Dissertation Zur Erlangung das akademischen Grades Doctor rerum naturalium

Proteolytische Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase

Vorgelegt von

Sarah Klünder

beim Fachbereich Biologie, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

Hamburg 2014

Tag der Disputation: 20.02.2015

Folgende Gutachter empfehlen die Annahme der Dissertation:

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Braulke
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Streit

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Mannose-6-Phosphat-abhängiger Transport löslicher lysosomaler Enzyme.	1
1.2	Struktureller Aufbau, Transport und enzymatische Aktivierung der GlcNA	c-1-
	Phosphotransferase	3
1.3	Domänenstruktur des α/β -Vorstufenproteins der GlcNAc-1-	
	Phosphotransferase	5
1.4	Defekte der GlcNAc-1-Phosphotransferase	7
1.4.1	Struktureller Aufbau der Site-1-Protease	7
1.4.2	Funktion der Site-1-Protease	8
1.4.3	Defekte der Site-1-Protease	10
1.4.4	Struktureller Aufbau und Funktion der Site-2-Protease	12
1.4.5	Defekte der Site-2-Protease	13
2.	ZIELSTELLUNG	15
3.	MATERIAL UND METHODEN	16
3.1	Material	16
3.1.1	Geräte	16
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	17
3.1.3	Chemikalien, Reagenzien und Kits	18
3.1.4	DNA- und Molekulargewichtstandards	20
3.1.5	Vektoren und cDNA-Konstrukte	20
3.1.6	Primer und Sonden	21
3.1.7	Zellen, Kulturmedien und Lösungen	22
3.1.8	Antikörper	22
3.1.9	Software	23
3.2	Methoden	24
3.2.1	Zellbiologische Methoden	24
3.2.1.1	Allgemeines	24
3.2.1.2	Kultivierung von Zelllinien	24
3.2.1.3	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen	24

I

3.2.1.4	Kultivierung und Selektionierung von Site-1- und Site-2-Protease- defizienten	
	Zellen	25
3.2.1.5	Konditionierung von Medien	
3.2.1.6	Transiente Transfektion von Zellen	
3.2.1.7	Metabolische Markierung von Proteinen mit [³⁵ S]-Methionin	27
3.2.1.8	Endozytose von [¹²⁵ I]-Arylsulfatase B	27
3.2.1.9	[¹²⁵ I]-Arylsulfatase B-Bindungsassay	28
3.2.1.10	Endozytose von AlexaFluor [®] -Transferrin	28
3.2.1.11	Fluoreszenzmikroskopie	29
3.2.2	Biochemische Methoden	29
3.2.2.1	Ernten von Zellen und Herstellung von Zelllysaten	29
3.2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen	.30
3.2.2.3	Deglykosylierung von Proteinen	.30
3.2.2.4	Immunpräzipitation von metabolisch markierten Proteinen	.30
3.2.2.5	SDS-PAGE	.31
3.2.2.6	Fluorographie	32
3.2.2.7	Westernblot-Analyse	32
3.2.2.8	Messung von Enzymaktivitäten	.33
3.2.2.9	Bestimmung der GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität	34
3.2.2.10	GFP-Trap [®] -Beads- <i>Pulldown</i>	.35
3.2.2.11	Größenausschluss-Chromatographie	
3.2.3	Molekularbiologische Methoden	.37
3.2.3.1	Kultivierung und Lagerung von E. coli	.37
3.2.3.2	Transformation von Plasmiden in E. coli	.38
3.2.3.3	Plasmidisolierung aus E. coli	.38
3.2.3.4	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	.38
3.2.3.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	
3.2.3.6	Restriktion von DNA	
3.2.3.7	Ligation on DNA	
3.2.3.8	Agarosegelelektrophorese	39
3.2.3.9	Polymerasekettenreaktion	
3.2.3.10	Sequenzierung von DNA	41

3.2.3.11	Extraktion von RNA aus kultivierten Zellen42
3.2.3.12	Synthese von cDNA
3.2.3.13	Quantitative Realtime-PCR42
3.2.3.14	Statistische Auswertung der Messdaten
4.	ERGEBNISSE44
4.1	Proteolytische Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase durch die Site-1
	Protease
4.1.1	Spaltung des α/β -Vorstufenproteins durch die Site-1-Protease45
4.1.2	Untersuchung der Interaktion zwischen der Site-1-Protease und der GlcNAc-1-
	Phosphotransferase
4.1.3	Bedeutung der N-Glykosylierung für den Transport und die Aktivierung der
	GlcNAc-1-Phosphotransferase
4.1.4	Bedeutung von Calcium für den Transport und die Aktivierung der GlcNAc-1-
	Phosphotransferase
4.1.5	Bedeutung des zellulären Cholesterol-Gehaltes für den Transport lysosomaler
	Enzyme
4.1.5.1	Auswirkung von Veränderungen des zellulären Cholesterol-Gehaltes auf die
	Expression des LDL-Rezeptors
4.1.5.2	Untersuchung des Transportes und der proteolytischen Aktivierung der
	GlcNAc-1-Phosphotransferase
4.1.5.3	Untersuchung der Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase und des
	Transports lysosomaler Enzyme
4.1.5.4	Einfluss von Cholesterol auf die M6P-Rezeptor vermittelte Endozytose65
4.2	Rolle der Site-1- und Site-2-Protease für die Funktion von Lysosomen68
4.2.1	Expression und Spaltung des α/β -Vorstufenproteins in S1P- und S2P-
	defizienten Zellen
4.2.2	Analysen zur lysosomalen Funktion in S1P- und S2P-defizienten Zellen72
4.2.2.1	Sortierung lysosomaler Enzyme72
4.2.2.2	Akkumulation von Speichermaterial in den Lysosomen S1P- und S2P-
	defizienter Zellen
4.2.2.3	Veränderte Mitochondrienmorphologie in S1P- und S2P-defizienten Zellen77
4.2.3	Rezeptor-vermittelte Endozytose in S1P- und S2P-defizienten Zellen78
	Ш

4.2.3.1	Endozytose von [¹²⁵ I]Arylsufatase B
4.2.3.2	Endozytose von Alexa Fluor [®] 546-markiertem Transferrin
5.	DISKUSSION84
5.1	Proteolytische Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase durch die Site-1
	Protease
5.1.1	Interaktion zwischen der GlcNAc-1-Phosphotransferase und der Site-1-
	Protease
5.1.2	Rolle von posttranslationalen Modifikationenen des α/β -Vorstufenproteins für
	die proteolytische Aktivierung
5.1.3	Rolle von Calcium für die proteolytische Aktivierung des α/β -
	Vorstufenproteins
5.1.4	Rolle von Cholesterol für den Transport und die proteolytische Aktivierung der
	α/β -Vorstufenproteins
5.2	Gestörte zelluläre Homeostase in Site-1- und Site-2-Protease-defizienten
	Zellen
5.3	Rolle der Site-2-Protease für die proteolytische Prozessierung des α/β -
	Vorstufenproteins
5.4	Lysosomale Dysfunktion und gestörte Rezeptor-vermittelte Endozytose in Site
	2-Protease-defizienten Zellen
6.	ZUSAMMENFASSUNG104
7.	LITERATURVERZEICHNIS106
Publik	ATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE120
DANKS	AGUNG123
Erkläi	RUNG124

Abkürzungsverzeichnis

Neben den hier aufgeführtet Abkürzungen wurden die gängigen SI-Einheiten verwendet. Alle englischen und lateinischen Abkürzungen und Wörtet, deren Übersetzung nicht gebräuchlich ist, sind kursiv dargestellt.

× g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
Abb.	Abbildung
ABCA1	adenosin triphosphate-binding casset A1
ADAM	a disintegrin and metalloprotease
APS	Ammoniumpersulfat
ATF	activating transcription factor
BDNF	brain-derived neurotropic factor
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumine
cDNA	complementary DNA
CHO-7	Zelllinie aus Hamster-Ovarien (chinese hamster ovary)
COP	coat protein
CREB	cAMP-response element-binding protein
CT	cycle of threshold
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMAP	DNA methyltransferase 1 associated protein 1
DMEM	Dulbeccoøs Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylene diamine teraacetic acid)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al	und andere

EtBr	Ethidiumbromid
FKS	Fötales Kälberserum
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GM130	Golgi-Matrixprotein 130
GNPATB	GlcNAc-1-phosphotransferase, α/β -Vorstufenprotein
GNPTG	GlcNAc-1-phosphotransferase, y-Untereinheit
Ham's F12	Spezialmedium (F-12 Nutrient Mixture Ham)
HEK	human embryonic kidney-Zelllinie
Hela	humane Zelllinie eines Zervixkarzinoms (von Patientin Henrietta Lacks)
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
I-CliP	intramembrane-cleaving protease
IgG	Immunoglobulin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
ki	knock in
LAMP1	lysosome associated membrane protein 1
LB	Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien (Luria-Bertani)
LDL	low density lipoprotein
LPDS	Lipoprotein-defizientes Serum
M6P	Mannose-6-Phosphat
MBTPS	membrane-bound transcription factor peptidase
miRNA	MicroRNA
ML	Mukolipidose
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mRNA	messenger RNA
NBCS	newborn calf serum
NP-40	Nonidet P-40
OASIS	old astrocyte specifically induced substance
OD	optische Dichte
OG	n-Octylglucosid
P/S	Penicillin/Streptomycin

Polyacrylamid
Polyacrylamidgelelektrophorese
phosphate-buffered saline
Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
Protein-Disulfid-Isomerase
Paraformaldehyd
Peptid-N-Glykosidase F
2,5-Diphenyloxazol
Ribonukleinsäure
Raumtemperatur
Site-1-Protease
Site-2-Protease
SREBP cleavage-activating protein
Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
Site-1-Protease-defiziente CHO-K1-Zellen
sterol regulatory element
sterol regulatory element binding protein
single chain fragment-Antikörper, der spezifisch M6P-Reste erkennt
Tris-Acetat-EDTA
Tris-buffered saline
N,N,N',N',-Tetramethylethylenddiamin
trans-Golgi-Netzwerk
Uridindiphosphat
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Ultraviolett
Wildtyp
zum Beispiel
Zentrum für Molekulare Neurobiologie
α-Fukosidase
α-Mannosidase
α-Mannosidase β-Galaktosidase

1. EINLEITUNG

1.1 Mannose-6-Phosphat-abhängiger Transport löslicher lysosomaler Enzyme

Lysosomen sind membranumschlossene Organellen in Eukaryonten in denen Makromoleküle wie z. B. Proteine, Fettsäuren, Kohlenhydrate und Nukleinsäuren durch lösliche lysosomale Enzyme abgebaut werden (de Duve, 1983). Diese Makromoleküle werden über sekretorische, endozytotische, autphagische und phagozytotische Wege zu den Lysosomen transportiert (Luzio et al, 2007). Bisher sind mehr als 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 \leq 5), das durch membranständige, vesikuläre ATP-abhängige Protonenpumpen gewährleistet wird (Cuppoletti et al, 1987). Weiterhin beinhaltet die lysosomale Membran 140-300 Membranproteine, um die abgebauten Produkte und Metabolite ins Cytosol zu transportieren und der Zelle zum Aufbau neuer Makromoleküle zur Verfügung zu stellen (Chapel et al, 2013; Schröder et al, 2007). Die Biogenese von Lysosomen erfordert eine kontinuierliche Substitution löslicher lysosomaler Enzyme und lysosomaler Membranproteine. Lösliche lysosomale Enzyme werden am rauhen endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und co-translational in das ER-Lumen inseriert. Dort werden sie anschließend mit N-Glykanen modifiziert. Hierfür wird eine vorgefertigte Oligosaccharidstruktur (GlcNAc₂Man₉Glc₃) durch eine Oligosaccharyltransferase auf einen Asparaginrest in der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr (X = alle Aminosäuren außer Prolin) des noch wachsenden Peptids übertragen (Kornfeld & Kornfeld, 1985). Durch die Glukosidasen I und II werden zwei Glukosereste entfernt. Die Glykoproteine binden nun an die Chaperone Calnexin und Calretikulin was zur Faltung des Peptids beiträgt (Trombetta & Helenius, 1998). Über COPII-Vesikelvermittelten Transport werden die N-glykosylierten lysosomalen Enzyme vom ER zum cis-Golgi-Apparat transportiert. Für den effizienten Weitertransport zu den Lysosomen benötigen die löslichen lysosomalen Enzyme Mannose-6-Phosphat-(M6P)-Reste (Pohl et *al*, 2009a).

Die Generierung des M6P-Restes erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen. Zunächst überträgt die *N*-acetylglucosamin-(GlcNAc)-1-Phosphotransferase einen GlcNAc-1-Phosphatrest von dem Phosphatdonor UDP-GlcNAc auf die C6-Position bestimmter Mannosereste lysosomaler Enzyme (Reitman & Kornfeld, 1981). Anschließend katalysiert im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) die GlcNAc-1-Phosphodiesterase die Abspaltung des GlcNAc, wodurch der M6P-Rest exponiert wird (Varki & Kornfeld, 1980; Waheed *et al*, 1981).





Die M6P-modifizierten lysosomalen Enzyme werden im TGN von zwei verschiedenen M6P-Rezeptoren (MPR46 und MPR300) erkannt, gebunden und durch Clathrinumschlossene Vesikel zu frühen Endosomen transportiert (Abb. 1.1) (Braulke & Bonifacino, 2009; Ghosh et al, 2003). In den späten Endosomen dissoziieren die lysosomalen Enzyme aufgrund des geringen pH-Wertes von den MPR und gelangen von dort aus in die Lysosomen, wo die M6P-Reste durch saure Phosphatasen entfernt werden (Braulke & Bonifacino, 2009; Makrypidi et al, 2012). Spezifische Retromerkomplexe sorgen für den signalabhängigen Rücktransport der MPR zum TGN, wo sie erneut lysosomale Enzyme binden und zu den Endosomen transportieren können. Einige lysosomale Enzyme werden im TGN nicht an MPR gebunden und in den Extrazellulärraum sezerniert. Die sezernierten lysosomalen Enzyme können an MPR300 an der Plasmamembran binden und durch Rezeptor-vermittelte, Clathrin-abhängige Endozytose internalisiert werden. Ein Tyrosin-basiertes Sortierungsmotiv mit der Sequenz YXXØ in der cytoplasmatischen Domäne des MPR300 dient dabei als Internalisierungssignal (Canfield et al, 1991; Jadot et al, 1992). Die löslichen lysosomalen Enzyme gelangen so über die frühen und späten Endosomen, wo sie von den MPR300 dissoziieren, in die Lysosomen (Abb. 1.1) (Braulke & Bonifacino, 2009). Der MPR46 ist im Gegensatz zum MPR300 nicht an der Internalisierung sezernierter lysosomaler Enzyme beteiligt (Abb. 1.1) (Ma et al, 1991; Stein et al, 1987).

1.2 Struktureller Aufbau, Transport und enzymatische Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase

Der bovine, hexamere 540 kDa GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplex besteht aus je zwei membrangebundenen α - und β -Untereinheiten sowie zwei löslichen γ -Untereinheiten (Abb. 1.2) (Bao *et al*, 1996b). Die α - und β -Untereinheiten werden als gemeinsames Typ-III-Membranprotein, das α/β -Vorstufenprotein, synthetisiert und von dem *GNPTAB*-Gen kodiert (Kudo *et al*, 2005; Tiede *et al*, 2005). Die γ -Untereinheit wird von dem Gen *GNPTG*-Gen kodiert (Raas-Rothschild *et al*, 2000). Das katalytische Zentrum der GlcNAc-1-Phosphotransferase wird von den α - und β -Untereinheiten gebildet, während die Funktion der γ -Untereinheit noch unklar ist. Es wurde vermutet, dass die γ -Untereinheit eine Rolle für die Erkennung lysosomaler Enzyme spielt (Lee *et al*, 2007). Eine Bindung lysosomaler Enzyme an die γ -Untereinheit konnte jedoch durch verschiedene experimentelle Ansätze nicht bestätigt werden (Pohl *et al*, 2009b).

Die α - und γ -Untereinheiten bilden über Disulfidbrücken Homodimere aus (Bao *et al*, 1996a). Die Assemblierung der Untereinheiten des GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplexes erfolgt bereits im ER (Abb. 1.2) (Encarnacao *et al*, 2011). Über N-terminale Dileucin (LL)- und C-terminale dibasische (<u>RIR</u>) Sortierungsmotive, die in den cytoplasmatischen Domänen des α/β -Vorstufenproteins lokalisiert sind, erfolgt der Transport der GlcNAc-1-Phosphotransferase vom ER zum *cis*-Golgi-Apparat (Abb. 1.2) (Franke *et al*, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass die korrekte räumliche Anordnung der Sortierungsmotive essentiell für den ER-Export des α/β -Vorstufenproteins ist. Außerdem wurde beobachtet, dass die einzelnen, überexprimierten α - bzw- β -Untereinheiten nicht vom ER zum Golgi-Apparat transportiert werden. So kann das α/β -Vorstufenprotein nur als Typ-III-Transmembranprotein das ER verlassen (Franke *et al*, 2013).



Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Assemblierung, des Transportes und der proteolytischen Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase. Nach Assemblierung der Untereinheiten des GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplexes erfolgt der Transport des inaktiven Komplexes vom ER zum *cis*-Golgi-Apparat über N-terminale Dileucin-Motive (LL) und C-terminale dibasische Motive (RIR) im α/β -Vorstufenprotein. Im Lumen des Golgi-Apparates erfolgt die proteolytische Spaltung und Aktivierung der α/β -Vorstufenproteine zwischen den Aminosäuren K928 und D929 durch die Site-1-Protease.

Im Lumen des *cis*-Golgi-Apparates erfolgt schließlich die proteolytische Spaltung des α/β -Vorstufenproteins zwischen den Aminosären K928 und D929 zu den reifen α - und β -Untereinheiten, die durch die Site-1-Protease katalysiert wird (Abb. 1.2) (Kudo & Canfield, 2006; Marschner *et al*, 2011). Die M6P-Modifikation lysosomaler Enzyme ist in Site-1-Protease-defizienten Zellen stark beeinträchtigt und zeigt, dass die proteolytische Aktivierung des α/β -Vorstufenproteins essentiell für die Funktion der GlcNAc-1-Phosphotranfrease ist (Marschner *et al*, 2011).

1.3 Domänenstruktur des α/β-Vorstufenproteins der GlcNAc-1-Phosphotransferase

Das 190 kDa α/β -Vorstufenprotein wird als Typ-III-Transmembranprotein synthetisiert, das aus 1256 Aminosäuren besteht. Die reife 145 kDa α-Untereinheit besitzt die Topologie eines Typ-II-Transmembranproteins. Die luminale Domäne der α-Untereinheit enthält 886 Aminosäuren. Ein Sequenzvergleich mittels der NCBI-Datenbank zeigt, dass die Aminosäuren 433-469 sowie 500-535 Homologien zu Notchrepeat-like-Domänen aufweisen (Abb. 1.3). Der Notch-Rezeptor ist ein Typ-I-Transmembranprotein und wird während des Transportes zur Plasmamembran durch Furin im Golgi-Apparat prozessiert (Bolos et al, 2007). Extrazelluläre Notch-Domänen, die der Notch-*repeat-like* Domäne der α -Untereinheit entsprechen, regulieren vermutlich die Liganden-induzierte proteolytische Spaltung des Notch-Rezeptors durch ADAM 10 (a disintegrin and mettalloprotease 10) (Groot et al. 2014; van Tetering et al. 2009). Diese Spaltung ist Voraussetzung für die Intramembranproteolyse des Notch-Rezeptors durch die γ -Sekretase (Weyer *et al*, 2007). Die freigesetzte intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors aktiviert als Transkriptionsfaktor nucleäre Gene, die in der Regulierung von Entwicklungsprozessen involviert sind (Lobry et al, 2014). Die Notch-repeat-like-Domänen der a-Untereinheiten besitzen fünf Calcium-Bindungsstellen an den Aspartatresten D449, D464, D467, D515, D534, deren Funktion für die GlcNAc-1-Phosphotransferase noch unklar ist. Die Aminosäuren 698-814 weisen Homologien zu einer Bindungsdomäne für den transkriptionalen Co-Repressor DNA-Methyltransferase 1 (DMAP1) auf (Abb. 1.3).

Für diese Domäne wurde kürzlich gezeigt, dass sie als Substraterkennungsmodul für die lysosomalen Enzyme α -Iduronidase und Cathepsin D dient (Qian *et al*, 2013).

Bei der reifen 45 kDa β -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase handelt es sich um ein Typ-I-Transmembranprotein, dessen komplette Sequenz evolutionär stark konserviert ist. Die Aminosäuren 1005-1040 bilden ein EF-Hand-Motiv (Abb. 1.3), das aus einer Helix-Loop-Helix-Struktur besteht und in vielen Calcium-bindenden Proteinen vorkommt (Chazin, 2011). Ob das EF-Hand-Motiv in der β -Untereinheit Calcium bindet, ist noch unklar. Neben den verschiedenen konservierten Domänen enthalten die α - und die β -Untereinheiten 17 bzw. 3 potentielle *N*-Glykosylierungsstellen (Abb. 1.3). Die funktionelle Relevanz der konservierten Domänen sowie der *N*-Glykosylierungen in den α - und β -Untereinheiten ist bislang unbekannt.



Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Domänenstruktur des humanen α/β -Vorstufenproteins. Die Beschreibung der unterschiedlichen Homologiedomänen erfolgte entsprechend eines Homologiedomänen-Alignments (NCBI-Datenbank, Referenz NM_024312.4). Domänenbegrenzende Aminosäuren, potentielle *N*-Glykosylierungsstellen sowie die Schnittstelle der Site-1-Protease zwischen den Aminosäuren K928 und D929 sind angegeben.

1.4 Defekte der GlcNAc-1-Phosphotransferase

Mutationen im *GNPTAB*-Gen führen zu der seltenen lysosomale Speichererkrankung Mukolipidose Typ II (MLII, OMIM# 252500). Durch den vollständigen Aktivitätsverlust der GlcNAc-1-Phosphotransferase kann keine M6P-Modifikation an löslichen lysosomalen Enzymen erfolgen, die dadurch im TGN nicht von M6P-Rezeptoren erkannt und nachfolgend sezerniert werden (Hasilik *et al*, 1981; Reitman & Kornfeld, 1981). Der Verlust der lysosomalen Enzyme resultiert in lysosomalen Dysfunktionen, die einhergehen mit der Akkumulation nicht-abbaubarer Makromoleküle in den Lysosomen. Charakteristische klinische Symptome der MLII-Erkrankung sind psychomotorische Retardierung, skelettale Abnormalitäten, stark reduziertes Körperwachstum und kardiorespiratorische Komplikationen, die zu einem frühen Tod der Patienten in den ersten Lebensjahren führen (Braulke *et al*, 2013). Die klinische Diagnose wird biochemisch durch stark erhöhte Aktivitäten lysosomaler Enzyme im Serum, oder im Medium kultivierter Patienten-Fibroblasten bestätigt. Die genetische Diagnostik erfolgt durch Sequenzierung des *GNPTAB*-Gens.

Um ein geeignetes Mausmodell für die MLII-Erkrankung zur Verfügung zu haben, wurde eine *Frameshift*-Mutation, die bei MLII-Patienten gefunden wurde in das homologe *Gnptab*-Gen eingeführt (c.3082insC) (Kollmann *et al*, 2012). *Gnptab*^{c.3082insC}-Mäuse zeigen alle charakteristischen klinischen und biochemischen Symptome der menschlichen Erkrankung (Kollmann *et al*, 2012; Kollmann *et al*, 2013).

1.4.1 Struktureller Aufbau der Site-1-Protease

Die Site-1-Protease ist ein Mitglied der *Proprotein Convertase Subtilisin Kexin* (PCSK)-Familie und wird auch als PCSK8 bezeichnet. Der Name der Protease-Familie ist auf Homologien zu der Serinproteasen Kexin aus Hefe und bakteriellen Subtilisinen zurückzuführen (Seidah *et al*, 1994). PCSKs sind Calcium-abhängige Serinproteasen, deren Domänenstruktur stark konserviert ist. Die PCSK-Familie umfasst neun Mitglieder, die entweder in Kompartimenten des sekretorischen Weges (Golgi-Apparat, sekretorische Vesikel, Endosomen) und/oder an der Plasmamembran lokalisiert sind (Seidah *et al*, 2008). Im Jahr 1998 wurde durch UV-induzierte Mutagenese von CHO-7-Zellen eine Zelllinie (SRD-12B) generiert, die für die Protease defizient ist, die die SREBPs in ihrer luminalen Domäne spaltet (Rawson *et al*, 1998). Durch Komplementationsklonierung mittels der SRD-12B-Zellen konnte das Gen für die Site-1-Protease identifiziert werden (Sakai *et al*, 1998). Die Site-1-Protease ist ein Typ-I-Membranprotein, bestehend aus 1052 Aminosäuren, das als inaktives Zymogen synthetisiert wird (Abb. 1.4). Die Site-1-Protease besitzt ein N-terminales Signalpeptid für die Translokation ins ER. Die Prodomäne spielt eine wichtige Rolle für die Faltung und den Transport und wird im Golgi-Apparat autokatalytisch entfernt, was zur Aktivierung der Site-1-Protease führt (Espenshade *et al*, 1999; Ramos da Palma *et al*, 2014). Die stark konservierte Subtilisin-ähnliche katalytische Domäne enthält die für Serinproteasen typische katalytische Triade aus einem Aspartat- (D218), Histidin- (H249) und Serinrest (S414) (Abb. 1.4). Die Site-1-Protease wurde im Golgi-Apparat, in Endosomen und außerdem als lösliche, sezernierte Form nachgewiesen (Cheng *et al*, 1999; Pullikotil *et al*, 2007; Seidah *et al*, 1999).



Abb. 1.4 Schematische Darstellung der humanen Site-1-Protease. Die Beschreibung der unterschiedlichen Homologiedomänen erfolgte entsprechend eines Homologiedomänen-*Alignments* (NCBI-Datenbank, Q14703.1). Domänenbegrenzende Aminosäuren, potentielle *N*-Glykosylierungsstellen sowie die katalytische Triade sind angegeben.

1.4.2 Funktion der Site-1-Protease

Die prototypischen Substrate der Site-1-Protease sind die SREBPs (*sterol regulatory element binding proteins*) (Eberle *et al*, 2004). Die SREBPs 1a, 1c und 2 werden Cholesterol-abhängig vom ER in den Golgi-Apparat transportiert und anschließend von der Site-1-Protease und der Site-2-Protease gespalten (Rawson *et al*, 1997; Sakai *et al*, 1998).

Der Transport der SREBPs vom ER zum Golgi-Apparat wird durch den Cholesterol-Gehalt in der Membran des ER reguliert. Der Cholesterol-Sensor ist das so genannte SREBP cleavage-activating protein (SCAP), das an die SREBPs bindet (Brown & Goldstein, 1997). Zusätzlich bildet das SCAP-Protein in Anwesenheit von Sterolen einen Komplex mit Insig-1 und Insig-2, die ER-Retentionsfaktoren für den SCAP-SREBP-Komplex darstellen (Rawson, 2003). In Abwesenheit von Sterolen dissoziiert der Insig-SCAP-Komplex was zu einer Konformationsänderung im SCAP-Protein führt und in der Exposition eines Golgi-Lokalisationssignales, der MELADL-Sequenz resultiert. Die MELADL-Sequenz ermöglicht die Rekrutierung von Sec24 und die Inkorporation des SCAP-SREBP-Komplexes in COPII-Vesikel für den anterograden Transport zum Golgi-Apparat (Motamed et al, 2011). Die proteolytische Aktivierung der SREBPs durch die Site-1- und Site-2-Protease bewirkt die Translokation des freigesetzten SREBP-Transkriptionsfaktors in den Nucleus und aktiviert z. B. die Gene der Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktase, der Fettsäuresynthase und des LDL-Rezeptors, um die Cholesterol-Biosynthese, die Fettsäuresynthese und die Aufnahme von Cholesterol zu steigern (Brown & Goldstein, 1997; Rawson et al, 1998).

Andere Substrate der Site-1-Protease sind der *activating transcription factor 6* (ATF6) und verwandte Transkriptionsfaktoren wie CREBH (cAMP-*responsive element binding protein, hepatocyte specific*), CREB4, LUMAN (CREB3) und OASIS (*old astrocyte specifically induced substance*) (Murakami *et al*, 2006; Raggo *et al*, 2002; Shen & Prywes, 2004; Stirling & O'Hare, 2006; Zhang *et al*, 2006). Über die Aktivierung dieser Substrate ist die Site-1-Protease an der ER-Stress-Regulierung beteiligt. Zusätzlich wurde beschrieben, dass die Site-1-Protease Hüllproteine der Familie der Arena- und Bunyaviren spaltet (Beyer *et al*, 2003; Lenz *et al*, 2001; Rojek *et al*, 2008; Vincent *et al*, 2003). Diese Prozessierung ist Voraussetzung für die Inkorporation der Glykoproteine in Virionen (Lenz *et al*, 2001).

Neben den beschriebenen Funktionen, stellt die Site-1-Protease durch die proteolytische Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase zusätzlich ein essentielles Enzym in der Biogenese von Lysosomen dar (Marschner *et al*, 2011).

1.4.3 Defekte der Site-1-Protease

Bislang sind keine Erkrankungen bekannt, die durch Mutationen im *MBTPS1*-Gen hervorgerufen werden. Die Generierung einer ubiquitär Site-1-Protease-defizienten Mauslinie war nicht möglich, da die Embryonen bereits am Embryonaltag 4 aufgrund einer defekten Epiblastenbildung starben (Mitchell *et al*, 2001). Daher wurden konditionale *Knockout*-Tiere mit Site-1-Protease-Defizienz in verschiedenen Gewebeund Zelltypen generiert. Ein Leber-spezifischer *Knockout* der Site-1-Protease führte zu erhöhten LDL-Spiegeln im Blut, da durch die fehlende *feedback*-Regulierung des Cholesterol- und Fettsäurestoffwechsels auch die SREBP-abhängige Expression des LDL-Rezeptors unterbleibt und somit die LDL-Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Cholesterol-haltigem LDL aus dem Blut gestört ist (Yang *et al*, 2001).

Die Zebrafisch-Mutante *gonzo*, die durch ein Screening auf generelle Knorpeldefekte identifiziert wurde, weist Mutationen im *MBTPS1*-Gen auf. Bei dem *gonzo*-Fisch wurden starke Defekte in der Knorpelbildung nachgewiesen, die durch eine defekte Knorpelmatrix sowie eine veränderte Morphologie der Chondrozyten verursacht werden (Schlombs *et al*, 2003). Zusätzlich ist die Verteilung von Lipiden im *gonzo*-Fisch verändert. Ein Phosphomorpholino-vermittelter *Knockdown* der Site-1-Protease im Zebrafisch wies dieselben Defekte auf. Dagegen führte ein Phosphomorpholino-vermittelter *Knockdown* des SREBP-*cleavage activating proteins* (SCAP), das den Transport der SREBPs vom ER zum Golgi-Apparat vermittelt, lediglich zu einer veränderten Lipidverteilung (Schlombs *et al*, 2003). Das bedeutet, dass die gestörte Lipidhomeostase und die Defekte in der Knorpelbildung im *gonzo*-Fisch auf zwei unterschiedliche Mechanismen zurückzuführen sein müssen (Schlombs *et al*, 2003). Um die Defekte in der Knorpelbildung genauer zu untersuchen wurde daher eine Knorpel-spezifische Site-1-Protease *Knockout*-Mauslinie (S1P^{eko}) generiert (Patra *et al*, 2007).

Die S1P^{cko}-Mäuse sterben kurz nach der Geburt und weisen eine defekte endochronale Knochenbildung auf. Elektronenmikroskopische Aufnahmen Site-1-Protease-defizienter Chondrozyten zeigten eine Fragmentierung des ER, was durch eine gestörte ER-Stress-Regulierung hervorgerufen sein könnte, die zu einer Retention von Typ-II-Collagenen im ER und zur Bildung einer defekten Knorpelmatrix führt (Patra *et al*, 2007). Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die ER-Stress-Regulierung in diesen Zellen nicht beeinträchtigt war. Aus heutiger Sicht ist es sehr wahrscheinlich, dass die defekte endochronale Knochenbildung auf den Verlust des α/β -Vorstufenproteins der GlcNAc-1-Phosphotransferase in Chondrozyten der S1P^{cko}-Mäuse zurückzuführen ist. Pathomechanistische Analysen der Skelettveränderungen bei *Gnptab^{c.3082insC}*-Mäusen zeigten ebenfalls morphologische und funktionelle Defekte in den Chondrozyten, die dem *gonzo*-Fisch und S1P^{cko}-Mäusen sehr ähneln (Kollmann *et al*, 2012; Marschner *et al*, 2011). Es können aber auch andere, bisher nicht identifizierte Site-1-Protease-Substrate in Chondrozyten als Ursache für den Phänotyp nicht ausgeschlossen werden (Patra *et al*, 2014).

Im Jahr 2012 wurde ein hypomorphes *Mbtps1*-Allel mit der Mutation Y496C generiert, das als *woodrat* bezeichnet wird (Rutschmann *et al*, 2012). Homozygote Mäuse waren gegen das lymphozytäre Choriomeningitis-Virus resistent, dessen Kapsel-Glykoprotein als Substrat der Site-1-Protease dient (Rutschmann *et al*, 2012). Bei den *woodrat*-Mäusen wurde eine uniforme Hypopigmentierung der Haut festgestellt, die auf eine gestörte Funktion von Melanosomen oder Melanozyten zurückzuführen sein könnte. Es wurde vermutet, dass die sezernierte Form der Site-1-Protease einen systemischen Effekt auf die Pigmentierung haben könnte (Rutschmann *et al*, 2012). Melanosomen werden als *"lysosome-ralated organelles"* bezeichnet, weil sie für ihre Zelltyp-spezifischen Funktionen verschiedene lysosomale Enzyme, wie z.B. β -Hexosaminidase, β -Galaktosidase, β -Glucuronidase, Cathepsin B und L benötigen (Diment *et al*, 1995; Raposo & Marks, 2007). Es ist daher denkbar, dass die *woodrat*-S1P-Mutation auch zu einer gestörten GlcNAc-1-Phosphotransferase-abhängigen Biogenese von Melanosomen und der anschließenden Pigmentierung führt.

1.4.4 Struktureller Aufbau und Funktion der Site-2-Protease

Das Gen für die Site-2-Protease (*MBTPS2*), das auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, wurde 1999 von Brown und Goldstein durch Komplementationsklonierung mit Hilfe von Zellen generiert, in denen die proteolytische Spaltung der SREBPs, die zur Freisetzung des N-terminalen Transkriptionsfaktors führt (*Site-2*-Spaltung) nicht erfolgt (Hasan *et al*, 1994). Diese sogenannten M19-Zellen wurden durch UV-induzierte Mutagenese von CHO-K1-Zellen und anschließende Selektionierung Cholesterol-auxotropher Zellen generiert (Brown & Goldstein, 1997; Hasan *et al*, 1994). Alle bisher identifizierten Substrate der Site-2-Protease werden zuvor von der Site-1-Protease gespalten und sind Typ-II-Membranproteine. Die Site-2-Protease war die erste Protease der *intramembranecleaving proteases* (I-CliPs)-Familie. In CHO-Zellen co-lokalisieren die Site-2-Protease und die Site-1-Protease im Golgi-Apparat (Shen & Prywes, 2004).

Die Site-2-Protease ist eine hydrophobe, Zink-abhängige Metalloprotease mit zwei Transmembran- und sechs Membran-assoziierten Domänen (Abb. 1.5) (Zelenski *et al*, 1999), deren N- und C-Termini ins Cytoplasma reichen. In der luminalen Domäne zwischen den Aminosäuren 108 bis 169 befindet sich eine stark konservierte Multiserinsequenz (Abb. 1.5), deren Funktion bislang unklar ist (Zelenski *et al*, 1999). Das HEXXH-Motif (Aminosäuren 171-175) ist charakteristisch für das aktive Zentrum vieler Metalloproteasen und essentiell für die Koordinierung des Zink-Atoms im katalytischen Zentrum (Rawlings & Barrett, 1995; Zelenski *et al*, 1999).



Abb. 1.5 Schematische Darstellung der humanen Site-2-Protease. Die Site-2-Protease ist ein Typ-III-Membranprotein, dessen N- und C-Termini ins Cytosol ragen. Sie besitzt mehrere Transmembran- sowie Membran-assoziierte Domänen. Das HEXXH-Motiv und das LDG-Motiv sind angegeben. Außerdem sind die Multiserinsequenz und die putative PDZ-Domäne gekennzeichnet (modifiziert nach Rawson, 2013).

Auch die LDG-Sequenz (Aminosäuren 466-468) ist vermutlich an der Koordinierung des Zink-Atoms im aktiven Zentrum beteiligt. Die Aminosäuren 255-299 weisen eine putative PDZ-Domäne auf, die möglicherweise eine Rolle für die Substratbindung und die Substratspezifiät spielt (Rawson, 2013). PDZ-Domänen sind ca. 80-100 Aminosäuren umfassende Proteindomänen, die Protein-Proteininteraktionen vermitteln (Lee & Zheng, 2010). Der Name geht auf die ersten drei Proteine (<u>PSD95/, Dlg und Zo-1</u>) zurück, in denen eine solche Domäne identifiziert wurde (Cho *et al*, 1992; Willott *et al*, 1993; Woods & Bryant, 1991).

1.4.5 Defekte der Site-2-Protease

Es sind verschiedene Erkrankungen bekannt, die durch missense-Mutationen im MBTPS2-Gen verursacht werden, die zu einer reduzierten Proteaseaktivität führen. Ein kompletter Verlust der Proteaseaktivität ist wahrscheinlich letal, da bisher keine Patienten mit diesem Gendefekt bekannt sind (Bornholdt et al. 2013). Da das MBTPS2-Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, sind Männer häufiger betroffen als Frauen. Die Symptome der Krankheitsformen mit unterschiedlicher klinischer Präsentation sind teilweise überlappend. Das Ichthyosis follicularis mit Atrichie und Photophobie-(IFAP)-Syndrom (OMIM #308205) ist charakterisiert durch die typische Triade einer gestörten Entwicklung der Haarfollikel, Haarlosigkeit und eine erhöhte Lichtsensitivität (Oeffner et al, 2009). Keratosis Follicularis Spinulosa Decalvans (KFSD) (OMIM #308800) ist gekennzeichnet durch hyperkeratotische, follikuläre Papeln auf der Kopfhaut, eine fortschreitende Alopezie der Kopfhaut, Wimpern und Augenbrauen sowie Photophobie aufgrund einer Dystrophie der Cornea (Aten et al, 2010). Symptome des Olmsted Syndroms (OMIM #300918) sind durch eine gestörte Keratinisierung verursachte hyperkeratotische Plaques, diffuse Alopezie, Läsionen der Cornea und verkrümmte Finger (Haghighi et al, 2013). Beim Bresek/Bresheck-Syndrom (OMIM #300404) kommt es zu Abnormalitäten des Gehirns, geistiger Retardierung, ektodermaler Dysplasie, einer Gaumenspalte, Skelettanomalien, Abnormalitäten der Nieren, der Augen und/oder Ohren (Naiki et al, 2012). Außerdem wurden eine Alopezie und eine erythematöse, trockene, schuppige Haut beobachtet.

Mutationen, die zu einem Aminosäure-Austausch in der Nähe des katalytischen Zentrums führen, resultieren in einer starken Verminderung der Site-2-Protease-Aktivität und sind mit einem schwerwiegenden Phänotyp der Patienten assoziiert (Bornholdt *et al*, 2013). Bislang ist unklar, ob die beschriebenen Symptome der *MBTPS2*-assoziierten Erkrankungen allein durch gestörte Lipidhomeostase und ER-Stress-Regulierung durch die verminderte Aktiviät der Site-2-Protease erklärt werden können. Möglicherweise resultieren einige Symptome aus der nicht erfolgten Spaltung bisher unbekannter Substrate der Site-2-Protease (Rawson, 2013).

2. ZIELSTELLUNG

Der heterohexamere GlcNAc-1-Phosphotransferase ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$)-Komplex katalysiert den ersten Schritt der Generierung von Mannose-6-Phosphat-Resten an löslichen lysosomalen Enzymen und ist essentiell für den Transport der Hydrolasen in die Lysosomen. Die α - und β -Untereinheiten werden als gemeinsames Typ-III-Transmembranpotein synthetisiert, das durch Site-1-Protease-vermittelte Spaltung aktiviert wird. Die Site-1-Protease spielt eine wichtige Rolle im Cholesterolstoffwechsel, was den Cholesterol-abhängigen Transport von Site-1-Protease-Substraten vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat erfordert. Defekte im GNPTAB-Gen, das für das α/β -Vorstufenprotein kodiert, führen zu der schweren lysosomalen Speichererkrankung Mukolipidose Typ II. Biochemisch ist diese Erkrankung durch synthetisierter lysosomaler Enzyme, Fehlsortierung neu Akkumulation von Speichermaterial und allgemeine lysosomale Dysfunktion gekennzeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Schwerpunkte behandelt.

- (A) Zunächst wurde untersucht, ob die Site-1-Protease-vermittelte proteolytische Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase durch N-Glykosylierung des α/β-Vorstufenproteins, durch Calcium oder durch Cholesterol reguliert wird.
- (B) Da viele Substrate der Site-1-Protease zusätzlich von der Site-2-Protease ein weiteres Mal gespalten werden, sollte bestimmt werden, ob auch das α/β-Vorstufenprotein der GlcNAc-1-Phosphotransferase durch die Site-2-Protease proteolytisch prozessiert wird. Zusätzlich sollte die Rolle der Site-2-Protease- für die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase und die Funktion von Lysosomen untersucht werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät (Modell)	Bezugsquelle	
Blot-Kammern (TE62 & TE22)	GE Healthcare	
Chromatographie-System (BioLogic DuoFlow TM)	Bio-Rad	
Drehrad	Neolab	
Einfrierhilfe (CoolCell [®] alcohol-free)	Biocision	
Entwicklermaschine (Curix 60)	Agfa	
Elektrophoresekammern (Agagel Midi Wide, SE600)	PeqLab, GE Healthcare	
Fluoreszenzdetektor MX3000P TM	Stratagene	
Flüssigstickstoffkontainer	Air Liquide	
Gel-Dokumentationsanlage (Chemi Doc XRS)	Bio-Rad	
Gel-Dokumentationsanlage (E Box V2)	PeqLab	
Gel-Trockner (GelAir Dryer)	Bio-Rad	
Heizblock (MHR23)	HLC	
Inkubatoren (Gasboy C20A, Innova 4230)	Labotect, Thermo Scientific	
Konfokales Laserscanning-Mikroskop (TCS SP5)	Leica Camera	
Magnetrührer (MSH-basic)	IKA-Werke	
Mikrowelle (Promicro)	Whirlpool	
PH-Meter (Five Easy TM FE20)	Mettler-Toledo	
Photometer (Multiscan GO)	Thermo Scientific	
Pipetten	Eppendorf	
Pipettierhilfe (Pipetus [®])	Hirschmann	
Rührer	GFL	
Scanner (GT-9600)	Epson	
Szintillations-Counter (Tri-carb 2900TR)	Perkin Elmer	
Spectrophotometer (Nanodrop ND-1000)	PeqLab	
Sterilbank (Hera Safe)	Thermo Scientific	
Thermocycler (Tpersonal, Mastercycler, Gradient)	Biometra, Eppendorf	
Thermocycler Realtime-PCR (MxPro3000)	Agilent	
Umkehrphasenmikroskop (Axiovert 25)	Zeiss	
Vakuumpumpe (Miniport)	SMT	

Vortexer (Genie1 TM)	Scientific Industries
Waagen (AC100, TE2101)	Mettler Toledo, Sartorius
Wasserbad	Schütt Labortechnik
Zentrifugen (5424, 5415R and 5804R, MC6)	Eppendorf, Sarstedt

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialie	Bezugsquelle
Blot-Papier	Roth
Deckgläschen	Glaswarenfabrik Hecht-Assistent
Einmal-Zellschaber	Sarstedt
Filmkassetten	Rego
Glasplatten für Gele	Glasgerätebau OCHS
Kanülen	Braun
Kryo-Gefäße	Sarstedt
Küvetten	Sarstedt
Linsenpapier MN 10 B	Zeiss
Nitrocellulose-Membran	GE Healthcare
nUView Tris-Glycin NN8-16%	NuSep
Objektträger SuperFrost [®] (glass slides)	Glaswarenfabrik Karl Hecht
PD-10-Ionenaustauschersäule	GE Healthcare
Pipettenspitzen	Sarstedt, Eppendorf
Reaktionsgefäße (0.2, 1.5 and 2 ml)	Sarstedt, Eppendorf
Röntgenfilme	GE Healthcare
Skalpelle	Braun
Sterilfilter (0.22 µm)	VWR
Szintillations-Röhrchen	Perkin-Elmer
UV-Küvetten	Sarstedt
Zellkultur-Verbrauchsmaterialien	BD Falcon, Sarstedt, Nunc

Chemikalie	Bezugsquelle
[³⁵ S]Methionin (Aktivität 1 mCi/mmol)	Hartmann Analytik
[³ H]-Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) (Aktivität 20 Ci/mmol)	ARC
2,5-Diphenyloxazol (PPO)	Roth
2-Mercaptoethanol (β-ME)	Sigma
4',6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI)	Roth
4-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glucosaminid	Sigma
p-Nitrophenyl-a-D-Mannopyranosid	Sigma
p-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid	Sigma
p-Nitrophenyl-α-D-Fucopyranosid	Sigma
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Adenosintriphosphat-Disodiumsalz (ATP)	Sigma
Agar	Roth
Albumin-Standards	Thermo Scientific
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad
Amphotericin B	Sigma
Aqua-Poly/Mount [®]	Polysciences
Atorvastatin	Sigma
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
Bradford Protein-Assay	Bio-Rad
Carbenicillin	Roth
Cholesterol	Sigma
Coomassie [®] Brilliant Blue R250	Serva
Cycloheximid	Sigma
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DNA-Ladepuffer	Thermo Scientific
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Fluka
GFP-Trap [®] -Beads	ChromoTek
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
Hefe-Extrakt	Roth
JetPEI [®] PolyPlus Transfektionsreagenz	PeqLab

3.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Kanamycin	Roth
Liquid Rotiszint [®] eco plus	Roth
L-Methionin	Roth
Luminol	Roth
Maxima [®] probe qPCR Master Mix	Thermo Scientific
Methyl-α-D-Mannosid (α-MM)	Sigma
Mevalonolacton	Sigma
Milchpulver	Roth
NNN'N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma
Nonidet P-40	Roche
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma
p-Cumarinsäure	Sigma
Protaminsulfat	Sigma
QAE Sephadex A-25	GE Healthcare
Saponin	Fluka
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan	Sigma
Triton X-100	Sigma
Trypton/Pepton	Roth
Tween 20	Roth
UDP-GlcNAc	Sigma

Kit	Bezugsquelle
GeneJet PCR-Aufreinigungskit	Thermo Scientific
GeneJet Plasmid-Minipräparationskit	Thermo Scientific
GeneJet RNA-Aufreinigungskit	Thermo Scientific
High-Capacity cDNA Reverse Transkriptase-Kit	Life Technologies
KAPA HiFi TM PCR-Kit	PeqLab
QIAquick [®] -Gelextraktionskit	QIAGEN
QIAquick [®] -Plasmid-Midipräparationskit	QIAGEN

Enzym	Aktivität	Bezugsquelle
Arylsulfatase B (ASB)		Biomarin
Benzonase [®]	100 U/µl	Merck
FastDigest [®] Restriktionsenzyme	10 U/µl	Thermo Scientific

KAPA HiFi TM	1 U/µl	PeqLab
MultiScribe [™] Reverse Transkriptase	50 U/µl	Life Technologies
Peptide-N-glycosidase F (PNGase F)	1 U/µl	Roche

3.1.4 DNA- und Molekulargewichtstandards

Der FastRulerTM DNA-Standard (low range), der GeneRulerTM 1 kb DNA-Standard und der PageRulerTM Prestained Molekulargewichtstandard wurden von Thermo Scientific erworben.

3.1.5 Vektoren und cDNA-Konstrukte

Plasmide, die humane cDNAs für die Proteinexpression in *E. coli* und eukarytischen Zellen kodieren, sind in den folgenden Tabellen aufgelistet.

Plasmid	Eigenschaften	Bezugsquelle
pcDNA TM 3.1	aukaryotigahar Evprossionsvaltar	Life
D/V5-His-TOPO®	eukaryotischer Expressionsvektor	Technologies
pCMV6 Entry	eukaryotischer Expressionsvektor mit cDNA der Site-	OriCono
MBTPS1	1-Protease mit C-terminalen DDK- und cMyc-Tag	Oligene
pEGFP-C1	eukaryotischer Expressionsvektor mit cDNA von GFP	Promega
pEGFP-N1	eukaryotischer Expressionsvektor mit cDNA von GFP	Promega
pET28a(+)	prokaryotischer Expressionsvektor	Novagen

Tabelle 3.1 Verwendete Plasmide

Tabelle 3.2 GNPTAB-Konstrukte

GNPTAB	Tag	Referenz
α/β -precursor (aa 1-1256)	-	Marschner et al, 2011
α/β -precursor (aa 1-1256)	C-term myc	Franke et al, 2013
α/β -precursor (aa 1-1256)	C-term GFP	In diesem Labor generiert
α/β -precursor (aa 1-1256) (R925A)	C-term GFP	In diesem Labor generiert

Tabelle 3.3 MBTPS1-Konstrukte

MBTPS1	Tag	Bezugsquelle
Site-1-Protease	C-term myc	OriGene
Site-1-Protease (S414G)	C-term myc	In diesem Labor generiert

3.1.6 Primer und Sonden

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

Tabelle 3.4 verwendete TaqMan[®]-Primer bzw. -Sonden

Gen (Produkt)	Spezies	Assay (Sonde + Primer)
ACTB (β-Aktin)	human	Hs99999903_m1
<i>ACTB</i> (β-Aktin)	murin	Mm00607939_s1
GNPTAB (α/β -Vorstufenprotein)	human	Hs00393389_m1
GNPTAB (α/β -Vorstufenprotein)	murin	Mm01773334_m1
LDLR (LDL-Rezeptor)	human	Hs00181192_m1
LDLR (LDL-Rezeptor)	murin	Mm00440169_m1
MBTPS1 (S1P)	human	Hs00186886_m1

Primer, die für die Klonierung und Sequenzierung verwendet wurden, wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert.

Primer	5'-3' Sequenz	Tm [°C]
PDZBamHI_F	GTAGGATCCGGGGTGCTCATCACTGAAG	69,5
PDZBamHI_Fstart	GTAGGATCCATGGGGGGTGCTCATCACTGAAG	70,8
PDZBamhI_R	GTAGGATCCAGTTGATGCACTTATACAGTAACC	67,0
PDZXhoI_F	GTACTCGAGGGGGGGGCTCATCACTGAAG	69,5
PDZXhoI_Fstart	GTACTCGAGATGGGGGGGGGCTCATCACTGAAG	70,8
PDZXhoI_R	GTACTCGAGAGTTGATGCACTTATACAGTAACC	67,0
S1P-S414G_F	CTCTCAGGGACCGGTGTTGCTTCTC	67,9
S1P-S414G_R	GAGAAGCAACACCGGTCCCTGAGAG	67,9

Tabelle 3.5 verwendete Primer

3.1.7 Zellen, Kulturmedien und Lösungen

Dulbeccoøs modiŁed Eagleøs medium (DMEM), GlutaMAXTM (100 x), Trypsin/EDTA, Opti-MEM[®], Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Pen and 10 mg/ml Strep), und Phosphate-buffered saline (PBS) für die Zellkultur (Calcium- und Magnesiumfrei) wurden von Life Technologies bezogen. Fötales Kälberserum (FKS) und DMEM ohne Methionin und Glutamin wurden von PAA bzw. MP Biomedicals bezogen.

Tabelle 3.6

Name	Ursprung	Bezugsquelle	Referenz
CHO-7	Ovarienzellen des chinesischen Hamsters	Prof. Goldstein, Universität Texas (USA)	Metherall et al, 1989
M19	CHO-K1, Site-1-Protease- defizient	Prof. Goldstein, Universität Texas (USA)	Rawson et al, 1998
SRD-12B	CHO-7, Site-2-Protease- defizient	Prof. Goldstein, Universität Texas (USA)	Hasan <i>et al</i> , 1994

HEK293-Zellen (*human embryonic kidney*) und HeLa-Zellen (*human cervical carcinoma*) wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC) erworben. Embryonale Mausfibroblasten (MEF) aus Wildtyp- und MLII- Mäusen wurden am Tag 12,5 der Embryonalentwicklung präpariert und von Sandra Markmann zur Verfügung gestellt.

3.1.8 Antikörper

Tabelle 3.7 Verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Herkunft/Referenz
Cathepsin Z	Ziege, polyklonal	WB 1:100	R&D Systems
c-myc	Maus, monoklonal	WB 1:10,000	Cell Signalling
Gapdh	Kaninchen, monoklonal	WB 1:1000	Santa Cruz Biotechnology
GFP Tag	Maus, monoklonal	WB 1:2000	Roche
GM130	Maus, monoklonal	IF 1:100	BD
LAMP1 (UH-3)	Maus, monoklonal	IF 1:100	Hybridoma Bank
LDL-Rezeptor	Kaninchen, monoklonal	WB 1:1000	Abcam
PDI	Maus, monoklonal	IF 1:500	Assays Design
Perilipin 2	Maus, monoklonal	IF 1:100	LifeSpan Biosciences

scFv M6P-1		WB 1:500	Müller-Loennies <i>et al</i> , 2010
Transferrin-Rezeptor	Maus monoklonal	WB 1:500	Life technologies
α-Untereinheit	Ratte, monoklonal	WB, IP 1:25, IF 1:250	De Pace et al, 2014
β-Tubulin	Maus, monoklonal	WB 1:2,000	Sigma

Tabelle 3.8 Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung	Herkunft
Ziege α Kaninchen IgG HRP	WB 1:5,000	Dianova
Ziege α Maus Alexa Fluor [®] 546	IF 1:1,000	Life Technologies
Ziege α Maus IgG HRP	WB 1:3,000	Dianova
Ziege α Ratte Alexa Fluor [®] 488	IF 1:1,000	Life Technologies
Ziege α Ratte Alexa Fluor [®] 546	IF 1:1,000	Life Technologies
Ziege α Ratte IgG HRP	WB 1:3,000	Dianova
Ziege α Kaninchen Alexa Fluor [®] 546	IF 1:1,000	Life Technologies

Fluorophor-gekoppelte Substanzen und Lektine	Verdünnung	Herkunft
Aleuria aurantia Lektin	IF 1:50	Vector Laboratories
Alexa Fluor [®] 546-Transferrin	IF 1:250	Life Technologies

3.1.9 Software

Tabelle 3.9 verwendete Software

Software	Bezugsquelle		
Adobe Photoshop 7.0	Adobe		
Corel Draw X5	Corel		
ECapt, ND-1000 V3.5.2	PeqLab		
Endnote X3	Thomson Reuter		
Finch TV 1.4.0	Geospiza		
Image Lab 3.0.1, Quantity One-4.6.7	Bio-Rad		
Imaris 7.6	Bitplane		
Leica Confocal Software	Leica Mikrosysteme		
Leica LAS AF Lite	Leica Mikrosysteme		
Microsoft Office 2010/2013	Microsoft		
MxPro-QPCR software	Agilent		
Skanit Software 3.2	Thermo Scientific		

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Allgemeines

Um eine sterile Kultivierung von Zelllinien zu gewährleisten, wurden alle Arbeitsschritte unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Vor dem Arbeiten an der Sterilwerkbank wurden die Arbeitsfläche sowie die Werkzeuge mit 70 % Ethanol gereinigt, um die Kontaminationsgefahr durch Bakterien oder Pilze zu minimieren. Es wurden ausschließlich sterile Verbrauchsmaterialien und Lösungen verwendet.

3.2.1.2 Kultivierung von Zelllinien

Je nach Zelllinie erfolgte die Kultivierung in Zellkulturflaschen oder in Zellkulturschalen. Eine Passagierung der Zellen erfolgte ca. ein- bis zweimal wöchentlich, wenn die Zellen eine Konfluenz von 80-100 % erreicht hatten. Hierfür wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung versetzt, um die adhärenten Zellen von der Oberfläche des Kulturgefäßes zu lösen. Nach einer ein- bis dreiminütigen Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen in 9 ml FKS-haltigem Medium aufgenommen, um die Wirkung des Trypsins zu inhibieren und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellen wurden für die weitere Kultivierung in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 in entsprechendem Kulturmedium aufgenommen

3.2.1.3 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Um Zelllinien über einen längeren Zeitraum zu lagern, wurden Kryokonserven von Zellen angelegt, die nach Bedarf rekultiviert werden konnten. Hierfür wurden die Zellen trypsiniert, in 9 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 900 \times g und 4 °C zentrifugiert und anschließend in 3 ml Einfriermedium (10 % DMSO, 20 % FKS) resuspendiert. Je 1 ml der Suspension wurde in ein Kryoröhrchen gegeben. Diese wurden für einen Tag in einer Einfrierhilfe bei -80 gelagert und anschließend in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Für die Rekultivierung wurden die Zellen in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert, in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 900 \times g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

3.2.1.4 Kultivierung und Selektionierung von Site-1- und Site-2-Proteasedefizienten Zellen

Kulturmedium:	1:1 DMEM/Ham's F12, 1 % P/S, 5 % FKS, 50 μM Na- Mevalonat, 20 μM Na-Oleat, 5 μg/ml Cholesterol
LDL-haltiges Medium:	1:1 DMEM/Ham's F12, 1 % P/S, 10 % NBKS, 10 mg/ml humanes LDL
Selektionierungsmedium:	1:1 DMEM/Ham's F12, 1 % P/S, 1 % lipoproteinarmes Serum, 50 μg/ml Amphotericin B

Die Site-1- und Site-2-Protease spielen durch die Spaltung von sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) eine wichtige Rolle als Regulatoren des zellulären Lipidmetabolsimus sowie der Cholesterol-Homeostase (Brown & Goldstein, 1999; Rawson et al, 1997; Sakai et al, 1998). Die proteolytische Aktivierung der SREBPs führt zu einer gesteigerten Rezeptor-vermittelten Cholesterolaufnahme sowie zu einer gesteigerten Cholesterol- und Fettsäurebiosynthese (Brown & Goldstein, 1997). Somit sind die Site-1- und die Site-2-Protease-defizienten Zellen auxotroph für Cholesterol und ungesättigte Fettsäuren. Für die Kultivierung der Zellen wird daher das Kulturmedium mit Cholesterol, Oleat und Mevalonat supplementiert. Um 1 M Na-Mevalonat-Lösung herzustellen wurden 2,5 g Mevalonolacton in 15 ml dH₂O gegeben. Zu dieser Lösung wurden unter Rühren tröpfchenweise 2 ml 10 M NaOH-Lösung gegeben, sodass eine Endkonzentration von 1,2 M erreicht wurde. Die Lösung wurde für 30 weitere Minuten gerührt in denen sich das Mevalonolacton vollständig auflöste. Die Hitze, die für das Lösen des Mevalonolactons nötig war, lieferte die Wärme, die bei der exothermen Säure-Base-Reaktion frei wurde. Da es sich bei den Site-1- und Site-2-Protease-defizienten Zellen nicht um reine Zelllinien handelte, musste eine wöchentliche Selektionierung der Zellen mit Amphotericin B durchgeführt werden, um den Phänotyp der Zellen zu erhalten (Hasan et al, 1994; Rawson et al, 1998).

Die Zellen wurden drei Tage vor der Selektionierung so ausgesät, dass am Tag der Selektionierung eine Konfluenz von 80 % erreicht wurde. Einen Tag vor der Selektionierung wurde LDL-haltiges Medium zu den Zellen gegeben. Da das humane LDL zur langfristigen Lagerung in KBr-Lösung vorlag, musste das LDL über eine PD-10-Ionenaustauschersäule aufgereinigt werden, um das KBr zu entfernen. Das Waschen der Säule sowie die Elution von LDL erfolgten mit PBS. Die Zellen wurden am dritten Tag zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 2 bis 5 h mit Selektionierungsmedium inkubiert. Das Amphotericin kann sich nur an sterolhaltige Zellmembranen anlagern (Chang & Chang, 1982; Cohen, 2010; Kinsky, 1970). Daher lagert sich das Amphotericin nur an Zellmembranen von Zellen an, die nicht defizient für die Site-1- oder Site-2- Protease sind. Da das Amphotericin zu Poren in den Membranen dieser Zellen führt, nehmen die Zellen Wasser auf, schwellen an und lösen sich schließlich von der Oberfläche der Zellkulturschale ab. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit frischem Kulturmedium versorgt.

3.2.1.5 Konditionierung von Medien

Für die Messung von Enzymaktivitäten in den Medien von Zellen wurden die Zellen in Kulturschalen (Ø 6 cm) für 48 h in OptiMEM[®] kultiviert.

3.2.1.6 Transiente Transfektion von Zellen

Für die transiente Transfektion wurden Zellen in Kulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Es wurde das jetPEITM-Transfektionsreagenz nach Herstellerangaben für die Transfektion von DNA verwendet. Je nach Größe der Zellkulturschale wurden unterschiedliche Mengen DNA und jetPEITM eingesetzt.

Kulturschale	DNA	NaCl-Lösung	JetPEI®	NaCl-Lösung	Kulturmedium
	(µg)	150 mM (µl)	(µl)	150 mM (μl)	(µl)
24-well	1	ad 50	2	ad 50	400
35 mm	3	ad 100	6	ad 100	1,600
60 mm	5	ad 250	10	ad 250	4,000
100 mm	10	ad 250	20	ad 250	8,000

Tabelle 3.10 Transiente Transfektion mit jetPEITM
In Reaktionsgefäß A wurde die DNA mit 150 mM NaCl-Lösung und in Reaktionsgefäß B das jetPEITM mit 150 mM NaCl-Lösung für 5 min inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt von Reaktionsgefäß B zu dem Inhalt von Reaktionsgefäß A gegeben und die Lösung für 25 min bei RT inkubiert. Das Kulturmedium der Zellen wurde durch das entsprechende Volumen frischen Kulturmediums ersetzt und der Transfektionsansatz tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 24 h bei 37 °C inkubiert.

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

Hungermedium:	DMEM ohne Methionin und Glutamin, 1 x GlutaMax TM -I				
Pulse-Medium:	DMEM ohne Methionin und Glutamin, 1 x GlutaMax TM -I, 100-150 μ Ci [³⁵ S]-Methionin				
Chase-Medium:	DMEM, 4 % hitzeinaktiviertes, dialysiertes FKS, 250 µg/ml Methionin, 10 mM M6P-Na-Salz, 1 x GlutaMax TM -I				

Der Einbau radioaktiver Aminosäuren in neu synthetisierte Proteine wird als metabolische Markierung bezeichnet. Die in Zellkulturschalen (\emptyset 3,5 cm) inkubierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 1 bis 2 h in Hungermedium inkubiert. Anschließend wurde das Hungermedium durch 0,75 ml *Pulse*-Medium ersetzt. Die Markierung neu synthetisierter Proteine mit [³⁵S]-Methionin erfolgte für 1 h (*Pulse*). Um die Prozessierung und Sortierung der markierten Proteine zu analysieren, wurde das *Pulse*-Medium abgenommen, die Zellen einmal mit Hungermedium gewaschen und dann für mehrere Stunden in *Chase*-Medium inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in der Immunpräzipitation verwendet.

3.2.1.8 Endozytose von [¹²⁵I]-Arylsulfatase B

 Pulse-Medium:
 DMEM, 0,1 % BSA, 625.000 cpm/ml [¹²⁵I]-ASB, +/- 10 mM M6P

 Sucrose-Puffer:
 250 mM Sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4)

Rekombinante humane, ¹²⁵I-markierte Arylsulfatase B ([¹²⁵I]-ASB) wurde von Prof. Braulke zur Verfügung gestellt. Konfluente Zellen in Zellkulturschalen (\emptyset 3,5 cm) wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 30 min in DMEM + 0,1 % BSA bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit dem *Pulse*-Medium für 20 min. Als Negativkontrolle wurde dem *Pulse*-Medium 10 mM M6P zugesetzt, das als kompetitiver Inhibitor der [¹²⁵I]-ASB diente. Zur Untersuchung der Menge der endozytierten [¹²⁵I]-ASB, wurden die Zellen zunächst dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 1 ml Sucrose-Puffer abgeschabt. Um die Prozessierung der endozytierten [¹²⁵I]-ASB zu analysieren, wurden die Zellen einmal mit warmem PBS und einmal mit warmem DMEM + 0,1 % BSA gewaschen und anschließend für 2 bzw. 4 h in DMEM + 0,1 % BSA bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 1 ml Sucrose-Puffer abgeschabt. Die Zellen wurden für 5 min bei 900 × g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Radioaktivität der Zellpellets in einem γ -Szintillations-Counter gemessen.

3.2.1.9 [¹²⁵I]-Arylsulfatase B-Bindungsassay

Pulse-Medium:	DMEM, 0,1 % BSA, 625.000 cpm/ml [¹²⁵ I]-ASB, +/- 10 mM M6P
Sucrose-Puffer:	250 mM Sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4)

Mittels [¹²⁵I]-ASB-Bindungsassays wurde der Anteil von M6P-Rezeptoren an der Zelloberfläche bestimmt. Konfluente Zellen in Zellkulturschalen (\emptyset 3,5 cm) wurden auf Eis abgekühlt und dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Gegebenenfalls folgten zusätzlich zwei 3-minütige Waschschritte mit 10 mM M6P in PBS, um gebundene Liganden von den Rezeptoren zu verdrängen. Es folgte die Inkubation mit dem *Pulse*-Medium mit oder ohne Zusatz von 10 mM M6P für 2 h auf Eis in einem Kühlschrank. Anschließend wurden die Zellen 5 x mit eiskaltem PBS gewaschen und in 1 ml Sucrose-Puffer abgeschabt und in ein Counterröhrchen überführt. Die Radioaktivität der Zellsuspensionen wurde in einem γ -Szintillations-Counter gemessen.

3.2.1.10 Endozytose von AlexaFluor[®]-Transferrin

Zellen wurden in 24 *well*-Platten auf sterilen Deckgläschen kultiviert. Es folgte eine Inkubation in entsprechendem Zellkulturmedium mit Alexa Fluor[®]-Transferrin (20 µg/ml) für 20 min bei 37 °C. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und für die Fluoreszenzmikroskopie präpariert.

3.2.1.11 Fluoreszenzmikroskopie

In eine 24 well-Platte wurden sterile Deckgläschen gegeben, Zellen ausgesät und für 16-24 h kultiviert. Die Zellen wurden transfiziert und für 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und bei RT für 20 min mit 4 % PFA fixiert. Es folgten zwei weitere Waschschritte mit PBS und eine 5-minütige Inkubation in 50 mM NH₄Cl-Lösung, um freie Aldehydgruppen zu blockieren. Die Zellen wurden für 10 min in 0,1 % Saponin in PBS (Saponin/PBS) inkubiert. Um unspezifische Proteinwechselwirkungen zu verringern, folgte eine Inkubation in 3 % BSA in Saponin/PBS für 30 min bei RT. Die Deckgläschen wurden auf einen Parafilm-Streifen überführt und für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper in 3 % BSA in Saponin/PBS inkubiert. Für Co-Lokalisationsstudien erfolgte die Inkubation simultan mit Primärantikörpern aus unterschiedlichen Spezies. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 10 min in Saponin/PBS inkubiert. Es folgte die Inkubation mit Alexa Fluor[®] 488- oder 546-gekoppelten Sekundärantikörpern in 3 % BSA in Saponin/PBS für 1 h bei RT. Es folgten zwei Waschschritte mit PBS. Zur Anfärbung der Zellkerne wurden die Zellen für 5 min in DAPI (2 µg/ml PBS) inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS und einmal mit dH₂O gewaschen, um Salze zu entfernen. Die Deckgläschen wurden in Aqua-Poly/Mount[®] eingebettet und über Nacht getrocknet. Die Analyse der Proben erfolgte mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop Leica TCS SP5. Für die Bearbeitung der Bilder wurde die Leica LAS AF Lite Software oder Adobe Photoshop 7.0 verwendet.

3.2.2 Biochemische Methoden

3.2.2.1 Ernten von Zellen und Herstellung von Zelllysaten

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

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, abgeschabt und für 5 min bei 900 \times g bei 4 °C sedimentiert. Das Zellpellet wurde je nach Größe in 100-500 µl Lysispuffer mit 1 x Proteaseinhibitor resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 16.000 \times g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lysaten erfolgte mit dem Bio-Rad-Protein Assay nach Herstellerangaben. Eine Kalibirierung wurde mit Hilfe von Standard-BSA-Lösungen (0, 5, 10, 15 and 20 μ g/ μ l) durchgeführt.

3.2.2.3 Deglykosylierung von Proteinen

Für die Deglykosylierung von Proteinen wurde das Enzym PNGase F verwendet, welches *in-vitro N*-glykosidische Bindungen an Glykoproteinen spaltet. Hierfür wurden zu 50-100 μ g eines Proteinextraktes 10 % SDS (Endkonzentration 0,2 %) hinzugegeben und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden 10 % NP-40 (Endkonzentration 1 %) und 2 μ l PNGase F hinzugegeben, mit dH₂O auf 100 μ l aufgefüllt und die Proben für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Kontrollen wurden unter gleichen Bedingungen, ohne PNGase F inkubiert.

3.	2.	.2	.4	Immun	prä	zip	oita	tion	von	meta	bol	isch	mar	kierten	Protei	nen
				-												

Lysispuffer:	PBS, 0,4 % Triton-X-100, 0,2 % Na-Desoxycholat, 0,2 % SDS, 0,8 % BSA, 1 x Proteaseinhibitor
Neufeld-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH8,5), 0,6 M NaCl, 0,1 % SDS, 0,05 % NP-40
IMM-Puffer:	PBS, 1 % Triton-X-100, 0,5 % Na-Desoxycholat

Die Zellpellets wurden in 1200 μ l Lysispuffer resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 20.000 × g und 4 °C zentrifugiert. Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurden die Lysate für 1 h bei 4 °C mit 50 μ l anti-Ratte IgG-Agarose-Beads auf dem Drehrad inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 1 min bei 1000 × g und 4 °C wurden die Überstande in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Beads verworfen. Die Überstände wurden über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad mit einem monoklonalen Antikörper gegen die α -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase inkubiert. Um die Antigen-Antikörper-Komplexe zu präzipitieren, wurden die Überstände für 1 h bei 4 °C auf dem Drehrad mit 50 μ l anti-Ratte IgG Agarose-Beads inkubiert. Die Proben wurden bei $1000 \times g$ und 4 °C für 1 min zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und bei -20 °C gelagert und die Beads wie folgt gewaschen:

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

Die präzipitierten Proteine wurden durch 5-minütiges Erhitzen in Solubilisierungspuffer bei 95 °C von den Agarose-Beads gelöst. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Fluorographie analysiert.

3.2.2.5 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer molaren Masse erfolgte mit einem diskontinuierlichen Puffersystem durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Acrylamidkonzentration der Trenngele variierte von 8-15 %.

Trenngel:	8-12 % Acrylamid, 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 % SDS, 0,08 % APS, 0,08 % TEMED
Sammelgel:	4 % Acrylamid, 125 mM Tris/HCl (pH 6,8), 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,1 % TEMED
Solubilisierungspuff	fer (Endkonzentration): 125 mM Tris/HCl (pH 6.8), 1 % SDS, 10 % Glycerin, Coomassie [®] Blue R ± 100 mM DTT
Anodenpuffer:	Tris/HCl (pH 8,6), 192 mM Glycin
Kathodenpuffer:	25 mM Tris/HCl (pH 8,6), 192 mM Glycin, 0,1 % SDS

Für die Solubilisierung wurden 50-100 μ g Proteinextrakt mit Solubilisierungspuffer unter reduzierenden (+ DTT) oder nicht-reduzierenden Bedingungen (- DTT) für 5 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 3 h bei 50 mA und RT.

3.2.2.6 Fluorographie

Die Fluorographie diente zur Signalverstärkung von [³⁵S]-markierten Proteinen nach Auftrennung durch die SDS-PAGE. Zur Entwässerung wurden die Gele zunächst dreimal für 20 min in DMSO geschwenkt. Über Nacht wurden die Gele in 20 % PPO/DMSO bei 37 °C inkubiert. Es folgten drei Waschschritte in dH₂O, wobei das in die Gele diffundierte PPO ausgefällt wurde. Die Gele wurden zwischen zwei Cellophan-Folien für 2 h in einem Geltrockner getrocknet. Es wurden Röntgenfilme auf die Gele aufgelegt, die bis zur Entwicklung bei -80 °C gelagert wurden.

3.2.2.7 Westernblot-Analyse

Transferpuffer:	25 mM Tris (pH 7,4), 192 mM Glycin, 20 % Methanol
TBS:	25 mM Tris (pH 7,4), 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl
Blockierungspuffer:	TBS, 0,1 % Tween 20, 5 % Milchpulver oder 1 % BSA
Waschpuffer:	TBS, 0,1 % Tween 20
ECL-1:	100 mM Tris/HCl (pH 8,5), 2,7 mM Luminol, 0,44 mM p- Cumarinsäure
ECL-2:	100 mM Tris/HCl (pH 8,5), 0,02 % H ₂ O ₂

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese zur Immunodetektion auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Transfer erfolgte für 3 h bei 900 mA oder über Nacht bei 250 mA in einer Elektroblot-Apparatur mit Transferpuffer. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h bei RT in Blockpuffer inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper verdünnt in Blockpuffer für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C (siehe Tabelle 3.7). Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen und danach für 1 h mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (siehe

Tabelle 3.8). Die Membran wurde 3 x für 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Detektion der gebundenen Antikörper durch eine *enhanced chemiluminescence*-(ECL)-Reaktion.

Hierfür wurden jeweils 5 ml der ECL-1- und ECL-2-Lösung gemischt und für 30 s auf der Membran inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mit dem Molecular Imager[®]/ChemiDocTM. Die Expositionszeit richtete sich nach der Signalstärke und variierte von 10 s bis 5 min.

Um gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran für 5 min in dH₂O, für 5 min in 0,2 M NaOH-Lösung und erneut für 5 min in dH2O inkubiert. Die Membran konnte im Anschluss erneut für die Immunodetektion mit anderen Antikörpern verwendet werden.

Zur Detektion M6P-haltiger Proteine im Westernblot wurde ein *single chain fragment*-Antikörper (scFv M6P-1), welcher spezifisch M6P-Reste erkennt, eingesetzt (Müller-Loennies et al, 2010). Dieser Antikörper wurde über einen fusionierten c-Myc-Tag nachgewiesen. Die Detektion erfolgte über drei Antikörper. Die Inkubation mit dem M6P-Antikörper verdünnt in 1 % BSA-Blockpuffer erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die Membran wurde dreimal für 10 min in Waschpuffer gewaschen und anschließend mit einem monoklonalen anti c-Myc-Antikörper inkubiert. Nach drei weiteren 10-minütigen Waschschritten erfolgte die Inkubation mit anti-Maus-HRP-Antikörpern für 1 h. Die Membran wurde dreimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Entwicklung über die ECL-Reaktion.

3.2.2.8 Messung von Enzymaktivitäten

Reaktionspuffer: 0,1 M Na-Citrat, 0,4 % BSA, 0,2 % Triton-X-100

β-Hexosaminidase-Substratpuffer: 10 mM 4-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glukosaminid in Reaktionspuffer

β-Galaktosidase-Substratpuffer: 10 mM 4-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid in Reaktionspuffer

α-Mannosidase-Substratpuffer:5 mM 4-Nitrophenyl-α-D-Mannopyranosid in Reaktionspuffer

α-Fukosidase-Substratpuffer: 10 mM 4-Nitrophenyl-α-L-Fukopyranosid in Reaktionspuffer Stopp-Puffer: 0,4 M Glycin/NaOH (pH 10,4)

Pro Ansatz wurden 4 μ g eines Proteinextraktes aus Zellen verdünnt in 20 μ l dH2O bzw. 20 μ l Medium eingesetzt. Es wurden 20 μ l des entsprechenden Substratpuffers hinzugegeben und der Reaktionsansatz für 45 min (β -Hexosaminidase), 16 h (β -Galaktosidase, α -Mannosidase) oder 24 h (α -Fukosidase). Durch Zugabe von 160 μ l Stopp-Puffer wurde die Reaktion beendet. Die Messung der Absorption erfolgte als Doppelbestimmung bei E₄₀₅. Die Enzymaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

 $A = \frac{\Delta E / \min \times Vm}{\epsilon \times d \times Vp}$

- A: Enzymaktivität
- ΔE : Differenz der Extinktion (Absorption) pro Zeit
- ϵ : molarer Extinktionskoeffizient [für Nitrophenol 18,45 / μ M × cm]
- V_P: Probenvolumen während der Reaktion [40 µl]
- V_M: Messvolumen in der Küvette
- d: Schichtdicke der Lösung

3.2.2.9 Bestimmung der GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität

- Puffer A: 50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂, 2 mg/ml BSA, 2 mM ATP, 100 mM α-Methylmannosid (α-MM), 75 µM UDP-GlcNAc, 1 µCi [³H]-UDP-GlcNAc
- Puffer B: 2 mM Tris/HCl (pH 8.0)
- Puffer C: 30 mM NaCl, 2 mM Tris/HCl (pH 8.0)

Lysispuffer: PBS, 0,5 % Triton-X-100

Um die enzymatische Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase zu bestimmen, wurde UDP-[³H]-GlcNAc als Donor und α -Methylmannosid (α -MM) als [³H]-GlcNAc-1-Phosphatakzeptor eingesetzt (Ben-Yoseph *et al*, 1984; Qian *et al*, 2013).

CHO-Zellen, die in Kulturschalen (Ø 10 cm) kultiviert und gegebenenfalls transfiziert wurden, wurden geerntet und in 150 µl Lysispuffer resuspendiert. Nach der Proteinbestimmung wurden 100 µg Proteinextrakt mit Lysispuffer auf ein totales Volumen von 25 µl gebracht. Anschließend wurden 25 µl Puffer A hinzugegeben und der Reaktionsansatz für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Puffer B abgestoppt und die Proben auf eine QAE-Sephadex A-25-Säule (1 ml Säulenmatrix äquilibriert in Puffer B) gegeben. Dabei wurde das Reaktionsprodukt UDP-[³H]-GlcNAc-P von dem Ionen-Austauscher QAE gebunden. Die Säule wurde mit 5 ml Puffer B gewaschen. Die Elution erfolgte mit zweimal 2 ml Puffer C und einmal 1 ml Puffer C. Die Elutionen wurden gesammelt und die Radioaktivität in einem 5-fachen Volumen Szintillationsflüssigkeit gemessen.

3.2.2.10 GFP-Trap[®]-Beads-Pulldown

Lysispuffer:	10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0.1 % Nonidet P40, 1 x Proteaseinhibitor
Waschpuffer:	10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 1 x Proteaseinhibitor

Pulldown-Experimente ermöglichen die Identifizierung von Interaktionspartnern von Proteinen. Die GFP-Trap[®]-Beads bestehen aus Agarose-Kügelchen an die sogenannte *Nanobodies* gekoppelt sind, die in *Camelidae* produziert wurden (Gibbs, 2005). Diese bestehen aus monomeren variablen Domänen von Schwere-Ketten-Antikörpern, die GFP spezifisch erkennen und binden. Der Ablauf eines GFP-Trap[®]-Beads-*Pulldown*-Experimentes ist in Abb. 3.1 schematisch dargetsellt. Zellen, die in Zellkulturschalen (\emptyset 6 cm) kultiviert wurden, wurden mit der cDNA eines GFP-Fusionsproteins oder der cDNA des Proteins, für das eine Interaktion untersucht werden soll, transfiziert. Die Zellen wurden geerntet und in 400 µl Lysispuffer lysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt. Von den Lysaten wurden 50 µg zur späteren Analyse abgenommen (*Input*). Es folgte die Inkubation von 25 µl GFP-Trap[®]-Beads, die mit dem Waschpuffer äquilibriert wurden, für 2 h bei 4 °C auf einem Drehrad mit 500 µg des Lysates der Zellen, die mit dem GFP-Fusionsprotein transfiziert wurden. Das totale Volumen wurde mit Waschpuffer auf 500 µl angepasst. Die Proben wurden für 1 min bei 1,700 × g und 4 °C zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 50 µl abgenommen (Flow through). Es folgten drei Waschschritte mit Waschpuffer. Von dem letzten Waschschritt wurden 50 µl abgenommen (Waschfraktion). 500 µg des Proteinextraktes der Zellen, die mit der cDNA des zu untersuchenden Proteins transfiziert wurden, wurden für 2 h bei 4 °C auf einem Drehrad mit den vorgeformten Komplexen in einem Volumen von 500 µl inkubiert. Nach der Inkubation folgte eine Zentrifugation bei $1,700 \times g$ und $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und $50 \text{ }^{\circ}\text{L}$ des Überstandes wurden abgenommen (Flow through). Nach drei Waschschritten wurden erneut 50 µl (Waschfraktion). in abgenommen Die Proben wurden reduzierendem Solubilisierungspuffer für 5 min bei 95 °C gekocht und der Überstand anschließend abgenommen (Bound fraction). Alle Fraktionen wurden mittels Westernblot analysiert.



Abb. 3.1 Schematische Darstellung des GFP-Trap[®]-Beads-Pulldown. Extrakte aus HEK-Zellen, die ein GFP-Fusionsprotein überexprimierten, wurden mit GFP-Trap[®]-Beads inkubiert. Nach dem Waschen der Beads wurden die vorgeformten Komplexe aus GFP-Trap[®]-Beads und GFP-Fusionsproteinen mit Extrakten aus HEK-Zellen inkubiert, die das Protein exprimieren, dessen Interaktion mit dem GFP-Fusionsprotein untersucht werden sollte.

3.2.2.11 Größenausschluss-Chromatographie

OG-Puffer:	PBS, 15 mM n-Octylglucosid (OG)
OG-Lysispuffer:	PBS, 30 mM n-Octylglucosid (OG), 1 x Proteaseinhibitor

Mit Hilfe der Größenausschluss-Chromatographie können Moleküle aufgrund ihrer molaren Massen aufgetrennt werden.

Somit ist es möglich, die molare Masse von Proteinkomplexen in Relation zu bekannten molaren Massen von Standardproteinen zu bestimmen.

Hierfür wurde eine Superose-12-Säule zunächst am Chromatographie-System BioLogic DuoFlowTM angeschlossen, mit OG-Puffer äquilibriert und die Probenschleife manuell mit dem gleichen Puffer gespült. Danach wurden in einem Volumen von 400 μ l OG-Puffer eine Mischung aus fünf Standardproteinen mit unterschiedlichen molaren Massen aufgetragen. Bei einer Flussrate von 40 μ l/min erfolgte die Auftrennung der Proteine. Es wurden 50 Fraktionen von jeweils 100 μ l gesammelt und die Extinktion jeder Fraktion photometrisch bei 280 nm gemessen und ein Elutionsprofil erstellt.

Um zu analysieren, ob zwei Proteine in Proteinkomplexen ähnlicher molarer Massen vorliegen, wurden überexprimierende HEK-Zellen (\emptyset 6 cm) in 200 µl OG-Lysispuffer lysiert. Die Lysate wurden mit 200 µl eiskaltem PBS verdünnt und 50 µg des Proteinextraktes über die Superose-12-Säule mit einer Flussrate von 40 µl/min aufgetrennt. Es wurden 50 Fraktionen (je 100 µl) eluiert. Mittels SDS-PAGE wurden 50 µl des Zellextraktes als *Input* sowie die gesammelten Fraktionen aufgetrennt und durch Westernblot mit entsprechenden Antikörpern analysiert.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 Kultivierung und Lagerung von E. coli

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

Für die Anzucht von *E. coli* wurden die Kulturen mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C und 250 UPM inkubiert. Für die Selektion von Plasmiden wurden die Antibiotika Kanamycin (50 mg/l) oder Carbenicillin (100 mg/l) bei Ampicillinresistenz verwendet. Für die kurzzeitige Lagerung von Bakterien wurden mit Antibiotikum versetzte LB-Agar Platten verwendet. Für die langfristige Aufbewahrung von Bakterienklonen wurden so genannte Glycerin-Stocks hergestellt. Hierfür wurden 500 μ l Glycerin zu 500 μ l einer Übernachtkultur gegeben. Anschließend wurde der Glycerin-Stock mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.3.2 Transformation von Plasmiden in E. coli

Chemisch kompetente *E. coli* Top 10 oder BL21 Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 5 µl eines Ligationsansatzes oder 1 µg DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 sek. Nachdem der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert wurde, wurden 500 µl LB-Medium hinzugegeben und es folgte eine Inkubation im Schüttelinkubator bei 37 °C und 250 UPM für 1 h. Der Transformationsansatz wurde auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.3.3 Plasmidisolierung aus E. coli

Für die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* wurden das GeneJet-Plasmid-Minipräparationskit und das QIAquick[®]-Plasmid-Midipräparationskit nach Herstellerangaben verwendet.

3.2.3.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Mit einem Skalpell wurden die gewünschten DNA-Fragmente aus Agarosegelen ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA erfolgte mit dem GeneJetTM-Gelextraktionskit nach Herstellerangaben.

3.2.3.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde mittels eines UV-Photometers bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen dH₂O ermittelt. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Konzentration von 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 μ g/ml RNA. Die Reinheit der Nukleinsäurelösungen gibt der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ an. Dieser sollte für DNA-Lösungen 1,8 und für RNA-Lösungen 2,0 betragen.

3.2.3.6 Restriktion von DNA

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen können zur Vorbereitung einer anschließenden Ligation cDNA-Fragmente und Vektoren geschnitten werden. Hierfür wurden FastDigest[®]-Enzyme in folgendem Reaktionsansatz verwendet:

- $2 \mu l$ 10 x FastDigest[®]-Puffer
- 1 μ l Restriktionsenzym(e) (10 U/ μ l)
- x µl DNA (0.1-1 µg)
- x µl Nucleasefreies Wasser (20 µl Endvolumen)

3.2.3.7 Ligation on DNA

Um komplementäre Enden von kohäsiven DNA-Fragmenten miteinander zu verbinden, wurde eine Ligation mit der T4-DNA-Ligase nach folgenden Pipettierschema verwendet:

- 100 ng Vektor-DNA
- x µl DNA-Fragment (3-5 molarer Überschuss)
- 1 µl 10 x T4-Ligase-Puffer
- 1 µl T4-DNA-Ligase (1 Unit/µl)
- $x \mu l dH_2O (10 \mu l Endvolumen)$

3.2.3.8 Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer: 40 mM Tris/HCl (pH 8,5), 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarose-Gele verwendet, für die 1-1,5 % Agarose in TAE-Puffer aufgekocht wurde. Die Agarose/TAE-Lösung wurde zunächst abgekühlt und anschließend mit einer Ethidiumbromid-Lösung (Endkonzentration 0,5 μ g/ μ l) versetzt. In horizontalen Elektrophoresekammern wurden die Agarosegele mit TAE-Puffer überschichtet. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 120 V für 15-30 min. Es folgte die Detektion der DNA-Fragmente unter UV-Licht.

3.2.3.9 Polymerasekettenreaktion

Die Amplifizierung von spezifischen DNA-Sequenzen erfolgte durch die Polymerasekettenreaktion. Es wurde die KAPA-Hifi-Polymerase in folgendem PCR Ansatz verwendet:

- $5 \mu l$ 5 μl KAPA-HiFi-Puffer
- $0.75 \,\mu l$ 10 μM forward-Primer
- $0.75 \,\mu l$ 10 μM reverse-Primer
- 0,75 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 1 µl KAPA HiFi-Polymerase
- $x \mu l$ Template (50 ng)
- x µl Nukleasefreies Wasser (50 µl Endvolumen)

Die PCR-Reaktion erfolgte nach folgendem Temperaturprogramm:

	Temperatur	Zeit	
1.	98 °C	5 min	
2.	98 °C	20 sek	
3.	60-70°C	30 sek	
4.	72 °C	30 sek/kb	[2-3] x 30 Zyklen
5.	72 °C	5 min	

Ortsspezifische Mutagenese

Um Nukleotide einer spezifischen DNA-Sequenz eines Plasmids auszutauschen, wurde das KAPA HiFi PCR-Kit verwendet. Hierfür wurden zwei komplementäre Oligonukleotide, die die gewünschte Mutation enthielten, entworfen. Plasmide mit der mutierten Sequenz wurden in einer PCR-ähnlichen Reaktion wie folgt synthetisiert:

- $5 \mu l$ 5 x KAPA HiFi-Puffer
- 0.75 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 0.75 μl 10 μM *forward*-Mutageneseprimer
- 0.75 µl 10 µM *reverse*-Mutageneseprimer
- 1 µl KAPA HiFi-Polymerase
- $x \mu l$ Template (50 ng)
- x µl Nukleasefreies Wasser (25 µl Endvolumen)

Die PCR-Reaktion erfolgte nach folgendem Temperaturprogramm:

	Temperatur	Zeit	
1.	98 °C	5 min	
2.	98 °C	45 sek	
3.	60 °C	30 sek	
4.	72 °C	260 sek	[2-4] x 18 Zyklen
5.	72 °C	30 min	

Kolonie-PCR

Für die Kolonie-PCR wurde ein Insert-spezifischer Primer sowie ein Vektor-spezifischer Primer verwendet, um falsch positive Klone zu vermeiden. In Reaktionsgefäßen wurde 10 µl dH₂O vorgelegt. Zellen aus Einzelkolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze abgenommen und in dem vorgelegten dH₂O resuspendiert. Pro Kolonie wurde wurde folgender Reaktionsansatz vorbereitet:

- 14,9 µl dH₂O
- $2 \mu l$ Puffer (10 ×)
- 0,4 µl MgCl₂ (50 mM)
- $0,5 \ \mu l$ 10 μM forward-Primer
- $0,5 \ \mu l$ 10 μM reverse-Primer
- 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM)
- $0,2 \mu l$ Taq-Polymerase (5 U/ μl)

Zu dem Reaktionsansatz, der auf Eis pipettiert wurde, wurde je 1 µl der Bakteriensuspension gegeben. Die PCR-Reaktion erfolgte nach folgendem Temperaturprogramm:

Temperatur	Zeit	
94 °C	3 min	
94 °C	45 sek	
40-70 °C	30 sek	
72 °C	15-30 sek	[2-3] x 40 Zyklen
72 °C	15-30 min	
	Temperatur 94 °C 94 °C 40-70 °C 72 °C 72 °C	Temperatur Zeit 94 °C 3 min 94 °C 45 sek 40-70 °C 30 sek 72 °C 15-30 sek 72 °C 15-30 min

3.2.3.10 Sequenzierung von DNA

DNA-Proben wurden von der Firma SEQLAB (Sequence Laboratories, Göttingen) sequenziert. Es wurde folgender Ansatz für die Sequenzierung vorbereitet:

- 3 μl 10 pM Primer
- $x \mu l$ Template (1.2 μg Plasmid)
- x µl Nukleasefreies Wasser (15 µl Endvolumen)

3.2.3.11 Extraktion von RNA aus kultivierten Zellen

Die Extraktion von RNA aus kultivierten Zellen erfolgte mit dem GeneJet-RNA Aufreinigungskit nach Herstellerangaben. Um die Qualität der extrahierten RNA zu überprüfen, wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen.

3.2.3.12 Synthese von cDNA

Die Synthese von cDNA erfolgte mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transkriptasekit nach Herstellerangaben. Es wurden folgender PCR-Ansatz und folgendes PCR-Programm für die cDNA-Synthese verwendet:

3.2.3.13 Quantitative Realtime-PCR

TagMan[®]-Genexpressionsassays Die quantitative Realtime-PCR wurde mit durchgeführt. Jeder Assay enthält einen forward-Primer, einen reverse-Primer sowie eine TaqMan[®]-Sonde, die am 5'-Ende mit einem Reporterfarbstoff und am 3'-Ende mit einem nicht-fluoreszierendem Quencherfarbstoff markiert ist. Diese Sonde lagert sich an eine spezifische cDNA-Sequenz zwischen dem forward- und dem reverse-Primer an. Eine Verlängerung der Sonde durch die DNA-Polymerase wird durch ein 3'-OHblockierendes Phosphat an der Sonde verhindert. Die Synthese der DNA durch die DNA-Polymerase beginnt somit am forward-Primer. Durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität wird der Reporterfarbstoff freigesetzt was in einer Zunahme der Fluoreszenz resultiert. In dem PCR-Zyklus, in dem die Fluoreszenz signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt, ist der so genannte cycle of threshold (CT) erreicht. Die Zunahme der Fluoreszenz verhält sich dabei proportional zur Menge der gebildeten DNA. Es wurde folgendes PCR-Programm für die Realtime-PCR verwendet:

	Temperatur	Zeit	
1.	95 °C	10 min	
2.	95 °C	30 sek	
3.	60 °C	1 min	[2-3] x 40 Zyklen

Die Berechnung der Daten erfolgte mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Hierfür wurde zunächst die Differenz zwischen dem C_T-Wert des zu untersuchenden Gens und dem Kontrollgen (β -Aktin) berechnet. Aus dem Vergleich der einzelnen Gruppen (Probe gegen Kontrolle) wurde die relative Expression nach der folgenden Gleichung ermittelt (Schmittgen & Livak, 2008).

 $2^{-\Delta\Delta C}_{T}$ mit $\Delta C_{T} = C_{T \text{ Gen}} - C_{T \text{ Kontrollgen}}$ $\Delta\Delta C_{T} = \Delta C_{T \text{ Probe}} - \Delta C_{T \text{ Kontrolle}}$

Für die graphische Auswertung wurde $\Delta\Delta C_T$ gleich 1 gesetzt. Alle PCR-Reaktionen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit dem Fluoreszenzdetektor MX3000PTM.

3.2.3.14 Statistische Auswertung der Messdaten

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel 2010. Bei Mehrfachbestimmungen wurde das arithmetische Mittel als Ergebnis dargestellt und die Standardabweichung angegeben. Zur Kalkulation von Unterschieden zwischen zwei unterschiedlichen Datensätzen wurde ein Students *T*-Test durchgeführt. Bei einem p-Wert von < 0,05 wurden die Unterschiede als signifikant eingestuft. Es erfolgte eine Einteilung in drei Signifikanzniveaus: p < 0,05 (*), p < 0,01 (**) und p < 0,005 (***).

4. ERGEBNISSE

Die Site-1-Protease übernimmt eine essentielle Funktion für die Biogenese von Lysosomen. Die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins durch die Site-1-Protease aktiviert die GlcNAc-1-Phosphotransferase und ermöglicht die Generierung von M6P-Erkennungsmarkern an löslichen lysosomalen Enzymen und somit deren Transport vom Golgi-Apparat zu den Lysosomen. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins durch die Site-1-Protease untersucht. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Rolle der Site-2-Protease für die proteolytische Aktivierung des α/β -Vorstufenproteins und den Transport lysosomaler Enzyme analysiert.

4.1 Proteolytische Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase durch die Site-1 Protease

In den folgenden Experimenten wurden cDNAs des *full-length* α/β -Vorstufenproteins, einer verkürzten Form des α^*/β -Vorstufenproteins der GlcNAc-1-Phosphotransferase oder der Site-1-Protease in Zelllinien überexprimiert (Abb. 4.1). Das verkürzte α^*/β -Vorstufenprotein, bei dem die Aminosäuren 431-848 deletiert sind, erfüllt alle strukturellen Voraussetzungen, um in den Golgi-Apparat transportiert und von der Site-1-Protease gespalten zu werden (Marschner *et al*, 2011).



Abb. 4.1 Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte. Für die Überexpression in verschiedenen Zelllinien wurden cDNAs des *full-length* α/β -Vorstufenproteins (α/β), des verkürzten α^*/β -Vorstufenproteins (α^*/β) der GlcNAc-1-Phosphotransferase, bei dem die Aminosäuren 431-848 deletiert sind, oder der Site-1-Protease (S1P) verwendet.

4.1.1 Spaltung des α/β -Vorstufenproteins durch die Site-1-Protease

In Lysaten von CHO-Zellen, die das α/β -Vorstufenprotein überexprimierten, wurde im Westernblot mit einem monoklonalen Antikörper gegen die α-Untereinheit ein 190 kDa Polypeptid detektiert, das in untransfizierten Zellen nicht nachweisbar war (Abb. 4.2 A, Bahn 1 und 2). Die gespaltene α-Untereinheit konnte als schwaches 14 kDa Polypepdid detektiert werden (Bahn 2). Nach Behandlung der Zellextrakte mit PNGase F waren die deglykosylierten Formen des α/β -Vorstufenproteins und der α -Untereinheit bei 155 und 120 kDa nachweisbar (Bahn 3). In Proteinextrakten von Zellen, die das verkürzte α^*/β -Vorstufenprotein exprimierten, wurde eine immunoreaktive Bande von 120 kDa nachgewiesen (Abb. 4.2 B, Bahn 2), die dem α^*/β -Vorstufenprotein entspricht (Marschner *et al*, 2011). Zusätzlich wurde die α^* -Untereinheit als 90 kDa Polypeptid detektiert. Die deglykoslierten Formen des α^*/β -Vorstufenproteins und der verkürzten α^* -Untereinheit wurden mit molaren Massen von 100 und 55 kDa nachgewiesen (Bahn 3). Diese Experimente zeigen, dass das überexprimierte *full-length* und die verkürzte Form des α^*/β -Vorstufenproteins von der endogenen Site-1-Protease in CHO-Zellen gespalten werden. Die Site-1-Protease konnte in überexprimierenden Zellen als 130 kDa immunoreaktive Bande detektiert werden, die in Extrakten von untransfizierten Zellen nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.2 C).



Abb. 4.2 Expression des α/β -Vorstufenproteins und der Site-1-Protease in CHO-Zellen. Für die Überexpression in CHO-Zellen wurden cDNAs (A) des α/β -Vorstufenproteins (α/β), (B) des verkürzten α^*/β -Vorstufenproteins (α^*/β) oder (C) der Site-1-Protease (S1P) transient transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und mit (+) oder ohne (-) PNGase F behandelt (A, B). Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit einem monoklonalen Antikörper gegen die α -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase oder den C-terminalen myc-Tag der Site-1-Protease (C) analysiert. Die molaren Massen von Markerproteinen in kDa sind angegeben. d.g.: deglykosyliert.

Um die Spaltung des verkürzten α^*/β -Vorstufenproteins genauer zu untersuchen, wurde ein Pulse-Chase-Experiment durchgeführt, das dazu dient, den Transport und die Prozessierung neu synthetisierter Proteine nach radioaktiver Markierung zu analysieren. Es sollte damit gleichzeitig untersucht werden, ob der monoklonale Antikörper gegen die α -Untereinheit nicht nur für Immunfluoreszenzfärbungen und Westernblot-Analysen (De Pace et al, 2014), sondern auch für Immunpräzipitationen verwendet werden kann. CHO-Zellen wurden für 1 h mit [³⁵S]-Methionin inkubiert (*Pulse*). Danach wurden die Zellen entweder geerntet oder für 1, 3 oder 5 h in nicht-radioaktivem Medium kultiviert (Chase). Es folgte eine Immunpräzipitation mit dem monoklonalen Antikörper gegen die a-Untereinheit aus den Zelllysaten mit anschließender SDS-PAGE und Fluorographie. Nach dem *Pulse* konnte das neu synthetisierte α^*/β -Vorstufenprotein als 120 kDa immunoreaktive Bande detektiert werden (Abb. 4.3 A, Bahn 2). In Extrakten untransfizierter Zellen konnte kein spezifisches Signal nachgewiesen werden (Bahn 1). Nach 1 h Chase konnte zusätzlich die reife α^* -Untereinheit als 70 kDa Polypeptid präzipitiert werden (Bahn 3), dessen Menge nach 3 h Chase zunahm (Bahn 4). Es handelte sich somit um die proteolytische Prozessierung des α^*/β -Vorstufenproteins zur reifen α^* -Untereinheit.



Abb. 4.3 Proteolytische Spaltung des neu synthetisierten α^*/β -Vorstufenproteins. Das verkürzte α^*/β -Vorstufenprotein wurde für 24 h in CHO-Zellen überexprimiert. Die Zellen wurden für 1 h mit [³⁵S]-Methionin (160 µCi/ml) markiert (*Pulse*), anschließend entweder geerntet (-) oder für 1, 3 oder 5 h mit nicht-radioaktivem Medium kultiviert. Mit einen Antikörper gegen die α -Untereinheit wurden die α^*/β -Vorstufenproteine sowie die α^* -Untereinheiten aus den Zelllysaten präzipitiert, per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Fluorographie sichtbar gemacht. Die molaren Massen von Markerproteinen in kDa sind angegeben.

Nach 5 h *Chase* war zwar eine Abnahme der Menge des α^*/β -Vorstufenproteins, aber keine weitere Zunahme der α^* -Untereinheit zu beobachten (Bahn 5).

Die GlcNAc-1-Phosphotransferase ist im *cis*-Golgi-Apparat lokalisiert (Tiede *et al*, 2005) während die Lokalisation der Site-1-Protease sowohl im *cis*- und *medial*-Golgi-Apparat, als auch in Endosomen beschrieben wurde (Seidah *et al*, 1999). Um zu untersuchen, ob die GlcNAc-1-Phosphotransferase und die Site-1-Protease co-lokalisieren, wurden das verkürzte α^*/β -Vorstufenprotein und/oder die Site-1-Protease in Hela-Zellen exprimiert und durch Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Das α^*/β -Vorstufenprotein co-lokalisierte mit dem endogenen *cis*-Golgi Matrixprotein 130 (GM130) (Abb.4.4 A). Die Site-1-Protease co-lokalisierte mit den verkürzten α^*/β -Vorsufenproteinen (Abb. 4.4 C). Dies bedeutet, dass das α^*/β -Vorstufenprotein zusammen mit der Site-1-Protease im *cis*-Golgi-Apparat lokalisiert ist.



Abb. 4.4 Co-Lokalisation des verkürzten α^*/β -Vorstufenproteins und der Site-1-Protease. Die cDNAs des α^*/β -Vorstufenproteins (A) oder der Site-1-Protease mit C-terminalen myc-Tag zusammen mit cDNA des α^*/β -Vorstufenproteins (B) wurden in Hela-Zellen transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen die α -Untereinheit (α^*/β (A) grün, (B) rot), oder gegen den myc-Tag der Site-1-Protease (S1P-myc, grün) oder GM130 (rot) gefärbt. Gelb zeigt die Co-Lokalisation an. Der Balken entspricht 5 µm.

In S1P-defizienten CHO-Zellen (SRD-12B) wurde gezeigt, dass das α/β -Vorstufenprotein nicht proteolytisch aktiviert wird. Durch Westernblot-Analysen gegen M6P-haltige Proteine konnte indirekt gezeigt werden, dass die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase in SRD-12B-Zellen stark verringert war (Marschner *et al*, 2011). Um die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase in den SRD-12B-Zellen direkt zu bestimmen, wurden *in-vitro*-Aktivitätsassays mit UDP-[³H]-GlcNAc als Phosphatdonor und α -Methylmannosid als Phosphatakzeptor durchgeführt. In Lysaten der S1P-defizienten SRD-12B-Zellen betrug die GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität ca. 30 % im Vergleich zu den CHO-Kontrollzellen (Abb. 4.5). Um zu untersuchen, ob diese Reduktion reversibel ist, wurden SRD-12B-Zellen mit der cDNA der Site-1-Protease transfiziert. Dazu wurden parallel zum Aktivitätsassay Westernblot-Analysen der Lysate der untransfizierten und transfizierten SRD-12B-Zellen durchgeführt und die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase auf die Expression der Site-1-Protease normalisiert. Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase in SRD-12B-Zellen durch die Überexpression der Site-1-Protease auf signifikante 75 % der CHO-Kontrollzellen erhöht werden konnte (Abb. 4.5) und belegt, dass die S1P-vermittelte Spaltung des α/β -Vorstufenproteins essentiell für die Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase ist.



Abb. 4.5 Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase in Site-1-Protease-defizienten Zellen. Die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase wurde *in-vitro* in Extrakten (100 µg) von CHO-Kontrollzellen und untransfizierten bzw. mit S1P-myc transfizierten SRD-12B-Zellen bestimmt. Die Inkubation der Lysate mit UDP-[³H]-GlcNAc (spezifische Aktiviät: 0,5 µCi/pmol UDP-GlcNAc) und 50 mM α -Methylmannosid erfolgte für 1 h bei 37 °C. Die Aktivität in Proteinextrakten von CHO-Kontrollzellen wurde gleich 100 % gesetzt (Mittelwert ± Standardabweichung; ***p < 0,005, ** p < 0,01, n = 2). Die Extrakte der untransfizierten und transfizierten SRD-12B-Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit einem Antikörper gegen den myc-Tag der Site-1-Protease analysiert. Die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase wurde auf die Expression der Site-1-Protease normalisiert. Die molaren Massen von Markerproteinen in kDa sind angegeben.

Die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins durch die Site-1-Protease erfolgt zwischen den Aminosäuren K928 und D929 (Abb. 4.1) (Kudo *et al*, 2005). Essentiell für die Spaltung sind die Aminosäuren R925, L927 sowie K928 in der α -Untereinheit, während die Aminosäuren 929-934 in der β -Untereinheit keinen Einfluss auf die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins haben (Marschner *et al*, 2011). In einem MLII-diagnostizierten Patienten wurde eine Deletion von 36 Aminosäuren (Y937_M972del) in der β -Untereinheit identifiziert (Cury *et al*, 2013). Die Mutation wurde in die Wildtyp-cDNA eingeführt und in HEK-Zellen überexprimiert.

Die Wildtyp-Formen des *full length* α/β -Vorstufenproteins und der gespaltenen α - bzw. β -Untereinheiten wurden bei 190, 155 und 45 kDa detektiert (Abb. 4.6 A, Bahn 1). Nach Deglykosylierung der Zellextrakte mit PNGase F waren die entspechenden deglykosylierten Formen bei 155, 120 und 38 kDa nachweisbar (Bahn 2). Das mutierte glykosylierte bzw. deglykosylierte α/β -Vorstufenprotein (Y937_M972del) wurde bei 180 bzw. 145 kDa detektiert (Bahn 3 und 4).



Abb. 4.6 Expression und Spaltung einer MLII-assoziierten Deletionsmutante des α/β -Vorstufenproteins. (A) HEK-Zellen oder (B) Site-1-Protease-defiziente Zellen (SRD-12B) wurden mit der cDNA des α/β -Vorstufenproteins (α/β) oder der Mutante Y937_M972del transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und in Gegenwart (+) oder Abwesenheit (-) von PNGase F für 1 h behandelt. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit einem monoklonalen Antikörper gegen die α -Untereinheit und gegen den C-terminalen myc-Tag des α/β -Vorstufenproteins analysiert. Die molaren Massen von Markerproteinen in kDa sind angegeben. d.g.: deglykosyliert.

Die immunreaktiven Signale für die mutierten ß-Untereinheiten waren in Lysaten der HEK-Zellen deutlich schwächer als die der Wildtyp-β-Untereinheiten. Da durch die Deletion eine verkürzte, elektrophoretisch schneller laufende Bande der
ß-Untereinheit zu erwarten wäre, zeigte der Westernblot erstaunlicherweise, dass die mutierte β-Untereinheit bei 47 kDa und die deglykosylierte, mutierte ß-Untereinheit bei 40 kDa nachgewiesen wurden (Abb. 4.6 A, Bahn 3 und 4). Dies lässt vermuten, dass die Deletion der Aminosäuren 937 bis 972 zu einer alternativen Spaltung des α/β -Vorstufenproteins in der α -Untereinheit führt. Daraufhin sollte untersucht werden, ob die Site-1-Protease für diese alternative Spaltung verantwortlich ist. Daher wurden die cDNAs des Wildtyp- α/β -Vorstufenproteins oder des mutierten α/β -Vorstufenproteins in Site-1-Proteasedefiziente SRD-12B-Zellen transfiziert. Die glykosylierten bzw. deglykosylierten α/β -Vorstufenproteine des Wildtyps und der Mutante konnten mit den gleichen molaren Massen wie in überexprimierenden HEK-Zellen detektiert werden (Abb. 4.6 B Bahn 2 und 4). Das bedeutet, dass das mutierte α/β -Vorstufenprotein aufgrund der Deletion für beide Formen eine erhöhte elektrophoretische Mobilität aufwies. Es wurden keine Signale für die α - und β -Untereinheiten in Lysaten der S1P-defizienten SRD-12B-Zellen nachgewiesen (Abb. 4.6 B Bahn 1-4). Daher ist die Spaltung des mutierten α/β -Vorstufenproteins an einer alternativen Spaltstelle auf die Site-1-Protease zurückzuführen.

Weiterhin wurde die Lokalisation der Y937_M972del-Mutante mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Das Wildtyp- α/β -Vorstufenprotein colokalisierte mit dem *cis*-Golgi-Markerprotein GM130, jedoch nicht mit dem ER-Markerprotein PDI (Abb. 4.7 A). Das mutierte α/β -Vorstufenprotein co-lokalisierte dagegen sowohl mit PDI als auch mit GM130. Dies bedeutet, dass der Transport des mutierten α/β -Vorstufenproteins vom ER in den Golgi-Apparat beeinträchtigt ist und möglicherweise für die geringere Menge an gebildeter β -Untereinheit (Abb.4.7 A) verantwortlich ist.



Abb. 4.7 Lokalisation und Aktivität einer MLII-assoziierten Deletionsmutante des α/β -Vorstufenproteins. HEK-Zellen wurden mit der cDNA des α/β -Vorstufenproteins (α/β) oder der Y937_M972del-Mutante transfiziert. (A) Die fixierten Zellen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen die α -Untereinheit (grün) und GM130 oder PDI (rot) gefärbt. Gelb zeigt die Co-Lokalisation an. Der Balken entspricht 5 µm. (B) Die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase wurde *in-vitro* in den Extrakten (100 µg) der überexprimierenden Zellen bestimmt. Die Inkubation der Zellextrakte mit UDP-[³H]-GlcNAc (spezifische Aktivität in Extrakten von Zellen, die das Wildtyp- α/β -Vorstufenprotein überexprimierten, wurde gleich 100 % gesetzt (Mittelwert ± Standardabweichung; *** p < 0,005, n = 3).

Um zu untersuchen, ob sich die Mutation Y937_M972del auf die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase auswirkt, wurden *in-vitro*-Aktivitätsassays mit UDP-[³H]-GlcNAc und Extrakten von HEK-Zellen durchgeführt, die zuvor mit dem Wildtyp α/β -Vorstufenprotein bzw. mit dem mutierten α/β -Vorstufenprotein transfiziert wurden. Es zeigte sich, dass das mutierte α/β -Vorstufenprotein nicht aktiv war (Abb. 4.7 B).

Die Ergebnisse belegen, dass die S1P-vermittelte Spaltung des α/β -Vorstufenproteins essentiell für die Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase ist und dass eine Überexpression der Site-1-Protease in Site-1-Protease-defizienten Zellen zu einem *Rescue* der GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität führt. Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass für die Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins zwischen den Aminosäuren K928 und D929 erfolgen muss.

4.1.2 Untersuchung der Interaktion zwischen der Site-1-Protease und der GlcNAc-1-Phosphotransferase

Der hexamere GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplex ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) wurde nach Größenausschluss-Chromatographie in Fraktionen hoher molarer Massen von über 660 kDa nachgewiesen (Bao et al, 1996a; Encarnacao et al, 2011). Um zu untersuchen, ob das α/β-Vorstufenprotein der GlcNAc-1-Phosphotransferase und die Site-1-Protease ähnlich großen Proteinkomplexen vorliegen, wurden Trennungen mittels in Größenausschluss-Chromatographie durchgeführt. Dazu wurde über eine Superose-12-Säule zunächst eine Mischung aus fünf Standardproteinen mit unterschiedlichen molaren Massen aufgetrennt und ein Elutionsprofil erstellt (Abb. 4.8 A). Anschließend wurden Octylglucosid-Proteinextrakte aus HEK-Zellen, die mit den cDNAs des α/β -Vorstufenproteins und der Site-1-Protease co-transfiziert wurden, über die Superose-12-Säule aufgetrennt und die Fraktionen gesammelt. Aliquote (50 µl) des Zellextraktes (Input, In) sowie die gesammelten Fraktionen 1-9 wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblot gegen die α -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase bzw. gegen den myc-Tag der Site-1-Protease analysiert. Im *Input* wurde das 190 kDa α/β -Vorstufenprotein detektiert (Abb. 4.8 B). Die α -Untereinheit konnte als schwaches 145 kDa Signal nachgewiesen werden. Nach der Superose-12-Auftrennung der Zellextrakte wurde das α/β -Vorstufenprotein hauptsächlich in den Fraktionen 2-4 detektiert, die einer molaren Masse von 440 bis 660 kDa entsprechen.

In den Fraktionen 1 sowie 5-9 wurden lediglich geringe Signale für das α/β -Vorstufenprotein und keine Signale für die α -Untereinheit detektiert. Die Site-1-Protease konnte in der *Input*-Fraktion als 130 kDa Polypeptid nachgewiesen werden (Abb. 4.8 B). Es wurden zusätzlich drei weitere immunoreaktive Banden geringerer molarer Masse detektiert, die in Triton-X-100-behandelten Zellextrakten nicht nachweisbar waren (Abb. 4.8 B). Nach der Größenausschluss-Chromatographie wurde die Site-1-Protease hauptsächlich in den Fraktionen 2 und 3 detektiert, die Proteinkomplexen von ca. 660 kDa entsprechen. In den Fraktionen 1 sowie 4-6 wurden nur schwache S1P-Signale detektiert. Die Banden geringerer molarer Massen, die in der *Input*-Fraktion detektiert wurden, konnten in den gesammelten Fraktionen nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.8 B). Die Ergebnisse zeigen, dass das α/β -Vorstufenprotein sowie die Site-1-Protease in hochmolekularen Proteinkomplexen vorliegen.



Abb. 4.8 Größenausschluss-Chromatographie des α/β -Vorstufenproteins und der Site-1-Protease. (A) Das Chromatogramm zeigt das Elutionsprofil von Standardproteinen bekannter molarer Massen, die bei einer Flussrate von 40 µl/min durch eine Superose-12-Säule aufgetrennt wurden. Es wurden Fraktionen von jeweils 100 µl gesammelt und die Extinktion jeder Fraktion photometrisch bei 280 nm gemessen. (B) Proteinextrakte (50 µg) von Zellen, die mit cDNAs des α/β -Vorstufenproteins (α/β) und der Site-1-Protease (S1P-myc) co-transfiziert wurden, wurden mit einer Superose-12-Säule bei einer Flussrate von 40 µl/min aufgetrennt. Eluierte Fraktionen (100 µl) sowie die *Input*-Fraktion wurden mittels Westernblot analysiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen die α -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase oder gegen den myc-Tag der Site-1-Protease analysiert. Die molaren Massen von Markerproteinen in kDa sind ebenfalls angegeben.

Mittels GFP (green fluorescent protein)-Trap[®] Beads-Pulldown wurde anschließend untersucht, ob eine direkte Interaktion zwischen dem α/β -Vorstufenprotein der GlcNAc-1-Phosphotransferase und der Site-1-Protease gezeigt werden kann. GFP-Trap[®] ist ein an Agarose-Beads gekoppeltes GFP-bindendes Protein, mit dem GFP-Fusionsproteine zusammen mit Interaktionspartnern unter geeigneten Bedingungen präzipitiert werden können. Hierfür wurde das α/β -Vorstufenprotein als C-terminales GFP-Fusionsprotein (α/β -GFP) in HEK-Zellen überexprimiert und das Proteinlysat (500 µg) mit GFP-Trap[®] Beads inkubiert.

Nach Abnahme des Überstandes (*Flow through*) wurden die Beads mit Lysaten (500 µg) Site-1-Protease-überexprimierender HEK-Zellen inkubiert. Die Beads (bound fraction) sowie Aliquots des Inputs, der Flow through- und Waschfraktionen wurden mittels Westernblot analysiert. Um eine unspezifische Bindung der Site-1-Protease mit GFP auszuschließen, wurde das Experiment unter den beschriebenen Bedingungen zunächst mit GFP-überexprimierenden Zellen durchgeführt. Im Input und im Flow through konnte ein Polypeptid von 27 kDa nachgewiesen werden, das der molaren Masse von GFP entspricht (Abb. 4.9 A, Bahn 1 und 2). In der Waschfraktion wurde kein Signal detektiert (Bahn 3). In den Input- und Flow through- Fraktionen der Zelllysate der S1P-mycüberexprimierenden Zellen wurde die 130 kDa Site-1-Protease detektiert (Bahn 4 und 5). In der bound fraction konnte nur das GFP nachgewiesen werden (Bahn 7). Somit bindet die Site-1-Protease nicht unspezifisch an GFP. In den Input- und Flow through-Fraktionen der Zelllysate der α/β -GFP- bzw. S1P-myc- exprimierenden HEK-Zellen wurde das 220 kDa α/β -GFP-Fusionsprotein (Abb. 4.9 B, Bahn 1 und 2) bzw. die 130 kDa Site-1-Protease mit C-terminalem myc-Tag (Bahn 4 und 5) nachgewiesen. In den Waschfraktionen wurden keine Signale detektiert (Bahn 3 und 6). In der bound fraction wurde das α/β -GFP-Fusionsprotein, jedoch nicht die Site-1-Protease nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Site-1-Protease unter diesen Bedingungen nicht an das α/β -GFP-Fusionsprotein bindet.



Abb. 4.9 Interaktion des α/β -Vorstufenproteins mit der Site-1-Protease. Zelllysate (500 µg) von (A) GFP- oder (B) α/β -GFP-überexprimierenden HEK-Zellen wurden mit GFP-Trap[®] Beads inkubiert. Nach dem Waschen der Beads wurden Zelllysate von S1P-myc überexprimierenden HEK-Zellen mit den vorgeformten GFP-Trap[®]-Komplexen inkubiert. Die *bound fraction* (100 %) sowie Aliquote (10 %) des jeweiligen *Inputs* (I), der *Flow through*-(Ft)-Fraktionen und des letztens Waschschrittes (W) wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot mit Antikörpern gegen GFP oder den myc-Tag analysiert. Die molaren Massen von Markerproteinen in kDa sind angegeben.

Die Ergebnisse zeigen, dass die GlcNAc-1-Phosphotranferase und die Site-1-Protease in hochmolekularen Komplexen von etwa 660 bis 440 kDa vorkommen. Es konnte jedoch mittels des GFP-Trap[®] Beads-*Pulldown* keine direkte Interaktion zwischen dem α/β -Vorstufenprotein und der Site-1-Protease gezeigt werden.

4.1.3 Bedeutung der *N*-Glykosylierung für den Transport und die Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase

Das α/β -Vorstufenprotein der GlcNAc-1-Phosphotransferase besitzt 20 potentielle N-Glykosylierungsstellen (Tiede et al. 2005). Für das Lassa-Virus-Glykoprotein C und den Transkriptionsfaktor CREBH (cAMP-responsive element binding protein, hepatocyte specific) wurde gezeigt, dass N-Glykosylierungen dieser Proteine eine wichtige Rolle für die Spaltung durch die Site-1-Protease spielen (Chan et al, 2010; Eichler et al, 2006). Die Bedeutung der N-Glykosylierungen des α/β -Vorstufenproteins für die proteolytische Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotranferase wurde durch Behandlung von CHO-Zellen mit Tunicamycin untersucht. Tunicamycin ist ein Inhibitor der Dolichol-P-GlcNAc-Phosphotransferase, die den ersten Schritt in der Synthese von N-Glykanen katalysiert (Heifetz *et al*, 1979). CHO-Zellen wurden mit der cDNA des verkürzten α^*/β -Vorstufenproteins transient transfiziert und nach 6 h für weitere 18 h in Kulturmedium mit oder ohne Tunicamycin (2,5 µg/ml) (Tsaytler et al, 2011) kultiviert. Es folgte ein Pulse-Chase-Experiment mit anschließender Immunpräzipitation, SDS-PAGE und Fluorographie. Nach 1 h Pulse konnte aus Zellextrakten unbehandelter Zellen das 120 kDa α^*/β -Vorstufenprotein präzipitiert werden (Abb. 4.10 B, Bahn 2). Während nach 3-stündiger Chase-Periode geringere Mengen des α^*/β -Vorstufenproteins detektiert wurden (Bahn 4), war die reife 70 kDa α^* -Untereinheit nachweisbar (Bahn 4). In Zellextrakten Tunicamycin-behandelter Zellen wurde nach dem Pulse ein 100 kDa Polypeptid präzipitiert, bei dem es sich um das unglykosylierte α^*/β -Vorstufenprotein handelte (Bahn 3). Die unglykosylierte α^* -Untereinheit konnte nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Tunicamycin-Behandlung die Syntheserate des α^*/β -Vorstufenproteins verringerte und unglykosylierte α^*/β -Vorstufenproteine nicht gespalten, und im Vergleich zum glykosylierten α^*/β -Vorstufenprotein schneller degradiert werden.

Um den intrazellulären Transport des α^*/β -Vorstufenproteins unter Tunicamycin-Behandlung zu untersuchen, wurden die überexprimierenden CHO-Zellen durch Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. In unbehandelten Zellen co-lokalisierte das α^*/β -Vorstufenprotein mit dem *cis*-Golgi-Markerprotein GM130 (Abb. 4.10 B), jedoch nicht mit dem ER-Markerprotein PDI. In den Tunicamycin-behandelten Zellen wurde das α^*/β -Vorstufenprotein im ER und nicht im Golgi-Apparat nachgewiesen (Abb. 4.10 B).



Abb. 4.10 Spaltung und Transport des unglykosylierten α^*/β -Vorstufenproteins. CHO-Zellen wurden mit der cDNA des verkürzten α^*/β -Vorstufenproteins transfiziert. Nach 6 h wurden die Zellen in Kulturmedium ohne (-) oder mit (+) Tunicamycin (TM) (2,5 µg/ml) für 18 h kultiviert. Das Medium der zuvor mit Tunicamycin behandelten Zellen enthielt in allen nachfolgenden Schritten 2,5 µg/ml Tunicamycin. (A) Die Zellen wurden für 1 h mit [³⁵S]-Methionin markiert (*Pulse*), anschließend geerntet oder für weitere 3 h mit nicht-radioaktivem Medium ohne (-) oder mit (+) Tunicamycin kultiviert. Mit einem Antikörper gegen die α -Untereinheit wurden die α^*/β -Vorstufenproteine sowie die α^* -Untereinheiten aus den Zelllysaten präzipitiert, per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Fluorographie sichtbar gemacht. Die molaren Massen von Markerproteinen in kDa sind angegeben. (B) Die Zellen wurden fixiert und mit Antikörpern gegen die α -Untereinheit (α^*/β grün), GM130 (rot) bzw. PDI (rot) gefärbt. Gelb zeigt die Co-Lokalisation an. Der Balken entspricht 5 µm.

Die fehlende *N*-Glykosylierung des α^*/β -Vorstufenproteins nach Tunicamycin-Behandlung resultierte in einer Retention des α/β -Vorstufenproteins im ER, was dazu führte, dass das α/β -Vorstufenprotein nicht von der Site-1-Protease gespalten werden konnte. Somit zeigen die Ergebnisse, dass die *N*-Glykosylierung des α/β -Vorstufenproteins essentiell für den Transport des α/β -Vorstufenproteins vom ER in den Golgi-Apparat ist.

4.1.4 Bedeutung von Calcium für den Transport und die Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase

Das α/β-Vorstufenprotein der GlcNAc-1-Phosphotransferase enthält verschiedene Calcium-Bindungsstellen und eine strukturelle EF-Hand-Domäne zur Bindung von Calcium-Ionen (NCBI-Datenbank). Um die Rolle von Calcium für den Transport und die proteolytische Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase zu untersuchen, wurden HEK-Zellen mit dem α/β-Vorstufenprotein transfiziert und für 18 h mit dem Calcium-Ionophor A23187 (0,3 μ M) (Lenz *et al*, 2001) oder Thapsigargin (0,3 μ M) (Tsukumo *et al*, 2007) behandelt. Das Calcium-Ionophor A23187 erhöht die Fähigkeit divalenter Ionen zelluläre Membranen zu passieren, und sorgt somit für eine gleichmäßige Verteilung von Calcium-Ionen innerhalb der Zelle (Pressman, 1976). Thapsigargin ist ein spezifischer Inhibitor der SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum Ca*²⁺-*ATPase*)-Pumpe, der zu einer Reduktion des Calcium-Gehaltes im ER sowie im Golgi-Apparat führt (Pinton *et al*, 1998; Thastrup *et al*, 1990).

In Extrakten unbehandelter Zellen wurde das 190 kDa α/β -Vorstufenprotein sowie die 45 kDa β -Untereinheit nachgewiesen, die in untransfizierten Zellen nicht nachweisbar waren (Abb.4.11 A, Bahn 1 und 2). Nach Behandlung der Zellen mit dem Calcium-Ionophor konnte in den Zellextrakten eine geringere Menge des α/β -Vorstufenproteins und ein sehr schwaches Signal für die β -Untereinheit detektiert werden (Bahn 3). In Lysaten Thapsigargin-behandelter Zellen wurde lediglich das α/β -Vorstufenprotein detektiert (Bahn 4). Da Thapsigargin unter den gewählten Bedingungen den größten inhibitorischen Effekt auf die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins zeigte, wurde dieser Inhibitor für die folgenden Experimente eingesetzt. Um zu analysieren, ob durch die Calcium-Reduktion auch die Spaltung des verkürzten α^*/β -Vorstufenproteins inhibiert wird, wurden überexprimierende HEK-Zellen mit Thapsigargin behandelt. In Zellextrakten der unbehandelten Zellen wurde das 120 kDa α^*/β -Vorstufenprotein sowie die 90 kDa α -Untereinheit nachgewiesen (Abb. 4.11 B, Bahn 2). In den Zellextrakten behandelter Zellen konnte lediglich das α^*/β -Vorstufenprotein und keine gespaltene α^* -Untereinheit detektiert werden (Bahn 3).



Abb. 4.11 Spaltung des α/β -Vorstufenproteins nach Calcium-Depletion. HEK-Zellen wurden mit der cDNA des (A) *full-length* α/β -Vorstufenproteins (α/β) oder (B) des verkürzten α^*/β -Vorstufenproteins (α^*/β) transfiziert und für 18 h mit (+) oder ohne (-) 0,3 μ M Calcium-Ionophor A23187 oder 0,3 μ M Thapsigargin (TG) behandelt. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit einem Antikörper gegen (A) den C-terminalen myc-Tag des α/β -Vorstufenproteins oder (B) die α -Untereinheit analysiert. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen α -Tubulin verwendet. Die molaren Massen von Markerproteinen in kDa sind angegeben.

Im nächsten Experiment wurde der Einfluß von Thapsigargin auf die subzelluläre Lokalisation des *full length* α/β -Vorstufenproteins untersucht. Hela-Zellen wurden zunächst mit der cDNA des α/β -Vorstufenproteins transfiziert, mit oder ohne Thapsigargin für 24 h kultiviert und anschließend mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Sowohl in den unbehandelten als auch in den mit Thapsigargin-behandelten Zellen zeigte sich eine Co-Lokalisation des α/β -Vorstufenproteins mit dem *cis*-Golgi-Markerprotein GM130 (Abb. 4.12).

Die Ergebnisse zeigen, dass ein durch Thapsigargin induzierter Calcium-Mangel im ER und im Golgi-Apparat sowohl die Spaltung des *full-length* α/β -Vorstufenproteins als auch des verkürzten α^*/β -Vorstufenproteins verhindert. Der inhibitorische Effekt der Thapsigargin-Behandlung auf die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins ist auf die Wirkung der fehlenden proteolytischen Spaltung und nicht auf eine induzierte Retention des α/β -Vorstufenproteins im ER durch Thapsigargin zurückzuführen.



Abb. 4.12 Lokalisation des α/β -Vorstufenproteins nach Calcium-Reduktion. Das α/β -Vorstufenprotein wurde in Hela-Zellen überexprimiert und in Kulturmedium ohne Thapsigargin (- TG) oder mit 0,3 μ M Thapsigargin (+ TG) kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen die α -Untereinheit (α/β grün) und gegen GM130 (rot) gefärbt. Gelb zeigt die Co-Lokalisation an. Der Balken entspricht 5 μ m.

4.1.5 Bedeutung des zellulären Cholesterol-Gehaltes für den Transport lysosomaler Enzyme

Die Site-1-Protease übernimmt durch die Spaltung von SREBPs (*sterol regulatory element binding proteins*) eine essentielle Rolle in der zellulären Cholesterol- und Fettsäurehomeostase (Brown & Goldstein, 1997). Die SREBPs 1 und 2 werden Cholesterol-abhängig vom ER in den Golgi-Apparat transportiert und anschließend von der Site-1-Protease und der Site-2-Protease gespalten (Rawson *et al*, 1997; Sakai *et al*, 1998). Der somit freigesetzte, N-terminale Transkriptionsfaktor wird in den Zellkern transportiert und aktiviert die Genexpression von Proteinen, die essentiell für die Aufnahme und die Biosynthese von Cholesterol sind. Im folgenden Teil der Arbeit wurde untersucht, ob der Transport und die Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase und der daraus resultierende Transport lysosomaler Enzyme durch den zellulären Cholesterol-Gehalt reguliert wird.

4.1.5.1 Auswirkung von Veränderungen des zellulären Cholesterol-Gehaltes auf die Expression des LDL-Rezeptors

Zunächst musste ein geeignetes Zellsystem zur gezielten Veränderung des intrazellulären Cholesterolgehaltes etabliert werden. Durch die Behandlung von embryonalen Mausfibroblasten (MEF) mit Atorvastatin sollte ein Cholesterol-Mangel verursacht werden. Atorvastatin ist ein spezifischer Inhibitor der HMG-CoA-Reduktase (Baumann et al, 1992), die das Schlüsselenzym der Cholesterol-Biosynthese darstellt. Ein intrazellulärer Cholesterol-Überschuss sollte dagegen durch die Behandlung mit humanem low densitiv lipoprotein (LDL) hervorgerufen werden. In Fibroblasten wird die Menge des LDL-Rezeptors (LDLR) unter Atorvastatin- bzw. LDL-Behandlung auf Protein- und mRNA-Ebene hoch- bzw. herunterreguliert (Goldstein et al, 1983). Immortalisierte MEF, die aus Wildtyp-Mäusen präpariert wurden, wurden für 48 h mit Atorvastatin (10 µM) oder LDL (100 µg/ml) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte MEF des Mausmodells für die MLII-Erkrankung, die durch einen erhöhten lysosomalen Cholesterol-Gehalt charakterisiert sind (Kollmann et al, 2012). Anschließend wurde RNA für quantitative Realtime-PCR-Analysen aus den Zellen isoliert und es wurden Zelllysate für Westernblot-Analysen hergestellt. In Atorvastatinbehandelten Zellen wurde eine 6-fach erhöhte Expression der Ldlr-mRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen nachgewiesen (Abb. 4.13 A). Die LDL-Behandlung führte dagegen zu einer 4-fachen Verringerung der Ldlr-Expression gegenüber unbehandelten Zellen. In den MLII-MEF war die basale Ldlr-Expression im Vergleich zu den Wildtyp-MEF 3-fach erhöht. Die Transkriptmenge des endogenen α/β -Vorstufenproteins (Gnptab) wurde weder durch die Behandlung mit Atorvastatin noch durch LDL verändert. In den MLII-MEF war die Expression des Gnptab-Gens im Vergleich zu den Wildtyp-MEF stark verringert (Abb. 4.13 A) (Kollmann et al, 2012). Bei dem Maus-Modell für MLII handelt es sich um ein "knock-in"-Mausmodell bei dem eine Frameshift-Mutation (c.3082insC) in das Maus-Genom eingebracht wurde. Die gebildete mRNA ist instabil (Kollmann et al, 2012). In den Zellextrakten der unbehandelten Wildtyp-Zellen wurde der LDL-Rezeptor als schwaches immunoreaktives Signal bei 120 kDa detektiert (Abb. 4.13 B).



Abb. 4.13 Expression des LDL-Rezeptors auf mRNA- und Proteinebene. MEF von Wildtyp- oder MLII-Mäusen wurden für 48 h ohne (-) oder mit (+) 10 μ M Atorvastatin (ATV) oder 100 μ g/ml LDL kultiviert. (A) RNA wurde aus den Zellen isoliert, die cDNA synthetisiert und die relative Expression der *Ldlr*- und *Gnptab*-mRNA durch quantitative Realtime-PCR bestimmt und gegen die Expression von β -Actin normalisiert. Die *Ldlr*-Expression in den unbehandelten Wildtyp-MEF wurde gleich 1 gesetzt (Mittelwert \pm Standardabweichung; ***p < 0,005, **p < 0,01, n = 3). (B) Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit einem Antikörper gegen den LDL-Rezeptor analysiert. Die Gapdh-Expression diente als Ladekontrolle. Die molaren Massen von Markerproteinen in kDa sind angegeben.

Die densitometrische Auswertung ergab, dass sich unter Atorvastatin-Behandlung die Expression des LDL-Rezeptors um das ca. 11-fache des Ausgangswertes erhöhte. Die LDL-Behandlung führte zu einer Reduktion der LDL-Rezeptor-Expression von ca. 75 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Eine 3-fach erhöhte basale Expression des LDL-Rezeptorproteins wurde in MLII-MEF beobachtet.

Die Behandlung von Mausfibroblasten mit Atorvastatin bzw. LDL veränderten sensitiv und reproduzierbar den Cholesterol-Gehalt der Zellen, was durch die Expression des LDL-Rezeptors auf mRNA- und Proteinebene exemplarisch gezeigt werden konnte. Damit sind Bedingungen in einem Zellmodell etabliert worden, die es erlauben die Abhängigkeit der Translokation des α/β -Vorstufenproteins vom ER zum Golgi-Apparat und die anschließende Site-1-Protease-vermittelte proteolytische Aktivierung des GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplexes zu untersuchen.

4.1.5.2 Untersuchung des Transportes und der proteolytischen Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase

Um die Abhängigkeit des Transportes des α/β -Vorstufenproteins vom Cholesterol-Gehalt zu untersuchen, wurden als zweites Kontrollsystem Fibroblasten von *Niemann-Pick disease, type C* (NPC)-Patienten verwendet. In den hier verwendeten Patientenfibroblasten liegt eine Mutation im *NPC1*-Gen vor, was zum Verlust der Funktion des lysosomalen Membranproteins NPC1 führt. Dadurch ist der Export von unverestertem Cholesterol aus den Lysosomen gestört, was zu einem intrazellulären Cholesterol-Mangel führt (Carstea *et al*, 1997; Erickson *et al*, 2001). Sowohl in den Kontrollfibroblasten als auch in den NPC1-Patientenfibroblasten co-lokalisierte das exprimierte α^*/β -Vorstufenprotein komplett mit dem Golgi-Markerprotein GM130 (Abb. 4.14 A und B). Dies zeigt, dass der Transport des α^*/β -Vorstufenproteins vom ER zum *cis*-Golgi-Apparat Cholesterol-unabhängig erfolgt.



Abb. 4.14 Transport des α/β -Vorstufenproteins unter Atorvastatin- und LDL-Behandlung. (A) Humane Kontrollfibroblasten oder (B) NPC1-Patientenfibroblasten wurden für 24 h mit 10 μ M Atorvastatin (ATV) oder 100 μ g/ml LDL kultiviert. Die Zellen wurden mit dem verkürzten α^*/β -Vorstufenprotein (α^*/β) transfiziert, nach weiteren 24 h Kultivierung in den entsprechenden Medien fixiert und mit Antikörpern gegen die α -Untereinheit (grün) und GM130 (rot) gefärbt. Gelb zeigt die Co-Lokalisation an. Die Balken entsprechen 5 μ m.

Im zweiten Versuchsansatz wurde der Cholesterol-Gehalt durch Atorvastatin bzw. LDL in MEF von Wildtyp- und MLII-Mäusen bzw. in Kontrollfibroblasten und NPC1-Patienten verändert und die proteolytische Spaltung des α^*/β -Vorstufenproteins mittels Westernblot analysiert.
In Zellextrakten der Wildtyp-MEF konnte das überexprimierte α^*/β -Vorstufenprotein als schwache, 120 kDa immunoreaktive Bande und die α^* -Untereinheit als starke 90 kDa Bande nachgewiesen werden, deren Intensität sich unter der Atorvastatin bzw. LDL-Behandlung im Vergleich mit unbehandelten Zellen nicht veränderte (Abb. 4.15 A, Bahn 2-4).



Abb. 4.15 Spaltung des α^*/β -Vorstufenproteins unter Atorvastatin- und LDL-Behandlung. MEF von Wildtyp- oder MLII-Mäusen (A) bzw. humane Kontrollfibroblasten oder NPC1-Patientenfibroblasten (B) wurden für 24 h mit 10 μ M Atorvastatin (ATV) oder 100 μ g/ml LDL kultiviert. Die Zellen wurden mit cDNA des α^*/β -Vorstufenproteins transfiziert und nach weiteren 24 h Kultivierung in den entsprechenden Medien lysiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit einem Antikörper gegen die α -Untereinheit analysiert. Als Ladekontrolle diente die Gapdh-Expression. Die molaren Massen von Markerproteinen in kDa sind angegeben.

In Lysaten der MLII-MEFs wurden ebenfalls das α^*/β -Vorstufenprotein sowie die reife α^* -Untereinheit nachgewiesen (Bahn 5). Die Expression war jedoch generell schwächer als in Wildtyp-MEF. In den Zellextrakten humaner Kontrollfibroblasten wurden das α^*/β -Vorstufenprotein und die α^* -Untereinheit in den mit Atorvastatin- oder LDL-behandelten Zellen als Signal gleich starker Intensität im Vergleich zu den Zellextrakten unbehandelter Zellen nachgewiesen (Abb. 4.15 B, Bahn 2-4). In Lysaten der NPC1-Fibroblasten wurde ebenfalls das α^*/β -Vorstufenprotein sowie die α^* -Untereinheit detektiert (Bahn 5), die im Vergleich zu den humanen Kontrollfibroblasten jedoch stärkere Signale aufwiesen.

Die Ergebnisse zeigen, dass Veränderungen des zellulären Cholesterol-Gehaltes keinen Einfluss auf die S1P-vermittelte Spaltung des α^*/β -Vorstufenproteins hatten.

4.1.5.3 Untersuchung der Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase und des Transportes lysosomaler Enzyme

Mit den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob Veränderungen des zellulären Cholesterol-Gehaltes zu Veränderungen der Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase und des Transportes lysosomaler Enzyme führen. Durch Westernblot-Analyse mit einem Antikörper, der spezifisch gegen M6P-Reste von Proteinen gerichtet ist, wurde indirekt die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase bestimmt (Müller-Loennies *et al*, 2010). In Zellextrakten unbehandelter oder Atorvastatin- bzw. LDL-behandelter Wildtyp-MEF wurde eine Vielzahl von M6P-haltigen Proteinen mit molaren Massen zwischen 40 und 130 kDa nachgewiesen (Abb. 4.16 A Bahn 1-3). Im Vergleich zu Lysaten aus MEF von Wildtyp-Mäusen konnten in Lysaten aus MEF von MLII-Mäusen nur sehr schwache, unspezifische Signale detektiert werden (Bahn 4) (Kollmann *et al*, 2012).



Abb. 4.16 Sortierung lysosomaler Enzyme unter Atorvastatin- und LDL-Behandlung. MEF-Zellen von Wildtyp- oder MLII-Mäusen wurden für 48 h mit 10 μ M Atorvastatin (ATV) oder 100 μ g/ml LDL kultiviert. (A) Die Zellen wurden lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit einem Antikörper gegen M6P-haltige Proteine analysiert. (B) Zellextrakte und Medien wurden für 24 h konditioniert und die relativen Enzymaktivitäten des lysosomalen Enzyms β -Hexosaminidase bestimmt. Die Aktivitäten der Zellextrakte und Medien der unbehandelten Wildtyp-MEF wurden gleich 1 gesetzt (Mittelwert ± Standardabweichung; ***p < 0,005, n = 3) (C) Die Menge von intrazellulärem Cathepsin Z wurde mittels Westernblot mit einem Antikörper gegen Cathepsin Z bestimmt. Als Ladekontrolle wurde die Expression von β -Tubulin verwendet. Die molaren Massen von Markerproteinen in kDa sind angegeben.

Um den Transport lysosomaler Enzyme zu untersuchen, wurden die Enzymaktivitäten der
ß-Hexosaminidase in Zellextrakten und Medien von Zellen bestimmt. Die gemessenen Aktivitäten der ß-Hexosaminidase unterschieden sich nicht zwischen den unbehandelten und den behandelten MEF (Abb. 4.16 B). In den Zellextrakten der MLII-MEF, die als Kontrolle verwendet wurden, war die Aktivität der β-Hexosaminidase aufgrund der M6P-abhängigen Fehlsortierung um ca. 80 % verringert. In den Medien der MLII-MEF hingegen wurde eine um 4,5-fach erhöhte β-Hexosaminidase-Aktivität im Vergleich zu den Medien der Wildtyp-MEF nachgewiesen. Aufgrund des Verlustes der GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität wird in MLII-Zellen das lysosomale Enzym Cathepsin Z nicht zu den Lysosomen transportiert, sondern ins Medium sezerniert (Kollmann et al, 2012). In Zellextrakten der unbehandelten und der mit LDL- bzw. Atorvastatin-behandelten Wildtyp-MEF wurde endogenes Cathepsin Z als 36 kDa immunoreaktive Bande detektiert. Die Intensität der Bande unterschied sich in den verschiedenen Zellextrakten nicht (Abb. 4.16 C, Bahn 1-3). In den Zellextrakten von MLII-MEF, die als Negativkontrolle verwendet wurden, wurde wie erwartet kein Cathepsin Z nachgewiesen (Bahn 4). Diese Ergebnisse zeigen, dass Änderungen des zellulären Cholesterol-Gehaltes keinen Einfluss auf die M6P-abhängige Sortierung der lysosomalen Enzyme β -Hexosaminidase und Cathepsin Z haben.

4.1.5.4 Einfluss von Cholesterol auf die M6P-Rezeptor vermittelte Endozytose

Durch Bindung an den 300 kDa M6P-Rezeptor (MPR300) können fehlsortierte lysosomale Enzyme aus den Extrazellularräumen endozytiert und über frühe und späte Endosomen zu den Lysosomen transportiert werden (Braulke & Bonifacino, 2009). Um zu untersuchen, ob die Behandlung von MEF mit Atorvastatin bzw. LDL einen Einfluss auf die Endozytose hat, wurde das rekombinante, lysosomale Enzym Arylsulfatase B (ASB) mit radioaktivem Jod [¹²⁵I] markiert und die Endozytose in den ATV- bzw. LDLbehandelten MEF-Zellen untersucht. Die ASB wird M6P-abhängig internalisiert und in den Lysosomen über ein Intermediat von 47 kDa zu einer reifen Form von 15 kDa proteolytisch aktiviert (Steckel *et al*, 1983). Nach der Inkubation der Zellen mit [¹²⁵I]-ASB-haltigen Medium für 20 min wurden die Zellen geerntet oder für 2- bzw. 4 h in nicht-radioaktivem Medium kultiviert (*Chase*). Die Zelllysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert. Es folgte eine densitometrsiche Auswertung mit anschließender Normalisierung der Werte auf die Proteinkonzentration der Zellextrakte. In Zellextrakten der unbehandelten Zellen wurde ein starkes Signal für die [¹²⁵I]-ASB-Proform von 64 kDa nachgewiesen (Abb. 4.17 A, Bahn 1).



Abb. 4.17 Endozytose von Arlysulfatase B unter Atorvastatin- und LDL-Behandlung. MEF-Zellen von Wildtyp-Mäusen wurden für 48 h in DMEM mit 10 μ M Atorvastatin (ATV) oder 100 μ g/ml LDL kultiviert. Die Zellen wurden für 20 min in DMEM mit [¹²⁵I]ASB (625000 cpm/ml) mit (+) oder ohne (-) Zusatz von M6P inkubiert (*Pulse*). Die Zellen wurden gewaschen und entweder geerntet bzw. für 2 oder 4 h in nicht-radioaktivem Medium kultiviert. Zellextrakte mit gleichen β -Hexosaminidase-Aktivitäten (21 mU/mg Protein ± 3,1) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert. Es folgte eine densitometrsiche Auswertung der Radiographie und die Normalisierung der Werte auf die Proteinkonzentration. Die Werte für den *Pulse* in den nicht behandelten Zellen wurden =1 gesetzt (Mittelwert ± Standardabweichung, n = 2). Die molaren Massen von Markerproteinen in kDa und die Positionen der Proform (p), des Intermediates (i) und der reifen Form (r) von Arylsulfatase B sind angegeben.

Zusätzlich wurden Signale für das 47 kDa Intermediat sowie die 15 kDa reife Form detektiert (Bahn 1). Durch Zusatz von M6P konnte die Endozytose von [¹²⁵I]-ASB fast vollständig inhibiert werden (Bahn 2). Nach 2 h *Chase* wurde nur ein sehr schwaches Signal für die Proform von 64 kDa nachgewiesen, während für das 47 kDa Intermediat die Signalstärke zunahm. Das Signal für die reife Form nahm ab (Bahn 3). Nach 4 h *Chase* nahm die Signalstärke für das 47 kDa Intermediat nicht weiter zu, das Signal für die 15 kDa reife Form nahm jedoch ab (Bahn 4).

In Zellextrakten der ATV-behandelten MEF wurden für alle ASB-Formen gleich starke Signale im Vergleich zu den Zellextrakten unbehandelter WT-MEF detektiert (Bahn 5-7). In Zellextrakten der LDL-behandelten MEF wurde ein 2,5-fach stärkeres Signal für die Proform der [¹²⁵I]-ASB im Vergleich zu Zellextrakten unbehandelter MEF detektiert (Bahn 8). Nach 2 h *Chase* wurden das 47 kDa Intermediat sowie die 15 kDa reife Form in Zellextrakten der LDL-behandelten MEF nachgewiesen (Bahn 9). Die Signale waren stärker ausgeprägt als in unbehandelten und ATV-behandelten MEF. Nach 4 h *Chase* nahm die Menge des 47 kDa Intermediates zu, die Menge der 15 kDa reifen Form hingegen ab (Bahn 10). Die Ergebnisse zeigen, dass ein erhöhter zellulärer Cholesterol-Gehalt in den LDL-behandelten Zellen zu einer erhöhten Internalisierung von [¹²⁵I]-ASB führte. Ein durch Atorvastatin hervorgerufener Cholesterol-Mangel in der Zelle hatte keinen Einfluss auf die Endozytose von [¹²⁵I]-ASB.

Die Ergebnisse demonstrieren, dass im Gegensatz zu den SREBPs der Tranport und die proteolytische Aktivierung des α/β -Vorstufenproteins Cholesterol-unabhängig erfolgen. Der zelluläre Cholesterol-Gehalt hatte außerdem keinen Einfluss auf die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotranferase und die Sortierung lysosomaler Enzyme. Ein erhöhter zellulärer Cholesterol-Gehalt führte jedoch zu einer gesteigerten M6P-abhängigen Endozytose der lysosomalen Arylsulfatase B.

4.2 Rolle der Site-1- und Site-2-Protease für die Funktion von Lysosomen

Die regulierte Intramembranproteolyse durch die Site-1-Protease (S1P) und die Site-2-Protease (S2P) im Golgi-Apparat spielt eine wichtige Rolle für die Regulierung der zellulären Cholesterol- und Fettsäure-Homeostase und die ER-Stress-Regulierung (Brown & Goldstein, 1997; Shen & Prywes, 2004; Stirling & O'Hare, 2006). Nach der Spaltung des Substrates durch S1P wird das Substrat durch S2P in der Membrandomäne gespalten. Das α/β -Vorstufenprotein der GlcNAc-1-Phosphotransferase wird S1Pvermittelt zu den reifen α -und β -Untereinheiten gespalten (Marschner *et al*, 2011). Ob anschließend die S2P die Untereinheiten weiter prozessiert, war bisher nicht bekannt. Im folgenden Teil dieser Arbeit wurde daher die Rolle der Site-2-Protease für die Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase und den Transport von Proteinen entlang des Biosynthese- und Endozytoseweges zu den Lysosomen untersucht.

4.2.1 Expression und Spaltung des α/β-Vorstufenproteins in S1P- und S2Pdefizienten Zellen

Bei allen bisher bekannten S2P-Substraten handelt es sich um Typ-II-Membranproteine, bei denen der N-Terminus im Cytosol und der C-Terminus im Lumen des Golgi-Apparates lokalisiert sind. Während die α -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase ein Typ-II-Membranprotein ist, stellt die β-Untereinheit ein Typ-I-Membranprotein dar. Es wurde daher analysiert, ob die α -Untereinheit ein Substrat der S2P ist. Hierfür standen S2P-defiziente M19-Zellen zur Verfügung, die aus CHO-Zellen generiert wurden (Rawson et al, 1998). Als Kontrolle dienten S1P-defiziente SRD-12B-Zellen (Hasan et al, 1994). Da die SRD-12B- und M19-Zellen auxotroph für Cholesterol und Fettsäuren sind, wurden die Zellen mit Zusatz von Cholesterol (5 µg/ml), Na-Oleat (20 µM) und Na-Mevalonat (50 µM) kultiviert, während CHO-Kontrollzellen nicht supplementiert wurden. Es erfolgte eine wöchentliche Selektionierung der Zellen, da es sich bei SRD-12B- und M19-Zellen nicht um reine Zelllinien handelt. Der Erfolg der Selektionierung wurde durch die mRNA-Expression der S1P (MBTPS1) bzw. S2P (MBTPS2) mittels quantitativer Realtime-PCR regelmäßig überprüft.

Die relative *MBTPS1*-mRNA-Expression in den SRD-12B-Zellen betrug durchschnittlich 8 % im Vergleich zu CHO-Zellen (Abb. 4.18). In den M19-Zellen erreichte die *MBTPS2*-mRNA-Expression 0,3 % der *MBTPS2*-Expression in CHO-Zellen. Dies bedeutet, dass die Effizienz der Selektionierung in den M19-Zellen höher war als in den SRD-12B-Zellen.



Abb. 4.18 Expression der *MBTPS1*- bzw. *MBTPS2*-mRNA in S1P- und S2P-defizienten Zellen. RNA wurde aus den Zellen isoliert, die cDNA synthetisiert und die relative Expression der *MBTPS1*- bzw. *MBTPS2*-mRNA durch quantitative Realtime-PCR bestimmt und gegen die Expression von β -Actin normalisiert. Die *MBTPS1*- bzw. die *MBTPS2*-Expression in den CHO-Zellen wurde jeweils gleich 100 % gesetzt (Mittelwert ± Standardabweichung; *** p < 0,005, n = 10).

Um zu untersuchen, ob die α -Untereinheit von S2P gespalten wird, wurde das α^*/β -Vorstufenprotein in CHO-, M19- sowie SRD-12B-Zellen überexprimiert. Die Zellextrakte wurden mittels PNGase F-Behandlung deglykosyliert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblot mit einem Antikörper gegen die α -Untereinheit analysiert. In Extrakten von CHO-, M19- sowie SRD-12B-Zellen wurden die deglykosylierten Formen des α^*/β -Vorstufenproteins als Doppelbande bei 100 kDa nachgewiesen (Abb.4.19 A, Bahn 1, 2 und 3). Die deglykosylierte α^* -Untereinheit wurde in Zellextrakten von CHO- sowie M19-Zellen als 55 kDa Polypeptid nachgewiesen (Bahn 1 und 2). Die Daten ergaben keinen Hinweis darauf, dass das α^*/β -Vorstufenprotein von der S2P gespalten wird. Wie erwartet, wurde in Extrakten von SRD-12B-Zellen keine deglykosylierte, reife α^* -Untereinheit detektiert (Bahn 3) (Marschner *et al*, 2011). Zusätzlich wurde ein *Pulse-Chase-*Experiment durchgeführt. Hierfür wurden CHO-, SRD-12B- sowie M19-Zellen mit der cDNA des α^*/β -Vorstufenproteins für 24 h transfiziert. Die Zellen wurden anschließend für 1 h mit [³⁵S]-markiertem Methionin inkubiert (*Pulse*). Danach wurden die Zellen entweder geerntet oder für 3 h in nichtradioaktivem Medium kultiviert (*Chase*). Es folgte eine Immunpräzipitation mit einem monoklonalen Antikörper gegen die α -Untereinheit aus den Zellextrakten mit anschließender SDS-PAGE und Fluorographie. Nach dem *Pulse* konnte aus den Zellextrakten der CHO-, M19- sowie SRD-12B-Zellen das glykosylierte 120 kDa α^*/β -Vorstufenprotein präzipitiert werden (Abb.4.19 B, Bahn 2-4). Zusätzlich wurde in den Zellextrakten der CHO- und M19-Zellen die reife glykosylierte 70 kDa α^* -Untereinheit detektiert, die in Lysaten der SRD-12B-Zellen nicht nachgewiesen wurde (Bahn 2-4). Nach 3 h *Chase* konnte in den Extrakten der CHO-, M19- sowie SRD-12B-Zellen das α^*/β -Vorstufenprotein nachgewiesen werden (Bahn 5-7).



Abb. 4.19 Expression und Spaltung des α^*/β -Vorstufenproteins in S1P- und S2P-defizienten Zellen. Das α^*/β -Vorstufenprotein wurde für 24 h in CHO-, SRD-12B- und M19-Zellen überexprimiert. (A) Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit einem monoklonalen Antikörper gegen die α -Untereinheit analysiert. (B) Die Zellen wurden für 1 h mit [³⁵S]-Methionin (160 µCi/ml) markiert (*Pulse*), anschließend entweder geerntet (Chase -) oder für weitere 3 h mit nicht-radioaktivem Medium kultiviert. Mit einem Antikörper gegen die α -Untereinheit wurden die α^*/β -Vorstufenproteine sowie die α^* -Untereinheiten aus den Zelllysaten präzipitiert, per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Fluorographie analysiert. Die molaren Massen von Markerproteinen in kDa und die Positionen des α^*/β -Vorstufenproteins und der reifen α^* -Untereinheit sind angegeben.

Aus dem Lysat der SRD-12B-Zellen wurde zusätzlich ein Protein von 125 kDa präzipitiert, bei dem es sich vermutlich um komplex glykosyliertes α^*/β -Vorstufenprotein handelt, das aufgrund der nicht erfolgten Spaltung durch S1P in das *trans*-Golgi-Netzwerk weiter transportiert wurde (Bahn 7). Die reife α^* -Untereinheit wurde in Extrakten der CHO- und M19-Zellen als 70 kDa Polypeptid nachgewiesen (Bahn 5 und 6). Da zwischen CHO- und M19-Zellen keine Unterschiede im elektrophoretischen Laufverhalten der reifen α^* -Untereinheit nachgewiesen wurden, bestätigt das Ergebnis die Westernblot-Analyse und lässt vermuten, dass das α^*/β -Vorstufenprotein nicht von der Site-2-Protease prozessiert wird.

Um die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase in SRD-12B- und M19-Zellen zu bestimmen, wurden *in-vitro*-Aktivitätsassays durchgeführt. Die SRD-12B- und M19-Zellen wurden standardmäßig in einem Medium kultiviert, das Cholesterol, Na-Oleat und Na-Mevalonat enthielt (Rawson *et al*, 1998). Um zu untersuchen, ob diese Supplementierung einen Einfluss auf die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase hat, wurden CHO-Zellen im gleichen Medium kultiviert. Es zeigte sich, dass die Supplementierung keinen Einfluss auf die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase hatte (Abb. 4.20) und bestätigt die in Kapitel 4.1.5 beschriebenen Ergebnisse, die demonstrieren, dass sowohl der Transport als auch die Aktivierung des α/β -Vorstufenproteins Cholesterol-unabhängig erfolgen. In SRD-12B-Zellen war die GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität im Vergleich zu CHO-Zellen um 84 % reduziert, was auf die fehlende proteolytische Aktivierung des α/β -Vorstufenproteins ist. In M19-Zellen war die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase im Vergleich zu CHO-Zellen nicht signifikant um 12 % reduziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die α -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase kein Substrat der Site-2-Protease darstellt und dass die Site-2-Protease keine Rolle für die enzymatische Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase spielt.



Abb. 4.20 Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase in S1P- und S2P-defizienten Zellen. Die endogene Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase wurde *in-vitro* in Zellextrakten (100 µg Protein) von CHO-, SRD-12B- sowie M19-Zellen bestimmt. Als Kontrolle dienten zusätzlich CHO-Zellen, die mit Zusatz von Cholesterol, Na-Oleat sowie Na-Mevalonat kultiviert wurden (CHO + Chol.). Die Inkubation der Zellextrakte mit UDP-[³H]-GlcNAc (spezifische Aktivität: 0,5 µCi/pmol UDP-GlcNAc) und α -Methylmannosid-Akzeptorsubstrat erfolgte für 1 h bei 37 °C. Die GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität in CHO-Zellen wurde gleich 100 % gesetzt (Mittelwert ± Standardabweichung; *** p < 0,005, n = 3).

4.2.2 Analysen zur lysosomalen Funktion in S1P- und S2P-defizienten Zellen

S1P-defiziente Zellen weisen einen MLII-ähnlichen Phänotyp auf, der unter anderem durch eine Fehlsortierung lysosomaler Enzyme und die Akkumulation von Speichermaterial in den Lysosomen charakterisiert ist (Marschner *et al*, 2011). Mit den folgenden Experimenten sollte die lysosomale Funktion in S2P-defizienten Zellen untersucht werden.

4.2.2.1 Sortierung lysosomaler Enzyme

Die Aktivitäten von verschiedenen lysosomalen Enzymen wurden in Zelllysaten und konditionierten Medien von CHO-Zellen und M19-Zellen untersucht. Eine primäre und sekundäre Wirkung der S2P auf die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase sollte sich in einer Fehlsortierung/Hypersekretion neu synthetisierter, lysosomaler Enzyme äußern.

In den Zelllysaten von M19-Zellen waren die Aktivitäten der β -Hexosaminidase, der β -Galaktosidase, der α -Mannosidase und der α -Fukosidase im Vergleich zu CHO-Zellen um 50 %, 51 %, 74 % und 54 % erhöht (Abb. 4.21).



Abb. 4.21 Sortierung lysosomaler Enzyme in S2P-defizienten Zellen. CHO- und M19-Zellen wurden für 48 h in Optimem[®] konditioniert. Anschließend wurden die spezifischen Enzymaktivitäten von vier lysosomalen Enzymen, β -Hexosaminidase (β -Hex), β -Galaktosidase (β -Gal), α -Mannosidase (α -Man) und α -Fukosidase (α -Fuk) in Zelllysaten (mU/mg; A) und in konditionierten Medien (mU/48 h/mg Zellprotein; B) bestimmt. Die spezifischen Enzymaktivitäten in Zelllysaten bzw. in konidionierten Medien von CHO-Zellen wurden = 1 gesetzt (Mittelwert ± Standardabweichung; ***p < 0,005, n = 3)

In den Medien von M19-Zellen waren die Aktivitäten der β -Hexosaminidase, der β -Galaktosidase, der α -Mannosidase und der α -Fukosidase im Vergleich zu CHO-Zellen um das 8-, 9-, 10- und 5-fache erhöht (Abb. 4.21).

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten in Medien von Zellen, die mit dem Zusatz von Cholesterol, Mevalonat und Oleat kultiviert wurden ergab, dass diese Zusätze keinen Einfluss auf die Sortierung von lysosomalen Enzymen hatten (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse zeigen, dass es in den S2P-defizienten Zellen zu einer Fehlsortierung von lysosomalen Enzymen kommt.

4.2.2.2 Akkumulation von Speichermaterial in den Lysosomen S1P- und S2Pdefizienter Zellen

Es wurde untersucht, ob die Fehlsortierung lysosomaler Enzyme in einer Akkumulation von Speichermaterial in den Lysosomen von S2P-defizienten M19-Zellen resultiert. Dafür wurden CHO, SRD-12B- und M19-Zellen fixiert, permeabilisiert und mit biotinyliertem Aleuria aurantia-Lektin (AAL) inkubiert. AAL erkennt und bindet spezifisch α 1,6-verknüpfte Fukosereste an N-Glykanen (Kratz et al, 2010), die auch in GlcNAc-1-Phosphotransferase-defizienten Zellen akkumulieren (Kollmann et al, 2012; die fukosylierten Schweizer et al. 2013). Um *N*-Glykane in der Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen, wurden die Zellen mit einem Fluorophor-gekoppelten Streptavidin-Antikörper inkubiert. Um die Lokalisation der fukosylierten Proteine auf subzellulärer Ebene zu untersuchen, wurde analysiert, ob die fukosylierten N-Glykane mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP1 (lysosome associated membrane protein 1) co-lokalisieren.



Abb. 4.22 Nachweis von fukosylierten *N*-Glykanen in S1P- und S2P-defizienten Zellen. CHO-, SRD-12B- und M19-Zellen wurden fixiert, permeablilisiert und mit biotinyliertem *Aleuria Aurantia*-Lektin (AAL) (rot) sowie einem Antikörper gegen LAMP-1 (grün) gefärbt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI (blau). Gelb zeigt die Lokalisation von fukosylierten *N*-Glykanen im Lysosom an. Der Balken entspricht 5 µm.

Sowohl in SRD-12B- auch in M19-Zellen konnten im Vergleich zu CHO-Zellen stärkere Fluoreszenzsignale für fukosylierte *N*-Glykane und LAMP1 detektiert werden (Abb. 4.22). Die akkumulierten, fukosylierten *N*-Glykane co-lokalisierten in allen Zelltypen partiell mit LAMP1. Die Ergebnisse zeigen, dass in SRD-12B- und M19-Zellen fukosylierte *N*-Glykane teilweise in den Lysosomen akkumulieren. Die stärkeren Fluoreszenzsignale für LAMP1 in SRD-12B- und M19-Zellen deuten darauf hin, dass die Anzahl der Lysosomen in diesen Zellen erhöht ist.

Um zu untersuchen, ob auch in den Lysosomen der S2P-defizienten Zellen Speichermaterial akkumuliert, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von Dr. M. Schweizer (ZMNH, Hamburg) angefertigt. Die Aufnahmen zeigen, dass im Vergleich zu CHO-Zellen sowohl in SRD-12B als auch in M19-Zellen zahlreiche lysosomale Vakuolen zu finden sind, die zum Teil mit elektronendichtem Speichermaterial gefüllt sind (Abb. 4.23).



Abb. 4.23 Akkumulation von Speichermaterial in S1P- und S2P-defizienten Zellen. Zellpellets wurden fixiert, eingebettet und anschließend Ultradünnschnitte (60 nm) angefertigt. Die Aufnahmen erfolgten bei 20000-facher Vergrößerung. Die Zellkerne (N) sowie die Mitochondrien (M) sind markiert. Lysosomale Vakuolen mit Speichermaterial sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Der Balken entspricht 0,5 μm.

In einer elektronenmikroskopischen Analyse von CHO-, SRD-12B- sowie M19-Zellen, die mit oder ohne Zusatz von Cholesterol, Na-Mevalonat und Na-Oleat kultiviert wurden, konnten in den supplementierten CHO-Zellen zahlreiche *Lipid Droplets* nachgewiesen werden (Abb. 4.24 A). Ein zellulärer Überschuss von Cholesterol und Fettsäuren, der durch die Supplementierung des Mediums verursacht wird, führt zu der Bildung von *Lipid Droplets* (Fujimoto & Ohsaki, 2006).

In CHO-Zellen, die ohne Zusätze kultiviert wurden, wurden hingegen kaum *Lipid Droplets* nachgewiesen. In SRD-12B-Zellen konnten unter beiden Bedingungen keine *Lipid Droplets* detektiert werden (Abb. 4.24 A). In M19-Zellen, die mit den Zusätzen kultiviert wurden, konnte eine große Anzahl an *Lipid Droplets* beobachtet werden (Abb. 4.24 A).



Abb. 4.24 Analyse von *Lipid Droplets* in S1P- und S2P-defizienten Zellen. (A) CHO-, SRD-12B- und M19-Zellen wurden mit (+) oder ohne Zusatz (-) von Cholesterol, Na-Oletat und Na-Mevalonat als Monolayer auf Aclar[®]-Folie kultiviert, anschließend fixiert, eingebettet und es wurden Ultradünnschnitte (60 nm) angefertigt. Die Aufnahmen erfolgten bei 7000-facher Vergrößerung. Die Zellkerne (N) sind markiert. *Lipid Droplets* sind exemplarisch mit Pfeilen gekennzeichnet. Der Balken entspricht 2 μ m. (B) CHO-, SRD-12B und M19-Zellen wurden unter Zusatz von Cholesterol, Na-Oletat und Na-Mevalonat auf Deckgläschen kultiviert, fixiert, permeablilisiert und mit einem Antikörper gegen Perilipin 2 (rot) gefärbt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI (blau). Der Balken entspricht 10 μ m. Die Quantifizierung der Intensität pro Zelle erfolgte mit der Imaris-Software. Die Fluoreszenzintensitätswerte für die CHO-Zellen wurden = 1 gesetzt (Mittelwert ± Standardabweichung, n = 3).

Um die Menge bzw. Dichte der *Lipid Droplets* quantitativ zu erfassen, wurden Zellen zunächst in Medium kultiviert, das Cholesterol, Na-Mevalonat sowie Na-Oleat enthielt. Die fixierten Zellen wurden anschließend permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen Perilipin 2, einem Hüllprotein der *Lipid Droplets*, inkubiert und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Hierfür wurden aufeinander folgende Bilder in unterschiedlichen Ebenen aufgenommen, die anschließend zu einer dreidimensionalen Aufnahme rekonstruiert wurden. Die Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensität pro Zelle erfolgte mit Hilfe der Imaris-Software. In SRD-12B-Zellen betrug die Fluoreszenzintensität lediglich 50 % der Fluoreszenzintensität in CHO-Zellen (Abb. 4.24 B), während in M19-Zellen etwa die doppelte Fluoreszenzintensität wie in CHO-Zellen nachgewiesen wurde (Abb. 4.24 B). Die fluoreszenzmikroskopische Analyse ergänzte die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Analyse und zeigte, dass im Vergleich zu Kontrollzellen in SRD-12B-Zellen eine geringere Anzahl, in M19-Zellen hingegen eine größere Anzahl an *Lipid Droplets* nachweisbar war.

Die Ergebnisse belegen, dass die S2P-Defizienz zu einer Fehlsortierung von lysosomalen Enzymen und zu einer Akkumulation von Speichermaterial in den Lysosomen führt. Dies deutet darauf hin, dass die Defizienz der Site-2-Protease zu lysosomalen Dysfunktionen führt. Es wurde außerdem festgestellt, dass in den S1P-defizienten Zellen weniger *Lipid Droplets* vorhanden waren als in den CHO- und den S2P-defizienten Zellen. Die größte Anzahl an *Lipid Droplets* wurde in den S2P-defizienten Zellen nachgewiesen.

4.2.2.3 Veränderte Mitochondrienmorphologie in S1P- und S2P-defizienten Zellen

Elektronenmikroskopische Aufnahem von CHO-Kontrollzellen, S1P-defizienten SRD12-B-Zellen und M19-Zellen, die in Anwesenheit oder Abwesenheit von Cholesterol, Mevalonat und Oleat kultiviert wurden zeigten, dass die Morpholgie der Mitochondrien sowohl in SRD-12B- als auch in M19-Zellen im Vergleich zu CHO-Zellen verändert ist. Während die Mitochondrien in den CHO-Zellen eine kompakte und kontrastreiche Struktur aufweisen, sind die Mitochondrien der SRD-12B-Zellen geschwollen und wenig kontrastreich (Abb. 4.25). Auffällig war, dass die fehlende Supplementierung der Cholesterol-auxotrophen SRD-12B und M19-Zellen in sehr stark geschwollenen Mitochondrien resultierte (Abb. 4.25).



Abb. 4.25 Veränderte Mitochondrienmorphologie in S1P- und S2P-defizienten Zellen. CHO-, SRD-12B- und M19-Zellen wurden als *Monolayer* auf Aclar[®]-Folie kultiviert, anschließend fixiert, eingebettet und es wurden Ultradünnschnitte (60 nm) angefertigt. Die Aufnahmen erfolgten bei 20000-facher Vergrößerung. Die Mitochondrien sind exemplarisch mit Pfeilen gekennzeichnet. Der Balken entspricht 1 μ m.

4.2.3 Rezeptor-vermittelte Endozytose in S1P- und S2P-defizienten Zellen

In S1P-defizienten Zellen führt die Fehlsortierung lysosomaler Enzyme zu dysfunktionalen Lysosomen und zu einer veränderten proteolytischen Prozessierung der endozytierten lysosomalen Arylsulfatase B (Marschner *et al*, 2011). Im Folgenden wurde die Rezeptor-vermittelte Endozytose verschiedener Liganden in S2P-defizienten Zellen untersucht.

4.2.3.1 Endozytose von [¹²⁵I]Arylsufatase B

Um die Endozytose sowie die Prozessierung von [¹²⁵I]-ASB in S2P-defizienten Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen für 20 min mit [¹²⁵I]-ASB-haltigen Medium inkubiert. S1P-defiziente Zellen (SRD-12B) sowie CHO-Zellen dienten als Kontrollen. Anschließend wurden die Zellen entweder geerntet oder für 2 bzw. 4 h in nicht-radioaktivem Medium kultiviert (*Chase*). Die Zelllysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert.

Nach dem *Pulse* wurde in den Zellextrakten der CHO-Zellen die 64 kDa [¹²⁵I]-ASB-Proform nachgewiesen (Abb. 4.26, Bahn 1). Durch Zusatz von 10 mM M6P im *Pulse*-Medium konnte die Internalisierung von [¹²⁵I]-ASB vollständig inhibiert werden (Bahn 2). Dies zeigte die Abhängigkeit der [¹²⁵I]-ASB-Aufnahme von M6P-Resten. Während der *Chase*-Periode von 2 oder 4 h nahm das Signal für die Proform deutlich ab, während eine intermediäre Form der ASB von 47 bzw. 42 kDa nachweisbar war (Bahn 3 und 4). In den Zellextrakten von SRD-12B-Zellen wurde nach dem *Pulse* im Vergleich zu den Zellextrakten der CHO-Zellen ein stärkeres Signal für die internalisierte Proform nachgewiesen (Bahn 5). Nach 2 h *Chase* war die Signalstärke der Proform der ASB fast unverändert (Bahn 6), es konnte jedoch zusätzlich das 47 kDa Intermediat nachgewiesen werden (Bahn 6). Auch nach 4 h *Chase* nahm die Signalstärke für die Proform lediglich geringfügig ab (Bahn 7), was für eine gestörte Prozessierung der ASB in den Lysosomen spricht. Die Intensität des Signals des Intermediates änderte sich im Vergleich mit dem Signal nach 2 h *Chase* nicht, das Intermediat wurde jedoch wie in den Zellextrakten der CHO-Zellen nach 4 h *Chase* bei 42 kDa nachgewiesen. (Bahn 7).



Abb. 4.26 Endozytose von [¹²⁵I]-ASB in S1P- und S2P-defizienten Zellen. CHO-, SRD-12B- und M19-Zellen wurden für 20 min in DMEM mit [¹²⁵I]-ASB (625000 cpm/ml) mit (+) oder ohne (-) Zusatz von 10 mM M6P inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und entweder geerntet (Bahn 1, 2, 5 und 8) oder für 2 bzw. 4 h in nicht-radioaktivem Medium kultiviert und geerntet (Bahn 3, 4, 6, 7, 9 und 10). Die Proteinextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert. Es folgte eine densitometrische Auswertung der Daten mit anschließender Normalisierung der Werte auf die Proteinkonzentration. Die molaren Massen von Markerproteinen in kDa und die Positionen der Proform (p) und des Intermediates (i) von Arylsulfatase B sind angegeben.

In den Zellextrakten der M19-Zellen wurde nach dem *Pulse* ein sehr schwaches Signal für die [¹²⁵I]-ASB-Proform detektiert (Bahn 8), das nach 2 und 4 h *Chase* abnahm (Bahn 9 und 10). Die Intermediatform konnte nur sehr schwach nachgewiesen werden. Die Ergebnisse demonstrieren, dass die Prozessierung der [¹²⁵I]-ASB in SRD-12B-Zellen stark beeinträchtigt ist, während in M19-Zellen die Endozytose der [¹²⁵I]-ASB stark verringert ist.



Abb. 4.27 Bindung von [¹²⁵I]-ASB in S2P-defizienten Zellen. (A, B) CHO- und M19-Zellen wurden für 2 h auf Eis bei 4 °C in DMEM mit [¹²⁵I]ASB (625000 cpm/ml) mit (+) oder ohne (-) Zusatz von 10 mM M6P inkubiert. (B) Gegebenenfalls erfolgte vor der Inkubation mit dem Pulse-Medium ein Waschschritt mit 10 mM M6P, um zu bestimmen ob Liganden-besetzte Rezeptoren für die erniedrigte Bindung an M19-Zellen verantwortlich sind. (A/B). Die Zellen wurden gewaschen, geerntet und die Radioaktivitäten in den Zellsuspensionen in einem γ -Szintillationscounter gemessen. Die gemessenen Werte in den Zellsuspensionen der CHO-Zellen wurden = 1 gesetzt (Mittelwert ± Standardabweichung; ***p < 0,005, n = 3).

Um die Ursache der verminderten Endozytose der [¹²⁵I]-ASB in M19-Zellen zu analysieren, wurden [¹²⁵I]-ASB-Bindungsassays bei 4 °C durchgeführt, um die Anzahl von 300 kDa M6P-Rezeptoren (MPR300) an der Zelloberfläche zu bestimmen. Dazu wurden Zellen auf Eis für 2 h mit [¹²⁵I]-ASB in An- oder Abwesenheit von M6P inkubiert. Anschließend wurden die Zellen intensiv gewaschen, um nicht gebundene Liganden zu entfernen, geerntet und die Radioaktivität der Zellsuspension gemessen.

In CHO-Zellen, die in M6P-haltigem [¹²⁵I]-ASB-Medium inkubiert wurden, war die Bindung der [¹²⁵I]-ASB zu 95 % inhibiert (Abb. 4.27 A). Dieser Wert wurde zur Korrektur und Ermittlung der spezifischen Bindung verwendet. Im Vergleich zu CHO-Zellen wurde in M19-Zellen eine 85 % reduzierte Bindung von [¹²⁵I]-ASB festgestellt, die durch Zusatz von M6P zum *Pulse*-Medium nur um 50 % verringert werden konnte, was auf eine unspezifische Bindung schließen lässt.

Mit einem weiteren [¹²⁵I]-ASB-Bindungsassay sollte untersucht werden, ob die reduzierte Bindung von [¹²⁵I]-ASB in den M19-Zellen durch eine verringerte Anzahl oder durch Liganden-besetzte M6P-Rezeptoren an der Zelloberfläche begründet ist. Dazu wurden einige Zellkulturplatten vor der Inkubation mit [¹²⁵I]-ASB mit oder ohne 10 mM M6P gewaschen. Der M6P-Waschschritt führte in den CHO-Zellen zu einer Steigerung der [¹²⁵I]-ASB-Bindung von 22 % (Abb. 4.27 B). In M19-Zellen wurde verglichen mit CHO-Zellen 90 % weniger [¹²⁵I]-ASB gebunden. Nach dem M6P-Waschschritt verdoppelte sich die Menge der gebundenen [¹²⁵I]-ASB. Die Zugabe von M6P im *Pulse*-Medium führte in den CHO-Zellen zu einer fast vollständigen Inhibierung der [¹²⁵I]-ASB-Bindung. In den M19-Zellen konnte durch den Zusatz von M6P zum *Pulse*-Medium lediglich eine Reduktion der [¹²⁵I]-ASB-Bindung um 50 % erreicht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die [¹²⁵I]-ASB-Bindung in den S2P-defizienten Zellen durchschnittlich um ca. 85 % verringert war, was auf eine geringere Anzahl an MPR300 an der Zelloberfläche zurückzuführen ist.

4.2.3.2 Endozytose von Alexa Fluor[®] 546-markiertem Transferrin

Es wurde gezeigt, dass die MPR300-vermittelte Endozytose von [¹²⁵I]-ASB in den S2Pdefizienten M19-Zellen reduziert war. Um zu untersuchen, ob diese Effekte spezifisch für den MPR300 sind oder auch für andere endozytotische Oberflächenrezeptoren beobachtet werden können, wurde die Endozytose von Alexa Fluor[®] 546-Transferrin über den Transferrin-Rezeptor bestimmt. Hierfür wurden die Zellen für 20 min bei 37 °C mit Alexa Fluor[®] 546-Transferrin in Kulturmedium inkubiert, die Zellen anschließend fixiert und durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die intrazelluläre Intensität der Fluoreszenz pro Fläche wurde mit der Imaris-Software quantifiziert. In S2P-defizienten M19-Zellen war die internalisierte Menge des Alexa Fluor[®] 546-Transferrins um 50 % gegenüber CHO-Zellen verringert (Abb. 4.28 A).

Um zu analysieren, ob die verringerte Endozytose des Alexa Fluor[®] 546-Transferrins in den M19-Zellen durch eine veränderte subzelluläre Verteilung des Transferrin-Rezeptors oder durch eine reduzierte Menge des Transferrin-Rezeptors begründet ist, wurden Extrakte der Zellen durch Westernblot mit einem Antikörper gegen den Transferrin-Rezeptor analysiert.



Abb. 4.28 Endozytose von Alexa Fluor[®] 546-markiertem Transferrin in S2P-defizienten Zellen. (A) CHO- und M19-Zellen wurden für 20 min in Medium mit 20 µg/ml Alexa Fluor[®] 546-Transferrin inkubiert, anschließend fixiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dargestellt sind das Alexa Fluor[®] 546-Transferrin (rot) sowie die Zellkerne, die mittels DAPI angefärbt wurden (blau). Der Balken entspricht 25 µm. Die Quantifizierung der intrazellulären Intensität/Fläche erfolgte mit der Imaris-Software. Die in den CHO-Zellen gemessene Intensität wurde = 1 gesetzt. (B) Zellextrakte von CHO- und M19-Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Westernblot mit einem Antikörper gegen den Transferrin-Rezeptor (TFR) analysiert. Die molaren Massen von Markerproteinen in kDa sind angegeben. Die Daten wurden densitometrisch ausgewertet und die Transferrin-Rezeptor-Expression gegen die GAPDH-Expression normalisiert. Die Werte für die CHO-Zellen wurden = 1 gesetzt (Mittelwert ± Standardabweichung; ***p < 0,005, n = 3)

Die Daten wurden anschließend densitometrisch ausgewertet. Die Expression des Transferrin-Rezeptors in S2P-defizienten M19-Zellen war um 50 % reduziert (Abb. 4.28 B). Die Daten zeigen, dass neben der Zahl des MPR300 auch die Konzentration des Transferrin-Rezeptors an der Oberfläche der S2P-defizienten M19-Zellen stark verringert ist.

5. DISKUSSION

Die GlcNAc-1-Phosphotransferase katalysiert den ersten Schritt der Generierung von M6P-Resten an löslichen lysosomalen Enzymen und begünstigt ihren effizienten Transport zu den Lysosomen. Die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins des heterohexameren GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplexes zu reifen α - und β -Untereinheiten ist Voraussetzung für die Aktivierung des Komplexes und wird durch die Site-1-Protease katalysiert (Marschner et al, 2011). Daher ist neben der GlcNAc-1-Phosphotransferase auch die Site-1-Protease ein Schlüsselenzym der lysosomalen Biogenese. So führen sowohl Mutationen im GNPTAB-Gen, das das α/β -Vorstufenprotein des GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplexes kodiert, als auch die Defizienz der Site-1-Protease zu der schweren lysosomalen Speichererkrankung Mukolipidose Typ II (MLII) bzw. zu einem MLII-ähnlichen Phänotyp, die jeweils durch Fehlsortierung lysosomaler Enzyme und die dadurch verursachte Akkumulation von nicht abgebautem Speichermaterial in den Lysosomen bedingt sind (Kollmann et al, 2010; Marschner et al, 2011). Ziel dieser Arbeit war es, Faktoren zu untersuchen, die wichtig für die proteolytische Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase sind. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Rolle der Site-2-Protease für die proteolytische Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase und die Funktionalität der Lysosomen untersucht.

5.1 Proteolytische Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase durch die Site-1-Protease

Um die Rolle der Site-1-Protease-vermittelten proteolytischen Aktivierung des α/β -Vorstufenproteins der GlcNAc-1-Phosphotransfrerase genauer zu untersuchen, wurden Site-1-Protease-defiziente SRD-12B-Zellen verwendet. Diese wurden 1998 von Goldstein und Brown durch UV-induzierte Mutagenese von CHO-7-Zellen und anschließender Selektionierung von Cholesterol-auxotrophen Zellen generiert (Rawson *et al*, 1998). CHO-7-Zellen sind Klone von CHO-K1-Zellen, die fähig sind, in Medium mit Lipoprotein-defizientem Serum zu wachsen (Metherall *et al*, 1989). Die Selektionierung der Cholesterol-auxotrophen Zellen erfolgte durch das Polyen-Antibiotikum Amphotericin B, das sich an Cholesterol in der Plasmamembran anlagert und Poren bildet, wodurch die Zellen schließlich abgetötet werden (Chang & Chang, 1982). Da Zellen, die auxotroph für Cholesterol sind und nach kurzer Inkubation in Cholesterol-freiem Medium kein Cholesterol in der Plasmamembran mehr enthalten, werden durch Amphotericin B nur Zellen abgetötet, die nicht auxotroph für Cholesterol sind. Vier Jahre vor der Generierung der Site-1-Protease-defizienten SRD-12B-Zellen gelang durch Mutagenese von CHO-K1-Zellen mit UV-Licht und anschließender Selektionierung von Cholesterol-auxotrophen Zellen die Generierung einer Zelllinie (M19), die defizient für die Site-2-Protease ist (Hasan et al, 1994). Da das MBTPS2-Gen, das für die Site-2-Protease kodiert, auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, liegt es haploid vor (Rawson et al, 1997). Das Gen für die Site-1-Protease liegt jedoch als doppelte Kopie vor. Um die Wahrscheinlichkeit einer Mutation im MBTPS1-Gen, das für die Site-1-Protease kodiert, zu erhöhen, wurden CHO-Zellen stabil mit der cDNA der Site-2-Protease transfiziert. Dies ermöglichte die Generierung der Site-1-Protease-defizienten SRD-12B-Zellen (Rawson et al, 1998). Da es sich bei den SRD-12B- und M19-Zellen nicht um reine Zelllinien handelt, muss eine wöchentliche Selektionierung mit Amphotericin B erfolgen, um nicht-defiziente Zellen abzutöten und den Phänotyp zu erhalten. Mit Hilfe der SRD-12B- sowie der M19-Zellen waren die Isolierung von Substraten und die Untersuchung der Funktion der Site-1- und Site-2-Protease möglich (Lenz et al, 2001; Marschner et al, 2011; Rawson et al, 1997; Sakai et al, 1998; Ye et al, 2000b).

Bisher konnte die Bedeutung der Site-1-Protease-vermittelten proteolytischen Spaltung des α/β -Vorstufenproteins für die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase und die Homeostase der Lysosomen nur indirekt gezeigt werden (Marschner *et al*, 2011). Mittels eines Aktivitätsassays mit UDP-[³H]-GlcNAc als Phosphatdonor war nun ein direkter Effekt der Spaltung des α/β -Vorstufenproteins auf die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase nachweisbar. So konnte in Site-1-Protease-defizienten SRD-12B-Zellen eine Reduktion der GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität um 80 % im Vergleich zu CHO-Kontrollzellen festgestellt werden (Abb. 4.5). Die Restaktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase ist auf die inhomogene Zusammensetzung der SRD-12B-Zellen zurückzuführen, die mit der Effizienz der Selektionierung variiert.

Quantitative Realtime-PCR-Analysen bestätigten, dass die *MBTPS1*-mRNA in den SRD-12B-Zellen durchschnittlich um 92 % herunterreguliert war (Abb. 4.18). Die proteolytische Spaltung des α/β -Vorstufenproteins und die GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität konnten durch Überexpression der Site-1-Protease in SRD-12B-Zellen wiederhergestellt werden (Abb. 4.5) (Marschner *et al*, 2011).

Nach [³⁵S]-Methionin-*Pulse-Chase*-Experimenten der SRD-12B-Zellen, die das verkürzte α^*/β -Vorstufenprotein überexprimierten, konnte ein 125 kDa Polypeptid präzipitiert werden, das in Zellextrakten von CHO- und M19-Zellen nicht nachweisbar war. Offensichtlich führt der Verlust der proteolytischen Spaltung des α/β -Vorstufenproteins in SRD-12B-Zellen zum Transport des α/β-Vorstufenproteins vom cis- weiter in mehr distale Cisternen des Golgi-Apparates. Dort könnten mannosereiche N-Glykane prozessiert und mit komplexen Zuckern modifiziert werden, die zu dem beobachteten Mobilitätsshift des α/β-Vorstufenproteins in den Zellextrakten der SRD-12B-Zellen führen. Eine Behandlung der SRD-12B-Zelllysate mit Endoglykosidase H könnte aufklären, ob es sich bei dem 125 kDa α^*/β -Vorstufenprotein tatsächlich um ein partiell mit komplexen Oligosacchariden modifiziertes Polypeptid handelt. Für die nichtspaltbare R925A-Mutante des α/β -Vorstufenproteins konnte bereits gezeigt werden, dass diese neben mannosereichen- auch komplexe Oligosaccharide enthält (Disseration K. Marschner, 2011). Das bedeutet, dass die proteolytische Spaltung des α/β -Vorstufenproteins nicht nur für die proteolytische Aktivierung, sondern auch für die Retention des GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplexes im cis-Golgi-Apparat verantwortlich ist.

Das katalytische Zentrum des GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplexes, dessen genaue Position noch unklar ist, ist mit den α - und β -Untereinheiten des Komplexes assoziiert (Kudo & Canfield, 2006). Eine in einem MLII-Patienten identifizierte Deletion von 36 Aminosäuren in der β -Untereinheit (Y937-M972del) (Cury *et al*, 2013) wenige Aminosäuren distal der Site-1-Protease-Spaltstelle (K928/D929) führte zu einer neuen Spaltstelle in der α -Untereinheit (Abb. 4.6 A). Die Expression der Y937-M972del-Mutante in Site-1-Protease-defizienten SRD-12B-Zellen belegte, dass die Spaltung an der neu generierten Spaltstelle ebenfalls durch die Site-1-Protease erfolgt (Abb. 4.6 B). Da die Y937-M972_del-Mutante jedoch enzymatisch inaktiv ist (Abb. 4.7), wurde deutlich, dass die genaue Spaltung zwischen K928 und D929 durch die Site-1-Protease essentiell für die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase ist. Dies lässt vermuten, dass entweder die neu generierte Spaltstelle direkt das aktive Zentrum zerstört, oder dass die α - und β -Untereinheiten sich nach der korrekten Spaltung zwischen den Aminosären K928 und D929 (Abb. 4.1) (Kudo *et al*, 2005) in einer bestimmten Konformation aneinanderlagern, um ein komplexes ($\alpha_2\beta_2$) aktives Zentrum zu bilden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit der Daten der Mutationsanalyse ist, dass ein Teil des aktiven Zentrums direkt in dem deletierten Bereich der β -Untereinheit liegt.

5.1.1 Interaktion zwischen der GlcNAc-1-Phosphotransferase und der Site-1-Protease

Die α -, β - und γ -Untereinheiten der GlcNAc-1-Phosphotransferase bilden einen Proteinkomplex hoher molekularer Masse (440-660 kDa) (Bao et al, 1996a), dessen Assemblierung bereits im ER stattfindet (Encarnacao *et al*, 2011). Für das α/β -Vorstufenprotein der GlcNAc-1-Phosphotransferase ist bekannt, dass komplexe Sortierungsmotive in den N- und C-terminalen cytoplasmatischen Domänen den Transport vom ER zum Golgi-Apparat über COPII-Vesikel vermitteln (Franke et al, 2013). Durch Immunfluoreszenzmikroskopie- und Größenausschluss-Chromatographie-Analysen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das α^*/β -Vorstufenprotein und die Site-1-Protease im cis-Golgi-Apparat co-lokalisieren (Abb. 4.4) bzw. in der gleichen Fraktion von 440-660 kDa Proteinkomplexen nachweisbar sind (Abb. 4.8). Mit Hilfe von Pulldown-Experimenten konnte jedoch keine direkte Interaktion der Site-1-Protease mit dem α/β -Vorstufenprotein nachgewiesen werden (Abb. 4.9 B). Auch für eine loss of function-Mutante der Site-1-Protease, bei der der Serinrest S414 der katalytischen Triade gegen einen Glutaminrest ausgetauscht wurde, war keine Interaktion mit dem α/β -Vorstufenprotein detektierbar. Umgekehrt konnte keine direkte Interaktion zwischen der nicht-spaltbaren R925A-Mutante des α/β -Vorstufenproteins und der Site-1-Protease beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Diese Befunde lassen vermuten, dass es sich bei der Interaktion zwischen dem α/β -Vorstufenprotein und der Site-1-Protease um einen sogenannten "kiss and runő-Mechanismus handelt, bei dem die Site-1-Protease kurzzeitig mit dem α/β -Vorstufenprotein interagiert, um dieses zu spalten, gefolgt von der Dissoziation der Site-1-Protease von den reifen α - und β -Untereinheiten. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß die Pufferbedingungen bei den Pulldown-Experimenten nicht optimal waren, um diese Art der Interaktion zwischen der Site-1-Protease und dem α/β -Vorstufenprotein nachzuweisen. Weitere Möglichkeiten, um diese Art der Interaktion zwischen Protease Substrat nachzuweisen, stellt die biomolekulare in-vivo Fluoreszenzund Komplementation z. B. durch das Split-YFP-System dar (Hu et al, 2002; Hu & Kerppola, 2003). Um die Fluoreszenz im Moment der kurzzeitigen Interaktion zu detektieren, könnten die Zellen mittels life cell imaging oder bei erniedrigter Temperatur zur Reduktion der Proteolyse-Kinetik untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit die Interaktion der Site-1-Protease mit dem α/β -Vorstufenprotein nachzuweisen, besteht in der Verwendung von bifunktionalen, chemischen Crosslinkern, die kovalente bzw. spaltbare Kopplungen von interagierenden Proteinen vermitteln. Zellen, die das α/β -Vorstufenprotein bzw. die nicht spaltbare Mutante (R925A) und die Site-1-Protease bzw. die loss of function-Mutante der Site-1-Protease (S414G) überexprimieren, könnten so mit einem geeigneten Crosslinker behandelt und mittels Co-Immunpäzipitation mit dem monoklonalen Antikörper gegen die α -Untereinheit (Abb. 4.3) untersucht werden.

5.1.2 Rolle von posttranslationalen Modifikationenen des α/β -

Vorstufenproteins für die proteolytische Aktivierung

N-Glykosylierungen zählen zu den wichtigsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen und spielen eine wichtige Rolle für die Stabilität, die Löslichkeit sowie den intrazellulären Transport von Proteinen (Helenius & Aebi, 2001; Roth *et al*, 2010). *N*-Glykosylierungen spielen außerdem eine wichtige Rolle für die korrekte Faltung von Proteinen, den ER-Export sowie für die Oligomerisierung von Proteinkomplexen (Mitra *et al*, 2006; Varki, 1993). Der hexamere GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplex enthält 44 potentielle *N*-Glykosylierungsstellen (17 in der α -Untereinheit, 3 in der β -Untereinheit und 2 in der γ -Untereinheit). Der Glykosylierungsgrad ist für ein Golgi-residentes Protein ungewöhnlich hoch. Für das α/β -Vorstufenprotein und die γ -Untereinheit wurde durch Inhibierung der N-Glykosylierung mittels Tunicamycin bzw. durch N-Glykosylierungsmutanten gezeigt, dass die N-Glykane essentiell für die Stabilität und den Transport der Proteine vom ER zum Golgi-Apparat sind (Abb. 4.10 A) (Encarnacao et al, 2011). Tunicamycin ist ein Inhibitor der Dolichol-P-GlcNAc-Phosphotransferase, die den ersten Schritt in der Synthese von N-Glykanen katalysiert (Heifetz et al, 1979). Die Präsenz von komplett unglykosylierten α/β -Vorstufenproteinen nach Tunicamycin-Behandlung verhindert vermutlich eine korrekte Faltung und führt somit zur Retention im Calnexin/Calretikulin-Zyklus (Trombetta & Helenius, 1998) mit anschließendem Abbau des α/β -Vorstufenproteins im Proteasom. Um die Funktion der N-Glykosylierungen des α/β -Vorstufenproteins genauer zu untersuchen und die Effekte der Tunicamycin-Behandlung zu umgehen, könnten Mutanten hergestellt werden, bei denen der jeweilige Asparaginrest gegen einen Glutaminrest ausgetauscht wird. Mit Hilfe dieser Mutanten kann dann untersucht werden, welche der potentiellen N-Glykosylierungsstellen in-vivo genutzt werden und ob einzelne N-Glykosylierungsstellen den Transport, die Degradation oder die proteolytische Aktivierung des α/β -Vorstufenproteins beeinflussen. Für eine in einem Mukolipidose-diagnostizierten Patienten identifizierte Mutation (T644M), die die potentielle N-Glykosylierungsstelle 642 NST 644 in der α -Untereinheit betrifft, konnte gezeigt werden, dass sie zu einer Reduktion der GlcNAc-1-Phosphotransferaseaktivität um 40 % führt. Der ER-Golgi-Transport und die proteolytische Aktivierung durch die Site-1-Protease waren jedoch nicht gestört. Die N-Glykosylierung ⁶⁴²NST⁶⁴⁴ im luminalen Bereich der α-Untereinheit ist möglicherweise an der Bindung der γ-Untereinheit beteiligt (Dissertation R. De Pace, 2014).

Für andere Substrate der Site-1-Protease konnte gezeigt werden, dass *N*-Glykosylierungen eine wichtige Rolle für deren proteolytische Aktivierung spielen. So besitzt das Lassa-Virus-Glykoprotein 11 potentielle *N*-Glykosylierungsstellen, von denen sechs eine Rolle für die Prozessierung durch die Site-1-Protease spielen (Abb. 5.1) (Eichler *et al*, 2006). Auch für den Transkriptionsfaktor CREBH konnte nachgewiesen werden, dass alle drei *N*-Glykosylierungsstellen, die im C-Terminus des Proteins lokalisiert sind, essentiell für die Site-1-Protease-vermittelte Prozessierung sind (Abb. 5.1) (Chan *et al*, 2010).



Abb. 5.1 *N*-Glykosylierungs- und Serin-Phosphorylierungsstellen verschiedener Substrate der S1P Dargestellt sind die S1P-Substrate und Typ-II-Membranproteine CREBH sowie das Lassa-Virus-Glykoprotein mit den jeweiligen *N*-Glykosylierungsstellen. Die *N*-Glykosylierungsstellen, die essentiell für die Spaltung der Proteine durch die Site-1-Protease sind, sind rot dargestellt. Außerdem ist das Typ-III-Membranprotein SREBP-1 mit der cytosolischen Phosphorylierungsstelle gezeigt sowie das Typ-III- α/β -Vorstufenprotein der GlcNAc-1-Phosphotransferase mit den potentiellen *N*-Glykosylierungs- und Phosphorylierungsstellen.

Dagegen wurde für ATF6 gezeigt, dass eine unterglykosylierte Form bei der zwei der drei *N*-Glykosylierungsstellen durch Mutagenese entfernt wurden, den Transport vom ER zum Golgi-Apparat sowie die damit verbundene Aktivierung durch die Site-1- und Site-2-Protease steigerte, was zu einer konstitutiven Lokalisation im Nucleus führte (Hong *et al*, 2004).

Eine weitere Art der posttranslationalen Modifikation von Proteinen stellt die Phosphorylierung dar. Hierbei dient der durch bestimmte Kinasen vermittelte Transfer eines Phosphatrestes, der vom ATP stammt, an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten von Proteinen der Regulierung ihrer Aktivität z. B. während einer Signaltransduktionskaskade (Johnson, 2009). SREBP-1c und SREBP-2 können von der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK), die einen Sensor der intrazellulären ATP-Konzentration darstellt (Carling, 2004), am N-Terminus phosphoryliert werden. Dies führt zu einer verminderten proteolytischen Spaltung der SREBPs und einer reduzierten Transkription von *SREBP*-Zielgenen (Li *et al*, 2011). Das α/β -Vorstufenprotein besitzt zwei potentielle Phosphorylierungsstellen an den Serinresten S15 und S1250 (NCBI-Datenbank), die in der N- bzw. C-terminalen Domäne lokalisiert sind (Abb. 5.1). Um zu untersuchen, ob das α/β -Vorstufenprotein an diesen Aminosäuren phosphoryliert wird, könnten Zellen, die den Wildtyp- oder die S15/S1250-Mutante des α/β -Vorstufenproteins überexprimieren mit [³²P] markiert und die α/β -Vorstufenproteine anschließend immunpräzipitiert und durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Zusätzlich kann die Aktivität der AMPK mit dem synthetischen Polyphenol S12834 gesteigert werden (Li *et al*, 2011). Alternativ könnte versucht werden, die Phosphorylierungsstellen von immunpräzipitierten α/β -Vorstufenproteinen massenspektroskopisch zu ermitteln.

5.1.3 Rolle von Calcium für die proteolytische Aktivierung des α/β-Vorstufenproteins

Calcium-Ionen spielen eine zentrale Rolle für die Signaltransduktion und sind z. B. essentiell für Exocytose, Apoptose und Transkription (Clapham, 2007). Die Konzentration von Calcium-Ionen muss daher innerhalb der Zelle fein reguliert werden. Das ER stellt einen wichtigen zellulären Calcium-Speicher dar, dessen hohe Calcium-Konzentration stetig durch die Aktivität von SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum Ca*²⁺-*ATPase*)-Pumpen aufrechterhalten wird (Berridge, 2002). Ein weiterer zellulärer Calcium-Speicher ist der Golgi-Apparat. Die Membranen des Golgi-Apparates enthalten SERCA-Pumpen und *secretory pathway Ca*²⁺⁻*ATPases*, durch die die Konzentration von Calcium-Ionen reguliert wird (Missiaen *et al*, 2007).

Das α/β -Vorstufenprotein der GlcNAc-1-Phosphotransferase besitzt in der β -Untereinheit (Aminosäuren V1005-L1040) ein klassisches EF-Hand-Motiv (NCBI-Datenbank) (Abb. 5.2). Es besteht aus einer α -Helix (E), einem Loop um das Calcium-Ion und einer weiteren α -Helix (F) (Nakayama & Kretsinger, 1994). In der Abbildung 5.2 ist das EF-Hand-Motiv in der β -Untereinheit im Vergleich mit der EF-Hand-Domäne des Calcium-bindenden Proteins *Eps15 homology-domain-containing protein 2* (EHD2) dargestellt. Zusätzlich sind in der α -Untereinheit fünf potentielle Calcium-Bindestellen in den *Notchrepeat-like*-Domänen (Aspartatreste D449, D464, D467, D515, D534) vorhanden (Abb. 5.2). Sowohl die Funktion der Calcium-Bindestellen in der α -Untereinheit als auch der EF-Hand-Domäne in der β -Untereinheit sind bisher unklar.



Abb. 5.2 EF-Hand-Domäne der β -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase. Dargestellt ist das α/β -Vorstufenprotein der GlcNAc-1-Phosphotransferase sowie die Sequenzen der EF-Hand-Domäne der β -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase im Vergleich zu der EF-Hand-Domäne des *Eps15* homology-domain-containing protein 2 (EHD2). Die Aminosäuren, die für die Calcium-Bindung essentiell sind, sind in Pink dargestellt (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Oliver Daumke, MDC Berlin). Zusätzlich sind die Notch-*repeat-like*-Domänen und die Calcium-Bindestellen in der α -Untereinheit dargestellt (NCBI-Datenbank, Referenz NM_024312.4).

Um die Rolle von Calcium für die proteolytische Aktivierung des α/β -Vorstufenproteins zu untersuchen, wurde das Calcium-Ionophor A23187 (Pressman, 1976) sowie Thapsigargin, ein Sesquiterpen-Lacton aus der Pflanze *Thapsia garganica* (Thastrup *et al*, 1990) verwendet, um den Calcium-Gehalt im ER bzw. Golgi-Apparat zu reduzieren. Eine Depletion von Calcium führte zu einer fast vollständigen Inhibierung der Spaltung des *full-length*- sowie des verkürzten α^*/β -Vorstufenproteins durch die Site-1-Protease (Abb. 4.11). Das α/β -Vorstufenprotein war jedoch auch nach der Calcium-Depletion im Golgi-Apparat lokalisiert (Abb. 4.12). Dieses Ergebnis bestätigte, dass der Calcium-Gehalt im Golgi-Apparat eine essentielle Rolle für die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins durch die Site-1-Protease spielt. Dies könnte zum einen durch eine Inhibierung der Site-1-Protease durch den geringen Calcium-Gehalt erklärt werden.

Zum anderen könnte der geringe Calcium-Gehalt die Bildung einer spaltungsfähigen Konformation des α/β -Vorstufenproteins verhindern. Es wurde beschrieben, dass die Calcium- und pH-Abhängigkeit der PCSKs durch die konservierte P-Domäne reguliert wird (Lipkind et al, 1998; Zhou et al, 1998). Die Sequenz der Site-1-Protease hingegen weist keine Homologien zur P-Domäne auf (Seidah et al, 1999). Dennoch gibt es widersprüchliche Beschreibungen über eine Calcium-Abhängigkeit der Site-1-Protease. Es wurde z. B. gezeigt, dass durch EDTA die Spaltung des pro-brain-derived neurotrophic factors (proBDNF), der ein in-vitro-Substrat der Site-1-Protease darstellt, inhibiert werden kann (Seidah et al, 1999). Auch für die Vorstufe des Lassa-Virus-Glykoproteins, das von der Site-1-Protease proteolytisch prozessiert wird, konnte eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Spaltung durch Calcium-Depletion nachgewiesen werden (Lenz et al, 2001). Durch in-vitro-Assays mit fluorogenen Substraten der Site-1-Protease wurde nachgewiesen, dass die Hydrolyse der Substrate durch rekombinante humane Site-1-Protease mit steigender Calcium-Konzentration ansteigt, die durch Anwesenheit der Chelatoren EDTA und EGTA (10-30 mM) komplett inhibiert wurde (Cheng et al, 1999; Toure et al, 2000). Nachfolgende Untersuchungen zur Kinetik der Site-1-Protease-vermittelten Spaltung unterschiedlicher Substrate und der Charakterisierung von Inhibitoren lassen dagegen vermuten, dass die Site-1-Protease keine Calcium-abhängige Protease ist (Bodvard et al, 2007). Die Aktivität der Site-1-Protease kann jedoch, abhängig von dem jeweiligen Substrat, durch verschiedene monosowie divalente Kationen moduliert werden (Bodvard et al, 2007).

Unter Verwendung des verkürzten α^*/β -Vorstufenproteins, bei dem die Notch-*repeatlike*-Domänen deletiert sind, konnte nach Thapsigargin-Behandlung keine Spaltung des α^*/β -Vorstufenproteins nachgewiesen werden, was zeigt, dass die Calcium-Bindungsstellen in der α -Untereinheit nicht für den inhibitorischen Effekt der Thapsigargin-Behandlung auf die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins verantwortlich sind (Abb. 4.11). Eine in der eigenen Arbeitsgruppe generierte Mutante des α/β -Vorstufenproteins, bei der die EF-Hand-Domäne deletiert wurde (V1005-L1040del), soll in nachfolgenden Arbeiten genutzt werden, um die Rolle der EF-Hand-Domäne für die Spaltung des α/β -Vorstufenproteins zu untersuchen.

Es könnten zusätzlich weitere Mutanten generiert werden, bei denen lediglich die Aspartatreste oder der Glutaminsäurerest in der EF-Hand-Domäne, die für eine mögliche Bindung von Calcium verantwortlich sind (Abb. 5.2), gegen Alanin ausgetauscht werden, um den Effekt der 35 Aminosäuren-Deletion zu vermeiden. Für die veränderten α/β -Vorstufenproteine bzw. reife Formen der α - und β -Untereinheiten bieten sich auch [⁴⁵Ca²⁺]-Overlay-Blots an (Kim *et al*, 2000), die als direkte Calcium-Bindungsnachweise angesehen werden. Zusätzlich könnten Peptide mit der Sequenz der Wildtyp- oder D/E-Mutante der EF-Hand-Domäne synthetisiert werden, die mittels isothermer Titrationskalorimetrie Aufschluss darüber geben sollen, ob und mit welcher Spezifität und Affinität die EF-Hand-Domäne in der β -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase Calcium *in-vitro* bindet (Kabiri & Unsworth, 2014).

5.1.4 Rolle von Cholesterol für den Transport und die proteolytische Aktivierung des α/β-Vorstufenproteins

Die Site-1- und Site-2-Protease sind für die proteolytische Aktivierung der SREBPs verantwortlich und spielen eine wichtige Rolle für die zelluläre Cholesterol- und Fettsäurehomeostase (Brown & Goldstein, 1997). Der Transport der SREBPs vom ER zum Golgi-Apparat wird durch den Cholesterol-Gehalt in den Membranen des ER reguliert. Der Cholesterol-Sensor ist das so genannte *SREBP cleavage-activating protein* (SCAP), das an die SREBPs bindet (Brown & Goldstein, 1999). Zusätzlich bildet das SCAP-Protein in Anwesenheit von Sterolen einen Komplex mit Insig-1 und Insig-2, die ER-Retentionsfaktoren für den SCAP-SREBP-Komplex darstellen (Rawson, 2003). In Abwesenheit von Sterolen dissoziiert der Insig-SCAP-Komplex, was in einer Konformationsänderung im SCAP-Protein und in der Exposition eines Golgi-Lokalisationssignales, der MELADL-Sequenz resultiert.

Die MELADL-Sequenz ermöglicht die Rekrutierung von Sec24 und die Inkorporation des SCAP-SREBP-Komplexes in COPII-Vesikel für den anterograden Transport zum Golgi-Apparat (Motamed *et al*, 2011). Die proteolytische Aktivierung der SREBPs durch die Site-1- und Site-2-Protease bewirkt die Translokation des freigesetzten SREBP-Transkriptionsfaktors in den Nucleus und aktiviert Gene, die die Cholesterol-Biosynthese, die Fettsäuresynthese und die Expression des LDL-Rezeptors steigern (Rawson *et al*, 1998).

Um zu untersuchen, ob Cholesterol auch den ER-Golgi-Transport und die Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase reguliert, wurden MEF-Zellen mit LDL bzw. Atorvastatin behandelt, die den intrazellulären Cholesterol-Gehalt steigern bzw. senken. Atorvastatin ist ein spezifischer Inhibitor der HMG-CoA-Reduktase (Baumann et al, 1992), die das Schlüsselenzym der Cholesterol-Biosynthese darstellt. Ein intrazellulärer Cholesterol-Überschuss sollte dagegen durch die Behandlung mit humanem low densitiy lipoprotein (LDL) hervorgerufen werden. Als in-vivo Kontrolle für die Effizienz und die Reproduktivität wurde die Menge des LDL-Rezeptors (LDLR) unter Atorvastatin- bzw. LDL-Behandlung in Fibroblasten auf Protein- und mRNA-Ebene bestimmt. Wie erwartet, resultiert die Behandlung von MEF mit LDL bzw. Atorvastatin in einer signifikanten Herunter- bzw. Hochregulierung des LDL-Rezeptors sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene (Abb. 4.13) (Goldstein et al, 1983). Unerwartet war, dass die basale Expression des LDL-Rezeptors in den MLII-MEF um den Faktor 3 erhöht war (Abb. 4.13). Offensichtlich bewirkt die Fehlsortierung nicht-phosphorylierter NPC2-Proteine die Akkumulation von nicht esterifiziertem Cholesterol in den Lysosomen (Kollmann et al, 2012) und führt sekundär zu einem intrazellulären Absinken des Cholesterolgehaltes, was letztlich zu einer Aktivierung der SREBPs und somit zur Hochregulierung des LDL-Rezeptors führt. Das NPC2-Protein vermittelt zusammen mit dem NPC1-Membranprotein den Export von unverestertem Cholesterol aus den Lysosomen (Morris et al, 1999; Naureckiene et al, 2000; Pentchev et al, 1997). LDLbzw. Atorvastatin-vermittelte Änderungen des Cholesterolspiegels in MEF zeigten weder Effekte auf den ER-Golgi-Transport noch auf die proteolytische Aktivierung des α/β -Vorstufenproteins (Abb.4.14 und 4.15).

Infolge dessen wurden auch keine Unterschiede in der Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase (Abb. 4.20) und der resultierenden Sortierung der lysosomalen Enzyme β -Hexosaminidase oder Cathepsin Z festgestellt (Abb. 4.16).

Die Daten zeigen zusammenfassend, dass im Gegensatz zu SREBP-1a, 1c sowie SREBP-2, der ER-Golgi-Transport und die proteolytische Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase Cholesterol-unabhängig erfolgen. Die Erhöhung des zellulären Cholesterolspiegels beeinflusst jedoch den Transport von Liganden, hier gezeigt am Beispiel der lysosomalen Arylsulfatase B, entlang des endozytotischen Weges zu Lysosomen. (Abb. 4.17).

Die M6P-abhängige Aufnahme von [¹²⁵I]-ASB wird durch den MPR300 vermittelt (Braulke & Bonifacino, 2009). Über einen Zusammenhang zwischen dem intrazellulären Cholesterol-Gehalt und dem Trafficking des MPR300 liegen verschiedene Publikationben vor. In einer aus CHO-Zellen generierten Zelllinie, die Lysosome-Endosome X2 (LEX2) genannt wurde, kommt es zu einer Blockade von Multivesicular Bodies (MVBs) in Endosomen, die positiv für das lysosomale Glykoprotein B, Cathepsin D und den MPR300 sind (Miwako et al, 2001; Ohashi et al, 2000). Wurden die Zellen in Kulturmedium mit Lipoprotein-defizientem Serum kultiviert, akkumulierte der MPR300 in den MVBs, während Cholesterol im Medium zu einer Steady-State-Lokalisation des MPR300 im TGN führte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cholesterol essentiell für den retrograden Transport des MPR300 von den Endosomen zum TGN ist (Miwako et al, 2001). Eine weitere Studie zeigte hingegen, dass der hohe Cholesterol-Gehalt in NPC1-Fibroblasten die Retention des MPR300 in späten Endosomen bewirkte (Kobayashi et al, 1999). Umeda et al. zeigten dagegen, dass MPR300 sowohl in NPC1als auch in Kontrollfibroblasten hauptsächlich im TGN nachweisbar ist (Umeda et al, 2003). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Unterschiede in der zellulären Cholesterol-Konzentration möglicherweise zu einem veränderten Trafficking und einer veränderten Steady-State-Lokalisation des MPR300 führen.

5.2 Gestörte zelluläre Homeostase in Site-1- und Site-2-Proteasedefizienten Zellen

Mittels elektronen- sowie immunfluoreszenzmikroskopischer Analysen von CHO-, Site-1-Protease-defizienten SRD-12B- sowie Site-2-Protease-defizienten M19-Zellen, die mit Zusatz von Cholesterol, Mevalonat und Oleat kultiviert wurden, konnten in den supplementierten CHO-Zellen zahlreiche Lipid Droplets nachgewiesen werden (Abb. 4.24 A). Es ist bekannt, dass ein zellulärer Überschuss von Cholesterol und Fettsäuren, der durch die Supplementierung des Mediums induziert wird, zur Bildung von Lipid Droplets führt (Fujimoto & Ohsaki, 2006). Lipid Droplets sind Lipid-speichernde Organellen, die von einer einschichtigen Phospholipid-Membran umgeben sind, in die verschiedene Lipid Droplet-assoziierte Proteine integriert sind. Lipid Droplets sind essentiell für den Energiestoffwechsel der Zelle und für die Synthese von Membranen. Sie dienen außerdem als Schutz der Zelle vor cytotoxischen Effekten freier Fettsäuren und somit als Schutz vor Lipotoxizität und einer möglichen Lipoapoptose (Beller et al, 2010). Des Weiteren ist beschrieben worden, dass Lipid Droplets bei der Degradation von Proteinen, der ER-Stress-Antwort, bei der Glykosylierung von Proteinen und bei Infektionen mit Pathogenen, wie dem Hepatitis-C-Virus eine Rolle spielen (Wilfling et al, 2014). In den hier beschriebenen Untersuchungen an Site-2-Protease-defizienten M19-Zellen, die auxotroph für Cholesterol sind, wurde verglichen mit CHO-Zellen die doppelte Menge Lipid Droplets nachgewiesen (Abb. 4.24 A und B). Site-1-Proteasedefiziente SRD-12B-Zellen, die ebenfalls auxotroph für Cholesterol sind, wiesen dagegen im Vergleich zu CHO-Zellen eine geringere Anzahl an Lipid Droplets auf (Abb. 4.24 A und B). Dies spricht dafür, dass die im Medium verfügbaren Fettsäuren und das Cholesterol in SRD-12B-Zellen schneller genutzt werden als in M19-Zellen. Durch Behandlung der CHO-, SRD-12B- sowie M19-Zellen mit Fettsäure-Albumin-Komplexen (Listenberger & Brown, 2007), die als Positivkontrolle dienten, zeigte eine anschließende Anfärbung von Lipid Droplets durch BODIPY® 493/503 und Perilipin 2, dass in allen Zellen eine erhöhte Akkumulation von Lipid Droplets nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Eine gestörte Synthese von Lipid Droplets in den SRD-12B-Zellen ist dadurch ausgeschlossen. Es ist daher eher wahrscheinlich, dass der Abbau der Lipid Droplets in M19-Zellen gestört ist. Normalerweise werden in Lipid Droplets gespeicherte Triacylglycerole (TAG) schrittweise abgebaut.

Daran sind drei unterschiedliche, im Cytosol lokalisierte Lipasen beteiligt. Zunächst entfernt die Adipose triglyceride lipase eine Fettsäure der TAGs. Das entstandene Diacylglycerol (DAG) wird anschließend von der Hormon-sensitiven Lipase zu Monoacylglycerol (MAG) hydrolysiert, das schließlich von der MAG-Lipase zu einer freien Fettsäure und Glycerol umgesetzt wird (Thiam et al, 2013). Außerdem wird der zelluläre Lipidmetabolismus durch Autophagie reguliert (Singh et al, 2009). Wichtige Komponenten des Autophagie-Signalweges, wie z. B. LC3 sind mit Lipid Droplets assoziiert und Lipid-Droplet-enthaltende Autophagosomen, fusionieren mit Lysosomen, wobei die Lipid Droplets durch lysosomale Hydrolasen metabolisiert werden. Dieser Mechanismus wird als Makrolipoautophagie bezeichnet. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass Lipid Droplets direkt mit Mitochondrien in Kontakt stehen und mit diesen interagieren (Jägerstrom et al, 2009). Mitochondriale Dysfunktionen als Antwort auf zellulären oder apoptotischen Stress, der durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies während der β-Oxidation von Fettsäuren bzw. durch apoptotische Signale ausgelöst wird, kann die Bildung von Lipid Droplets induzieren (Boren & Brindle, 2012; Lee et al, 2013). Eigene elektronenmikroskopische Aufnahmen von SRD-12B- sowie M19-Zellen zeigten geschwollene Mitochondrien mit einer ungewöhnlichen Morphologie, wie sie in CHO-Zellen nicht nachweisbar war (Abb. 4.25). Dies sind Anzeichen für degenerative Prozesse und eine gestörte zelluläre Energiehomeostase in Site-1- und Site-2-Protease-defizienten Zellen. Die zelluläre ER-Stress-Antwort und die Cholesterol- und Fettsäurehomeostase sind eng miteinander verbunden. Dies zeigt auch die Tatsache, dass die Site-1- und Site-2-Protease sowohl für die Spaltung der SREBPs als auch verschiedener ER-Stress-Transducer, wie z. B. ATF6, verantwortlich sind (Brown & Goldstein, 1997; Shen & Prywes, 2004; Stirling & O'Hare, 2006). Die veränderte Mitochondrienmorpholgie in SRD-12B- und M19-Zellen könnte sowohl Ausdruck einer sekundär gestörten Cholesterol-Homeostase als auch der Energiehomeostase sein. Auch die gestörte ER-Stress-Antwort in SRD-12B- und M19-Zellen (Ye et al, 2000b) könnte zu der veränderten mitochondrialen Struktur in diesen Zellen führen, was durch die Beobachtung unterstützt wird, dass ER-Stress über eine Störung der mitochondrialen Calcium-Homeostase zu einer mitochondrialen Dysfunktion führen kann (Leem & Koh, 2012).
5.3 Rolle der Site-2-Protease f ür die proteolytische Prozessierung des α/β-Vorstufenproteins

Bei allen bisher bekannten Site-2-Protease-Substraten, wie den SREBPs 1a, 1c und 2, ATF6, CREBH, LUMAN und OASIS handelt es sich um Typ-II-Membranproteine, bei denen der N-Terminus im Cytosol und der C-Terminus im Lumen des Golgi-Apparates lokalisiert sind (Rawson, 2013). Auch die α -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase ist ein Typ-II-Membranprotein. Westernblot- und [³⁵S]-Methionin-*Pulse-Chase*-Experimente gaben jedoch keinen Hinweis darauf, dass die α -Untereinheit weiter durch die Site-2-Protease proteolytisch prozessiert wird (Abb. 4.19 A und B).

Für die bisher beschriebenen Substrate der Site-2-Protease konnte keine gemeinsame Konsensussequenz für die Spaltstelle identifiziert werden. Es wird jedoch diskutiert, dass eine Helix-destabilisierende Asparagin-Prolinsequenz in der Transmembrandomäne von SREBP-2 sowie ATF6 eine Rolle für die Erkennung und die Spaltung durch die Site-2-Protease spielen könnte (Ye et al, 2000a; Ye et al, 2000b). Auch für andere intramembrane-cleaving proteases (I-CliPs) wie die Signalpeptid-Peptidasen oder Rhomboid-Proteasen sind ähnliche Helix-destabilisierende Motive nachgewiesen worden (Lemberg & Martoglio, 2002; Rawson, 2013; Urban & Freeman, 2003). Die Transmembrandomäne der α-Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase weist jedoch keine Helix-destabilisierende Asparagin-Prolinsequenz auf. Ein weiteres Kriterium für ein Site-2-Protease-Substrat ist die Länge der luminalen Domäne. Bei SREBP-2 und ATF6 liegen zwischen der S1P- und S2P-Spaltstelle nur 39 bzw. 20 Aminosäuren (Duncan et al, 1997; Duncan et al, 1998; Shen & Prywes, 2004). Untersuchungen an einer ATF6-Mutante zeigten, dass die Länge der luminalen Domäne maximal aus 75 Aminosäuren bestehen darf, um als Site-2-Protease-Substrat zu dienen (Shen & Prywes, 2004). Auch für die proteolytische Aktivität anderer I-CLiPs ist die Länge der luminalen Substratdomäne limitiert, wie es am Beispiel der Presenilinvermittelten Spaltung von Notch gezeigt werden konnte, dessen luminale Domäne kleiner als 50 Aminosäuren sein musste (Struhl & Adachi, 2000).

Es ist daher sehr unwahrscheinlich, dass die α -Untereinheit der GlcNAc-1-Phosphotransferase, deren luminale Domäne aus 886 Aminosäuren besteht, ein Substrat der Site-2-Protease darstellt.

Alle der bisher identifizierten Substrate der Site-2-Protease weisen in ihrer N-terminalen Domäne basische *helix-loop-helix*-Leucin-Zipper-Motive oder basische Leucin-Zipper-Motive auf (Haze *et al*, 1999; Hua *et al*, 1993; Stirling & O'Hare, 2006; Yokoyama *et al*, 1993). Nach Freisetzung der N-terminalen Domäne und der anschließenden Translokation in den Nucleus binden diese Motive als Transkriptionsfaktoren an die DNA von Zielgenen und aktivieren diese. Der N-terminale, cytosolische Teil der α -Untereinheit besitzt jedoch kein DNA-bindendes Motiv, das als Transkriptionsfaktor fungieren könnte.

Schließlich zeigten UDP-[³H]-GlcNAc-Aktivitätsassays, dass die GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität in den S2P-defizienten M19-Zellen nicht gegenüber CHO-Zellen verändert war (Abb. 4.20), was indirekt belegt, dass eine potentielle Site-2-Protease vermittelte proteolytische Spaltung der α -Untereinheit für die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase keine Rolle spielt.

5.4 Lysosomale Dysfunktion und gestörte Rezeptor-vermittelte Endozytose in Site-2-Protease-defizienten Zellen

Obwohl gezeigt werden konnte, dass das α/β -Vorstufenprotein der GlcNAc-1-Phosphotransferase nach der Spaltung durch die Site-1-Protease nicht zusätzlich durch die Site-2-Protease gespalten wird (Abb. 4. 19), war eine Fehlsortierung lysosomaler Enzyme (Abb. 4.21) verbunden mit einer Akkumulation von fukosylierten *N*-Glykanen (Abb. 4.22) und anderem Speichermaterial in den Lysosomen nachweisbar (Abb. 4.23). Dies lässt auf Dysfunktionen der Lysosomen in den S2P-defizienten M19-Zellen schließen.

Außerdem ist der Endozytoseweg, auf dem extrazelluläre Liganden das Lysosom erreichen, in S2P-defizienten Zellen gestört (Abb. 4.26, Abb. 4.28). Für die lysosomale Arylsulfatase B ist die veränderte Aufnahme auf die veränderte Zahl an 300 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR300) zurückzuführen (Abb. 4.27 A und B).

Dagegen ist die um 50 % verringerte Internalisierung von (Alexa-Fluor[®])-Transferrin auf eine um 60 % verminderte Menge des Transferrin-Rezeptorproteins zurückzuführen (Abb. 28 A und B). Um zu untersuchen, ob die Expression des MPR300 und des Transferrin-Rezeptors in den S2P-defizienten M19-Zellen auch auf mRNA-Ebene verringert ist, sollen in weiterführenden Experimenten quantitative Realtime-PCR-Analysen durchgeführt werden. Wie die Abwesenheit der Site-2-Protease die Verteilung bzw. Expression von endozytotischen Rezeptoren verändert, ist zurzeit noch unklar. Die fehlende proteolytische Aktivierung eines bisher nicht identifizierten Site-2-Protease-Substrates könnte die Bindung (einzelner) lysosomaler Enzyme an MPR300 blockieren und so die Sortierung der Enzyme im Golgi-Apparat beeinträchtigen, was zur Hypersekretion und intrazellulären Defizienz der lysosomalen Hydrolasen beiträgt. Der beobachtete Anstieg lysosomaler Enzyme im Medium Site-2-Protease-defizienter Zellen könnte aber auch eine direkte Wirkung der verminderten MPR300-vermittelten Endozytose von Liganden sein, die über den sogenannten "Secretion-recapture"-Mechansismus (Hickman & Neufeld, 1972) zu Lysosomen gelangen. Wenn es sich bei den vermehrt sezernierten lysosomalen Enzymen um nicht-phosphorylierte Hydrolasen handelt, könnten in den S2P-defizienten Zellen alternative, M6P-unabhängige Transportwege zu Lysosomen gestört sein. So konnte in der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Subpopulationen nicht-phosphorylierter lysosomaler Enzyme, z. B. Cathepsin B und Cathepsin D, sezerniert und anschließend durch den LDL-Rezeptor und LDL-receptor related protein 1 (LRP1) wieder internalisiert und zu Lysosomen transportiert werden können (Markmann et al, eingereicht). Eine weitere Erklärung für die lysosomale Dysfunktion und die gestörte Endozytose-Fähigkeit in Site-2-Proteasedefizienten Zellen könnte auch in der Existenz von MicroRNAs (miRNAs) liegen, die in Genen von S2P-Substraten kodiert sind, und die Site-2-Protease stimulierten Stoffwechselwege gegenreguliert. Die miRNAs sind RNAs aus ca. 22 Nucleotiden, die durch die RNAse-III-Proteine Drosha und Dicer produziert werden. Eine miRNA kann mRNAs binden und deren Translation inhibieren (Ha & Kim, 2014). So wurden zwei miRNAs, miRNA-33a und -33b, identifiziert, die in Intron-Strukturen der SREBP-1- bzw. SREBP-2-Gene lokalisiert sind.

Während der SREBP-vermittelten Aktivierung der Cholesterol- und Fettsäuresynthese, inhibieren miRNA-33a und -33b die Synthese des Cholesterol-Transporters ABCA1 (*adenosin triphosphate-binding casset A1*), um den zellulären Cholesterol-Gehalt zusätzlich zu steigern (Najafi-Shoushtari *et al*, 2010; Rayner *et al*, 2010). Es bleibt also in fortlaufenden Arbeiten zu klären, ob in S2P-defizienten Zellen Expressionsmuster veränderter miRNAs zu beobachten sind.

Für die Identifizierung neuer Substrate der Site-2-Protease wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Expressionskonstrukte für die PDZ-Domäne der Site-2-Protease generiert (Daten nicht gezeigt). PDZ-Domänen sind ca. 80-100 Aminosäuren umfassende Proteindomänen, die Protein-Proteininteraktionen vermitteln (Lee & Zheng, 2010). Der Name geht auf die ersten drei Proteine (PSD95, Dlg und Zo-1) zurück, in denen eine solche Domäne identifiziert wurde (Cho et al, 1992; Willott et al, 1993; Woods & Bryant, 1991). Eine klassische PDZ-Domäne enthält sechs β -Faltblätter sowie zwei α -Helices und bindet normalerweise C-terminale Sequenzen von Zielproteinen, bestehend aus 5-7 Aminosäuren. Es können jedoch auch interne Sequenzen von Zielproteinen von PDZ-Domänen erkannt und gebunden werden (Ye & Zhang, 2013). Bei den meisten PDZhaltigen Proteinen, sind die PDZ-Domänen im Cytosol lokalisiert, wo sie häufig als Scaffolding-Domänen dienen, die Interaktionen innerhalb von Signalkomplexen vermitteln (Ye & Zhang, 2013). Auch die humane Site-2-Protease sowie viele bakterielle Site-2-Proteasen enthalten PDZ-Domänen. Die Funktionen der PDZ-Domänen in Site-2-Proteasen sind jedoch weitgehend unbekannt. Kürzlich wurde für die PDZ-Domäne der M. tuberculosis Site-2-Protease Rip1 das interagierende Protein Ppr1 (PDZ-interacting protease regulator 1) identifiziert, das wahrscheinlich eine Rolle für die Substratspezifität von Rip1 spielt (Schneider et al, 2013). Die Autoren schlagen ein Modell vor, in dem Ppr1 den Kontakt zwischen Rip1 und einem Rip1-Substrat, dem anti-Sigma-Faktor M (anti-SigM), vermittelt und die Spaltung von anti-SigM solange verhindert, bis es durch die Site-1-Protease proteolytisch prozessiert wurde. Auch für die E. coli Site-2-Protease RseP wurde ein Zusammenhang zwischen der Substratspezifität der Protease und ihrer Tandem-PDZ-Domäne nachgewiesen. Es wird vermutet, dass die beiden PDZ-Domänen eine Taschen-ähnliche Struktur ausbilden, die als Größenausschluss-Filter dient, um die bereits verkürzte Form des Substrates RseA in das katalytische Zentrum von RseP zu integrieren.

Eine Deletion des PDZ-Tandems führte zur Spaltung von RseA durch RseP ohne vorherige Spaltung von RseA durch die Site-1-Protease DegS (Hizukuri *et al*, 2014). Da die PDZ-Domäne der humanen Site-2-Protease, ebenso wie die C-Termini ihrer Substrate im Lumen des Golgi-Apparates lokalisiert sind (Kinch *et al*, 2006; Rawson, 2013), ist es sehr wahrscheinlich, dass die PDZ-Domäne der Site-2-Protease eine Rolle für die Substraterkennung und möglicherweise auch für die Substratspezifität spielt. Ein PDZ-Tag-Fusionsprotein soll als Affinitätsmatrix zur Identifizierung von Interaktionspartnern bzw. Substraten der Site-2-Protease aus Golgi-angereicherten Fraktionen dienen. Alternativ könnten durch CRISPR/Cas9-Editing generierte Site-2-Protease-defiziente humane Zelllinien dazu dienen, auf der Basis von SILAC (*stable isotope-labeling by amino acids in cell culture*) (Ong *et al*, 2002) akkumulierte, proteolytisch veränderte Site-2-Protease-Substrate über Massenspektroskopie zu identifizieren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die GlcNAc-1-Phosphotransferase ist ein Schlüsselenzym für die Biogenese von Lysosomen. Sie katalysiert die Generierung von Mannose-6-Phosphat-Resten an löslichen lysosomalen Enzymen, die Voraussetzung für deren Rezeptor-vermittelten Transport zu den Lysosomen ist. Der Golgi-residente GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplex ist aus drei verschiedenen Untereinheiten ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) aufgebaut, deren α - und β -Untereinheiten als gemeinsames Typ-III-Transmembranprotein synthetisiert und im Lumen des *cis*-Golgi-Apparates durch die Site-1-Protease proteolytisch aktiviert werden. Sowohl der vererbbare Verlust der GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität, der mit der lysosomalen Speicherkrankheit Mucolipidose Typ II (MLII) assoziiert ist, als auch eine Defizienz der Site-1-Protease resultieren in Fehlsortierung lysosomaler Enzyme, verbunden mit lysosomalen Dysfunktionen und einer Akkumulation nicht abbaubarer Makromoleküle in den Lysosomen.

- Unter Verwendung von Site-1-Protease-defizienten Zellen und einem radioaktiven *in-vitro*-Aktivitätsassay konnte in dieser Arbeit erstmalig direkt gezeigt werden, dass die Proteolyse zwischen den Aminosäuren K928 und D929 des α/β-Vorstufenproteins zu den reifen α- und β-Untereinheiten essentiell für die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase ist. Die alternative Spaltung einer MLII-assoziierten, mutierten Form des α/β-Vorstufenproteins war enzymatisch inaktiv.
- Während die am besten charakterisierten Substrate der Site-1-Protease, SREBP1 und SREBP2, in Abhängigkeit vom Cholesterol-Gehalt der Zelle vom ER zum Golgi-Apparat transportiert und proteolytisch aktiviert werden, erfolgen der Transport und die proteolytische Aktivierung des α/β-Vorstufenproteins der GlcNAc-1-Phosphotransferase Cholesterol-unabhängig. Inhibitorstudien, [³⁵S]-Methionin-*Pulse-Chase*-Experimente und Immunfluoreszenzanalysen zeigten jedoch, dass der Transport zum Golgi-Apparat von der *N*-Glykosylierung, und die proteolytische Aktivierung des α/β-Vorstufenproteins vom Calcium-Gehalt abhängen.
- Im Gegensatz zu anderen Substraten der Site-1-Protease erfolgt die Aktivierung der GlcNAc-1-Phosphotransferase unabhängig von der Site-2-Protease.

Dennoch weisen Site-2-Protease-defiziente Zellen eine Fehlsortierung neu synthetisierter lysosomaler Enzyme, lysosomale Dysfunktionen und Akkumulation von nicht-abbaubarem Speichermaterial in den Lysosomen auf. Zusätzlich ist die Rezeptor-abhängige Endozytose verschiedener Liganden in Site-2-Protease-defizienten Zellen stark verringert. Die erzielten Ergebnisse lassen vermuten, dass bisher noch nicht identifizierte Substrate der Site-2-Protease essentiell sowohl für die Biogenese und Funktion von Lysosomen als auch für die Rezeptor-vermittelte Endozytose und den Transport von Liganden zu Lysosomen sind. Die hier vorgestellte detaillierte Beschreibung des morphologischen und biochemischen Phänotyps Site-2-Protease-defizienter Zellen trägt zum besseren Verständnis des fein regulierten Cholesterolhaushaltes und der zentralen Rolle von Lysosomen im Katabolismus von Makromolekülen, Autophagie und Endozytose/Phagozytose bei.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Aten E, Brasz LC, Bornholdt D, Hooijkaas IB, Porteous ME, Sybert VP, Vermeer MH, Vossen RH, van der Wielen MJ, Bakker E, Breuning MH, Grzeschik KH, Oosterwijk JC, den Dunnen JT (2010) Keratosis Follicularis Spinulosa Decalvans is caused by mutations in MBTPS2. *Hum Mutat* 31: 1125-1133

Bao M, Booth JL, Elmendorf BJ, Canfield WM (1996a) Bovine UDP-Nacetylglucosamine:lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. I. Purification and subunit structure. *J Biol Chem* 271: 31437-31445

Bao M, Elmendorf BJ, Booth JL, Drake RR, Canfield WM (1996b) Bovine UDP-Nacetylglucosamine:lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. II. Enzymatic characterization and identification of the catalytic subunit. *J Biol Chem* 271: 31446-31451

Baumann KL, Butler DE, Deering CF, Mennen KE, Millar A, Nanninga TN, Palmer CW, Roth BD (1992) The convergent synthesis of CI-981, an optically active, highly potent, tissue selective inhibitor of HMG-CoA reductase. *Tetrahedron Letters* 33: 2283-2284

Beller M, Thiel K, Thul PJ, Jackle H (2010) Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus. *FEBS Lett* 584: 2176-2182

Ben-Yoseph Y, Baylerian MS, Nadler HL (1984) Radiometric assays of Nacetylglucosaminylphosphotransferase and alpha-N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase with substrates labeled in the glucosamine moiety. *Anal Biochem* 142: 297-304

Berridge MJ (2002) The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 32: 235-249

Beyer WR, Popplau D, Garten W, von Laer D, Lenz O (2003) Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P. *J Virol* 77: 2866-2872

Bodvard K, Mohlin J, Knecht W (2007) Recombinant expression, purification, and kinetic and inhibitor characterisation of human site-1-protease. *Protein Expr Purif* 51: 308-319

Bolos V, Grego-Bessa J, de la Pompa JL (2007) Notch signaling in development and cancer. *Endocr Rev* 28: 339-363

Boren J, Brindle KM (2012) Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation. *Cell Death Differ* 19: 1561-1570

Bornholdt D, Atkinson TP, Bouadjar B, Catteau B, Cox H, De Silva D, Fischer J, Gunasekera CN, Hadj-Rabia S, Happle R, Holder-Espinasse M, Kaminski E, Konig A, Megarbane A, Megarbane H, Neidel U, Oeffner F, Oji V, Theos A, Traupe H, Vahlquist

A, van Bon BW, Virtanen M, Grzeschik KH (2013) Genotype-phenotype correlations emerging from the identification of missense mutations in MBTPS2. *Hum Mutat* 34: 587-594

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).

Brown MS, Goldstein JL (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89: 331-340

Brown MS, Goldstein JL (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11041-11048

Canfield WM, Johnson KF, Ye RD, Gregory W, Kornfeld S (1991) Localization of the signal for rapid internalization of the bovine cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor to amino acids 24-29 of the cytoplasmic tail. *J Biol Chem* 266: 5682-5688

Carling D (2004) The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* 29: 18-24

Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, Gu J, Rosenfeld MA, Pavan WJ, Krizman DB, Nagle J, Polymeropoulos MH, Sturley SL, Ioannou YA, Higgins ME, Comly M, Cooney A, Brown A, Kaneski CR, Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Neufeld EB, Chang T-Y, Liscum L, Strauss JF, Ohno K, Zeigler M, Carmi R, Sokol J, Markie D, O'Neill RR, van Diggelen OP, Elleder M, Patterson MC, Brady RO, Vanier MT, Pentchev PG, Tagle DA (1997) Niemann-Pick C1 Disease Gene: Homology to Mediators of Cholesterol Homeostasis. *Science* 277: 228-231

Chan CP, Mak TY, Chin KT, Ng IO, Jin DY (2010) N-linked glycosylation is required for optimal proteolytic activation of membrane-bound transcription factor CREB-H. *J Cell Sci* 123: 1438-1448

Chang TY, Chang CC (1982) Revertants of a Chinese hamster ovary cell mutant resistant to suppression by an analogue of cholesterol: isolation and partial biochemical characterization. *Biochemistry* 21: 5316-5323

Chapel A, Kieffer-Jaquinod S, Sagné C, Verdon Q, Ivaldi C, Mellal M, Thirion J, Jadot M, Bruley C, Garin J, Gasnier B, Journet A (2013) An Extended Proteome Map of the Lysosomal Membrane Reveals Novel Potential Transporters. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 12: 1572-1588

Chazin WJ (2011) Relating form and function of EF-hand calcium binding proteins. *Acc Chem Res* 44: 171-179

Cheng D, Espenshade PJ, Slaughter CA, Jaen JC, Brown MS, Goldstein JL (1999) Secreted site-1 protease cleaves peptides corresponding to luminal loop of sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* 274: 22805-22812

Cho KO, Hunt CA, Kennedy MB (1992) The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* 9: 929-942

Clapham DE (2007) Calcium signaling. Cell 131: 1047-1058

Cohen BE (2010) Amphotericin B membrane action: role for two types of ion channels in eliciting cell survival and lethal effects. *J Membr Biol* 238: 1-20

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

Cury GK, Matte U, Artigalás O, Alegra T, Velho RV, Sperb F, Burin MG, Ribeiro EM, Lourenço CM, Kim CA, Valadares ER, Galera MF, Acosta AX, Schwartz IVD (2013) Mucolipidosis II and III alpha/beta in Brazil: Analysis of the GNPTAB gene. *Gene* 524: 59-64

de Duve C (1983) Lysosomes revisited. Eur J Biochem 137: 391-397

De Pace R, Coutinho MF, Koch-Nolte F, Haag F, Prata MJ, Alves S, Braulke T, Pohl S (2014) Mucolipidosis II-Related Mutations Inhibit the Exit from the Endoplasmic Reticulum and Proteolytic Cleavage of GlcNAc-1-Phosphotransferase Precursor Protein (GNPTAB). *Human Mutation* 35: 368-376

Diment S, Eidelman M, Rodriguez GM, Orlow SJ (1995) Lysosomal hydrolases are present in melanosomes and are elevated in melanizing cells. *J Biol Chem* 270: 4213-4215

Duncan EA, Brown MS, Goldstein JL, Sakai J (1997) Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the lumenal loop of sterol regulatory elementbinding protein-2. *J Biol Chem* 272: 12778-12785

Duncan EA, Dave UP, Sakai J, Goldstein JL, Brown MS (1998) Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning. *J Biol Chem* 273: 17801-17809

Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F (2004) SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86: 839-848

Eichler R, Lenz O, Garten W, Strecker T (2006) The role of single N-glycans in proteolytic processing and cell surface transport of the Lassa virus glycoprotein GP-C. *Virol J* **3**: 41

Encarnacao M, Kollmann K, Trusch M, Braulke T, Pohl S (2011) Post-translational modifications of the gamma-subunit affect intracellular trafficking and complex assembly of GlcNAc-1-phosphotransferase. *J Biol Chem* 286: 5311-5318

Erickson RP, Kiela M, Garver WS, Krishnan K, Heidenreich RA (2001) Cholesterol signaling at the endoplasmic reticulum occurs in npc1(-/-) but not in npc1(-/-), LDLR(-/-) mice. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 326-330

Espenshade PJ, Cheng D, Goldstein JL, Brown MS (1999) Autocatalytic processing of site-1 protease removes propeptide and permits cleavage of sterol regulatory elementbinding proteins. *J Biol Chem* 274: 22795-22804

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

Fujimoto T, Ohsaki Y (2006) Cytoplasmic lipid droplets: rediscovery of an old structure as a unique platform. *Ann N Y Acad Sci* 1086: 104-115

Ghosh P, Dahms NM, Kornfeld S (2003) Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 202-212

Gibbs WW (2005) Nanobodies. Sci Am 293: 78-83

Goldstein JL, Basu SK, Brown MS (1983) Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol* 98: 241-260

Groot AJ, Habets R, Yahyanejad S, Hodin CM, Reiss K, Saftig P, Theys J, Vooijs M (2014) Regulated proteolysis of NOTCH2 and NOTCH3 receptors by ADAM10 and presenilins. *Mol Cell Biol* 34: 2822-2832

Ha M, Kim VN (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 509-524

Haghighi A, Scott CA, Poon DS, Yaghoobi R, Saleh-Gohari N, Plagnol V, Kelsell DP (2013) A missense mutation in the MBTPS2 gene underlies the X-linked form of Olmsted syndrome. *J Invest Dermatol* 133: 571-573

Hasan MT, Chang CC, Chang TY (1994) Somatic cell genetic and biochemical characterization of cell lines resulting from human genomic DNA transfections of Chinese hamster ovary cell mutants defective in sterol-dependent activation of sterol synthesis and LDL receptor expression. *Somat Cell Mol Genet* 20: 183-194

Hasilik A, Waheed A, von Figura K (1981) Enzymatic phosphorylation of lysosomal enzymes in the presence of UDP-N-acetylglucosamine. Absence of the activity in I-cell fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 98: 761-767

Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 10: 3787-3799

Heifetz A, Keenan RW, Elbein AD (1979) Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc:dolichyl-phosphate Glc-NAc-1-phosphate transferase. *Biochemistry* 18: 2186-2192

Helenius A, Aebi M (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. Science 291: 2364-2369

Hickman S, Neufeld EF (1972) A hypothesis for I-cell disease: defective hydrolases that do not enter lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 49: 992-999

Hizukuri Y, Oda T, Tabata S, Tamura-Kawakami K, Oi R, Sato M, Takagi J, Akiyama Y, Nogi T (2014) A structure-based model of substrate discrimination by a noncanonical PDZ tandem in the intramembrane-cleaving protease RseP. *Structure* 22: 326-336

Hong M, Luo S, Baumeister P, Huang JM, Gogia RK, Li M, Lee AS (2004) Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem* 279: 11354-11363

Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* 9: 789-798

Hu CD, Kerppola TK (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol* 21: 539-545

Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL, Wang X (1993) SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 11603-11607

Jadot M, Canfield WM, Gregory W, Kornfeld S (1992) Characterization of the signal for rapid internalization of the bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor. *J Biol Chem* 267: 11069-11077

Jägerstrom S, Polesie S, Wickstrom Y, Johansson BR, Schroder HD, Hojlund K, Bostrom P (2009) Lipid droplets interact with mitochondria using SNAP23. *Cell Biol Int* 33: 934-940

Johnson LN (2009) The regulation of protein phosphorylation. *Biochem Soc Trans* 37: 627-641

Kabiri M, Unsworth LD (2014) Application of isothermal titration calorimetry for characterizing thermodynamic parameters of biomolecular interactions: peptide self-assembly and protein adsorption case studies. *Biomacromolecules* 15: 3463-3473

Kim M, Jung Y, Lee K, Kim C (2000) Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein. *Arch Pharm Res* 23: 633-636

Kinch LN, Ginalski K, Grishin NV (2006) Site-2 protease regulated intramembrane proteolysis: sequence homologs suggest an ancient signaling cascade. *Protein Sci* 15: 84-93

Kinsky SC (1970) Antibiotic interaction with model membranes. *Annu Rev Pharmacol* 10: 119-142

Kobayashi T, Beuchat MH, Lindsay M, Frias S, Palmiter RD, Sakuraba H, Parton RG, Gruenberg J (1999) Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat Cell Biol* 1: 113-118

Kollmann K, Damme M, Markmann S, Morelle W, Schweizer M, Hermans-Borgmeyer I, Rochert AK, Pohl S, Lubke T, Michalski JC, Kakela R, Walkley SU, Braulke T (2012) Lysosomal dysfunction causes neurodegeneration in mucolipidosis II 'knock-in' mice. *Brain* 135: 2661-2675

Kollmann K, Pestka JM, Kuhn SC, Schone E, Schweizer M, Karkmann K, Otomo T, Catala-Lehnen P, Failla AV, Marshall RP, Krause M, Santer R, Amling M, Braulke T, Schinke T (2013) Decreased bone formation and increased osteoclastogenesis cause bone loss in mucolipidosis II. *EMBO Mol Med* 5: 1871-1886

Kollmann K, Pohl S, Marschner K, Encarnacao M, Sakwa I, Tiede S, Poorthuis BJ, Lubke T, Muller-Loennies S, Storch S, Braulke T (2010) Mannose phosphorylation in health and disease. *Eur J Cell Biol* 89: 117-123

Kornfeld R, Kornfeld S (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54: 631-664

Kratz EM, Borysewicz K, Katnik-Prastowska I (2010) Terminal monosaccharide screening of synovial immunoglobulins G and A for the early detection of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 30: 1285-1292

Kudo M, Bao M, D'Souza A, Ying F, Pan H, Roe BA, Canfield WM (2005) The alphaand beta-subunits of the human UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme Nacetylglucosamine-1-phosphotransferase [corrected] are encoded by a single cDNA. *J Biol Chem* 280: 36141-36149 Kudo M, Canfield WM (2006) Structural requirements for efficient processing and activation of recombinant human UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal-enzyme-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. *J Biol Chem* 281: 11761-11768

Lee HJ, Zheng JJ (2010) PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Commun Signal* 8: 8

Lee SJ, Zhang J, Choi AM, Kim HP (2013) Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 327167

Lee WS, Payne BJ, Gelfman CM, Vogel P, Kornfeld S (2007) Murine UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase lacking the gamma-subunit retains substantial activity toward acid hydrolases. *J Biol Chem* 282: 27198-27203

Leem J, Koh EH (2012) Interaction between mitochondria and the endoplasmic reticulum: implications for the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Exp Diabetes Res* 2012: 242984

Lemberg MK, Martoglio B (2002) Requirements for signal peptide peptidase-catalyzed intramembrane proteolysis. *Mol Cell* 10: 735-744

Lenz O, ter Meulen J, Klenk HD, Seidah NG, Garten W (2001) The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12701-12705

Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, Park O, Luo Z, Lefai E, Shyy JY, Gao B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Shaw RJ, Cohen RA, Zang M (2011) AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab* 13: 376-388

Lipkind GM, Zhou A, Steiner DF (1998) A model for the structure of the P domains in the subtilisin-like prohormone convertases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7310-7315

Listenberger LL, Brown DA (2007) Fluorescent detection of lipid droplets and associated proteins. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 24: Unit 24 22

Lobry C, Oh P, Mansour MR, Look AT, Aifantis I (2014) Notch signaling: switching an oncogene to a tumor suppressor. *Blood* 123: 2451-2459

Luzio JP, Pryor PR, Bright NA (2007) Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 622-632

Ma ZM, Grubb JH, Sly WS (1991) Cloning, sequencing, and functional characterization of the murine 46-kDa mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 266: 10589-10595

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

Metherall JE, Goldstein JL, Luskey KL, Brown MS (1989) Loss of transcriptional repression of three sterol-regulated genes in mutant hamster cells. *J Biol Chem* 264: 15634-15641

Missiaen L, Dode L, Vanoevelen J, Raeymaekers L, Wuytack F (2007) Calcium in the Golgi apparatus. *Cell Calcium* 41: 405-416

Mitchell KJ, Pinson KI, Kelly OG, Brennan J, Zupicich J, Scherz P, Leighton PA, Goodrich LV, Lu X, Avery BJ, Tate P, Dill K, Pangilinan E, Wakenight P, Tessier-Lavigne M, Skarnes WC (2001) Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. *Nat Genet* 28: 241-249

Mitra N, Sinha S, Ramya TN, Surolia A (2006) N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends Biochem Sci* 31: 156-163

Miwako I, Yamamoto A, Kitamura T, Nagayama K, Ohashi M (2001) Cholesterol requirement for cation-independent mannose 6-phosphate receptor exit from multivesicular late endosomes to the Golgi. *J Cell Sci* 114: 1765-1776

Morris JA, Zhang D, Coleman KG, Nagle J, Pentchev PG, Carstea ED (1999) The genomic organization and polymorphism analysis of the human Niemann-Pick C1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 261: 493-498

Motamed M, Zhang Y, Wang ML, Seemann J, Kwon HJ, Goldstein JL, Brown MS (2011) Identification of luminal Loop 1 of Scap protein as the sterol sensor that maintains cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 286: 18002-18012

Müller-Loennies S, Galliciotti G, Kollmann K, Glatzel M, Braulke T (2010) A novel single-chain antibody fragment for detection of mannose 6-phosphate-containing proteins: application in mucolipidosis type II patients and mice. *Am J Pathol* 177: 240-247

Murakami T, Kondo S, Ogata M, Kanemoto S, Saito A, Wanaka A, Imaizumi K (2006) Cleavage of the membrane-bound transcription factor OASIS in response to endoplasmic reticulum stress. *J Neurochem* 96: 1090-1100

Naiki M, Mizuno S, Yamada K, Yamada Y, Kimura R, Oshiro M, Okamoto N, Makita Y, Seishima M, Wakamatsu N (2012) MBTPS2 mutation causes BRESEK/BRESHECK syndrome. *Am J Med Genet A* 158A: 97-102

Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE, Naar AM (2010) MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science* 328: 1566-1569

Nakayama S, Kretsinger RH (1994) Evolution of the EF-hand family of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23: 473-507

Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H, Fensom A, Vanier MT, Wattiaux R, Jadot M, Lobel P (2000) Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science* 290: 2298-2301

Oeffner F, Fischer G, Happle R, Konig A, Betz RC, Bornholdt D, Neidel U, Boente Mdel C, Redler S, Romero-Gomez J, Salhi A, Vera-Casano A, Weirich C, Grzeschik KH (2009) IFAP syndrome is caused by deficiency in MBTPS2, an intramembrane zinc metalloprotease essential for cholesterol homeostasis and ER stress response. *Am J Hum Genet* 84: 459-467

Ohashi M, Miwako I, Yamamoto A, Nagayama K (2000) Arrested maturing multivesicular endosomes observed in a Chinese hamster ovary cell mutant, LEX2, isolated by repeated flow-cytometric cell sorting. *J Cell Sci* 113 (Pt 12): 2187-2205

Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1: 376-386

Patra D, DeLassus E, Liang G, Sandell LJ (2014) Cartilage-specific ablation of site-1 protease in mice results in the endoplasmic reticulum entrapment of type IIb procollagen and down-regulation of cholesterol and lipid homeostasis. *PLoS One* 9: e105674

Patra D, Xing X, Davies S, Bryan J, Franz C, Hunziker EB, Sandell LJ (2007) Site-1 protease is essential for endochondral bone formation in mice. *J Cell Biol* 179: 687-700

Pentchev PG, Blanchette-Mackie EJ, Liscum L (1997) Biological implications of the Niemann-Pick C mutation. *Subcell Biochem* 28: 437-451

Pinton P, Pozzan T, Rizzuto R (1998) The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca2+ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum, Vol. 17.

Pohl S, Marschner K, Storch S, Braulke T (2009a) Glycosylation- and phosphorylationdependent 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

Pressman BC (1976) Biological applications of ionophores. *Annu Rev Biochem* 45: 501-530

Pullikotil P, Benjannet S, Mayne J, Seidah NG (2007) The proprotein convertase SKI-1/S1P: alternate translation and subcellular localization. *J Biol Chem* 282: 27402-27413

Qian Y, Flanagan-Steet H, van Meel E, Steet R, Kornfeld SA (2013) The DMAP interaction domain of UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase is a substrate recognition module. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 10246-10251

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

Raggo C, Rapin N, Stirling J, Gobeil P, Smith-Windsor E, O'Hare P, Misra V (2002) Luman, the cellular counterpart of herpes simplex virus VP16, is processed by regulated intramembrane proteolysis. *Mol Cell Biol* 22: 5639-5649

Ramos da Palma J, Burri DJ, Oppliger J, Salamina M, Cendron L, Polverino de Laureto P, Seidah NG, Kunz S, Pasquato A (2014) Zymogen Activation and Subcellular Activity of Subtilisin Kexin Isozyme-1/Site-1 Protease. *J Biol Chem*

Raposo G, Marks MS (2007) Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 786-797

Rawlings ND, Barrett AJ (1995) Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol* 248: 183-228

Rawson RB (2003) The SREBP pathway--insights from Insigs and insects. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 631-640

Rawson RB (2013) The site-2 protease. Biochim Biophys Acta 1828: 2801-2807

Rawson RB, Cheng D, Brown MS, Goldstein JL (1998) Isolation of cholesterol-requiring mutant Chinese hamster ovary cells with defects in cleavage of sterol regulatory elementbinding proteins at site 1. *J Biol Chem* 273: 28261-28269

Rawson RB, Zelenski NG, Nijhawan D, Ye J, Sakai J, Hasan MT, Chang TY, Brown MS, Goldstein JL (1997) Complementation Cloning of S2P, a Gene Encoding a Putative Metalloprotease Required for Intramembrane Cleavage of SREBPs. *Molecular Cell* 1: 47-57

Rayner KJ, Suarez Y, Davalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, Fisher EA, Moore KJ, Fernandez-Hernando C (2010) MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science* 328: 1570-1573

Reitman ML, Kornfeld S (1981) Lysosomal enzyme targeting. N-Acetylglucosaminylphosphotransferase selectively phosphorylates native lysosomal enzymes. *J Biol Chem* 256: 11977-11980

Rojek JM, Lee AM, Nguyen N, Spiropoulou CF, Kunz S (2008) Site 1 protease is required for proteolytic processing of the glycoproteins of the South American hemorrhagic fever viruses Junin, Machupo, and Guanarito. *J Virol* 82: 6045-6051

Roth J, Zuber C, Park S, Jang I, Lee Y, Kysela KG, Le Fourn V, Santimaria R, Guhl B, Cho JW (2010) Protein N-glycosylation, protein folding, and protein quality control. *Mol Cells* 30: 497-506

Rutschmann S, Crozat K, Li X, Du X, Hanselman JC, Shigeoka AA, Brandl K, Popkin DL, McKay DB, Xia Y, Moresco EMY, Beutler B (2012) Hypopigmentation and Maternal-Zygotic Embryonic Lethality Caused by a Hypomorphic Mbtps1 Mutation in Mice. *G3: Genes/Genomes/Genetics* 2: 499-504

Sakai J, Rawson RB, Espenshade PJ, Cheng D, Seegmiller AC, Goldstein JL, Brown MS (1998) Molecular Identification of the Sterol-Regulated Luminal Protease that Cleaves SREBPs and Controls Lipid Composition of Animal Cells. *Molecular Cell* 2: 505-514

Schlombs K, Wagner T, Scheel J (2003) Site-1 protease is required for cartilage development in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14024-14029

Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **3:** 1101-1108

Schneider JS, Reddy SP, E HY, Evans HW, Glickman MS (2013) Site-2 protease substrate specificity and coupling in trans by a PDZ-substrate adapter protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 19543-19548

Schröder B, Wrocklage C, Pan C, Jager R, Kosters B, Schafer H, Elsasser HP, Mann M, Hasilik A (2007) Integral and associated lysosomal membrane proteins. *Traffic* 8: 1676-1686

Schröder BA, Wrocklage C, Hasilik A, Saftig P (2010) The proteome of lysosomes. *Proteomics* 10: 4053-4076

Schweizer M, Markmann S, Braulke T, Kollmann K (2013) Ultrastructural analysis of neuronal and non-neuronal lysosomal storage in mucolipidosis type II knock-in mice. *Ultrastruct Pathol* 37: 366-372

Seidah NG, Chretien M, Day R (1994) The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions. *Biochimie* 76: 197-209

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, Mowla SJ, Hamelin J, Mamarbachi AM, Benjannet S, Toure BB, Basak A, Munzer JS, Marcinkiewicz J, Zhong M, Barale JC, Lazure C, Murphy RA, Chretien M,

Marcinkiewicz M (1999) Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1321-1326

Shen J, Prywes R (2004) Dependence of site-2 protease cleavage of ATF6 on prior site-1 protease digestion is determined by the size of the luminal domain of ATF6. *J Biol Chem* 279: 43046-43051

Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ (2009) Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458: 1131-1135

Steckel F, Hasilik A, von Figura K (1983) Biosynthesis and maturation of arylsulfatase B in normal and mutant cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 258: 14322-14326

Stein M, Zijderhand-Bleekemolen JE, Geuze H, Hasilik A, von Figura K (1987) Mr 46,000 mannose 6-phosphate specific receptor: its role in targeting of lysosomal enzymes. *EMBO J* 6: 2677-2681

Stirling J, O'Hare P (2006) CREB4, a transmembrane bZip transcription factor and potential new substrate for regulation and cleavage by S1P. *Mol Biol Cell* 17: 413-426

Struhl G, Adachi A (2000) Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell* 6: 625-636

Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca2+ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca2(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2466-2470

Thiam AR, Farese RV, Jr., Walther TC (2013) The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 775-786

Tiede S, Storch S, Lubke 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

Toure BB, Munzer JS, Basak A, Benjannet S, Rochemont J, Lazure C, Chretien M, Seidah NG (2000) Biosynthesis and enzymatic characterization of human SKI-1/S1P and the processing of its inhibitory prosegment. *J Biol Chem* 275: 2349-2358

Trombetta ES, Helenius A (1998) Lectins as chaperones in glycoprotein folding. *Curr Opin Struct Biol* 8: 587-592

Tsaytler P, Harding HP, Ron D, Bertolotti A (2011) Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science* 332: 91-94

Tsukumo Y, Tomida A, Kitahara O, Nakamura Y, Asada S, Mori K, Tsuruo T (2007) Nucleobindin 1 controls the unfolded protein response by inhibiting ATF6 activation. *J Biol Chem* 282: 29264-29272 Umeda A, Fujita H, Kuronita T, Hirosako K, Himeno M, Tanaka Y (2003) Distribution and trafficking of MPR300 is normal in cells with cholesterol accumulated in late endocytic compartments: evidence for early endosome-to-TGN trafficking of MPR300. *J Lipid Res* 44: 1821-1832

Urban S, Freeman M (2003) Substrate specificity of rhomboid intramembrane proteases is governed by helix-breaking residues in the substrate transmembrane domain. *Mol Cell* 11: 1425-1434

van Tetering G, van Diest P, Verlaan I, van der Wall E, Kopan R, Vooijs M (2009) Metalloprotease ADAM10 is required for Notch1 site 2 cleavage. *J Biol Chem* 284: 31018-31027

Varki A (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3: 97-130

Varki A, Kornfeld S (1980) Identification of a rat liver alpha-N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase capable of removing "blocking" alpha-N-acetylglucosamine residues from phosphorylated high mannose oligosaccharides of lysosomal enzymes. *J Biol Chem* 255: 8398-8401

Vincent MJ, Sanchez AJ, Erickson BR, Basak A, Chretien M, Seidah NG, Nichol ST (2003) Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein proteolytic processing by subtilase SKI-1. *J Virol* 77: 8640-8649

Waheed A, Hasilik A, von Figura K (1981) Processing of the phosphorylated recognition marker in lysosomal enzymes. Characterization and partial purification of a microsomal alpha-N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase. *J Biol Chem* 256: 5717-5721

Weyer K, Boldt HB, Poulsen CB, Kjaer-Sorensen K, Gyrup C, Oxvig C (2007) A substrate specificity-determining unit of three Lin12-Notch repeat modules is formed in trans within the pappalysin-1 dimer and requires a sequence stretch C-terminal to the third module. *J Biol Chem* 282: 10988-10999

Wilfling F, Haas JT, Walther TC, Farese RV, Jr. (2014) Lipid droplet biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 29: 39-45

Willott E, Balda MS, Fanning AS, Jameson B, Van Itallie C, Anderson JM (1993) The tight junction protein ZO-1 is homologous to the Drosophila discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7834-7838

Woods DF, Bryant PJ (1991) The discs-large tumor suppressor gene of Drosophila encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* 66: 451-464

Yang J, Goldstein JL, Hammer RE, Moon YA, Brown MS, Horton JD (2001) Decreased lipid synthesis in livers of mice with disrupted Site-1 protease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13607-13612

Ye F, Zhang M (2013) Structures and target recognition modes of PDZ domains: recurring themes and emerging pictures. *Biochem J* 455: 1-14

Ye J, Dave UP, Grishin NV, Goldstein JL, Brown MS (2000a) Asparagine-proline sequence within membrane-spanning segment of SREBP triggers intramembrane cleavage by site-2 protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5123-5128

Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL (2000b) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 6: 1355-1364

Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, Brown MS (1993) SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* 75: 187-197

Zelenski NG, Rawson RB, Brown MS, Goldstein JL (1999) Membrane topology of S2P, a protein required for intramembranous cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* 274: 21973-21980

Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, Back SH, Kaufman RJ (2006) Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 124: 587-599

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

PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE

Publikationen

- Sperrhacke M, Fischer J, Wu Z, Klünder S, Sedlacek R, Schroeder JM, Meyer-Hoffert U, Reiss K. (2014) SPINK9 stimulates metalloprotease/EGFR-dependent keratinocyte migration via purinergic receptor activation. *J Invest Dermatol.* 134: 1645-1654
- Klünder S, Heeren J, Markmann S, Santer R, Braulke T, Pohl S. Cholesterolindependent activation of site-1 protease substrate GlcNAc-1-phosphotransferase. *J Biol Chem*, in Vorbereitung
- Franke M, De Pace R, Klünder S, Marschner K, Schweizer M, Storch S, Pohl S, Braulke T (2014) Turnover of the GlcNAc-1-phosphotransferase. *J Biol Chem*, in Vorbereitung
- Voltolini RV, De Pace R, Klünder S, Sperb-Ludwig F, Schwartz IVD, Braulke T, Pohl S. Analysis of the pathogenicity of *GNPTAB* mutations. *Hum Mutat*, in Vorbereitung

Kongressbeiträge (Vortrag)

- Klünder S: Proteolytic activation of the GlcNAc-1-phosphotransferase, Progress Report of the International Research Training Group (Sonderforschungsbereich 877), 3.2.2012, Kiel
- Klünder S: Proteolysis-mediated regulation of mannose 6-phosphate-dependent transport of lysosomal enzymes, Retreat - Sonderforschungsbereich 877, 31.8.2012, Sylt

 Klünder S: Proteolytic activation of the Golgi-resident GlcNAc-1phosphotransferase,

2nd International Symposium of the Research Training Group 1459 "Protein Trafficking in Health and Disease", 26.-28.9.2012 Hamburg

- Klünder S: Proteolytic activation of the GlcNAc-1-phosphotransferase, Progress Report of the International Research Training Group (Collaborative Research Centre 877), 15.2.2013, Hamburg
- Klünder S: Proteolytic activation of the Golgi-resident GlcNAc-1phosphotransferase,
 ESGLD (European Study Group on Lysosomal Diseases) workshop, 25.-29.9.2013, Leibnitz, Austria
- Klünder S: Regulation of S1P-mediated cleavage of the GlcNAc-1phosphotransferase,
 Progress Report of the International Research Training Group (Sonderforschungsbereich 877), 07.02.2014

3. Kongressbeiträge (Poster)

- Klünder S, Marschner K, Heeren J, Braulke T, Pohl S: Proteolytic activation of the Golgi-resident GlcNA-1-phosphotransferase
 1st International Symposium of the Collaborative Research Centre 877 "Protease World in Health & Disease", 13.-15.9.2012, Kiel
- Klünder S, Heeren J, Schweizer M, Koch-Nolte F, Braulke T, Pohl S: Proteolytic activation of the Golgi-resident GlcNAc-1-phosphotransferase,
 International Joint Meeting of the German Society for Cell Biology (DGZ) and the German Society for Developmental Biology (GfE), 20.-23.3.2013, Heidelberg

Klünder S, Heeren J, Schweizer M, Braulke T, Pohl S: Proteolysis-dependent transport of lysosomal enzymes,
 3rd International Symposium of the Research Training Group 1459 "Protein trafficking in health and disease", 10.-12.9.2014, Hamburg, Germany

3. Kongresse (Teilnahme)

- International Symposium "Lysosomes", 29.9.-1.10.2011, Hamburg
- UKE Microscopy Symposium, 23.-24.4.2014, Hamburg
- ESGLD (European Study Group on Lysosomal Diseases) graduate course, 25.-29.9.2013, Leibnitz, Austria
 3rd International Symposium of the Research Training Group 1459 "Protein trafficking in health and disease", 10.-12.9.2014, Hamburg, Germany

3. Kongresse (Teilnahme)

- International Symposium ,,Lysosomes", 29.9.-1.10.2011, Hamburg
- UKE Microscopy Symposium, 23.-24.4.2014, Hamburg
- ESGLD (European Study Group on Lysosomal Diseases) graduate course, 25.-29.9.2013, Leibnitz, Austria

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der letzten drei Jahre unterstützt, und zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Thomas Braulke und Dr. Sandra Pohl, die es mir ermöglicht haben ein so spannendes Projekt zu bearbeiten und mich durch anregende Diskussionen und konstruktive Kritik sehr unterstützt haben. Sandra, ich hätte mir keine bessere Betreuung während meiner Doktorarbeit vorstellen können! Du hast mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden und deine fachliche Kompetenz, deine Ehrlichkeit, dein Vertrauen in meine Arbeit und deine Geduld haben mir stets sehr geholfen und meine Arbeit vorangetrieben. Danke dafür!

Bei Prof. Dr. Wolfgang Streit möchte ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Dem SFB 877 danke ich für die finanzielle Unterstützung und für die fachlichen Weiterbildungsmöglichkeiten.

Bei Dr. Michaela Schweizer (ZMNH, Hamburg) bedanke ich mich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Prof. Dr. Joseph L. Goldstein (Texas, USA), danke ich für die Bereitstellung der CHO-7-, SRD-12B- und M19-Zellen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Bei Sandra Ehret aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Heeren (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, UKE) bedanke ich mich für die Herstellung von Lipoproteindefizientem Serum und humanem LDL. Prof. Dr. Jörg Heeren danke ich für seine fachlichen Ratschläge, die sehr zur Bearbeitung des Projektes beigetragen haben.

Dr. Sandra Markmann danke ich für die Bereitstellung von Wildtyp und MLII-Mausfibroblasten.

Bei meinen Arbeitskollegen und Freunden Raffaella, Johannes, Jessica, Carolin, Mine, Georgia und Laura bedanke ich mich für das gute Arbeitsklima und natürlich für die vielen schönen Stunden außerhalb des Labors!

Johannes, dir danke ich besonders für deine Unterstützung, deine Spontanität, deinen Humor und deine Aufmunterungen in stressigen Zeiten!

Ein herzlicher Dank gilt meiner Familie. Danke, dass ihr immer für mich da seid und mich bei all meinen Entscheidungen stets unterstützt!

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den

Unterschrift