UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Sektion Biochemie Direktor: Prof. Dr. med. Kurt Ullrich

Proteolytische Fragmentierung der γ-Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase in humanen Makrophagen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

> vorgelegt von: Luce Laverne Darnell aus Kamerun

> > Hamburg 2014

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 03.12.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. ren. Thomas Braulke

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Med. Friedrich Nolte

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:

"Der Herr ist mein Hirte; mir wird nichts mangeln. Er weidet mich auf grüner Aue und führet mich zum frischen Wasser. Er erquicket meine Seele; er führet mich auf rechter Straße um seines Willen."

Psalm 23, 1-3

Dir großer Gott widme ich diese Arbeit. Dir gebührt alle Herrlichkeit, Kraft und Lobpreis in Ewigkeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3		
1.1	Lysosomen und lysosomale Speichererkrankungen			
1.2	Biosynthese und Mannose-6-Phosphat-Modifikation von lysosomalen	3		
	Enzymen			
1.3	Mannose-6-Phosphat-abhängiger Transport lysosomaler Enzyme	5		
1.4	Die GlcNAc-1-phosphotransferase			
1.5	Makrophagen 8			
1.5.1	Das mononukleäre Phagocytose-System	8		
1.5.2	Mannose-6-Phosphat-unabhängiger Transport lysosomaler Enzyme	10		
	in Makrophagen			
1.6	Zielstellung	10		
2	Material und Methoden	11		
2.1	Material	11		
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	11		
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	12		
2.1.3	Zellkulturmedien und Zusätze	14		
2.1.4	Expressionsvektoren	14		
2.1.5	Puffer und Lösungen 1			
2.2	Zellbiologische Methoden 1			
2.2.1	Kultivieren von eukaryotischen Zellen 1			
2.2.2	Passagieren und Aussäen von Zellen 1			
2.2.3	Kryokonservierung von Zellen 1			
2.2.4	Auftauen von Zellen 1			
2.2.5	Isolierung von Makrophagen aus Buffy-Coats	17		
2.2.6	Transiente Transfektion von Zellen	18		
2.2.6.1	Transfektion mit PromoFectin	18		
2.2.6.2	Transfektion mit LipoGen [™]	18		
2.2.6.3	Transfektion mit Lipofectamine [™] 2000	18		
2.2.6.4	Transfektion mit Lipofectamine [™] LTX & PLUS	19		
2.2.6.5	Transfektion mit JetPEI®	19		
2.2.7	Transfektion von siRNA in Makrophagen	19		
2.2.8	Inhibitor-Behandlung von Zellen	20		
2.2.9	Lentivirale Transduktion von Zellen 20			
2.2.9.1	Produktion lentiviraler Virusüberstände	20		
2.2.9.2	Qualität der lentiviralen Virusüberstände	22		
2.2.9.3	Virale Transduktion von Zellen	22		
2.3	Proteinchemische Methoden	23		
2.3.1	Herstellung von Zellextrakten	23		

2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellextrakten	23
2.3.3	SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)	23
2.3.4	Westernblot-Analysen	24
2.4	Molekularbiologische Methoden	26
2.4.1	RNA-Isolierung aus Zellen	26
2.4.2	Bestimmung der Konzentration von RNA-Lösungen	26
2.4.3	Synthese von cDNA	26
2.4.4	Quantitative Realtime-PCR	27
2.4.5	Statistische Auswertung der Messdaten	29

3	Ergebnisse	30		
3.1	Expression der γ-Untereinheit in humanen Makrophagen	30		
3.2	Transfektion und Transduktion von Makrophagen			
3.2.1	Transfektion von GFP in Makrophagen			
3.2.2	Expression des γ-GFP-Fusionsproteins in Makrophagen	33		
3.2.3	Lentivirale Transduktion von Makrophagen	34		
3.2.3.1	3.1 Produktion lentiviraler Virusüberstände in HEK-Zellen			
3.2.3.2	Virale GFP-Transduktion von Makrophagen 3			
3.2.3.3	Transduktion von γ -Untereinheit-GFP in Makrophagen	38		
3.3	Identifizierung von Protease-Kandidaten aus der PCSK-Familie	42		
3.3.1	Expression von Proteasen der PCSK-Familie in Makrophagen	42		
3.3.2	Pharmakologische Inhibierung von Furin (PCSK3) in Makrophagen	45		
3.3.3	Depletion von PCSK3, PCSK7 und PCSK8 in Makrophagen mittels	47		
	siRNA			
4	Distance	5 1		

4	Diskussion	51
4.1	Lentivirale Transduktion von primären Makrophagen	51
4.2	Spaltung der γ-Untereinheit durch Proteasen der PCSK-Familie	53
4.3	Ausblick	60
5	Zusammenfassung	62
6	Literaturverzeichnis	63
7	Abkürzungsverzeichnis	69
8	Kongressbeiträge	72
9	Danksagung	73
10	Lebenslauf	74
11	Eidesstattliche Erklärung	75

1 Einleitung

1.1 Lysosomen und lysosomale Speichererkrankungen

Lysosomen sind membranumschlossene Organellen in Eukaryonten und stellen ein wichtiges Recycling-System der Zelle dar. In den Lysosomen werden zelleigene Makromoleküle wie z. B. Proteine, Fettsäuren, Kohlenhydrate und Nukleinsäuren durch lysosomale Enzyme verdaut (de Duve, 1983). Außerdem können durch Endocytose aufgenommene Nährstoffe, wie z. B. LDL (*low density lipoprotein*), oder Mikroorganismen zu den Lysosomen transportiert und abgebaut werden. Bisher sind ca. 60 lysosomale Enzyme, darunter Nukleasen, Lipasen, Proteinasen, Phosphatasen, Sulfatasen oder Glykosidasen, bekannt (Schröder *et al*, 2010). Die Enzyme haben eine optimale Wirkung im sauren Milieu (pH < 5) und werden daher auch als saure Hydrolasen bezeichnet. Die Erhaltung des sauren pH-Wertes wird durch membranständige, vesikuläre ATP-abhängige Protonenpumpen gewährleistet (Cuppoletti *et al*, 1987). Die abgebauten Produkte werden anschließend über verschiedene lysosomale Membranproteine zurück ins Cytosol transportiert und stehen der Zelle zum Aufbau neuer Makromoleküle zur Verfügung.

Beim Ausfall eines oder mehrerer dieser Enzyme kommt es zu einer lysosomalen Speicherung von nicht abgebauten Makromolekülen und nachfolgend zu einer lysosomalen Speichererkrankung (Klein & Futerman, 2013). Das klinische Erscheinungsbild der lysosomalen Speichererkrankungen ist sehr heterogen, weil es sowohl von der Art, als auch von der Verteilung und der Menge des Speichermaterials abhängig ist (Ballabio & Gieselmann, 2009).

1.2 Biosynthese und Mannose-6-Phosphat-Modifikation von lysosomalen

Enzymen

Damit die Funktion der Lysosomen aufrecht erhalten werden kann, müssen lysosomale Proteine stets neu synthetisiert und zum Lysosom transportiert werden. Die Biosynthese löslicher, lysosomaler Enzyme erfolgt wie bei sekretorischen Proteinen über Vorläuferproteine an freien Ribosomen im Cytosol. Die entstehenden Polypeptidketten enthalten hydrophobe N-terminale Signalsequenzen, die von Signalerkennungspartikeln erkannt werden und eine Translokation ins Lumen des endoplasmatischen Reticulums (ER) initieren (Rapoport, 2008). Im ER beginnt die ko-translationale Modifikation der entstehenden Polypeptide. Das Signalpeptid wird abgespalten und Oligosaccharide können *N*-glykosidisch an Asparaginreste der Erkennungssequenz Asn-X-Ser/Thr (X: alle Aminosäuren außer Prolin) gebunden werden (Yan & Lennarz, 1999). Bevor die Proteine das ER verlassen, werden die endständigen Glukosereste durch die ER-Glukosidasen I und II, und ein Mannoserest durch die α -Mannosidase I abgespalten (Helenius & Aebi, 2004). Wenn die neu entstehenden Proteine Chaperon-vermittelt korrekt gefaltet sind, werden sie vesikulär zum Golgi-Apparat transportiert (Braulke & Bonifacino, 2009).

Im Golgi-Apparat werden die *N*-Glykane zu Mannose-reichen oder komplexen Oligosacchariden prozessiert. Um den Transport der synthetisierten lysosomalen Enzyme vom Golgi-Apparat zu den Lysosomen zu gewährleisten, müssen diese mit einem Mannose-6-Phosphat (M6P)-Rest markiert werden. Die M6P-Reste gelten als "Passierschein" für die meisten lysosomalen Hydrolasen (Pohl *et al*, 2009a). Dazu überträgt im *cis*-Golgi-Apparat zunächst die UDP-*N*-Acetylglucosamin-1-Phosphotransferase (GlcNAc-1-Phosphotransferase) ein GlcNAc-1-Phosphat auf die C6-Hydroxyl-Gruppe von bestimmten Mannose-Resten lysosomaler Enzyme. In einer zweiten Reaktion im *trans*-Golgi-Apparat (TGN) spaltet die GlcNAc-1phosphodiesterase den GlcNAc-Rest ab und legt den M6P-Rest frei (Kollmann *et al*, 2010; Abb. 1).



Abb. 1: Schematische Darstellung zur Synthese des M6P-Erkennungsmarkers an Mannose-Resten lysosomaler Enzyme. Ein GlcNAc-1-Phosphat-Rest wird ausgehend von UDP-GlcNAc durch die GlcNAc-1-Phosphotransferase auf Mannose-Reste an Oligosacchariden von löslichen lysosomalen Enzymen unter Ausbildung eines Phosphodiesters übertragen. In einem zweiten Schritt entfernt die GlcNAc-1-Phosphodiesterase den GlcNAc-Rest und der M6P-Erkennungsmarker wird exponiert (modifiziert nach Alberts *et al* (2003): Molecular Biology of the Cell).

1.3 Mannose-6-Phosphat-abhängiger Transport lysosomaler Enzyme

Im TGN werden die lysosomalen Vorläuferproteine von M6P-Rezeptoren gebunden, in Clathrin-umhüllte Vesikel verpackt und zum Endosom transportiert (Ghosh et al, 2003). Die Vesikel verschmelzen mit der Membran der frühen oder späten Endosomen, wo der saure pH-Wert zur Dissoziation der Enzyme von den Rezeptoren führt (Abb. 2). Die M6P-Rezeptoren werden anschließend zurück zum TGN transportiert, wo sie für neue Transportrunden zur Verfügung stehen (Braulke & Bonifacino, 2009). Während des Transportes der Vorläuferproteine zum endosomalen/lysosomalen Kompartiment werden viele lysosomale Hydrolasen durch limitierte Proteolyse aktiviert und dephosphoryliert (Hasilik & Neufeld, 1980; Makrypidi et al, 2012). Ein kleiner Anteil neu synthetisierter lysosomaler Enzyme wird nicht von M6P-Rezeptoren im TGN gebunden und sezerniert. Diese Enzyme können allerdings durch M6P-Rezeptoren, die an der Plasmamembran lokalisiert sind, gebunden und durch Endocytose über späte Endosomen zu den Lysosomen transportiert werden (Braulke & Bonifacino, 2009).



Abb. 2: Schematische Darstellung zur Sortierung und M6P-abhängigen Transport lysosomaler Enzyme. Neu synthetisierte lösliche lysosomale Enzyme erhalten im *cis*-Golgi-Apparat M6P-Reste, die durch M6P-Rezeptoren im TGN erkannt werden. Über vesikulären Transport gelangen die Enzym-Rezeptor-Komplexe zu frühen Endosomen, dissoziieren aufgrund des niedrigen pH-Wertes von den Rezeptoren und werden von dort weiter zu den Lysosomen transportiert. Rezeptoren an der Plasmamembran können ebenfalls sezernierte M6P-haltige Proteine binden und zu den Endosomen befördern.

1.4 Die GlcNAc-1-Phosphotransferase

Der GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplex konnte erstmals aus laktierendem Milchdrüsengewebe von Rindern isoliert werden. Der 540 kDa hexamere Enzymkomplex besteht aus zwei α -Untereinheiten, zwei β -Untereinheiten und zwei γ -Untereinheiten, wobei die α - und γ -Untereinheiten durch Disulfidbrücken verbundene Homodimere darstellen (Bao *et al*, 1996).

Das humane α/β-Vorläuferprotein wird durch das *GNPTAB*-Gen kodiert, das aus 21 Exons besteht und auf dem Chromosom 12q23.3 lokalisiert ist (Tiede *et al*, 2005). Das α/β-Vorläuferprotein wird als *N*-glykosyliertes Typ III-Membranprotein synthetisiert. Die 36 kDa γ-Untereinheit wird von dem *GNPTG*-Gen auf Chromosom 16p13.3 kodiert und enthält 11 Exons (Raas-Rothschild *et al*, 2000). Nach Assemblierung der Untereinheiten der GlcNAc-1-Phosphotransferase wird der enzymatisch inaktive Komplex vesikulär vom ER zum Golgi-Apparat transportiert (Encarnação *et al*, 2011; Franke *et al*, 2013; Abb. 3). Dort wird das α/β-Vorstufenprotein zwischen den Aminosäuren Lys⁹²⁸ und Asp⁹²⁹ durch die Site-1-Protease (S1P) in die katalytisch aktiven 145 kDa α- und 45 kDa β-Untereinheiten gespalten (Marschner *et al*, 2011). Während die α- und β-Untereinheiten auch die Bindungsstellen für das Substrat UDP-GlcNAc und für die lysosomalen Enzyme enthalten (Kudo *et al*, 2005), ist die Funktion der *N*-glykosylierten, löslichen γ-Untereinheit bis heute unklar.



Abb. 3: Schematische Darstellung zur proteolytischen Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase. Die hexamere ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) GlcNAc-1-Phosphotransferase wird als inaktiver Komplex zum *cis*-Golgi-Apparat transportiert. Dort findet die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins zwischen den Aminosäuren Lys⁹²⁸ und Asp⁹²⁹ zu den reifen α - und β -Untereinheiten durch die Site-1-Protease (S1P) statt.

Es wird vermutet, daß die γ -Untereinheiten wichtig für die Stabilität des GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplexes sind (Pohl *et al*, 2009b). Außerdem wurde gezeigt, dass die γ -Untereinheiten für die effiziente M6P-Modifikation bestimmter lysosomaler Enzyme notwendig sind (Qian *et al*, 2010). Die *N*-Glykosylierung der γ -Untereinheiten an den Resten Asn⁸⁸ und Asn¹¹⁵ ist essentiell für die Faltung, Stabilität und den Transport vom ER zum Golgi-Apparat, während die kovalente Dimersierung über den Rest Cys²⁴⁵ wichtig für die Bindung der γ -Untereinheit an den Enzymkomplex ist (Encarnação *et al*, 2011).

Mutationen in den GNPTAB- oder GNPTG-Genen führen zu den lysosomalen Speichererkrankungen Mucolipidose (ML) Typ II bzw. III. In den Zellen dieser Patienten ist die Synthese von M6P-Resten an lysosomalen Enzymen und deren Transport zu den Lysosomen gestört (Review: Braulke et al, 2013). Die lysosomalen Enzyme werden verstärkt sezerniert und stehen der Zelle nicht mehr zur Verfügung. Zahlreiche lysosomale Abbauvorgänge können daher nicht stattfinden und resultieren in einer Akkumulation von nicht-degradierten Makromolekülen, die als phasendichte Einschlusskörperchen (inclusion bodies) lichtmikroskopisch erkennbar, was zur Bezeichnung I-cell disease für MLII führte (Leroy & DeMars, 1967). Das klinische Bild der Erkrankungen ist sehr variabel. Bei dem schweren Verlauf der Erkrankung MLII liegen Mutationen im GNPTAB-Gen vor, Mutationen im GNPTG-Gen führen zum milderen Krankheitsverlauf MLIII. MLII ist gekennzeichnet durch eine frühe Manifestation der Symptome und einen schweren klinischen Verlauf. Typisch für die Erkrankung Dysmorphien, sind faziale progrediente psychomotorische Retardierung und eine ausgeprägte Dysostosis multiplex. Zunehmende kardio-respiratorische Komplikationen führen bereits im ersten Lebensjahrzehnt zum Tod. Die Diagnosestellung bei MLIII ist häufig verzögert, da die Erkrankung weniger schwerwiegend verläuft und die Symptome später auftreten. Die Lebenserwartung bei MLIII ist erheblich höher als bei MLII (Review: Braulke et al, 2013). Bis heute gibt es keine Therapien der Erkrankungen, die Behandlung der Patienten erfolgt symptomatisch.

1.5 Makrophagen

1.5.1 Das mononukleäre Phagocytose-System

Mit den im Blut zirkulierenden Monocyten werden Makrophagen zum sogenannten mononukleären Phagocytose-System zusammengefaßt (van Furth & Cohn, 1968; Robbins & Swirski, 2010). Makrophagen zählen zu den Zellen des Immunsystems. Sie entstehen aus Monocyten und werden im Knochenmark gebildet. Von dort gelangen sie für 1-2 Tage in dem Blutkreislauf, bevor sie in verschiedene Gewebe und Organe des Körpers emigrieren und dort zu Gewebe-spezifischen Makrophagen differenzieren (Abb. 4). Mit der Adhärenz der fluiden Monocyten an das Epithel der Blutgefäße beginnt die Differenzierung zu Makrophagen. Dabei stellt die Adhärenz allein einen Stimulus dar und kann für die *in-vitro*-Kultivierung von Makrophagen genutzt werden (Liu et al, 2008). Die Differenzierung von Monocyten zu Makrophagen ist morphologisch durch eine Zunahme des Cytoplasmas im Verhältnis zum Nukleoplasma gekennzeichnet. Zudem induziert die einsetzende Differenzierung eine Änderung der Genexpression. In-vitro gelten Makrophagen als vollständig differenziert, wenn sie für etwa sieben Tage in Kultur gehalten wurden (Martinez et al, 2006).



Abb. 4: Schematische Darstellung zur Differenzierung von Pro-Monocyten in verschiedene Zellen des mononukleären Phagozytose-Systems. Hämatopoetische Stammzellen wandern aus dem Knochenmark ins Blut aus und differenzieren zu Monocyten. Diese Monocyten adhärieren an das Blutgefäß-Epithel, emigrieren in das jeweilige Gewebe und differenzieren zu Gewebe-spezifischen Makrophagen (modifiziert nach Gordon, 2003).

Eine wichtige Funktion der Makrophagen ist die Antigenpräsentation. Die Makrophagen prozessieren phagozytierte Proteine zu Peptidfragmenten von 15-18 Aminosäuren, die anschließend mit Hilfe von *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-II-Molekülen an die Plasmamembran transportiert werden. Die präsentierten Antigene werden durch T-Helferzellen erkannt, die daraufhin die Produktion spezifischer Antikörper in Plasmazellen auslöst (Germain, 1995; Geissmann *et al*, 2003). Die wichtigste Aufgabe von Makrophagen ist jedoch die Phagozytose von Mikroorganismen sowie geschädigten und abgestorbenen körpereigenen Zellen im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr. Makrophagen enthalten eine große Anzahl von Lysosomen mit zum Teil Zelltyp-spezifischen sauren Hydrolasen (wie z. B. Granzym A und B, Cathepsin S), die den phagocytierten Erreger verdauen können. Dieser Vorgang führt zur Aktivierung der Makrophagen und zur Sekretion von Cytokinen, die die Entzündungsreaktion steuern (Stafford *et al*, 2002).

1.5.2 M6P-unabhängiger Transport lysosomaler Enzyme in Makrophagen

Die Expression der GlcNAc-1-Phosphotransferase ist in humanen Makrophagen sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene gegenüber anderen humanen Zelllinien deutlich erhöht (Pohl *et al*, 2010). Dies scheint zunächst sinnvoll, da Makrophagen eine erhöhte Menge von lysosomalen Enzymen synthetisieren, um ihre Funktion ausüben zu können. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Menge an M6Phaltigen Proteinen in Makrophagen im Vergleich zu anderen Zellinien, wie z. B. Fibroblasten, signifikant erniedrigt ist (Pohl *et al*, 2010).

Anstelle der 36 kDa γ -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase sind in humanen Makrophagen drei verschiedene immunoreaktive Fragmente von 23 kDa, 24 kDa und 28 kDa nachweisbar. Diese Fragmente der γ -Untereinheit sind nicht in der Lage, an den α - oder β -Untereinheiten der GlcNAc-1-Phosphotransferase zu binden, um den heterohexameren Komplex zu bilden (Pohl *et al*, 2010). Trotzdem werden die Spaltprodukte nicht sezerniert oder sind in Lysosomen nachweisbar, sondern sind weiterhin im *cis*-Golgi-Apparat lokalisiert. Es ist daher davon auszugehen, daß es im Golgi-Apparat eine Protease gibt, die diese Fragmente der γ -Untereinheit generiert. Es ist denkbar, daß die einzelnen Fragmente der γ -Untereinheit die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase hemmen und die lysosomalen Enzyme in Makrophagen M6P-unabhängig zum Lysosom transportiert werden.

1.6 Zielstellung

Die GlcNAc-1-Phosphotransferase ist ein hexamerer Enzymkomplex ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$), der essentiell für die Generierung von M6P-Resten an neu synthetisierten lysosomalen Enzymen ist. M6P-Reste sind in vielen Zellen für den Rezeptor-abhängigen Transport lysosomaler Enzyme zum Lysosom essentiell. Eine Zelltyp-spezifische Modifikation der γ -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase wurde in humanen Makrophagen beobachtet. Die proteolytsiche Spaltung der γ -Untereinheit zu stabilen Fragmenten ist für die reduzierte Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase in Makrophagen verantwortlich. Offensichtlich existieren in Makrophagen M6P-unabhängige Transportmechanismen, die die Fehlsortierung von neusynthetisierten lysosomalen Enzymen kompensieren können.

Um die regulatorischen Mechanismen der Fragmentierung der γ -Untereinheit zu verstehen, sollen im ersten Teil dieser Arbeit die Spaltstellen in der γ -Untereinheit identifiziert werden. Um ausreichende Mengen der Fragmente zu erhalten, soll die γ -Untereinheit als C-terminales GFP (*green fluorescent protein*)-Fusionsprotein in Makrophagen lentiviral überexprimiert werden. Das dafür benötigte Expressionssystem zur Transduktion von primären Makrophagen soll zunächst etabliert werden. Anschließend sollen die gespaltenen C-terminalen Fragmente aufgereinigt werden, um sie einer massenspektrometrischen Analyse unterziehen zu können.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollen Kandidaten von Golgi-residenten Proteasen durch *in-silico*-Analyse der Aminosäuresequenz der γ -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase eingegrenzt werden. Anschließend sollen vergleichende mRNA-Expressionsanalysen der Kandidaten-Proteasen und Inhibierungsstudien auf mRNAund Proteinebene durchgeführt werden, um die Protease der γ -Untereinheit zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und deren Herkunft sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 1: Geräte

Gerät	Firma
Absaugpumpe Miniport	SMT
Biophotometer	Eppendorf
CO ₂ -Inkubator	New Brunswick Scientific
Eismaschine AF 10	Scotsman Ice Systems
Elektrophorese-Spannungsgerät	Biometra
Elektrophoresekammer SE600	Hoefer
Imager "ChemiDoc TM XRS"	Bio-Rad
Heizblock	HLC, Kleinfeld Labortechnik
Konfokales Fluoreszenzmikroskop "SP2"	Leica
Lichtmikroskop, Axiovert 25	Zeiss
Magnetrührer MSH-basic	IKA-Werke
PCR-Gerät, Realtime Mx3000P TM	Stratagene
pH-Meter FE20	Mettler Toledo
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfe Pipetus [®]	Hirschmann Laborgeräte
Sterilbank Herasafe	Heraeus
Stickstofftank	Air Liquide
Transferkammer TE62	Hoefer
Vortex Mixer	Neolab
Waage AC100 (Feinwaage)	Mettler
Waage TE2101	Sartorius
Wasserbad C 10	Schütt Labortechnik
Wippschüttler Rocky	GFL
Zentrifuge 5702 R, 5415R, 5424	Eppendorf

Zentriguge MC 6	Sarstedt
Zentrifuge Minifuge RF	Heraeus

Neben den laborüblichen Kunststoff- und Glasgefäßen wurden die folgenden Verbrauchsmaterialien benutzt.

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma
Einwegmaterialien für Zellkultur	Falcon, Sarstedt, Nunc
Filterschwämme	Amersham
Einweg-Küvetten	Brand
Gel-Glasplatten	Amersham
Kanülen	Dickensen
Kryo-Einfrierbox	Nalgene
Kryo-Röhrchen	Sarstedt
LeucoSep [®] -Röhrchen	Greiner
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schüll
Pipettenspitzen	Sarstedt, Eppendorf
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Sarstedt, Greiner
Skalpelle und Spritzen	Braun
Sterilfilter	VWR
Stripes und Deckel für Realtime-PCR	Applied Biosystems
Teflonkämme	Hoefer
UV-Küvetten,	Eppendorf
Whatman-Papier	Whatman

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Neben den in Tab. 3 gelisteten Chemikalien wurden alle weiteren gängigen Laborchemikalien und Lösungsmittel von den Firmen Sigma-Aldrich, Roth, Merck und Fluka bezogen.

T 1	2	~	
Tab.	3:	Chemikalier	1
	•••	0.110111111111111111	•

Chemikalie	Firma
Acrylamid	Roth
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	Thermo Scientific
Bradford-Reagenz Roti-Quant [®]	Roth
Chloroquin	Sigma-Aldrich
DAPI	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
FullRange Rainbow TM	GE Healthcare
Glycerin	Merck
Glycin	Roth
JetPEI	Polyplus
Lipofectamine TM 2000	Invitrogen
Lipofectamine TM LTX PLUS	Invitrogen
Lipogen	Invivogen
Milchpulver	Roth
Mowiol (Polyvinylalkohol)	Roth
N,N,N´,N´,-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich
Nonidet P-40 (NP-40)	Roche
Page Ruler TM	Fermentas
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich
Polybren	Sigma-Aldrich
PromoFectin TM	Promocell
Proteaseinhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich
ß-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
TritonX-100	Sigma-Aldrich
Trizma [®] base	Sigma-Aldrich
Tween 20	Roth
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck

2.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze

Für zellbiologische Arbeiten wurden folgende Kulturmedien und Zusätze verwendet.

Medien und Zusätze	Firma
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA
Furin-Inhibitoren I und II	Merck
GlutaMax TM	Invitrogen
Lymphozyten-Separationsmedium	PAA
OptiMEM®	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
RPMI-Medium	Invitrogen
Trypsin-EDTA	Invitrogen

Tab. 4 Medien und Zusätze

2.1.4 Expressionsvektoren

Die für die transiente Transfektion und virale Transduktion von eukaryotischen Zellen verwendeten Expressionsvektoren sind in Tab. 5 aufgeführt. Die zur Virusproduktion notwendigen Plasmide pCMV-VSV-G, pMDLg/pRRE und pRSV-Rev wurden von Addgene bezogen.

Insert	Tag	Vektor	Herkunft/Referenz
GNPTG (human)	-	pcDNA3.1	Invitrogen, (Pohl et al, 2010)
GNPTG (human)	C-terminal GFP	pEGFP-N1	Promega, (Encarnação et al, 2011)
-	GFP	pEGFP-N1	Promega
-	GFP	pLeGO-G2	(Weber <i>et al</i> , 2008)
GNPTG (human)	C-terminal GFP	pLeGO-G2	(Weber <i>et al</i> , 2008)

Tab. 5: Verwendete Expressionsvektoren

2.1.5 Puffer und Lösungen

In Tab. 6 ist die Zusammensetzung von häufig verwendeten Puffern und Lösungen aufgeführt.

Puffer, Lösung (pH)	Zusammensetzung		
10 × PBS (pH 7,4)	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ \times 2		
	H ₂ O, 17,6 mM KH ₂ PO ₄		
10 × TBS (pH 7,4)	250 mM Tris/HCl, 1,37 M NaCl, 27 mM KCl		
$2 \times \text{HBS} (\text{pH 7,2})$	10 mM Dextrose, 40 mM Hepes, 10 mM KCl, 270 mM		
	$Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$		
Lysispuffer (pH 7,5)	50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100,		
	Proteaseinhibitor-Cocktail		
Transferpuffer (pH 7,4)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol		
Anodenpuffer (pH 8,6)	25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin		
Kathodenpuffer (pH 8,6)	25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS		
Blockpuffer (pH 7,4)	PBS bzw. TBS, 0,1 % Tween 20, 5 % Milchpulver		
Waschpuffer (pH 7,4)	PBS bzw. TBS, 0,1 % Tween 20		
ECL-Lösung 1 (pH 8,5)	1 M Tris/HCl, 250 mM Luminol, 90 mM p-		
	Cumarinsäure		
ECL-Lösung 2 (pH 8,5)	1 M Tris/HCl (pH 8,5), 30 % H ₂ O ₂		
$4 \times$ Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris/HCl, 0,4 % SDS		
$4 \times$ Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 M Tris/HCl, 0,4 % SDS		
Solubilizierungspuffer (pH 6,8)	50 mM Tris/HCl, 4 % SDS, 12 % Glycerin		
	Coomassie [®] Blue R (reduzierend: + 10 mM DTT und		
	0,1 mM β-Mercaptoethanol)		

Tab. 6: Puffer und Lösungen

2.2 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung von eukaryotischen Zellen erfolgte unter einer Sterilbank. Die Arbeitsflächen und verwendeten Materialien wurden mit Ethanol desinfiziert. Die verwendeten Einwegmaterialien sowie Medien und Zusätze waren ebenfalls steril.

2.2.1 Kultivieren von eukaryotischen Zellen

Die jeweiligen Zellen wurden in kleinen (25 cm^2) oder großen (75 cm^2) Zellkulturflaschen in einem Inkubator mit wassergesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂-Gehalt bei 37 °C kultiviert. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen in DMEM inkubiert, dem 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % GlutaMaxTM zugesetzt war (nachfolgend Kulturmedium genannt). Ein Mediumwechsel erfolgte zwei- bis dreimal pro Woche. In dieser Arbeit wurden die in Tab. 7 aufgeführten Zell-Linien verwendet.

Zell-Linie	Spezies
HeLa, Epithelzellen eines Zervixkarzinoms	human
HEK, embryonale Nierenzellen	human
COS7, Nierenzellen, transformiert mit Simian Virus 40 T-Antigen	Grüne Meerkatze
RAW 264.7, Makrophagen-ähnliche Tumorzellen, induziert durch	Maus
das Murine Leukämievirus	
Fibroblasten	human
Makrophagen, isoliert aus Buffy coats	human

2.2.2 Passagieren und Aussäen von Zellen

Wenn die Konfluenz der kultivierten Zellen bei 80-100 % lag, wurden die Zellen mit 5 bzw. 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 0,5 bzw. 1 ml Trypsin-EDTA bei 37 °C für 3-5 Minuten inkubiert bis sich die Zellen abgerundet und abgelöst hatten. Durch Zugabe von vorgewärmtem Kulturmedium wurde die Wirkung von Trypsin inhibiert. Die Zellsuspension wurde je nach gewünschter Verdünnung auf 5 bzw. 10 ml mit Kulturmedium aufgefüllt und auf entsprechende Zellkulturschalen oder - flaschen ausgesät.

2.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Durch Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff wurden Zellen längerfristig aufbewahrt und ihre Vitalität aufrechterhalten. Nach Trypsinieren der Zellen erfolgte eine Zentrifugation der Zellsuspension für 5 Minuten und 900 x g. Der Überstand wurde sorgfältig abgesaugt und das Pellet vorsichtig in eiskaltem Einfriermedium (DMEM, 10 % FKS, 10 % DMSO) resuspendiert. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und zunächst in eine mit Isopropanol gefüllte Kryo-Einfrierbox bei -80 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.4 Auftauen von Zellen

Für die Revitalisierung von Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und die Zellsuspension in einer kleinen Menge aufgewärmtes Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in einem mit 10 ml Kulturmedium gefüllten 15-ml-Röhrchen überführt und es folgte eine Zentrifugation bei 900 x g und 4 °C für 5 Minuten. Nach dem Absaugen des Überstands wurden 5 ml Kulturmedium zu dem Pellet gegeben, das Pellet wurde resuspendiert und anschließend in eine kleine Zellkulturflasche überführt.

2.2.5 Isolierung von Makrophagen aus Buffy-Coats

Für diese Arbeiten liegt ein Unbedenklichkeitsvotum der Ethikkomission der Hamburger Ärztekammer der AG Braulke vor.

Humane Makrophagen wurden aus Buffy-Coats (Leukocytenfilme) isoliert. Dies ist die Grenzschicht zwischen Erythrocyten und Blutplasma und besteht hauptsächlich aus Leukocyten und Thrombocyten. Buffy-coats sind Nebenprodukte bei der Verarbeitung von Vollblutspenden und wurden freundlicherweise vom UKE-Blutspendedienst des Institutes für Transfusionsmedizin zur Verfügung gestellt. In je ein 50-ml-LeucoSep[®]-Röhrchen wurden 15 ml Lymphocyten-Separationsmedium überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 3000 rpm mit einer Zentrifuge Minifuge RF von Heraeus und dem Rotor B54402/A für 30 Sekunden bei RT. Es wurden dann 30 ml Buffy Coats dazu gegeben. Durch eine Zentrifugation bei 3000 rpm für 10 Minuten entsteht eine Schicht aus Plasma, Monocyten, Separationsmedium und Erythrocyten. Die Schicht aus Monocyten wurde in 50-ml-Reaktionsgefäße überführt und in 20 ml PBS resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 1700 rpm für 10 Minuten. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet erneut in 20 ml PBS resuspendiert und bei 1700 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Es erfolgte dann zweimal eine Zentrifugation bei 200 rpm für 10 Minuten. Diese Male wurde das Pellet nach dem Absaugen des Überstands in 10 ml PBS resuspendiert. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (bei 1700 rpm für 10 Minuten) wurde das Pellet zuerst in 10 ml RPMI (+ 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % GlutaMaxTM) mit Hilfe einer 10-ml-Spritze mehrmals resuspendiert. Anschließend wurde RPMI (+ 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % GlutaMaxTM) bis zur gewünschten Verdünnung dazu gegeben. Die Zellsuspension wurde dann auf 6-cm-Platten bzw. auf 6-Well-Platten ausgesät und das Medium mit DMEM (+ 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % GlutaMaxTM) in den ersten 4 Tagen täglich gewechselt.

Danach wurden die Zellen alle 2 Tage mit PBS gewaschen und das Medium gewechselt. Nach 9 bis 14 Tagen wurden die kultivierten Makrophagen für Experimente eingesetzt.

2.2.6 Transiente Transfektion von Zellen

Die transiente Transfektion von kultivierten Zellen in 6-cm-Schalen erfolgte mit verschiedenen Transfektionsreagenzien. Die Zellernte erfolgte in allen Fällen 24 Stunden nach der Transfektion.

2.2.6.1 Transfektion mit PromoFectin

In einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden 1,5 µg DNA und 100 µl OptiMEM[®] gemischt. In einem zweiten Ansatz wurden 3 µl Promofectin mit 100 µl OptiMEM[®] gemischt. Die Inhalte wurden gemischt und 15-20 Minuten bei RT inkubiert. Inzwischen wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und 4 ml Kulturmedium zugegeben. Nach der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise und unter Schwenken auf der Kulturschale verteilt.

2.2.6.2 Transfektion mit LipoGenTM

In einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden 3 µl LipoGen[™] mit 96 µl OptiMEM[®] gemischt und dazu wurde 1 µg DNA gegeben. Es erfolgte dann eine Inkubation bei RT für 5-10 Minuten. Inzwischen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 2 ml Kulturmedium hinzugegeben. Nach der Inkubationszeit wurde die Mischung tröpfchenweise und unter Schwenken auf der Kulturschale verteilt.

2.2.6.3 Transfektion mit Lipofectamine[™] 2000

In einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden 4 µg DNA und 250 µl OptiMEM[®] gemischt. In einem weiteren 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden 10 µl LipofectamineTM 2000 mit 100 µl OptiMEM[®] gemischt, gefolgt von einer Inkubation für 5 Minuten bei RT. Die Inhalte wurden gemischt und 20 Minuten bei RT inkubiert. Inzwischen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 2 ml Kulturmedium hinzugegeben. Nach der Inkubationszeit wurde die Mischung tröpfchenweise und unter Schwenken auf der Kulturschale verteilt.

2.2.6.4 Transfektion mit Lipofectamine™ LTX & PLUS

In einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden 2,5 µg DNA, 500 µl OptiMEM[®] und 2,5 µl PLUS-Reagenz gemischt. Es erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten bei RT. Dazu wurden dann 10 µl LTX-Reagenz gegeben, gefolgt von einer Inkubation für 25 Minuten bei RT. Inzwischen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 2 ml Kulturmedium hinzugegeben. Nach der Inkubationszeit wurde die Mischung tröpfchenweise und unter Schwenken auf der Kulturschale verteilt.

2.2.6.5 Transfektion mit JetPEI[®]

In einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden 1,5 μ g DNA und 100 μ l NaCl-Lösung (150 mM) gemischt. In einem weiteren 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden 3 μ l JetPEI[®] mit 100 μ l NaCl-Lösung (150 mM) gemischt.

Die Inhalte wurden gemischt und 25 Minuten bei RT inkubiert. Inzwischen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 4 ml Kulturmedium hinzugegeben. Nach der Inkubationszeit wurde die Mischung tröpfchenweise und unter Schwenken auf der Kulturschale verteilt.

2.2.7 Transfektion von siRNA in Makrophagen

Makrophagen wurden in 6-cm-Kulturschalen kultiviert und anschließend mit der jeweiligen siRNA (*small interference* RNA) und Lipofectamine[™] 2000 transfiziert. In einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden 360 pmol siRNA und 490 µl OptiMEM[®] gemischt. In einem weiteren 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden 10 µl Lipofectamine[™] 2000 mit 490 µl OptiMEM[®] gemischt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Inhalte der Reaktionsgefäße wurden gemischt und weitere 20 Minuten bei RT inkubiert. Inzwischen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 3 ml Kulturmedium hinzugegeben. Nach der Inkubationszeit wurde die Mischung tröpfchenweise und unter Schwenken auf der Kulturschale verteilt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel und nach 3 Tagen erfolgte eine erneute Transfektion mit der jeweiligen siRNA. Die Analyse der Zellen erfolgte 3 bzw. 6 Tage nach der ersten Transfektion. Die verwendeten siRNA-SMART-Pools[®] *PCSK3* und *PCSK7* der Firma Dharmacon bestehen aus 4 Nukleotiden. Als Kontrolle diente eine universelle Kontroll-siRNA (Tab. 8). Die siRNA-Nukleotide gegen *PCSK8* und die Kontroll-siRNA wurden von Invitrogen synthetisiert (Marschner *et al*, 2011).

Tab. 8: siRNAs

siRNA	Sequenz $5' \rightarrow 3'$
PCSK3	5'GGGCUGGGCUCCAUCUUUG 3'
	5'GCAGAUGGGUUUAAUGACU 3'
	5'GGACUUGGCAGGCAAUUAU 3'
	5':GGACUAAACGGGACGUGUA 3'
PCSK7	5'CAGCAAGGAUCCAGACGAA 3'
	5'GGACAUUGCACCCAACUAU 3'
	5'CUACGUCAGUCCCGUGUUA 3'
	5'GAAAAUACCUGCACGAUGA 3'
PCSK8	5' CAGAUGUGCUCUGGCAGAUGGGAUA 3'
Kontrolle	5'UAAGGCUAUGAAGAGAUAC 3'

2.2.8 Inhibitor-Behandlung von Zellen

Konfluente Makrophagen einer 6-cm-Kulturschale wurden mit 100 μ M Furin-Inhibitor I bzw. Furin-Inhibitor II in Kulturmedium für 48 Stunden inkubiert. In den ersten 6 Stunden wurden die Zellen alle 2 Stunden unter dem Mikroskop auf Vitalität kontrolliert.

2.2.9 Lentivirale Transduktion von Zellen

Alle Arbeitsschritte wurden unter den Sicherheitsmaßnahmen der Sicherheitsstufe S2 durchgeführt.

2.2.9.1 Produktion lentiviraler Virusüberstände

Die Herstellung der lentiviralen Viruspartikel erfolgte durch Ko-Transfektion von geeigneten Produzentenzellen mit allen benötigten Plasmiden unter Verwendung der Calciumphosphat-Methode (Pear *et al*, 1993). HEK-Zellen (5 x 10^6) wurden 12 bis 16 Stunden vor der Transfektion in einer 10-cm-Zellkulturschale ausgesät.

Der Ansatz für die Ko-Transfektion einer 10-cm-Schale ist in Tab. 9 gelistet. Das Plasmid-Gemisch wurde mit dest. Wasser auf ein Volumen von 437,5 μ l gebracht. Anschließend wurden 62,5 μ l einer 2 M CaCl₂-Lösung dazu pipettiert (final: 16 mM) und tröpfchenweise in 500 μ l 2 × HBS-Puffer (Tab. 6) in ein 15-ml-Reaktionsgefäß gegeben, wobei zur optimalen Durchmischung mit einer Pasteurpipette Luft durch den Puffer geblasen wurde.

Tab. 9: Ansatz zur Ko-Transfektion von HEK-Zellen

Plasmid	Menge
Vektor-Plasmid: GNPTG-GFP oder GFP in pLeGO-G2	15 µg
Hüllprotein-Plasmid: pCMV-VSV-G	2 µg
Verpackungsplasmid: pMDLg/pRRE	10 µg
Rev-Plasmid: pRSV-Rev	5 µg

Es erfolgte eine Inkubation für 20 Minuten bei RT. Inzwischen wurden die HEK-Zellen mit PBS gewaschen und 10 ml Kulturmedium (DMEM + 10 % FKS, 1 mM Natriumpyruvat, 20 mM Hepes, Penicillin/Streptomycin) und 25 µM Chloroquin hinzugegeben. Nach der Inkubationszeit wurde die DNA-Mischung tröpfchenweise und unter Schwenken auf der Kulturschale verteilt. Chloroquin erhöht den vesikulären pH-Wert. Durch eine verminderte Aktivität lysosomaler DNasen wird die Transfektionseffizienz gesteigert (Hasan *et al*, 1991). Nach 6 Stunden Inkubation wurde das Medium durch 10 ml frisches Medium ersetzt. Nach erfolgreicher transienter Transfektion wurden infektiöse Lentiviruspartikel in den Kulturüberstand sezerniert. Diese Überstände wurden nach 24 Stunden abgenommen, steril filtriert, aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Es wurde erneut 10 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben und nach 24 Stunden wieder gesammelt und aufbewahrt. Die Zellen sowie alle Verbrauchsmaterialien, die mit den Viren in Berührung kamen, wurden autoklaviert und entsorgt.

2.2.9.2 Qualität der lentiviralen Virusüberstände

Die Qualität der Virusüberstände wurde durch Nachweis des GFP, das in allen verwendeten Vektor-Plasmiden enthalten war, mittels Immunfluoreszenzmikroskopie überprüft. Es wurden 5 x 10^4 Zellen in 500 µl Kulturmedium pro Vertiefung auf Glasplättchen in einer 24-Well-Platte ausgesät. Nach 6 Stunden wurde das Medium gewechselt. Außerdem wurden 8 µg/ml des kationischen Polymers Polybren zugesetzt, um die ladungsabhängige Adsorption des Viruspartikels an die Extrazellulärmatrix der Zielzellen zu erhöhen (Davis et al. 2002). Die Zellen wurden mit zunehmenden Verdünnungen $(0.5 \ \mu l, 1 \ \mu l, 10 \ \mu l, 100)$ µl) der Überstände transduziert und die 24-Well-Platte wurde für 1 Stunde bei 1000 x g zentrifugiert. Die Platte wurde danach für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert, das Medium von den Deckgläschen abgenommen und die Zellen mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 20 Minuten bei RT mit 3 % PFA in PBS fixiert und danach nochmals mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit einer DAPI-Lösung (5 µg/ml) für 5 Minuten inkubiert. Nach letztmaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser mit Eindeckmedium (Mowiol) auf einem Objektträger fixiert und über Nacht bei RT getrocknet. Die GFP- bzw. DAPI-Signale der transduzierten Zellen wurden an einem Laser-Scan-Mikroskop untersucht.

Die mikroskopischen Analysen wurden freundlicherweise von J. Brand (UKE) durchgeführt.

2.2.9.3 Virale Transduktion von Zellen

Die zu transduzierenden Zellen einer 6-Well-Platte wurden mit PBS gewaschen. Anschließend wurden verschiedene Volumina (100 bis 850 μ l) der viralen Kulturüberstände auf die Zellen gegeben und mit Kulturmedium auf 2 ml aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation der 6-Well-Platte für 1 Stunde bei 1000 x g und RT. Die Zellen wurden dann bei 37 °C inkubiert und täglich mikroskopisch kontrolliert. Das Medium wurde nach 24 Stunden gewechselt und die Ernte der Zellen erfolgte nach 5 Tagen.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Zellextrakten

Zellen einer 6-cm-Schale wurden auf Eis gestellt, mit eiskaltem PBS gewaschen, in 750 μ l PBS abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Danach folgte eine Zentrifugation bei 900 x g für 10 Minuten und 4 °C. Das Pellet wurde in 100 μ l Triton X-100-Lysispuffer (Tab. 6) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach folgte eine zweite Zentrifugation bei 20000 x g für 10 Minuten und 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Wenn nötig, wurde das Pellet für eine spätere Nutzung bei -20 °C eingefroren werden.

2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellextrakten

Die verwendete kolorimetrische Methode beruht auf einer Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung. Durch die Bindung wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 auf 595 nm verschoben. Anhand einer Eichreihe (0-20 µg BSA) lässt sich so die Konzentration einer Proteinlösung bestimmen. Dazu wurden 2-5 µl der zu messenden Probe mit dest. Wasser auf 800 µl aufgefüllt. Anschließend wurden je 200 µl Roti-Quant[®] zu den Proteinproben und den Proben der Eichreihe pipettiert und gut gemischt. Nach 3-5 Minuten Inkubation bei RT wurden die Proben nacheinander in eine Einmalküvette gegeben und die Extinktion am Photometer bei 595 nm gemessen.

2.3.3 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Die Proteine wurden nach ihrer molaren Masse durch SDS-PAGE in einem diskontinuierlichen Puffersystem getrennt. Die Acrylamidkonzentration der Trenngele betrug 10 % oder 12,5 %. Zwischen zwei durch Abstandshalter getrennte Glasplatten wurde das Polyacrylamid-Trenngel (Tab. 10) gegossen. Nach ungefähr 30 Minuten wurde auf das polymerisierte Trenngel das Sammelgel gegossen und sofort ein Gel-Kamm eingesteckt. Nach weiteren 30 Minuten wurde der Gel-Kamm herausgenommen und die Geltaschen mit dest. H₂O gespült. Auf das Gel wurden 30-150 µg Protein aufgetragen, gegebenenfalls mussten die Proben mit Lysispuffer verdünnt werden.

Die aufzutragenden Proben wurden in reduzierendem Solubilisierungspuffer aufgenommen, kurz gevortext, für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und in die Geltaschen überführt. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsstandard (Full-Range RainbowTM oder Page RulerTM) auf das Gel geladen. Die Gele in den Glasplatten wurden in die Elektrophoresekammer eingespannt und an ein Spannungsgerät angeschlossen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 60 mA für ca. 2 Stunden. Der Lauf war beendet, sobald die Coomassie-Front aus dem Gel herausgelaufen war.

Chemikalie/Puffer	10 % Trenngel (30 ml)	12,5 % Trenngel (30 ml)	4 % Sammelgel (10 ml)
30,8 % Acrylamid	9,8 ml	14,6 ml	1,3 ml
Trenngelpuffer (Tab. 6)	7,5 ml	7,5 ml	-
Sammelgelpuffer (Tab. 6)	-	-	2,5 ml
dH ₂ O	12,2 ml	9,8 ml	6 ml
10 % APS	250 µl	250 µl	100 µl
10 % SDS	300 µl	300 µ1	100 μ
TEMED	25 µl	25 µl	10 µl

Tab. 10: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE

2.3.4 Westernblot-Analysen

Die aufgetrennten Proteine werden bei dieser Methode aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, wodurch das Trennmuster erhalten bleibt. Das Gel und eine Nitrocellulosemembran wurden in Transferpuffer luftblasenfrei zwischen Whatman-Filterpapiere und Schwammfilter gelegt. Der Tranfer erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Blot-Kammer für 2 Stunden bei 900 mA oder über Nacht bei 130 mA. Zur Besetzung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für eine Stunde in Blockpuffer (Tab. 6) blockiert.

Danach wurde die Membran mit einem primären Antikörper, der in Blockpuffer verdünnt wurde, für ca. eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit Waschpuffer (Tab. 6) gewaschen und es erfolgte eine Inkubation mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Membran wurde erneut dreimal für 10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte durch eine enhanced chemiluminescence (ECL)-Reaktion. Dafür wurden 5 ml der beiden ECL-Lösungen (Tab. 6) gemischt und 30 Sekunden auf der Membran inkubiert. Diese konnte anschließend mit dem BioRad-Molecular Imager[®] ChemiDocTMXRS mit eingebauter Digitalkamera aufgenommen werden. Die Exposition lag zwischen 10 Sekunden und 5 Minuten. Wenn nötig, konnte die Membran nach dem "Strippen" wieder eingesetzt werden, um andere Proteinbanden durch andere Antikörper zu identifizieren. Dafür wurde die Membran zweimal mit 0,2 M NaOH für 5 Minuten inkubiert und zweimal mit dH₂O vor einer weiteren Inkubation mit dem Blockpuffer gewaschen. Für die Westernblot-Analysen wurden die in den Tab. 11 und 12 gelisteten primären und sekundären Antikörper in der angegebenen Verdünnung verwendet.

Antigen	Immunisierte	Verdünnung	Firma,
	Spezie		Referenz
GFP	Maus,	1:3.000	Roche
	monoklonal		
GlcNAc-1-Phosphotransferase,	Kaninchen,	1:500	Tiede <i>et al</i> , 2004
γ-Untereinheit (human)	polyklonal		
GlcNAc-1-Phosphotransferase,	Kaninchen,	1:500	Pohl <i>et al</i> , 2010
β-Untereinheit (human)	polyklonal		
GAPDH	Kaninchen,	1:1000	Santa Cruz
	polyklonal		

Tab.	11:	Primäre	Antikörper
------	-----	---------	------------

Antikörper, HRP-konjugierte IgG	Verdünnung	Firma
Ziege anti Kaninchen	1:5.000	Dianova
Ziege anti Maus	1:3.000	Dianova

Tab. 12: Sekundäre Antikörper

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Isolierung aus Zellen

Die RNA wurde aus kultivierten Zellen einer 6-cm-Schale isoliert. Die Zellen wurden zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen und in 1 ml PBS abgeschabt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 4 °C und 900 x g. Aus dem Pellet wurde die RNA mit Hilfe des *GeneJETTM RNA Purification Kit* (Fermentas) nach Herstellerangaben präpariert. Die RNA wurde in 50 μ l DEPC-Wasser aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

2.4.2 Bestimmung der Konzentration von RNA-Lösungen

Die photometrische Messung von RNA-Lösungen erfolgte bei 260 nm in einer UV-Küvette gegen Wasser. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Konzentration von 40 μ g/ml RNA. Reine RNA besitzt einen $OD_{260/280}$ -Quotienten von 2,0.

2.4.3 Synthese von cDNA

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 mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase), zuerst eine zur RNA komplementäre cDNA zu synthetisieren. Die entstehende cDNA dient als Ausgangsmatrize für die Amplifikation mittels PCR. Die cDNA-Synthese aus RNA erfolgte mittels des *High capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Es wurde der folgende Ansatz pipettiert und anschließend in einem Thermocycler inkubiert:

2,0 µl	Random-Primer (10 x)	Programm	
2,0 µl	Puffer (10 x)	25 °C	10 Minuten
0,8 µl	dNTP-Mix (25 x)	37 °C	120 Minuten
1,0 µl	Reverse Transkriptase	85 °C	5 Minuten
4,2 µl	DEPC-Wasser	4 °C	∞
10 µl	RNA-Lösung (1 µg RNA)		

Die entstandene cDNA diente als Ausgangsmatritze für die cDNA-Amplifikation über Realtime-PCR.

2.4.4 Quantitative Realtime-PCR

Die Expressionsanalyse spezifischer Gene auf RNA-Ebene wurde mit einer quantitativen Realtime-PCR durchgeführt. Verwendet wurde der *TaqMan*[®] *Gene Expression Assay* (Applied Biosystems), der Gen-spezifische Primer und fluoreszenzmarkierte Sonden enthält. Die TaqMan-Sonde besitzt an ihrem 5´-Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff während das 3´-Ende mit einem fluoreszierenden Quencherfarbstoff markiert ist. Ist die TaqMan-Sonde nicht an einen cDNA-Abschnitt gebunden, wird die Energie des Reporterfarbstoffs nach Anregung bei 488 nm vom Quencher resorbiert (Cardullo *et al*, 1988).



Abb. 5: Schematische Darstellung des Taqman-Prinzips. Aufgrund der räumlichen Nähe werden die Lichtsignale des Reporterfarbstoffs vom Quencherfarbstoff resorbiert. Während der PCR-Reaktion verlängert die Taq-Polymerase, ausgehend von einem Primer, den Nukleotidstrang und entfernt dabei die Sonde. Der Reporterfarbstoff wird freigesetzt und seine Lichtsignale können detektiert werden.

Während der PCR amplifiziert die *Taq*-Polymerase, ausgehend vom gebundenen Primer, die cDNA und entfernt die Sonde. Dadurch verlieren der Quencher- und der Reporterfarbstoff die Nähe zueinander und die Lichtsignale des Reporters können detektiert werden (Abb. 5). Da sowohl die Sonde als auch die Primer gebunden sein müssen, ist diese Methode sehr spezifisch. Der Anstieg der Fluoreszenz ist proportional zum Anstieg der Konzentration des Amplifikationsproduktes. 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 -Actin) gebildet. Die relative Expression wurde aus dem Vergleich der Probe gegen die Kontrolle nach der folgenden Gleichung ermittelt (Schmittgen & Livak, 2008):

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$
 mit $\Delta C_T = C_T Gen - C_T Kontrollgen$
 $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T Probe - \Delta C_T Kontrolle$

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

Die Amplifikation und der Nachweis erfolgten in einer Dreifachbestimmung mit dem Thermocycler und Fluoreszenzdetektor MX3000PTM.

10 μ l Maxima TM Probe Master Mix (2 ×)	95 °C 10 Minuten
7 µl DEPC-Wasser	95 °C 30 sec 40.7 wklop
1 µl TaqMan [®] Gene Expression Assay	60 °C 1 Minuten
<u>2 μl Template-cDNA</u>	
20 µl	

Für die Realtime-PCR-Analysen wurden die in Tab. 13 gelisteten Assays verwendet. Die Nukleotidsequenzen sind nicht bekannt.

Gen	Assay-Nr.
GNPTG	Hs00261332_m1*
PCSK1	Hs01026107_m1
PCSK2	Hs01037347_m1
PCSK3	Hs00159829_m1
PCSK4	Hs00399493_m1
PCSK5	Hs00196400_m1
PCSK6	Hs00159844_m1
PCSK7	Hs00237114_m1
PCSK8	Hs00186886_m1
PCSK9	Hs00545399_m1
ACTB	Hs99999903_m1

Tab. 13: Taqman[®]-Gene Expression Assays

* Hs: Homo sapiens

2.4.5 Statistische Auswertung der Messdaten

Die statistische Analyse der erhaltenen Daten erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel. Bei einer Mehrfachbestimmung wurden als Ergebnis der Mittelwert der Messdaten und die Standardabweichung angegeben.

3. Ergebnisse

Der GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplex ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) ist essentiell für die Generierung von M6P-Resten an lysosomalen Enzymen. Es wurde eine Akkumulation proteolytischer Fragmente der γ -Untereinheit beobachtet, die mit einer reduzierten Aktivität des GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplexes assoziiert war. Daher ist in Makrophagen die Menge an M6P-haltigen Proteinen im Vergleich zu anderen Zellinien stark erniedrigt (Pohl *et al*, 2010). In dieser Arbeit sollte die proteolytische Fragmentierung der γ -Untereinheit genauer untersucht werden. Es sollten die Spaltstellen in der γ -Untereinheit sowie potentielle Kandidaten für Golgiresidente Proteasen identifiziert werden.

3.1 Expression der γ-Untereinheit in humanen Makrophagen

Um die Expression der endogenen γ-Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase in humanen, primär kultivierten Makrophagen zu untersuchen, wurden zunächst vergleichende Westernblot-Analysen durchgeführt.



Abb. 6: Vergleichende Expression der γ -Untereinheit in humanen Makrophagen und überexprimierenden COS7-Zellen. Makrophagen (M Φ) wurden aus *Buffy Coats* isoliert und 14 Tage kultiviert. COS7-Zellen wurden nicht oder mit der cDNA der humanen γ -Untereinheit transfiziert und nach 24 Stunden analysiert. Die Proteinextrakte wurden mittels reduzierender SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot gegen die γ -Untereinheit (γ -UE) analysiert. Es wurden drei unabhängige Präparationen (A, B, C) untersucht. Die molaren Massen von Markerproteinen sind angegeben.

Dazu wurden Extrakte von Makrophagen und COS7-Zellen, die mit der cDNA der humanen γ -Untereinheit transfiziert waren, in einer reduzierenden SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit einem spezifischen, polyklonalen Antikörper gegen die humane γ -Untereinheit analysiert. In den Proteinextrakten transfizierter COS7-Zellen konnte eine 36 kDa immunoreaktive Bande nachgewiesen werden, bei der es sich um die monomere Form der γ -Untereinheit handelt (Abb. 6A, B, Bahn 2). In den Extrakten nicht-transfizierter COS7-Zellen war kein spezifisches Signal nachweisbar (Abb. 6A, B, Bahn 1). Dagegen konnte in den Extrakten von Makrophagen (M Φ) die endogene γ -Untereinheit in drei Fragmenten mit molaren Massen von 28 kDa, 24 kDa und 23 kDa detektiert werden (Abb. 6A, B, Bahn 3, C). In den hier dargestellten drei unabhängigen Experimenten sind die Fragmente der γ -Untereinheit mit unterschiedlichen Intensitäten nachweisbar. Außerdem war die Auftrennung der Doppelbande von 23/24 kDa nicht immer möglich (Abb. 6B).

Um die Expression in Abhängigkeit der Kultivierungszeit zu untersuchen, wurden Makrophagen 4, 7, 10 und 14 Tage nach Isolierung und Kultivierung geerntet und die Proteinextrakte im Westernblot analysiert. Erst ab dem 14. Kultivierungstag ist es möglich die Fragmente der endogenen γ -Untereinheit nachzuweisen (Abb. 7). Daher wurden für alle weiteren Experimente die Makrophagen für 14 Tage kultiviert, bevor sie analysiert wurden.



Abb. 7: Expression der γ -Untereinheit in humanen Makrophagen in Abhängigkeit der Kultivierungszeit. Makrophagen wurden aus *Buffy Coats* isoliert und 4, 7, 10 bzw. 14 Tage kultiviert. Die Proteinextrakte wurden mittels reduzierender SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot gegen die γ -Untereinheit analysiert. Die molaren Massen von Markerproteinen sind angegeben.

3.2 Transfektion und Transduktion von Makrophagen

Um die Spaltstellen in der γ -Untereinheit mittels Massenspektrometrie zu identifizieren, sollten die gespaltenen Fragmente aufgereinigt werden. Damit ausreichende Mengen der Fragmente aufgereinigt werden können, sollte die γ -Untereinheit als C-terminales GFP-Fusionsprotein in Makrophagen überexprimiert werden.

3.2.1 Transfektion von GFP in Makrophagen

Da sich primär kultivierte Makrophagen nur schwer transfizieren lassen, wurden zunächst lipid-basierte Transfektionsreagenzien verschiedener Firmen getestet. In diesen Vorversuch wurde die cDNA von GFP in Makrophagen nach 14 Tagen Kultivierung transfiziert und nach 24 Stunden analysiert. Als Kontrolle wurden nicht-transfizierte Makrophagen verwendet. Es konnten spezifische immunreaktive GFP-Signale von etwa 27 kDa bei Verwendung der Transfektionsreagenzien Lipofectamine[™] 2000, Lipofectamine[™] LTX und JetPEI[®] beobachtet werden, wobei die Bande nach der JetPEI[®]-Transfektion nur sehr schwach detektierbar war (Abb. 8). Insgesamt ist die Transfektionseffizienz nur sehr gering im Vergleich zu anderen GFP-überexprimierenden Zelltypen (Dr. S. Pohl, UKE, persönliche Mitteilung).



Abb. 8: Transfektion von GFP in humane Makrophagen mittels verschiedener lipid-basierter Transfektionsreagenzien. Primär kultivierte Makrophagen wurden mit 5 μ g cDNA von GFP unter Verwendung von verschiedenen Transfektionsreagenzien nach Herstellerangaben transfiziert. Die Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot analysiert. Die molaren Massen von Markerproteinen sind angegeben. (LF = Lipofectamine)

3.2.2 Expression des γ-GFP-Fusionsproteins in Makrophagen

Im folgenden Experiment sollte die cDNA der γ -Untereinheit als C-terminales GFP-Fusionsprotein (Encarnação *et al*, 2011) in humane Makrophagen transfiziert werden. Als Transfektionsreagenz wurde LipofectamineTM 2000 benutzt (Abb. 8). Leider ließ sich das γ -GFP-Fusionsprotein unter diesen Bedingungen nicht exprimieren (Daten nicht gezeigt). In einem zweiten Experiment wurden RAW-264.7-Zellen verwendet, die eine Makrophagen-ähnliche und durch das murine Leukämievirus transformierte Tumorzell-Linie darstellen. Als Positivkontrolle dienten COS7-Zellen, die das γ -GFP-Fusionsprotein überexprimierten, während nicht-transfizierte Makrophagen als Negativkontrolle verwendet wurden. In Zellextrakten von humanen Makrophagen sind drei immunreaktiven Banden (28 kDa, 24 kDa und 23 kDa) der endogenen γ -Untereinheit nachweisbar (Abb. 9A, Spur 1). In den Extrakten von nicht-transfizierten RAW-Zellen sind zwei schwache Banden von 30 kDa und 28 kDa detektierbar. Es könnte sich hierbei um die murine, endogene γ -Untereinheit handeln (Abb. 9A, Spur 2).



Abb. 9: Expression von γ -**GFP in verschiedenen Zell-Linien.** RAW- und COS7-Zellen wurden nicht oder mit der cDNA des humanen γ -GFP-Fusionproteins transfiziert und 24 Stunden später analysiert. Nicht-transfizierte Makrophagen (M ϕ) wurden als Negativkontrolle verwendet. Die Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot analysiert. Es wurden Antikörper gegen die humane γ -Untereinheit (A) oder gegen GFP (B) verwendet. Die molaren Massen von Markerproteinen sind angegeben.
Die Proteinextrakte von transfizierten COS7-Zellen zeigten eine immunreaktive Bande von 63 kDa, die die humane y-Untereinheit (36 kDa) fusioniert an GFP (27 kDa) repräsentiert (Spur 3). Die Extrakte von RAW-Zellen, die mit dem Vektor γ-GFP transfiziert wurden, zeigten die gleichen immunreaktiven Doppelbanden der endogenen γ-Untereinheit von etwa 30/28 kDa wie in den nicht-transfizierten RAW-Zellen (Spur 4). Die Transfektion der RAW-Zellen war in diesem Fall nicht erfolgreich, da keine weitere Bande bei 63 kDa zu beobachten war (Spur 4). Weiterhin wurde ein Konstrukt verwendet, das die γ -Untereinheit-GFP im viralen Vektor pLeGO-G2 kodiert, das zur späteren Transduktion von Makrophagen verwendet werden sollte. Auch hier sind keine immunspezifischen Signale für das überexprimierte Protein (y-GFP) detektierbar (Spur 5). Anschließend wurde die Blotmembran gestrippt und mit einem Antikörper gegen GFP inkubiert (Abb. 9B). Ein GFP-Signal bei 63 kDa (γ -GFP) war nur in den Extrakten transfizierter COS7-Zellen zu beobachten (Spur 3). Somit war weder die Transfektion von primär kultivierten Makrophagen noch von Makrophagen-ähnlichen RAW-Zellen erfolgreich.

3.2.3 Lentivirale Transduktion von Makrophagen

In der vorliegenden Arbeit wurde ein lentivirales, HIV-1-basiertes Vektorsystem verwendet, um primär kultivierte Makrophagen zu transduzieren. Aus biologischen Sicherheitsgründen gibt es bei dem hier verwendeten System verschiedene Mechanismen, die das Entstehen replikationsfähiger Lentiviren verhindern sollen. Zum einen sind die zur Herstellung infektiöser Viruspartikel notwendigen DNAs auf vier weitgehend voneinander unabhängige Plasmiden verteilt (Dull *et al*, 1998). Zum anderen sind von den ursprünglich neun lentiviralen Genen nur noch vier (gag, pol, env und rev) auf den verschiedenen Plasmiden vorhanden, die zwar die Virusproduktion jedoch nicht die Replikation in den Zielzellen ermöglichen. Der <u>Transfer-Vektor</u> enthält das zu verpackende genetische Material, das nach Umwandlung in RNA zusammen mit der lentiviralen RNA in das Viruspartikel verpackt wird. Der Transfer-Vektor enthält als einziges der vier Vektoren das lentivirale Verpackungssignal (Ψ). Der Transfer-Vektor pLeGO-G2 wurde von Dr. K. Cornils (UKE) zur Verfügung gestellt (Weber *et al*, 2008).

In diesen Vektor wurde die kodierende Sequenz der γ -Untereinheit (*GNPTG*) mit einem C-terminalen GFP-Tag kloniert und von Dr. S. Pohl (UKE) zur Verfügung gestellt. Das <u>Verpackungsplasmid</u> kodiert die für die Verpackung der Viruspartikel notwendigen Strukturproteine sowie die Reverse Transkriptase. In diesem System werden die HIV-1-Proteine Gag und Pol verwendet. Das <u>Rev-Plasmid</u> ist essentiell für die Virusvermehrung in den Produktionszellen. Das <u>Hüllprotein-Plasmid</u> kodiert das virale Hüllprotein und bestimmt die Wirtszellspezifität. Das in diesem System verwendete Hüllprotein VSV-G (Glykoprotein G des Vesikulären Stomatitis-Virus) interagiert nicht mit speziellen Rezeptoren, wie z. B. das Hüllprotein der HIV-Viren, sondern mit Phospholipiden der Zielzellmembran und ermöglicht daher die Infektion einer sehr großen Anzahl von Zelltypen (Cronin *et al*, 2005).

3.2.3.1 Produktion lentiviraler Virusüberstände in HEK-Zellen

Die Herstellung der lentiviralen Viruspartikel erfolgte durch Ko-Transfektion von den jeweiligen Vektorplasmiden (γ-Untereinheit-GFP oder GFP im Vektor pLEGO-G2), dem Hüllproteinplasmid, dem Verpackungsplasmid und das zur Virusvermehrung notwendige Rev-Plasmid in HEK-Zellen unter Verwendung der Calciumphosphat-Methode. Die transfizierten Zellen exprimieren die Virusproteine, so dass Lentiviruspartikel produziert wurden, die ins Medium ausgeschleust wurden (Abb. 10). Diese Überstände wurden abgenommen und standen für Transduktionen von Makrophagen zur Verfügung.



Abb. 10: Schematische Darstellung zur lentiviralen Transduktion. Eine Produktionszelle wird mit den Virus-Plasmiden und dem Transfervektor ko-transfiziert. Die Zelle produziert Viren, die in das Kulturmedium abgegeben werden. Die viralen Kulturüberstände können dann für die Transduktion von Zielzellen eingesetzt werden.

Zur Etablierung der Methode wurden zunächst lentivirale GFP-Virusüberstände hergestellt. Die Qualität der Virusüberstände wurde durch den Nachweis der GFP-Signale mittels Fluoreszenzmikroskopie-Analyse überprüft. Dazu wurden HEK-Zellen mit zunehmenden Verdünnungen (0,5 μ l, 1 μ l, 10 μ l, 100 μ l) GFPexprimierenden Virusüberständen für 24 Stunden inkubiert, das Medium gewechselt und die Zellen nach 5 Tagen mikroskopisch analysiert. Die lichtmikroskopische Aufnahme zeigen konfluente HEK-Zellen (Abb. 11A). Die GFP-Signale der erfolgreich transduzierten HEK-Zellen sind in der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme zu sehen und zeigen, dass die hergestellten Virusüberstände infektiös waren und HEK-Zellen transduziert werden konnten (Abb. 11B).



Abb. 11: Mikroskopische Qualitätsüberprüfung der hergestellten GFP-Virusüberstände. HEK-Zellen wurden mit GFP-Virusüberständen (100 μ l) inkubiert und nach 5 Tagen durch Phasenkontrastmikroskopie (A) und Fluoreszenzmikroskopie (B) analysiert. (Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. K. Cornils (UKE) zur Verfügung gestellt.)

3.2.3.2 Virale GFP-Transduktion von Makrophagen

Verschiedene Volumina (100 µl, 500 µl, 850 µl) der erfolgreich getesteten GFP-Virusüberstände wurden für die Transduktion von Makrophagen einer 6-Well-Platte verwendet. Die Makrophagen wurden nach Isolierung für 9 Tage kultiviert, für 24 Stunden mit den Virusüberständen inkubiert, nach Mediumwechsel für weitere 5 Tagen kultiviert und anschließend geerntet. Die erfolgreiche Transduktion wurde durch den Nachweis der GFP-Signale in einer fluoreszenzmikrokopischen Analyse überprüft. Es zeigte sich, dass sich unter Verwendung von 850 μ l Virusüberstand etwa 10 % der Makrophagen positive GFP-Signale zeigten und somit erfolgreich transduziert wurden (Abb. 12A). Für alle weiteren Transduktionen wurden deshalb 850 μ l Virusüberstände verwendet. Zur Bestätigung dieses Ergebnis wurden die Proteinextrakte der transduzierten Makrophagen in einem GFP-Westernblot analysiert. Als Kontrolle dienten COS7-Zellen, die die γ -Untereinheit-GFP überexprimierten (Spur 1) und nicht-transduzierte Makrophagen (Spur 2). In den Extrakten von transfizierten COS7-Zellen konnte eine spezifische, immunreaktive Bande von 63 kDa für das Fusionsprotein nachgewiesen werden (Abb. 12B, Spur 1). Die schwache Bande bei 27 kDa entspricht abgespaltenem GFP. In den Extrakten von Makrophagen, die mit drei verschiedenen Virusmengen transduziert wurden, konnten in allen Fällen immunreaktive GFP-Banden nachgewiesen werden, die in nicht-transduzierten Makrophagen nicht zu beobachten waren. Die Intensität des GFP-Signals nahm mit zunehmender Virusmenge zu (Abb. 12B, Spur 3-5).



Abb. 12: Lentivirale Transduktion zur Expression von GFP in humanen Makrophagen. In primär kultivierten Makrophagen erfolgte eine Transduktion mit verschiedenen Virusmengen (100 μ l, 500 μ l und 850 μ l Virusüberstand) zur Expression von GFP. Nach 5 Tagen wurde die Transduktionseffizienz durch Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Exemplarisch gezeigt ist die Transduktion mit 850 μ l Virusüberstand (A). Proteinextrakte der transduzierten Makrophagen und COS7-Zellen, die mit der cDNA von γ -Untereinheit-GFP (γ -GFP) transfiziert wurden, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im GFP-Westernblot analysiert. Die molaren Massen von Markerproteinen sind angegeben (B).

3.2.3.3 Transduktion von y-Untereinheit-GFP in Makrophagen

Nach der erfolgreichen Transduktion und Expression von GFP in Makrophagen erfolgte nun der Versuch, das γ -GFP-Fusionsprotein in Makrophagen lentiviral zu exprimieren. Die Produktion der lentiviralen Überstände erfolgte wie unter 3.2.3.1 beschrieben, nur das als Vektorplasmid γ -Untereinheit-GFP im pLEGO-G2 verwendet wurde. Die Qualitätskontrolle erfolgte durch Transduktion von HEK-Zellen mit 850 µl Virusüberstand und anschließender Fluoreszenzmikroskopie-Analyse. Da etwa 90 % der Zellen eine deutliche Grünfärbung anzeigten, war die Herstellung der viralen Partikel mit dem γ -Untereinheit-GFP-Protein erfolgreich (Abb. 13).



Abb. 13: Mikroskopische Qualitätsüberprüfung der hergestellten γ -Untereinheit-GFP-Virusüberstände. HEK-Zellen wurden mit dem γ -GFP-Virusüberstand (850 µl) für 24 Stunden inkubiert und nach Mediumwechsel weitere 5 Tage inkubiert und durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die GFP-Signale sind in grün dargestellt, die Zellkerne sind mit DAPI blau angefärbt.

Jeweils 850 µl der γ -GFP-Lentivirus-Überstände wurden dann zur Transduktion von Makrophagen einer 6-Well-Platte eingesetzt. Die Makrophagen wurden mit den Virusüberständen für 24 Stunden inkubiert und nach Mediumwechsel weitere 5 Tage inkubiert und anschließend in einem Westernblot gegen GFP (Abb. 14 A) und die γ -Untereinheit (Abb. 14B) analysiert. Nicht-transduzierte Makrophagen (Spur 3) sowie transfizierte COS7-Zellen (Spur 1 und 2) dienten als Kontrollen. In den Extrakten von GFP bzw. γ -GFP-transfizierten COS7-Zellen konnten spezifische Banden von 27 kDa bzw. 63 kDa nachgewiesen werden (Abb. 14A, B, Spur 1 und 2). In den transduzierten Makrophagen konnten keine GFP-Signale nachgewiesen werden (Abb. 14A, Spur 3 und 4).

Die Membran wurde *gestrippt* und anschließend mit einem Antikörper gegen die γ -Untereinheit analysiert. In diesem Fall waren nur die endogenen Fragmente der γ -Untereinheit detektierbar (Abb. 14B, Spur 3 und 4). Somit war die Transduktion von Makrophagen zur Expression des γ -GFP-Fusionsproteins nicht erfolgreich.



Abb. 14: Transduktion zur Expression von γ -GFP in humanen Makrophagen. In primär kultivierten Makrophagen erfolgte für 24 Stunden eine lentivirale Transduktion mit 850 µl des γ -GFP-Virusüberstandes und nach Mediumwechsel wurden die Makrophagen für weitere 5 Tage inkubiert wurden. Als Kontrolle dienten COS7-Zellen, die mit GFP und mit γ -GFP transfiziert wurden. Die Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot gegen GFP (A) und die γ -Untereinheit (B) analysiert. Die molaren Massen von Markerproteinen sind angegeben.

In einem weiteren Experiment wurden verschiedene Zelllinien (primäre humane Makrophagen, HEK- und Makrophagen-ähnliche RAW-Zellen) mit GFP oder γ -GFP transduziert. Nicht-transduzierte Makrophagen und GFP-transduzierte Zellen dienten als Kontrolle. In den Extrakten von transduzierten HEK-und RAW-Zellen konnte sowohl das 27 kDa GFP als auch das 63 kDa Fusionsprotein γ -GFP nachgewiesen werden (Abb. 15A, Spur 1, 2, 4 und 5), wobei die Expression in HEK-Zellen im Vergleich zu RAW-Zellen stärker war. In den Extrakten von HEK-Zellen, die das Fusionsprotein überexprimierten, konnte außerdem abgespaltenes GFP nachgewiesen werden (Spur 4). In den Extrakten der transduzierten Makrophagen konnten keine GFP-positiven Signale beobachtet werden (Abb. 15A, Spur 3 und 6). Die Membran wurde *gestrippt* und anschließend mit einem Antikörper gegen die γ -Untereinheit analysiert.

Das überexprimierte 63 kDa γ -GFP konnte in HEK- und RAW-Zellen, jedoch nicht in Makrophagen detektiert werden (Abb. 15B, Spur 4, 5 und 6). Die endogene γ -Untereinheit war in Makrophagen und RAW-Zellen nachweisbar. Es zeigte sich, dass nach Transduktion der Makrophagen nur das 28 kDa Fragment zu detektieren war, während in nicht-transduzierten Zellen auch die kleineren 23/24 kDa Fragmente zu sehen waren (Spur 7).



Abb. 15: Transduktion von γ -GFP in humanen Makrophagen, HEK- und RAW-Zellen. Es erfolgte eine Transduktion von GFP oder γ -GFP in Makrophagen, HEK- und RAW-Zellen. Nichttransduzierte Makrophagen dienten als Negativkontrolle. Die Zellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot gegen GFP (A) bzw. gegen die γ -Untereinheit (B) analysiert. Die molaren Massen von Markerproteinen sind angegeben.

Auch in diesem Experiment konnten primäre Makrophagen nicht erfolgreich transduziert werden. Es konnten jedoch in transduzierten HEK-Zellen immunreaktive Banden von 45 kDa und 39 kDa nachgewiesen, bei denen es sich nur um Fragmente des Fusionsproteins handeln kann (Abb. 15B, Spur 4). Nach Korrektur um das 27 kDa GFP kann den γ -Untereinheitsfragmenten eine Masse von 16 bzw. 12 kDa zugwiesen werden. Diese Fragmente konnten in schwächerer Ausprägung auch in überexprimierenden COS7-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 14B, Spur 2)

Um zu untersuchen, ob eine Spaltung der γ -Untereinheit in überexprimierenden HEK-Zellen vorliegt, wurde eine Transfektion der HEK-Zellen mit der γ -Untereinheit-GFP und γ -Untereinheit-GFP LeGO durchgeführt.

In den Extrakten nicht-transfizierter Zellen war kein spezifisches γ -Signal nachweisbar (Abb. 16A, Spur 1). In Extrakten von Zellen, die mit zwei verschiedenen Expressionsvektoren (γ -GFP bzw. γ -GFP LeGO) transfiziert wurden, konnten sowohl mit anti-GFP als auch mit anti- γ -Untereinheit Antikörpern 63 kDa immunoreaktive Banden aber keine γ -GFP-Fragmente nachgewiesen werden (Abb. 16). Die 27 kDa Banden repräsentieren freies GFP (Abb. 16B). Somit konnte die Beobachtung aus dem in der Abb. 15 dargestellten Experiment nicht bestätigt werden, da keine Fragmentierung der γ -Untereinheit nachgewiesen werden konnte. Die Fragmente der γ -Untereinheit in Abb. 15B könnten daher Produkte der Degradationsprodukte sein, die durch die Transduktion bedingt waren.



Abb. 16: Transfektion von γ -**GFP in HEK-Zellen.** HEK-Zellen wurden mit der humanen γ -GFP und γ -GFP LeGO transfiziert. Die Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot gegen die γ -Untereinheit (A) und gegen GFP (B) analysiert. Die molaren Massen von Markerproteinen sind angegeben.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden erfolgreich Virusüberstände hergestellt, die GFP oder das Fusionsprotein γ-Untereinheit-GFP exprimieren. Diese Überstände wurden zur lentiviralen Transduktion von primär kultivierten Makrophagen eingesetzt. Durch Immunfluoreszenz-Analyse konnte gezeigt werden, dass 10 % der Makrophagen erfolgreich mit GFP transduziert werden konnten. Die Transduktion von Makrophagen mit Virusüberständen, die γ -Untereinheit-GFP exprimieren, war jedoch nicht möglich. Somit konnte diese Methode nicht verwendet werden, um die gespaltenen Fragmente der γ -Untereinheit aus Makrophagen aufzureinigen, um anschließend die Spaltstellen durch Massenspektrometrie zu identifizieren.

3.3 Identifizierung von Protease-Kandidaten aus der PCSK-Familie

3.3.1 Expression von Proteasen der PCSK-Familie in Makrophagen

Um die Protease zu identifizieren, die die γ -Untereinheit spaltet, wurde die γ -Untereinheit-Aminosäuresequenz auf potentielle Spaltstellen bekannter Proteasen *insilico* analysiert. Da die Fragmente der γ -Untereinheit im Golgi-Apparat lokalisiert sind, wurde nur nach Golgi-residenten Proteasen gesucht. Mit Hilfe des ExPASy Online-Tools "Eukaryotic Linear Motif Resource for Functional Binding Sites in Proteins" konnten neben der Spaltstelle für die Signalpeptidase nach 24 Aminosäuren (²⁴A \downarrow A²⁵) zwei weitere potentielle Spaltstellen von Proteasen der *Proprotein Convertase Subtilisin Kexin* (PCSK)-Familie identifiziert werden (Abb. 17). Die Proteasen PCSK1 und PCSK7 spalten potentiell in der Sequenz ⁵²KR \downarrow D⁵⁴ bzw. ⁴⁸RLQAKR \downarrow D⁵⁴. Eine potentielle Spaltstelle der PCSK8, auch als Site-1-Protease (S1P) bekannt, ist in der γ -Untereinheit bei den Aminosäuren ²¹⁰RTLF \downarrow E²¹⁴ lokalisiert.

MAAGLARLLLLLGLSAGGPAPAGAAKMKVVEEPNAFGVNNPFLPQASRLQ	50
₽CSK1 /PCSK7 AKRDPSPVSGPVHLFRLSGKCFSLVESTYKYEFCPFHNVTQHEQTFRWNA	100
YSGILGIWHEWEIANNTFTGMWMRDGDACRSRSRQSKVELACGKSNRLAH	150
VSEPSTCVYALTFETPLVCHPHALLVYPTLPEALQRQWDQVEQDLADELI	200
<pre>PCSK8 = S1P TPQGHEKLLRTLFEDAGYLKTPEENEPTQLEGGPDSLGFETLENCRKAHK</pre>	250
ELSKEIKRLKGLLTQHGIPYTRPTETSNLEHLGHETPRAKSPEQLRGDPG	300
LRGSL	305

Abb. 17: Aminosäuresequenz der γ -Untereinheit und potentielle Spaltstellen von Signalpeptidasen und Golgi-residenten Proteasen. braun = Signalpeptid, blau = Spaltmotiv von PCSK1 und PCSK7, rot = Spaltmotiv von PCSK8 (S1P) Um zu untersuchen, ob diese Proteasen in primär kultivierten Makrophagen exprimiert werden und somit potentielle Kandidaten für die Spaltung der γ -Untereinheit darstellen, wurden quantitative Realtime-PCR-Analysen durchgeführt. Es wurde mRNA aus humanen Makrophagen und als Kontrolle aus den humanen Zelllinien HEK, HeLa und Fibroblasten isoliert. Die mRNA wurde durch eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend durch Realtime-PCR analysiert. Die relative Quantifizierung erfolgte durch die 2^{- $\Delta\Delta$ CT}-Methode (siehe 2.8.4), wobei die mRNA-Expression in Fibroblasten auf 1 gesetzt wurde. Neben den Proteasen PCSK1, PCSK7 und PCSK8 wurden auch die anderen 6 Mitglieder der PCSK-Familie in die Analysen einbezogen.

Zunächst wurde die mRNA-Expression der γ -Untereinheit (*GNPTG*) bestimmt. Das *GNPTG*-Transkript konnte in allen hier untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 18). Die 2-fach erhöhte mRNA-Expression von *GNPTG* in Makrophagen ist bereits beschrieben worden (Pohl *et al*, 2010) und diente als Kontrolle.



Abb. 18: Expressionsanalyse von *GNPTG*-mRNA in verschiedenen humanen Zelllinien. Die RNA aus Fibroblasten, HEK-Zellen, HeLa-Zellen und primär kultivierten Makrophagen wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die relativen mRNA-Spiegel wurden mittels Realtime-PCR bestimmt. Eine Normalisierung erfolgte auf die mRNA-Expression von β -Actin. Die Expression in Fibroblasten wurde 1 gesetzt. Das Diagramm zeigt den Mittelwert ± Standardabweichung aus drei unabhängigen RNA-Präparationen.

Anschließend wurden die mRNA-Expressionen der verschiedenen Proteasen der PCSK-Familie (*PCSK1-9*) in den vier Zelltypen bestimmt (Tab. 14). Da alle Proteasen in Fibroblasten exprimiert waren, wurden die mRNA-Level in diesem Zelltyp gleich 1 gesetzt. Die mRNA der Protease *PCSK1* war in HEK-Zellen und Makrophagen nicht nachweisbar.

Im Vergleich zu Fibroblasten ist der *PCSK1*-mRNA-Spiegel in HeLa-Zellen ca. 60fach höher während in HEK-Zellen und Makrophagen weniger als 10 % der mRNA-Mengen nachweisbar waren. Die mRNA-Expression von *PCSK2* ist in HEK-Zellen vergleichbar mit dem *PCSK2*-Level in Fibroblasten, während die mRNA-Spiegel in HeLa-Zellen ca. 54-fach gegenüber Fibroblasten erhöht sind. In Makrophagen wird *PCSK2* nicht exprimiert.

Protease (Synonym)	Fibrobl	asten	HEK-Zellen	HeLa-Zellen	Makrophagen
	ΔCT	relative Expression			
PCSK1	12,14	1,0 ± 0,2	< 0,1	59,4 ± 14,9	< 0,1
PCSK2	10,86	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1	53,8 ± 7,5	< 0,1
PCSK3 (Furin)	13,47	1,0 ± 0,1	$1,2 \pm 0,2$	22,5 ± 2,2	1157,1 ± 257,2
PCSK4	10,04	1,0 ± 0,1	3,3 ± 0,4	3,7 ± 0,5	$0,3 \pm 0,2$
PCSK5	5,66	1,0 ± 0,1	$2,2 \pm 0,5$	< 0,1	$0,3 \pm 0,1$
PCSK6	11,39	1,0 ± 0,1	651,4 ± 101,8	10,0 ± 0,9	32,1 ± 2,7
PCSK7	5,57	1,0 ± 0,1	$4,4 \pm 0,6$	1,6 ± 0,2	$1,0 \pm 0,2$
PCSK8 (S1P)	2,80	1,0 ± 0,3	3,9 ± 1,1	$1,0 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$
PCSK9	10,44	1,0 ± 0,1	< 0,1	661,3 ± 140,4	< 0,1

Tab. 14: Relative mRNA-Expression der PCSK-Proteasen in verschiedenen Zelltypen.

Die Transkriptmenge PCSK3 (Furin) ist in Fibroblasten und HEK-Zellen etwa gleich, während sie in HeLa-Zellen und Makrophagen ca. 22-fach bzw. 1000-fach stärker exprimiert wird. Die mRNA-Spiegel der Proteasen PCSK4 und PCSK5 sind in HEK-Zellen 3- bzw. 2-fach stärker exprimiert als in Fibroblasten. In Makrophagen sind dagegen die mRNA-Mengen beider Proteasen ca. 3-fach niedriger exprimiert als in Fibroblasten. In HeLa-Zellen war die PCSK4-mRNA im Vergleich zu Fibroblasten ca. 4-fach stärker exprimiert, während PCSK5-mRNA nicht nachweisbar war. Transkripte der Protease PCSK6 waren in HEK-und HeLa-Zellen bzw. Makrophagen ca. 650-, 10- bzw. 32-fach stärker exprimiert als in Fibroblasten. Die mRNA-Spiegel von PCSK7 und PCSK8 (S1P) waren in HeLa-Zellen und Makrophagen vergleichbar zu Fibroblasten. In HEK-Zellen waren die PCSK7- und PCSK8-mRNA ca. 4-fach stärker exprimiert als in den anderen untersuchten Zelltypen. Während die PCSK9-mRNA in HEK-Zellen und Makrophagen nicht nachgewiesen werden konnte, war sie in HeLa-Zellen ca. 660-fach höher exprimiert als in Fibroblasten. Die Daten zeigen, dass die Proteasen PCSK1, PCSK2 und PCSK9 in Makrophagen kaum oder gar nicht exprimiert werden. Auffällig war dagegen die besonders starke Expression der PCSK3-mRNA in Makrophagen.

3.3.2 Pharmakologische Inhibierung von Furin (PCSK3) in Makrophagen

Die *in-silico*-Analyse der Aminosäuresequenz der γ -Untereinheit ergab zwar keine potentielle Furin-Spaltstelle, jedoch ist diese Protease in Makrophagen besonders stark exprimiert (Tab. 14). Um zu untersuchen, ob Furin für die proteolytische Fragmentierung der γ -Untereinheit beteiligt ist, wurde die Protease-Aktivität in Makrophagen durch Inhibitoren blockiert. Die Furin-Inhibitoren I (Peptidyl-L-Chloromethylketon) und II (Polyarginin-Peptid) binden an das katalytische Zentrum von Furin und inhibieren dadurch die Furin-Aktivität (Abb. 19; Cameron *et al*, 2000). Primär kultivierte Makrophagen wurden 48 Stunden mit jeweils 100 μ M Inhibitoren behandelt (Cameron *et al*, 2000) und anschließend die γ -Untereinheit in Zellextrakten im Westernblot analysiert. In den Extrakten der unbehandelten Makrophagen konnten die drei Fragmente (28 kDa, 24 kDa und 23 kDa) der endogenen γ -Untereinheit beobachtet werden (Abb. 19, Spur 1). In den Extrakten der Makrophagen, die mit dem Furin-Inhibitor I behandelt wurden, konnten ebenfalls die Fragmente der γ -Untereinheit nachgewiesen werden (Spur 2). Die 28 kDa-Bande war jedoch stärker und die 24 kDa-Bande schwächer als in nichtbehandelten Makrophagen. Die Behandlung mit dem Furin-Inhibitor II führte ebenfalls zu einer veränderten Fragmentierung der γ -Untereinheit, da das 28 kDa-Fragment stärker und weniger vom 23 kDa-Fragment nachweisbar war im Vergleich zu Kontrollen (Spur 3). Das 24 kDa-Fragment konnte nicht nachgewiesen werden. Das Experiment zeigte, dass die Inhibierung von Furin die Spaltung der γ -Untereinheit in Makrophagen beeinflusst, wobei die Wirkung von Furin-Inhibitor II stärker ausgeprägt war.



Abb. 19: Inhibierung von Furin in Makrophagen. Primär kultivierte Makrophagen wurden für 48 Stunden mit den Furin-Inhibitoren I und II (jeweils 100 μ M) behandelt. Die Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot gegen die γ -Untereinheit analysiert. Die molaren Massen von Markerproteinen sind angegeben.

In einem zweiten Inhibierungsexperiment wurde der Furin-Inhibitor II in zwei verschiedenen Konzentrationen (a: $100 \ \mu$ M, b; $100 \ n$ M) eingesetzt.



anti y-Untereinheit

Abb. 20: DMSO-induzierte Veränderung des Fragmentierungsmusters der γ -Untereinheit. Primär kultivierte Makrophagen wurden für 48 Stunden mit den Furin-Inhibitoren I (100 μ M) und II (a: 100 μ M, b: 100 nM) behandelt. Makrophagen, die mit 1 % DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrolle. Die Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot gegen die γ -Untereinheit analysiert. Die molaren Massen von Markerproteinen sind angegeben. Da die Inhibitoren in DMSO gelöst waren, wurden Makrophagen zusätzlich mit 1 % DMSO ohne Inhibitorzugabe behandelt. In allen Extrakten ist eine Fragmentierung der γ-Untereinheit zu beobachten (Abb. 20). In den Extrakten von nicht-behandelten Makrophagen ist die 28 kDa-Bande nur schwach nachweisbar. In den Extrakten von Makrophagen, die mit den Furin-Inhibitoren oder mit DMSO behandelt wurden, ist diese Bande deutlich als Doppelbande zu sehen. Die in allen Exkrakten am stärksten exprimierte Bande entspricht dem 23 kDa-Fragment, die allein durch Zugabe von DMSO deutlich an Intensität abnimmt.

3.3.3 Depletion von PCSK3, PCSK7 und PCSK8 in Makrophagen mittels siRNA

Da die pharmakologische Inhibierung von Furin (PCSK3) keine eindeutigen Ergebnisse brachte, wurden potentielle PCSK-Kandidaten für die proteolytische Fragmentierung der y-Untereinheit mittels small interference (si)RNA in primär kultivierten Makrophagen depletiert. Die verwendeten siRNA-SMART-Pools[®] bestehen aus jeweils vier verschiedenen Oligonukleotiden. Neben PCSK3 wurden PCSK7 und PCSK8 (S1P) in die Analysen einbezogen, da durch die in-silico-Analyse potentielle Spaltmotive dieser Proteasen in der y-Untereinheit identifiziert wurden (Abb. 17). Dazu wurden primär kultivierte Makrophagen mit KontrollsiRNA bzw. PCSK3-, PCSK7- oder PCSK8-siRNA transfiziert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen geerntet oder ein zweites Mal transfiziert und nach weiteren 72 Stunden geerntet. Für Realtime-PCR-Analysen wurde die RNA aus den Zellen isoliert. Die relative Quantifizierung erfolgte durch die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode, wobei die mRNA-Expression in Kontroll-siRNA-transfizierten Makrophagen für die jeweilige Zeit auf 1 gesetzt wurde. Die PCSK3-Expression verringerte sich durch siRNA-Transfektion nach 3 Tagen auf etwa 25 % und nach 6 Tagen auf etwa 15 % (Abb. 21A) der Transkriptmenge von Zellen, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Die PCSK3-Depletion führte außerdem zu einer 1,3- bis 1,5-fachen Erhöhung des GNPTG-mRNA-Spiegels im Vergleich zu Kontrollen. Die siRNAvermittelte Depletion von PCSK7 reduzierte die PCSK7-mRNA nach 3 Tagen auf etwa 50 % und nach 6 Tagen auf etwa 40 % (Abb. 21B) der mRNA-Spiegel von Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen, während die GNPTG-Expression um das 1,5bis 2-fache erhöht war.

Die *PCSK8*-Depletion hatte nur einen geringen Effekt auf die Expression der *GNPTG*-mRNA (Abb. 21C). Die mRNA-Spiegel von *PCSK8* konnten nach 3 oder 6 Tagen nur auf 60 bzw. 50 % gesenkt werden.



Abb. 21: Analyse der mRNA-Expression nach Depletion von *PCSK3*, *PCSK7* oder *PCSK8* in Makrophagen. Primär kultivierte Makrophagen wurden mit siRNA spezifisch gegen *PCSK3*, *PCSK7* oder *PCSK8* für 3 oder 6 Tage behandelt. Die isolierte mRNA wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend durch Realtime-PCR analysiert. Eine Normalisierung erfolgte auf die mRNA-Expression von β -Actin. Die relative Expression in Makrophagen, die mit der Kontroll-siRNA für die jeweilige Zeit transfiziert wurden, wurde 1 gesetzt. Als Vergleich wurden die mRNA-Spiegel von *GNPTG* unter denselben Bedingungen gemessen. n = 1

Proteinextrakte von Makrophagen, die parallel zur RNA-Analyse unter den gleichen Bedingungen mit siRNA gegen die jeweiligen Proteasen behandelt wurden, wurden anschließend im Westernblot auf eine veränderte proteolytische Fragmentierung der γ -Untereinheit untersucht. In Zellextrakten von Makrophagen, die mit der KontrollsiRNA transfiziert wurden, konnten zwar alle 3 Fragmente der γ -Untereinheit sichtbar gemacht werden, wobei die 28 kDa und 24 kDa Fragmente nur schwach nachweisbar waren (Abb. 22A und B, Spur 1).



Abb. 22: Westernblot-Analyse nach Depletion von *PCSK3*, *PCSK7* und *PCSK8* in Makrophagen. Primär kultivierte Makrophagen wurden mit siRNA spezifisch gegen *PCSK3*, *PCSK7* (A) und *PCSK8* (B, C) für 6 Tage behandelt. Die Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot gegen die γ -Untereinheit (A, B) oder die β -Untereinheit (C) analysiert. Die Expression der Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente als Ladekontrolle. Die molaren Massen von Markerproteinen sind angegeben.

Die Depletion von *PCSK3* und *PCSK7* führte nach 6 Tagen zu einer deutlichen Verminderung des 28 kDa Fragmentes, während das 24 kDa Fragment im Vergleich zu den Kontrollen stärker detektierbar war. Die Depletion von *PCSK8* führte zu einer ähnlichen Veränderung des Fragmentierungsmusters, war jedoch nicht so stark ausgeprägt (Abb. 22B). Da PCSK8 (S1P) das α/β -Vorstufenprotein der GlcNAc-1-Phosphotransferase proteolytisch in die reife α - und β -Untereinheit spaltet (Marschner *et al*, 2011), wurde außerdem ein Westernblot gegen die β -Untereinheit durchgeführt. Die etwa 50 %-ige Depletion von *PCSK8* führte jedoch zu keiner verminderten Spaltung des α/β -Vorstufenprotein, da das Signal der β -Untereinheit nach densitometrischer Normierung zu GAPDH gleich stark ausgeprägt war als in Kontrollzellen.

Dieses Experiment zeigte, dass eine effektive Depletion nur für *PCSK3* nach zweimaliger siRNA-Transfektion in humane Makrophagen erreicht werden konnte. Außerdem führte die Depletion von *PCSK3*, *PCSK7* und *PCSK8* zu einer erhöhten Expression der *GNPTG*-mRNA. Das Fragmentierungsmuster der γ -Untereinheit war zwar nach Depletion der Proteasen verändert, allerdings war keine Akkumulation eines größeren Fragmentes zu beobachten. Daher können PCSK3, PCSK7 und PCSK8 mit großer Wahrscheinlichkeit für die Beteiligung an der Spaltung der γ -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase in Makrophagen ausgeschlossen werden.

4. Diskussion

4.1 Lentivirale Transduktion von primären Makrophagen

Die γ-Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase besteht aus 305 Aminosäuren und kann im Westernblot als 36 kDa Protein nachgewiesen werden. Dagegen wird die y-Untereinheit in humanen, primär kultivierten Makrophagen proteolytisch in drei Fragmente von 23 kDa, 24 kDa und 28 kDa gespalten (Abb. 6). Um die Spaltstellen in der y-Untereinheit zu identifizieren und damit Hinweise auf die beteiligte Protease zu erhalten, sollten die gespaltenen Fragmente aufgereinigt werden, um sie einer massenspektrometrischen Analyse unterziehen zu können. Als geeignete Methode zur Gewinnung ausreichender Mengen der Fragmente war die Überexpression der γ-Untereinheit als **GFP-Fusionsprotein** in humanen Makrophagen vorgesehen.

Generell ist der Gentransfer in primäre Zell-Linien schwieriger als in immortalizierte Zelllinien (Hamm et al, 2002). Die lipid-basierte Transfektion von primären Makrophagen und der immortalisierten Makrophagen-ähnlichen Zelllinie RAW264.7 mit der cDNA des Fusionsproteins γ -Untereinheit-GFP war nicht erfolgreich (Abb. 9). Eine schwache Expresson in primären Makrophagen konnte nur mit GFP-cDNA erzielt werden (Abb. 8). In der Arbeitsgruppe wurden außerdem kommerziell erhältliche Makrophagen-spezifische Transfektionsreagenzien, wie z. B. "JetPEITMmacrophage" (PolyPlus) und "PromoFectin-macrophage" (PromoCell), und die Transfektion über Elektroporation getestet. Beide Methoden erbrachten ebenfalls keine positiven Ergebnisse (Dr. S. Pohl, persönliche Mitteilung). Es sollte daher in dieser Arbeit ein System zur lentiviralen Transduktion von Makrophagen etabliert werden. Das hier verwendete HIV-1-basierte Transduktionssystem ist auch für nichtteilende Zellen anwendbar (Naldini et al, 1996). Die in der Literatur beschriebene Transduktionseffizienz von primär kultivierten Makrophagen mit diesem System lag zwischen 15 und 30 % (Schroers et al. 2000; Neil et al. 2001; Lu et al. 2003). Die Herstellung der lentiviralen Viruspartikel erfolgte durch Ko-Transfektion von den jeweiligen Vektorplasmiden (y-Untereinheit-GFP oder GFP in pLEGO-G2), dem Hüllproteinplasmid (pCMV-VSV-G), dem Verpackungsplasmid (pMDLg/pRRE) und das zur Virusvermehrung notwendige Rev-Plasmid (pRSV-Rev) in HEK-Zellen.

Die transfizierten Zellen exprimieren die Virusproteine, so dass Lentiviruspartikel produziert wurden, die ins Medium ausgeschleust wurden. Diese Überstände wurden abgenommen und für weitere Transduktionen von Zellen verwendet. Die Qualität der Virusüberstande wurde durch Transduktion von HEK-Zellen überprüft. Die Virusüberstände, die GFP oder γ -Untereinheit-GFP exprimierten, waren infektiös. Etwa 90 % der HEK-Zellen konnten erfolgreich transduziert werden (Abb. 11). Somit ist es gelungen, infektiöse lentivirale Überstande herzustellen. Die etablierte Methode kann von der Arbeitsgruppe für verschiedene Fragestellungen verwendet werden. Dafür ist nur eine Umklonierung der cDNA des zu untersuchenden Proteins in den bestehenden Transfervektor pLEGO-G2 notwendig.

Zur Transduktion von Makrophagen wurden Virusüberstande, die GFP oder das Fusionsprotein γ -Untereinheit-GFP exprimieren, eingesetzt. Durch Immunfluoreszenz-Analyse konnte gezeigt werden, dass 10 % der Makrophagen erfolgreich mit GFP transduziert werden konnten (Abb. 12). Die Rate liegt jedoch unter den in der Literatur beschriebenen Transduktionseffizienzen. Auch durch Westernblot-Analysen konnte das GFP-Protein nachgewiesen werden, wobei die Intensität des GFP-Signals mit zunehmender Virusmenge zunahm (Abb. 12). Die Transduktion von Makrophagen mit Virusüberständen, die γ -Untereinheit-GFP exprimieren, war nicht erfolgreich (Abb. 14 und 15). Hingegen konnten die immortalisierten, Makrophagen-ähnlichen RAW-Zellen mit GFP und γ -Untereinheit-GFP transduziert werden (Abb. 15). Die Effizienz war im Vergleich zu transduzierten HEK-Zellen jedoch wesentlich geringer.

Die endogenen proteolytischen Fragmente der γ -Untereinheit konnten in Makrophagen erst nach einer Kultivierungszeit von 14 Tagen nach Isolierung nachgewiesen werden. Die lentiviralen Überstände wurden deshalb am 9. Tag nach Isolierung auf die Makrophagen gegeben und nach weiteren 5 Tagen erfolgte die Analyse der Zellen. In der Literatur wurde beschrieben, dass sich die lentivirale Transduktionseffizienz von primären Makrophagen erheblich steigern lässt, wenn die lentiviralen Überstände direkt nach der Isolierung (2 Stunden nach dem Ausplattieren) auf die Makrophagen gegeben werden (Leyva *et al.* 2011). Dies konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt stehen der Abteilung keine experimentellen Mittel zur Verfügung, die Menge der γ-Untereinheit-Fragmente in primären humanen Makrophagen zu erhöhen.

4.2 Spaltung der γ-Untereinheit durch Proteasen der PCSK-Familie

Die proteolytischen Fragmente der γ-Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase sind im cis-Golgi-Apparat lokalisiert (Pohl et al, 2010). Es ist daher davon auszugehen, daß sich die Protease ebenfalls im Golgi-Apparat befindet. Die in-silico-Analyse der Aminosäuresequenz der y-Untereinheit ergab zwei potentielle Spaltstellen von Proteasen der Proprotein Convertase Subtilisin Kexin (PCSK)-Familie (Abb. 18). **PCSKs** sind hochkonservierte, Calcium-abhängige Serinproteasen, die im sekretorischen Weg (Golgi-Apparat, Endosomen, sekretorische Vesikel) und/oder an der Zelloberfläche lokalisiert sind (Seidah et al, 2008; Abb. 23).



Abb. 23: Schematische Darstellung der intrazellulären Lokalisation der Proteasen der PCSK-Familie. Nach Synthese und Faltung im ER werden die PCSKs zum *cis*-Golgi-Apparat transportiert. Bis auf PCSK8 (S1P) erfolgt ein Weitertransport der anderen PCSK-Mitglieder zum TGN. Von dort können PCSK1, PCSK2 und PCSK4 sekretorische Vesikel (SV) erreichen. PCSK3 und PCSK7 zirkulieren zwischen dem TGN, den Endosomen und der Plasmamembram. PCSK5, PCSK6 und PCSK9 werden in den Extrazellulärraum sezerniert, wobei PCSK5 und PCSK6 auch an Heparansulfatproteoglykane (HSPG) gebunden sein können (modifiziert nach Seidah & Prat, 2012).

Bisher wurden neun Mitglieder der PCSK-Familie in Säugetieren identifiziert (PCSK1-9; Abb. 24). Sie sind homolog zur Serinprotease Kexin in der Hefe und zu bakteriellen Subtilisinen (Fuller *et al*, 1989). PCSKs aktivieren durch post-translationale, proteolytische Prozessierungen eine Vielzahl von Vorläufer-proteinen, aber auch Hormone (z. B. Pro-Insulin), Wachstumsfaktoren und virale Hüllproteine (Steiner *et al*, 1980; Seidah & Prat, 2012).

Die PCSKs bestehen aus mehreren konservierten Domänen (Abb. 24). Auf ein Nterminales Signalpeptid, das die Translokation des Proenzyms in das ER ermöglicht, folgt die Prodomäne, die entscheidend für die Faltung und Aktivierung der Proteasen ist (Bergeron *et al*, 2000). Erst nach autokatalytischer Freisetzung der Prodomäne im ER oder im Golgi-Apparat erlangen die Enzyme ihre volle katalytische Aktivität (Seidah & Prat, 2012).



Abb. 24: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Proteasen der PCSK-Familie. Alle PCSKs besitzen ein N-terminales Signalpeptid, eine Prodomäne, eine katalytische Domäne und eine P-Domäne. Der C-Terminus ist variabel. Die Aminosäuren der katalytischen Triade und die Spaltmotive sind im Einbuchstabencode gezeigt.

Die stark konservierte katalytische Domäne enthält eine, für Serinproteasen typische, katalytischen Triade aus Ser, His und Asp. C-terminal von dieser Domäne liegt die P-Domäne, die essentiell für die Aktivität der Proteasen ist und die Calcium- und pH-Abhängigkeit reguliert (Zhou *et al*, 1998). PCSK3, auch bekannt als Furin, PCSK7 und PCSK8 besitzen wie Kexin aus der Hefe zusätzlich eine Transmembrandomäne (Abb. 24).

Die Spaltung der biologisch inaktiven Substrate erfolgt C-terminal von spezifischen Sequenzmotiven. PSCK1-7 spalten ihre Substrate C-terminal von basischen Aminosäuren (Seidah & Chretien, 1999). In den überwiegenden Fällen ist die Position P1 des Substrates mit einem Arginin und die Position P2 mit einem Lysin besetzt (Nomenklatur nach Schechter & Berger, 1967; Positionen N-terminal von der Spaltstelle werden mit P1, P2, ... bezeichnet, Positionen C-terminal zu der Spaltstelle mit P1', P2', ...). Viele PCSK-Substrate weisen N-terminal zu der Spaltstelle noch weitere basische Aminosäuren auf. PCSK8, auch bekannt als Site-1-Protease (S1P), spaltet dagegen hinter nicht-basischen Aminosäuren (Abb. 24; Sakai *et al*, 1998). PCSK9 aktiviert sich autokatalytisch durch Spaltung in der Sequenz ¹⁴⁹VFAQ¹⁵²↓ (Benjannet *et al*, 2004). Anschließend ist PCSK9 nicht mehr als Protease aktiv, sondern bindet Rezeptoren an der Zelloberfläche wie z. B. den LDL-Rezeptor (Horton *et al*, 2007).

Die *in-silico*-Analyse der Aminosäuresequenz der γ -Untereinheit ergab, dass die Proteasen PCSK1 und PCSK7 die γ -Untereinheit potentiell in der Sequenz ⁵²KR \downarrow D⁵⁴ bzw. ⁴⁸RLQAKR \downarrow D⁵⁴ (Abb. 17) spalten. Eine potentielle Spaltstelle der PCSK8 (S1P) ist in der γ -Untereinheit bei den Aminosäuren ²¹⁰RTLF \downarrow E²¹⁴ lokalisiert. Neben den Spaltmotiven der Substrate bestimmen die gewebespezifische Expression und subzelluläre Lokalisation der PCSKs die Selektivität dieser Proteasen (Tab. 15, Abb. 23; Bergeron *et al*, 2000). Um zu untersuchen, ob diese Proteasen in primär kultivierten Makrophagen exprimiert werden und somit potentielle Kandidaten für die Spaltung der γ -Untereinheit darstellen, wurden quantitative Realtime-PCR-Analysen durchgeführt (Tab. 14).

Protease (Synonym)	Gewebespezifische Expression ¹	Intrazelluläre Lokalisation ¹	Expression in Makrophagen ²
PCSK1	neuronal, endokrin	sekretorische Vesikel (Granula)	-
PCSK2	neuronal, endokrin	sekretorische Vesikel (Granula)	-
PCSK3 (Furin)	ubiquitär	TGN, Endosom, Zelloberfläche	++
PCSK4	Testes, Ovar, Plazenta	Zelloberfläche	+
PCSK5	Nebenniere, Darm, Leber, Ovar	extrazellulär, Zelloberfläche (gebunden an HSPG)	+
PCSK6	Muskel, Herz, Darm, Leber, Gehirn	extrazellulär, Zelloberfläche (gebunden an HSPG)	++
PCSK7	ubiquitär	TGN, Endosom, Zelloberfläche	+
PCSK8 (S1P)	ubiquitär	cis-Golgi-Apparat	+
PCSK9	Leber, Darm, Niere	TGN, Endosom, Zelloberfläche	-

Tab. 15: Gewebespezifische Expression und subzelluläre Lokalisation der PCSKs

¹ Angaben nach: Seidah & Prat, 2012; ² in dieser Arbeit bestimmten mRNA-Level in Relation zu humanen Fibroblasten (siehe Tab. 14); - nicht exprimiert, + exprimiert, ++ erhöht exprimiert

<u>PCSK1 und PCSK2</u> sind ausschließlich in sekretorischen Vesikeln von neuronalen und endokrinen Zellen lokalisiert (Abb. 24; Tab. 15) und prozessieren eine Vielzahl von Prohormonen und Neuropeptid-Vorläufern wie z. B. Pro-Insulin, Pro-Glucagon, Pro-Enkephalin oder Pro-Somatostatin, die erst nach Stimulus freigesetzt werden (Müller & Lindberg, 1999). *PCSK1* und *PCSK2* konnten auf mRNA-Ebene in Makrophagen nicht nachgewiesen werden (Tab. 14) und wurden daher für die proteolytische Fragmentierung der γ -Untereinheit verantwortlich zu sein, ausgeschlossen.

Furin (PCSK3), die am besten charakterisierte Protease der PCSK-Familie, aktiviert eine Vielzahl von Proproteinen wie z. B. Wachstumsfaktoren, Hormone, Rezeptoren, Serumproteine, Zelloberflächenproteine, Proteine der extrazellulären Matrix und virale Proteine (Thomas, 2002). Furin spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Biogenese von Lysosomen, weil sie die GlcNAc-1-Phosphodiesterase proteolytisch aktiviert (Do et al, 2002), die Phosphodiester zu M6P-Resten an lysosomalen Enzymen hydrosyliert (siehe Abb. 1). Furin wird ubiquitär exprimiert und ist im TGN, in Endosomen und an der Zelloberfläche, zwischen denen sie zirkuliert, lokalisiert (Abb. 23, Tab. 15). Im Vergleich zu Fibroblasten wurde eine 1000-fach erhöhte mRNA-Menge von Furin in Makrophagen bestimmt (Tab. 14). Es wurden daher Furin-Inhibierungsexperimente durchgeführt, obwohl die in-silico-Analyse kein Furin-Spaltmotiv in der γ -Untereinheit ergab. Die Furin-Inhibitoren I (Peptidyl-L-Chloromethylketon) und II (Polyarginin-Peptid) binden an das katalytische Zentrum von Furin und inhibieren dadurch die Furin-Aktivität (Cameron et al, 2000). Die Behandlung von Makrophagen mit dem Furin-Inhibitor II führte im Vergleich zu Kontrollen zu einer veränderten Fragmentierung der y-Untereinheit, da das 28 kDa-Fragment stärker und das 23 kDa-Fragment schwächer nachweisbar war (Abb. 19). Diese Beobachtung konnte in einem zweiten Experiment jedoch nicht bestätigt werden (Abb. 20). In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde die mRNA von Furin durch siRNA depletiert. Realtime-PCR-Analysen ergaben, dass die Furin-Expression durch siRNA-Transfektion nach 3 Tagen auf etwa 25 % und nach 6 Tagen auf etwa 15 % der Transkriptmenge von Zellen, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden, verringerte (Abb. 21). Auf Proteinebene führte die Depletion von Furin zu einer deutlichen Verminderung des 28 kDa-Fragmentes der γ-Untereinheit, während das 24 kDa-Fragment im Vergleich zu den Kontrollen stärker zu sehen war (Abb. 22). Diese Experimente zeigten, dass sich das Fragmentierungsmuster der γ -Untereinheit nach Depletion von Furin ändert, allerdings war keine Akkumulation eines größeren Fragmentes zu beobachten.

Daher ist Furin wahrscheinlich nicht für die Spaltung der γ -Untereinheit in Makrophagen verantwortlich oder beteiligt.

<u>PCSK4</u> wird ausschließlich germinal in Spermatozyten, in der Plazenta und in Makrophagen-ähnlichen Ovarzellen exprimiert und ist intrazellulär in sekretorischen Vesikeln lokalisiert (Abb. 23; Seidah *et al*, 1992; Qiu *et al*, 2005). Die *in-vivo*-Substrate von PCSK4 sind bisher nicht bekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *PCSK4* in geringen Mengen auch in primär kultivierten Makrophagen, Fibroblasten, HEK- und HeLa-Zellen exprimiert wird (Tab. 14). Aufgrund der germinalen Lokalisation von PCSK4 wurde jedoch ausgeschlossen, dass diese Protease die γ -Untereinheit spaltet.

<u>PCSK5 und PCSK6</u> weisen eine breite Gewebeverteilung auf und sind extrazellulär lokalisiert oder über eine C-terminale Cystein-reiche Region an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) gebunden und somit an die Plasmamembran assoziiert (Abb. 23) Sie aktivieren proteolytisch Proteine der extrazellulären Matrix wie z. B. Wachstumsfaktoren und Matrix-Metalloproteinasen (Seidah *et al*, 2008). Während nur geringe Mengen von *PCSK5*-mRNA in Makrophagen nachgewiesen werden konnte, wird *PCSK6* ca. 30-mal stärker als in humanen Fibroblasten exprimiert (Tab. 14). Aufgrund der extrazellulären Lokalisation von PCSK5 und PCSK6 und dem Vorkommen der γ -Untereinheit im *cis*-Golgi.Apparat wurden diese Proteasen nicht weiter untersucht.

<u>PCSK7</u> wird ähnlich wie Furin ubiquitär exprimiert und ist im TGN, in Endosomen und an der Zelloberfläche lokalisiert (Abb. 23, Tab. 15). Als *in-vivo*-Substrat wurde bisher nur der Transferrinrezeptor identifiziert, der an der Plasmamembran von PSCK7 gespalten wird (Oexle *et al*, 2011). *PCSK7* konnte in allen hier untersuchten humanen Zellen nachgewiesen werden (Tab. 14). Da die *in-silico*-Analyse ein Spaltmotiv für PCSK7 identifiziert hat, wurde PCSK7 durch siRNA depletiert. Die *PCSK7*-Transkriptmenge reduzierte sich im Vergleich zu Kontrollen nach 6 Tagen jedoch nur auf etwa 40 % (Abb. 21). Die Westernblot-Analyse zeigte ein ähnliches Fragmentierungsmuster der γ -Untereinheit wie in Furin-depletierten Zellen (Abb. 22). Da auch hier keine Akkumulation eines größeren Fragmentes oder der vollständigen γ -Untereinheit zu beobachten war, ist PCSK7 wahrscheinlich nicht für die Spaltung der γ -Untereinheit in Makrophagen verantwortlich.

S1P (PCSK8) ist ubiquitär exprimiert und aktiviert verschiedene Membranproteine im *cis*-Golgi-Apparat. Die Protease reguliert die Cholesterin- und Fettsäuresynthese durch die Spaltung der Transkriptionsfaktoren sterol element-binding proteins SREBP-1 und 2 (Sakai et al, 1998). S1P aktiviert außerdem Transkriptionsfaktoren (z. B. ATF6), die an der ER-Stress-Antwort beteiligt sind (Ye et al, 2000). Durch die S1P-vermittelte proteolytische Aktivierung des α/β-Vorläuferprotein der GlcNAc-1-Phosphotransferase ist sie essentiell für den M6P-abhängigen Transport lysosomaler Enzyme (Marschner et al, 2011). Eine potentielle Spaltstelle der PCSK8 (S1P) ist in der γ-Untereinheit bei den Aminosäuren ²¹⁰RTLF↓E²¹⁴ lokalisiert (Abb. 17). Daher wurde die mRNA von S1P ebenfalls durch siRNA depletiert. Der mRNA-Spiegel von PCSK8 konnte nach 3 oder 6 Tagen nur auf 60 bzw. 50 % gesenkt werden (Abb. 21). Die partielle Depletion von PCSK8 führte nicht zu einer signifikanten Veränderung der γ -Untereinheit-Fragmente (Abb. 22B). Da PCSK8 das α/β -Vorstufenprotein der GlcNAc-1-Phosphotransferase proteolytisch in die reife α- und β-Untereinheit spaltet (Marschner et al, 2011), wurde außerdem ein Westernblot gegen die β-Untereinheit durchgeführt. Die Depletion von 50 % der mRNA-Menge von *PCSK8* führte zu keiner verminderten Spaltung des α/β -Vorstufenprotein (Abb. 22C). In S1P-defizienten Zellen zeigte sich im Vergleich zu Kontrollen keine Veränderung der überexprimierten y-Untereinheit (Dr. S. Pohl, persönliche Mitteilung). Allerdings wurde die γ -Untereinheit in den Kontroll-Zellen auch nicht gespalten und zeigt, dass die Proteolyse der γ -Untereinheit ein zelltyp-spezifisches Ereignis ist.

<u>PCSK9</u> wird hauptsächlich in der Leber exprimiert und ist ein ungewöhnliches Mitglied der PCSK-Familie, da es selbst nur zur autokatalytischen Aktivierung als Protease aktiv ist. An der Zelloberfläche von Hepatocyten bindet PCSK9 den LDL-Rezeptor und initiiert dadurch die Clathrin-vermittelte Endocytose und den lysosomalen Abbau des LDL-Rezeptors (Attie & Seidah, 2005; Horton *et al*, 2007). In Makrophagen konnte die *PCSK9*-mRNA nicht nachgewiesen werden (Tab. 14). Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden im Ausschlussverfahren mögliche Kandidaten von Proteasen der PCSK-Familie untersucht, die für die Fragmentierung der y-Untereinheit in Makrophagen verantwortlich sein könnten. Kriterien dafür waren die Gewebe- und Zellexpression, die intrazelluläre Lokalisation und die vorhergesagten Spaltmotive der PCSK-Proteasen. Die mRNAs von PCSK1, PCSK2 und PCSK9 konnten in Makrophagen nicht nachgewiesen werden (Tab. 14). PCSK4, PCSK5 und PCSK6 konnten aufgrund der intrazellulären Lokalisation ausgeschlossen werden, da diese Proteasen an der Plasmamembran aktiv sind, während die Spaltprodukte der y-Untereinheit im cis-Golgi-Apparat lokalisiert sind (Tab. 15; Pohl et al, 2010). Für PCSK7 und S1P (PCSK8) konnten Spaltmotive in der y-Untereinheit identifiziert werden. Aufgrund der ubiquitären Expression und intrazellulären Lokalisation wurden Furin (PCSK3), PCSK7 und S1P (PCSK8) genauer untersucht. Inhibierungsstudien und Depletion der Proteasen erbrachten jedoch keine eindeutigen Ergebnisse. Die siRNA-vermittelte Depletion der mRNAs von PCSK7 und PCSK8 führte nur zu einer Reduktion von ca. 50 %. Außerdem lässt sich keine Aussage über die Proteinexpression der Proteasen nach mRNA-Depletion machen, da keine Antikörper kommerziell zur Verfügung standen, die einen endogenen Nachweis ermöglichten.

4.3 Ausblick

Die lentivirale Transduktion von primären Makrophagen lieferte keine ausreichend hohen Fragmentmengen an intrazellulären γ -Untereinheit-GFP. Um die Protease zu identifizieren, die die γ -Untereinheit in Makrophagen spaltet, könnte ein anderer experimenteller Ansatz gewählt werden, in dem die endogen Fragmente der γ -Untereinheit durch Gelfiltrationschromotagraphie aufgereinigt werden. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Fragmente in Fraktionen eluiert wurde, die Proteine mit geringem molaren Massen (15-45 kDa) enthalten, während die in COS7-Zellen überexprimierte, humane γ -Untereinheit ausschließlich in Fraktionen mit Proteinen oder Proteinkomplexen von hoher molarer Masse (~600 kDa) eluiert wurde (Pohl *et al*, 2010). Diese Daten haben gezeigt, dass die proteolytischen Fragmente der γ -Untereinheit nicht in der Lage sind, an den α - oder β -Untereinheiten der GlcNAc-1-Phosphotransferase zu binden, um den heterohexameren Komplex zu bilden. Um die Anreicherung der Fragmente von anderen endogenen Proteinen wesentlich zu erhöhen, sollte die Disulfid-bedingte Bildung zu einem 97 kDa Komplex ausgenutzt werden (Pohl et al, 2010). Die Gelfiltrationschromatographie sollte zunächst unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt werden, gefolgt vom Zusatz reduzierender Reagenzien. Dieses Verfahren wurde erfolgreich für die Aufreinigung der lysosomalen Arylsulfatase A ausgeführt (Waheed & Van Etten, 1979). Nach erfolgter Größenauftrennung der Makrophagenextrakte, werden die entsprechenden Fraktionen zunächst durch SDS-PAGE und Westernblot-Analyse gegen die y-Untereinheit auf positive Signale überprüft. Parallel werden die Fraktionen durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine im Gel mit Coomassie Brilliant Blue G-250 angefärbt. Die entsprechenden Gelbanden können dann aus dem Gel ausgeschnitten werden und die Spaltstellen der Fragmente durch massenspektrometrische Analyse identifiziert werden. Die Spaltstellen können anschliessend mit Spaltmotiven von Golgi-Proteasen verglichen werden. Ein entscheidender Fortschritt bei der Identifizierung der Protease wäre eine Makrophagen-Zelllinie, die ähnlich zu den primären humanen Makrophagen, die Spaltung zu den Fragmenten der y-Untereinheit zeigt. Erste Analysen zeigten jedoch, dass z. B. in der Linie RAW 264.7 keine Fragmentierung beobachtet werden konnte.

5 Zusammenfassung

Die GlcNAc-1-Phosphotransferase ist ein hexamerer Enzymkomplex ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$), der essentiell für die Generierung von M6P-Resten an neu synthetisierten lysosomalen Enzymen und ihren Rezeptor-abhängigen Transport zum Lysosom ist. Eine Zelltypspezifische proteolytsiche Spaltung der γ -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase in humanen Makrophagen führt zur Bildung von drei stabilen Fragmenten, die für die reduzierte Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase verantwortlich gemacht werden. Offensichtlich existieren in Makrophagen M6Punabhängige Transportmechanismen, die die Fehlsortierung von neu synthetisierten lysosomalen Enzymen kompensieren können.

- Im ersten Teil dieser Arbeit sollten die Spaltstellen in der γ-Untereinheit identifiziert werden, um damit Hinweise auf die beteiligte Protease zu erhalten. Dafür sollte die γ-Untereinheit als C-terminales GFP-Fusionsprotein in Makrophagen lentiviral überexprimiert und die Fragmente aufgereinigt werden. Das lentivirale Expressionssystem wurde erfolgreich im Labor etabliert und konnte zur Transduktion von HEK-Zellen und der Makrophagen-ähnlichen RAW-Zelllinie verwendet werden. Die Transduktion von primären humanen Makrophagen war jedoch nicht erfolgreich. Somit konnten keine ausreichenden Mengen der γ-Untereinheit-Fragmente für eine massenspektrometrische Analyse gewonnen werden.
- 2. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die neun Proteasen der *Proprotein Convertase Subtilisin Kexin* (PCSK)-Familie als mögliche Kandidaten für die Fragmentierung der γ-Untereinheit in Makrophagen untersucht. Kriterien waren zunächst die Gewebe- und Zellexpression, die durch vergleichende quantitative mRNA-Expressionsanalysen in verschiedenen humanen Zelllinien durchgeführt wurden. Die Proteasen Furin (PCSK3), PCSK7 und S1P (PCSK8) waren in Makrophagen exprimiert. Für PCSK7 und S1P (PCSK8) konnten außerdem *in-silico* Spaltmotive in der γ-Untereinheit identifiziert werden. In weiterführenden Experimenten sollte die Rolle von PCSK3, PCSK7 und PCSK8 für die Regulation des Transports lysosomaler Enzyme untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P (2003), In: Molecular biology of the cell, 4th edition, New York: Garland Science
- Attie AD & Seidah NG (2005) Dual regulation of the LDL receptor-some clarity and new questions. *Cell Metab*1: 290-292.
- Ballabio A & Gieselmann V (2009) Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta* 1793, 684-696.
- Bao M, Booth JL, Elmendorf BJ & Canfield WM (1996) Bovine UDP-Nacetylglucosamine:lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1phosphotransferase. I. Purification and subunit structure. *J Biol Chem* 271: 31437-31445.
- Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, Mayne J, Wickham L, Jin W, Asselin MC, Hamelin J, Varret M, Allard D, Trillard M, Abifadel M, Tebon A, Attie AD, Rader DJ, Boileau C, Brissette L, Chretien M, Prat A & Seidah NG (2004) NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem* 279: 48865-48875.
- Bergeron F, Leduc R & Day R (2000) Subtilase-like pro-protein convertases: from molecular specificity to therapeutic applications. *J Mol Endocrinol* 24: 1-22.
- Braulke T & Bonifacino JS (2009) Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* 1793: 605-614.
- Braulke T, Raas-Rothschild A & Kornfeld S (2013) I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy: Disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization.
 In: *The online metabolic and molecular basis of inherited diseases*, Valle D BA, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, Scriver CR, Sly WS, Bunz F, Gibson KM, Mitchell G (ed). www.ommbid.com.
- Cameron A, Appel J, Houghten RA, Lindberg I (2000) Polyarginines are potent furin inhibitors. *J Biol Chem* 275: 36741-36749.
- Canuel M, Korkidakis A, Konnyu K & Morales CR (2008) Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H. *Biochem Biophys Res Commun* 373: 292-297.
- Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC & Wolf DE (1988) Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 8790-8794.

- Cronin J1, Zhang XY, Reiser J (2005) Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther* 5: 387-398.
- 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: 276-284.
- Davis HE, Morgan JR, Yarmush ML (2002) Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophys Chem* 97: 159-172.
- de Duve C (1983) Lysosomes revisited. Eur J Biochem 137: 391-397.
- Do H, Lee WS, Ghosh P, Hollowell T, Canfield W, Kornfeld S (2002) Human mannose 6-phosphate-uncovering enzyme is synthesized as a proenzyme that is activated by the endoprotease furin. *J Biol Chem* 277: 29737-29744.
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72: 8463-8471.
- Encarnação M, Kollmann K, Trusch M, Braulke T & Pohl S (2011) Posttranslational modifications of the gamma-subunit affect intracellular trafficking and complex assembly of GlcNAc-1-phosphotransferase. *J Biol Chem* 286: 5311-5318.
- Franke M, Braulke T, Storch S (2013) Transport of the GlcNAc-1 phosphotransferase alpha/beta-subunit precursor protein to the Golgi apparatus requires a combinatorial sorting motif. *J Biol Chem* 288: 1238-1249.
- Fuller RS, Brake AJ & Thorner J (1989) Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science* 246: 482-486.
- Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19: 71-82.
- Germain RN (1995) The biochemistry and cell biology of antigen presentation by MHC class I and class II molecules. Implications for development of combination vaccines. *Ann N Y Acad Sci* 754: 114-125.
- Ghosh P, Dahms NM & Kornfeld S (2003) Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 202-212.
- Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol 3: 23-35.
- Hamm A, Krott N, Breibach I, Blindt R, Bosserhoff AK (2002) Efficient transfection method for primary cells.*Tissue Eng* 8: 235-245.
- Hasan MT, Subbaroyan R, Chang TY (1991) High-efficiency stable gene transfection using chloroquine-treated Chinese hamster ovary cells. Somat Cell Mol Genet 17: 513-517.

- Hasilik A & Neufeld EF (1980) Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts.Synthesis as precursors of higher molecular weight. *J Biol Chem* 255: 4937-4945.
- Helenius A & Aebi M (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73: 1019-1049.
- Horton JD, Cohen JC & Hobbs HH (2007) Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem Sci* 32: 71-77.
- Klein AD & Futerman AH (2013) Lysosomal storage disorders: old diseases, present and future challenges. *Pediatr Endocrinol Rev* 11: 59-63.
- Kollmann K, Pohl S, Marschner K, Encarnação M, Sakwa I, Tiede S, Poorthuis BJ, Lübke T, Müller-Loennies S, Storch S & Braulke T (2010) Mannose phosphorylation in health and disease. *Eur J Cell Biol* 89: 117-123.
- Kudo M, Bao M, D'Souza A, Ying F, Pan H, Roe BA & Canfield WM (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: 36141-36149.
- Leroy JG & DeMars RI (1967) Mutant Enzymatic and Cytological Phenotypes in Cultured Human Fibroblasts. *Science* 157: 804-806.
- Leyva FJ1, Anzinger JJ, McCoy JP Jr, Kruth HS (2011) Evaluation of transduction efficiency in macrophage colony-stimulating factor differentiated human macrophages using HIV-1 based lentiviral vectors. *BMC Biotechnol* 11: e13
- Liu H, Shi B, Huang CC, Eksarko P, Pope RM (2008) Transcriptional diversity during monocyte to macrophage differentiation. *Immunol Lett* 117: 70-80.
- Lu Y, Liu C, Zeng L, Lin Z, Dewhurst S, Gartner S, Planelles V (2003) Efficient gene transfer into human monocyte-derived macrophages using defective lentiviral vectors. *Cell Mol Biol* 49: 1151-1156.
- Makrypidi G, Damme M, Muller-Loennies S, Trusch M, Schmidt B, Schluter H, Heeren J, Lubke T, Saftig P, Braulke T (2012) Mannose 6 dephosphorylation of lysosomal proteins mediated by acid phosphatases Acp2 and Acp5. *Mol Cell Biol* 32: 774-782.
- Marschner K, Kollmann K, Schweizer M, Braulke T & Pohl S (2011) A key enzyme in the biogenesis of lysosomes is a protease that regulates cholesterol metabolism. *Science* 333: 87-90.
- Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A (2006) Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol.* 177: 7303-7311.
- Müller L, Lindberg I (1999) The cell biology of the prohormone convertases PC1 and PC2. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 63: 69-108.

- Muschol N, Matzner U, Tiede S, Gieselmann V & Braulke T (2002) Secretion of phosphomannosyl-deficient arylsulphatase A and cathepsin D from isolated human macrophages. *Biochem J.* 368: 845-853.
- Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science 272: 263-267.
- Neil S, Martin F, Ikeda Y, Collins M (2001) Postentry restriction to human immunodeficiency virus-based vector transduction in human monocytes. *J Virol* 75: 5448-5456.
- Oexle K, Ried JS, Hicks AA, Tanaka T, Hayward C, Bruegel M, Gogele M, Lichtner P, Muller-Myhsok B, Doring A, Illig T, Schwienbacher C, Minelli C, Pichler I, Fiedler GM, Thiery J, Rudan I, Wright AF, Campbell H, Ferrucci L, Bandinelli S, Pramstaller PP, Wichmann HE, Gieger C, Winkelmann J, Meitinger T (2011) Novel association to the proprotein convertase PCSK7 gene locus revealed by analysing soluble transferrin receptor (sTfR) levels. *Hum Mol Genet* 20: 1042-1047.
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D (1993) Production of high-titer helperfree retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8392-8396.
- Pohl S, Marschner K, Storch S & Braulke T (2009a) Glycosylation- and phosphorylation-dependent intracellular transport of lysosomal hydrolases. *Biol Chem* 390: 521-527.
- Pohl S, Tiede S, Castrichini M, Cantz M, Gieselmann V & Braulke T (2009b) Compensatory expression of human N-Acetylglucosaminyl-1-phosphotransferase subunits in mucolipidosis type III gamma. *Biochim Biophys Acta* 1792: 221-225.
- Pohl S, Tiede S, Marschner K, Encarnação M, Castrichini M, Kollmann K, Muschol N, Ullrich K, Müller-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: 23936-23944.
- Qian Y, Lee I, Lee WS, Qian M, Kudo M, Canfield WM, Lobel P & Kornfeld S (2010) Functions of the alpha, beta, and gamma subunits of UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. J Biol Chem 285: 3360-3370.

- Qiu Q, Basak A, Mbikay M, Tsang BK, Gruslin A (2005) Role of pro-IGF-II processing by proprotein convertase 4 in human placental development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11047-11052.
- 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 WM (2000)
 Molecular basis of variant pseudo-hurler polydystrophy (mucolipidosis IIIC). J Clin Invest 105: 673-681.
- Rapoport TA (2008) Protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *FEBS J* 275: 4471-4478.
- Robbins CS & Swirski FK (2010) The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. *Cell Mol Life Sci* 67: 2685-2693.
- Schmittgen TD & Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3: 1101-1108.
- Schröder BA, Wrocklage C, Hasilik A & Saftig P (2010) The proteome of lysosomes. *Proteomics* 10: 4053-4076.
- Schroers R, Sinha I, Segall H, Schmidt-Wolf IG, Rooney CM, Brenner MK, Sutton RE, Chen SY (2000) Transduction of human PBMC-derived dendritic cells and macrophages by an HIV-1-based lentiviral vector system. *Mol Ther* 1: 171-179.
- Sakai J, Nohturfft A, Goldstein JL & Brown MS (1998) Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies. *J Biol Chem* 273: 5785-5793.
- Schechter I & Berger A (1967) On the size of the active site in proteases. *Biochem Biophys Res Commun* 27: 157-162.
- Seidah NG, Day R, Hamelin J, Gaspar A, Collard MW, Chretien M (1992) Testicular expression of PC4 in the rat: molecular diversity of a novel germ cell-specific Kex2/subtilisin-like proprotein convertase. *Mol Endocrinol* 6: 1559-1570.
- Seidah NG & Chretien M (1999) Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res* 848: 45-62.
- Seidah NG, Mayer G, Zaid A, Rousselet E, Nassoury N, Poirier S, Essalmani R & Prat A (2008) The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1111-1125.
- Seidah NG & Prat A (2012) The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nat Rev Drug Discov* 11: 367-383.
- Stafford JL, Neumann NF & Belosevic M (2002) Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev Microbiol* 28: 187-248.

- Steiner DF, Quinn PS, Chan SJ, Marsh J & Tager HS (1980) Processing mechanisms in the biosynthesis of proteins. *Ann N Y Acad Sci* 343: 1-16.
- Thomas G (2002) Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 753-766.
- Tiede S, Cantz M, Raas-Rothschild A, Muschol N, Bürger F, Ullrich K, Braulke T (2004) A novel mutation in UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase gamma subunit (GNPTAG) in two siblings with mucolipidosis type III alters a used glycosylation site. *Hum Mutat* 24: 535.
- Tiede S, Storch S, Lübke T, Henrissat B, Bargal R, Raas-Rothschild A & Braulke T (2005) Mucolipidosis II is caused by mutations in GNPTA encoding the alpha/beta GlcNAc-1-phosphotransferase. *Nat Med* 11: 1109-1112.
- van Furth R & Cohn ZA (1968) The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 128: 415-435.
- Waheed A & Van Etten RL (1979) The monomer-dimer association of rabbit liver arylsulfatase A and its relationship to the anomalous kinetics. Arch Biochem. Biophys: 194: 215-225.
- Weber K, Bartsch U, Stocking C & Fehse B (2008) A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther* 16: 698-706.
- Yan Q & Lennarz WJ (1999) Oligosaccharyltransferase: a complex multisubunit enzyme of the endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun* 266: 684-689.
- Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. Mol Cell 6: 1355-1364.
- Zhou A, Martin S, Lipkind G, LaMendola J & Steiner DF (1998) Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *J Biol Chem* 273: 11107-11114.

7 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	complementary DNA
C _T	Cycle of treshhold
DAPI	4',6-Diamin-2-Phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsaeure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fötales Kälberserum
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung ($g = 9,78 \text{ m/s}^2$)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
γ-GFP	γ-Untereinheit, C-terminal mit GFP fusioniert
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
HBS	Hepes-buffered saline
HCl	Chlorwasserstoff
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hs	Homo sapiens
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-R	LDL-Rezeptoren
---------	--
LeGO	Lentivirus "Gene Ontology"
МΦ	Makrophagen
M6P	Mannose-6-Phosphat
MHC	Major Histocompatibility Complex
MPR	Mannose-6-Phosphat Rezeptoren
mRNA	messenger RNA
MLII	Mucolipidose II
MLIII	Mucolipidose III
NP-40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PCSK	Proprotein convertase subtilisin kexin
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Para-Formaldehyd
PNGaseF	Protein N-Glykosidase F
RNA	Ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
S1P	Site-1-Protease
SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	small interfering RNA
SV	sekretorische Vesikel
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N´,N´,-Tetramethylethylendiamin
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
UE	Untereinheit
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	Ultra-violett
VSV	Vesikuläres Stomatitis-Virus

Anniosaure-Duchstaben-Coue			
Alanin	А	Ala	
Arginin	R	Arg	
Asparagin	Ν	Asn	
Aspartat	D	Asp	
Cystein	С	Cys	
Glutamat	Е	Gln	
Glutamin	Q	Glu	
Glycin	G	Gly	
Histidin	Н	His	
Isoleucin	Ι	Ile	
Leucin	L	Leu	
Lysin	Κ	Lys	
Methionin	М	Met	
Phenylalanin	F	Phe	
Prolin	Р	Pro	
Serin	S	Ser	
Threonin	Т	Thr	
Tryptophan	W	Trp	
Tyrosin	Y	Tyr	
Valin	V	Val	

Aminosäure-Buchstaben-Code

8 Kongressbeiträge

Poster:

- Sandra Pohl, Katrin Marschner, Bastian Thies, Luce Laverne Darnell, Thomas Braulke SFB 877: Proteolyse als regulatorisches Ereignis in der Pathophysiologie "dies academicus" an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg, 08.07.2011, Hamburg (1. Posterpreis)
- Bastian Thies, Luce Laverne Darnell, Thomas Braulke, Sandra Pohl *Proteolysis-mediated regulation of the GlcNAc-1-phosphotransferase in human macrophages* Symposium der Integrated Research Training Group (IRTG) des Sonderforschungsbereiches (SFB) 877,,Proteases & Pathophysiology" 26.- 27.09.2011, Kiel

9 Danksagung

Prof. Dr. Thomas Braulke möchte ich für die Bereitstellung des Themas und für die engagierte Unterstützung dieser Arbeit danken.

Dr. Sandra Pohl danke ich für die wunderbare Betreuung, die extreme Geduld und Verständnis. Alle schematischen Abbildungen dieser Arbeit wurden von ihr angefertigt und zur Verfügung gestellt.

Bei Dr. med. Bastian Thies bedanke ich mich für die hervorragende Einarbeitung, die Beratungen und die Ermutigungen.

Dem SFB877 danke ich für die finanzielle Unterstützung. Prof. Dr. Fritz Nolte aus dem Institut für Immunologie möchte ich für die externe Betreuung danken.

Dr. Kerstin Cornils aus der Klinik für Stammzelltransplantation danke ich für die Einführung in die Techniken zur lentiviralen Transduktion.

Johannes Brand danke ich für seine unendliche Hilfe und Mitarbeit. Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen in dieser Arbeit wurden von ihm durchgeführt.

Ich möchte mich bei der Arbeitsgruppe Biochemie der Kinderklinik für ihre Hilfsbereitschaft, für das sehr gute Laborklima und den Spaß während der Arbeit bedanken, besonders bei Raffaela, Jana, Georgia, Sylvia, Katrin, Lisa, Pieter, Mine, Sandra, Jessica und Melanie.

Ich möchte mich auch bei meinen Freunden für ihre Unterstützung, Ermutigungen und Gebete bedanken.

Mein tiefster und herzlichster Dank geht an Gott und an meine Eltern und Geschwister, ohne die ich es einfach nicht geschafft hätte.

Meinem Mann, Eric Nono Ghomsi, danke ich vom ganzen Herzen. Er hat mich nie aufgegeben und hat immer an mich, an uns geglaubt.

10 Lebenslauf Luce Laverne Darnell

Entfällt	aus	datenschutzrechtlichen	Gründen.
Entfällt	aus	datenschutzrechtlichen	Gründen

•

11 Eidesstattliche Versicherung

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

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: