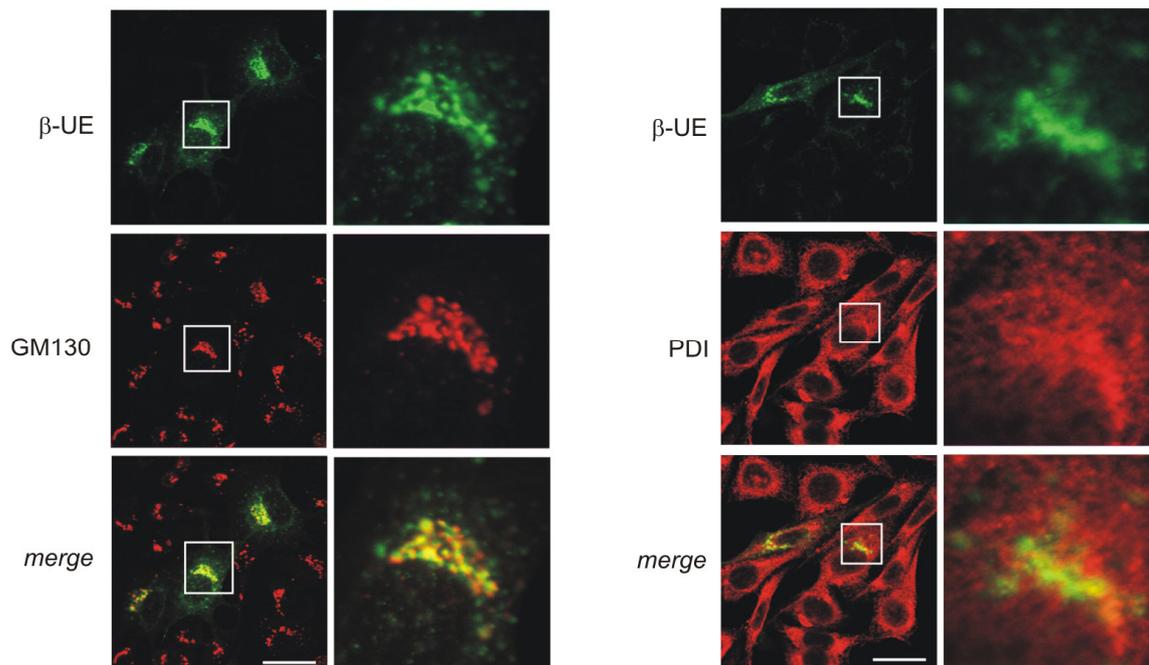


Abbildung 4.17: Lokalisation des α/β -Minikonstruktes in BHK-Zellen. Das α/β -Minikonstrukt wurde in BHK-Zellen überexprimiert, die Zellen auf Glasplättchen fixiert und mittels Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Markiert wurden der *cis*-Golgi-Apparat mit anti GM130 bzw. das ER mit anti PDI (rot) und das transfizierte α/β -Minikonstrukt bzw. die daraus gebildete β -Untereinheit (anti β -UE, grün); gelb zeigt die Colokalisation; der Balken entspricht 20 μm .

4.2.3 Untersuchungen zur proteolytischen Spaltung des α/β -Vorstufenproteins

Es wird angenommen, dass im humanen Genom etwa 550 Proteasen kodiert werden (Puente *et al.*, 2003). Um die Auswahl einzugrenzen, sollte zunächst untersucht werden, um welchen Typ von Protease es sich handelt und in welchem Zellkompartiment die Spaltung stattfindet. Weiterhin können Angaben über die AS, die für die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins essentiell sind, über den Vergleich mit bekannten Konsensussequenzen bekannter Proteasen Hinweise auf die Protease liefern.

4.2.3.1 Hemmung der Spaltung durch Proteaseinhibitoren

Um den Proteasentyp (Serin-, Cystein- oder Aspartylprotease) zu bestimmen, wurden mit dem α/β -Minikonstrukt transfizierte BHK-Zellen mit sechs verschiedenen Proteaseinhibitoren für 16 h behandelt. Die verwendeten Konzentrationen der Inhibitoren wurden

aus der Literatur von vergleichbaren Fragestellungen übernommen. Anschließend wurden die Zellextrakte im anti β -UE Westernblot analysiert (Abbildung 4.18). Bei keiner der eingesetzten Inhibitoren konnte einer Verringerung der Spaltung des α/β -Minikonstruktes zur reifen β -Untereinheit nachgewiesen werden. Es wurde auch die Degradation über das Proteasom mit dem Inhibitor ALLN untersucht, wobei sich ebenfalls keine verringerte Spaltung zur reifen β -Untereinheit ergab.

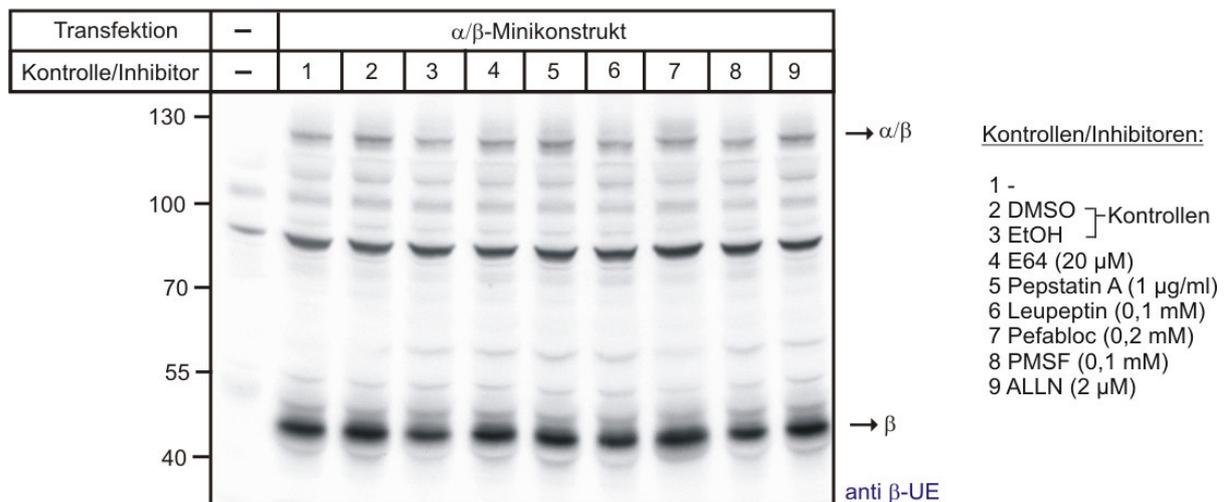


Abbildung 4.18: Behandlung von α/β -Minikonstrukt-exprimierenden BHK-Zellen mit verschiedenen Proteaseinhibitoren. Zellen wurden mit dem α/β -Minikonstrukt transfiziert und über Nacht mit den angegebenen Inhibitoren (4 - 9) bzw. den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen (2, 3) inkubiert. Es folgte eine Auftrennung der Zellysate mittels SDS-PAGE und anschließende anti β -UE Westernblot-Analyse. (E64 - Cysteinproteaseinhibitor, Pepstatin A - Aspartylproteaseinhibitor, Leupeptin - Serin- und Cysteinproteaseinhibitor, Pefabloc - Serinproteaseinhibitor, PMSF - Serinproteaseinhibitor, ALLN - Proteasominhibitor)

4.2.3.2 Lokalisation der Protease

Die Protease, die das α/β -Vorstufenprotein spaltet, könnte sowohl im ER als auch im Golgi-Apparat lokalisiert sein. Durch die Behandlung von Zellen mit Brefeldin A (BFA) wird der Golgi-Apparat zerstört, da der Transport vom ER zum Golgi-Apparat unterbrochen wird und nur noch der Rücktransport vom Golgi-Apparat zum ER funktioniert (Abbildung 4.19 A) (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1991). BHK-Zellen wurden mit dem *full length* α/β -Vorstufenprotein-6 \times His transfiziert und mit und ohne BFA behandelt. Die Zellextrakte wurden im anti β -UE Westernblot analysiert. Es zeigte sich, dass es unter der Behandlung mit BFA zu keiner Spaltung des α/β -Vorstufenproteins kommt (Abbildung 4.19 B).

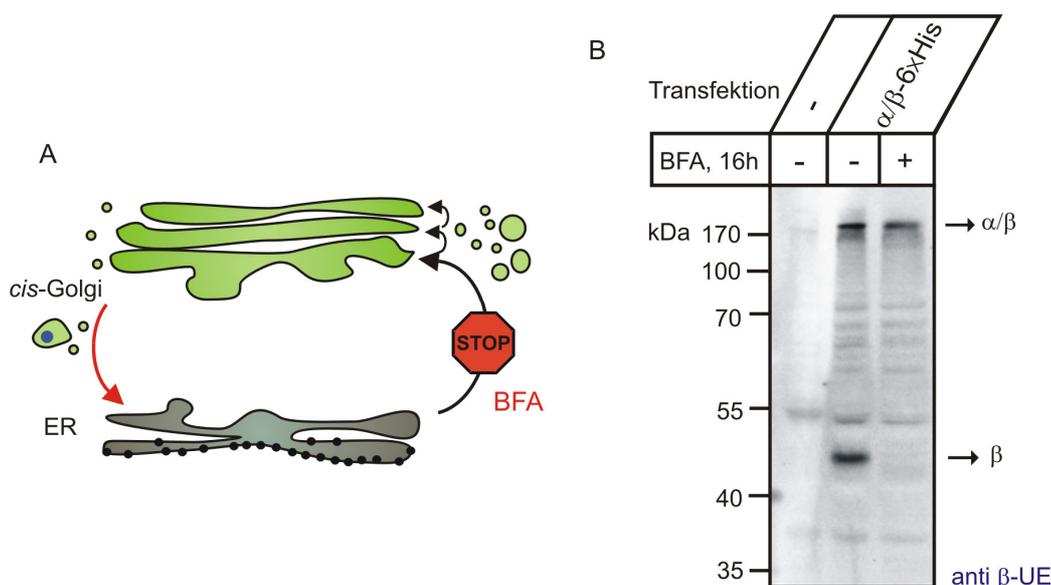


Abbildung 4.19: Behandlung von transfizierten BHK-Zellen mit BFA. (A) Schematische Darstellung der Wirkung von BFA: Der vesikuläre Transport vom ER zum Golgi-Apparat wird durch die Behandlung mit BFA gestoppt, wobei der Rücktransport vom Golgi-Apparat zum ER nicht gestört wird. Als Folge werden Bestandteile des Golgi-Apparates in das ER umverteilt. (B) BHK-Zellen wurden mit dem α/β-Vorstufenprotein-6xHis transfiziert und für 16 h mit (+) oder ohne (-) 5 mM BFA behandelt. Es folgte eine Auftrennung der Lysate mittels SDS-PAGE und eine anti β-UE Westernblot-Analyse.

Dieses Experiment wies darauf hin, dass sich die gesuchte Protease nicht im ER befindet. Da außerdem die einzeln exprimierten α- und β-Untereinheiten das ER nicht verlassen können (Dr. S. Storch, UKE, persönliche Mitteilung), wurde angenommen, dass sich die Protease in einem post-ER-Kompartiment, vorzugsweise im Golgi-Apparat, befindet.

4.2.3.3 Mutation der Spaltstelle im α/β-Minikonstrukt

Durch Sequenzierung des α/β-Vorstufenproteins wurde die N-terminale AS der β-Untereinheit als Aspartat identifiziert und beschrieben, dass die Spaltung im humanen α/β-Vorstufenprotein zwischen AS K928 und D929 erfolgt (Kudo & Canfield, 2006). Daher wurden die AS an der Spaltstelle K928 und D929 einzeln oder simultan gegen Alanin ausgetauscht (Abbildung 4.20 A). BHK-Zellen wurden mit den mutanten Konstrukten transfiziert und im Westernblot analysiert. Die Spaltung erfolgte trotz Austausch der direkt an der Spaltstelle befindlichen AS zu Alanin (Abbildung 4.20 B). Beim Austausch K928A sowie K928A/D929A konnte eine leichte Inhibierung der Spaltung detektiert werden, da die Bande für das α/β-Vorstufenprotein intensiver als beim nicht-mutierten α/β-Minikonstrukt

erschien. Das Konstrukt mit der Mutation D929A wurde sogar stärker gespalten als das nicht-mutierte α/β -Minikonstrukt.

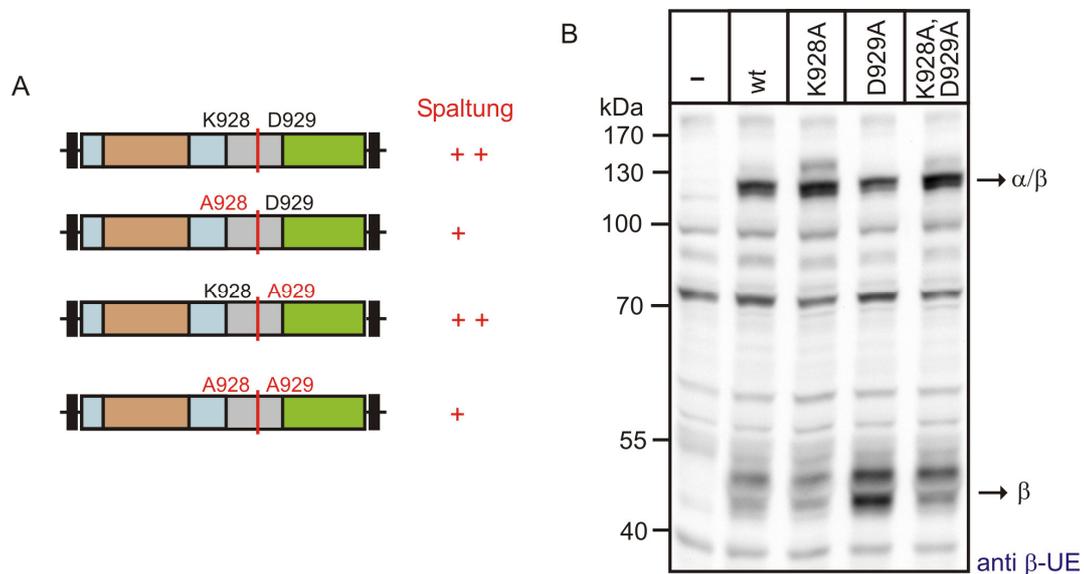


Abbildung 4.20: Spaltung von K928/D929-Mutanten des α/β -Minikonstruktes. (A) Schematische Darstellung des verwendeten α/β -Minikonstruktes und der erstellten Mutanten. Durch ortsspezifische Mutagenese wurden die AS K928 und D929 im α/β -Minikonstrukt gegen Alanin ausgetauscht (rot markiert). Rechts neben den Konstrukten ist die Stärke der Spaltung angegeben (++ starke, + schwache Spaltung). (B) BHK-Zellen wurden mit den unter A dargestellten Konstrukten transfiziert, die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im anti β -UE Westernblot analysiert.

Um die Homologie zu bekannten Konsensussequenzen von Substraten bekannter Proteasen zu untersuchen, wurden weitere AS vor und nach der Spaltstelle im α/β -Minikonstrukt mutiert. Die AS 923 bis 934 wurden einzeln durch Alanin ersetzt (bzw. Alanin an Position 932 gegen Glycin), in BHK- und CHO-7-Zellen exprimiert und im Westernblot auf Spaltung untersucht. Es zeigt sich dabei, dass beim Austausch der AS R925, L927 und K928 eine verringerte Spaltung auftrat (Abbildung 4.21 A). Den stärksten inhibitorischen Effekt auf die Proteolyse des α/β -Minikonstruktes wies der Austausch R925A auf, da die β -Untereinheit nicht nachgewiesen werden konnte. Beim Austausch L927A und K928A konnte die β -Untereinheit im Westernblot noch in geringen Mengen nachgewiesen werden (Abbildung 4.21 B).

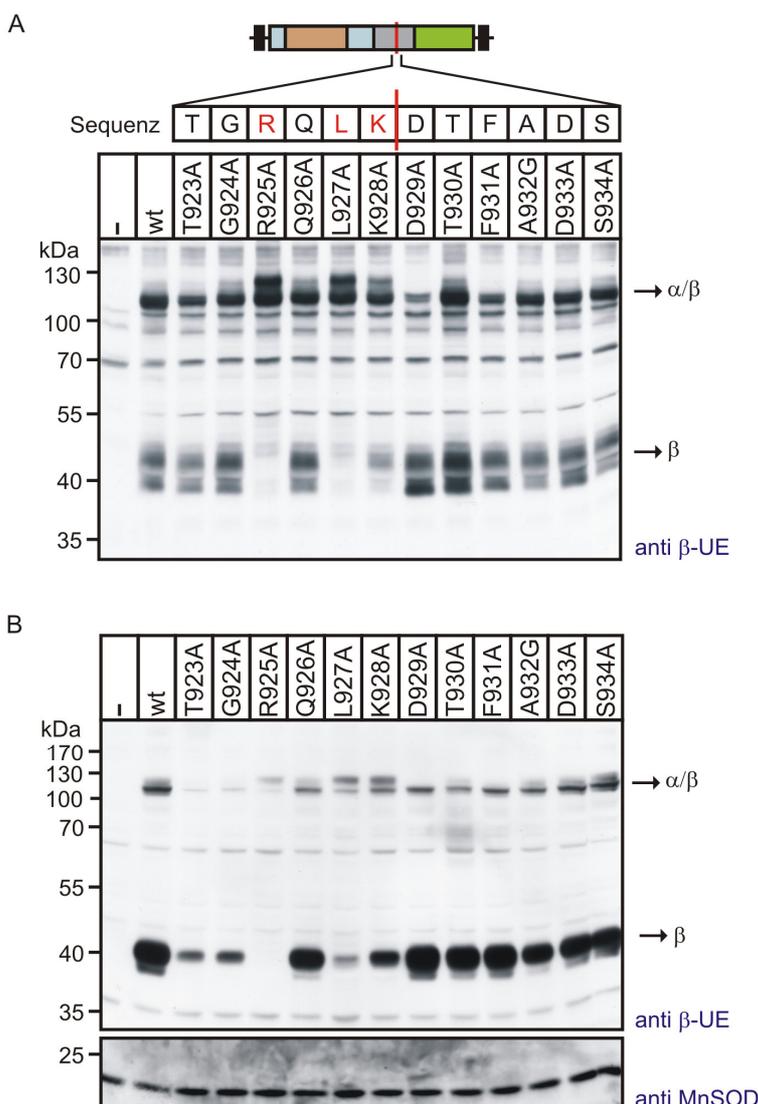


Abbildung 4.21: Austausch von sechs AS vor und nach der Spaltstelle im α/β -Minikonstrukt. Schematische Darstellung des verwendeten α/β -Minikonstruktes und der Sequenz um die Spaltstelle des α/β -Vorstufenproteins. Die AS-Reste wurden durch ortsspezifische Mutagenese mit Alanin bzw. Glycin ersetzt. Extrakte aus **(A)** CHO-7-Zellen und **(B)** BHK-Zellen, die das α/β -Minikonstrukt und mutante α/β -Minikonstrukte exprimierten, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch anti β -UE Westernblot analysiert. Die Expression der Mangan-abhängigen Superoxiddismutase (MnSOD) diente als Ladekontrolle.

4.2.3.4 N-Glykosylierung und Lokalisation nicht-spaltbarer α/β -Minikonstrukte

Bei den gezeigten Experimenten fiel auf, dass es eine zweite Bande für das α/β -Vorstufenprotein gab, wenn es nicht gespalten wurde (Abbildung 4.16, 4.21). Es wurde daher untersucht, ob die zweite höhermolekulare Bande auf verschiedene Glykosylierungen

zurückzuführen ist. Wenn Extrakte von Zellen, die das Wildtyp (wt) α/β -Minikonstrukt exprimierten, mit Endo H oder PNGase F behandelt wurden, wurden identische 90 kDa-Banden für des ungespaltene α/β -Minikonstrukt erhalten, d. h. das wt α/β -Minikonstrukt enthielt nur mannosereiche Oligosaccharide. Von der β -Untereinheit lagen Formen unterschiedlicher Glykosylierung mit und ohne komplexen Oligosacchariden vor, da nach Endo H-Verdau der Lysate von Zellen, die das wt α/β -Minikonstrukt exprimierten, mehrere Banden auftraten. Wenn Extrakte von Zellen, die die Mutante R925A exprimierten, mit PNGase F behandelt wurden, war die gleiche 90 kDa-Bande nachweisbar, wie für das deglykosylierte wt α/β -Minikonstrukt. Nach Endo H-Verdau waren zwei Banden sichtbar, eines der zwei Polypeptide wies das gleiche elektrophoretische Laufverhalten auf wie das durch PNGase F deglykosylierte α/β -Minikonstrukt. Das andere Polypeptid enthielt komplexe Oligosaccharide, die durch Endo H nicht gespalten werden konnten (Abbildung 4.22).

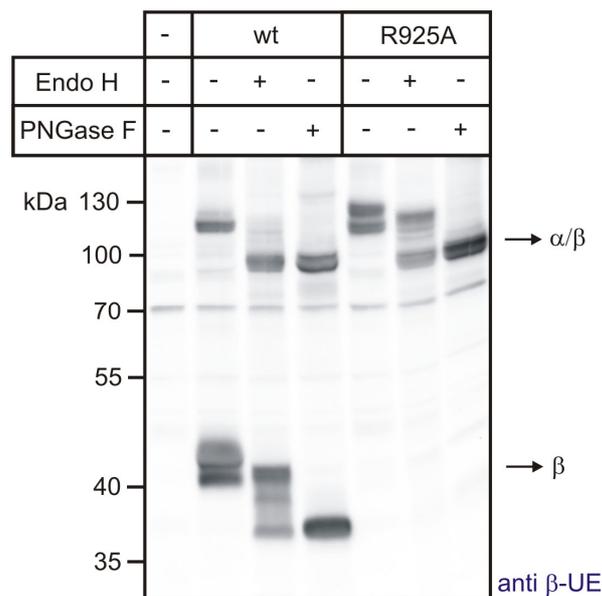


Abbildung 4.22: Analyse der N-Glykosylierung des verwendeten α/β -Minikonstruktes (wt) und der R925A-Mutante. Lysate von BHK-Zellen, die mit dem wt α/β -Minikostrukt oder der R925A-Mutante transfiziert waren, wurden mit oder ohne PNGase F bzw. Endo H behandelt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch anti β -UE Westernblot analysiert.

Die Experimente zeigten, dass das ungespaltene wt α/β -Minikonstrukt nur mannosereiche Oligosaccharide enthält, während die R925A-Mutante zwei verschiedene Formen mit mannosereichen und komplexen Oligosacchariden aufweist. Daraus kann geschlossen

werden, dass das nicht-spaltbare α/β -Minikonstrukt mit der Mutation R925A zum Golgi-Apparat transportiert wird.

Um zu bestätigen, dass die nicht-spaltbaren Mutanten im Golgi-Apparat lokalisiert sind, wurden Immunfluoreszenzmikroskopien mit der Mutante R925A durchgeführt. Transfizierte Zellen wurden mit den Antikörpern anti β -UE, anti PDI bzw. anti GM130 inkubiert. Es zeigte sich, dass die Mutante R925A wie auch das *full length* α/β -Vorstufenprotein und das wt α/β -Minikonstrukt (Vgl. 4.2.1 und 4.2.2) in den *cis*-Golgi-Apparat gelangte (Abbildung 4.23). Eine Colokalisation mit dem *cis*-Golgi-Apparat-Marker ist durch die gelbe Färbung verdeutlicht. Es konnte keine Lokalisation im ER nachgewiesen werden.

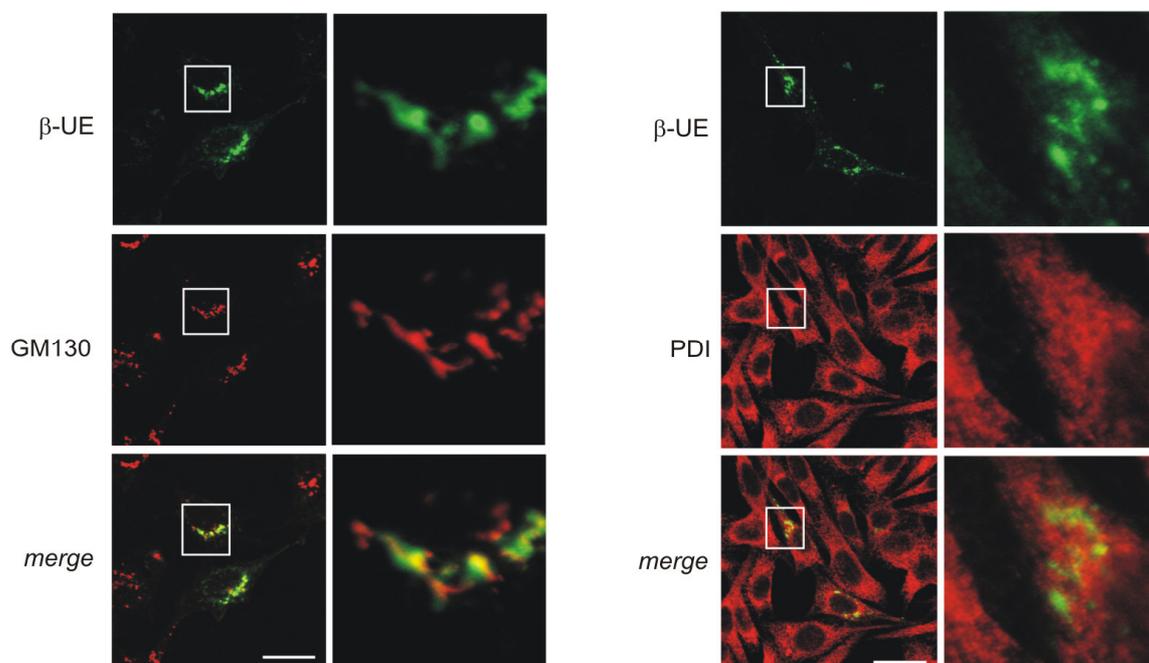


Abbildung 4.23: Lokalisation der nicht-spaltbaren Mutante R925A des α/β -Minikonstruktes. Die Mutante R925A des α/β -Minikonstruktes wurde in BHK-Zellen überexprimiert, die Zellen auf Glasplättchen fixiert und mittels Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Markiert wurden der *cis*-Golgi-Apparat mit anti GM130 bzw. das ER mit anti PDI (rot) und die transfizierte Mutante R925A (anti β -UE, grün); gelb zeigt die Colokalisation; der Balken entspricht 20 μm .

4.2.4 Identifizierung der Site-1-Protease

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass AS R925, L927 und K928 essentiell für die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins sind. Literaturrecherchen zeigten, dass diese AS Teil einer Konsensussequenz sind, die bei verschiedenen Proteinen gefunden wurden, die durch

die im *cis/medial*-Golgi-Apparat lokalisierte Site-1-Protease gespalten werden: (R/K)X(hydrophob)Z↓ (Z = Leucin, Threonin oder andere, aber nicht Valin, Prolin, Glutamat, Aspartat, Cystein). Einige Spaltstellensequenzen sind in Tabelle 4.2 dargestellt (Elagoz *et al.*, 2002).

Tabelle 4.2: Sequenzvergleich des α/β -Vorstufenproteins mit bekannten Substraten der Site-1-Protease. Aufgeführt sind ausgewählte Substrate der Site-1-Protease und deren Spaltstellensequenzen. In der letzten Zeile ist die Sequenz der Spaltstelle des α/β -Vorstufenproteins aufgeführt. Wichtige AS der Konsensussequenz sind in fett dargestellt.

Vorstufenprotein	Sequenz der Spaltstelle																
	P8	P6	P4	P2	P1	P1'	P2'	P4'	P6'	P8'							
Humane pro-S1P	R	K	V	F	R	S	L	K	↓	Y	A	E	S	D	P	T	V
Stelle B	V	T	P	Q	R	K	V	F	↓	R	S	L	K	Y	A	E	S
Stelle B'	R	H	S	S	R	R	L	L	↓	R	A	I	P	R	Q	V	A
Stelle C	K	A	G	S	R	G	L	T	↓	S	L	A	D	T	F	E	H
Humane pro-BDNF	S	G	S	G	R	S	V	L	↓	S	F	E	S	G	S	G	G
Humane SREBP-2	H	S	P	G	R	N	V	L	↓	G	T	E	S	R	D	G	P
Humane SREBP-1a	A	N	Q	R	R	H	L	L	↓	G	F	S	A	K	E	A	Q
Humane ATF6	I	Y	I	S	R	R	L	L	↓	G	T	F	T	W	T	L	S
Lassa Virus Glykoprotein																	
α/β-Vorstufenprotein	K	N	T	G	R	Q	L	K	↓	D	T	F	A	D	S	L	R

Abkürzungen: ATF6 = *activating transcription factor-6*; Pro-BDNF = *pro-brain-derived neurotropic factor*; S1P = Site-1-Protease; SREBP = *sterol regulatory element-binding protein* / Referenzen: Lenz *et al.*, 2001; Seidah *et al.*, 1999; Touré *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2000b.

4.2.4.1 Knock-down der Site-1-Protease mittels siRNA

Die Site-1-Protease wird vom *MBTPS1*-Gen kodiert (Seidah *et al.*, 1999) und ist in Mensch, Hund, Kuh, Maus, Hamster, Ratte, Zebrafisch, Fruchtfliege und weiteren Spezies bis hin zu Pflanzen konserviert. Um zu untersuchen, ob die Site-1-Protease für die proteolytische Spaltung des α/β -Vorstufenproteins verantwortlich ist, wurde die mRNA-Expression von *MBTPS1* in Hela-Zellen siRNA-vermittelt herunterreguliert. Dazu wurden die Zellen mit Kontroll-siRNA oder *MBTPS1*-siRNA transfiziert. Nach 48 h wurde ein zweites Mal transfiziert und nach weiteren 48 h RNA für Realtime-PCR-Analysen isoliert (Abbildung 4.21 A). Die *MBTPS1*-Expression verringerte sich durch siRNA-Transfektion auf etwa 10 % der Transkriptmenge von Kontroll-siRNA-behandelten Zellen (Abbildung 4.24 B). Die Expression der Site-1-Protease auf Proteinebene konnte nicht gezeigt werden, da kein Antikörper gegen das Protein erhältlich ist.

Um zu überprüfen, ob das α/β -Minikonstrukt in den *MBTPS1*-herunterregulierten HeLa-Zellen gespalten wird, wurden die Zellen 24 h nach der zweiten siRNA-Transfektion mit der cDNA des α/β -Minikonstruktes transfiziert (Abbildung 4.24 A). In HeLa-Zellen, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden, konnte hauptsächlich die gesplattene β -Untereinheit und nur im geringen Maß das α/β -Vorstufenprotein im Westernblot nachgewiesen werden (Abbildung 4.24 C). In *MBTPS1*-herunterregulierten HeLa-Zellen konnte dagegen keine proteolytische Spaltung des α/β -Minikonstruktes beobachtet werden.

Diese Daten lieferten den ersten Hinweis, dass die Site-1-Protease tatsächlich für die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins verantwortlich ist.

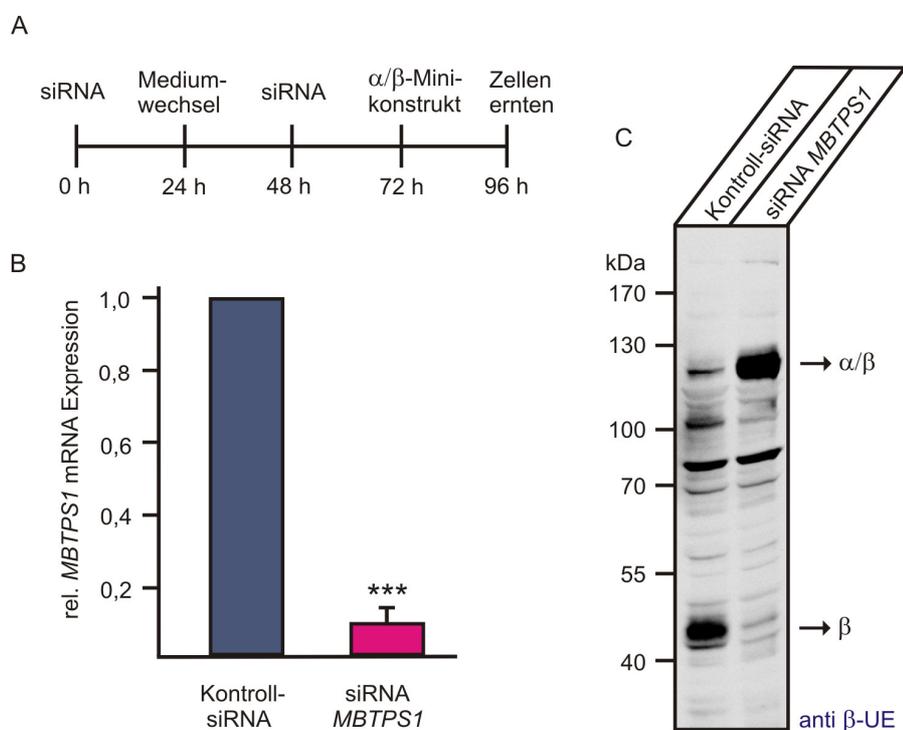


Abbildung 4.24: Analyse der Spaltung des α/β -Minikonstruktes in *MBTPS1*-siRNA transfizierten HeLa-Zellen. (A) Transfektionsschema des durchgeführten Experiments: HeLa-Zellen wurden zweimal mit Kontroll- bzw. *MBTPS1*-siRNA (0, 48 h) und nach weiteren 24 h mit dem α/β -Minikonstrukt transfiziert. (B) Die mRNA-Expression von *MBTPS1* in Kontroll- oder *MBTPS1*-siRNA transfizierten HeLa-Zellen wurde mittels Realtime-PCR als Dreifachwert bestimmt. Eine Normalisierung erfolgte auf die mRNA-Expression von β -Aktin. Das Diagramm zeigt den Mittelwert \pm Standardabweichung aus sechs unabhängigen RNA-Isolationen. Die Expression der Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt (***) $p \leq 0,005$). (C) SDS-PAGE und anschließende anti β -UE Westernblot-Analyse von Extrakten aus HeLa-Zellen, die mit Kontroll- bzw. *MBTPS1*-siRNA behandelt und anschließend mit dem α/β -Minikonstrukt transfiziert wurden.

4.2.4.2 Untersuchungen an Site-1-Protease-defizienten Zellen

Von Dr. J. L. Goldstein (Texas, USA) wurden Site-1-Protease-defiziente CHO-Zellen zur Verfügung gestellt (im folgenden SRD-12B genannt). In diesen Zellen ist die Site-1-Protease-vermittelte Regulation des Lipidstoffwechsels gestört (Rawson *et al.*, 1998). Das ist auf die Spaltung der Transkriptionsfaktoren SREBP-1a, 1c und 2 durch die Site-1-Protease zurückzuführen (Brown & Goldstein, 1997). Daher sind SRD-12B-Zellen auf die Supplementation von Cholesterol, Mevalonat und Oleat angewiesen. Weiterhin müssen die Zellen wöchentlich selektioniert werden, da keine reine Kultur von Site-1-Protease-defizienten Zellen vorliegt. Site-1-Protease-haltige Zellen haben einen Wachstumsvorteil gegenüber den Site-1-Protease-defizienten Zellen, so dass ohne regelmäßige Selektion die Site-1-Protease-defizienten Zellen verdrängt würden (siehe 2.2.2.4).

SRD-12B-Zellen wurden mittels Realtime-PCR auf das Vorhandensein von *MBTPSI*-mRNA untersucht. Der mRNA-Gehalt von *MBTPSI* betrug nur 1 bis 8 % im Vergleich zu CHO-7-Zellen (Abbildung 4.25 A).

SRD-12B- und CHO-7-Zellen wurden mit der cDNA des wt α/β -Minikonstruktes bzw. mit der nicht spaltbaren R925A-Mutante transfiziert und die Lysate im Westernblot analysiert (Abbildung 4.25 B). Das wt α/β -Minikonstrukt, jedoch nicht die Mutante R925A, wurde in CHO-7-Zellen zur reifen β -Untereinheit gespalten (Vgl. 4.2.3.3). Wenn SRD-12B-Zellen mit der cDNA des α/β -Minikonstruktes transfiziert wurden, konnte keine Spaltung des α/β -Minikonstruktes beobachtet werden. Dies bestätigt die *knock-down*-Experimente in Hela-Zellen (4.2.3.4). Auch bei diesem Experiment kam es zu einer zusätzlichen Bande für das α/β -Minikonstrukt bei 120 kDa, wenn das α/β -Minikonstrukt aufgrund der fehlenden Proteaseaktivität oder der Mutation nicht gespalten werden konnte (Abbildung 4.25 B, Vgl. 4.2.3.4).

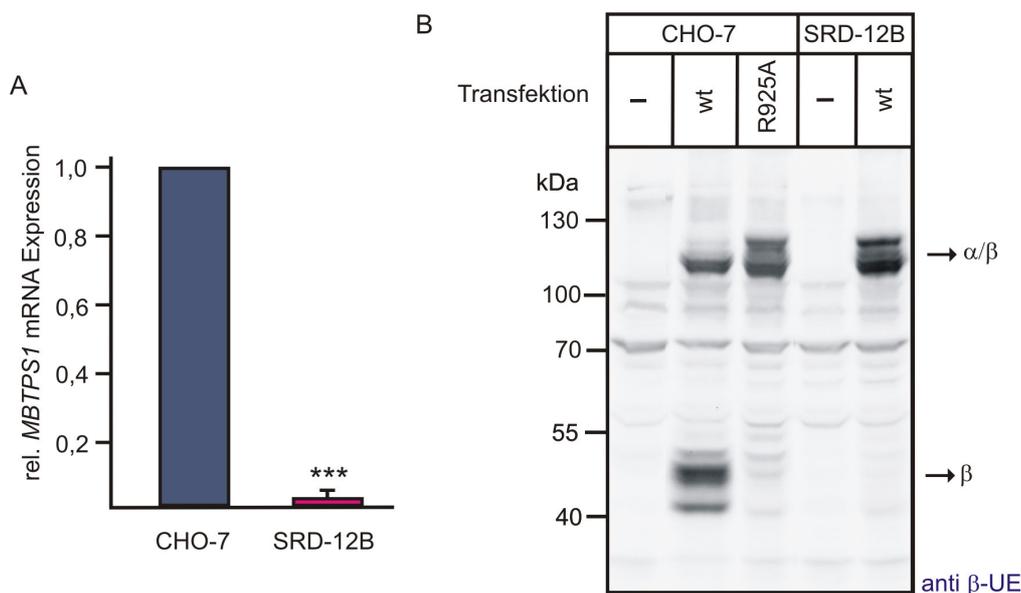


Abbildung 4.25: Analyse der Spaltung des α/β -Minikonstruktes in Site-1-Protease-defizienten Zellen.

(A) Die Genexpression von *MBTPS1* in CHO-7 und SRD-12B-Zellen wurde mittels Realtime-PCR als Dreifachwert bestimmt. Eine Normalisierung erfolgte auf die mRNA-Expression von β -Aktin. Das Diagramm zeigt den Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen RNA-Isolationen. Die relative *MBTPS1*-Expression in CHO-7-Zellen wurde gleich 1 gesetzt (***) $p \leq 0,005$). (B) Transfektion des wt α/β -Minikonstruktes und der R925A-Mutante in CHO-7- und SRD-12B-Zellen, anschließende Auftrennung der Zell-extrakte mittels SDS-PAGE und anti β -UE Westernblot-Analyse. Als weitere Kontrollen dienten nicht-transfizierte Zellen.

In einem zweiten experimentellen Ansatz sollte durch Re-Expression der humanen Site-1-Protease (mit C-terminalem c-Myc-tag) die Fähigkeit zur Proteolyse des α/β -Minikonstruktes wieder hergestellt werden (*Rescue*). In SRD-12B-Zellen, die mit dem α/β -Minikonstrukt transfiziert wurden, konnte nur das α/β -Vorstufenprotein detektiert werden (Abbildung 4.26 A). In Zellen, die zusätzlich mit der cDNA des Site-1-Protease transfiziert wurde, erfolgte dagegen die vollständige Spaltung des α/β -Vorstufenproteins zur reifen β -Untereinheit. Um zu zeigen, dass die Site-1-Protease erfolgreich transfiziert wurde, wurde der gleiche Blot mit einem c-Myc-Antikörper inkubiert. Die Site-1-Protease wird als Präprotein gebildet. Die Signalsequenz wird im ER entfernt. Es entsteht ein 128 kDa Protein, welches durch autokatalytische Spaltung zu einer 113 kDa (Spaltung an B/B') und einer 106 kDa Form (Spaltung an C) aktiviert wird (Pullikotil *et al.*, 2004; Seidah *et al.*, 1999) (Abbildung 4.26 B). Die Site-1-Protease konnte in transfizierten SRD-12B-Zellen als

eine starke ca. 128 kDa immunreaktive Bande und zwei schwächeren Banden von 106 und 113 kDa detektiert werden (Abbildung 4.26 A).

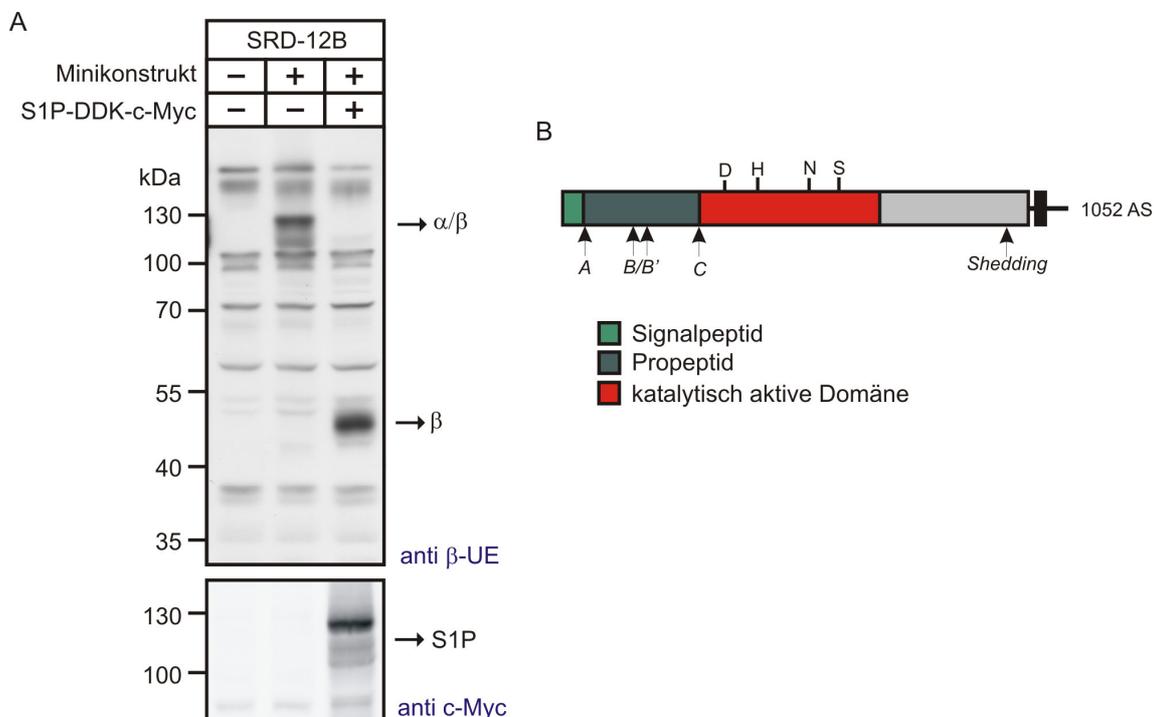


Abbildung 4.26: Analyse der Spaltung des α/β -Minikonstruktes in SRD-12B-Zellen nach Cotransfektion mit der Site-1-Protease-cDNA. (A) SRD-12B-Zellen wurden entweder mit der cDNA des α/β -Minikonstruktes allein, oder mit der cDNA der Site-1-Protease (C-terminal an ein c-Myc fusioniert) cotransfiziert. Die Zellysate wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch anti β -UE- und anti c-Myc-Westernblot analysiert. (B) Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Site-1-Protease. Diese enthält ein Signalpeptid, eine Prodomäne, die an den Stellen B/B' und C' autokatalytisch gespalten wird, um die Protease zu aktivieren. Die katalytische Domäne (rot) enthält vier für die Aktivität essentielle Aminosäuren. Ein Teil des Proteins wird autokatalytisch kurz vor der Transmembrandomäne gespalten (*Shedding*).

Dieses Experiment bestätigt, dass die Site-1-Protease für die proteolytische Spaltung des α/β -Vorstufenproteins der GlcNAc-1-Phosphotransferase verantwortlich ist.

4.2.5 Strukturelle Analyse der proteolytischen Spaltung des α/β -Vorstufenproteins

Im Folgenden wurde überprüft, ob die *N*-Glykane der β -Untereinheit wichtig für die Spaltung bzw. die Erkennung durch die Site-1-Protease sind. Grund dafür war, dass für das Lassa-Virus-Glykoprotein GP-C und für den Transkriptionsfaktor CREB-H *N*-Glykane wichtig für die Prozessierung durch die Site-1-Protease sind (Chan *et al.*, 2010; Eichler *et*

al., 2006). Dazu wurden die drei potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen der β -Untereinheit (N1109, N1056, N1129) (Abbildung 4.27 A) im α/β -Minikonstrukt einzeln mittels ortsspezifischer Mutagenese durch Glutamin substituiert. Die Konstrukte wurden in BHK-Zellen transfiziert, die Lysate mit oder ohne PNGase F behandelt und im Westernblot analysiert. Die Expression der mutierten Konstrukte war wesentlich geringer als die Expression des wt α/β -Minikonstruktes, was auf Instabilität der Konstrukte hinweist. Alle drei mutanten Konstrukte zeigten die erwartete Reduzierung der molaren Masse, die nach PNGase F-Behandlung das gleiche elektrophoretische Laufverhalten aufwies wie das deglykosylierte wt α/β -Minikonstrukt. Das zeigt, dass alle drei *N*-Glykosylierungsstellen der β -Untereinheit genutzt werden. Es wurde bei allen Konstrukten eine Spaltung zur reifen β -Untereinheit erhalten. Das heißt, dass die *N*-Glykane der β -Untereinheit nicht von Bedeutung für die Erkennung durch die Site-1-Protease sind (Abbildung 4.27 B).

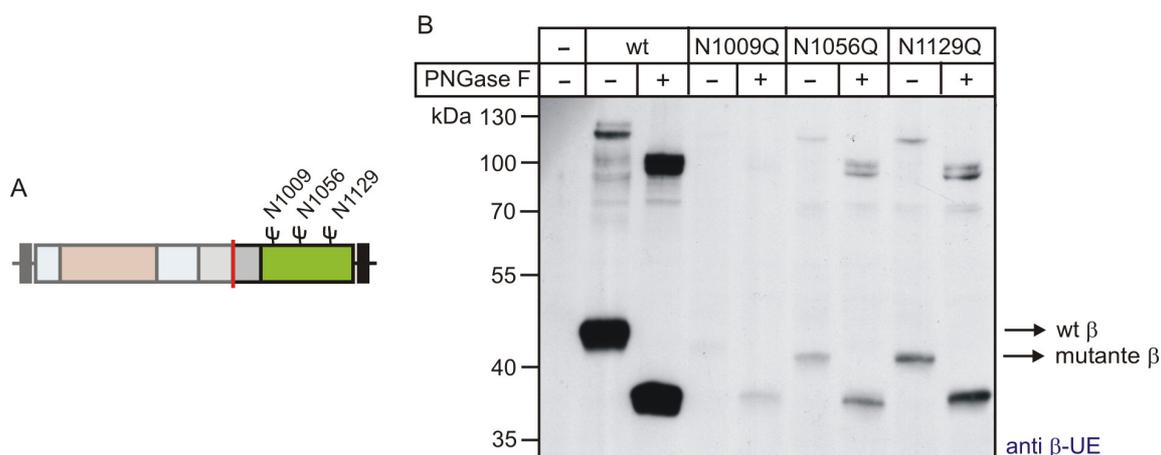


Abbildung 4.27: Ortsspezifische Mutagenese der drei potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen der β -Untereinheit und Analyse der Spaltung. (A) Schematische Darstellung des α/β -Minikonstruktes und der drei *N*-Glykosylierungsstellen der β -Untereinheit. (B) BHK-Zellen wurden mit dem wt α/β -Minikonstrukt oder den *N*-Glykosylierungsmutanten (N1009Q, N1056Q und N1129Q) transfiziert. Die Zellextrakte wurden mit oder ohne PNGase F behandelt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im anti β -UE-Westernblot analysiert.

4.2.6 Funktionelle Analyse der proteolytischen Spaltung des α/β -Vorstufenproteins

Die α - und β -Untereinheiten der GlcNAc-1-Phosphotransferase enthalten das katalytische Zentrum zur Generierung von M6P-Resten an lysosomalen Enzymen (Vgl. 1.4) (Kudo *et al.*, 2005). Außerdem wurde beschrieben, dass die fehlende Spaltung des α/β -Vorstufen-

proteins einen Aktivitätsverlust der GlcNAc-1-Phosphotransferase hervorruft (Kudo & Canfield, 2006). An Site-1-Protease-defizienten SRD-12B-Zellen sollte dieser Aspekt untersucht werden.

4.2.6.1 Bildung von M6P-Resten

Der Funktionsverlust der GlcNAc-1-Phosphotransferase kann indirekt mit Hilfe eines *single chain*-Antikörpers, der spezifisch gegen M6P-Reste gerichtet ist (scFv M6P-1; Abbildung 4.28 A), im Westernblot dargestellt werden (Müller-Loennies *et al.*, 2010). Als Kontrollen dienten Lysate von embryonalen Mausfibroblasten (MEF) von wt und ML II *knock in* (ki)-Mäusen, die keine M6P-Reste generieren können (Vgl. 1.4.2). ML II-Mäuse haben einen Defekt im α/β -Vorstufenprotein, das zu einem Funktionsverlust der GlcNAc-1-Phosphotransferase und einem Mukopolidose (ML) II-ähnlichem Phänotyp führt (Kollmann *et al.*, 2010). Im Vergleich zu MEF von wt-Mäusen konnten keine M6P-haltigen Proteine in den MEF von ki-Mäusen detektiert werden (Abbildung 4.28 B).

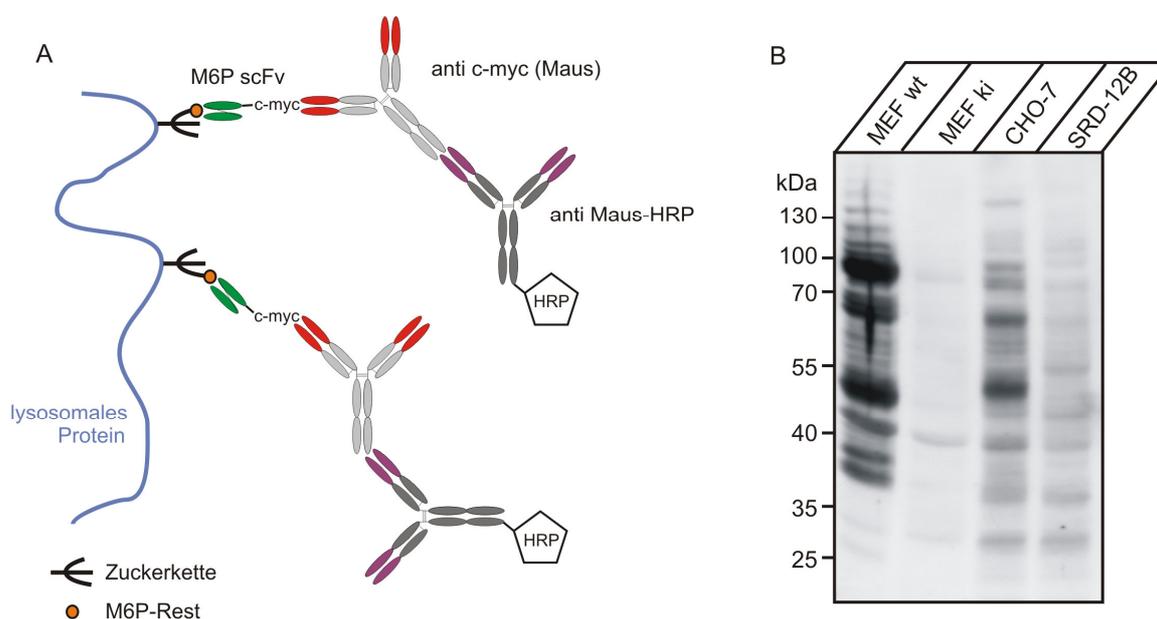


Abbildung 4.28: Analyse der Bildung von M6P-Resten an lysosomalen Enzymen in SRD-12B-Zellen. (A) Schematische Darstellung der Detektion von M6P-Resten. Zunächst bindet das *single chain* Fragment scFv M6P-1, das einen c-Myc-tag besitzt, an M6P-Reste. An den c-Myc-tag bindet ein in Maus generierter anti c-Myc Antikörper, den schließlich anti Maus-HRP-gekoppelte Antikörper binden können. (B) Kultivierte MEFs von Wildtyp (wt)- und *knock in* (ki)-Mäusen (zur Verfügung gestellt von Dr. K. Kollmann, UKE), CHO-7- und SRD-12B-Zellen wurden für drei Tage kultiviert. Die Lysate (50 μ g Protein) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und M6P-haltige Proteine durch scFv M6P-1-Westernblot detektiert.

In den Lysaten von CHO-7-Zellen konnten ebenfalls eine Vielzahl von M6P-haltigen Proteinen mit molaren Massen zwischen 25 und 150 kDa nachgewiesen werden. Es fiel außerdem auf, dass das Muster und die Intensität der M6P-haltigen Proteine in MEF von gesunden wt-Mäusen sich von dem der CHO-7-Zellen unterscheiden. In Site-1-Protease defizienten SRD-12B-Zellen war die Intensität der M6P-haltigen Polypeptide wesentlich schwächer (Abbildung 4.28 B). Dieses Experiment zeigt, dass die fehlende Spaltung des α/β -Vorstufenproteins in Site-1-Protease-defizienten SRD-12B-Zellen zum Funktionsverlust der GlcNAc-1-Phosphotransferase und folglich zu einer verminderten Bildung von M6P-Resten an Proteinen führt.

4.2.6.2 Sortierung lysosomaler Enzyme

Die gestörte M6P-Bildung führt in Patienten und im Mausmodell mit Defekten in der GlcNAc-1-Phosphotransferase zu einer massiven Fehlsortierung lysosomaler Enzyme (Kollmann *et al.*, 2010; Tiede *et al.*, 2005b).

Um die Auswirkung der fehlenden Spaltung des α/β -Vorstufenproteins auf die Sortierung lysosomaler Enzyme zu untersuchen, wurden die Aktivitäten verschiedener lysosomaler Enzyme in Lysaten und konditionierten Medien von SRD-12B- und CHO-7-Zellen gemessen.

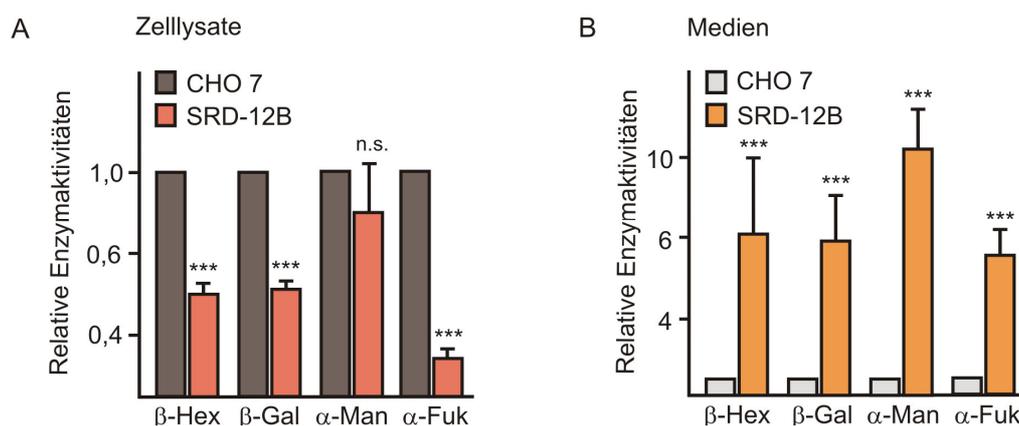


Abbildung 4.29: Enzymaktivitäten lysosomaler Enzyme in CHO-7- und Site-1-Protease-defizienten SRD-12B-Zellen. CHO-7- und SRD-12B-Zellen wurden für 48 h in OptiMEM® I konditioniert. Anschließend wurden die spezifischen Enzymaktivitäten von vier lysosomalen Enzymen, β -Hexosaminidase (β -Hex), β -Galaktosidase (β -Gal), α -Mannosidase (α -Man) und α -Fukosidase (α -Fuk) in Zellysaten (mU/mg; A) und in konditionierten Medien (mU/48 h/mg Zellprotein; B) gemessen. Die spezifischen Enzymaktivitäten in CHO-7-Zellen bzw. in konditionierten Medien von CHO-7-Zellen wurden 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus fünf unabhängigen Messungen (n.s. = nicht signifikant, *** $p \leq 0,005$).

Die lysosomalen Enzyme β -Hexosaminidase (β -Hex), β -Galaktosidase (β -Gal), α -Mannosidase (α -Man) und α -Fukosidase (α -Fuk) wurden untersucht. Die spezifischen Aktivitäten der β -Hex, β -Gal und α -Fuk waren in den Zelllysaten signifikant reduziert (Abbildung 4.29 A). Für α -Man wurde keine signifikante Reduktion der Enzymaktivität in SRD-12B-Zellen festgestellt. In den Medien von SRD-12B-Zellen waren die Aktivitäten der vier untersuchten Enzyme im Vergleich zu Medien von CHO-7-Zellen 6 bis 10-fach erhöht (Abbildung 4.29 B).

Für alle vier untersuchten lysosomalen Enzyme konnte eine Fehlsortierung in SRD-12B-Zellen festgestellt werden, in deren Folge die Effizienz des Transportes zu den Lysosomen gesenkt wird. Dies ist verbunden mit einer Hypersekretion der lysosomalen Enzyme ins Medium.

Ein wesentlich sensitiverer experimenteller Ansatz, um die Fehlsortierung von lysosomalen Enzymen darzustellen, sind *Pulse-Chase*-Experimente, bei denen der Transport und die Prozessierung einer definierten Population neusynthetisierter Proteine nach Markierung mit [³⁵S]-Methionin untersucht wird.

Als Beispielprotein wurde die lysosomale Protease Cathepsin Z ausgewählt. Cathepsin Z wird im ER als Präproprotein synthetisiert, die hydrophobe Signalsequenz wird abgespalten und Procathepsin Z freigesetzt. Das Propeptid von Procathepsin Z ist mit dem aktiven Zentrum über eine Disulfidbrücke verknüpft. Es wird cotranslational an zwei Stellen *N*-glykosyliert und anschließend mit M6P-Resten versehen, die den rezeptorvermittelten Transport zum Lysosom bewirken. Das Propeptid wird nach Transport zum Lysosom abgespalten und die enzymatisch reife Form wird gebildet (Appenzeller-Herzog *et al.*, 2005) (Abbildung 4.30 A).

CHO-7- und SRD-12B-Zellen wurden mit [³⁵S]-Methionin für eine Stunde metabolisch markiert (*Pulse*) und danach entweder geerntet oder für fünf Stunden in nicht-radioaktivem Medium inkubiert (*Chase*). Anschließend wurde Cathepsin Z aus den Zelllysaten und den *Chase*-Medien immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE und Fluorographie analysiert (Abbildung 4.30 B).

Nach dem *Pulse* wurden aus den Lysaten von CHO-7- und SRD-12B-Zellen etwa gleiche Mengen der 38 kDa-Vorstufe von Cathepsin Z präzipitiert. Innerhalb der fünf Stunden *Chase* erfolgte die Prozessierung zur 36 kDa reifen, aktiven Form. Ein Teil des neusynthetisierten Cathepsin Z (28 %) entgeht der Sortierung im Golgi-Apparat und wird

stattdessen sezerniert und ist im Medium wiederzufinden. In den Site-1-Protease-defizienten SRD-12B-Zellen lagen nach fünf Stunden *Chase* weniger reife Form in den Zellen vor, stattdessen wurde mehr Cathepsin Z aus der Zelle sezerniert (72 %). Die sezernierten Cathepsin Z-Formen bei SRD-12B-Zellen wiesen außerdem eine größere molare Masse auf als die sezernierte Form in CHO-7-Zellen. Dies ist auf eine veränderte Oligosaccharidprozessierung zurückzuführen, da die gestörte M6P-Bildung zur Bildung von komplexen *N*-Glykanen führt (Hasilik & von Figura, 1981).

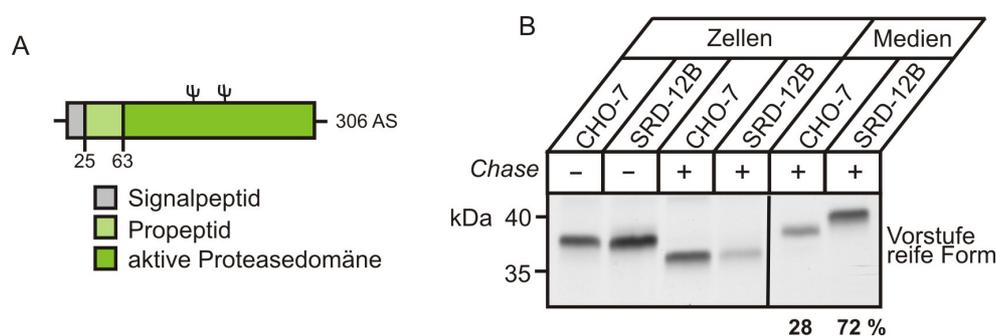


Abbildung 4.30: Sortierung und Prozessierung von Cathepsin Z in CHO-7- und Site-1-Protease-defizienten SRD-12B-Zellen. (A) Schematische Darstellung von Cathepsin Z mit Signalpeptid, Propeptid und aktiver Proteasedomäne, die zwei *N*-Glykosylierungsstellen enthält. (B) CHO-7 und SRD-12B-Zellen wurden 1 h mit [³⁵S]-Methionin markiert (*Pulse*) und anschließend geerntet (Zeitpunkt 0 h) oder 5 h mit nicht-radioaktivem Medium inkubiert (*Chase*). Cathepsin Z wurde aus den Zelllysaten und *Chase*-Medien immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Unter der Abbildung ist der Anteil an sezerniertem Cathepsin Z angegeben, der durch densitometrische Auswertung des Röntgenfilms bestimmt wurde.

Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse, dass die Site-1-Protease für die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins der GlcNAc-1-Phosphotransferase verantwortlich ist. In Abwesenheit der Site-1-Protease ist die Generierung von M6P-Resten durch die GlcNAc-1-Phosphotransferase inhibiert, da das ungespaltene α/β -Vorstufenprotein nicht aktiv ist. Die resultierende Fehlsortierung multipler lysosomaler Enzyme entspricht dem Phänotyp einer Mukopolidose II.

5 DISKUSSION

Die GlcNAc-1-Phosphotransferase ist verantwortlich für die Bildung von M6P-Resten an lysosomalen Enzymen, die essentiell für den Transport der Enzyme zum Lysosom sind. Die Bildung von M6P-Resten an lysosomalen Enzymen stellt einen wichtigen Schritt in der Biogenese von Lysosomen dar. Defekte im α/β -Vorstufenprotein des GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplexes führen zur schweren lysosomalen Speichererkrankung Mukopolipidose II. Aufgrund der Fehlsortierung vieler lysosomaler Enzyme kommt es zur Akkumulation von Speichermaterial und damit zu skelettalen Abnormalitäten, psychomotorischer Retardierung und kardiorespiratorischen Komplikationen, die zu einem frühzeitigen Tod der Patienten führen (Kornfeld & Sly, 2001).

Ziel dieser Arbeit war, das α/β -Vorstufenprotein der GlcNAc-1-Phosphotransferase und dessen Modulstruktur zu analysieren. Das α/β -Vorstufenprotein enthält das katalytische Zentrum des Komplexes und weiterhin die Bindungsstellen 1. für den Phosphatdonor UDP-GlcNAc, 2. für lysosomale Enzyme und 3. für mannosereiche Oligosaccharide an lysosomalen Enzymen (Braulke *et al.*, 2008; Kudo *et al.*, 2005; Tiede *et al.*, 2005b). Die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins in die α - und β -Untereinheit stellt dabei einen wichtigen Schritt zur Aktivierung des Enzymkomplexes dar. Daher stand die Identifizierung der Protease im Vordergrund dieser Arbeit. Weiterhin wurden die Bindung von UDP-GlcNAc und posttranslationale Modifikationen des α/β -Vorstufenproteins untersucht.

5.1 Bindung von UDP-GlcNAc an den N-terminalen Bereich des α/β -Vorstufenproteins

Aus Sequenzanalysen ist bekannt, dass die Region, die die AS 60 - 430 des α/β -Vorstufenproteins umfasst, Ähnlichkeiten zu dem N-terminalen Teil von Kapselbiosyntheseproteinen aufweist (Tiede *et al.*, 2005b). Diese Proteine binden UDP-GlcNAc (Tzeng *et al.*, 2003). Daher wird angenommen, dass die N-terminale Region des α/β -Vorstufenproteins für die Bindung von UDP-GlcNAc verantwortlich ist, das das Substrat der enzymatischen GlcNAc-1-Phosphotransferase-Reaktion darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass Konstrukte, die nur die N-terminale Region des α/β -Vorstufenprotein enthalten, an *Reactive Green-19*-Agarose binden (Abbildung 4.8). *Reactive Green-19*-Agarose ist dafür bekannt an Nukleotid-bindende Proteine zu assoziieren (Stead, 1987). Die eingefügte säugerspezifische

Domäne (AS 102 - 324) war dabei für die Bindung an *Reactive Green-19*-Agarose nicht von Bedeutung. Diese Experimente gaben einen ersten Hinweis, dass diese Domäne tatsächlich für die Bindung an UDP-GlcNAc verantwortlich ist.

Eine Bindung der N-terminalen Domäne der α -Untereinheit an Affigel 10-gekoppeltes UDP-Hexanolamin konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 4.10). Der Nachweis der Bindung der gesamten GlcNAc-1-Phosphotransferase an UDP-Hexanolamin-*beads* schlug aber auch bei anderen Arbeitsgruppen fehl (Bao *et al.*, 1996a). Es konnte jedoch eine schwache Bindung der N-terminalen Konstrukte 430-GFP und 430 Δ -GFP an [¹²⁵I]-markiertes BSA-gekoppeltes UDP-Hexanolamin nachgewiesen werden (Abbildung 4.11). Die Bindung beider Konstrukte an [¹²⁵I]-markiertes BSA-gekoppeltes UDP-Hexanolamin wurde durch Zugabe von UDP-GlcNAc inhibiert, was die Spezifität der Bindung belegt. Jedoch waren die Bedingungen für die Bindung nicht optimal, da nur eine sehr geringe Menge des [¹²⁵I]-markiertes BSA-gekoppeltes UDP-Hexanolamins gebunden wurde. Die fehlende Bindung an UDP-Hexanolamin-Agarose bzw. die schwache Bindung an [¹²⁵I]-markiertes BSA-gekoppeltes UDP-Hexanolamin können möglicherweise dadurch erklärt werden, dass nicht nur das UDP an die Bindungsstelle der GlcNAc-1-Phosphotransferase bindet, sondern auch der GlcNAc-Zuckeranteil eine wichtige Rolle für die Bindung des UDP-GlcNAc spielt. Die Bindung an UDP-, CDP- und GDP-Hexanolamin konnte für verschiedene Glykosyltransferasen nachgewiesen und für deren Reinigung eingesetzt werden (Sadler *et al.*, 1981). Glykosyltransferasen übertragen im Gegensatz zur GlcNAc-1-Phosphotransferase nur den Zucker und nicht einen Zuckerphosphatrest. Daher ist anzunehmen, dass der Reaktionsmechanismus und auch die Erkennung des aktivierten Zuckers in Glykosyltransferasen und der GlcNAc-1-Phosphotransferase nach verschiedenen Mechanismen erfolgen.

Die Bindung von UDP-GlcNAc muss durch weitere Experimente bestätigt werden. Eine Möglichkeit besteht darin, die Domäne möglichst als lösliche Form, in größeren Mengen zu reinigen und das gereinigte Protein in *Saturation Transfer Difference* (STD)-NMR-Studien einzusetzen. Diese Technik wurde z. B. zur Charakterisierung der Bindung von UDP-GlcNAc an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/N-Acetylmannosamin-Kinase eingesetzt (Benie *et al.*, 2004; Blume *et al.*, 2004). Weiterhin sollte die Bindung der N-terminalen Kaspelbiosyntheseprotein-ähnlichen Domäne (AS 60 - 101, AS 325 - 430) und einzelner AS der Region für die Funktion aufgrund bekannter Patientenmutationen untersucht werden. Es

sind zahlreiche Punktmutationen in diesem Genabschnitt bekannt, die zur ML II-Erkrankung führen (W81L, R334L, R334Q, I348L, F374L, S399F, I403T und D407A) (Bargal *et al.*, 2006; Cathey *et al.*, 2010; Encarnacao *et al.*, 2009; Otomo *et al.*, 2009; Tiede *et al.*, 2005a). Durch diese Mutationen könnte die Bindung des Phosphatdonors UDP-GlcNAc verhindert oder beeinträchtigt sein und zum Funktionsverlust der GlcNAc-1-Phosphotransferase führen. Für die Bindungsstudien sollten daher Konstrukte mit diesen Mutationen einbezogen werden.

5.2 Identifizierung der Protease

Die Protease, die das α/β -Vorstufenprotein zu den reifen α - und β -Untereinheiten der GlcNAc-1-Phosphotransferase spaltet, konnte in dieser Arbeit identifiziert werden. Mutationsanalysen und Sequenzvergleiche mit bekannten Spaltsequenzen lieferten die ersten Hinweise, dass das α/β -Vorstufenprotein von der Site-1-Protease gespalten wird (Abbildung 4.21; Tabelle 4.2). Sowohl die GlcNAc-1-Phosphotransferase als auch die Site-1-Protease sind im *cis/medial*-Golgi-Apparat lokalisiert (Abbildung 4.19). Die siRNA-vermittelte *Downregulation* (Abbildung 4.24) und Untersuchungen an Site-1-Protease-defizienten Zellen (Abbildung 4.25, 4.26) bestätigten die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins durch die Site-1-Protease.

Die Site-1-Protease, auch Subtilisin-Kexin-Isoenzym genannt, gehört zur Familie der Proprotein-Convertasen und aktiviert sich selbst durch autokatalytische Entfernung der Prodomäne (Touré *et al.*, 2000). Sie wurde gleichzeitig von Goldstein und Brown (Sakai *et al.*, 1998) und Seidah (Seidah *et al.*, 1999) entdeckt. Die Site-1-Protease spielt eine essentielle Rolle in der Regulation des Lipidmetabolismus und der Cholesterolumöostase durch die Spaltung der Transkriptionsfaktoren *sterol regulatory element binding proteins* SREBP-1a, SREBP-1c und SREBP-2. SREBPs werden als ~120 kDa Vorstufenproteine synthetisiert. Sie enthalten wie die GlcNAc-1-Phosphotransferase zwei Transmembrandomänen, die aber nur durch eine kurze luminaire Schleife von ~30 AS getrennt sind, eine zytosolische N-terminale Transkriptionsfaktordomäne und eine zytosolische C-terminale Regulationsdomäne. SREBP-Vorstufenproteine sind in der ER-Membran lokalisiert und assoziieren dort mit einem weiteren ER-Membranprotein, *SREBP cleavage-activating protein* (SCAP). Die N-terminale Domäne von SCAP hat acht Transmembrandomänen, die eine mit Sterolen interagierende *sterol-sensing* Domäne enthalten. Die C-terminale Domäne

bindet an die C-terminale regulatorische Domäne von SREBP-Vorstufenproteinen. Bei einem intrazellulären Mangel an Sterolen (z. B. Cholesterol) wird der SCAP/SREBP-Komplex vom ER zum Golgi-Apparat transportiert (Wang *et al.*, 1994). SCAP bindet dabei über eine Sequenz (MELADL) in der dritten zytosolischen Schleife an Sec24, einer Komponente des Sar1/Sec23/Sec24-Komplexes von COPII *coat*-Proteinen. Die SCAP/SREBP-Komplexe werden in COPII-umhüllte Vesikel verpackt und zum Golgi-Apparat transportiert (Abbildung 5.1 A). Bei einer hohen Konzentration von Sterolen, bindet SCAP an Insig, einem ER-Retentionsprotein. Sterole binden an Insig oder an SCAP, wodurch die Konformation von SCAP so verändert wird, dass die Bindung von SCAP an Sec24 und somit der Transport zum Golgi-Apparat verhindert wird (Abbildung 5.1 B) (Brown & Goldstein, 2009).

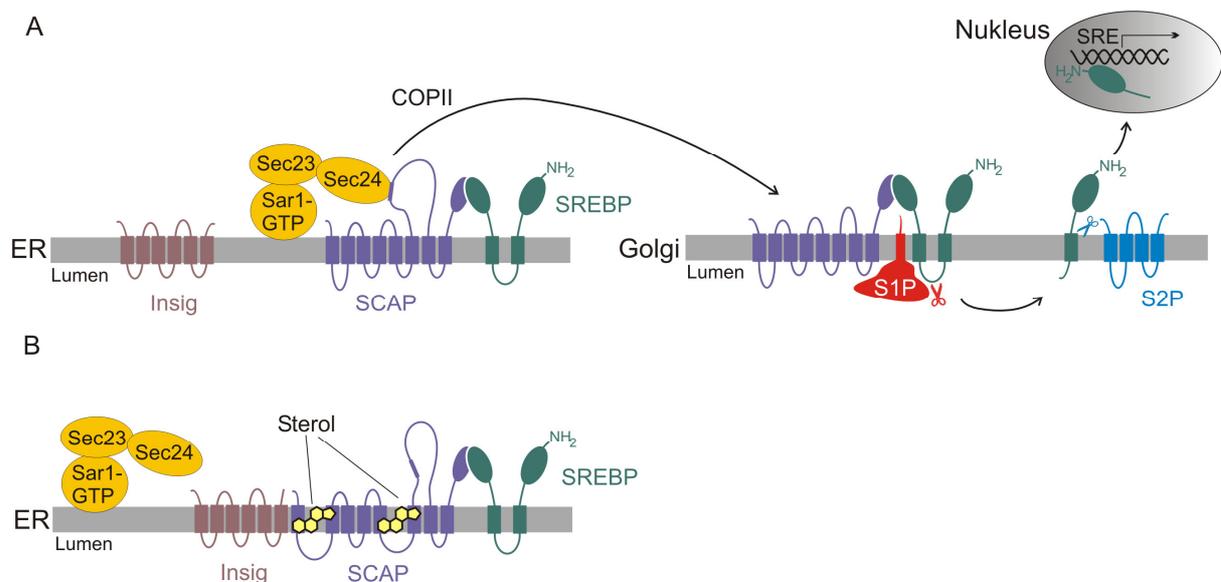


Abbildung 5.1: Mechanismus des sterolabhängigen Transports von SREBPs zum Golgi-Apparat. (A) Herrscht ein Mangel an Sterolen, wird SREBP zusammen mit SCAP COPII-abhängig zum Golgi-Apparat transportiert, wo sie durch S1P und S2P prozessiert werden. (B) Bei einem Überschuss an Sterolen wird SREBP im ER zurückgehalten. Das geschieht über die Bindung des SCAP/SREBP-Komplexes an das ER-Retentionsprotein Insig. (S1P = Site-1-Protease, S2P = Site-2-Protease, SRE = *sterol regulatory element*)

Der Transportmechanismus, über den die GlcNAc-1-Phosphotransferase zum Golgi-Apparat transportiert wird, ist bisher nicht bekannt. Ob das α/β -Vorstufenprotein der GlcNAc-1-Phosphotransferase Sterol- bzw. SCAP-abhängig zum Golgi-Apparat transportiert wird, kann zunächst durch siRNA-vermittelte *Downregulation* von SCAP untersucht werden. Weiterhin könnte ein möglicher sterolabhängiger Transport des α/β -Vor-

stufenproteins durch Erhöhung von Sterolen (z. B. Zugabe von 25-Hydroxycholesterol/Cholesterol und LDL zum Kulturmedium) oder Erniedrigung von Sterolen (z. B. Austausch von FKS im Kulturmedium durch lipoproteinfreies Serum) untersucht werden.

Nach dem Erreichen des Golgi-Apparates werden die SREBP-Vorstufenproteine zunächst durch die Site-1-Protease nach einer spezifischen Aminosäuresequenz RXLV↓ in der luminalen Schleife (*site-1*) gespalten (Sakai *et al.*, 1998). Der verbleibende, membran-gebundene N-terminale Teil wird durch einen zweiten, proteolytischen Schritt an der *site-2* durch die Site-2-Protease von der Membran des Golgi-Apparates abgelöst (Duncan *et al.*, 1998; Rawson *et al.*, 1997). Dieser aktive N-terminale Teil des SREBP kann nun in den Zellkern gelangen und die Transkription von über 35 mRNAs aktivieren. Diese mRNAs kodieren für Enzyme, die an der Biosynthese und Aufnahme von Cholesterol und ungesättigten Fettsäuren beteiligt sind (z. B. Acetyl-CoA-Synthetase, Fettsäuresynthetase, Hydroxymethyl-Glutaryl-Coenzym A-Synthase, Mevalonat-Kinase), sowie für den LDL-Rezeptor. Die sterolabhängige proteolytische Spaltung der SREBP-Vorstufenproteine resultiert somit in einer Steigerung der LDL-Rezeptor-vermittelten Cholesterolaufnahme in die Zelle und in einer Steigerung der Fettsäure- und Cholesterolsynthese (Rawson, 2003).

Die Site-1-Protease ist auch für die Spaltung anderer Proteine von Bedeutung (Abbildung 5.2), wie z. B. der Mitglieder der CREB/ATF-Familie (CREB = *cAMP-response element-binding protein*; ATF = *activating transcription factor*): ATF6, LUMAN (CREB3), OASIS (CREB3L2), CREB-H und CREB-4.

ATF6 spielt eine wichtige Rolle bei der *unfolded protein response* (Zhang & Kaufman, 2008). Unter physiologischen Bedingungen wird es vom Chaperon BIP (*binding immunoglobulin protein*) im ER gehalten. Eine Akkumulation von ungenügend gefalteten Proteinen im ER führt zu einer ER-Stress-Antwort. BIP dissoziiert vom ATF6-Vorstufenprotein, was dann zum Golgi-Apparat transportiert wird, um dort von Site-1- und Site-2-Protease gespalten zu werden. Die frei werdende zytosolische N-terminale Domäne wird zum Zellkern transportiert und aktiviert dort die Transkription bestimmter Zielgene. Damit wird die Chaperon-Produktion erhöht und der Abbau von Proteinen beeinflusst (Ye *et al.*, 2000b). Andere Substrate der Site-1-Protease sind proBDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) (Seidah *et al.*, 1999) und proSomastatin (Mouchantaf *et al.*, 2004). Die Site-1-Protease spielt auch eine bedeutende Rolle bei der Prozessierung von Oberflächen-

glykoproteinen von infektiösen Viren, wie dem Lassa-Virus (Lenz *et al.*, 2001), dem lymphozytischen Choriomeningitis-Virus (Beyer *et al.*, 2003) und dem Krim-Kongo-Fieber-Virus (Vincent *et al.*, 2003).

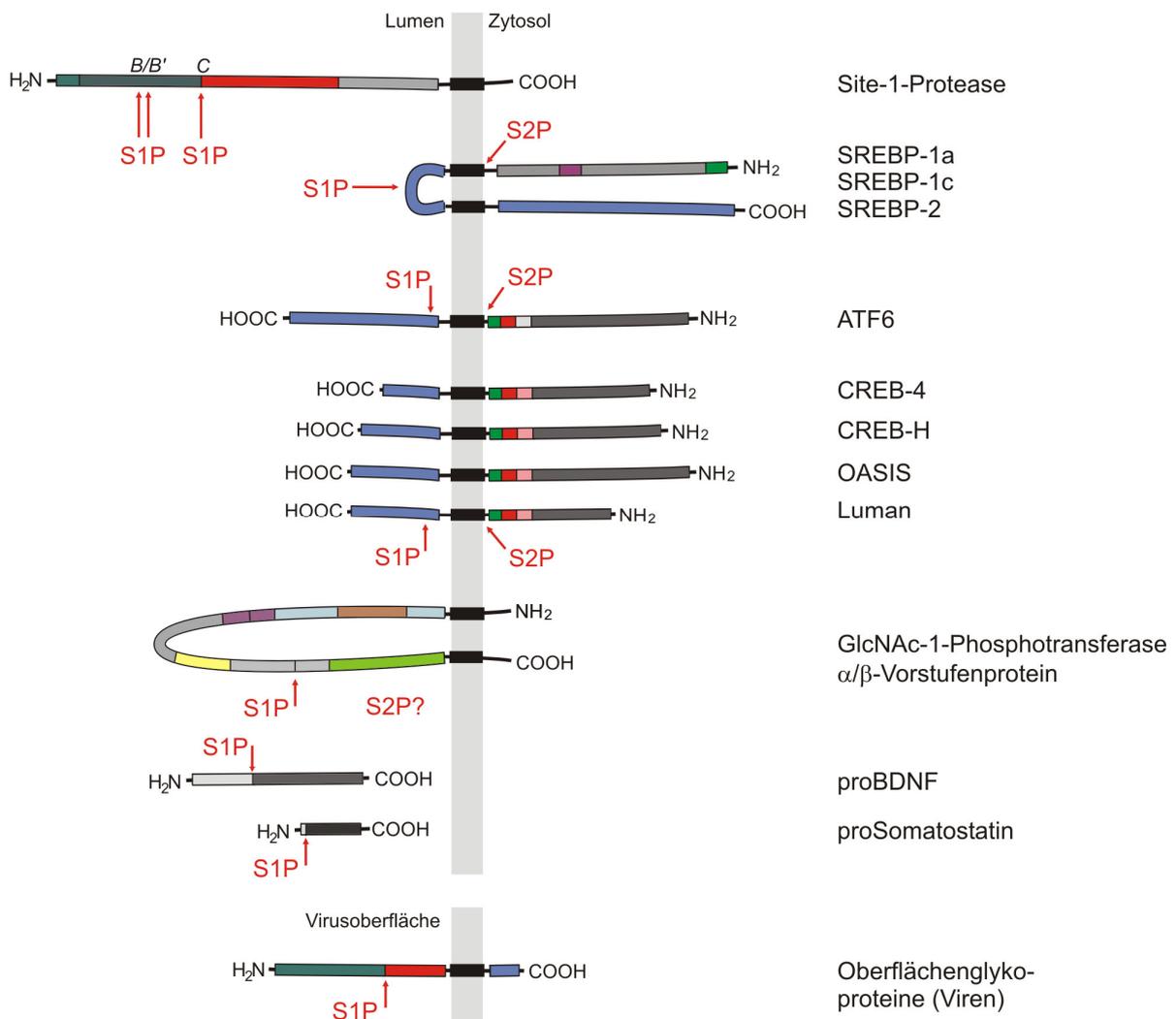


Abbildung 5.2: Auswahl von Substraten der Site-1- und Site-2-Protease. Angegeben sind bekannte Substrate der Site-1-Protease (S1P) und deren (Membran-)Topologie. Einige der Substrate werden nach Spaltung durch die Site-1-Protease ein zweites Mal durch die Site-2-Protease (S2P) gespalten.

In Westernblot-Experimenten mit den N-terminalen Konstrukten 430-GFP und 430 Δ -GFP, die die Membran nur einmal durchspannen und die eigentliche Site-1-Protease-Spaltstelle nicht besitzen, fiel auf, dass beide Proteine als Doppelbande in der SDS-PAGE aufgetrennt wurden (Abbildung 4.3). Da SREBP-Proteine und auch andere Substrate der Site-1-Protease durch die Site-2-Protease einem zweiten proteolytischen Schritt in einer Membrandomäne ausgesetzt sind (Vgl. Abbildung 5.2), kann im Augenblick nicht ausgeschlossen werden,

dass auch das α/β -Vorstufenprotein nach der Spaltung durch die Site-1-Protease durch die Site-2-Protease gespalten wird. Im *full length* α/β -Vorstufenprotein wäre der Mobilitätsshift im Westernblot nach einer zweiten proteolytischen Spaltung, die eventuell zur Verkürzung von etwa 20 AS führen würde, nicht nachweisbar. Die Site-2-Protease ist eine hydrophobe Metalloproteinase, die ein HEXXH-Zink-Bindungsmotif enthält (Chen & Zhang, 2010). Für SREBP-2 liegt die *site-2* zwischen L484 und C485 am Übergang vom N-terminalen zyttoplasmatischen Teil zur Transmembrandomäne (Duncan *et al.*, 1998). Bei ATF6 erfolgt die Spaltung zwischen V379 und C380 (Ye *et al.*, 2000b). Außerdem benötigt es für die Erkennung und Spaltung durch die Site-2-Protease einen Asparagin- und Prolinrest in der Transmembrandomäne (Ye *et al.*, 2000a; Ye *et al.*, 2000b). Die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins durch die Site-2-Protease ist relativ unwahrscheinlich, da die Site-2-Protease immer nach der Site-1-Protease schneidet und sich im Golgi-Apparat befindet. Die N-terminalen Konstrukte 430-GFP und 430 Δ -GFP jedoch verlassen das ER nicht. Außerdem gibt es keine Sequenz, die für Site-2-Protease-Spaltung in Frage kommen würde. Um die Möglichkeit der Spaltung durch die Site-2-Protease vollständig auszuschließen, können siRNA-vermittelte *knock-down*-Experimente mit anschließender Expression der N-terminalen GFP-Konstrukte bzw. des α/β -Minikonstruktes und Analyse der Lysate im Westernblot durchgeführt werden.

Im katalytischen Zentrum der Site-1-Protease befindet sich eine katalytische Triade aus einem Aspartat-, Histidin- und Serinrest, weshalb sie zur Familie der Serinproteasen gezählt wird. In den hier vorgestellten Experimenten wurden verschiedene Inhibitoren gegen Serinproteasen (0,1 mM Leupeptin, 0,2 mM Pefabloc und 1 mM PMSF) getestet (Abbildung 4.18), die jedoch zu keiner Reduktion der Spaltung des α/β -Minikonstruktes zur reifen β -Untereinheit führten. Auch in anderen Arbeiten zeigte das Screening von allgemeinen Serinproteaseinhibitoren und spezifischen Inhibitoren gegen andere Proprotein-Convertasen keine Inhibierung der Site-1-Protease-Aktivität (Bodvard *et al.*, 2007). In einigen Studien wird Pefabloc als Inhibitor der Site-1-Protease beschrieben (Basak *et al.*, 2004), in anderen Arbeiten wird dagegen gezeigt, dass Pefabloc nur einen geringen Einfluss auf die Site-1-Protease-Aktivität hat (Cheng *et al.*, 1999; Elagoz *et al.*, 2002). So ist in UMR-Zellen, einer Osteoblastenzelllinie, eine Mindestkonzentration von 0,1 mM Pefabloc notwendig, um die Site-1-Protease wirksam zu inhibieren (Gorski *et al.*, 2011; Huffman *et al.*, 2007). Obwohl im hier beschriebenen Versuchsansatz 0,2 mM Pefabloc eingesetzt

wurden, kam es zu keiner Verringerung der Spaltung. Als wirksamer Inhibitor der Site-1-Protease ist der allgemeine Serinproteaseinhibitor 3,4-Dichloroisocoumarin (DCI) beschrieben, der nur eine sehr kurze Halblebenszeit besitzt und zytotoxisch wirkt und daher nicht bei lebenden Zellen eingesetzt werden kann (Bodvard *et al.*, 2007). Spezifische wirkungsvolle Inhibitoren von Proprotein-Convertasen stellen die Prosegmente der Proteasen dar. Für die Site-1-Protease sind besonders das Präprosegment der Site-1-Protease mit der Mutation R134E (ppS1P^{R134E}) und verschiedene mutierte Formen des α_1 -Antitrypsins (RRVL³⁵⁸, RRYL³⁵⁸, RRIL³⁵⁸) gute Inhibitoren (Pullikotil *et al.*, 2004). An Decanoyl-gekoppelte Chloromethylketon-Peptide wie z. B. Decanoyl-Arg-Arg-Leu-Leu-Chloromethylketone (dec-RRLC-cmk), stellen ebenfalls gute spezifische Inhibitoren für die Site-1-Protease dar (Gorski *et al.*, 2011; Pasquato *et al.*, 2006). Der Einfluss des Präprosegment ppS1P^{R134E} und von dec-RRLC-cmk sollten auch auf die Spaltbarkeit des GlcNAc-1-Phosphotransferase α/β -Vorstufenproteins getestet werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sich bei der Site-1-Protease um eine eher untypische Serinprotease handelt, die mit gebräuchlichen, kommerziell erhältlichen Serinproteaseinhibitoren nicht und nur durch spezielle Inhibitoren gehemmt werden kann.

5.2.1 Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase durch Site-1-Protease-vermittelte Spaltung

Die α - und β -Untereinheiten der GlcNAc-1-Phosphotransferase enthalten das katalytische Zentrum zur Generierung von M6P-Resten an lysosomalen Enzymen. Außerdem wurde beschrieben, dass die fehlende Spaltung des α/β -Vorstufenproteins mit der Inaktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase assoziiert ist (Kudo & Canfield, 2006), was durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt wurde. Der Gehalt von M6P-Resten an Proteinen in Site-1-Protease-defizienten Zellen war im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich verringert (Abbildung 4.28). Dennoch war ein höherer Gehalt an M6P-Resten nachweisbar als in embryonalen Mausfibroblasten von ML II-Mäusen mit einem Defekt im α/β -Vorstufenprotein, der zum vollständigen Funktionsverlust der GlcNAc-1-Phosphotransferase führt (Kollmann *et al.*, 2010). Das kann darauf zurückgeführt werden, dass SRD-12B-Zellen keine reine Kultur von Site-1-Protease-defizienten Zellen darstellen. Eine wöchentliche umfangreiche Selektion ist notwendig, um Zellen abzutöten, die die Site-1-Protease exprimieren (Rawson *et al.*, 1998). Ein weiterer Grund kann darin liegen, dass auch das

ungespaltene α/β -Vorstufenprotein noch eine geringe Restaktivität besitzt und M6P-Reste an lysosomale Enzyme anfügen kann.

Die gestörte M6P-Bildung führt in Patienten und im Mausmodell mit Defekten in der GlcNAc-1-Phosphotransferase zu einer massiven Fehlsortierung lysosomaler Enzyme (Kollmann *et al.*, 2010; Tiede *et al.*, 2005b). Das wurde auch für Site-1-Protease-defiziente Zellen bestätigt (Abbildung 4.29). Die Aktivitäten von vier lysosomalen Enzymen, β -Hexosaminidase, β -Galaktosidase, α -Mannosidase und α -Fukosidase waren in SRD-12B-Zelllysaten erniedrigt und in den konditionierten Medien dieser Zellen 6 - 10-fach erhöht. Ein wesentlich sensitiverer experimenteller Ansatz, um die Fehlsortierung von lysosomalen Enzymen darzustellen, sind *Pulse-Chase*-Experimente, bei denen der Transport und die Prozessierung einer definierten Population neusynthetisierter Proteine nach Markierung mit [³⁵S]-Methionin untersucht wird. Über ein solches *Pulse-Chase*-Experiment wurde die Sortierung und Prozessierung der lysosomalen Protease Cathepsin Z untersucht. Diese wurde von Site-1-Protease-defizienten Zellen verstärkt sezerniert (Abbildung 4.30). Weiterhin wurde für Cathepsin Z eine veränderte molare Masse der sezernierten Form im Vergleich zu Kontrollzellen beobachtet, das auf eine veränderte *N*-Glykosylierung hinweist. Da der M6P-Rest nicht gebildet wird, kann nun das *trimming* durch α -Mannosidase und das Anfügen von weiteren Zuckerresten zur Bildung komplexer Zuckerketten mit Auswirkung auf die elektrophoretische Mobilität erfolgen. Ähnliche Veränderungen der *N*-Glykosylierung und des Laufverhaltens lysosomaler Proteine wurden auch in ML II-Patientenzellen beobachtet (Tiede *et al.*, 2005b).

Trotz massiver Fehlsortierung war immer noch ein Anteil des Cathepsin Z als prozessierte Form im Lysosom zu finden. Das kann sowohl auf die gemischte Kultur der Site-1-Protease-defizienten Zellen, als auch auf die Restaktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase oder aber auch auf den M6P-unabhängigen Transport von lysosomalen Enzymen zurückgeführt werden. So werden z. B. Prosaposin und die saure Sphingomyelinase M6P-unabhängig durch den alternativen Rezeptor Sortilin zum Lysosom transportiert (Lefrancois *et al.*, 2003; Ni & Morales, 2006). Außerdem fungiert LIMP-2 (*lysosomal integral membrane protein 2*) als spezifischer Rezeptor für den Transport des lysosomalen Enzyms β -Glukocerebrosidase (Reczek *et al.*, 2007). In vielen Zelltypen von ML II-Patienten wurden normale intrazelluläre Enzymaktivitäten gemessen. Diese Daten belegen, dass es

zusätzlich zu M6P-abhängigen Transport auch einen M6P-unabhängigen Transport von löslichen lysosomalen Enzymen zum Lysosom gibt (Kornfeld & Sly, 2001).

Da die Ergebnisse dieser Arbeit den Daten aus Experimenten an ML II-Patientenzellen (Tiede *et al.*, 2005b) bzw. an ML II-Mäusen (Kollmann *et al.*, 2010) ähneln, kann vermutet werden, dass die fehlende Spaltung des α/β -Vorstufenproteins der GlcNAc-1-Phosphotransferase einen ML II-ähnlichen Phänotyp aufgrund fehlender Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase verursacht. Nach neusten Erkenntnissen bilden das α/β -Vorstufenprotein und die γ -Untereinheit bereits im ER einen Enzymkomplex, der jedoch inaktiv ist (Encarnacao *et al.*, 2011). Erst die Spaltung zur reifen α - und β -Untereinheit durch die Site-1-Protease im Golgi-Apparat führt zur korrekten Faltung der α - und β -Untereinheiten und damit zur vollständigen Aktivierung des GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplexes, der nun lysosomale Enzyme binden und GlcNAc-1-Phosphat an mannosereiche Oligosaccharide anfügen kann (Abbildung 5.3).

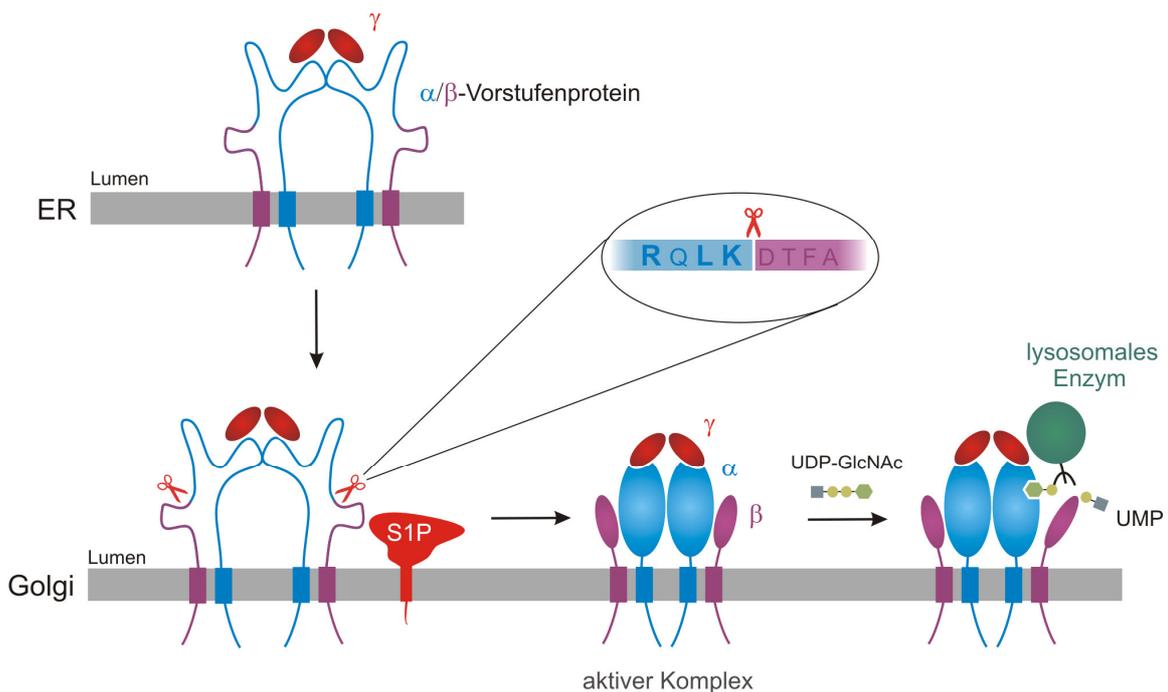


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung zur Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase durch die Site-1-Protease. Das α/β -Vorstufenprotein und die γ -Untereinheit bilden bereits im ER einen Enzymkomplex, der jedoch inaktiv ist (Encarnacao *et al.*, 2011). Im Golgi-Apparat findet die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins durch die Site-1-Protease statt, was den GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplex in die korrekte Konformation bringt, die Interaktion mit lysosomalen Enzymen ermöglicht und zum Transfer des GlcNAc-1-Phosphat-Restes führt. Wird das α/β -Vorstufenprotein nicht gespalten, liegt die GlcNAc-1-Phosphotransferase in einem inaktiven Zustand vor. (S1P = Site-1-Protease)

Welche Rolle die γ -Untereinheit beim ER-Export bzw. bei der proteolytischen Aktivierung des α/β -Vorstufenproteins oder bei der M6P-Modifizierung von lysosomalen Enzymen spielt, ist z. Z. noch unbekannt. In kultivierten humanen Makrophagen wird die γ -Untereinheit proteolytisch fragmentiert, während die β -Untereinheit (und vermutlich auch die α -Untereinheit) intakt sind (Abbildung 4.13 C). Dies führt zu einer reduzierten GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität, verbunden mit dem Verlust an M6P-haltigen Proteinen. Somit wird der γ -Untereinheit eine regulierende Funktion für die GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität zugeschrieben (Pohl *et al.*, 2010).

5.2.2 Defekte der Site-1-Protease

Bisher sind keine Erkrankungen beim Menschen mit Defekten in der Site-1-Protease bekannt. Der *knock out* der Site-1-Protease im Mausmodell führt zum Absterben der Embryonen in einem frühen Stadium der Entwicklung an Embryonaltag 4 (Mitchell *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001). Es ist denkbar, dass molekulargenetisch ungeklärte Fälle von ML II oder ML II-ähnliche Fälle wie die Pacman Dysplasie (Saul *et al.*, 2005), bei denen bisher keine Mutationen im *GNPTAB*-Gen nachgewiesen werden konnten, einen Defekt in der Site-1-Protease besitzen. Dabei kommen vor allem milde Mutationen in Betracht, die möglicherweise die Interaktion mit dem GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplex betreffen. Mutationen, die auch die Aktivierung der anderen Substrate der Site-1-Protease beeinflussen, wie die Spaltung der SREBP-Proteine, würden vermutlich zum Absterben im Embryonalstadium führen, wie es im Mausmodell gezeigt wurde.

Zur funktionellen Charakterisierung der Site-1-Protease wurden konditionale *knock out*-Tiere mit Site-1-Protease-Defizienz in verschiedenen Zell- bzw. Gewebetypen (Leber, Knorpel) hergestellt. Um die Site-1-Protease induzierbar in der Leber auszuschalten, wurden Mäuse generiert, die homozygot für ein gefloxtes Site-1-Protease-Allel und heterozygot für die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Interferon-induzierbaren MX1-Promoters waren (Yang *et al.*, 2001). Bei Produktion von Interferon wurden 70 - 90 % der Site-1-Protease-Allele in der Leber inaktiviert. Wie zu erwarten, waren weniger SREBPs im Nukleus detektierbar und die mRNA zahlreicher SREBP-Zielgene war herabgesetzt. Die Cholesterol- und Fettsäurebiosynthese in Hepatozyten waren um 75 % erniedrigt. Da auch die LDL-Rezeptor-mRNA um 50 % reduziert war, wurde weniger [¹²⁵I]-markiertes LDL aus dem Plasma in die Zellen aufgenommen. Die Nutzung von Site-1-Protease-Inhibitoren als

lipidsenkende Medikamente wurde daher bei Hypercholesterinämie vorgeschlagen (Yang *et al.*, 2001). Auch in anderen Veröffentlichungen werden Site-1-Protease-Inhibitoren als Therapeutika vorgeschlagen, um die Bildung von Cholesterin, LDL und Fettsäuren bei Lipidstoffwechselerkrankungen zu reduzieren (Hawkins *et al.*, 2008; Seidah & Prat, 2007). Auch die Behandlung von Virusinfektionen durch die Inhibition der Site-1-Protease wird diskutiert (Rojek *et al.*, 2010). Die hier vorgelegten Daten zeigen aber die bisher nicht bekannten Wirkungen dieser Behandlungsstrategien auf die Biogenese und Funktion der Lysosomen auf, die dringendst vom therapeutischen Einsatz von Site-1-Protease-Inhibitoren abraten.

Die Untersuchungen eines Zebrafisch-Modells mit defekter Site-1-Protease (*gonzo*-Fisch) ergaben, dass die Site-1-Protease für die Knorpelbildung wichtig ist (Schlombs *et al.*, 2003). Der Fisch zeigte sowohl Defekte im Lipidstoffwechsel als auch Skelettveränderungen. Die Autoren konnten nachweisen, dass die skelettalen Veränderungen im *gonzo*-Fisch unabhängig von den Störungen im Lipidstoffwechsel und fehlender SREBP-Proteolyse sind. Um die Rolle der Site-1-Protease in der Entwicklung des Skeletts von Mäusen zu untersuchen, wurde ein knorpelspezifischer Site-1-Protease *knock-out* (S1P^{cko}) generiert. S1P^{cko}-Mäuse sterben kurz nach der Geburt und zeigen eine schwerwiegende Chondrodysplasie, d. h. es kommt u. a. zur Deformation des Skeletts und zu Minderwuchs. Die Knorpelmatrix ist verändert und die Knochenbildung ist gestört (Patra *et al.*, 2007). Die Mineralisierung wurde an kultivierten Osteoblasten genauer untersucht. Die Inhibierung der Site-1-Protease durch Pefabloc und dec-RLL-cmk führte zur *Downregulation* vieler Gene, die für die Osteoblastenaktivität notwendig sind. Weiterhin führte die Überexpression der Site-1-Protease in Osteoblasten zur Erhöhung der Mineralisierung (Gorski *et al.*, 2011). Der Mechanismus dahinter konnte nicht geklärt werden.

Veränderungen des Knorpelaufbaus und der Knochenbildung in Site-1-Protease-defizienten S1P^{cko}-Mäusen bzw. des *gonzo*-Fisches lassen sich über die sekundär verhinderte Spaltung des α/β -Vorstufenproteins des GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplexes erklären. Wie bei ML II-Patienten sind auch bei ML II-Mäusen starke skelettale Veränderungen feststellbar. So weisen ML II-Mäuse verkürzte Knochen und eine Verminderung der Knochenmasse und der Knochendichte auf (Dr. K. Kollmann, UKE). Die Chondrozyten sind vergrößert und ungeordnet im Gewebe verteilt (Abbildung 5.4 A). Elektronenmikroskopische Aufnahmen

von Wachstumsfugen zeigen Chondrozyten, die Speichermaterial in den Lysosomen akkumulieren (Abbildung 5.4 B).

Da die Site-1-Protease noch weitere Osteogenese-relevante Substrate wie OASIS (*old astrocyte specifically induced substance*) und ATF6 spaltet, lässt sich der Knochendefekt in $S1P^{cko}$ -Mäusen und *gonzo*-Fischen nur teilweise über die gestörte Spaltung des α/β -Vorstufenproteins der GlcNAc-1-Phosphotransferase erklären. So zeigen die Skelette von OASIS-defizienten Mäusen eine starke Osteopenie, charakterisiert durch Typ I-Kollagen-defiziente Knochenmatrix und reduzierte Osteoblastenaktivität (Murakami *et al.*, 2006; Murakami *et al.*, 2009). Aber auch Mäuse, die einen dominant negativen Effektor der Transkriptionsfaktoren ATF6/CREB überexprimieren, sind durch eine dramatisch reduzierte Knochenbildungsrate gekennzeichnet (Chandhoke *et al.*, 2008).

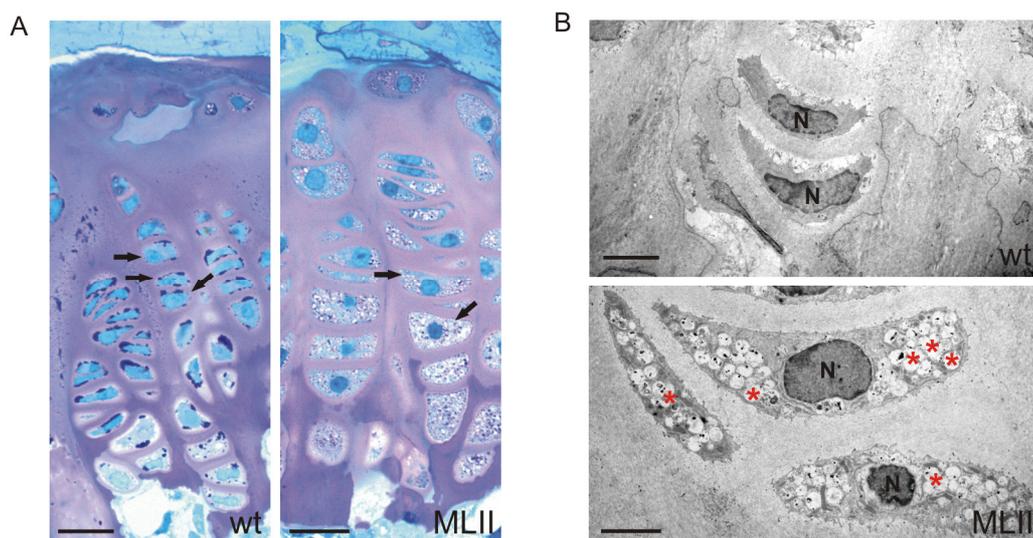


Abbildung 5.4: Histopathologische und elektronenmikroskopische Analyse des Schienbeins von ML II-Mäusen. Chondrozyten der Epiphysen-Wachstumsfuge von vier Monate alten Wildtyp (wt)- und ML II-Mäusen wurden untersucht. (A) Toluidinblau-gefärbte Schnitte (links) zeigen stark angeschwollene und chaotisch angeordnete Chondrozyten im Gewebe von ML II-Mäusen (Pfeile). (B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die ML II-Chondrozyten mit einer Vielzahl an Speicherlysosomen gefüllt sind, die mit roten Sternchen gekennzeichnet sind. Der Balken entspricht 20 µm (A) und 5 µm (B). (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. K. Kollmann, UKE & Dr. M. Schweizer, ZMNH)

5.3 Strukturelle Analysen des α/β -Vorstufenproteins

Strukturelle Analysen von Proteinen oder von Teildomänen sind wichtig, um deren Bedeutung für die Gesamtfunktion genauer zu charakterisieren. Hier wurden zunächst die *N*-Glykosylierung des α/β -Vorstufenproteins und die Dimerisierung der Konstrukte des N-terminalen Bereichs der α -Untereinheit untersucht.

Basierend auf Sequenzanalysen enthält die N-terminale Domäne der α -Untereinheit (AS 1 - 430) sieben potentielle *N*-Glykosylierungsstellen mit der Konsensussequenz Asn-X-Thr/Ser. Mutationsanalysen zeigten, dass von den sieben potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen sechs *in vivo* genutzt werden (Abbildung 4.4). Die drei potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen der β -Untereinheit wurden alle *in vivo* genutzt (Abbildung 4.27). Die verbleibenden 10 potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen der α -Untereinheit im Bereich AS 431 - 928 konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden. Es ist aber anzunehmen, dass auch von diesen potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen der größte Anteil *in vivo* genutzt wird. Das α/β -Vorstufenprotein der GlcNAc-1-Phosphotransferase stellt damit ein ungewöhnlich hoch-glykosyliertes Membranprotein im Golgi-Apparat dar. Normalerweise finden sich so hoch-glykosylierte Proteine nur im Lysosom. Dort schützen die Oligosaccharidketten die Proteine vor der Degradation durch sauren Hydrolasen im Lumen des Lysosoms (Fukuda, 1991). Da die GlcNAc-1-Phosphotransferase direkt lysosomale Enzyme bindet, könnte der hohe Glykosylierungsgrad ebenfalls einen Schutz gegen die Degradation durch diese Enzyme darstellen. Dagegen spricht jedoch, dass die sauren Hydrolasen nur im sauren Milieu des Lysosoms wirken und keine oder nur eine geringe Hydrolysewirkung im Golgi-Apparat besitzen sollten.

Die Experimente zeigten, dass das Wildtyp α/β -Vorstufenprotein und das Wildtyp α/β -Minikonstrukt nur mannosereiche Oligosaccharide enthalten (Abbildung 4.13, 4.22). Nichtspaltbare Formen des α/β -Vorstufenproteins, wie die R925A-Mutante des α/β -Minikonstruktes, weisen zwei verschiedene Formen mit unterschiedlicher *N*-Glykosylierung auf, wobei eine Form komplexe Oligosaccharide besitzt. Auch die gespaltene β -Untereinheit besitzt komplexe Oligosaccharide (Abbildung 4.22). Es wird davon ausgegangen, dass die verschiedenen Glykosidasen und Glykosyltransferasen, die für die Prozessierung von mannosereichen zu komplexen Oligosacchariden verantwortlich sind, in verschiedenen Zisternen des Golgi-Apparates lokalisiert sind (Abbildung 5.5). Dabei erfolgen die frühen Reaktionen in den *cis*-Zisternen (Golgi-Mannosidase I), später ablaufende Schritte in

medial-Zisternen (GlcNAc-Transferase I, Golgi-Mannosidase II) und abschließende Modifikationen in *trans*-Zisternen (GlcNAc-Transferase II, Galaktosyltransferase) und im TGN (Sialyltransferase) (Vgl. 1.2.2; Goldberg & Kornfeld, 1983).

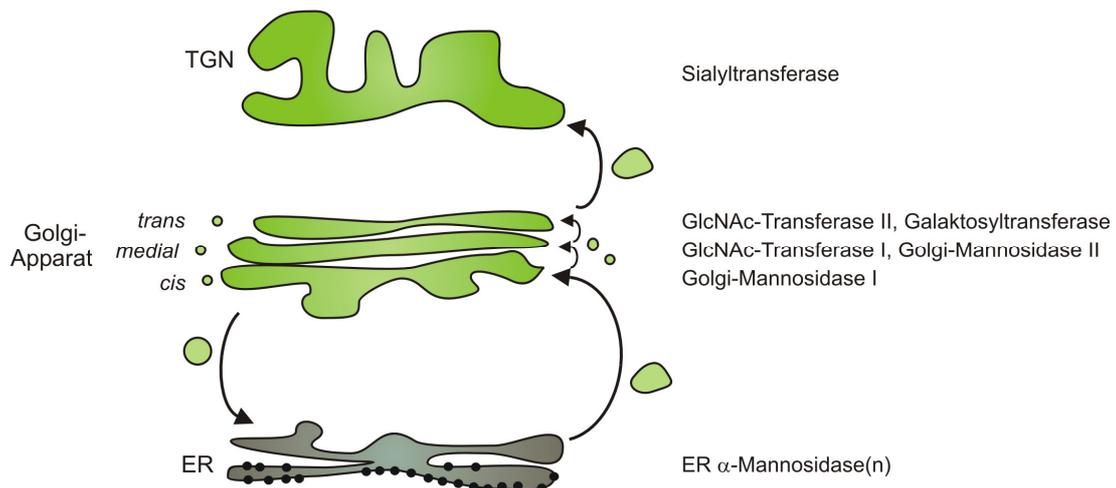


Abbildung 5.5: Zelluläre Verteilung von Enzymen, die für den Aufbau von N-Glykanen verantwortlich sind. Der Aufbau von Asparagin-verknüpften Glykanen erfolgt in ER, Golgi-Apparat und TGN. Die Unterteilung des Golgi-Apparates in *cis*-, *medial*- und *trans*-Zisternen hat dabei eine entscheidende Rolle.

Aus dem Vorhandensein komplexer Oligosaccharidketten kann geschlossen werden, dass die gespaltene β -Untereinheit und das nicht-spaltbare α/β -Minikonstrukt mit der Mutation R925A mindestens bis zum *medial*-Golgi-Apparat transportiert werden. Das könnte durch Doppelimmunfluoreszenzen mit Markerproteinen für den *medial*-Golgi-Apparat bestätigt werden. Spaltbare Formen des α/β -Vorstufenproteins zeigten nur eine Polypeptidbande im Westernblot für das noch nicht gespaltene Protein, die nur mannosereiche Oligosaccharide enthält (Abbildung 4.22). Vermutlich wird das α/β -Vorstufenprotein sobald es den Golgi-Apparat erreicht in die reifen α - und β -Untereinheiten gespalten, bevor deren N-glykosidische Zuckerketten weiter zu komplexen Oligosacchariden prozessiert werden.

Für das Lassa-Virus-Glykoprotein GP-C und für den Transkriptionsfaktor CREB-H sind N-Glykane wichtig für die Prozessierung durch die Site-1-Protease (Chan *et al.*, 2010; Eichler *et al.*, 2006). Die vorgelegten Daten zeigten jedoch, dass die N-Glykane der β -Untereinheit nicht von Bedeutung für die Erkennung und Spaltung durch die Site-1-Protease sind (Abbildung 4.27). Da im α/β -Minikonstrukt ein Großteil der Domänen

deletiert wurde, spielen vermutlich auch die *N*-Glykane in der α -Untereinheit keine Rolle bei der Erkennung durch die Site-1-Protease.

Schließlich sollte überprüft werden, ob die *N*-Glykosylierung der N-terminalen Domäne einen Einfluss auf die Bindung an *Reactive Green-19*-Agarose hat. Das war nicht der Fall, denn die Bindung erfolgte trotz der Mutation aller *N*-Glykosylierungsstellen in diesem Bereich des α/β -Vorstufenproteins (Aspararin \rightarrow Glutamin) (Abbildung 4.9). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die *N*-Glykane die Bindung von UDP-GlcNAc nicht beeinflussen.

Die vorliegenden Expressionsanalysen ergaben, dass die Mutagenese der drei potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen der β -Untereinheit zu einer verringerten Proteinexpression des α/β -Minikonstruktes führt, was auf eine reduzierte Stabilität und Faltung des α/β -Vorstufenproteins hinweist (Abbildung 4.27). Auch für die γ -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase konnte gezeigt werden, dass die *N*-Glykane wichtig für die Stabilität sind (Encarnacao *et al.*, 2011). Die Mutation der *N*-Glykosylierungsstelle N116 in der γ -Untereinheit führt zur Erkrankung ML III (Tiede *et al.*, 2004). Bisher wurden keine Mutationen im α/β -Vorstufenprotein der GlcNAc-1-Phosphotransferase von ML II-Patienten gefunden, die *N*-Glykosylierungsstellen betreffen.

Die GlcNAc-1-Phosphotransferase ist ein hexamerer Enzymkomplex bestehend aus jeweils zwei membrangebundenen α - und β -Untereinheiten und zwei löslichen γ -Untereinheiten ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$). Es wurde bereits beschrieben, dass die bovine α -Untereinheit Homodimere über Disulfidbrücken bildet (Bao *et al.*, 1996a). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cystein 70 im N-terminalen Teil der humanen α -Untereinheit an der Dimerisierung beteiligt ist (Abbildung 4.7). Es bleibt nachzuweisen, ob weitere Cysteine in die Dimerisierung der gesamten α -Untereinheit bzw. des nicht-gespaltenen α/β -Vorstufenproteins involviert sind. Die γ -Untereinheiten der GlcNAc-1-Phosphotransferase bilden über Cystein 245 Dimere aus. Durch Gelfiltrationsanalysen wurde gezeigt, dass die γ -Untereinheit mit mutiertem C245 nicht mehr an den Komplex binden kann (Encarnacao *et al.*, 2011). Ähnliche Studien könnten auch für die α -Untereinheit und das α/β -Vorstufenprotein durchgeführt werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die GlcNAc-1-Phosphotransferase ist das Schlüsselenzym bei der Bildung des Mannose-6-Phosphatrestes an Zuckerketten von löslichen lysosomalen Proteinen, der das Signal für den rezeptorabhängigen Transport dieser Proteine zum Lysosom darstellt. Der hexamere GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplex besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$), die durch zwei Gene kodiert werden. Defekte im Gen für das α/β -Vorstufenprotein der GlcNAc-1-Phosphotransferase führen zu einer schweren Erkrankung, Mukopolidose II, die biochemisch durch Fehlsortierung lysosomaler Enzyme und einer lysosomalen Dysfunktion gekennzeichnet ist. Als Folge kommt es zur zellulären Akkumulation von nicht-abbaubarem Speichermaterial. Skelettale Abnormalitäten, psychomotorische Retardierung und kardiorespiratorische Komplikationen führen zu einem frühzeitigen Tod der Patienten. Die α - und β -Untereinheit werden als gemeinsames Transmembran-Typ III-Vorstufenprotein synthetisiert, das eine modulare Domänenstruktur aufweist. Die Bedeutung der einzelnen Domänen für die GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität ist bisher unbekannt. Die α - und β -Untereinheiten enthalten das katalytische Zentrum des Komplexes und weiterhin die Substratbindungsstellen 1. für den Phosphatdonor UDP-GlcNAc, 2. für lysosomale Enzyme und 3. für mannosereiche Oligosaccharide an lysosomalen Enzymen. Die proteolytische Spaltung des α/β -Vorstufenproteins in die reifen Untereinheiten ist essentiell für die enzymatische Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase. Die für die Spaltung verantwortliche Protease ist bisher nicht bekannt.

- (A) Aus Sequenzanalysen ist bekannt, dass die Region, die die Aminosäuren 60 - 430 des α/β -Vorstufenproteins umfasst, Ähnlichkeiten zu dem N-terminalen Teil von Kapselbiosyntheseproteinen von Amöben und Bakterien aufweist, die UDP-GlcNAc für den Aufbau der Kapsel nutzen. Daher wird angenommen, dass die N-terminale Region des α/β -Vorstufenproteins für die Bindung des UDP-GlcNAc verantwortlich ist, das das Substrat der enzymatischen Reaktion darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Region des α/β -Vorstufenprotein an einen sogenannten „Reaktiven Farbstoff“ bindet, der dafür bekannt ist, Nukleotid-bindende Proteine zu erkennen. Die strukturelle Untersuchung der N-terminalen Domäne ergab, dass die eingefügte säugerspezifische Domäne (Aminosäuren 102 - 324), sowie die

N-Glykane in dieser Region für die Bindung an UDP-GlcNAc nicht von Bedeutung sind. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der Cysteinrest 70 im N-terminalen Teil des α/β -Vorstufenproteins an der Dimerisierung der α -Untereinheit beteiligt ist.

- (B) Die Protease, die das α/β -Vorstufenprotein zu den reifen α - und β -Untereinheiten der GlcNAc-1-Phosphotransferase spaltet, konnte in dieser Arbeit identifiziert werden. Mutationsanalysen, subzelluläre Lokalisation und Sequenzvergleiche mit bekannten Spaltsequenzen lieferten die ersten Hinweise, dass das α/β -Vorstufenprotein von der im Golgi-Apparat lokalisierten Site-1-Protease gespalten wird. Die siRNA-vermittelte *Downregulation* und Untersuchungen in Site-1-Protease-defizienten Zellen bestätigten die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins durch die Site-1-Protease. Es wurde gezeigt, dass die *N*-Glykane der β -Untereinheit wichtig für die Stabilität des α/β -Vorstufenproteins sind, jedoch keine Bedeutung für die Erkennung und die Spaltung durch die Site-1-Protease haben. Die Site-1-Protease ist durch die Spaltung von spezifischen membranintegralen Transkriptionsfaktoren an der Lipid- und Cholesterolumöostase beteiligt. Site-1-Protease-defiziente Zellen sind nicht in der Lage das α/β -Vorstufenprotein proteolytisch zu aktivieren und zeigen einen Mukopolidose II-ähnlichen Phänotyp. Die Ergebnisse belegen eine neue Funktion der Site-1-Protease in der Biogenese von Lysosomen und weisen darauf hin, dass lipidunabhängige Veränderungen in Site-1-Protease-defizienten Zellen oder Organen zumindest teilweise durch lysosomale Fehlfunktion verursacht werden können.

7 SUMMARY

GlcNAc-1-phosphotransferase is the key enzyme in the generation of the mannose-6 phosphate residue on soluble lysosomal proteins, which functions as a signal for receptor-mediated transport to the lysosome. The hexameric GlcNAc-1-phosphotransferase complex ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) consists of three different subunits that are encoded by two different genes. Defects in the gene encoding the α/β -precursor of the GlcNAc-1-phosphotransferase lead to the severe disorder mucopolipidosis II that is biochemically characterized by missorting of lysosomal enzymes and lysosomal dysfunction. The cellular accumulation of non-degradable storage material results in skeletal abnormalities, psychomotor retardation and cardiorespiratory complications accompanied by an early death of the patients.

The α - and β -subunits are synthesized as a single type III-membrane protein showing a complex modular structure. The α - and β -subunits contain the catalytic portion of the complex and substrate binding sites for 1. the phosphate donor UDP-GlcNAc, 2. lysosomal enzymes and 3. high-mannose type oligosaccharides on lysosomal enzymes. The proteolytic cleavage of the α/β -precursor to mature α - and β -subunits is a prerequisite for the enzymatic activity of the GlcNAc-1-phosphotransferase. The protease responsible for the cleavage is not known so far.

- (A) Sequence comparison showed that a region (amino acids 60 to 430) of the α/β -precursor has similarities to the N-terminal part of capsule biosynthesis proteins of amoeba and bacteria. Therefore the N-terminal region of the α/β -precursor might be responsible for the binding of UDP-GlcNAc, the substrate of the enzymatic reaction. It was shown that the N-terminal part of the α/β -precursor bind to a so-called reactive dye that is known to recognize nucleotide-binding proteins. Structural analysis of the N-terminal domain revealed that the inserted mammalian-specific domain (amino acids 102-324) as well as the N-glycans in this region is not necessary for the binding. Furthermore, cysteine residue 70 seems to be responsible for the dimerization of the α -subunit of the GlcNAc-1-phosphotransferase.
- (B) The protease cleaving the α/β -precursor to mature α - and β -subunits of the GlcNAc-1-phosphotransferase was identified. Mutational analysis, subcellular localization and sequence comparison with known cleavage sites gave the first hints,

that the α/β -precursor is cleaved by the Golgi-resident site 1 protease. The siRNA mediated knockdown and the analysis of site-1 protease deficient cells confirmed the cleavage of the α/β -precursor by the site-1 protease. It was shown that *N*-glycans of the β -subunit are required for folding and stabilisation of the α/β -precursor protein but are not necessary for the recognition and cleavage by site-1 protease. Site-1 protease is known to be involved in the lipid- and cholesterol homeostasis by cleaving specific membrane-bound transcription factors. Site-1 protease-deficient cells are not able to proteolytically activate the α/β -precursor and show a mucopolipidosis II-like phenotype. These results reveal a new function of site-1 protease in the biogenesis of lysosomes and suggest that lipid-independent phenotypes of site-1 protease-deficient cells and organs are at least partially caused by lysosomal dysfunction.

8 LITERATUR

- APPENZELLER-HERZOG, C., NYFELER, B., BURKHARD, P., SANTAMARIA, I., LOPEZ-OTIN, C. & HAURI, H.P. (2005). Carbohydrate- and conformation-dependent cargo capture for ER-exit. *Mol Biol Cell*, **16**, 1258-67.
- ASTER, J.C., SIMMS, W.B., ZAVALA-RUIZ, Z., PATRIUB, V., NORTH, C.L. & BLACKLOW, S.C. (1999). The folding and structural integrity of the first LIN-12 module of human Notch1 are calcium-dependent. *Biochemistry*, **38**, 4736-42.
- BALLABIO, A. & GIESELMANN, V. (2009). Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta*, **1793**, 684-96.
- BAO, M., BOOTH, J.L., ELMENDORF, B.J. & CANFIELD, W.M. (1996a). Bovine UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. I. Purification and subunit structure. *J Biol Chem*, **271**, 31437-45.
- BAO, M., ELMENDORF, B.J., BOOTH, J.L., DRAKE, R.R. & CANFIELD, W.M. (1996b). Bovine UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. II. Enzymatic characterization and identification of the catalytic subunit. *J Biol Chem*, **271**, 31446-51.
- BARGAL, R., ZEIGLER, M., ABU-LIBDEH, B., ZURI, V., MANDEL, H., BEN NERIAH, Z., STEWART, F., ELCIOGLU, N., HINDI, T., LE MERRER, M., BACH, G. & RAAS-ROTHSCHILD, A. (2006). When Mucopolipidosis III meets Mucopolipidosis II: GNPTA gene mutations in 24 patients. *Mol Genet Metab*, **88**, 359-63.
- BASAK, S., STEWART, N.A., CHRETIEN, M. & BASAK, A. (2004). Aminoethyl benzenesulfonyl fluoride and its hexapeptide (Ac-VFRSLK) conjugate are both in vitro inhibitors of subtilisin kexin isozyme-1. *FEBS Lett*, **573**, 186-94.
- BENIE, A.J., BLUME, A., SCHMIDT, R.R., REUTTER, W., HINDERLICH, S. & PETERS, T. (2004). Characterization of ligand binding to the bifunctional key enzyme in the sialic acid biosynthesis by NMR: II. Investigation of the ManNAc kinase functionality. *J Biol Chem*, **279**, 55722-7.
- BEYER, W.R., POPPLAU, D., GARTEN, W., VON LAER, D. & LENZ, O. (2003). Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P. *J Virol*, **77**, 2866-72.
- BLOBEL, G. & DOBBERSTEIN, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol*, **67**, 835-51.

- BLUME, A., BENIE, A.J., STOLZ, F., SCHMIDT, R.R., REUTTER, W., HINDERLICH, S. & PETERS, T. (2004). Characterization of ligand binding to the bifunctional key enzyme in the sialic acid biosynthesis by NMR: I. Investigation of the UDP-GlcNAc 2-epimerase functionality. *J Biol Chem*, **279**, 55715-21.
- BODVARD, K., MOHLIN, J. & KNECHT, W. (2007). Recombinant expression, purification, and kinetic and inhibitor characterisation of human site-1-protease. *Protein Expr Purif*, **51**, 308-19.
- BRAULKE, T. & BONIFACINO, J.S. (2009). Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1793**, 605-14.
- BRAULKE, T., POHL, S. & STORCH, S. (2008). Molecular analysis of the GlcNAc-1-phosphotransferase. *J Inherit Metab Dis*.
- BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. (2009). Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J Lipid Res*, **50 Suppl**, S15-27.
- BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11041-8.
- BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, **89**, 331-40.
- CARDULLO, R.A., AGRAWAL, S., FLORES, C., ZAMECNIK, P.C. & WOLF, D.E. (1988). Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8790-4.
- CATHEY, S.S., LEROY, J.G., WOOD, T., EAVES, K., SIMENSEN, R.J., KUDO, M., STEVENSON, R.E. & FRIEZ, M.J. (2010). Phenotype and genotype in mucopolidoses II and III alpha/beta: a study of 61 probands. *J Med Genet*, **47**, 38-48.
- CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W.W. & PRASHER, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, **263**, 802-5.
- CHAN, C.P., MAK, T.Y., CHIN, K.T., NG, I.O. & JIN, D.Y. (2010). N-linked glycosylation is required for optimal proteolytic activation of membrane-bound transcription factor CREB-H. *J Cell Sci*, **123**, 1438-48.
- CHANDHOKE, T.K., HUANG, Y.F., LIU, F., GRONOWICZ, G.A., ADAMS, D.J., HARRISON, J.R. & KREAM, B.E. (2008). Osteopenia in transgenic mice with osteoblast-targeted expression of the inducible cAMP early repressor. *Bone*, **43**, 101-9.

- CHEN, G. & ZHANG, X. (2010). New insights into S2P signaling cascades: regulation, variation, and conservation. *Protein Sci*, **19**, 2015-30.
- CHENG, D., ESPENSHADE, P.J., SLAUGHTER, C.A., JAEN, J.C., BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. (1999). Secreted site-1 protease cleaves peptides corresponding to luminal loop of sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem*, **274**, 22805-12.
- COHEN, B.E. (2010). Amphotericin B membrane action: role for two types of ion channels in eliciting cell survival and lethal effects. *J Membr Biol*, **238**, 1-20.
- CUOZZO, J.W., TAO, K., WU, Q.L., YOUNG, W. & SAHAGIAN, G.G. (1995). Lysine-based structure in the proregion of procathepsin L is the recognition site for mannose phosphorylation. *J Biol Chem*, **270**, 15611-9.
- CUPPOLETTI, J., AURES-FISCHER, D. & SACHS, G. (1987). The lysosomal H⁺ pump: 8-azido-ATP inhibition and the role of chloride in H⁺ transport. *Biochim Biophys Acta*, **899**, 276-84.
- DAHMS, N.M., OLSON, L.J. & KIM, J.J. (2008). Strategies for carbohydrate recognition by the mannose 6-phosphate receptors. *Glycobiology*, **18**, 664-78.
- DE DUVE, C. (1983). Lysosomes revisited. *Eur J Biochem*, **137**, 391-397.
- DUNCAN, E.A., DAVE, U.P., SAKAI, J., GOLDSTEIN, J.L. & BROWN, M.S. (1998). Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning. *J Biol Chem*, **273**, 17801-9.
- EHRMANN, M. & CLAUSEN, T. (2004). Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annu Rev Genet*, **38**, 709-24.
- EICHLER, R., LENZ, O., GARTEN, W. & STRECKER, T. (2006). The role of single N-glycans in proteolytic processing and cell surface transport of the Lassa virus glycoprotein GP-C. *Virol J*, **3**, 41.
- ELAGOZ, A., BENJANNET, S., MAMMARBASSI, A., WICKHAM, L. & SEIDAH, N.G. (2002). Biosynthesis and cellular trafficking of the convertase SKI-1/S1P: ectodomain shedding requires SKI-1 activity. *J Biol Chem*, **277**, 11265-75.
- ELLGAARD, L. & FRICKEL, E.M. (2003). Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding. *Cell Biochem Biophys*, **39**, 223-47.
- ENCARNACAO, M., KOLLMANN, K., TRUSCH, M., BRAULKE, T. & POHL, S. (2011). Post-translational modifications of the gamma-subunit affect intracellular trafficking and complex assembly of GlcNAc-1-phosphotransferase. *J Biol Chem*, **286**, 5311-8.

- ENCARNACAO, M., LACERDA, L., COSTA, R., PRATA, M.J., COUTINHO, M.F., RIBEIRO, H., LOPES, L., PINEDA, M., IGNATIUS, J., GALVEZ, H., MUSTONEN, A., VIEIRA, P., LIMA, M.R. & ALVES, S. (2009). Molecular analysis of the GNPTAB and GNPTG genes in 13 patients with mucopolidosis type II or type III - identification of eight novel mutations. *Clin Genet*, **76**, 76-84.
- FUKUDA, M. (1991). Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem*, **266**, 21327-30.
- GHOSH, P., DAHMS, N.M. & KORNFELD, S. (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 202-12.
- GOLDBERG, D.E. & KORNFELD, S. (1983). Evidence for extensive subcellular organization of asparagine-linked oligosaccharide processing and lysosomal enzyme phosphorylation. *J Biol Chem*, **258**, 3159-65.
- GOLDBERG, D.E. & KORNFELD, S. (1981). The phosphorylation of beta-glucuronidase oligosaccharides in mouse P388D1 cells. *J Biol Chem*, **256**, 13060-7.
- GORSKI, J.P., HUFFMAN, N.T., CHITTUR, S., MIDURA, R.J., BLACK, C., OXFORD, J. & SEIDAH, N.G. (2011). Inhibition of proprotein convertase SKI-1 blocks transcription of key extracellular matrix genes regulating osteoblastic mineralization. *J Biol Chem*, **286**, 1836-49.
- GRIFFITHS, G., FULLER, S.D., BACK, R., HOLLINSHEAD, M., PFEIFFER, S. & SIMONS, K. (1989). The dynamic nature of the Golgi complex. *J Cell Biol*, **108**, 277-97.
- HASILIK, A. & VON FIGURA, K. (1981). Oligosaccharides in lysosomal enzymes. Distribution of high-mannose and complex oligosaccharides in cathepsin D and beta-hexosaminidase. *Eur J Biochem*, **121**, 125-9.
- HASILIK, A., WAHEED, A. & VON FIGURA, K. (1981). Enzymatic phosphorylation of lysosomal enzymes in the presence of UDP-N-acetylglucosamine. Absence of the activity in I-cell fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, **98**, 761-7.
- HAWKINS, J.L., ROBBINS, M.D., WARREN, L.C., XIA, D., PETRAS, S.F., VALENTINE, J.J., VARGHESE, A.H., WANG, I.K., SUBASHI, T.A., SHELLY, L.D., HAY, B.A., LANDSCHULZ, K.T., GEOGHEGAN, K.F. & HARWOOD, H.J., JR. (2008). Pharmacologic inhibition of site 1 protease activity inhibits sterol regulatory element-binding protein processing and reduces lipogenic enzyme gene expression and lipid synthesis in cultured cells and experimental animals. *J Pharmacol Exp Ther*, **326**, 801-8.
- HELENIUS, A. & AEBI, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, **291**, 2364-9.

- HILLE-REHFELD, A. (1995). Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Biochim Biophys Acta*, **1241**, 177-94.
- HUFFMAN, N.T., KEIGHTLEY, J.A., CHAOYING, C., MIDURA, R.J., LOVITCH, D., VENO, P.A., DALLAS, S.L. & GORSKI, J.P. (2007). Association of specific proteolytic processing of bone sialoprotein and bone acidic glycoprotein-75 with mineralization within biomineralization foci. *J Biol Chem*, **282**, 26002-13.
- KIMBLE, J. & SIMPSON, P. (1997). The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 333-61.
- KOCH, G.L. (1990). The endoplasmic reticulum and calcium storage. *Bioessays*, **12**, 527-31.
- KOLLMANN, K., POHL, S., MARSCHNER, K., ENCARNACAO, M., SAKWA, I., TIEDE, S., POORTHUIS, B.J., LUBKE, T., MULLER-LOENNIES, S., STORCH, S. & BRAULKE, T. (2010). Mannose phosphorylation in health and disease. *Eur J Cell Biol*, **89**, 117-23.
- KORNFELD, R., BAO, M., BREWER, K., NOLL, C. & CANFIELD, W. (1999). Molecular cloning and functional expression of two splice forms of human N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase. *J Biol Chem*, **274**, 32778-85.
- KORNFELD, R. & KORNFELD, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*, **54**, 631-64.
- KORNFELD, S. & MELLMAN, I. (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol*, **5**, 483-525.
- KORNFELD, S. & SLY, W.S. (2001). I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy: disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. ed Scriver, C.R. pp. 3421-3452. New York, USA: McGraw-Hill Inc.
- KUDO, M., BAO, M., D'SOUZA, A., YING, F., PAN, H., ROE, B.A. & CANFIELD, W.M. (2005). The alpha- and beta-subunits of the human UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase [corrected] are encoded by a single cDNA. *J Biol Chem*, **280**, 36141-9.
- KUDO, M. & CANFIELD, W.M. (2006). Structural requirements for efficient processing and activation of recombinant human UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal-enzyme-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. *J Biol Chem*, **281**, 11761-8.
- KUNDRA, R. & KORNFELD, S. (1999). Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J Biol Chem*, **274**, 31039-46.

- LAZZARINO, D.A. & GABEL, C.A. (1989). Mannose processing is an important determinant in the assembly of phosphorylated high mannose-type oligosaccharides. *J Biol Chem*, **264**, 5015-23.
- LEE, W.S., PAYNE, B.J., GELFMAN, C.M., VOGEL, P. & KORNFELD, S. (2007). Murine UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase lacking the gamma-subunit retains substantial activity toward acid hydrolases. *J Biol Chem*, **282**, 27198-203.
- LEFRANCOIS, S., ZENG, J., HASSAN, A.J., CANUEL, M. & MORALES, C.R. (2003). The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *Embo J*, **22**, 6430-7.
- LENZ, O., TER MEULEN, J., KLENK, H.D., SEIDAH, N.G. & GARTEN, W. (2001). The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12701-5.
- LEROY, J.G., HO, M.W., MACBRINN, M.C., ZIELKE, K., JACOB, J. & O'BRIEN, J.S. (1972). I-cell disease: biochemical studies. *Pediatr Res*, **6**, 752-7.
- LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., YUAN, L., TIPPER, C., AMHERDT, M., ORCI, L. & KLAUSNER, R.D. (1991). Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell*, **67**, 601-16.
- MITCHELL, K.J., PINSON, K.I., KELLY, O.G., BRENNAN, J., ZUPICICH, J., SCHERZ, P., LEIGHTON, P.A., GOODRICH, L.V., LU, X., AVERY, B.J., TATE, P., DILL, K., PANGILINAN, E., WAKENIGHT, P., TESSIER-LAVIGNE, M. & SKARNES, W.C. (2001). Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. *Nat Genet*, **28**, 241-9.
- MOUCHANTAF, R., WATT, H.L., SULEA, T., SEIDAH, N.G., ALTURAIHI, H., PATEL, Y.C. & KUMAR, U. (2004). Prosomatostatin is proteolytically processed at the amino terminal segment by subtilase SKI-1. *Regul Pept*, **120**, 133-40.
- MÜLLER-LOENNIES, S., GALLICIOTTI, G., KOLLMANN, K., GLATZEL, M. & BRAULKE, T. (2010). A novel single-chain antibody fragment for detection of mannose 6-phosphate-containing proteins: application in mucopolidosis type II patients and mice. *Am J Pathol*, **177**, 240-7.
- MURAKAMI, T., KONDO, S., OGATA, M., KANEMOTO, S., SAITO, A., WANAKA, A. & IMAIZUMI, K. (2006). Cleavage of the membrane-bound transcription factor OASIS in response to endoplasmic reticulum stress. *J Neurochem*, **96**, 1090-100.

- MURAKAMI, T., SAITO, A., HINO, S., KONDO, S., KANEMOTO, S., CHIHARA, K., SEKIYA, H., TSUMAGARI, K., OCHIAI, K., YOSHINAGA, K., SAITOH, M., NISHIMURA, R., YONEDA, T., KOU, I., FURUICHI, T., IKEGAWA, S., IKAWA, M., OKABE, M., WANAKA, A. & IMAIZUMI, K. (2009). Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation. *Nat Cell Biol*, **11**, 1205-11.
- NI, X. & MORALES, C.R. (2006). The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic*, **7**, 889-902.
- NICKEL, W., BRUGGER, B. & WIELAND, F.T. (1998). Protein and lipid sorting between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *Semin Cell Dev Biol*, **9**, 493-501.
- OGURI, S., MINOWA, M.T., IHARA, Y., TANIGUCHI, N., IKENAGA, H. & TAKEUCHI, M. (1997). Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine: alpha1,3-D-mannoside beta1,4-N-acetylglucosaminyltransferase (N-acetylglucosaminyltransferase-IV) from bovine small intestine. *J Biol Chem*, **272**, 22721-7.
- OTOMO, T., MURAMATSU, T., YORIFUJI, T., OKUYAMA, T., NAKABAYASHI, H., FUKAO, T., OHURA, T., YOSHINO, M., TANAKA, A., OKAMOTO, N., INUI, K., OZONO, K. & SAKAI, N. (2009). Mucopolipidosis II and III alpha/beta: mutation analysis of 40 Japanese patients showed genotype-phenotype correlation. *J Hum Genet*, **54**, 145-51.
- PASQUATO, A., PULLIKOTIL, P., ASSELIN, M.C., VACATELLO, M., PAOLILLO, L., GHEZZO, F., BASSO, F., DI BELLO, C., DETTIN, M. & SEIDAH, N.G. (2006). The proprotein convertase SKI-1/S1P. In vitro analysis of Lassa virus glycoprotein-derived substrates and ex vivo validation of irreversible peptide inhibitors. *J Biol Chem*, **281**, 23471-81.
- PATRA, D., XING, X., DAVIES, S., BRYAN, J., FRANZ, C., HUNZIKER, E.B. & SANDELL, L.J. (2007). Site-1 protease is essential for endochondral bone formation in mice. *J Cell Biol*, **179**, 687-700.
- POHL, S., MARSCHNER, K., STORCH, S. & BRAULKE, T. (2009a). Glycosylation- and phosphorylation-dependent intracellular transport of lysosomal hydrolases. *Biol Chem*, **390**, 521-7.
- POHL, S., TIEDE, S., CASTRICHINI, M., CANTZ, M., GIESELMANN, V. & BRAULKE, T. (2009b). Compensatory expression of human N-acetylglucosaminyl-1-phosphotransferase subunits in mucopolipidosis type III gamma. *Biochim Biophys Acta*, **1792**, 221-5.

- POHL, S., TIEDE, S., MARSCHNER, K., ENCARNACAO, M., CASTRICHINI, M., KOLLMANN, K., MUSCHOL, N., ULLRICH, K., MULLER-LOENNIES, S. & BRAULKE, T. (2010). Proteolytic processing of the gamma-subunit is associated with the failure to form GlcNAc-1-phosphotransferase complexes and mannose 6-phosphate residues on lysosomal enzymes in human macrophages. *J Biol Chem*, **285**, 23936-44.
- POWERS, J.C., ASGIAN, J.L., EKICI, O.D. & JAMES, K.E. (2002). Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem Rev*, **102**, 4639-750.
- PUENTE, X.S., SANCHEZ, L.M., OVERALL, C.M. & LOPEZ-OTIN, C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet*, **4**, 544-58.
- PULLIKOTIL, P., VINCENT, M., NICHOL, S.T. & SEIDAH, N.G. (2004). Development of protein-based inhibitors of the proprotein of convertase SKI-1/S1P: processing of SREBP-2, ATF6, and a viral glycoprotein. *J Biol Chem*, **279**, 17338-47.
- RAAS-ROTHSCHILD, A., CORMIER-DAIRE, V., BAO, M., GENIN, E., SALOMON, R., BREWER, K., ZEIGLER, M., MANDEL, H., TOTH, S., ROE, B., MUNNICH, A. & CANFIELD, W.M. (2000). Molecular basis of variant pseudo-hurler polydystrophy (mucopolidosis IIIC). *J Clin Invest*, **105**, 673-81.
- RAPOPORT, T.A. (2008). Protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *Febs J*, **275**, 4471-8.
- RAWLINGS, N.D. & BARRETT, A.J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem J*, **290** (Pt 1), 205-18.
- RAWSON, R.B. (2003). The SREBP pathway--insights from Insigs and insects. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 631-40.
- RAWSON, R.B., CHENG, D., BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. (1998). Isolation of cholesterol-requiring mutant Chinese hamster ovary cells with defects in cleavage of sterol regulatory element-binding proteins at site 1. *J Biol Chem*, **273**, 28261-9.
- RAWSON, R.B., ZELENSKI, N.G., NIJHAWAN, D., YE, J., SAKAI, J., HASAN, M.T., CHANG, T.Y., BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. (1997). Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol Cell*, **1**, 47-57.
- RECZEK, D., SCHWAKE, M., SCHRODER, J., HUGHES, H., BLANZ, J., JIN, X., BRONDYK, W., VAN PATTEN, S., EDMUNDS, T. & SAFTIG, P. (2007). LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell*, **131**, 770-83.

- REDDY, A., CALER, E.V. & ANDREWS, N.W. (2001). Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell*, **106**, 157-69.
- REITMAN, M.L. & KORNFELD, S. (1981). Lysosomal enzyme targeting. N-Acetylglucosaminylphosphotransferase selectively phosphorylates native lysosomal enzymes. *J Biol Chem*, **256**, 11977-80.
- ROJEK, J.M., PASQUAL, G., SANCHEZ, A.B., NGUYEN, N.T., DE LA TORRE, J.C. & KUNZ, S. (2010). Targeting the proteolytic processing of the viral glycoprotein precursor is a promising novel antiviral strategy against arenaviruses. *J Virol*, **84**, 573-84.
- ROUNTREE, M.R., BACHMAN, K.E. & BAYLIN, S.B. (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet*, **25**, 269-77.
- RUIVO, R., ANNE, C., SAGNE, C. & GASNIER, B. (2009). Molecular and cellular basis of lysosomal transmembrane protein dysfunction. *Biochim Biophys Acta*, **1793**, 636-49.
- SADLER, J.E., BEYER, T.A. & HILL, R.L. (1981). Affinity chromatography of glycosyltransferases. *J Chromatogr*, **215**, 181-94.
- SADLER, J.E., REARICK, J.I. & HILL, R.L. (1979). Purification to homogeneity and enzymatic characterization of an alpha-N-acetylgalactosaminide alpha 2 leads to 6 sialyltransferase from porcine submaxillary glands. *J Biol Chem*, **254**, 5934-41.
- SAKAI, J., RAWSON, R.B., ESPENSHADE, P.J., CHENG, D., SEEGMILLER, A.C., GOLDSTEIN, J.L. & BROWN, M.S. (1998). Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol Cell*, **2**, 505-14.
- SAUL, R.A., PROUD, V., TAYLOR, H.A., LEROY, J.G. & SPRANGER, J. (2005). Prenatal mucopolipidosis type II (I-cell disease) can present as Pacman dysplasia. *Am J Med Genet A*, **135**, 328-32.
- SCHECHTER, I. & BERGER, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*, **27**, 157-62.
- SCHLOMBS, K., WAGNER, T. & SCHEEL, J. (2003). Site-1 protease is required for cartilage development in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 14024-9.
- SCHMITTGEN, T.D. & LIVAK, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, **3**, 1101-8.

- SCHRÖDER, B.A., WROCKLAGE, C., HASILIK, A. & SAFTIG, P. (2010). The proteome of lysosomes. *Proteomics*, **10**, 4053-76.
- SEIDAH, N.G., MOWLA, S.J., HAMELIN, J., MAMARBACHI, A.M., BENJANNET, S., TOURE, B.B., BASAK, A., MUNZER, J.S., MARCINKIEWICZ, J., ZHONG, M., BARALE, J.C., LAZURE, C., MURPHY, R.A., CHRETIEN, M. & MARCINKIEWICZ, M. (1999). Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1321-6.
- SEIDAH, N.G. & PRAT, A. (2007). The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J Mol Med*, **85**, 685-96.
- SHAKIN-ESHLEMAN, S.H., SPITALNIK, S.L. & KASTURI, L. (1996). The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation efficiency. *J Biol Chem*, **271**, 6363-6.
- SILBERSTEIN, S. & GILMORE, R. (1996). Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *Faseb J*, **10**, 849-58.
- SPRANGER, J.W., BRILL, P.W. & POZNANSKI, A.K. (2002). *Bone dysplasias: an atlas of genetic disorders of the skeletal development*. New York: Oxford University Press.
- STEAD, V.C. (1987). The Use of Reactive Dyes in Protein Separation Processes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **37**, 55-71.
- STENBECK, G. (2002). Formation and function of the ruffled border in osteoclasts. *Semin Cell Dev Biol*, **13**, 285-92.
- STINCHCOMBE, J., BOSSI, G. & GRIFFITHS, G.M. (2004). Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes. *Science*, **305**, 55-9.
- TIEDE, S., CANTZ, M., RAAS-ROTHSCHILD, A., MUSCHOL, N., BURGER, F., ULLRICH, K. & BRAULKE, T. (2004). A novel mutation in UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase gamma subunit (GNPTAG) in two siblings with mucopolipidosis type III alters a used glycosylation site. *Hum Mutat*, **24**, 535.
- TIEDE, S., MUSCHOL, N., REUTTER, G., CANTZ, M., ULLRICH, K. & BRAULKE, T. (2005a). Missense mutations in N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase alpha/beta subunit gene in a patient with mucopolipidosis III and a mild clinical phenotype. *Am J Med Genet A*, **137A**, 235-40.
- TIEDE, S., STORCH, S., LUBKE, T., HENRISSAT, B., BARGAL, R., RAAS-ROTHSCHILD, A. & BRAULKE, T. (2005b). Mucopolipidosis II is caused by mutations in GNPTA encoding the alpha/beta GlcNAc-1-phosphotransferase. *Nat Med*, **11**, 1109-12.

- TOURÉ, B.B., MUNZER, J.S., BASAK, A., BENJANNET, S., ROCHEMONT, J., LAZURE, C., CHRETIEN, M. & SEIDAH, N.G. (2000). Biosynthesis and enzymatic characterization of human SKI-1/S1P and the processing of its inhibitory prosegment. *J Biol Chem*, **275**, 2349-58.
- TRIMBLE, R.B. & MALEY, F. (1984). Optimizing hydrolysis of N-linked high-mannose oligosaccharides by endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. *Anal Biochem*, **141**, 515-22.
- TZENG, Y.L., NOBLE, C. & STEPHENS, D.S. (2003). Genetic basis for biosynthesis of the (alpha 1-->4)-linked N-acetyl-D-glucosamine 1-phosphate capsule of *Neisseria meningitidis* serogroup X. *Infect Immun*, **71**, 6712-20.
- VAN MEEL, E. & KLUMPERMAN, J. (2008). Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system. *Histochem Cell Biol*, **129**, 253-66.
- VAN MEER, G. (2005). Cellular lipidomics. *Embo J*, **24**, 3159-65.
- VARDAR, D., NORTH, C.L., SANCHEZ-IRIZARRY, C., ASTER, J.C. & BLACKLOW, S.C. (2003). Nuclear magnetic resonance structure of a prototype Lin12-Notch repeat module from human Notch1. *Biochemistry*, **42**, 7061-7.
- VARKI, A. & KORNFELD, S. (1983). The spectrum of anionic oligosaccharides released by endo-beta-N-acetylglucosaminidase H from glycoproteins. Structural studies and interactions with the phosphomannosyl receptor. *J Biol Chem*, **258**, 2808-18.
- VINCENT, M.J., SANCHEZ, A.J., ERICKSON, B.R., BASAK, A., CHRETIEN, M., SEIDAH, N.G. & NICHOL, S.T. (2003). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein proteolytic processing by subtilase SKI-1. *J Virol*, **77**, 8640-9.
- WALSH, C.T., GARNEAU-TSODIKOVA, S. & GATTO JR., G.J. (2005). Posttranslationale Proteinmodifikation: die Chemie der Proteomdiversifizierung. *Angewandte Chemie*, **117**, 7508-7539.
- WANG, X., SATO, R., BROWN, M.S., HUA, X. & GOLDSTEIN, J.L. (1994). SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell*, **77**, 53-62.
- YANG, J., GOLDSTEIN, J.L., HAMMER, R.E., MOON, Y.A., BROWN, M.S. & HORTON, J.D. (2001). Decreased lipid synthesis in livers of mice with disrupted Site-1 protease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13607-12.
- YE, J., DAVE, U.P., GRISHIN, N.V., GOLDSTEIN, J.L. & BROWN, M.S. (2000a). Asparagine-proline sequence within membrane-spanning segment of SREBP triggers intramembrane cleavage by site-2 protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5123-8.

YE, J., RAWSON, R.B., KOMURO, R., CHEN, X., DAVE, U.P., PRYWES, R., BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. (2000b). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell*, **6**, 1355-64.

ZHANG, K. & KAUFMAN, R.J. (2008). From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, **454**, 455-62.

9 ANHANG

Verwendete Primer

Tabelle 9.1: Primer zur Amplifikation ausgewählter Bereiche von *GNPTAB* für die Antikörpergewinnung. Fett hervorgehoben sind die Schnittstellen für *Bam*HI (GGA TCC) und *Xho*I (CTC GAG), die Ligation erfolgte in den Vektor pGEX 4T-1.

Name	Sequenz 5' → 3'	Länge	T _m
PT400_for	GGA TCC CTG TCC CAQ AAG TTT ATT TAC	27-mer	63,4
PT600_rev	CTC GAG TCA GAG GTG GAT GGT TTT CCA CTT	31-mer	69,5
PT929_for	GGA TCC GAT ACA TTT GCA GAT TCC CTC	27-mer	65,0
PT1209_rev	CTC GAG TCA CTT CAA TTT GTC TCG ATA AGC	30-mer	65,4

Tabelle 9.2: Primer zur Amplifikation von *GNPTAB* mit C-terminalem 6xHis-tag. Die Ligation erfolgte in den Vektor pcDNATM3.1D/V5-His TOPO[®].

Name	Sequenz 5' → 3'	Länge	T _m
PTHis_for	CAC CAT GCT GTT CAA GCT GCA G	22-mer	64,9
PTHis_rev	CT TAC TCT GAT TCG ATT GGG ACT	23-mer	57,4

Tabelle 9.3: Primer zur Amplifikation ausgewählter Bereiche von *GNPTAB* zur Generierung der Konstrukte 2-6 (Vgl. Abbildung 4.15). Die Ligation erfolgte in den Vektor pcDNATM3.1D/V5-His TOPO[®]. (Konstrukt 2: Primer 1, 2, 3 und 4; Konstrukt 3: Primer 1, 2, 5 und 6; Konstrukt 4: Primer 1, 2, 7 und 8; Konstrukt 5: Primer 2 und 9; Konstrukt 6: Primer 1 und 10)

Name	Sequenz 5' → 3'	Länge	T _m
1: P1_430beta	CAC CAT GCT GTT CAA GCT GCA G	22-mer	66,3
2: P4_430beta	CTA TAC TCT GAT TCG ATT GGG	21-mer	55,9
3: P3_430_919-beta	CAG AAG GTT TAT GAT AGC AAA AAT ACT GGG AGG	33-mer	67,3
4: P2_430_919-beta	ATT TTT GCT ATC ATA AAC CTT CTG GCC TTT GGA	33-mer	69,9
5: P3_430-NOS2-beta	CAG AAG GTT TAT ACT CAC ACC CAA AAA ACC ATA	33-mer	64,5
6: P2_430-NOS2-beta	TTG GGT GTG AGT ATA AAC CTT CTG GCC TTT GGA	33-mer	68,2
7: P2_TM-NOS2-beta	TAT AGA GAC AAT ACT CAC ACC CAA AAA ACC ATA	33-mer	64,3
8: P3_TM-NOS2-beta	TTG GGT GTG AGT ATT GTC TCT ATA GGA ATC AAA	33-mer	66,0

9: Pfor_delTM-N	CACC ATG ACT CAC ACC CAA AAA ACC	25-mer	66.2
10: Prev_delTM-C	CTA CTT CAA TTT GTC TCG ATA	21-mer	48.4

Tabelle 9.4: Primer zur Amplifikation ausgewählter Bereiche von *GNPTAB* zur Generierung der Konstrukte 7, 8 und 9 (Vgl. Abbildung 4.16). Die Ligation erfolgte in den Vektor pcDNATM3.1D/V5-His TOPO[®]. (Konstrukt 7: Primer 1, 2, 11 und 12; Konstrukt 8: Primer 1, 2, 13 und 14; Konstrukt 9: Primer 1, 2, 15 und 16)

Name	Sequenz 5' → 3'	Länge	T _m
1: P1_430beta	CAC CAT GCT GTT CAA GCT GCA G	22-mer	66,3
2: P4_430beta	CTA TAC TCT GAT TCG ATT GGG	21-mer	55,9
11: P3_430_849-beta	CAG AAG GTT TAT GAA AAG AAA ATC ACA GGG AAA	33-mer	67.7
12: P2_430_849-beta	GAT TTT CTT TTC ATA AAC CTT CTG GCC TTT GGA	33-mer	69.7
13: P3_430_889-beta	CAG AAG GTT TAT TTG GGC TTT TTG CCA TGG GAG	33-mer	74.4
14: P2_430_889-beta	CAA AAA GCC CAA ATA AAC CTT CTG GCC TTT GGA	33-mer	73.9
15: P3_430_909-beta	CAG AAG GTT TAT TCA TTG AAG ACA CAA TTG GCA	33-mer	69.9
16: P2_430_909-beta	TGT CTT CAA TGA ATA AAC CTT CTG GCC TTT GGA	33-mer	71.7

Tabelle 9.5: Primer für die ortsspezifische Mutagenese der sechs AS vor und nach der Spaltstelle. Fett hervorgehoben sind die Stellen, die mutiert wurden (Austausch zu Alanin oder Glycin).

Name	Sequenz 5' → 3'	Länge	T _m
T923A_s	GAT AGC AAA AAT GCT GGG AGG CAA CTA	27-mer	66.7
T923A_as	TAG TTG CCT CCC AGC ATT TTT GCT ATC	27-mer	66.7
G924A_s	AGC AAA AAT ACT GCG AGG CAA CTA AAA	27-mer	64.7
G924A_as	TTT TAG TTG CCT CGC AGT ATT TTT GCT	27-mer	64.7
R925A_s	AAA AAT ACT GGG GCG CAA CTA AAA GAT	27-mer	64.5
R925A_as	ATC TTT TAG TTG CGC CCC AGT ATT TTT	27-mer	64.5
Q926A_s	AAT ACT GGG AGG GCA CTA AAA GAT ACA	27-mer	62.1
Q926A_as	TGT ATC TTT TAG TGC CCT CCC AGT ATT	27-mer	62.1
L927A_s	ACT GGG AGG CAA GCA AAA GAT ACA TTT	27-mer	65.6
L927A_as	AAA TGT ATC TTT TGC TTG CCT CCC AGT	27-mer	65.6
K928A_s	GGG AGG CAA CTA GCA GAT ACA TTT GCA	27-mer	67.7

K928A_as	TGC AAA TGT ATC TGC TAG TTG CCT CCC	27-mer	67.7
D929A_s	AGG CAA CTA AAA GCT ACA TTT GCA GAT	27-mer	62.4
D929A_as	ATC TGC AAA TGT AGC TTT TAG TTG CCT	27-mer	62.4
T930A_s	CAA CTA AAA GAT GCA TTT GCA GAT TCC	27-mer	63.7
T930A_as	GGA ATC TGC AAA TGC ATC TTT TAG TTG	27-mer	63.7
F931A_s	CTA AAA GAT ACA GCT GCA GAT TCC CTC	27-mer	62.5
F931A_as	GAG GGA ATC TGC AGC TGT ATC TTT TAG	27-mer	62.5
A932G_s	AAA GAT ACA TTT GGA GAT TCC CTC AGA	27-mer	62.2
A932G_as	TCT GAG GGA ATC TCC AAA TGT ATC TTT	27-mer	62.2
D933A_s	GAT ACA TTT GCA GCT TCC CTC AGA TAT	27-mer	62.6
D933A_as	ATA TCT GAG GGA AGC TGC AAA TGT ATC	27-mer	62.6
S934A_s	ACA TTT GCA GAT GCC CTC AGA TAT GTA	27-mer	64.5
S934A_as	TAC ATA TCT GAG GGC ATC TGC AAA TGT	27-mer	64.5

Tabelle 9.6: Primer für die ortsspezifische Mutagenese der N-Glykosylierungsstellen der β -Untereinheit im α/β -Minikonstrukt. Fett hervorgehoben sind die Stellen, die mutiert wurden (Austausch Asparagin \rightarrow Glutamin).

Name	Sequenz 5' \rightarrow 3'	Länge	T _m
N1009Q_s	GTG CAG CCA CTG CAA ATA TCT CAA GTC	27-mer	65,0
N1009Q_as	GAC TTG AGA TAT TTG CAG TGG CTG CAC	27-mer	65,0
N1056Q_s	CAC ATG CTA ATA CAA TGC TCA AAA ATG	27-mer	58,9
N1056Q_as	CAT TTT TGA GCA TTG TAT TAG CAT GTG	27-mer	58,9
N1129Q_s	ATG ATT CGT ACC CAA GTT TCT CAT GTG	27-mer	61,9
N1129Q_as	CAC ATG AGA AAC TTG GGT ACG AAT CAT	27-mer	61,9

Tabelle 9.7: Primer zur Amplifikation ausgewählter Bereiche von *GNPTAB* für die die Generierung der Konstrukte 430-GFP und 430 Δ -GFP. Fett hervorgehoben sind die Schnittstellen für *Bam*HI (GGA TCC) und *Xho*I (CTC GAG), die Ligation erfolgte in den Vektor pEGFP-N1.

Name	Sequenz 5' \rightarrow 3'	Länge	T _m
PT430_P1	GGA TCC TGC TGG AAA GTC CTT TCA GAA	27-mer	65,0
PT430_P2	TTC TTC GTT ATC CTC CAT CTG TTG TCT GAC CTG	33-mer	68,2
PT430_P3	GAA CAG ATG GAG GAT AAC GAA CTG AGG TAC	30-mer	68,2
PT430_P4	CTC GAG TCA ATA AAC CTT CTG GCC TTT GGA	30-mer	66,8

Tabelle 9.8: Primer für die ortsspezifische Mutagenese der N-Glykosylierungsstellen in 430-GFP und 430A-GFP. Fett hervorgehoben sind die Stellen, die mutiert wurden (Austausch Asparagin → Glutamin).

Name	Sequenz 5' → 3'	Länge	T _m
N83Q_s	TAC AAC TGG GTG CAG GGC ACA GAT CTT	27-mer	68,0
N83Q_as	AAG ATC TGT GCC CTG CAC CCA GGT GTA	27-mer	68,0
N114Q_s	ATC CTT GGG AAA CAG ACA ACG GAA CCT	27-mer	65,0
N114Q_as	AGG TTC CGT TGT CTG TTT CCC AAG GAT	27-mer	65,0
N148Q_s	GCC CTG CCA GCC CAG ATC ACC CTG AAG	27-mer	72,6
N148Q_as	CTT CAG GGT GAT CTG GGC TGG CAG GGC	27-mer	72,6
N179Q_s	AAC CCT TCT ACC CAG GTC TCA GTT GTT	27-mer	65,0
N179Q_as	AAC AAC TGA GAC CTG GGT AGA AGG GTT	27-mer	65,0
N250Q_s	AAA TTG CCA GAA CAG CTT TCC TCT AAA	27-mer	60,4
N250Q_as	TTT AGA GGA AAG CTG TTC TGG CAA TTT	27-mer	60,4
N287Q_s	CAA ACT AAG AAG CAG ATG ACC ATT GAT	27-mer	60,4
N287Q_as	ATC AAT GGT CAT CTG CTT CTT AGT TTG	27-mer	60,4
N376Q_s	GAT GTT TTT CGA CAG TTG AGC CAC TTG	27-mer	63,4
N376Q_as	CAA GTG GCT CAA CTG TCG AAA AAC ATC	27-mer	63,4

Tabelle 9.9: Primer für die ortsspezifische Mutagenese des Cysteins C70 zu Serin in 430-GFP und 430A-GFP, Fett hervorgehoben sind die Stellen, die mutiert wurden (Austausch Cystein → Serin).

Name	Sequenz 5' → 3'	Länge	T _m
C70S_1	AAT CGG CTT TCT CTG CCC ATG	21-mer	59,8
C70S_2	CAT GGG CAG AGA AAG CCG ATT	21-mer	59,8

Tabelle 9.10: Verwendete Primer für die Sequenzierung erstellter Konstrukte. Die Zahlen im Namen der Primer geben den Bereich in der cDNA an, an dem die Primer binden. (PT = GlcNAc-1-Phosphotransferase/*GNPTAB*, S1P = Site-1-Protease/*MBTPSI*)

Name	Sequenz 5' → 3'	Länge	T _m
pEGFP-N1	CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G	22-mer	59,0
PTseq_500	CAT TTT CAA TGT TGC AAA ACC	21-mer	52,0
PTseq_800	CGC TTC TAA AAC TGA ATA ACC	21-mer	52,3
PTseq_1000	GAT CTA TCG AGA GGC ATG CAC	21-mer	59,8
PTseq_1500	AGT GTC TCT TAC TGT AAT CAG	21-mer	54,0

PTseq_1600	GAC TGT GGG CAA GAT CAT TTT	21-mer	57,6
PTseq_2000	GGA TAT TCC CAA AGA AAA ACG	21-mer	54,0
PTseq_2400	TGA CCA GGG TCA GAA TCC ACC	21-mer	63,0
PTseq_2500	AGC CCC CAT CTC TGA TTG TTC	21-mer	59,8
PTseq_3000	CTC ATG AGT GCA GTG CAG CCA	21-mer	61,8
PTseq_3500	TCT CAG GGA CTT CTA TGA ATC	21-mer	55,9
S1P_800seq	CCA GAT GCA GAA CTT CAC ATT	21-mer	56,3
S1P_1600seq	TGG CAG CCC TAT TTG CCA CAG	21-mer	66,1
S1P_2400seq	GTC GTG ATA ACA CAG ACT TTC	21-mer	50,7
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	20-mer	51,7

Liste verwendeter gefährlicher Chemikalien

Substanz	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Aceton	F, Xi	11-36-66-67	(2)-9-16-26-46
Acrylamid	T	45-46-20/21-25-36/38-43-48/23/24/25-62	53-45
Ammoniumperoxo- disulfat	O, Xn	8-22-36/37/38-42/43	(2)-22-24-26-37
Amphotericin B	Xn	20/22-37/38-41	3/7-22-24/25-36/37/39-49-56
BFA	Xn	22	-
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
DEPC	Xn	22-36/37/38	26-36
DTT	Xn	22-36/38	-
EDTA	Xi	36	(2)-26
Ethanol	F	11	7-16
Ethidiumbromid	T ⁺	22-26-68	(1/2)-28-36/37-45-63
Isopropanol	F, Xi	11-36-67	(2)-7-16-24/25-26
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
Natriumcyano- borhydrid	F, T ⁺ , N	15-26/27/28-32-34-50/53	26-28-36/37/39-43-45-61
Natriumdeoxycholat	Xn	22	-
Natriumhydroxid	C	35	(1/2)-26-37/39-45
NP-40	Xn	22-41	24-26-39
Paraformaldehyd	Xn	20/22-36/37/38-40-43	22-26-36/37
Pefabloc	Xn	20/21/22	24/25-37/39
Phenol-Lösung	T, C	23/24/25-34-48/20/21/22-68	(1/2)-24/25-26-28-36/37/39-45
Salzsäure	C	34-37	(1/2)-26-45
SDS	F, Xn	11-21/22-36/37/38	26-36/37
H ₂ O ₂ , 30 %	C	34	3-26-36/37/39-45

Gefahrensymbole

F	leichtentzündlich
T	giftig
T ⁺	sehr giftig
Xn	gesundheitsschädlich
Xi	reizend
C	ätzend
O	brandfördernd
N	umweltgefährlich

Hinweise auf besondere Gefahren (R-Sätze)

- R 8 Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen.
- R 11 Leichtentzündlich.
- R 15 Reagiert mit Wasser unter Bildung leicht entzündlicher Gase.
- R 22 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
- R 25 Giftig beim Verschlucken.
- R 26 Sehr giftig beim Einatmen.
- R 32 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
- R 34 Verursacht Verätzungen.
- R 35 Verursacht schwere Verätzungen.
- R 36 Reizt die Augen.
- R 37 Reizt die Atmungsorgane.
- R 38 Reizt die Haut.
- R 40 Verdacht auf krebserzeugende Wirkung.
- R 41 Gefahr ernster Augenschäden.
- R 43 Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.
- R 45 Kann Krebs erzeugen.
- R 46 Kann vererbare Schäden verursachen.
- R 62 Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen.
- R 66 Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.
- R 67 Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
- R 68 Irreversibler Schaden möglich.

Kombination der R-Sätze

- R 20/21 Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R 20/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken.
- R 20/21/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
- R 21/22 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.
- R 23/24/25 Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
- R 26/27/28 Sehr giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
- R 36/38 Reizt die Augen und die Haut.
- R 37/38 Reizt die Atmungsorgane und die Haut.
- R 36/37/38 Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut.
- R 39/23/24/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
- R 42/43 Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich.
- R 48/20/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken.
- R 48/20/21/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
- R 48/23/24/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
- R 50/53 Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.

Sicherheitsratschläge (S-Sätze)

- S 2 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
- S 7 Behälter dicht verschlossen halten.
- S 9 Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren.
- S 16 Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen.
- S 22 Staub nicht einatmen.
- S 24 Berührung mit der Haut vermeiden.
- S 26 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
- S 28 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel ... (vom Hersteller anzugeben).
- S 36 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

- S 37 Geeignete Schutzhandschuhe tragen.
- S 39 Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- S 43 Zum Löschen ... verwenden. (vom Hersteller anzugeben)(wenn Wasser die Gefahr erhöht, anfügen: Kein Wasser verwenden)
- S 45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).
- S 46 Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.
- S 49 Nur im Originalbehälter aufbewahren.
- S 51 Nur in gut gelüfteten Bereichen verwenden.
- S 53 Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. – Nur für den berufsmäßigen Verwender –.
- S 56 Dieses Produkt und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.
- S 61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/
Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.
- S 63 Bei Unfall durch Einatmen: Verunfallten an die frische Luft bringen und ruhigstellen.

Kombination der S-Sätze

- S 1/2 Unter Verschluss aufbewahren.
- S 3/7 Behälter dicht geschlossen halten und an einem kühlen Ort aufbewahren.
- S 24/25 Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden.
- S 36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.
- S 36/37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- S 37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.

PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE

Artikel

K. Marschner, K. Kollmann, M. Schweizer, T. Braulke, S. Pohl (2011) A key enzyme in the biogenesis of lysosomes is a protease that regulates cholesterol metabolism. *Science* **333**, 87-90.

S. Pohl, S. Tiede, **K. Marschner**, M. Encarnaçã, M. Castrichini, K. Kollmann, N. Muschol, K. Ullrich, S. Müller-Loennies, T. Braulke (2010) Proteolytic processing of the γ -subunit is associated with the failure to form GlcNAc-1-phosphotransferase complexes and mannose 6-phosphate residues on lysosomal enzymes in human macrophages. *J Biol Chem.* **285**, 23936-23944.

K. Kollmann, S. Pohl, **K. Marschner**, M. Encarnaçã, I. Sakwa, S. Tiede, B.J. Poorthuis, T. Lübke, S. Müller-Loennies, S. Storch, T. Braulke (2009) Mannose phosphorylation in health and disease. *Eur J Cell Biol.* **89**, 117-123.

S. Pohl, **K. Marschner**, S. Storch, T. Braulke (2009) Glycosylation- and phosphorylation-dependent intracellular transport of lysosomal hydrolases. *Biol Chem.* **390**, 521–527.

Abstracts

K. Marschner, S. Pohl, T. Braulke (2009) Molecular analysis of modular domains of α -subunit of the GlcNAc-1-phosphotransferase, *Eur J Cell Biol.* **88S1**, 16.

S. Pohl, **K. Marschner**, S. Storch, T. Braulke (2007) Molecular analysis of the GlcNAc-1-phosphotransferase, *Eur J Cell Biol.* **87S1**, 39.

Vorträge

“Proteolytic cleavage of the GlcNAc-1-phosphotransferase regulates M6P-dependent transport of lysosomal enzymes”, Vortragsveranstaltung des SFB877 in Kiel (2011)

“Molecular and functional analysis of the GlcNAc-1-phosphotransferase α/β -subunit precursor”, Meeting des Graduiertenkollegs 1459 in Bad Bederkesa (2009)

“Molecular and functional analysis of the α/β -subunit of the GlcNAc-1-phosphotransferase”, Lysosom-Meeting der Universitäten Hamburg und Kiel in Westerland (2008)

“Molecular and functional analysis of the α/β -subunit precursor of the GlcNAc-1-phosphotransferase: *N*-glycosylation & dimerization”, Vortragsveranstaltung des SFB470 in Hamburg (2008)

Poster

K. Marschner, T. Braulke, S. Pohl (2010) Structural and functional characterization of the α/β -subunits of the GlcNAc-1-phosphotransferase, Symposium “Protein Trafficking in Health and Disease” in Hamburg

M. Encarnação, **K. Marschner**, K. Kollmann, A. Strowald, J. Pestka, A. Thielebein, S. Storch, M. Amling, T. Braulke, S. Pohl (2009): Molecular and functional analysis of the GlcNAc-1-phosphotransferase, UKE-Forschertag in Hamburg

K. Marschner, T. Braulke, S. Pohl (2009) Characterization of the modular structure of the GlcNAc-1-phosphotransferase α -subunit, 17te ESGLD-Tagung in Bad Honnef

K. Marschner, S. Storch, T. Braulke, and S. Pohl (2009) Molecular analysis of modular domains of the α -subunit of the GlcNAc-1-phosphotransferase, Abschluss-symposium des SRB470 in Hamburg

K. Marschner, S. Pohl, T. Braulke (2009) Molecular analysis of modular domains of α -subunit of the GlcNAc-1-phosphotransferase, 32. Jahrestagung der DGZ in Konstanz

K. Marschner, M. Encarnação, I. Sakwa, M. Castrichini, K. Kollmann, S. Storch, T. Braulke, S. Pohl (2008) Molecular and functional analysis of the GlcNAc-1-phosphotransferase, UKE-Forschertag in Hamburg

DANKSAGUNG

Prof. Dr. Thomas Braulke und Dr. Sandra Pohl möchte ich für die Bereitstellung des Themas, die hervorragende Betreuung, viele anregende Diskussionen und die kritische Durchsicht meiner Arbeit danken.

Prof. Dr. Ulrich Hahn danke ich für die Begutachtung der Arbeit.

Dem Graduiertenkolleg 1459, dem SFB 877 und dem SFB 470 und deren Mitgliedern danke ich für die finanzielle Unterstützung und besonders für die vielen Möglichkeiten der geistigen Weiterbildung.

Für die Bereitstellung der CHO-7 und SRD-12B-Zellen danke ich Prof. Dr. Joseph L. Goldstein (Texas, USA). Für die Herstellung von humanem LDL und lipoproteinfreiem Serum danke ich der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Heeren (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, UKE).

Dr. Katrin Kollmann danke ich für die Bereitstellung von Wildtyp- und ML II-Mausfibroblasten sowie Daten zur ML II-Maus.

Ganz besonders möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Biochemie/ Molekularbiologie der Kinderklinik für ihre Hilfsbereitschaft, die ermunternden Worte, das gute Laborklima und viel Spaß während und auch mal nach der Arbeit bedanken, besonders bei Anne-Hélène, Annika, Inke, Johannes, Jessica, Melanie und der „Phosphotransferase-Gruppe“: Bastian, Georgia, Katrin, Lisa, Marisa, Mine, Sandra M. und Sandra P.

Zum Schluss gilt mein herzlichster Dank meinen Eltern, die mich immer bei allen Entscheidungen unterstützt haben.