Aus dem Arbeitsbereich Molekularbiologie
Zentrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin des
Universitätsklinkum Hamburg-Eppendorf
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Direktor: Prof. Dr. Kurt Ullrich

Beschreibung eines neuen Proteins und seiner Interaktion mit dem 300kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptor

Promotion

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich der Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Adrian Meder

aus Hamburg

Hamburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 30.06.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. T. Braulke

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. K. Ullrich

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. H.-J. Kreienkamp

1. Inhaltsverzeichnis 3

2. Abkürzungsverzeichnis 7

3. Einleitung 9

3.1. Lysosomen 9

3.2. *N*-Glykosylierung und Biosynthese des Mannose-6-Phosphat-Erkennungsmarkers an neusynthetisierten lysosomalen Enzymen 9

3.3. Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren 10

3.3.1. Struktur des 300 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptors 10

3.3.2. Signalstrukturen in der zytoplasmatischen Domäne des MPR300 11

3.4. Signalabhängiger Transport der Mannose-6-Phosphat Rezeptoren 12

3.4.1. Anterograder Transport der Mannose-6-Phosphat Rezeptoren 13

3.4.2. Retrograder Transport der Mannose-6-Phosphat Rezeptoren 15

3.4.3. Internalisierung der Mannose-6-Phosphat Rezeptoren an der Plasmamembran 17

3.4.4. Fragestellung/Zielsetzung 17

4. Material und Methoden 19

4.1. Material 19

4.1.1. Radioaktive Substanzen 19

4.1.2. Antikörper 19

4.1.3. Vektoren 20

4.1.4. Bakterienstämme 21

4.1.5. Medien zur Anzucht von Bakterien 21

4.1.6. Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen p66 21

4.1.7. Zelllinien 22

4.1.8. Zellkulturmedien und Lösungen zur Arbeit mit eukaryonten Zellen 22

4.1.9. Häufig verwendete Puffer 22

4.2. Molekularbiologische Methoden 23

4.2.1 Sequenzierungsprimer 23

4.2.2. Primer zur Amplifikation der p66-Myc cDNA 23

4.2.3. Konzentrationsbestimmung von DNA 23

4.2.4. Reinigung von DNA-Fragmenten 24

4.2.5. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen 24

4.2.6. Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA 24

4.2.6.1. Präparation von „kompetenten“ *E. coli*-Zellen 24

4.2.6.2. Transformation kompetenter Zellen 25

4.2.6.3. Anlegen einer Glyzerinkultur 25
4.2.6.4. Mini- und Midi-Präparation (Qiagen-Methode) 25
4.2.6.5. Auftrennung von DNA in Agarosegelen 25
4.2.6.6. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 26
4.2.6.7. DNA-Amplifikation über Polymerase-Ketten-Reaktion 26
4.2.6.8. Sequenzierung von Plasmid-DNA 27
4.3. Zellbiologische Methoden 27
4.3.1. Kultivierung von Zellen 27
4.3.2. Trypsinieren von Zellen 27
4.3.3. Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen 27
4.3.4. Transfektion von Zellen mit Lipofectamin 2000 28
4.3.5. Herstellung von stabilen Zelllinien 28
4.3.6. Herstellung von postnukleären Überständen 29
4.3.7. Herstellung von Zellhomogenaten 29
4.3.8. Subzelluläre Fraktionierung durch Ultrazentrifugation 29
4.3.9. Immunfluoreszenz-Mikroskopie 30
4.3.10. Bestimmung der Endozytoserate von [^{125}J]-Arylsulfatase B 30
4.3.11. Bestimmung der MPR300-Rezeptorexpression an der Zelloberfläche 30
4.4. Biochemische Methoden 31
4.4.1. Bestimmung der Proteinkonzentration 31
4.4.2. Metabolische Markierung von Zellen mit [^{35}S]-Methionin 31
4.4.3. Immmunpräzipitation von Cathepsin D 31
4.4.4. Enzymatische Abspaltung von *N*-verbundenen Oligosaccharidketten 31
4.4.5. Dephosphorylierung von p66 32
4.4.6. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 32
4.4.7. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Tricin 33
4.4.8. Anfärbung von Proteinen mit Coomassie Blue 34
4.4.9. Western-Blot-Analyse 35
4.4.9.1. Immunodetektion von p66 36
4.4.9.2. Immunodetektion von GFP 36
4.4.9.3. Immunodetektion des MPR300 36

5. Ergebnisse **37**
5.1. Identifizierung und Analyse von λ-cDNA-Klonen vollständiger Länge durch *in vitro* Translation 37
5.2. Protein-Sequenzanalyse des 66 kDa Proteins 38
5.3. Protein-Sequenzvergleich und homologe Domänen des p66 39
5.4. Untersuchungen zur endogenen Expression von p66 in humanen Zelllinien 41
5.5. Verteilung von p66 in cytosolischen Membranfraktionen humaner Zelllinien 42
5.6. Subzelluläre Verteilung von p66 43
5.6.1. Klonierung der p66-cDNA in die Expressionsvektoren pcDNA3.1.D/V5-His-TOPO und pcDNA 6.2/V5/GW/D-TOPO 43
5.6.2. Immunpräzipitation von p66 aus transfizierten BHK Zellen 43
5.6.3. Analyse der Verteilung von p66 in Zytosol und Gesamt-Membran-Fraktionen durch Ultrazentrifugation 44
5.7. Untersuchungen zu posttranslationalen Modifikationen von p66 46
5.7.1. Analyse der *N*-Glykosylierung von p66 47
5.7.2. Analyse der Phosphorylierung von p66 48
5.8. Analyse intrazellulärer Transportfunktionen des MPR300 in p66 exprimierenden Zellen 49
5.9. Analyse der Expression und Oberflächenkonzentration des humanen MPR300 in stabil transfizierten BHK-Zellen 51
5.10. Endozytose von Mannose-6-Phosphat-haltigen Liganden 52
5.11. Lokalisation von p66 in transfizierten CHO-Zellen 55
5.12. Lokalisation von p66 und des MPR300 in transfizierten HeLa-Zellen 57
5.13. Analyse der Interaktion zwischen p66 und dem MPR300 *in vivo* durch Kopräzipitationsanalysen 57

6. Diskussion **59**
6.1. Proteinchemische Analyse von p66 59
6.2. Sequenzvergleich der p66 Polypeptidsequenz mit homologen Proteinen 60
6.3. Analyse von posttranslationalen Modifikationen von p66 61
6.4 Subzelluläre Lokalisation von p66 61
6.5. Bedeutung von p66 für intrazelluläre Transportfunktionen des MPR300 63
6.6. Analyse der MPR300-abhängigen Endozytose lysosomaler Arylsulfatase B nach Überexpression von p66 65
6.7. Analyse der Interaktion von p66 und dem MPR300 *in vivo* 66

7. Zusammenfassung **68**

8. Literaturverzeichnis **69**

9. Anhänge **77**

9.1. Lebenslauf 77

9.2. Danksagung 78

2. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. bidest.	doppelt destilliertes Waser
AP	Adaptorprotein
BHK	Baby-Hamster-Niere
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin (Bovine Serum Albumin)
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
CK2	Casein-Kinase 2
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
GFP	Green fluorescent protein
GP3ST	β-Gal-3'-Sulfotransferase
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
LAMP1	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein 1
LIMP2	Lysosomales integrales Membranprotein 2
M6P	Mannose-6-Phosphat
MEM	minimal essential medium
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MPR300-CT	Zytoplasmatische Domäne des MPR300
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PNS	Post-Nukleärer Überstand

RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Taq	*Thermophilus aquaticus*
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor ß
TGN	*trans*-Golgi-Netzwerk
WT	Wildtyp
x g	-fache Erdbeschleunigung

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

3. Einleitung

3.1. Lysosomen

Lysosomen sind membranumgebene Organellen eukaryonter Zellen, die für den Abbau von zelleigenen und zellfremden Makromolekülen, wie Polysacchariden, Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden verantwortlich sind. Lysosomen sind funktionell durch eine erhöhte Protonenkonzentration (pH ≤ 5) charakterisiert und enthalten ca. 50 verschiedene saure Hydrolasen, die durch eine lysosomale Membran vom Zytosol abgetrennt sind (Eskelinen et al., 2003). Die Funktion der lysosomalen Membran besteht im Schutz zytoplasmatischer Proteine und Strukturen vor hydrolytischem Abbau, der Aufrechterhaltung eines intralysosomalen sauren Milieus und dem selektiven Transport von Abbauprodukten ins Zytosol. Die lysosomale Membran wird hauptsächlich durch integrale Membranproteine aufgebaut, die als lysosomale assoziierte Membran-Proteine (LAMP1 und 2) und lysosomale integrale Membran Proteine (LIMP1 und 2) bezeichnet werden und deren luminale Domänen stark glykosyliert sind. Die Azidifizierung des lysosomalen Lumens wird durch integrale V-Typ H^+-ATPasen katalysiert, die ATP-abhängig die Translokation von Protonen vermitteln. Weiterhin wurden lysosomale Membranproteine identifiziert, die den Transport von Aminosäuren (Cystinosin), Monosacchariden (Sialin) und Nukleotiden (LAPTM4a) aus dem lysosomalen Lumen ins Zytosol katalysieren (Verheijen und Mancini, 2005). Die Biogenese der Lysosomen und deren Funktion sind abhängig von einem konstitutiven Transport neusynthetisierter lysosomaler Proteine zum Lysosom (Kornfeld und Mellman, 1989).

3.2. *N*-Glykosylierung und Biosynthese des Mannose-6-Phosphat-Erkennungsmarkers an neusynthetisierten lysosomalen Enzymen

Nach der Translokation neusynthetisierter lysosomaler Enzymvorstufen in das endoplasmatische Reticulum (ER), werden diese an selektiven Asparaginresten der Sequenz Asn-X-Ser/Thr glykosyliert. Eine spezifische Oligosaccharyltransferase überträgt hierbei einen Oligosaccharidrest der Zusammensetzung $(Glc)_3$-$(Man)_9$-$(GlcNAc)_2$, der an den Carrier Dolicholpyrophosphat gebunden ist, auf den Asparaginrest. Der Oligosaccharidrest wird dann im ER und Golgi-Apparat weiter durch sogenannte "trimming-Prozesse" modifiziert. Die dabei entstandenen Oligosaccharidseitenketten werden in drei Klassen, komplexe, Mannose-reiche und hybride Oligosaccharide eingeteilt, denen eine Grundstruktur aus drei Mannose- und zwei GlcNAc-Resten gemeinsam ist (Kornfeld und Kornfeld, 1985).

Spezifisch für lysosomale Enzyme ist die Ausstattung der Mannose-reichen Oligosaccharidenseitenketten mit Mannose-6-Phosphat (M6P)-Erkennungssignalen. Die Biosynthese des M6P-Erkennungsmarkers an neusynthetisierten lysosomalen Enzymen wird durch zwei Enzyme in einem Zwei-Stufen-Prozess katalysiert (von Figura und Hasilik, 1986). Im ersten Schritt wird ein *N*-Acetylglucosamin-1-Phosphatrest vom Donor UDP-*N*-Actetylglucosamin unter Abspaltung von UMP auf die Hydroxylgruppe an C6 von Mannoseresten lysosomaler Enzyme durch das Enzym *N*-Acetylglucosamin-1-phosphotransferase (EC 2.7.8.17, Phosphotransferase) übertragen (Tiede et al., 2005). In einem zweiten Schritt wird der *N*-Acetylglucosamin-Rest im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) durch das Enzym *N*-Acetylglucosamin-1-Phosphodiester-α-*N* Acetylglucosaminidase (EC 3.1.4.45, Uncovering Enzyme, UCE) abgespalten und der M6P-Erkennungsmarker demaskiert (Kornfeld et al., 1998, Rohrer und Kornfeld, 2001). Der M6P-Erkennungsmarker vermittelt die spezifische und hochaffine Bindung neusynthetisierter löslicher lysosomaler Enzyme an M6P-spezifische Rezeptoren (MPR) und die Seggregation vom sekretorischem Pfad.

3.3. Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren

Die beiden bekannten Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren werden nach ihren molaren Massen als MPR300 und MPR46 bezeichnet (Hille-Rehfeld, 1995). Beide MPRs sind Typ-1 integrale Membranglykoproteine, die im TGN, in endosomalen Kompartimenten und an der Plasmamembran lokalisiert sind (Braulke, 1996). Die subzelluläre Verteilung der beiden MPRs ist vergleichbar und korrespondiert mit den Transportwegen lysosomaler Enzyme. Das Optimum der Ligandenbindung liegt *in vitro* beim MPR300 zwischen pH 6,0-7,4 (Tong et al., 1989) und beim MPR46 zwischen 6,0-6,3 (Tong und Kornfeld, 1989).
Beide MPRs sind am Transport saurer Hydrolasen vom TGN zu frühen Endosomen beteiligt. Hierbei werden die Hydrolasen über ihre M6P-Reste an die MPRs gebunden und anschließend gemeinsam in Clathrin-beschichtete Vesikel gepackt, die nach Verlust der Clathrinhülle mit dem endosomalen Kompartiment verschmelzen können. Nach Dissoziation der Rezeptor-Ligand-Komplexe aufgrund des niedrigeren endosomalen pH-Wertes gelangen die MPRs durch retrograden vesikulären Transport zum TGN zurück, wo sie erneut neusynthetisierte lysosomale Enzyme binden und zu den Endosomen transportieren können. Der aktive retrograde Transport verhindert, dass die MPRs in die Lysosomen transportiert und degradiert werden (Bonifacino und Rojas, 2006).

Neben dem Transport lysosomaler Hydrolasen ist der MPR300 an der Regulation des extrazellulären Spiegels des nicht-glykosylierten Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors IGFII beteiligt (Braulke, 1999). Dabei bindet IGFII an MPR300 an der Plasmamembran, die die

Endozytose und den Abbau in den Lysosomen vermitteln. Ferner ist der MPR300 Teil der Aktivierungsmaschinerie des latenten, inaktiven Transforming Growth Faktors β (Dennis und Rifkin, 1991). Schliesslich sind als M6P-haltige Liganden noch Proliferin (Groskopf et al., 1997) und Granzyme B (Motyka et al., 2000) identifiziert worden. Neben IGF-II bindet der MPR300 weitere nicht M6P-haltige Liganden, wie Retinsäure (Kang et al., 1999), den Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator Rezeptor (Nykjaer et al., 1998) und Plasminogen (Godar et al., 1999).

3.3.1. Struktur des 300 kDa Mannose-6-Phosphat Rezeptors

Der 300 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR300) ist aus einer luminalen, einer Transmembran und einer zytosolischen Domäne zusammengesetzt. Die luminale Domäne des MPR300 besteht aus 15 sich wiederholenden Segmenten, die jeweils ca. 147 Aminosäuren enthalten und untereinander eine Homologie von 14-38% aufweisen. Von den 19 potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen in der luminalen Domäne werden mindestens 2 genutzt und tragen ca. 20-30 kDa zum Molekulargewicht bei (Braulke, 1996).
Der MPR300 scheint in der Membran als Dimer vorzuliegen, das die Affinität für M6P-haltige Liganden verbessern soll. (Byrd und MacDonald, 2000; Byrd et al., 2000). Als Monomer bindet der MPR300 2 Mol eines monophoshorylierten oder 1 Mol eines diphosphorylierten Liganden (Tong et al., 1989). Die luminale Domäne des MPR300 besitzt zwei M6P-Bindungsstellen in den Segmenten 3 und 9 (Hancock et al., 2002) sowie eine IGFII-Bindungstelle in Segment 11 (Schmidt et al., 1995; Gamroudi et al., 1996). Für die Bindung von M6P-haltigen Liganden sind die Aminosäuren Arginin 435 in Domäne 3 und Arginin 1334 in Domäne 9 wichtig. Für die Bindung von IGFII in Domäne 11 des MPR300, die durch hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt wird, sind die Aminosäuren 1508-1566 essentiell (Schmidt et al., 1995).

3.3.2. Signalstrukturen in der zytoplasmatischen Domäne des MPR300

Die zytoplasmatische Domäne des MPR300 (MPR300-CT) enthält Signalstrukturen, die für die intrazelluläre Sortierung des MPR300 wichtig sind (Ghosh et al., 2003a). Das C-terminale saure Cluster/ Di-Leucin-Motiv ^{157}DDSDEDLL^{164} ist für den anterograden Transport des MPR300 vom TGN zu endosomalen Kompartimenten kritisch (Johnson und Kornfeld, 1992; Chen et al., 1997). Das Tyrosin-haltige Internalisierungssignal ^{26}**Y**SK**V**^{29} vermittelt die Endozytose des MPR300 an der Plasmamembran (Jadot et al., 1992). Das Internalisierungssignal, das interne Di-Leucin-Motiv (^{39}ETEW**LM**^{44}) und zwei Casein-Kinase Phosphorylierungsstellen (^{84}D**S**EDE^{88} und ^{154}DD**S**DED^{160}) sind für Sortierungsschritte, die durch den zytosolischen Adaptorkomplex AP-1 vermittelt werden, notwendig (Ghosh und

Kornfeld, 2004). Ein Sequenzbereich, der die Aminosäurereste 48-100 umfasst, ist für den Retromer-vermittelten Rücktransport des MPR300 aus endosomalen Kompartimenten zum TGN wichtig (Arighi et al., 2004).

Die Sortierungssignale in der MPR300-CT können mit multiplen zytosolischen Adaptor-Proteinen und akzessorischen Proteinen interagieren, wobei die Affinität der Interaktion entweder durch postranslationale Modifikationen (z. B. Phosphorylierung) oder Kofaktoren in der Plasmamembran (z. B Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat, Höning et al., 2005) reguliert werden kann.

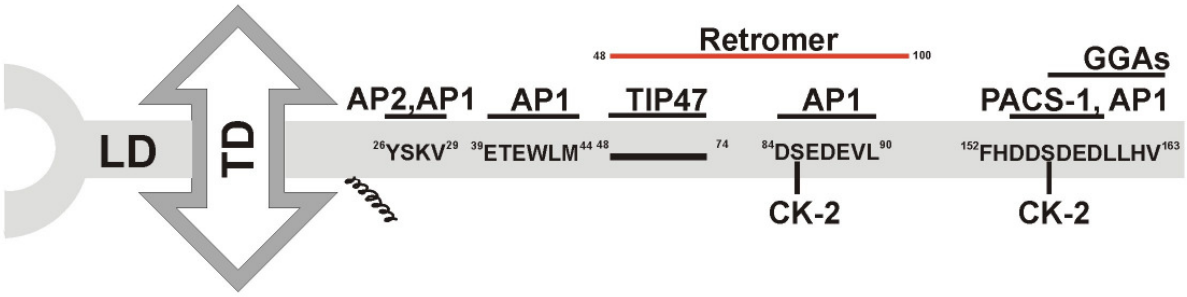

Abb.1: Sortierungssignale in der zytoplasmatischen Domäne des MPR300 und interagierende zytosolische Adaptorproteine. Schematische Darstellung der zytoplasmatischen Domäne (Aminosäuren 1-163) des humanen MPR300. Wichtige Sortierungssignale bzw. Sequenzbereiche und deren Aminosäuresequenz im Ein-Buchstaben-Code sind als schwarze Striche hervorgehoben und interagierende zytosolische Proteine darübergestellt. Serinreste, die von negativ geladenen sauren Aminosäuren umgeben sind und durch Casein-Kinase (CK-2) phosphoryliert werden können, sind mit senkrechten Strichen gekennzeichnet. Abkürzungen: LD: luminale Domäne des MPR300. TD: Transmembran-Domäne des MPR300, GGA: **G**olgi-localized, **γ**-ear containing, **A**RF-Bindungsprotein, TIP47: **T**ail **I**nteracting **P**rotein von 47 kDa; AP: **A**daptor-**P**rotein, PACS-1: **P**hosphofurin **A**cidic **C**luster **S**orting Protein 1. Diese Abbildung wurde nach Ghosh et al., 2003 a modifiziert.

3.4. Signalabhängiger Transport der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren

Die Interaktion der zytoplasmatischen Domäne des MPR300 mit verschiedenen Adaptorproteinen führen zur Rekrutierung von Hüllproteinen (z. B. Clathrin) und akzessorischer Proteine an Membranen des TGN, der Endosomen oder der Plasmamembran. Nach Bildung und Abschnürung von Clathrin-beschichteten Transportvesikeln und intrazellulärem Transport erfolgt die zielgerichtete Verschmelzung mit Membranen der Akzeptororganellen. Man unterscheidet beim MPR300 den anterograden Transportweg vom TGN zu endosomalen Kompartimenten und den retrograden Transportweg zurück zum TGN. Weiterhin zirkuliert der MPR300 konstitutiv zwischen endosomalen Membranen und der Plasmamembran. Für sämtliche Transportschritte sind zytosolische Adaptorproteine wichtig, die sowohl für einzelne (z. B. AP-2) als auch für multiple intrazelluläre Transportwege des Rezeptors (z. B. AP-1) wichtig sind (Robinson und Bonifacino, 2001). Die Beteiligung der Adaptorproteine an den intrazellulären

Transportwegen des Rezeptors sind in Abb. 2 schematisch dargestellt. Die essentielle Bedeutung der Sortierungssignale und der zytosolischen Adaptorproteine (AP) für den intrazellulären Transport des MPR300 wurde durch Nachweis der *in vitro*-Interaktion zwischen MPR300 und AP, durch die Analyse von Adaptor-defizienten Mausfibroblasten und die Expression von Rezeptoren mit mutierten Sortierungssignalen in Rezeptor-defizienten Fibroblasten gezeigt (Ghosh et al., 2003a).

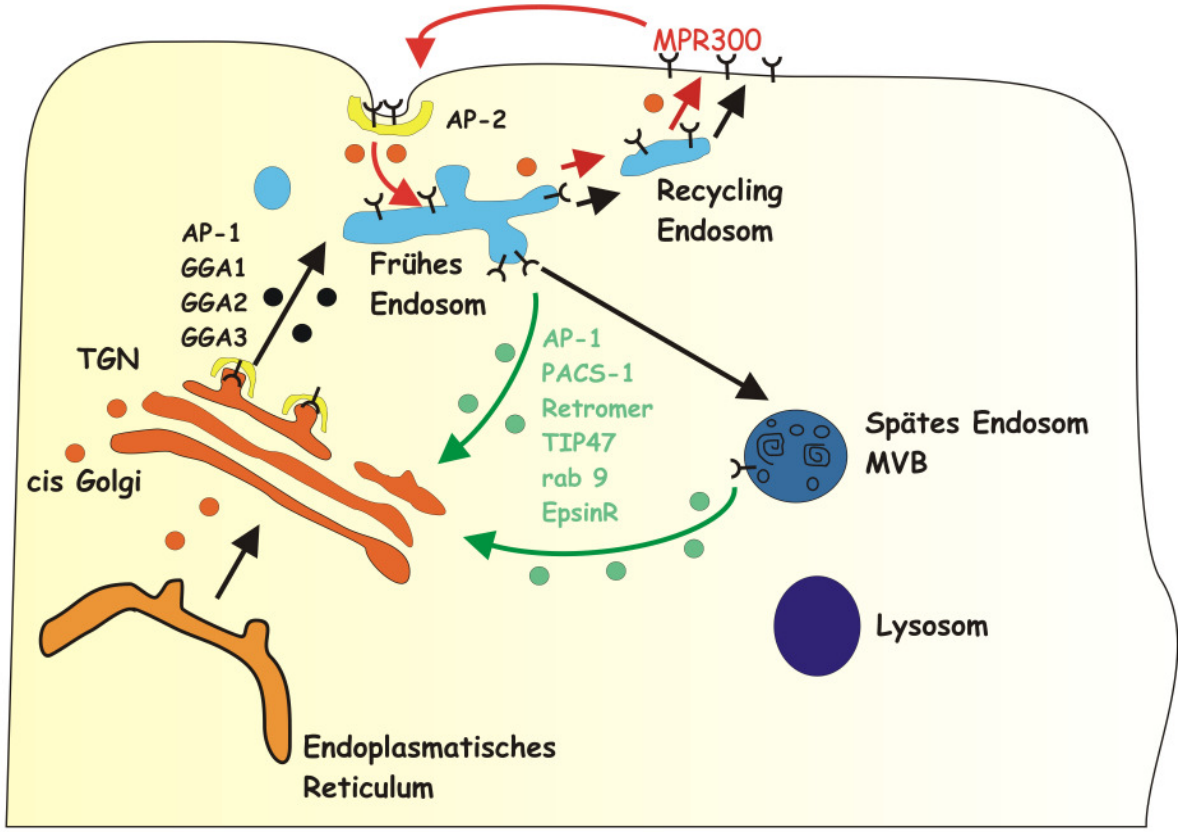

Abb. 2: Schematische Darstellung der intrazellulären Transportwege des MPR300. Die Transportwege des MPR300 zwischen dem *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN), früh- und spät-endosomalen Kompartimenten bzw. multivesicular bodies (MVB) sind mit schwarzen Pfeillinien dargestellt; die Internalisierung von MPR300 an der Plasmamembran und Transportwege aus endosomalen Kompartimenten an die Zelloberfläche sind durch rote, retrograde Transportrouten von endosomalen Kompartimenten zum TGN durch grüne Pfeile bezeichnet. Neben den Pfeilen sind zytosolische Proteine, die mit Signalstrukturen der zytoplasmatischen Domäne des MPR300 interagieren und für bestimmte Transportwege wichtig sind, dargestellt. (Abkürzungen: **AP**-1/2: **A**daptor**p**rotein 1/2, TIP 47: **T**ail **I**nteracting **P**rotein von 47 kDa, PACS-1: **P**hosphofurin **A**cidic **C**luster **S**orting **P**rotein 1).

3.4.1. Anterograder Transport der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren

Der anterograde Transport umfaßt die Abschnürung MPR-haltiger Vesikel vom TGN, die intrazelluläre vesikuläre Sortierung und die Verschmelzung mit endosomalen Kompartimenten (Abb. 2). Das TGN ist das Kompartiment mit der Hauptsortierungsfunktion beim anterograden Transport (Bonifacino und Glick, 2004). Für den anterograden vesikulären Transport der MPRs sind eine Gruppe von monomeren, zytosolischen Clathrin-Adaptorproteinen wichtig, die als **G**olgi-localized, **γ**-ear containing, **A**RF-Bindungsproteine

(GGAs) bezeichnet werden (Hirst et al., 2000; dell' Angelica et al., 2000). Die Familie der humanen GGAs umfasst drei homologe Proteine mit einer molaren Masse von 60 – 80 kDa (GGA1, GGA2, GGA3), die eine Sequenzidentität von 35-45% aufweisen und hauptsächlich am TGN lokalisiert sind (Nakayama und Wakatsuki, 2003). Alle GGAs sind aus einer N-terminalen VHS-Domäne, einer GAT-Domäne, einer flexiblen Gelenk-Region und einer C-terminalen GAE-Domäne zusammengesetzt. Während die VHS-Domäne die Bindung an die C-terminalen saure Cluster/ Di-Leucin-Motive der MPRs am TGN vermittelt (Zhu et al., 2001; Takatsu et al., 2001), induziert die Bindung von ARF1-GTP durch die GAT-Domäne die Assoziation der GGAs an Membranen des TGN (Puertollano et al., 2001 a). Die Gelenk-Region bindet an Clathrin (Zhu et al., 2001) und die GAE-Domäne, die homolog zur γ-Domäne von AP-1 ist, interagiert mit akzessorischen Proteinen, wie γ-Synergin (Hirst et al., 2000), Rabaptin 5 (Zhu et al., 2001), Epsin R (Duncan et al., 2003) und p56 (Lu et al., 2003).

Für die Bindung der MPRs an die GGAs *in vitro* sind das C-terminal lokalisierte Di-Leucin Sortierungssignal der zytoplasmatischen Domänen in Verbindung mit einem sauren Asparaginrest in Position –3 wichtig (kursiv und fett gekennzeichnet; MPR300: DDS***D***ED***LL***; MPR46: EER***D***DH***LL;*** Puertollano et al., 2001b; Zhu et al., 2001). Ein Sequenzvergleich der C-terminalen Domänen GGA-bindender Proteine zeigte, dass alle Proteine am C Terminus das Konsensus-Motiv: **D**/**E**XX**LL** tragen (Bonifacino, 2004). Die essentielle Bedeutung der GGAs für den Clathrin-abhängigen vesikulären Transport der MPRs und die Sortierung von neusynthetisierten lysosomalen Enzymen wird durch *in vivo* Untersuchungen belegt. Die Expression von MPR mit mutierten Di-Leucin-Signalen in MPR-Rezeptor-defizienten Zelllinien bewirkt eine erhöhte Sekretion von lysosomalen Enzymen ins Medium (Chen et al., 1993; 1997; Johnson und Kornfeld, 1992). Dominant-negative GGA1-VHS-GAT-Konstrukte, denen die Clathrin-bindende Gelenk-Region und die GAE-Domäne fehlt, verhindern den anterograden Transport der MPRs und bewirken eine Akkumulation der MPRs am TGN und eine Depletion der Rezeptoren in endosomalen Kompartimenten (Puertollano et al., 2001a; Puertollano et al., 2001b).

GGA1, GGA2 und GGA3 sind für die Rekrutierung der MPRs, die Bildung von Clathrin-beschichteten Vesikeln am TGN und den MPR-abhängigen Transport löslicher lysosomaler Enzyme wichtig (Bonifacino, 2004). Die einzelnen GGAs bilden wahrscheinlich einen funktionellen Komplex am TGN, da die Expressionsverminderung eines der GGA-Proteine die subzelluläre Umverteilung der anderen GGA-Mitglieder ins Zytosol induziert (Ghosh et al., 2003b). Die Depletion eines GGA-Proteins ist assoziiert mit einer gestörten Rekrutierung des MPR300 in Clathrin-beschichtete Vesikel, der Akkumulation des MPR300 in Endosomen und der Fehlsortierung des löslichen lysosomalen Enzyms Cathepsin D ins Medium (Ghosh et al., 2003b).

Die Bedeutung des Adaptorkomplexes AP-1 beim anterograden Transport des MPR300 ist unklar. Ein Modell schlägt vor, dass die Interaktion der GGA-Proteine und des AP-1-Komplexes die Verpackung der MPRs in Clathrin beschichtete Vesikel vermittelt (Doray et al., 2002). Für dieses Modell spricht, dass GGA1 und GGA3 mit dem AP1-Komplex an Clathrin-beschichteten Ausstülpungen von TGN-Membranen in MPR300-defizienten Maus L- und HeLa-Zellen kolokalisieren (Doray et al., 2002). Ferner interagiert die Gelenkregion der GGA-Proteine mit der γ-Untereinheit von AP-1. Schliesslich ist die Verpackung von MPR300, deren GGA-Bindungssstelle in der zytosolischen Domäne mutiert wurde, in Clathrin-beschichtete AP-1-enthaltende Vesikel vermindert (Doray et al., 2002).

3.4.2. Retrograder Transport der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren

Als retrograder Transport der MPRs wird die vesikuläre Sortierung nach Dissoziation der M6P-haltigen Liganden aus endosomalen Kompartimenten zurück zum TGN bezeichnet, wo weitere neusynthetisierte lösliche lysosomale Proteine gebunden werden können (Bonifacino und Rojas, 2006). Verschiedene zytosolische Adaptorproteine, die mit Sortierungssignalen der MPRs in endosomalen Kompartimenten interagieren, vermitteln den aktiven Rücktransport zum TGN und verhindern die Sortierung der MPRs ins Lysosom (Abb. 2). Der gerichtete Rücktransport der Rezeptoren wird durch eine komplexe Maschinerie von verschiedenen zytosolischen Proteinen, wie AP-1, PACS-1, dem Retromerkomplex, EpsinR, TIP47 und rab9 (Abb. 2), vermittelt, die wichtig für die Konzentrierung der MPRs in bestimmten endosomalen Subkompartimenten bzw. die Abschnürung in Transportvesikel sind (Ghosh et al., 2003a). Die Lokalisation von AP-1 und dem Retromerkomplex an tubulären Fortsätzen von frühen Endosomen und von TIP47 und rab9 an späten Endosomen lässt vermuten, das der retrograde Transport der MPRs aus unterschiedlichen endosomalen Kompartimenten heraus erfolgt (Bonifacino und Rojas, 2006).

Für den retrograden Transport des MPR300 von Endosomen zum TGN sind die zytosolischen Adaptorproteine AP-1 und **P**hosphofurin-**A**cidic **C**luster **S**orting **P**rotein 1 (PACS-1) essentiell (Wan et al., 1998; Meyer et al., 2000; Crump et al., 2001). PACS-1 interagiert mit dem C-terminalen sauren Cluster von Aminosäuren des MPR300 *in vitro* (Abb. 1) und bindet an das Adaptorprotein AP-1 (Wan et al., 1998; Crump et al., 2001). Nach Reduzierung der PACS-1 Expression durch RNA-Interferenz bzw. nach Überexpression von PACS-1 mit mutierter AP-1-Bindungsstelle wird eine Umverteilung der MPR300-Rezeptoren aus dem TGN in periphere endosomale Strukturen und ein Anstieg der Cathepsin D-Sekretion ins Medium um 20% beobachtet (Crump et al., 2001; Scott et al., 2006). Eine ähnliche Umverteilung in periphere Strukturen und ein verminderter Rücktransport des

MPR300 zum TGN wurde in embryonalen Fibroblasten von AP-1-knock-out Mäusen beschrieben, bei denen die µ1A-Untereinheit ausgeschaltet wurde (Meyer et al., 2000). Schliesslich sind auch Clathrin und der Clathrin Adaptor EpsinR für den retrograden Transport des MPR300 aus frühen und Recycling-Endosomen wichtig (Saint-Pol et al., 2004). Zusammenfassend wird vermutet, dass der retrograde Transport der MPR300 über Clathrin-beschichtete Vesikel, die die Adaptoren AP-1, EpsinR und PACS-1 enthalten, erfolgt (Bonifacino und Rojas, 2006).

Eine weitere Komponente des retrograden Transportes des MPR300 ist der heteropentamere Retromerkomplex, der aufgrund von Homologien zu Proteinen aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* mit vakuolärer Protein-Sortierungsfunktion (Vps) identifiziert wurde. (Arighi et al., 2004). Der Retromerkomplex besteht aus den fünf Untereinheiten hVps26p, hVps29p, hVps35p und den Sorting-Nexinen Snx1 und Snx2. Retromerkomplexe sind in tubulär-vesikulären Strukturen der frühen Endosomen und reifenden späten Endosomen lokalisiert (Arighi et al., 2004). Die Interaktion des Komplexes mit der zytosolischen Domäne des MPR300 wird durch die Vps35p-Untereinheit vermittelt, die an die Aminosäuren 48-100 der MPR300-CT bindet (Abb. 1; Arighi et al., 2004). Die Retromer-Bindungsstelle überlappt weder mit dem C-terminalen saure Cluster/Di-Leucin-Sortierungsmotiv für den GGA-abhängigen anterograden Transport (^{157}DDSDEDLL^{164}) noch mit dem Internalisierungsignal (Y^{26}SKV^{29}) für die Endozytose der MPR300.
Verschiedene Untersuchungen belegen die funktionelle Bedeutung der MPR300-Retromer-Wechselwirkung *in vivo* (Arighi et al., 2004, Seaman, 2004*)*. Die Reduzierung der endogenen Vps26p-Expression durch RNA-Interferenz führt zum Abbau der MPR300-Rezeptoren im Lysosom, einer Erniedrigung der zellulären Aktivitäten der lysosomalen Enzyme β-Glucuronidase und β-Hexosaminidase um 25% und einem Anschwellen der Lysosomen (Arighi et al., 2004). Der Retromerkomplex verhindert offensichtlich den Transport des MPR300 in späte endosomale Kompartimente, die mit den Lysosomen verschmelzen können.

Für zwei weitere zytosolische Proteine, TIP 47 und rab9, wird eine Beteiligung beim retrograden Transport des MPR300 diskutiert (Bonifacino und Rojas, 2006). So inhibieren sowohl die Expression einer dominant negativen rab9-Mutante mit defizienter GTPase-Aktivität, als auch die Depletion von TIP47 den retrograden Transport des MPR300 *in vivo* (Riederer et al., 1994, Diaz und Pfeffer, 1998). TIP47 interagiert *in vitro* mit einem komplexen Sortierungssignal der MPR300-CT, das die Aminosäurereste 48-74 umfasst (Abb. 1; Orsel et al., 2000). Die Bindung von GTP-gebundenem rab9 an TIP47 erhöht die Affinität zum MPR300 *in vitro* um den Faktor 3 (Carroll et al., 2001).

3.4.3. Internalisierung der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren an der Plasmamembran

Circa 3-20% der Gesamtzahl an MPR300 sind an der Plasmamenbran lokalisiert, die entweder aus einer Fehlsortierung der MPRs im TGN (Lin et al., 2004), durch Recycling aus früh- (Tikkanen et al., 2000) oder spätendosomalen Kompartimenten (Riederer et al, 1994) resultiert. Die Internalisierung der MPRs an der Plasmamembran und die Verpackung in Clathrin-beschichtete Vesikel wird durch den heterotetrameren zytosolischen Adaptor-Komplex AP-2 vermittelt (Abb. 2), der aus zwei grossen Untereinheiten (α und β2; jeweils 100 kDa), einer mittleren μ2 (50 kDa) und einer kleinen σ-2 Untereinheit (20 kDa) zusammmengesetzt ist (Robinson, 2004). AP-2 interagiert einerseits mit dem Tyrosin-haltigen Internalisierungsmotiv des MPR300 und andererseits mit dem Hüllprotein Clathrin und vermittelt die Abschnürung von MPR-haltigen Clathrin-beschichteten Vesikeln an der Plasmamembran. Die μ-Untereinheit des AP-2-Komplexes interagiert *in vitro* mit dem YSKV-Internalisierungssignal des MPR300-Rezeptors (Ohno et al., 1995). Die Bindung von M6P-haltigen Liganden an die MPR300 der Zelloberfläche kann eine effizientere Internalisierung der Rezeptoren bewirken. So wird nach nach Bindung von β-Glucuronidase an die luminale Domäne der MPR300 eine Steigerung der Rezeptorinternalisierung beschrieben, die wahrscheinlich durch Konformationsänderung eine effizientere Präsentation des Internalisierungssignals in der zytosolischen Domäne induziert (York et al., 1999).
An der Plasmamembran lokalisierte MPR300 sind für die Internalisierung von verschiedenen Liganden verantwortlich. An der Zelloberfläche bindet der MPR300 bei neutralem pH sowohl Mannose-6-Phosphat-haltige Liganden, wie lysosomale Enzyme, den TGF-β1 Precursor, Proliferin und Granzyme B (Hille-Rehfeld, 1995) als auch auch Liganden, die keine M6P-Reste tragen, wie der Insulin like Growth Factor II, Retinsäure, der Urokinase Plasminogen-Aktivator Rezeptor und Plasminogen (Braulke, 1999).

3.4.4. Fragestellung/ Zielsetzung

In Vorarbeiten wurde in einem „Hefe Two-Hybrid“ Screen mit einer humanen HeLa cDNA-Bibliohek ein unbekanntes 66 kDa Protein (p66) identifiziert, dessen C-terminale Domäne mit der zytoplasmatischen Domäne des 300 kDa Mannose 6-Phosphat-Rezeptors interagiert. Zur weiteren Charakterisierung des p66 und zur Verifizierung der Protein-Protein-Interaktion durch Kopräzipitationsexperimente wurde ein polyklonales Antiserum gegen die C-terminale p66-Domäne generiert.

Zunächst sollte die Spezifität des generierten p66-Antiserums durch verschiedene biochemische und zellbiologischen Methoden, wie Western-Blot-Analyse, Immunpräzipitation, subzelluläre Fraktionierung und Doppel-Immunfluoreszenzmikroskopie, untersucht und die experimentellen Versuchsbedingungen für verschiedene Zelllinien etabliert werden. Auf Grundlage dieser Arbeiten sollte dann mit dem p66-Antiserum das Molekulargewicht, die endogene Expression in verschiedenen Zelllinien und Geweben sowie die subzelluläre Lokalisation des unbekannten p66 analysiert werden. Damit sollte ein geeignetes Zellkulturmodell etabliert werden, das die Untersuchung der Lokalisation und Funktion von p66 erlaubt.

Anschließend sollten mit geeigneten Expressionskonstrukten stabil und transient transfizierte Zelllinien etabliert werden, um die subzelluläre Lokalisation noch genauer und posttranslationale Modifikationen von p66 durch biochemische Methoden zu analysieren.

Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf Untersuchungen, die die Bedeutung von p66 für den MPR-vermittelten intrazellulären Transport lysosomaler Enzyme, die intrazelluläre Lokalisation und Verteilung des MPR300 zum Inhalt hatte. Dabei interessierte besonders die Frage, ob die Überexpression von p66 die intrazelluläre Verteilung des MPR verändert, da anzunehmen war, dass die Wechselwirkung mit p66 die sortierungsspezifische Interaktion mit anderen zytoplasmatischen Adaptorproteinen wie AP-1, AP-2 oder GGAs verhindert.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Radioaktive Substanzen

[^{35}S]-Methionin, 100 Ci/mmol Amersham-Buchler, Braunschweig

[^{125}J]-Natriumjodid, 100 mCi/ml Amersham-Buchler, Braunschweig

4.1.2. Antikörper

Primärantikörper

Antigen	***immunisierte Spezies Bezeichnung***	***Aufbereitung***	***Referenz***
p66, human	Kaninchen, polyklonal	IgG-Fraktion	S. Storch, unveröffentlicht
p66, human	Kaninchen, polyklonal	Serum	S. Storch, unveröffentlicht
MPR300, human	Kaninchen, polyklonal	Serum	Körner et al., 1995
Cathepsin D, human	Kaninchen, polyklonal	Serum	Hasilik et al., 1980
GFP, Aequorea victoria	Maus, monoklonal	Serum	Clontech, Palo Alto CA, USA
c-Myc	Kaninchen, polyklonal	Serum	Santa Cruz, Heidelberg
Protein Disulfid-Isomerase (PDI)	Maus, monoklonal	affinitätsgereinigt	Stressgen, Victoria, Canada
cis Golgi Marker GM130	Maus, monoklonal	affinitätsgereinigt	Transduction Laboratories, Lexington KY, USA
LAMP1 (Klon UH-	Maus, monoklonal	Hybridoma	University of

1, Hamster		Überstand	Iowa, Hybridoma facility, USA
LAMP1 (Klon H4A3), human	Maus, monoklonal	Hybridoma-Überstand	University of Iowa Hybridoma facility, USA
LAMP2 (Klon H4B4), human	Maus, monoklonal	Hybridoma-Überstand	University of Iowa Hybridoma facility, USA
c-Myc (Klon 9E10)	Maus, monoklonal	affinitätsgereinigt	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Sekundärantikörper

Ziege anti-Kaninchen IgG, Meerettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Schaf anti-Maus IgG konjugiert mit Cy 3	Sigma, Deisenhofen
Schaf anti-Kaninchen IgG konjugiert mit Cy 3	Sigma, Deisenhofen
Schaf anti-Maus IgG konjugiert mit FITC	Sigma, Deisenhofen
Ziege anti-Kaninchen IgG konjugiert mit FITC	Sigma, Deisenhofen

4.1.3. Vektoren

pcDNA 3.1.D-V5-His-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA 6.2-V5-GW/D-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
pGEM-T-easy	Promega, Madison, USA
pCR-Blunt II-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
pSPUTK	Stratagene, La Jolla, USA
pHH	Hasilik, unveröffentlicht

4.1.4. Bakterienstämme

Zur Amplifikation von DNA in Prokaryonten wurden folgende Stämme von *E. coli*- Bakterien verwendet:

DH5α (Genotyp: F´/*end*A1, *hsd*R17(r_K^-,mK^+), *sup*E44, *thi*-1, *rec*A1, *gyr*A, ($Na1^r$), *rel*A1, D(*lac*ZYA-*arg*F)$_{U169}$, (j80*lac*ZDM15))

TOP10 (Genotyp: F^- *mcrA* Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *deo*R *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G)

4.1.5. Medien zur Anzucht von Bakterien

LB-Medium:

10 g	Bacto-Trypton
5 g	Bacto-Hefe Extrakt
5 g	NaCl

wurden in 800 ml A. dest. gelöst, auf pH 7,5 eingestellt, anschließend mit A. dest. auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.

LB-Ampicillin-Platten: Zur Bakterienanzucht wurde dem LB-Medium Agar in einer Endkonzentration von 1,5% zugesetzt. Nach Autoklavieren und Abkühlen auf 50 °C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugefügt. Das Nährmedium wurde in Petrischalen (∅: 9 cm) gegossen, bei Raumtemperatur abgekühlt und anschließend bei 4 °C unter Lichtauschluß gelagert.

4.1.6. Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen p66

Zur Generierung eines spezischen Antikörpers gegen p66 wurden die C-terminalen 205 Aminosäuren von p66 als 50 kDa GST-Fusionsprotein im *Escherichia coli*-Stamm BL21 exprimiert und das affinitätsaufgereinigte Fusionsprotein zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Das Antiserum wurde über eine Affi-Gel-Matrix, an die das GST-Fusionsprotein kovalent gebunden wurde, aufgereinigt. Das affinitätsgereignigte IgG Antiserum wurde für Western-Blot-Analysen, Immunpräzipitationen, Kopräzipitationsanalysen und Immunfluoreszenz-Untersuchungen verwendet.

4.1.7. Zelllinien

Zelllinie:	Beschreibung:	Referenz:
HeLa	Epithelzelllinie aus humanem Cervix-Karzinom	Scherer et al., 1953
MCF7	Epithelzelllinie aus humanem Mamma-Adenokarzinom; ATCC-Nr. HTB 22	J. Nat. Cancer Inst., 1973
HEK 293	Humane embryonale Nierenfibroblasten	Graham et al., 1977
BHK-MPR 300 A	Baby Hamster Nierenfibroblasten; stabil transfiziert mit humaner MPR 300 cDNA	Damke et al., 1991
BHK-21	Baby Hamster Nierenfibroblasten	Mac Pherson & Stoker, 1962
CHO	V5 Chinesische Hamster Ovarien	Puck et al., 1958

4.1.8. Zellkulturmedien und Lösungen zur Arbeit mit eukaryonten Zellen

Dulbeccos (DMEM)	GIBCO/BRL, Eggenstein
Glutamax	GIBCO/BRL, Eggenstein
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA, Parsching
Trypsin/EDTA-Lösung	GIBCO/BRL, Eggenstein
OptiMEM	Invitrogen, Karlsruhe

<u>Antibiotika:</u>

Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) (10 000 U bzw. 10000 µg/ml)	Seromed/Biochrom, Berlin
Ampicillin (25 mg/ml in H_2O)	Serva, Heidelberg

4.1.9. Häufig verwendete Puffer

PBS:	150	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	4,3	mM	Na_2HPO_4 x 7 H_2O
	1,4	mM	KH_2PO_4, pH 7,4
PBS-Tween (PBS-T):	0,05 %		Tween 20 in PBS

TBS:	150 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCl, pH 7,4

4.2. Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Sequenzierungsprimer

T 7	(5'→ 3')	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G
BGA-rev	(5'→ 3')	TAG AAG GCA CAG TCG AG
M13-for	(5'→ 3')	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13-rev	(5'→ 3')	CAG GAA ACA GCT ATG AC
SP6	(5'→ 3')	GAT TTA GGT GAC ACT ATA G
TK polyA-rev	(5'→ 3')	CTT CCG TGT TTC AGT TAG C
lambda gt-11 for	(5'→ 3')	GGC GAC GAC TCC TGG AG
lambda gt-11 rev	(5'→ 3')	ACT GGT AAT GGT AGC GA

4.2.2. Primer zur Amplifikation der p66-Myc cDNA

M1-for	(5'→ 3')	C ACC ATG GCC GCG GCG GTG GCG GTG
M28-for	(5'→ 3')	C ACC ATG ATC TGG GAC TTC ACC GAA C
P66-Myc rev	(5'→ 3')	TCA CAG ATC CTC TTC TGA GAT GAG TTT TTG CGA GTC TCT CTC TTT TTT CAC

4.2.3. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette gegen TE bzw. A. dest. im Biophotometer von Eppendorf gemessen. Eine OD260 von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA und 31 µg/ml Oligonukleotide.

4.2.4. Reinigung von DNA-Fragmenten mit QIAquick-Säulen

Gemäß Gebrauchsanweisung des Herstellers Qiagen.

4.2.5. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Reaktionsansatz:		
	x µg	DNA
	2 µl	10 x Puffer (nach Herstellerangabe)
	2 *x*	Restriktionsendonuklease
	ad 20 µl	A. dest.

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend ein Aliquot im Agarosegel analysiert. Präparative Spaltungen wurden in größeren Volumina und mit entsprechend größerer Enzymmenge durchgeführt. Als Reaktionspuffer wurde das New England Biolabs (NEB) Puffer-System verwendet. Diese Puffer werden vom Hersteller als 10 x konzentrierte Stammlösungen zusammen mit den Enzymen geliefert.

4.2.6. Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

4.2.6.1. Präparation von „kompetenten“ *E. coli*-Zellen

Lösungen:	TfbI:		
		100 mM	RbCl
		50 mM	$MnCl_2$
		30 mM	KAc
		10 mM	$CaCl_2$
		15 % (v/v)	Glyzerin
		pH 5,8	mit Essigsäure (0,2 M) eingestellt
	TfbII:		
		10 mM	MOPS
		10 mM	RbCl
		75 mM	$CaCl_2$
		15 % (v/v)	Glyzerin
		pH 7,0	mit NaOH eingestellt

TfbI und TfbII wurden jeweils frisch angesetzt und sterilfiltriert. 5 ml LB-Medium wurde mit einer Kolonie *E. coli* DH5α von einer Stammplatte (LB-Agarplatte, ohne Ampicillin) angeimpft und auf dem Drehrad bei 37°C bis zu einer OD550 von 0,3 inkubiert. Mit 2 ml dieser Vorkultur wurden 200 ml LB-Medium in einem 1 l Schüttelkolben mit Schikane angeimpft und 2 bis 2,5 h unter starkem Schütteln (300 Upm) auf dem Reziprokschüttler bis zu einer OD550 von 0,3 bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 10 min in Eiswasser unter Schwenken abgekühlt und in JA-10 Zentrifugenbechern 5 min bei 3.000 Upm (Beckman-Zentrifuge, 4°C) zentrifugiert. Die Pellets wurden in 30 ml TfbI (4°C) resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in 4 ml TfbII resuspendiert und in Aliquots von je 420 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

4.2.6.2. Transformation kompetenter Zellen

200 µl kompetente Zellen (*E. coli DH5α* oder *TOP10*) wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 ng Vektor-DNA bzw. einem Ligationsansatz gemischt. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock von 2 min bei 42 °C. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 0,8 ml LB-Medium zugegeben und der Ansatz für 60 min bei 37 °C auf dem Drehrad inkubiert.
Anschließend wurden 50 bis 150 µl des Transformationsansatzes auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte, die 100 µg/ml Ampicillin enthielt, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit den erhaltenen Kolonien wurden 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft. Diese Vorkultur wurde für Plasmid-Präparationen und zum Anlegen von Glyzerinkulturen verwendet.

4.2.6.3. Anlegen einer Glyzerinkultur

Vorkulturen mit einer OD260 von größer als 1 in LB-Medium wurden mit 0,25 Volumen 80% Glyzerin versetzt und bei -80 °C aufbewahrt. Aus der Glyzerinkultur kann direkt eine Vorkultur angeimpft werden.

4.2.6.4. Mini- und Midi-Präparation (Qiagen-Methode)

Es wurden der Qiaprep Miniprep und der Qiagen Midi Plasmid Kit nach Anleitung des Herstellers Qiagen verwandt.

4.2.6.5. Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden Agarosegele verwendet. Abhängig von der Fragmentgröße betrug die Agarosekonzentration 1% bis 2% (w/v). Die erforderliche Agarosemenge wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, pH 8,0) aufgekocht und nach dem Abkühlen auf etwa 55 °C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) versetzt. Die Lösung wurde in einen Gelträger gegossen und bei RT abgekühlt. Das erstarrte Gel wurde in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt, die Proben mit DNA-Auftragspuffer (Bromphenolblau, Glycerin) versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 3-4 V/cm durchgeführt. Durch das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht als Banden sichtbar. Die Dokumentation erfolgte mittels einer CCD-Kamera (Diana 1.6.).

4.2.6.6. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Es wurde der Qiaquick-Spin-Gel-Extraction Kit mit den zugehörigen Puffern der Firma Qiagen verwendet.

4.2.6.7. DNA-Amplifikation über Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode, um definierte DNA-Fragmente logarithmisch zu amplifizieren. Grundlage für die Automatisierung dieser Technik ist die Entdeckung und Isolierung einer thermostabilen DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums Thermophilus aquaticus (Taq) von Saiki et al. (1988). Die PCR basiert auf drei Schritten, die für jede DNA-Synthese nötig sind:

1. Denaturierung der Ausgangs-DNA (Template) in Einzelstränge
2. Annealing = Bindung von Oligonukleotid-Primern an beide Einzelstränge
3. Extension = Synthese der DNA, ausgehend von den gebundenen Primern.

Faktoren, die den Erfolg einer PCR beeinflussen können, sind die Auswahl und Konzentration der Oligonukleotid-Primer, Template-Qualität, Pufferbedingungen, die Zeiten und die Temperaturen der Zyklusschritte.
Als Template wurde DNA verwendet, die mit der Plasmid-Präparation nach Qiagen gewonnen wurde. Die Taq-Polymerase wurde zusammen mit dem 10 x Puffersystem und dem Ultrapure-dNTP-Set von der Firma Pharmacia bezogen. Das dNTP-Set wurde von je 100 mM je Nukleotid auf 10 mM verdünnt (dNTP-Mix).

PCR-dNTP-Mix:	je 10 mM	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
10 x PCR-Puffer:	800 mM	Tris/HCl, pH 8,9
	200 mM	$(NH_4)_2SO_4$
	50 mM	$MgCl_2$

Taq DNA Polymerase (2,5 U/µl)

In jeder PCR wurden zwei Kontrollen mitgeführt, um die verwendeten Lösungen auf Kontaminationen zu untersuchen. Es wurde jeweils eine Probe ohne Template und eine Probe ohne Primer angesetzt. In beiden Kontrollen darf kein PCR-Fragment entstehen. Die Oligonukleotide für die PCR und für die Sequenzanalysen wurden von der Firma MWG-Biotech (München) synthetisiert.

4.2.6.8. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) im Institut für Zellbiochemie und Neurobiologie des Universitätsklinikums Eppendorf auf einem ABI PRISM-3100 Sequenzer durchgeführt.

4.3. Zellbiologische Methoden

4.3.1. Kultivierung von Zellen

Die Zellen wurden in 5%-iger CO_2-Atmosphäre und 85% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Medien und Lösungen wurden auf 37 °C vorgewärmt, wenn nicht anders angegeben. Die verwendeten Zelllinien wurden in DMEM, 10% FKS, 1 x Penicillin/Streptomycin kultiviert.

4.3.2. Trypsinieren von Zellen

Der Zellrasen wurde mit PBS gespült, um Trypsininhibitoren des FKS zu entfernen. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen ca. 1-2 min mit Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert. Die Ablösung der Zellen wurde im inversen Mikroskop kontrolliert. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit der Pipette vereinzelt und gegebenenfalls die Zellzahl pro Milliliter mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in der gewünschten Dichte ausgesät.

4.3.3. Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen

Zur Konservierung wurden konfluent wachsende Zellen, z. B. eine 25 cm^2-Flasche trypsiniert, in Medium aufgenommen und für 5 min bei 1.000x g in der Heraeus Labofuge GL sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 7 ml Einfriermedium aufgenommen und auf sieben Einfrierröhrchen verteilt. Die Zellen wurden zunächst bei -80°C ü. N. eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.
Zur Revitalisierung wurde das Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank genommen, zunächst für ca. 1 min bei RT angewärmt und anschließend im Ethanolbad bei 37 °C aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellsuspension wurde entnommen, in 10 ml kaltes Medium (4 °C) überführt und 5 min bei 1.000x g sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml Medium ohne Selektionsantibiotika resuspendiert und in

eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um DMSO-Reste, tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen sowie gegebenenfalls Selektionsantibiotika einzuführen.

4.3.4. Transfektion von Zellen mit Lipofectamine 2000

Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion in einer Dichte von 4,8 x 10^5 Zellen auf 35 mm Zellkulturschalen ausplattiert. 4 µg der Expressions-cDNA wurden mit OptiMEM in einem Gesamtvolumen von 200 µl gelöst, gemischt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Parallel wurden 8 µl Lipofectamine in einem Gesamtvolumen von 200 µl OptiMEM gelöst. Die beiden Lösungen wurden gemischt, für 20 Minuten bei RT inkubiert und die Transfektionsmischung auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden in Antibiotika-freiem Medium für 24 Stunden inkubiert, das Transfektionsmedium entfernt und durch 2 ml DMEM, 10% FKS; 1% Penicillin/ Streptomycin ersetzt. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden Zellen unter gleichen Bedingungen mit der pGFPN1-cDNA transfiziert und die Anzahl der GFP exprimierenden Zellen am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axiovert S100) analysiert. Aus der Anzahl der GFP-positiven Zellen wurde die Transfektionseffizienz [in %] abgeschätzt. Für Zellkulturschalen anderer Grössen bzw. 24- oder 96-Well-Platten wurden die Mengen an eingesetzter DNA und die Volumina der Transfektionsreagenzien entsprechend der Oberflächen angepasst.

4.3.5. Herstellung von stabilen Zelllinien

Zur Herstellung von stabilen Zelllinien wurde der Expressionsvektor mit Restriktionsendonukleasen zunächst linearisiert und anschließend HEK293-Zellen (35 mm Platte) wie unter 3.3.4. beschrieben transfiziert. 24 Stunden nach Beginn der Transfektiion wurde das Transfektionsmedium abgenommen und die Zellen für weitere 24 Stunden in DMEM, 10% FKS, 1 x Pen/Strep inkubiert. 48 Stunden nach Transfektionsbeginn wurden stabil exprimierende Zellen durch Zugabe von 200 µg/ ml Geneticin (G418) selektioniert. Die Konzentration des G418 wurde jeweils nach 48 Stunden um 200 µg/ml G418 bis auf eine Endkonzentration von 800 µg/ml erhöht. Nach 14 Tagen wurden Einzelklone gepickt, in 24 Well Platten überführt und die Biosynthese des überexprimierten Proteins durch Western-Blot-Analyse getestet. Stabil exprimierende Zellklone wurden in DMEM, 10% FKS und 500 µg/ ml G418 inkubiert.

4.3.6. Herstellung von postnukleären Überständen

Homogenisierungspuffer:	250 mM	Saccharose
	10 mM	Tris/HCl pH 7,4
	1 mM	EDTA
	1 x	Inhibitor Cocktail

Konfluent gewachsene Zellen auf, z. B. einer 35 mm Platte, wurden auf Eis zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in 1,5 ml PBS abgeschabt und für 5 Minuten bei 1000 x g 4 °C in der Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 250 µl Homogenisierungspuffer resuspendiert und anschließend die Zellen durch 30 Hübe im Dounce-Homogenisator aufgeschlossen. Das Homogenat wurde für 5 min bei 1.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der postnukleäre Überstand wurde vom Pellet (Kerne, Zelldebris) abgenommen und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.

4.3.7. Herstellung von Zellhomogenaten

TX-100-Lysispuffer:	50 mM	Tris pH 7,4
	1 %	TX-100
	1 mM	EDTA
	1 x	Inhibitor Cocktail (aus 50 x Stocklösung)

Konfluent gewachsene Zellen auf, z. B. einer 35 mm Platte, wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 1,5 ml PBS abgeschabt und anschließend für 5 min bei 1000 x g 4 °C in der Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 200 µl TX-100-Lysispuffer resuspendiert und für 30 min auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert: Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm bei 4 °C wurden die Überstände abgenommen und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.

4.3.8. Subzelluläre Fraktionierung durch Ultrazentrifugation

Zur Auftrennung von Zellhomogenaten in zytosolische und Membran-Fraktionen intrazellulärer Organellen (ER, Golgi, Mitochondrien, Endosomen, Lysosomen, Plasmamembranen) wurden Zellen einer 6 cm-Platte in 500 µl Homogenisierungspuffer abgeschabt und die Zellen im Dounce-Homogenisator (30 Hübe) homogenisiert. Nach Abtrennung der Kerne (3.3.6) wurde der PNS für 1 Stunde bei 100.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die zytosolische Fraktion (Überstand) wurde abgenommen und das Pellet

(Gesamt-Membran-Fraktion) in TX-100 Lysispuffer resuspendiert. Zytosolische und Membran-Fraktionen wurden anschließend für Western-Blot-Analysen verwandt.

4.3.9. Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Doppel-Immunfluoreszenz Mikroskopie von p66 und subzellulären Markerproteinen in transient transfizierten CHO und COS7-Zellen erfolgte nach PFA-Fixierung wie bei Storch et al. (2004) beschrieben. Die Primär-Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen in 1 x PBS/ 1% BSA eingesetzt: anti-p66 (Verdünnung: 1:100), anti-Myc (1:100), anti-LAMP2 (1:50), anti-Protein Disulfid Isomerase (1:800) und anti-GM130 (1:100) und anti-MPR300 (1:100). Die Sekundärantikörper wurden wie folgt eingesetzt: anti-rabbit FITC (Verdünnung: 1:100) und anti-mouse Cy3 (1:2.000). Zur Anfärbung des Kernkompartimentes wurden die Zellen nach nach Waschen mit PBS für 5 Minuten mit DAPI (1 µg/ml in DMSO; Molecular Probes) inkubiert.

4.3.10. Bestimmung der Endozytoserate von [^{125}J]-Arylsulfatase B

Die Analysen der Endozytoserate von [^{125}J]- Arylsulfatase B (ASB) erfolgte nach Muschol et al. (2002).

4.3.11. Bestimmung der MPR300-Rezeptorexpression an der Zelloberfläche

Konfluent gewachsene BHK-Zellen (35 mm Platten), die den humanen MPR300 stabil exprimieren, wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend für 1 Stunde mit MEM, das 0,1% BSA; 20 mM HEPES pH 7,2 enthielt, in Gegenwart und Abwesenheit (+/-) des Detergenz Saponin (0,1%) inkubiert. Anschließend folgte die Antikörperbindung in dem gleichen Medium (+/- Saponin) bei 4°C für 2 Std. Dabei wurden pro Platte ca. 50 ng (ca. 200.000 cpm/Platte) eines [^{125}J]-markierten monoklonalen Antikörpers gegen den humanen MPR300 (2C2, Braulke et al., 1987) angeboten. Die ^{125}J-2C2 Bindung in Abwesenheit von Saponin entspricht der Bindung am MPR300 an der Zelloberfläche. Die Antikörperbindung in Anwesenheit von Saponin spiegelt die Gesamtzahl an zellulärem MPR300 wider.
Nach Ablauf der Bindungszeit wurden nicht gebundene Antikörper entfernt, indem die Zellen fünfmal mit kalter PBS in An- bzw. Abwesenheit von Saponin gewaschen wurden. Zur Bestimmung der gebundenen Radioaktivität wurden die Zellen in 1 ml 1N NaOH lysiert und für 1 min im γ-Szintillationszähler gemessen.

4.4. Biochemische Methoden

4.4.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Lowry (1951) oder Bradford (1976) mit BSA als Standard.

4.4.2. Metabolische Markierung von Zellen mit [^{35}S]-Methionin

Metabolische Markierungen von Zellen mit [^{35}S]-Methionin wurde wie bei Muschol et al. (2002) beschrieben, durchgeführt. Für Pulse-Chase Analysen wurden die Zellen mit 100 µCi [^{35}S]-Methionin/ 35 mm Platte in einem Volumen von 800 µl für 1 Stunde markiert.

4.4.3. Immmunpräzipitation von Cathepsin D

Die Immunpräzipitation von Cathepsin wurde nach Muschol et al. (2002) durchgeführt.

4.4.4. Enzymatische Abspaltung von *N*-verbundenen Oligosaccharidketten mlt PNGase F

Lysispuffer B:	100 mM	Na-P_i, pH 7,4
	0,2 %	SDS
	1 x	Inhibitor Cocktail

Transient transfizierte Zellen einer 35 mm-Platte wurden zweimal mit PBS gewaschen, in 1,5 ml PBS abgeschabt und für 5 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zell-Pellets in 200 µl Lysispuffer B aufgenommen, für 10 sek mit Ultraschall behandelt und in zwei Aliquots von 100 µl aufgeteilt. Nach Zugabe von β-Mercaptoethanol (Endkonzentration: 1%) wurden die Proben für 5 min bei 95 °C gekocht. Nach Zugabe von NP-40 (Endkonzentration: 1%) wurden die Proben mit 1 µl PNGase F (1U/ µl) bzw. 1 µl Wasser versetzt und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Nach dem Solubilisieren im SDS-PAGE Puffer wurden die Proben durch SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und im Western Blot analysiert.

4.4.5. Dephosphorylierung von p66

Dephosphorylierungs-Puffer:	50 mM	Tris-Cl, pH 8,5
	0,1 mM	EDTA

Transient transfizierte Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, in 1,5 ml PBS abgeschabt und für 5 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Dephosphorylierungs-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden mit 5 Einheiten alkalischer Phosphatase versetzt und für 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in reduzierendem Auftragspuffer aufgenommen, durch Tris-Tricin SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und durch Western Blot analysiert.

4.4.6. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970)

Lösungen:	Trenngelpuffer:	1,5 M	Tris/HCl, pH 8,8
		0,4 %	SDS (w/v)
	Sammelgelpuffer:	0,5 M	Tris/HCl, pH 6,8
		0,4 %	SDS (w/v)
	Acrylamidlösung:	30 %	Acrylamid (w/v)
		0,8 %	Bisacrylamid (w/v)
	APS:	10 %	Ammoniumperoxodisulfat (w/v)
	Anodenpuffer:	50 mM	Tris/HCl
		192 mM	Glycin
			in A. dest., pH 6,8
	Kathodenpuffer:	1%	SDS (w/v)
		0,001 %	Bromphenolblau in Anodenpuffer
	2 x Probenpuffer:	250 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	(nicht reduzierend)	2 %	SDS (w/v)
		20 %	Glyzerin
	2 x Probenpuffer:	250 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	(reduzierend)	2 %	SDS (w/v)
		20 %	Glyzerin
		20 mM	DTT

Ansatz:

	Trenngel 10 %	Sammelgel 4 %
Acrylamidlösung (ml)	9,8	1,3
Trenngelpuffer (ml)	7,5	-
Sammelgelpuffer (ml)	-	2,5
10 % APS (µl)	250	100
TEMED (µl)	25	10
A. dest.	ad 30 ml	ad 10 ml

Die Elektrophorese wurde in einem System mit vertikalen Platten durchgeführt (Größe der Glasplatten: 160 mm x 18 cm, 1 mm Spacer). Das frisch gemischte Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und sofort mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Nach 30 min Polymerisation bei RT wurde das Butanol abgegossen, die Trenngeloberfläche mit Wasser gespült, das Sammelgel eingegossen und der Probenkamm eingefügt. Nach 20 min Polymerisation wurde der Probenkamm entfernt, die Probentaschen mit Wasser gespült und Gelreste aus den Taschen entfernt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit reduzierendem oder nicht reduzierendem Probenpuffer gemischt, 5 min bei 95 °C denaturiert, aufgetragen und mit Kathodenpuffer überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte mit 50 mA pro Gel bei 4 °C für 2-3 Stunden.

4.4.7. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Tricin

(Schagger H, 1987)

Lösungen:

Tris-SDS-Puffer:	3 M	Tris/HCl, pH 8,45
	0,3 %	SDS (w/v)
Acrylamidlösung:	30 %	Acrylamid (w/v)
	0,8 %	Bisacrylamid (w/v)
APS:	10%	Ammoniumperoxodisulfat (w/v)
Anodenpuffer:	0,2 M	Tris/HCl pH 8,9

Kathodenpuffer:	0,1 M	Tris/Base
	0,1 M	Tricin
	0,1 %	SDS

Ansatz:

	Trenngel 10 %	Sammelgel 4 %
Acrylamidlösung (ml)	9,8	1,62
Tris-SDS-Puffer (ml)	10	3,1
A. dest. (ml)	7,03	7,78
Glycerol	4,00 g	-
	Lösung entgasen	Lösung entgasen
APS (µl)	50	37,5
TEMED (µl)	25	7,5

Die Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE erfolgte wie unter 3.4.6 beschrieben.

4.4.8. Anfärbung von Proteinen mit Coomassie Blue

Fixierungslösung:	50 %	Methanol
	40 %	H_2O
	10 %	Essigsäure
Coomassie Blue-Färbelösung:	0,05 %	Serva Blue R in Fixierungslösung

Nach Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE wurde das Polyacrylamidgel in der Coomassie Blue-Färbelösung für 5 min gefärbt und ü. N. in Fixierungslösung entfärbt. Anschließend wurde das Gel für 20 min gewässert und getrocknet.

4.4.9. Western-Blot-Analyse

Nitrozellulose und 4 Filterpapierstücke wurden entsprechend der Gelgröße zugeschnitten und für 30 min in Transferpuffer getränkt. Der Blot wurde anschließend im Pufferbad luftblasenfrei wie folgt zusammengelegt:

Kathodenseite

durchlöcherte Plastikplatte
1 x Schaumstoff
2 x Filterpapier
Gel
Nitrozellulosemembran
2 x Filterpapier
1 x Schaumstoff
durchlöcherte Plastikplatte

Anodenseite

Transferpuffer:	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	20 %	Methanol

Der Transfer erfolgte in Abhängigkeit vom Molekulargewicht des zu transferierenden Proteins bei 4 °C für 2-3 Stunden (p66 und GFP) oder 5 Stunden (MPR 300) bei einer Stromstärke von 900 mA.

Nach erfolgter Übertragung der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran wie folgt behandelt:

Blocken:	1 Stunde in Blotto (5% Milchpulver in PBS-0,05% Tween 20 (PBS-T)) auf einer Wippe
1. Antikörper:	über Nacht bei 4°C auf einer Wippe
Waschen (RT):	1 x 10 min PBS
	3 x 10 min PBS-T
2. Antikörper:	1: 10.000 in PBS-T
Waschen (RT):	1 x 10 min PBS
	3 x 10 min PBS-T

ECL: 1 min

Exposition: 1 sek – 15 min

4.4.9.1. Immunodetektion von p66

1. Antikörper: anti-Human-p66 aus Kaninchen (1: 1.000 in Blotto)

2. Antikörper: anti-Kaninchen-IgG-Antiserum, HR-Peroxidase-gekoppelt aus Ziege, (1: 10.000 in PBS-T)

4.4.9.2. Immunodetektion von GFP

1. Antikörper: anti-GFP aus Kaninchen (1:500 in Blotto)

2. Antikörper: anti-Kaninchen-IgG-Antiserum, HR-Peroxidase-gekoppelt aus Ziege, (1: 10.000 in PBS-T)

4.4.9.3. Immunodetektion des MPR300

1. Antikörper: anti-human MPR300 aus Kaninchen (1 : 500 in Blotto)

2. Antikörper: anti-Kaninchen-IgG-Antiserum, HR-Peroxidase-gekoppelt aus Ziege, (1:10.000 in PBS-T)

5. Ergebnisse

5.1. Identifizierung und Analyse von p66-λ-cDNA-Klonen vollständiger Länge durch *in vitro* Translation

Zur Identifizierung eines vollständigen p66 cDNA-Klons wurde eine humane HeLa-λ-cDNA Bibliothek gescreent und drei λ-cDNA Klone (249-1, 249-2 und 249-3) mit verschiedenen cDNA-Längen zur Sequenzierung und weiteren Analyse ausgewählt. Während alle cDNA-Sequenzen ein Stopcodon enthielten und die 3' kodierenden Regionen identisch waren, unterschieden sich die cDNA-Längen der 5' nicht-translatierten Regionen (249-1= 32 bp; 249-2= 100 bp; 249-3= 100 bp). Zum Nachweis des offenen Leserahmens wurden die cDNA-Sequenzen der λ- Klone in den *in vitro*-Translationsvektor pSputk subkloniert.

Nach *in vitro*-Translation der cDNA-Klone 249-1, -2 und -3 in einem gekoppeltem i*n vitro* Transkriptions/ Translations-System in Abwesenheit von Mikrosomen mit [^{35}S]-markiertem Methionin wurden bei allen Klonen nach SDS-PAGE und Fluorographie zwei radioaktive Banden mit molaren Massen von 66 kDa und 60 kDa detektiert (Abb. 3A). Die schwächere 60 kDa-Bande resultiert möglicherweise aus dem Translationsstart an einem alternativen Start-Codon (Abb. 3B). Sequenzvergleiche der cDNA-Klone ergaben, dass alle drei cDNA-Klone im 5'-Sequenzbereich zwei ATG-Startcodons in den Sequenzbereichen 32-34 bp und 113-115 bp mit flankierender Kozak-Konsensussequenz enthielten (Abb. 3B). Bei Benutzung des 1. Startcodons resultiert ein Protein aus 587 Aminosäuren, bei Benutzung des 2. Startcodons ein Protein, dass aus 560 Aminosäuren besteht. Diese Experimente bestätigen, dass alle drei cDNA-Klone die vollständige kodierende p66-cDNA-Sequenz und zwei funktionelle ATG-Startcodons enthielten.

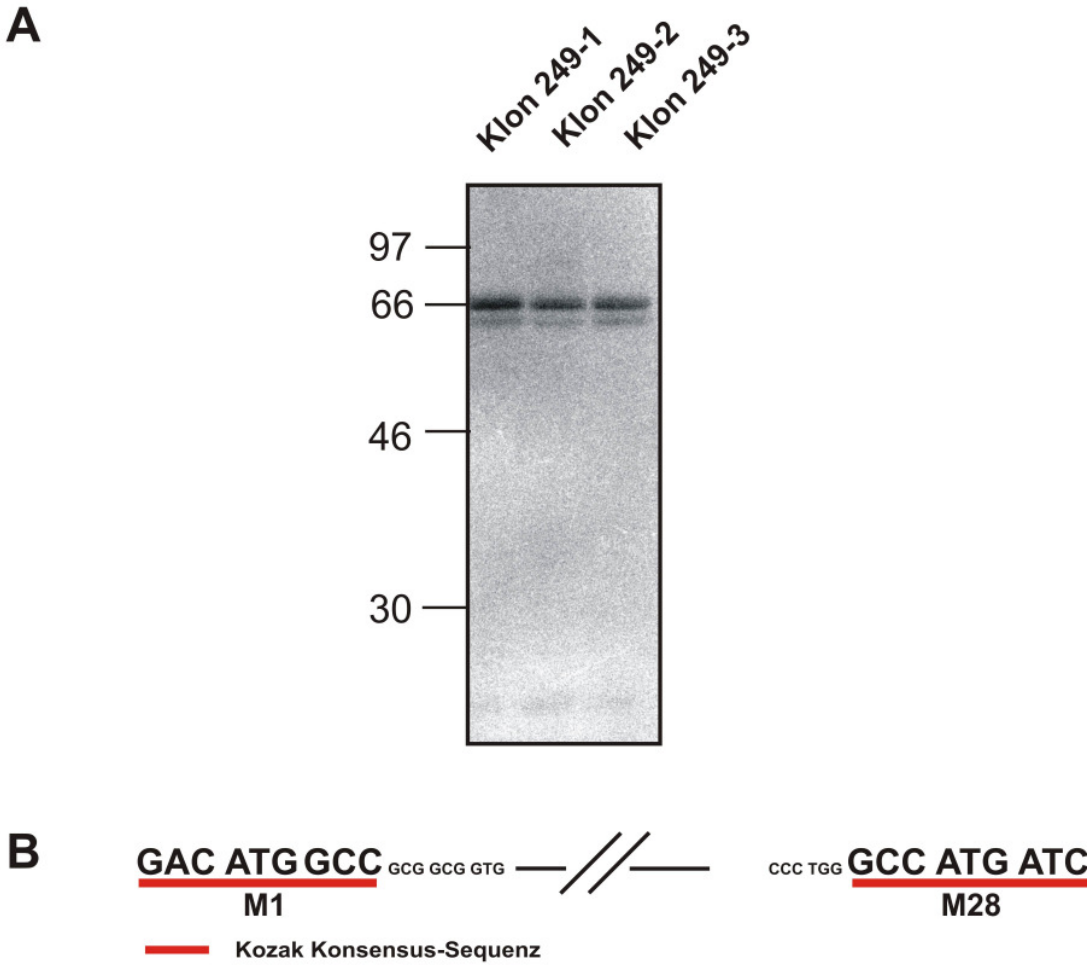

Abb. 3: *In vitro* Transkription und Translation der p66-cDNA. (A) Die cDNA-Klone 249-1, 249-2 und 249-3 wurden in einem Retikulozytenlysat *in vitro* transkribiert und die mRNA in Anwesenheit von [^{35}S]-Methionin für 90 Minuten bei 30 °C *in vitro* translatiert. Nach Solubilisierung wurde der gesamte Reaktionsansatz über SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine durch Fluorographie dargestellt. (B) Schematische Darstellung des 5' kodierenden Sequenzbereichs der p66 cDNA. Putative Translationsstart-Codons mit flankierender Kozak-Konsensus-Sequenz, die für Methionin M1 und M28 kodieren, sind rot unterstrichen dargestellt.

5.2 Protein-Sequenzanalyse des 66 kDa Proteins

Die p66-cDNA kodiert für ein Protein von 587 Aminosäuren mit einer errechneten molaren Masse von 61,1 kDa (Abb. 4). Im 5' translatierten Sequenzbereich der cDNA existieren zwei Startcodons mit angrenzender Kozak-Konsensus-Sequenz, die für die Translationsstart-Methionine M1 und M28 kodieren. Die Polypeptidsequenz enthält zwei putative *N*-Glykosylierungstellen in den Positionen Asn 345 und Asn 410 sowie ein putatives Kernlokalisierungssignal ^{356}KRKP^{359}, die in der homologen murinen Sequenz konserviert sind. Die humane und die murine p66 Proteinsequenz sind zu 83% identisch. Weitere Sequenzvergleiche in der Datenbank zeigten, dass p66 keine putativen Transmembrandomänen, keine Konsensussequenz für Prenylierung und keine N-terminale

Signalsequenz für den Import in das ER enthält. Weiterhin besitzt p66 einen N-terminalen Glutamin-reichen Sequenzabschnitt, der die Glutaminreste 94-98 umfasst (Abb. 4).

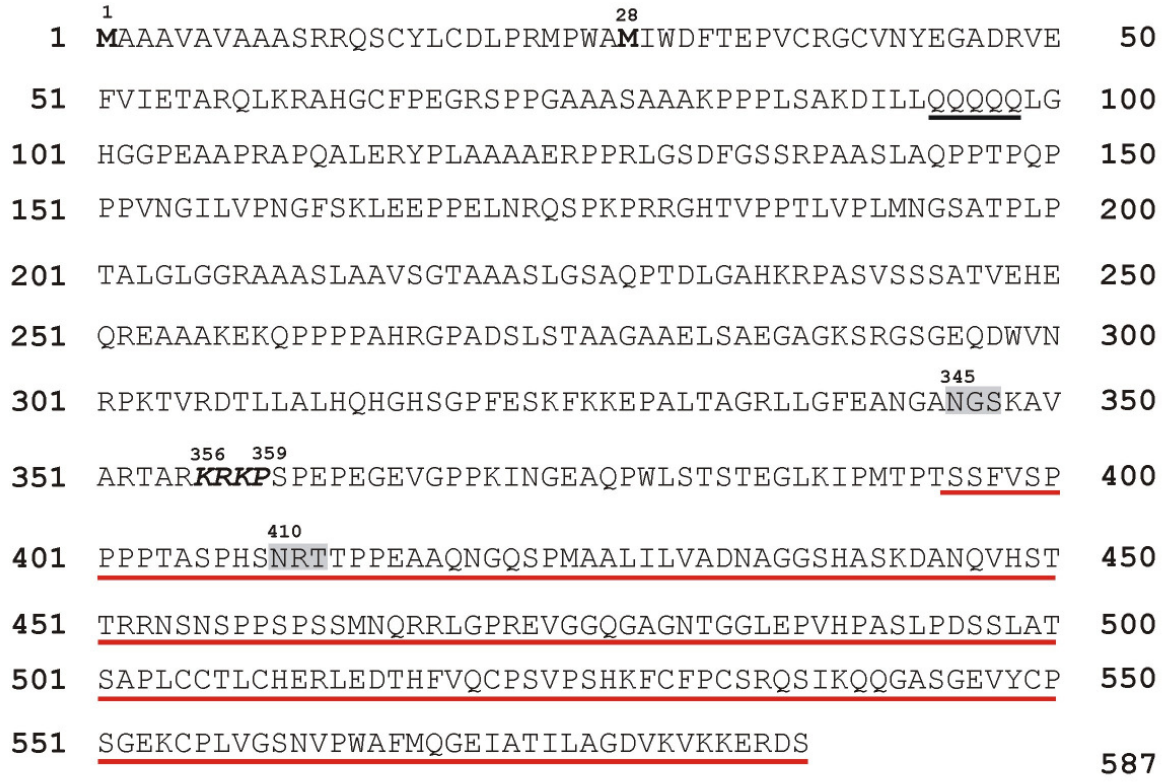

Abb. 4: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von p66. Die aus der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz von p66 ist im Einbuchstaben-Code dargestellt. Die Nummerierung der Aminosäuresequenz ist beginnend mit dem ersten Methionin links dargestellt. Die putativen Methionin Start-Codons M1 und M28 sind fett eingezeichnet. Ein putatives Kernlokalisierungssignal und die beiden *N*-Glykosylierungsstellen sind kursiv bzw. mit grauen Kästen hervorgehoben dargestellt. Der N-terminale Glutamin-reiche Sequenzabschnitt (Q94-Q98) ist schwarz unterstrichen. Die für die Antikörpergewinnung amplifizierte C-terminale Sequenz (S394- S587) ist rot unterstrichen.

5.3. Protein-Sequenzvergleich und homologe Domänen des p66

Ein Sequenzvergleich der isolierten p66 cDNA in einer Nukleotid-Datenbank (Gen-Bank; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) im Suchalgorithmus BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) ergab die Identität mit einer cDNA (Accession-Nr. NM_182972), die für das Interferon Regulatory Factor 2-Bindungsprotein 2A (IRF2-BP2A; Accession-Nr. NP_892017.1) von 587 Aminosäuren kodiert (Abb. 5; Childs und Goodbourn, 2003). Das *IRF2-BP2A Gen* ist auf Chromosom 1q42.3 lokalisiert. Proteinsequenzvergleiche im Suchalgorithmus BLAST ergaben sowohl im N als auch im C Terminus von p66 eine hohe Homologie (bis zu ca. 70%) zu den humanen Proteinen IRF2-BP2B, IRF2-BP1 und dem c14orf4, einem Poly-Glutamin-reichem Protein mit einer Länge des Polypeptides von 796 Aminosäuren (Accession-Nr. CAC10539), dessen Lokalisation und Funktion unbekannt sind (Rampazzo, 2000). Der Vergleich der Aminosäuresequenz des humanen mit dem murinen

p66 zeigt eine hohe Homologie im C-terminalen Bereich sowie einen verkürzten N-terminalen Bereich beim murinen p66.

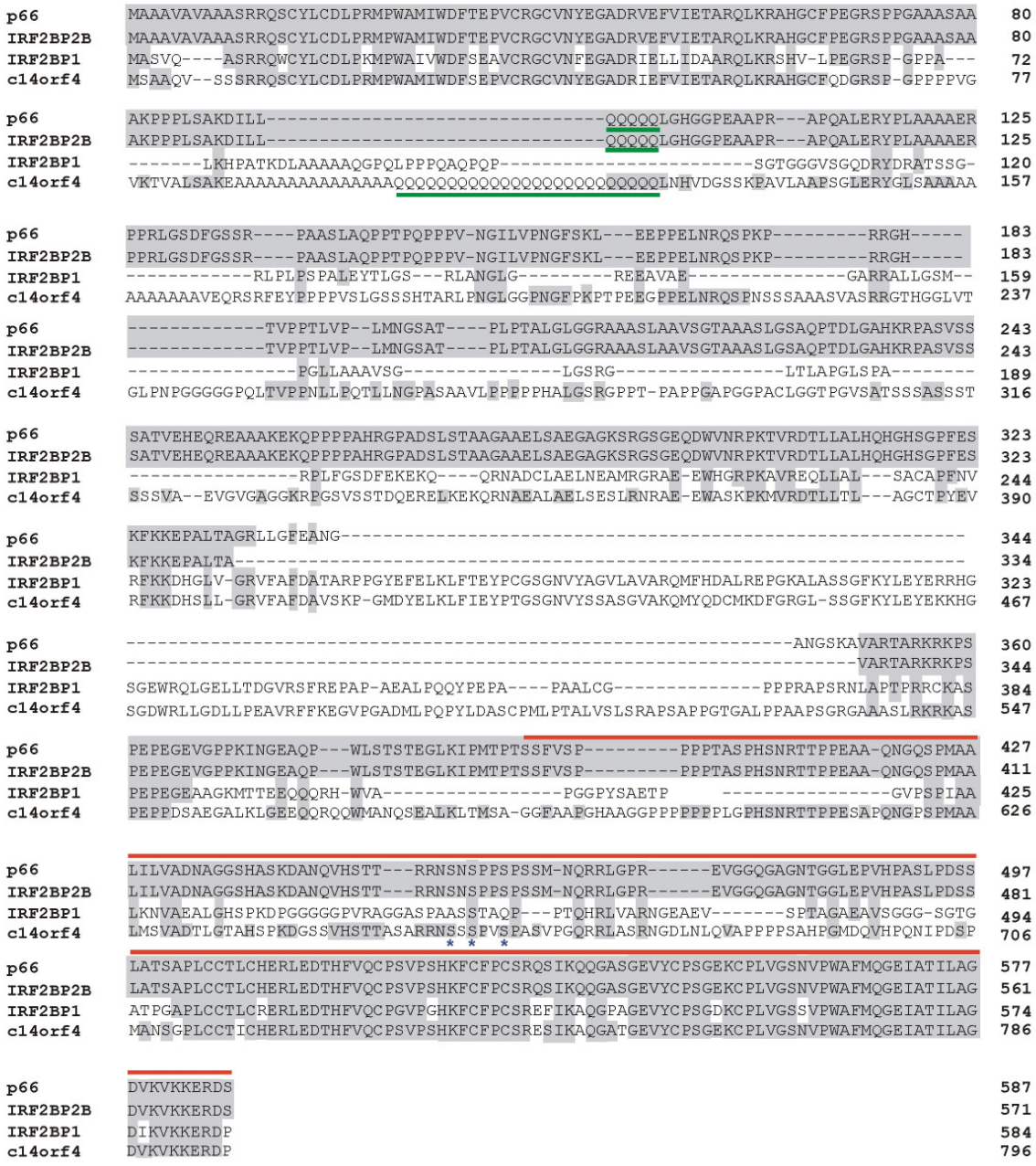

Abb. 5: Proteinsequenzvergleich von p66 (identisch mit IRF2-BP2A, Accession-Nr. NP_892017.1) mit den homologen humanen Proteinen IRF2-BP2B (Accession-Nr. AAP78945), IRF2-BP1 (Accession-Nr. NP_056464) und c14orf4 (Accession-Nr. NP_078772). Identische Aminosäuren sind mit grauen Kästen hervorgehoben. Glutaminreiche N-terminale Sequenzabschnitte sind grün unterstrichen. Phosphorylierte Serinreste in der c14orf4-Proteinsequenz sind mit blauen Sternchen gekennzeichnet. Der C-terminale p66-Sequenzbereich, der als GST-Fusionsprotein zur Generierung des polyklonalen Antiserums verwendet wurde, ist rot unterstrichen dargestellt. Die einzelnen Aminosäuren sind durch Zahlen links und rechts nummeriert. Die Länge der homologen Polypeptidsequenzen ist unten rechts dargestellt.

5.4. Untersuchungen zur endogenen Expression von p66 in humanen Zelllinien

Vorversuche ergaben, dass der gegen die C-terminale p66-Sequenz gerichtete Antikörper (Abb. 4) in HeLa-Zellen und humanen Haut-Fibroblasten immunoreaktive Proteine mit molaren Massen von 93 kDa in Homogenaten und von 55 kDa in zytosolischen Fraktionen detektierte (Storch, 1999).

Zur Identifizierung einer Zelllinie mit hoher endogener p66-Expression wurden Western-Blot Analysen an Homogenaten aus humanen Fibroblasten (0049), der Cervix-Carcinom Zelllinie HeLa S3 und der embryonalen Nieren-Zelllinie HEK293 durchgeführt. Alle Zelllinien zeigten eine starke Immunoreaktivität bei 93 kDa. Nur in HeLa-Zellen konnte zusätzlich eine schwache Bande bei 66 kDa nachgewiesen werden (Abb. 6, Pfeil). Bei dem 93 kDa-Protein handelt es sich möglicherweise um kreuzreagierendes c14orf4-Protein, dessen C-terminale Aminosäuresequenzen (Aminosäuren 584-796) zu 72% identisch ist mit den C-terminalen Aminosäuresequenzen (Aminosäuren 394-587) von p66 (Abb. 5). Die kalkulierte molare Masse des c14orf4-Translationsproduktes beträgt 82,7 kDa.

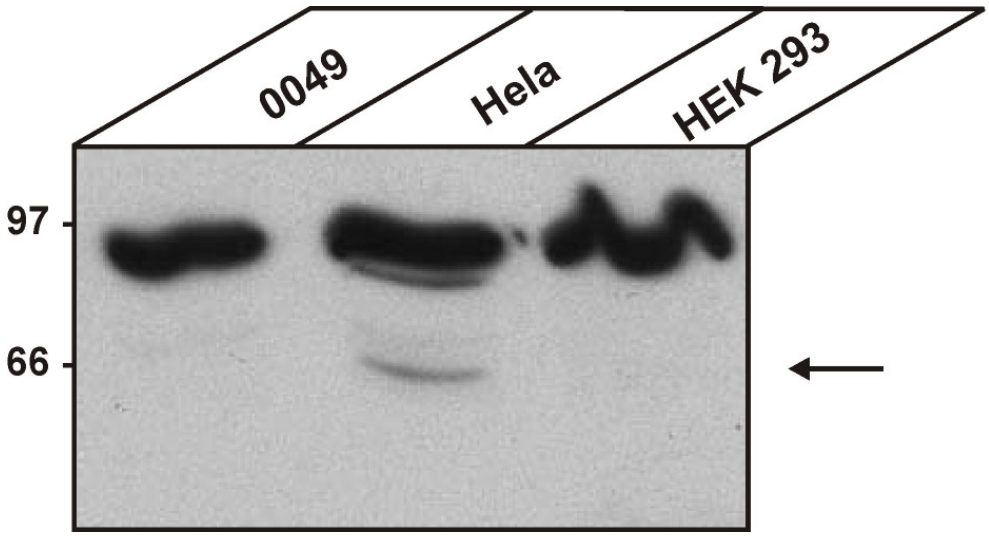

Abb. 6: Western Blot-Analyse der endogenen p66 Expression in humanen Zelllinien. Homogenisierte (60 µg Protein) humane Hautfibroblasten (0049), HeLa und HEK293 Zellen wurden durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit anti-p66 Antikörpern inkubiert. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgte durch HRP-gekoppelte Sekundärantikörper und ECL-Detektion. p66 ist mit einem Pfeil markiert. Die Positionen der Molekulargewichtsmarker (in kDa) sind links angegeben.

5.5. Verteilung von p66 in cytosolischen Membranfraktionen humaner Zelllinien

Zur weiteren Charakterisierung von p66 wurden postnukleäre Überstände (PNS) des Zellhomogenates aus humanen epithelialen Zelllinien HeLa, HEK-293 und MCF7 (Mamma-Karzinom) nach Abtrennung von Zellkernen gewonnen und durch Ultrazentrifugation in eine Zytosol und eine Gesamt-Membran-Fraktion aufgetrennt. Bei dieser Methode werden integrale und Membran-assoziierte Proteine der Plasmamembran und der Organellen im 100.000 x g-Pellet wiedergefunden und von löslichen zytosolischen und luminalen Proteinen aufgrund der unterschiedlichen Dichten getrennt. Zur Bestimmung der relativen Verteilung von p66 wurden vor der Ultrazentrifugation 20% des PNS abgenommen. Proteine des PNS, des Zytosols und der Membran-Fraktionen wurden in einem TX-100-haltigen Lysispuffer extrahiert, die Volumina der Fraktionen auf ein Endvolumen von 500 µl angeglichen und die Proteinkonzentration der Fraktionen bestimmt. PNS (30 µg Protein) und jeweils 100 µl zytosolischer und Membran-Fraktion wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und die Verteilung von p66 zwischen Zytosol und Membran durch Western-Blot-Analyse detektiert. Der Hauptteil von p66-immunoreaktivem Material stellt in allen untersuchten Zellen das p93 kDa Protein dar. Bei HeLa und MCF7–PNS war ein schwaches p66 Signal unter diesen Bedingungen nachweisbar. Diese p66-reaktive Bande wurde ausschließlich in der Membranfraktion von MCF7 Zellen wiedergefunden (Abb. 7).

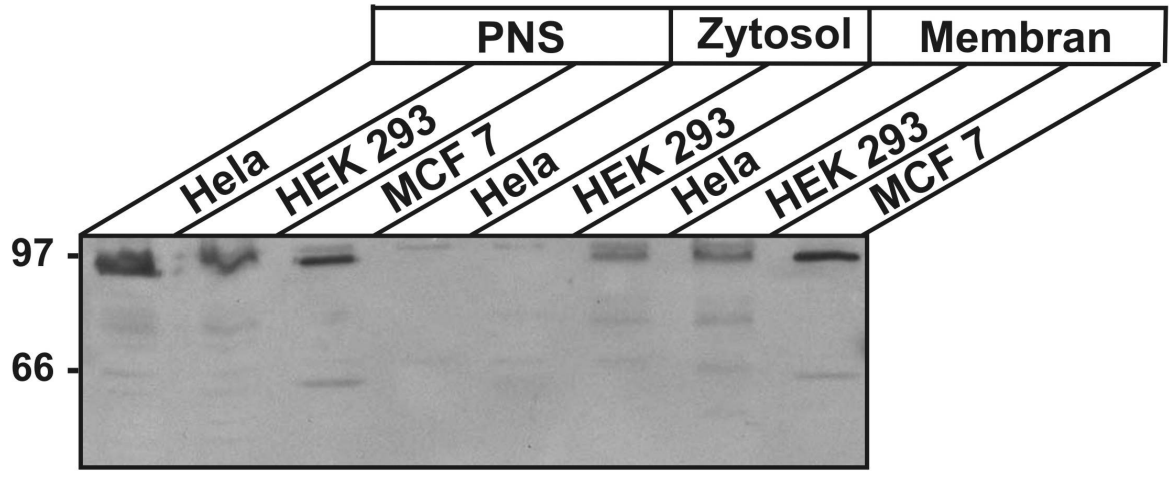

Abb. 7: Verteilung von endogenem p66 in Zytosol- und Membran-Fraktionen. Postnukleäre Überstände aus HeLa, HEK293 und MCF7 Zellen wurden durch Ultrazentrifugation in eine Zytosol und eine Gesamt-Membran-Fraktion getrennt. PNS (75 µg Protein) und gleiche Volumina (100 µl = 20%) der Zytosol- und Membran-Fraktion (100 µl) wurden durch SDS-PAGE (8% Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit anti-p66-Antikörpern detektiert. Der Nachweis erfolgte durch HRP-gekoppelte Sekundärantikörper mit anschließender ECL-Detektion.

5.6. Subzelluläre Verteilung von p66

Um die Signalstärke von p66 zu erhöhen und damit verlässlichere und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die folgenden Experimente an p66-überexprimierenden Zellen durchgeführt.

5.6.1. Klonierung der p66-cDNA in die Expressionsvektoren pcDNA3.1.D/V5-His-TOPO und pcDNA 6.2/V5/GW/D-TOPO

Die kodierende p66 cDNA wurde in die eukaryotischen Expressionsvektoren pcDNA3.1.D/V5-His-TOPO und pcDNA 6.2/V5/GW/D-TOPO kloniert, um transient und stabil exprimierende Zelllinien zu generieren. Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden Expressionsvektoren kloniert, die für das Wild-Typ p66 und für ein C-terminal Myc fusioniertes p66 kodieren.

5.6.2. Immunpräzipitation von p66 aus transfizierten BHK Zellen

Zur Überexpression von p66 in eukaryonten Zelllinien wurde die kodierende p66-cDNA aus dem λgt10-Phagenklon 249-1 in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) subkloniert. Nach transienter Transfektion der p66-cDNA in BHK-Zellen wurden in Western-Blot Analysen immunoreaktive Banden bei 66 kDa in Gesamthomogenaten detektiert, die in nicht-transfizierten BHK-Zellen nur schwach nachweisbar waren (Abb. 8A). Diese Daten wurden durch Immunpräzipitation mit einem affinitätsaufgereinigtem anti-p66 Antikörper verifiziert. Nach metabolischer Markierung von Vektor und p66 transfizierten BHK-Zellen mit [^{35}S]-Methionin konnte ein 66 kDa Protein spezifisch immunpräzipitiert werden (Abb. 8B, Bahn 2, Pfeil), das in Vektor-transfizierten Zellen (Abb. 8B, Bahn 1) nicht detektierbar war. Sowohl in Vektor- als auch in p66 transfizierten BHK-Zellen wurde eine schwache 93 kDa Bande mit dem Antikörper präzipitiert (Abb. 8B, Bahnen 1 und 2, Pfeilkopf).

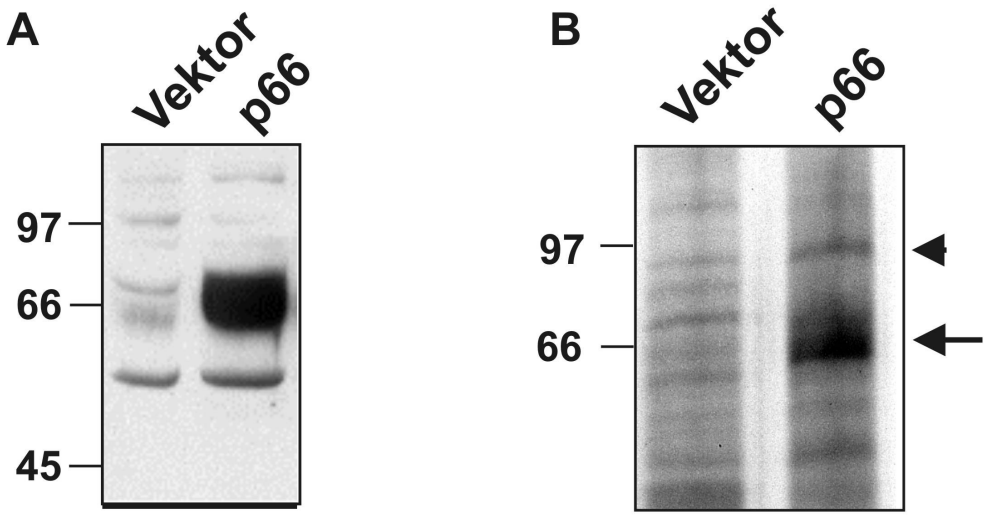

Abb. 8: Immunpräzipitation von p66 aus metabolisch markierten BHK-Zellen. Konfluent gewachsene BHK-Zellen einer 35 mm-Platte wurden transient mit der pcDNA6.2/V5 oder der pcDNA6.2/V5-p66 cDNA transfiziert. 24 Stunden nach Beginn der Transfektion wurden die Zellen entweder für (A) Western-Blot Analysen aufgearbeitet oder (B) für 1 Stunde mit [^{35}S]-Methionin (100 µCi/ml) metabolisch markiert. Nach einer Chase-Dauer von 6 Stunden wurden die Zellen geerntet und Zellextrakte mit dem anti-p66-Antikörper inkubiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und durch Fluorographie detektiert. Die Positionen der Molekulargewichtsmarker (in kDa) sind links angegeben. Die Positionen von p66 (Pfeil) und p93 (Pfeilkopf) sind markiert.

Diese Ergebnisse sollten durch Untersuchungen an stabil mit der p66 cDNA transfizierten Zelllinien verifiziert werden. Es konnten jedoch keine stabil exprimierenden HEK293-Zellen generiert werden, da nach Selektion keine Neomycin-resistenten Klone erhalten wurden.

5.6.3. Analyse der Verteilung von p66 in Zytosol und Gesamt-Membran-Fraktionen durch Ultrazentrifugation

Aufgrund der Kreuzreaktivität des anti-p66 Antiserums mit einem unbekanntem 93 kDa-Proteins in allen untersuchten humanen Zelllinien und der niedrigen endogenen p66-Expression, sollte p66 in einem geeignetem heterologen Zellkultursystem transient exprimiert werden, das keine Kreuzreaktivität endogener Proteine mit dem anti-p66 Antiserum aufweist. In Western-Blot-Analysen nicht-transfizierter BHK-Zellen wurden keine immunoreaktiven Proteine mit dem anti-p66 Antiserum detektiert (nicht gezeigt). Anschließend wurde PNS von Vektor- und p66 cDNA transfizierten BHK-Zellen durch Ultrazentrifugation in eine zytosolische und eine Gesamt-Membran-Fraktion aufgetrennt und die Verteilung von p66 in den Fraktionen durch Western-Blot-Analyse untersucht. Die densitometrische Auswertung ergab, dass ca. 25% des Gesamt p66 im Zytosol und ca. 75% in der Membranfraktion zu finden sind. (Abb. 9).

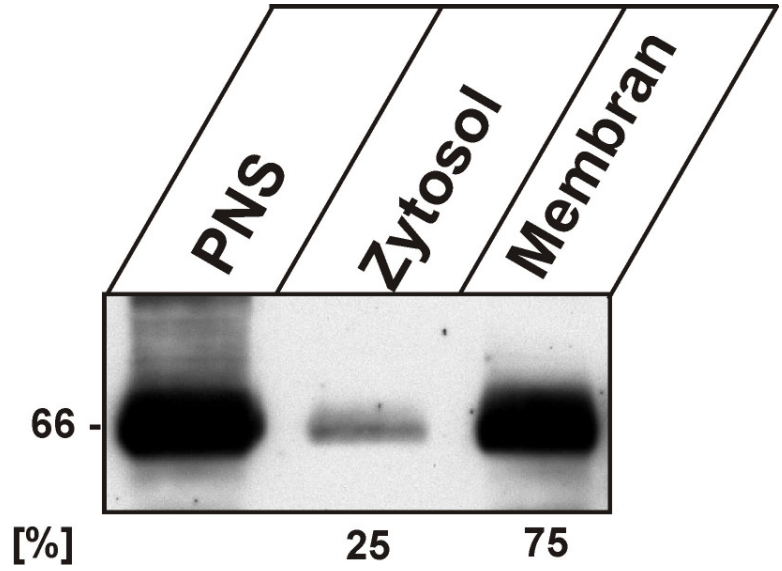

Abb. 9: Verteilung von überexprimiertem p66 in zytosolischen und Membran-Fraktionen. PNS von transient mit der p66 cDNA transfizierten BHK-Zellen wurden durch Ultrazentrigation in eine zytosolische und eine Membran-Fraktion aufgetrennt. Vom PNS wurden 150 µg Protein und äquivalente Volumina der zytosolischen und Membran-Fraktion über SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit anti-p66 Antikörpern inkubiert. Die Detektion erfolgte durch ECL über HRP-gekoppelte Sekundärantikörper. Die Intensitäten der immunoreaktiven Banden wurden densitometrisch bestimmt und die prozentuale Verteilung von p66 in zytosolischer und Membran-Fraktion in Bezug auf den eingesetzten PNS bestimmt.

Um den Anteil von unspezifischer Verunreinigung mit zytosolischen Proteinen und der Membranfraktion zu überprüfen, wurden BHK-Zellen mit GFP bzw. p66 und GFP transient transfiziert. GFP ist ein lösliches Protein der Qualle *Aequorea victoria*, das im Zytosol und im Kernkompartiment lokalisiert ist und daher als Markerprotein für das zytosolische Kompartiment im PNS diente (Cubitt et al., 1995). PNS transfizierter Zellen wurde durch Ultrazentrifugation bei 100.000xg in eine zytosolische und eine Membran-Fraktion aufgetrennt und die Verteilung von GFP und p66 in den Fraktionen durch Western-Blot-Analyse bestimmt. In BHK-Zellen, die nur GFP exprimieren, wird GFP ausschliesslich in der zytosolischen Fraktion, nicht jedoch in der Membranfraktion detektiert (Abb. 10). In BHK-Zellen, die p66 und GFP koexprimieren, ist die Verteilung von GFP nicht verändert (Abb. 10). Die densitometrische Auswertung der Signalintensitäten der immunoreaktiven Banden ergab, dass p66 zu 25% in der zytosolischen und zu 75% in der Membran-Fraktion lokalisiert ist (Abb. 10). Die Daten zeigen, dass 1.) der Membran-assoziierte Anteil von p66 nicht auf eine Kontamination mit zytosolischem p66 zurückzuführen ist und 2.) die subzelluläre Verteilung des zytosolischen p66 nicht durch die Überexpression zur Membran-Assoziation hin verschoben ist.

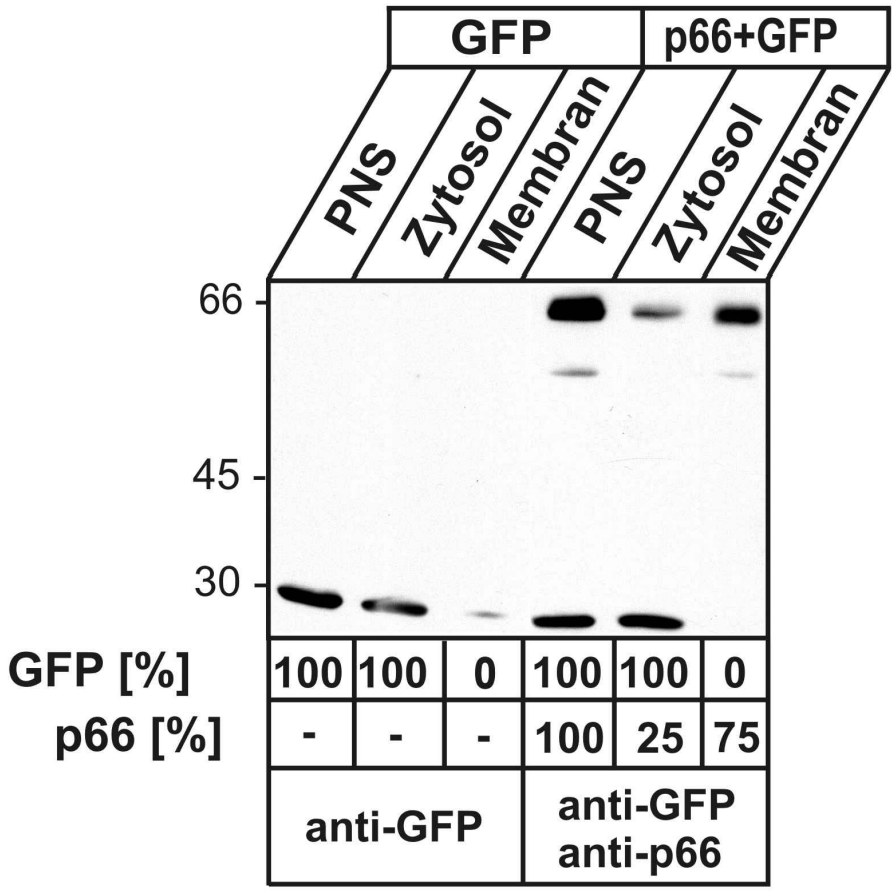

Abb. 10: Subzelluläre Verteilung von p66 in Zytosol- und Membran-Fraktionen. Postnukleäre Überstände aus mit GFP bzw. p66 und GFP cDNA kotransfizierten BHK-Zellen wurden durch Ultrazentrifugation in zytosolische- und Membran-Fraktionen aufgetrennt. PNS (75 µg Protein) und äqivalente Volumina von Zytosol- und Membranfraktion wurden durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf Nitrozellulose wurden die Membranen mit anti-GFP bzw. anti-GFP und anti-p66-Antikörpern inkubiert. Der immunologische Nachweis der Antikörperbindung erfolgte mit HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern mit anschließender ECL-Detektion. Die prozentuale Verteilung von GFP und p66 in Zytosol- und Membranfraktion wurde nach densitometrischer Auswertung der immunoreaktiven Banden bestimmt und ist unter den Bahnen angegeben.

5.7. Untersuchungen zu posttranslationalen Modifikationen von p66

Ausgehend von der Polypeptidsequenz beträgt die errechnete molare Masse von p66 58,2 kDa (Abb. 4). Differenzen zur experimentell bestimmten molaren Masse von 66 kDa (Abb. 6) und die Breite der immunoreaktiven Bande (Abb. 8; Abb. 9) sind möglicherweise auf posttranslationale Modifikationen, wie z. B. *N*-Glykosylierung, Phosphorylierung und Palmitoylierung oder proteolytische Prozessierung zurückzuführen.

5.7.1. Analyse der *N*-Glykosylierung von p66

In der p66-Aminosäuresequenz sind zwei putative *N*-Glykosylierungsstellen, Asn(345)GlySer und Asn(410)ArgThr lokalisiert (Abb. 4), die der Aminosäurekonsensus-Sequenz Asn-X-Ser/Thr (X: beliebige Aminosäure außer Prolin) von Glykoproteinen mit *N*-glykosidisch verbundenen Seitenketten entsprechen.

Um zu untersuchen, ob p66 *N*-glykosyliert ist, wurden BHK-Zellen mit p66 bzw. p66-Myc cDNA transient transfiziert und Zellhomogenate enzymatisch mit PNGase F inkubiert. Als Positiv-Kontrolle für ein *N*-glykosidisch modifiziertes Membranprotein wurde die cDNA des Golgi-lokalisierten Typ II Membranproteins β-Gal-3'-Sulfotransferase (GP3ST; Accession Nr. AB040610) transfiziert und unter gleichen Bedingungen analysiert. Die humane GP3ST besitzt 6 *N*-Glykosylierungsstellen (Honke et al., 2001). Da gegen die GP3ST kein etabliertes Antiserum zur Verfügung stand, wurde an das 3'-Ende der kodierenden cDNA ein Oligonukleotid eingefügt, das für ein 10 Aminosäure langes C-terminales Myc-Tag Epitop kodiert (Greimel et al., 2006) und gegen das kommerzielle Antikörper erhältlich sind. Nach Solubilisierung wurden die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und im Western-Blot mit anti-p66 bzw. anti-Myc Antikörpern analysiert.

PNGase F spaltet alle Oligosaccharidtypen (Mannose-reiche, hybride und komplexe Oligosaccharidseitenketten) zwischen dem Asparaginrest des Polypeptids und dem ersten *N*-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc)-Rest der Oligosaccharid-Seitenkette. Nach PNGase F Behandlung war keine Veränderung des elektrophoretischen Laufverhaltens von p66 im Vergleich zu nicht-behandelten Homogenaten detektierbar. (Abb. 11, Bahnen 3 und 4). Identische Ergebnisse wurden mit dem p66-Myc Konstrukt erhalten (Abb. 11, Bahnen 5 -8). Die molare Masse von p66 Myc ist um ca. 1 kDa größer als die von p66. In nicht-transfizierten Kontrollzellen wurden keine p66 immunoreaktiven Banden detektiert (Abb. 11, Bahnen 1 und 2). In Zell-Homogenaten von GP3ST-Myc exprimierenden-Zellen sind eine Hauptbande bei 60 kDa und vier schwächere Banden zwischen 48 und 56 kDa im Myc Western Blot detektierbar (Abb. 11, Bahn 9). Nach Behandlung mit PNGase F ist nur noch eine einzelne immunoreaktive Bande von 48 kDa nachweisbar (Abb. 11, Bahn 10). Die multiplen immunoreaktiven Banden in nicht-behandelten Kontroll-Homogenaten entsprechen unterschiedlich *N*-glykosylierten GP3ST-Formen. Die immunoreaktive Hauptbande mit einer molaren Masse von 60 kDa könnte dem reifen Protein nach vollständiger Glykosylierung der 6 *N*-Glykosylierungsstellen entsprechen, da ca. 2 kDa Masse einer *N*-Oligosaccharidkette zugerechnet werden können (Abb. 11, Bahn 9). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die beiden putativen *N*-Glykosylierungsstellen in p66 *in vivo* nicht benutzt werden.

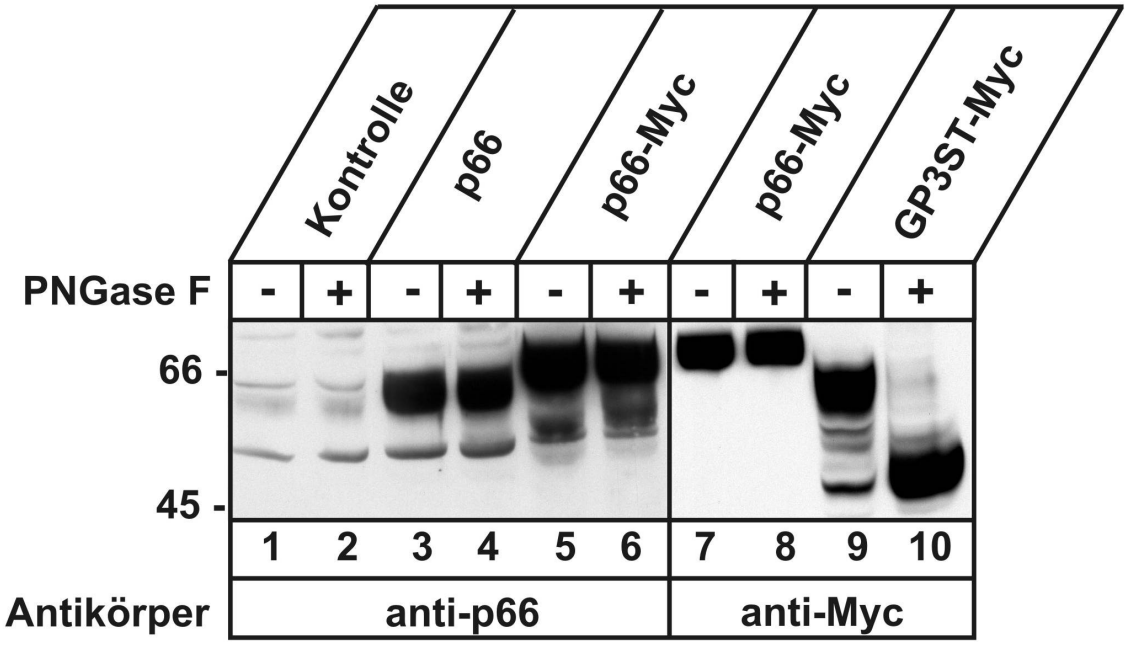

Abb. 11: Analyse der *N*-Glykosylierung von p66. BHK-Zellen wurden mit p66 (Bahnen 3 und 4), p66-Myc (Bahnen 5-8) und GP3ST-Myc (Bahnen 9 und 10) cDNAs transient transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Lysate für 20 Stunden in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von PNGase F bei 37°C inkubiert. Je 50 µg jeden Ansatzes wurden unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) getrennt. Die Proteine wurden auf Nitrozellulose transferiert und mit anti-p66 (Bahnen 1-6) bzw. anti-Myc Antikörpern (Bahnen 7-10) inkubiert. Die Detektion erfolgte durch ECL über HRP-konjugierte Sekundärantikörper. Nichttransfizierte BHK-Zellen (Bahnen 1 und 2) wurden als Kontrolle unter identischen Bedingungen analysiert.

5.7.2. Analyse der Phosphorylierung von p66

Für verschiedene Adaptorproteine (z.B. AP-2, GGA1, GGA3, PACS-1), die sowohl im Zytosol als auch in Assoziation mit Membranen existieren, wurde die Bedeutung der Phosphorylierung für die subzelluläre Lokalisation und Bindungsaffinität für Sortierungssignale der MPRs gezeigt (Ricotta et al., 2002; Ghosh und Kornfeld, 2003; Scott et al., 2003). Es sollte zunächst analysiert werden, ob p66 phosphoryliert ist. Hierzu wurden Homogenate von p66-überexprimierenden BHK-Zellen in An- und Abwesenheit von alkalischer Phosphatase inkubiert und durch Western-Blot Analyse untersucht. Nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase war keine Veränderung des elektrophoretischen Laufverhaltens im Vergleich zu nicht-behandelten Homogenaten in der SDS-PAGE zu detektieren (Abb. 12).

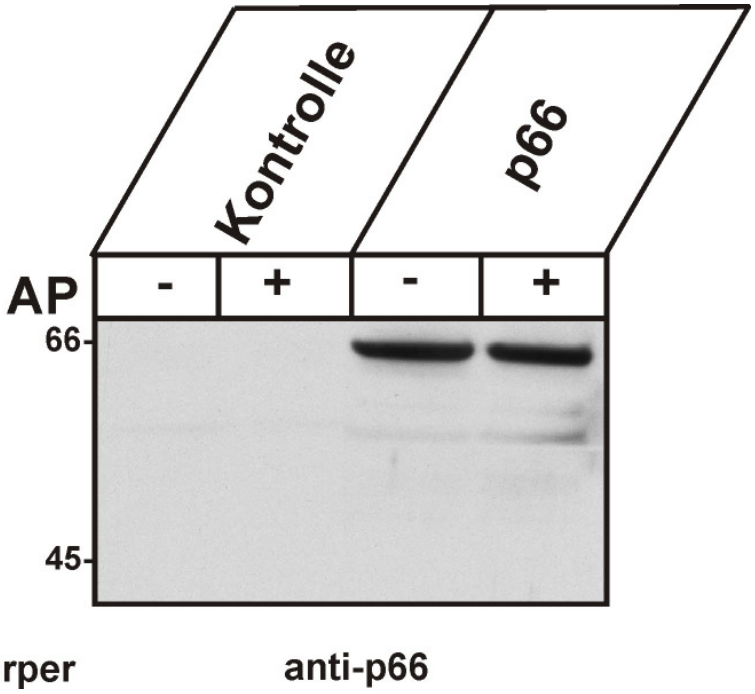

Abb. 12: Western-Blot Analyse von BHK-Zell Lysaten nach Dephosphorylierung. BHK-Zellen wurden transient mit Vektor (Kontrolle) und p66 (p66)-cDNA transfiziert und die Zellen lysiert. Jeweils 100 µg des Lysates wurden in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von alkalischer Phosphatase (AP) inkubiert, durch SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Nach Inkubation der Membran mit anti-p66 Antikörpern erfolgte der immunologische Nachweis über Chemoluminiszenz-Reaktion.

5.8. Analyse intrazellulärer Transportfunktionen des MPR300 in p66 exprimierenden Zellen

Die Vorarbeiten zeigten, dass p66 intrazellulär zu 75% in Assoziation mit Membranen und zu 25% im Zytosol verteilt ist. Eine Wechselwirkung zwischen der Membran-assoziierten Fraktion von p66 und der zytoplasmatischen Domäne des MPR300 *in vivo* wäre in subzellulären Kompartimenten vorstellbar, die der MPR300 beim intrazellulärem Transport passiert, also an Membranen des TGN, der endosomalen Kompartimente und der Zelloberfläche. Um zu untersuchen, ob p66 für den anterograden Transport des MPR300 zwischen TGN und Endosom wichtig ist, wurde der intrazelluläre Transport und die Prozessierung von neusynthetisiertem Cathepsin D in p66 überexprimierenden Zellen untersucht. Nach Transfektion von BHK-Zellen mit der Cathepsin D cDNA bzw. der Cathepsin D und p66 cDNA wurden die Zellen für 1 Stunde mit [^{35}S]-Methionin markiert und für 6 Stunden einem Chase unterzogen. Während dieser Zeit werden 5-10% des neusynthetisiertem Cathepsin D sezerniert (Tiede et al., 2005b). Um die Wiederaufnahme von sezerniertem Cathepsin D durch MPR300-vermittelte Endozytose zu verhindern, wurde den Medien 5 mM Mannose-6-Phosphat zugesetzt. Cathepsin D wurde aus Zellen und Medien immunpräzipitiert und die intrazelluläre und sezernierte Fraktion nach densitometrischer Auswertung als Prozentsatz des gesamten Cathepsin D errechnet. Ferner

wurde auch die prozentuale Verteilung der Pro-, Intermediär- und reifen Cathepsin D-Formen quantifiziert.

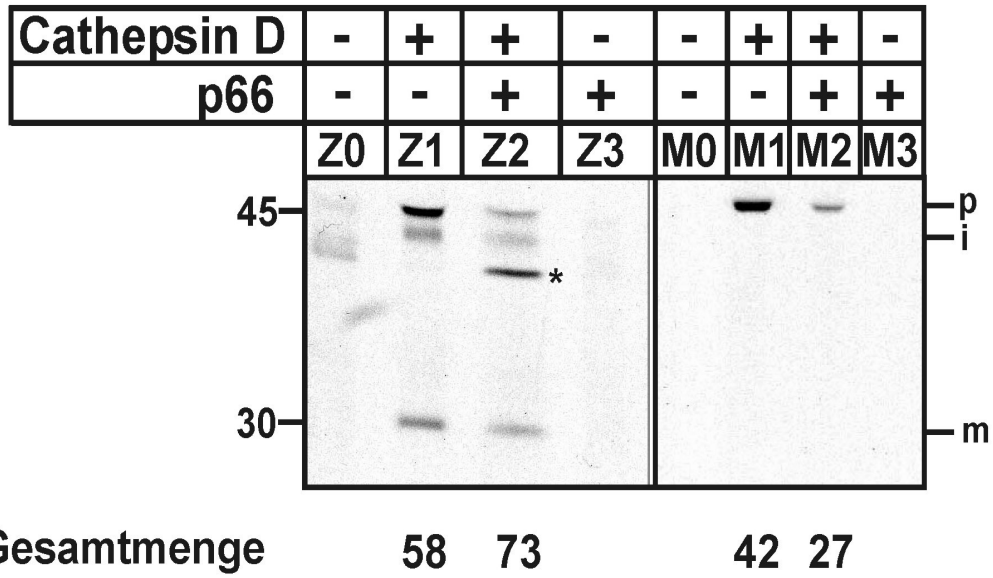

Abb. 13: Immunpräzipitation von Cathepsin D aus p66-exprimierenden BHK-Zellen. BHK-Zellen, die den MPR300 stabil exprimieren, wurden mit Vektor (Z0), Cathepsin D (Z1), Cathepsin D +p66 (Z2) und p66 cDNA (Z3) transient transfiziert. 36 Stunden nach Beginn der Transfektion wurden die Zellen für 1 Stunde metabolisch mit [^{35}S]-Methionin (100 µCi/ml) markiert und einem Chase von 6 Stunden in Anwesenheit von 5 mM M6P im Medium unterzogen. Aus den Zellhomogenaten (Z) und den Medien (M) wurde Cathepsin D mit einem polyklonalen Antiserum immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und durch Fluorographie detektiert. Die Position der Molekulargewichtsmarker (in kDa) und der Pro- (p), intermediären (i) und reifen Formen (m) des Cathepsin D sind angegeben. Unspezifisch präzipitierte Proteine sind in Bahn Z2 mit einem * gekennzeichnet. Die Signalintensitäten der immunpräzipitierten Cathepsin D-Formen wurden densitometrisch ausgewertet. Die Verteilung der zellulären Cathepsin D-Formen und der ins Medium sezernierten Pro-Form in Bezug auf die Gesamtheit des präzipitierten zellulären Cathepsin D sind in Prozent dargestellt.

In Zellen, die mit Cathepsin D transfiziert waren, wurden 58% des neusynthetisierten Cathepsin D aus den Zellen präzipitiert (Verteilung: 47% als Pro-, 25% als Intermediär- und 28% als reife Form (Abb. 13, Z1). In das Medium wurden 42% des Cathepsin D sezerniert (Abb. 13, M1). Aus BHK-Zellen, die mit der Cathepsin D und p66 cDNA kotransfiziert waren, wurden 73% des neusynthetisierten Cathepsin D aus Zellen präzipitiert (33% als Pro-, 31% als Intermediär-und 37% als reife Form) (Abb. 13, Z2). In das Medium wurden 27% des Cathepsin D sezerniert (Abb. 13, M2). In Vektor-transfizierten (Z0, M0) und p66-überexprimierenden Zellen (Z3, M3) konnte Cathepsin D weder aus Zellen (Z0, Z3) noch aus Medien (M0, M3) mit dem anti-human Cathepsin D-Antikörper präzipitiert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass nach Transfektion von p66 die Fraktion des sezernierten Cathepsin D im Vergleich zu den Kontrollzellen abnimmt (27% versus 42%) und p66 offensichtlich die MPR300 abhängige Sortierung von neusynthetisiertem Cathepsin D im Golgi-Apparat verbessert.

5.9. Analyse der Expression und Oberflächenkonzentration des humanen MPR300 in stabil transfizierten BHK-Zellen

Um die Bedeutung von p66 für die MPR300-abhängige Endocytose lysosomaler Enzyme zu analysieren, wurden BHK-Zellen verwendet, die den humanen MPR300 stabil exprimieren. Zunächst wurden aus verschiedenen stabil transfizierten Zelllinien jene ausgewählt, die den humanen MPR300 am höchsten exprimieren, da auch die Expressionsrate von stabil transfizierten Zellen abhängig ist von der Anzahl der Passagen und der Kultivationsdauer nach Transfektion und Selektion. Nach densitometrischer Auswertung der immunoreaktiven Banden im Western Blot wurde die höchste MPR300-Expressionsrate in Zellklon A gemessen (Abb. 14) und für Experimente zur MPR300-vermittelten Endozytose verwendet.

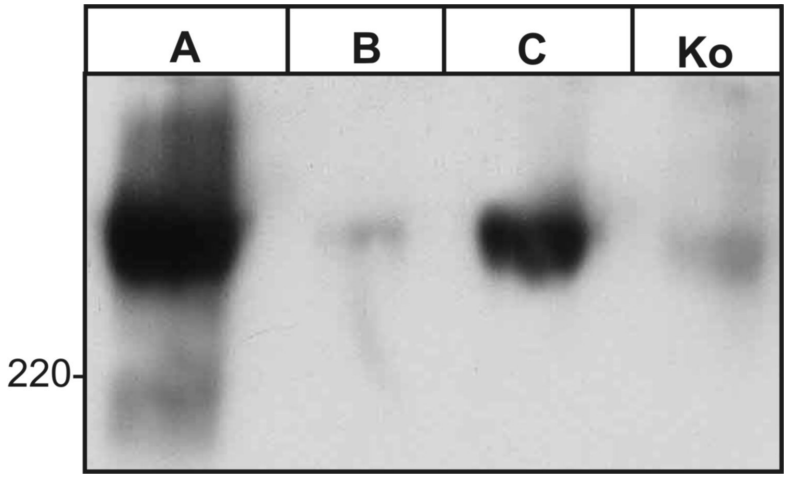

Abb. 14: Western Blot-Analyse der MPR300-Expression in stabil transfizierten BHK-Zellen. 100 µg Gesamtprotein aus nichttransfizierten Kontrollzellen (Ko) und drei BHK-Zelllinien (Klone A, B, C), die den humanen MPR300 stabil exprimieren, wurden durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und anschließend mit anti-MPR300 Antikörpern (1:1000) im Western-Blot analysiert. HRP-gekoppelte Sekundärantikörper ermöglichten die Detektion durch ECL.

Die Oberflächenexpression des humanen MPR300 wurde durch Bindung des [^{125}J] markierten monoklonalen anti MPR300 Antikörpers 2C2, der gegen die luminale Domäne des humanen MPR300 gerichtet ist, in Abwesenheit von Saponin, analysiert. Zellklon A hat gegenüber nicht transfizierten Kontrollzellen eine 4-fach höhere [^{125}J] 2C2-Bindungswerte aufgewiesen (nicht gezeigt).

5.10. Endozytose von Mannose-6-Phosphat-haltigen Liganden in transfizierten BHK-Zellen

Der MPR300 bindet extrazelluläre Mannose-6-Phosphat (M6P)-haltige Liganden an der Plasmamembran, die nach Rezeptor-vermittelter Endozytose über Clathrin-beschichtete Vesikel zu endosomalen Kompartimenten transportiert werden. Nach Dissoziation der Ligand-Rezeptor-Komplexe im Endosom gelangen die lysosomalen Enzyme zum Lysosom, während der MPR300 über vesikulären Transport entweder zum TGN oder zur Plasmamembran rezirkulieren kann (Storch und Braulke, 2005).

Um die Bedeutung der möglichen Bindung von p66 an die zytoplasmatische Domäne des MPR300 (MPR300-CT) auf die Endozytoserate und das Recycling des Rezeptors zwischen endosomalen Kompartimenten und der Plasmamembran zu analysieren, wurde die Rezeptor-vermittelte Aufnahme eines affinitätsaufgereinigten rekombinanten lysosomalen Enzyms, Arylsulfatase B (ASB; EC 3.1.6.12), gemessen. MPR300-überexprimierende BHK-Zellen wurden mit der p66 cDNA transient transfiziert und die Aufnahme von [^{125}J]-markierter ASB (200.000 cpm/Ansatz) für 120 Minuten bei 37 °C in An- und Abwesenheit des kompetitiven Inhibitors Mannose-6-Phosphat (M6P, 1 mM) gemessen. BHK-Zellen, die mit der GFP cDNA transfiziert wurden, dienten als Kontrolle (Abb. 15). Nach Ende der Endozytosezeit wurde die Zelloberflächen assoziierte, M6P-ablösbare Radioaktivität, als auch die intrazelluläre ^{125}J-ASB Radioaktivität bestimmt (Abb. 15A). Zur Verifizierung der Radioaktivitätsbestimmung und zur Analyse der Prozessierung der endozytierten ASB wurden Aliquots der Zellpellets durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschliessend durch Autoradiographie untersucht (Abb. 15B). Die Expression von GFP und p66 wurde durch Western-Blot-Analyse bestimmt.

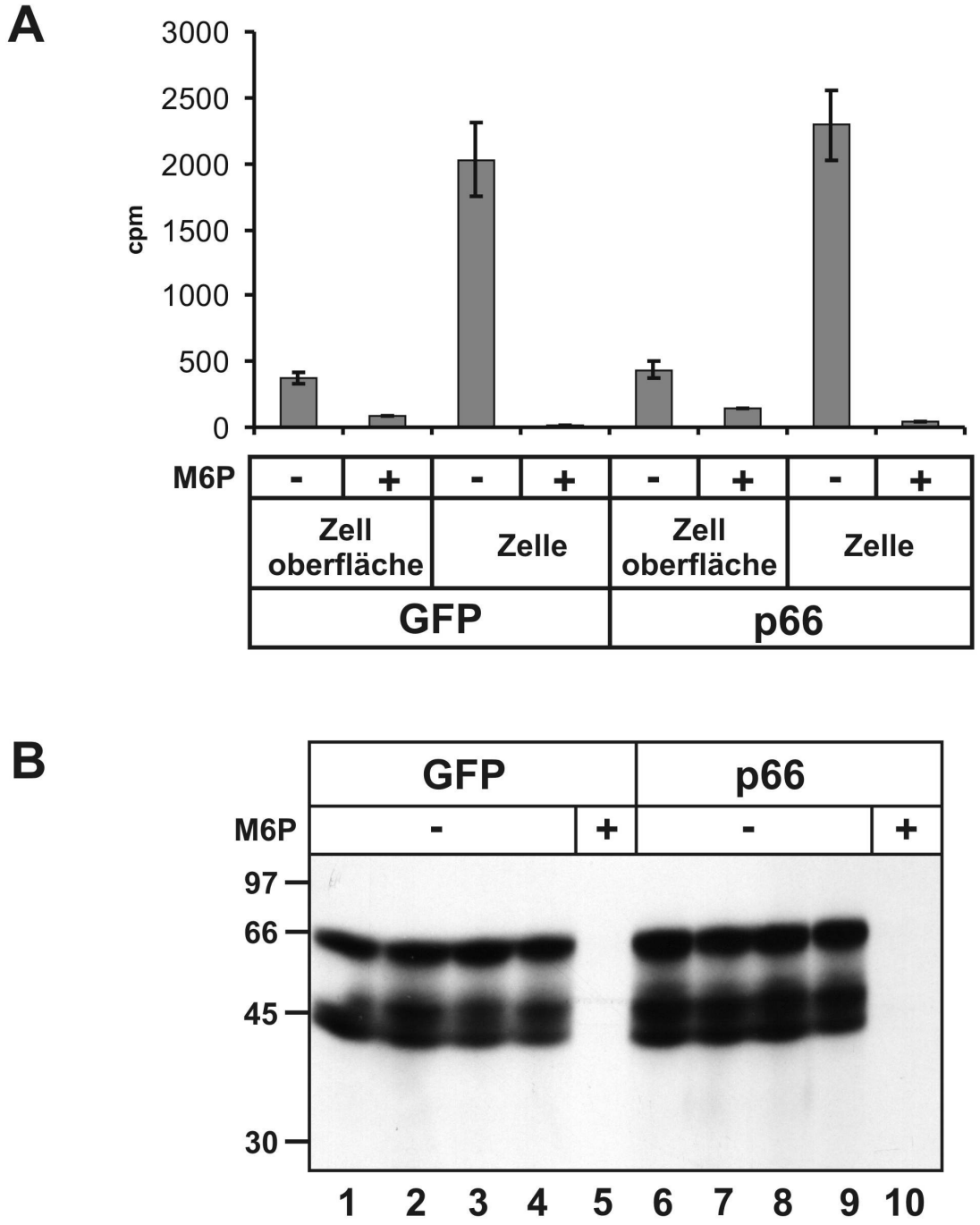

Abb. 15: Endozytose von [^{125}J]-ASB in p66 exprimierenden BHK-Zellen. A) BHK-Zellen wurden mit GFP- (Bahn 1-5) bzw. p66-cDNA (Bahn 6-10) transient tranfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen in An- (+) und Abwesenheit (-) des kompetitiven Inhibitors Mannose-6-Phosphat (M6P; 1 mM) für 120 Minuten mit [^{125}J]-ASB (200.000 cpm/Ansatz) bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung der an der Zelloberfläche gebundenen ASB bzw. der ASB-Aufnahme in die Zellen wurden 10% des Trypsinüberstandes und 10% des Zellpellets im γ–Counter gemessen. Die gemessenen Radioaktivitäten in cpm sind als Balkendiagramm dargestellt. Die an der Zelloberfläche und die intrazellulär gemessene Radioaktivität stellen die Mittelwerte aus 4 unabhängigen ASB-Endozytoseexperimenten mit errechneter Standardabweichung dar. B) 70% der Zellpellets wurden nach Solubilisierung durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und die intrazelluläre radioaktiv markierte ASB durch Autoradiographie detektiert. In den Bahnen 1-4 bzw. 6-9 ist die aufgenommene ASB in Ab- (-) und in Bahnen 5 und 10 in Anwesenheit (+) von M6P im Medium dargestellt. Die Positionen der Molekulargewichtsmarker (in kDa) sind links angegeben.

Die Auswertung der Radioaktivitätsmessungen aus jeweils 4 unabhängigen Transfektionen ergab, dass nach 120 minütiger Inkubation ca. 15% der Zell-assoziierten [^{125}J]-ASB an der Zelloberfläche und 85% intrazellulär verteilt war (Abb. 15A). In Anwesenheit von M6P wird die Menge der an die Zelloberfläche gebundenen Radioaktivität um 70% inhibiert, während die Endozytose komplett gehemmt wird. In p66 exprimierenden BHK-Zellen war sowohl die an der Zelloberfläche gebundene als auch die intrazelluläre Radioaktivität um 13% im Vergleich zu GFP-exprimierenden Kontrollzellen erhöht (Abb. 15 A). Der Anstieg der MPR300-abhängigen Endozytose war statistisch jedoch nicht signifikant ($p>0.05$, student's t-Test).

Nach 120 minütiger Inkubation der transfizierten BHK-Zellen mit [^{125}J]-ASB, Lyse der Zellen und Auftrennung der Zellhomogenate wurden eine 64 kDa Bande und ein 47/45 kDa Dublett in der Fluorographie detektiert (Abb. 15 B, Bahnen 1-4 und 6-9). Die 64 kDa-Bande entspricht der Vorläufer- und das 47/45 kDa Dublett stellt prozessierte lysosomale ASB-Formen dar (Peters et al., 1990). Die Aufnahme der [^{125}J]-ASB in den BHK-Zellen ist spezifisch und lässt sich komplett durch einen Überschuß an M6P hemmen (Abb. 15 B, Bahnen 5 und 10). Nach Überexpression von p66 waren sowohl die Signalintensitäten der 64 kDa- als auch der 47/45 kDa ASB-Formen im Vergleich zu GFP-transfizierten Kontrollzellen erhöht (Abb. 15 B). Das Verhältnis der 64 kDa ASB Vorläufer-Formen zu den prozessierten reifen 47/45 kDa-Formen war in p66-exprimierenden BHK-Zellen nicht verändert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz und der Expression von GFP bzw. p66 wurden 20% der Zellpellets nach Solubilisierung durch Western-Blot-Analyse untersucht (nicht gezeigt). Hierbei waren die Expressionshöhen von GFP bzw. p66 bei den fünf unabhängigen Transfektionsansätzen gleich.

5.11. Lokalisation von p66 in transfizierten CHO-Zellen

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von p66 wurde zunächst das anti-p66 Antiserum in Immunfluoreszenzanalysen an transient transfizierten CHO-Zellen verwandt. Während in manchen Zellen Immunoreaktivität im Kernkompartiment lokalisiert werden konnte, war in anderen Zellen Immunoreaktivität in perinukleären, retikulären Strukturen detektierbar (Abb. 16A). Mit der indirekten Doppelimmunfluoreszenz-Mikroskopie war keine eindeutige Kolokalisation von p66 mit subzellulären Markern des Lysosoms (LAMP2; Abb. 16B), des endoplasmatischen Reticulums (PDI) und des Golgi-Apparates (GM130; nicht gezeigt) darstellbar.

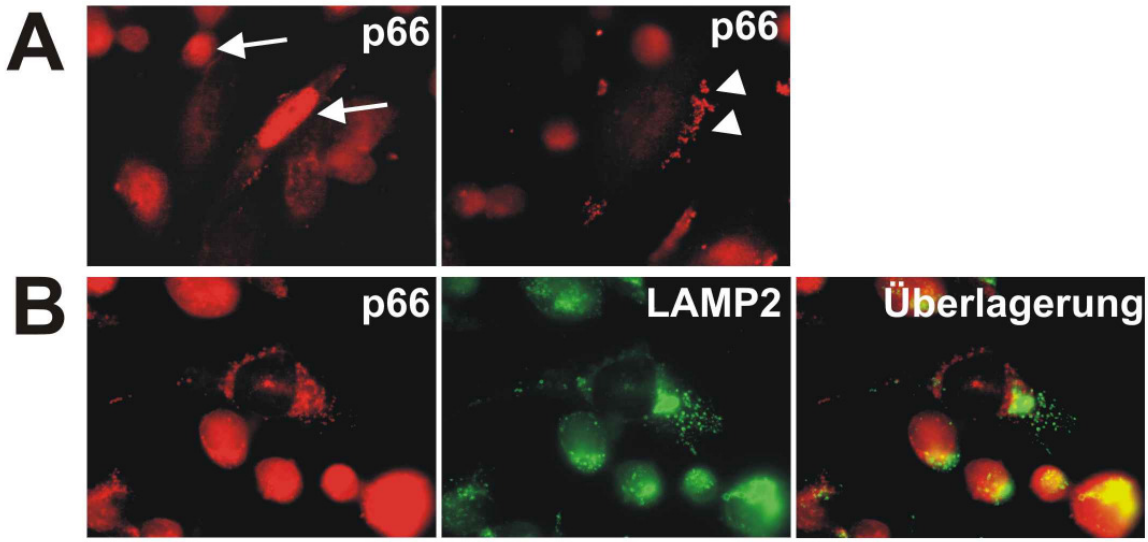

Abb. 16: Lokalisation von p66 in transfizierten CHO-Zellen. CHO-Zellen wurden transient mit der p66 cDNA transfiziert und die Zellen nach Fixierung mit dem anti-p66 Antikörper (rot, A, B) und Antikörpern gegen das spät endosomale/lysosomale Markerprotein LAMP2 (grün, B) inkubiert. In A zeigen Pfeile die Kernlokalisation bzw. Pfeilspitzen die perinukleäre, vesikuläre Lokalisation von p66 an. B: Nach Überlappung der Aufnahmen war keine Kolokalisation von p66 und LAMP2 detektierbar.

Um eine mögliche Kreuzreaktivität des p66 Antiserums mit dem p93kDa c14orf4-Protein (siehe 6.3) auszuschliessen, wurde zur spezifischen Lokalisationsanalyse das C-terminal Myc-fusionierte p66-Expressionskonstrukt für die Transfektion von CHO-Zellen verwendet. Nach transienter Transfektion von CHO-Zellen wurden die Zellen fixiert, mit anti-Myc-Antikörpern, dem Kernfarbstoff DAPI und Antikörpern gegen Markerproteine der späten Endosomen/Lysosomen, des ER und des Golgi-Apparates inkubiert (Abb. 17). p66 ist im steady state hauptsächlich im Kernkompartiment lokalisiert, was durch die Kolokalisation mit dem Kernmarker DAPI gezeigt wurde (Abb. 17). In CHO-Zellen, die p66-Myc transient exprimierten, wurde keine Kolokalisation von p66 mit Marker-Proteinen des ER, des Golgi-Apparates und des späten Endosoms/Lysosoms detektiert (Abb. 17). Auch an der Plasmamembran und im Zytosol war die Konzentration von p66-Myc nicht ausreichend, um eine Detektion mit den sehr sensitiven Immunfluoreszenztechniken zu ermöglichen. Die

Immunfluoreszenz-Untersuchungen belegen, dass p66 wahrscheinlich im Zytosol translatiert wird und anschließend in das Kernkompartiment transportiert wird.

Die Abwesenheit von transfizierten Zellen mit einer Anfärbung von p66 im ER ist ein weiterer Hinweis, dass p66 nicht in das ER transloziert wird. Bei sezernierten, Golgi-residenten oder lysosomalen Proteinen wird bei transienter Überexpression in dem CHO-Expressionssystem die vesikuläre Transportmaschinerie saturiert, so dass bei einigen Zellen eine Fehllokalisation im ER zu beobachten ist (S. Storch, persönliche Mitteilung).

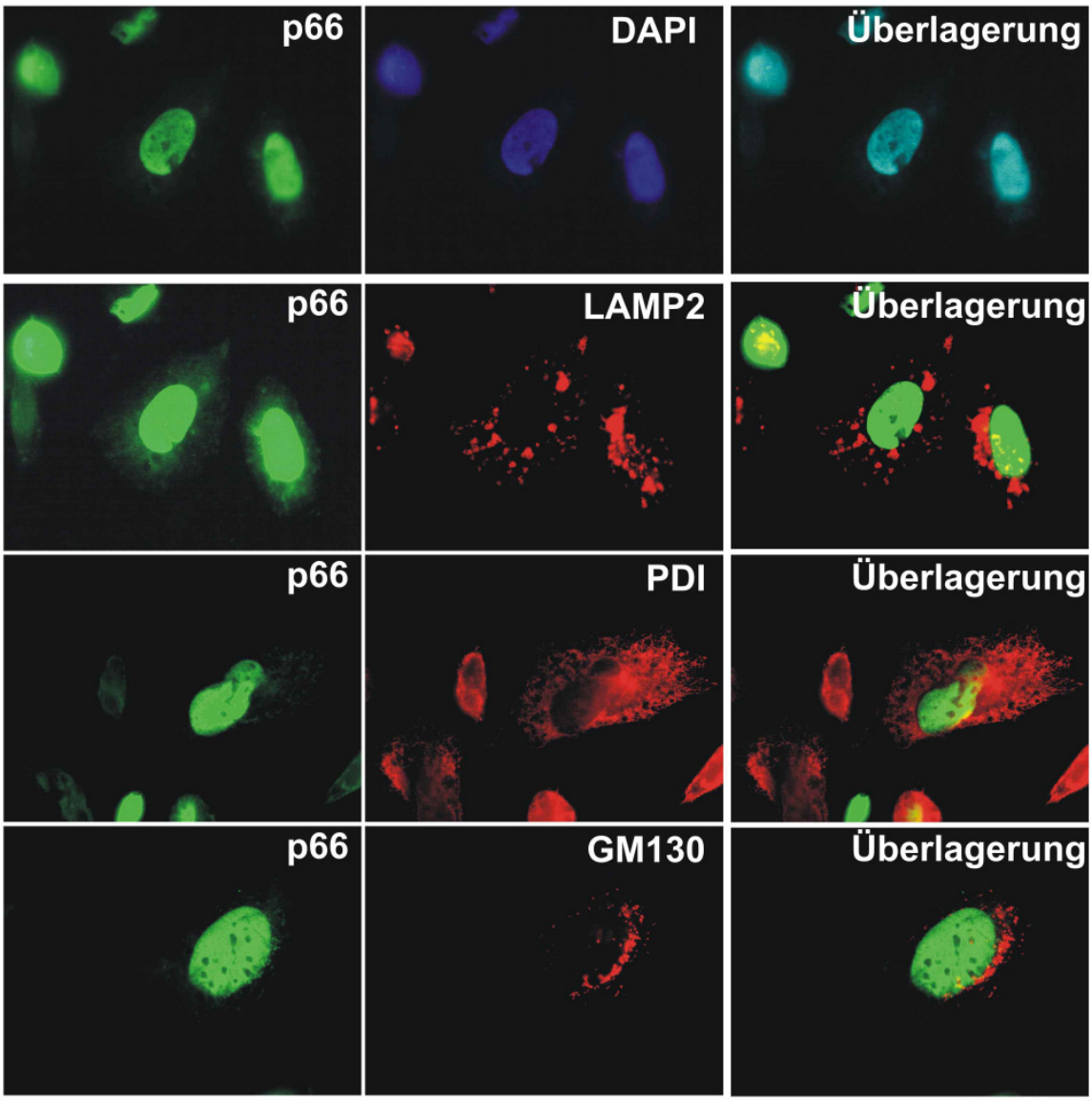

Abb. 17: Lokalisation von p66-Myc in transfizierten CHO-Zellen. CHO-Zellen wurden transient mit der Vektor und der p66-Myc cDNA transfiziert und die Zellen nach Fixierung mit polyklonalen anti-Myc-Antikörpern (grün, Verdünnung: 1: 100) und dem Marker des Kernkompartimentes DAPI (violett), monoklonalen Antikörpern gegen Markerproteine des späten Endosoms/ Lysosoms (rot, LAMP2, Verdünnung: 1: 50), des endoplasmatischen Reticulums (rot, Protein Disulfid Isomerase, Verdünnung. 1: 800) und des *cis*-Golgi-Apparates (rot, GM130 Verdünnung: 1: 100) inkubiert. Nach Inkubation der Zellen mit FITC- (Verdünnung: 1: 100 in PBS, BSA) und Cy3-konjugierten Sekundärantikörpern (Verdünnung: 1: 2.000 in PBS, BSA) wurden die Zellen mit Anregungswellenlängen [λ1: 488 nm (grün) λ2: 543 (rot)] bei 63-facher Vergrößerung analysiert. Nach Überlagerung der Bilder erscheint eine Kolokalisation in hellblau (rechte Spalte, obere Reihe) bzw. gelb (rechte Spalte, weitere Reihen).

5.12. Lokalisation von p66 und des MPR300 in transfizierten HeLa-Zellen

Zur Analyse der subzellulären Lokalisation von p66 in HeLa-Zellen, die eine schwache endogene p66-Expression besitzen, und der Bedeutung von p66 für die subzelluläre Lokalisation des MPR300 wurden HeLa-Zellen transient mit der p66-Myc cDNA transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen das Myc-Epitop und den humanen MPR300 inkubiert. In der Immunfluoreszenz kolokalisiert p66-myc in HeLa-Zellen mit dem Kernmarker DAPI (Abb. 18). Die Immunfluoreszenzaufnahmen belegen, dass alle Zellen p66 exprimieren und dass der MPR300 sowohl in nicht transfizierten Kontrollzellen als auch in p66 exprimierenden Zellen perinukleär im TGN und in vesikulären Strukturen lokalisiert ist (Abb. 18). Es wird keine Kolokalisation von p66-Myc und MPR300 detektiert. Die Untersuchungen zeigen, außerdem dass die intrazelluläre Verteilung des MPR300 in p66 exprimierenden Zellen im Vergleich zu Vektor-transfizierten Kontrollzellen nicht verändert war (Abb. 18).

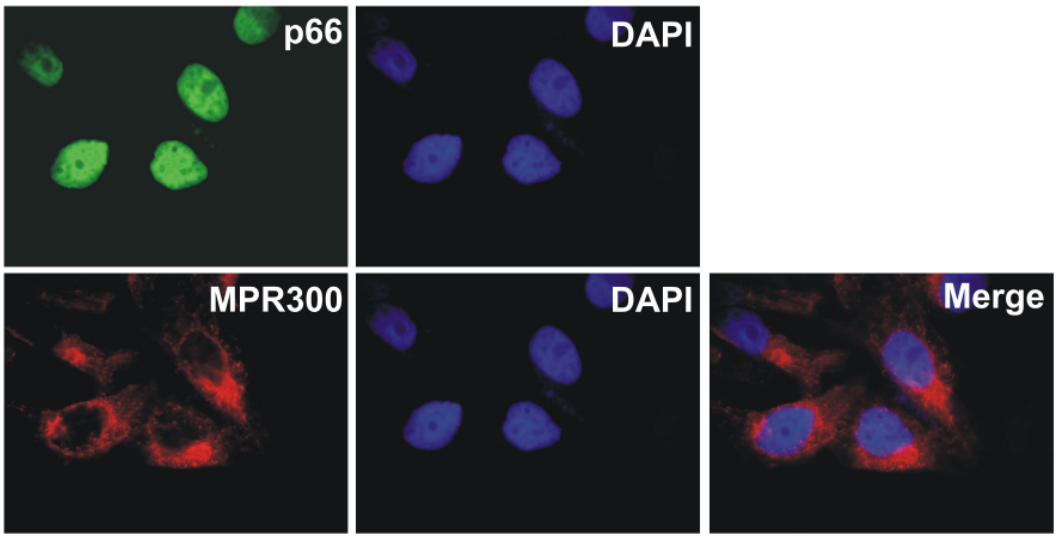

Abb. 18 Lokalisation von p66-myc und MPR300 in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden auf mikroskopischen Deckgläschen ausplattiert und mit der pcDNA6.2.V5 p66-Myc cDNA transient transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit PFA fixiert und nach Saponinbehandlung mit Antikörpern gegen Myc (grün) und den humanen MPR300 (rot) dargestellt. Die Kernkompartimente wurden mit dem Zellkernmarker DAPI (violett) angefärbt.

5.13. Analyse der Interaktion zwischen p66 und dem MPR300 *in vivo* durch Kopräzipitationsanalysen

Zum Nachweis der Interaktion zwischen dem MPR300 und p66 *in vivo* wurden BHK-Zellen, die den MPR300 Rezeptor stabil exprimieren, mit Vektoren und p66 cDNA transient transfiziert. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion in einem Detergenz-haltigem Puffer, der den MPR300-Rezeptor aus Membranen extrahiert, lysiert. Aus den

Zellysaten wurde der MPR300 mit einem polyklonalen Antiserum präzipitiert, die koimmunpräzipitierten Proteine anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und die Anwesenheit von p66 in den Präzipitaten durch Western-Blot-Analyse untersucht. Bei den koimmunpräzipitierten Proteinen wurde keine p66 Immunoreaktivität detektiert (Abb. 19). Zur Kontrolle der p66-Expression nach transienter Transfektion wurde vor der Immunpräzipitation ein Aliquot der Lysate abgenommen und durch p66 Western-Blot-Analyse untersucht (Abb. 19).

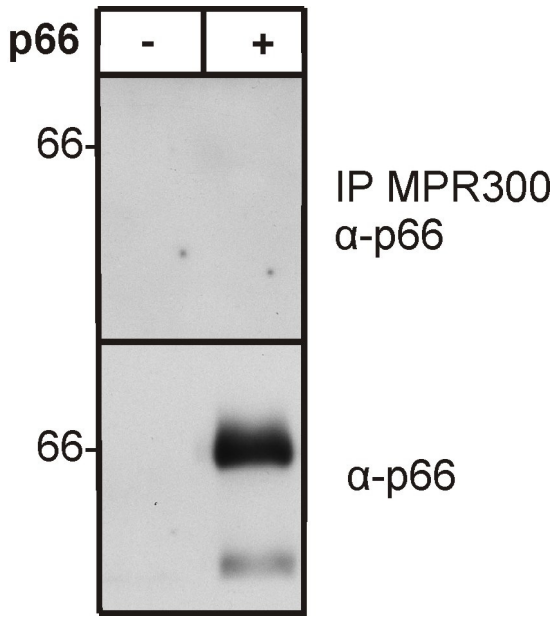

Abb. 19: p66 Western-Blot-Analyse nach Immunpräzipitation des humanem MPR300. BHK-Zellen, die den MPR300 stabil exprimieren, wurden mit der Vektor (-) und der p66 cDNA (+) transient transfiziert. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion lysiert und der MPR300 aus den Zellhomogenaten präzipitiert. Die Präzipitate wurden nach Solubilisierung über SDS-PAGE (8%) aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet, mit anti-p66 Antikörpern inkubiert und immunreaktive Proteine über eine Chemoluminiszenzreaktion sichtbar gemacht (oberer Blot-Teil). Zum Nachweis der p66-Expression wurden 10 µg des Lysates durch p66 Western-Blot-Analyse untersucht (unterer Blot-Teil).

6. Diskussion

In Vorarbeiten wurde in einem „Hefe-Two-Hybrid“ Screen mit der zytoplasmatischen MPR300-Domäne als Köderprotein die C-terminale Domäne eines unbekannten Proteins identifiziert. (Storch, 1999). Ziel dieser Untersuchung war die Identifizierung neuer zytosolischer Proteine, die Adaptorproteinfunktionen beim zielgerichteten Transport des 300 kDa Mannose-6-Phosphat Rezeptors übernehmen können. Nach Klonierung der vollständigen cDNA des p66 genannten Proteins wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst ein polyklonales Antiserum gegen die C-terminale Domäne (Aminosäuren 394-587) von p66 generiert und das unbekannte Protein durch verschiedene biochemische Untersuchungen charakterisiert.

In Western-Blot-Analysen von Proteinextrakten aus humanen Fibroblasten, der humanen Cervix-Carcinom Zelllinie HeLa S3 und der humanen embryonalen Nieren-Zelllinie HEK293 wurde nur in HeLa-Zellen eine schwache endogene Expression eines Proteins der molaren Masse von 66 kDa detektiert. Gleichzeitig war bei allen Zelllinien eine starke Immunoreaktivität eines Proteins mit der molaren Masse von 93 kDa nachweisbar (Abb. 6 und 7). Ein Proteinsequenzvergleich der homologen humanen Proteine belegt, dass das 93 kDa-Protein möglicherweise identisch mit dem c14orf4 ist (Rampazzo et al., 2000), da die C-terminalen Aminosäuresequenzen von p66 (Aminosäuren 394-587) und c14orf4 (Aminosäuren 593-796) eine Identität von 72% besitzen (Abb. 5). Außerdem entspricht die molare Masse des aus 796 Aminosäuren bestehenden c14orf4-Proteins am ehesten dem Laufverhalten des 93 kDa immunoreaktiven Proteins (Abb. 6 und 7). Die anderen homologen Proteine IRF2-BP1 und IRF2-BP2B sind aufgrund der Länge der Polypeptidketten (584 bzw. 571 Aminosäuren) als das immunoreaktive 93 kDa Protein auszuschliessen.

6.1. Proteinchemische Analyse von p66

Aufgrund der Kreuzreaktivität des 93 kDa Proteins in allen untersuchten humanen Zelllinien und der niedrigen endogenen p66-Expression wurde ein geeignetes heterologes Zellkultursystem gesucht, das durch eine hohe p66-Expression nach transienter Transfektion bei fehlender Kreuzreaktivität des 93 kDa (c14orf4) Proteins mit dem anti-p66 Antiserums charakterisiert war. Nach transienter Transfektion von BHK-Zellen mit der p66 cDNA wurde in Western-Blot-Analysen ein 66 kDa Protein detektiert, das in Vektor-transfizierten Kontrollzellen nur schwach nachweisbar war. BHK-Zellen wurden in weiteren Versuchen zur Analyse der subzellulären Verteilung verwandt.

6.2. Sequenzvergleich der p66-Polypeptidsequenz mit homologen Proteinen

Während des Verlaufs dieser Doktorarbeit wurden die cDNA- und abgeleiteten Protein-Sequenzen der Bindungsproteine des Interferon-Regulatory Factors 2 (IRF2-BP2A und IRF2-BP2) veröffentlicht, die in einem Two-Hybrid-Screen mit einer cDNA-Bibliothek aus humaner Plazenta als Interaktionspartner der C-terminalen Domäne von IRF2 identifiziert wurden (Childs und Goodbourn, 2003). Proteinsequenzvergleiche belegen, dass die IRF2-BP2A und p66 cDNA-Sequenzen identisch sind. IRF2-BP2A (587 Aminosäuren) und IRF2-BP2B (571 Aminosäuren) sind alternativ gespleisste Isoformen von nukleären Proteinen mit einem N-terminalen Poly-Glutamin Sequenzabschnitt (Abb. 5). Koimmunpräzipitations-experimente zeigten, dass IRF2-BP2A *in vivo* mit dem Interferon Regulatory Faktor 2 (IRF2) interagiert. IRF2 ist ein Transkriptionsfaktor, der aus einer N-terminalen DNA-Bindungsdomäne (Aminosäuren 1-113), einer Aktivierungsdomäne (Aminosäuren 160-220) und einer C-terminalen Repressions-Domäne (Aminosäuren 290-349), die inhibierende Funktionen auf die Aktivierungsdomäne besitzt, zusammengesetzt ist (Taniguchi et al., 2001). IRF2 besitzt eine molare Masse von 40 kDa und ist im Zellkern lokalisiert. IRF-2 ist ein Repressor für Gene mit Interferon-abhängiger Transkription und IRF-Bindungsstellen in den Promotorregionen der Gene, wie z.B. 2'-5'-Oligoadenylate Synthase, iNOS und MHC Klasse I Moleküle (Taniguchi et al., 2001). Funktionelle Analysen belegen, dass IRF2-BP2A ein IRF-2 abhängiger Transkriptionskorepressor ist, der sowohl die basale als auch die Enhancer-aktivierte Transkription hemmt (Childs und Goodbourn, 2003). Ein weiterer Hinweis, dass p66 möglicherweise über eine Transkriptionsrepression wichtige Zellteilungs- und Zellzyklusvorgänge hemmt, ist die Beobachtung, dass keine stabilen Zellklone nach Transfektion mit der p66 cDNA generiert werden konnten.

Die IRF2-BPs binden an die C-terminalen 58 Aminosäuren von IRF2 (Childs und Goodbourn, 2003). Ein Sequenzvergleich der C-terminalen Domäne von IRF2 (Aminosäuren: 292-349; Accession Nr. NP_002190, Harada et al., 1989) und der zytoplasmatischen Domäne des bovinen MPR300 (Aminosäuren 2336-2499; Accession Nr. NP_776777, Lobel et al., 1987) belegt keine signifikanten Homologien (Homologie IRF2/MPR300-CT: 18,6%) und keine identischen oder homologen Peptidsequenzen in den beiden Domänen.

Die Sequenzvergleiche und die hohen Homologien im N- und C-terminalen Sequenzbereich belegen, dass p66 ein Mitglied einer Proteinfamilie mit N-terminalen Poly-Glutamin-Abschnitten variabler Länge ist. Bei p66/IRF2-BP2A und IRF2-BP2B umfassen die N-terminalen Poly-Glutamin-Abschnitte 5 und bei dem homologen c14orf4-Protein 25 Glutaminreste (Abb. 5).

6.3. Analyse von posttranslationalen Modifikationen von p66

Western-Blot-Analysen von PNGase F-behandelten p66-haltigen Zellextrakten ergaben, dass p66 keine *N*-glykosidisch verbundenen Oligosaccharidseitenketten besitzt und die beiden putativen *N*-Glykosylierungsstellen Asn(345) und Asn(410) nicht benutzt werden (Abb. 11). *N*-Glycosidische Modifikationen finden nach Translokation von Proteinen im Lumen des ER und im Golgi Apparat statt. Da Analysen der p66-Proteinsequenz aber zeigten, dass p66 keine abspaltbare *N*-terminale Signalsequenz besitzt, die bei löslichen Proteinen die Translokation in das ER vermittelt, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei p66 um ein Protein handelt, das nicht durch den sekretorischen Weg transportiert wird. Diese Befunde wurden auch durch Immunfluoreszenzanalysen belegt, die in transient mit der p66 cDNA transfizierten CHO-Zellen keine Kolokalisation von p66 mit Markerproteinen des ER (PDI, Abb. 17) und des sekretorischen Pfades (cis-Golgi GM130, Abb. 17) detektierten.
Die Bindung bekannter zytosolische Adaptorproteine wie AP-1 und AP-2 µ-Ketten sowie der GGA1 und GGA3-Adaptorproteine an die MPR300-CT wird durch Phosphorylierung verstärkt (Wilde und Brodsky, 1996; Fingerhut et al., 2001; Ricotta et al., 2002; Ghosh et al., 2003). Außerdem zeigten proteomische 2D-Analysen von nukleären Phosphoproteinen aus HeLa-Zellen und Maushirn, dass die Serin-Reste des homologen 93 kDa c14orf4-Proteins in den Positionen 657, 659 und 662 phosphoryliert sind (Ballif et al., 2004; Beausoleil et al., 2004). Diese Serin-Reste sind auch in p66 konserviert (Ser 455, 457 und 460, Abb. 5). Es sollte deshalb untersucht werden, ob p66 durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert werden konnte. In *in vitro*-Dephosphorylierungsexperimenten wurde keine Phosphorylierung von p66 detektiert (Abb. 12). Diese Befunde müssten jedoch noch mit 2D-Elektrophorese oder mit radioaktiver Markierung mit $^{32}P/^{33}P$ und anschließender Immunpräzipitation überprüft werden.

6.4. Subzelluläre Lokalisation von p66

Zur Analyse der intrazellulären Lokalisation von p66 wurden subzelluläre Fraktionierungen mit anschliessender Western-Blot Analyse und Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie-Analysen durchgeführt. Nach differentieller Fraktionierung von postnukleären Überständen (PNS) war p66 zu 75% an Membranen und zu 25% im Zytosol lokalisiert ist. Die parallel an GFP überexprimierenden Zellen durchgeführte Fraktionierung zeigte wie erwartet eine 100%-ige Lokalisation im Zytosol. Damit konnte eine Kontamination der 100.000 x g Membranfraktion mit zytosolischem Protein ausgeschlossen werden. An welche Membranen p66 binden kann, muß durch Dichtegradientenzentrifugation und Organellenmarkervergleich weiter analysiert werden.

In der Doppellimmunfluoreszenzmikroskopie mit dem anti-p66-Antikörper konnte p66 in transfizierten BHK- und CHO-Zellen sowohl im Kernkompartiment als auch in perinukleären retikulären Strukturen detektiert werden. Es wurde keine Kolokalisation von p66 mit Markerproteinen des ER, des Golgi-Apparates und der späten Endosomen/Lysosomen beobachtet. Aufgrund der Homologien der C-terminalen p66-Aminosäuresequenz mit anderen Proteinen (IRF2-BP2B, IRF2-BP1 und c14orf4, Abb. 5) und der Kreuzreaktivität des p66-Antiserums in Western-Blot Analysen ist es möglich, dass diese Proteine nach Fixierung auch mit dem anti-p66 Antikörper reagieren und somit eine eindeutige spezifische Analyse der intrazellulären Lokalisation von p66 nicht möglich ist.

Aufgrund der Kreuzreaktivität des anti-p66-Antiserums wurde p66 mit einem C-terminalen Myc Epitop Tag fusioniert, gegen den etablierte poly- und monoklonale Antikörper kommerziell erhältlich sind und der eine anti-p66-Antiserum unabhängige Lokalisation erlaubt. Die Doppel-Immunfluoreszenz Untersuchungen von p66-Myc überexprimierenden CHO-Zellen zeigen, dass p66 im steady state im Kernkompartiment lokalisiert ist, da die p66-Immunoreaktivität vollständig mit dem Kernfarbstoff DAPI überlappt (Abb. 17). Die Lokalisation im Kernkompartiment wurde unabhängig mit zwei verschiedenen anti-Myc Antikörpern nachgewiesen. Die Lokalisation von p66 ist nicht zelltypspezifisch, da p66 auch in HeLa-Zellen im Kernkompartiment lokalisiert war. Es wurde keine Kolokalisation von p66 mit Markerproteinen anderer Organellen (endoplasmatisches Reticulum, Golgi, Endosomen, Lysosomen, Mitochondrien), an der Plasmamembran oder im Zytosol in der Immunfluoreszenzmikroskopie detektiert.

Aufgrund der fehlenden *N*-Glykosylierung und der fehlenden Kolokalisation mit Markerproteinen des sekretorischen Pfades ist es wahrscheinlich, dass p66 im Zytosol an freien Ribosomen translatiert wird und anschließend in das Kernkompartiment transportiert wird. Die zytosolische und membranassoziierten p66-Anteile sind möglicherweise die neusynthetisierte p66-Fraktion, die noch nicht in das Kernkompartiment importiert wurde.

Proteinsequenzvergleiche belegen, dass die p66-Polypeptidsequenz ein Kernlokalisierungssignal ^{356}LysArgLysPro^{359} enthält, das in der murinen p66/IRF2BP2A, den humanen IRF2-BP2B und c14orf4-Proteinsequenzen konserviert ist (Abb. 5). Kernlokalisierungssignale vermitteln durch Bindung an Importine den Transport zytosolischer Proteine in das Kernkompartiment (Görlich und Kutay, 1999). Die unterschiedlichen Lokalisationen nach Verwendung der anti-p66 bzw. der anti-Myc Antiseren (Abb. 16-18) lassen vermuten, dass eines oder mehrere der homologen Proteine nicht im Kernkompartiment, sondern in retikulären/ paranukleären Kompartimenten lokalisiert sein müssen.

Die Ergebnisse werden durch Arbeiten anderer Arbeitsgruppen zum Teil bestätigt. Subzelluläre Fraktionierungen zeigten, dass das mit p66 identische IRF2-BP2A fusioniert mit dem SV5-Epitop Tag in transfizierten HeLa-Zellen ausschliesslich in der Kern-Fraktion, jedoch nicht in der zytosolischen Fraktion detektierbar war (Childs und Goodbourn, 2003).

6.5. Bedeutung von p66 für intrazelluläre Transportfunktion des MPR300

Der anterograde und retrograde intrazelluläre Transport des MPR300 wird durch Adaptorproteine reguliert, die in Abhängigkeit von ihrem Phosphorylierungszustand im Cytosol oder in Assoziation mit Membranen des TGN und der endosomalen Kompartimente existieren. Da p66 i) sowohl im Zytosol als auch in Assoziation mit Membranen detektiert wurde und ii) im Two-Hybrid-System mit der MPR300-CT interagiert, wurde vermutet, dass p66 ein MPR300-bindendes Adaptorprotein darstellen könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der MPR300-abhängige intrazelluläre Transport von lysosomalen Enzymen in p66-überexprimierenden BHK-Zellen untersucht. Der MPR300 ist ein Cargo-Rezeptor für lösliche M6P-haltige lysosomale Enzyme und Analysen der intrazellulären Sortierung und Prozessierung neusynthetisierter lysosomaler Hydrolasen sind eine indirekte Nachweismethode für die intrazellulären Transportrouten und die Verteilung der MPR300. Die Interaktion zwischen der MPR300-CT und p66 *in vivo* könnte sowohl eine Bedeutung für die Sortierungsfunktion des MPR300 an Membranen des TGN, der endosomalen Kompartimente oder an der Zelloberfläche besitzen (Abb. 2). Möglicherweise reguliert die MPR300-CT/p66-Wechselwirkung sekundär die Interaktion mit zytosolischen Adaptorproteinen, die für den anterograden Transport (GGA1, GGA2, GGA3, AP-1) bzw. retrograden Transport (AP-1, PACS-1, EpsinR, TIP47, rab9) wichtig sind. Es ist möglich, dass p66 eine Komponente der Multi-Proteinkomplexe darstellt, die sich bei der Assemblierung und Abschnürung der MPR300-enthaltenden Clathrin-beschichteten Vesikel an Membranen des TGN oder der Endosomen durch multiple Protein-Protein-Interaktionen bildet.

Der intrazelluläre Transport des MPR300 wurde durch Analyse der Sortierung und Prozessierung des lysosomalen Markerenzyms Cathepsin D an p66-überexprimierenden BHK-Zellen untersucht (Abb. 13). Cathepsin D wurde als Markerprotein verwendet, da Antikörper im Labor vorhanden sind, die den spezifischen Nachweis und die Quantifizierung von Cathepsin D-Formen durch Western Blot-Analyse und Immunpräzipitation erlauben. BHK-Zelllen wurden transient mit der Cathepsin D cDNA allein bzw. mit der Cathepsin D und p66 cDNA kotransfiziert und Cathepsin D nach metabolischer Pulse-Chase Markierung aus Zellen und Medien immunpräziptiert. Die Immunpräzipitation erlaubt durch Nachweis der

Pro- und Intermediärformen des Cathepsin D und der Rate der sezernierten Cathepsin D-Proform indirekt eine Aussage über die korrekte anterograde und retrograde Sortierung der MPR300. Die Umwandlung der prälysosomalen 47 kDa Cathepsin D-Form (Intermediär-Form) in zwei reife Formen, eine schwere (31 kDa) und eine leichte Kette (13 bzw. 14 kDa), erfolgt proteolytisch im Lysosom (Gieselmann et al., 1984). Die proteolytische Prozessierung im Lysosom erfolgt jedoch unabhängig vom MPR300, da der Rezeptor keine Transportfunktionen zwischen endosomalen Kompartimenten und Lysosomen besitzt (Braulke, 1996). Die densitometrische Auswertung entsprechender Transportversuche in der vorliegenden Arbeit zeigte, dass die Fraktion des sezernierten Cathepsin D (27%) in p66 exprimierenden BHK-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (42%) vermindert war. p66 erhöht möglicherweise die Effizienz der MPR300-abhängigen Sortierung von neusynthetisiertem Cathepsin D im TGN oder es erhöht die MPR300-abhängige Wiederaufnahme des sezernierten Pro-Cathepsin D aus dem Medium. Da dem Medium während der Chase-Periode der kompetitive Inhibitor M6P zugesetzt wurde, sind Veränderungen der MPR300-abhängigen Endozytose von Cathepsin D aus dem Medium auszuschliessen. Daher ist eine Zunahme des anterograden Transportes/der Effizienz der Sortierung im TGN möglicherweise auf i) eine durch p66-vermittelte effizientere Rekrutierung von zytosolischen Adaptorproteinen oder von Clathrin an das TGN oder ii) eine p66-abhängige Konzentrierung der MPR300 in bestimmten Subkompartimenten des TGN zurückzuführen. Aufgrund der fehlenden Lokalisation von p66 am TGN oder an endosomalen Kompartimenten sind diese Mechanismen aber nicht nachweisbar gewesen. Nach Überexpression von p66 in CHO-Zellen war keine subzelluläre Umverteilung der MPR300 detektierbar. Doppelimmunfluoreszenmikroskopieanalysen zeigten keine Veränderung der MPR300 Lokalisation im Vergleich zu Vektor-transfizierten Kontrollzellen. Im steady state war der Hauptanteil der Rezeptoren weiterhin im TGN und in endosomalen Kompartimenten lokalisiert (Abb. 18).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde p66 in den Zellen überexprimiert, um die funktionelle Bedeutung auf die MPR300-abhängige Sortierung zu untersuchen. Dieser Versuchsansatz wurde gewählt, da die endogene p66-Expression sehr niedrig war. Um die Hypothese der Steigerung der anterograden MPR300-Transportrate durch p66 zu bestätigen, müsste zusätzlich die Sekretionsrate von Cathepsin D nach RNAi vermittelter Reduzierung der endogenen p66-Expression gemessen werden. Bei allen bisherigen Charakterisierungen von MPR300-Interaktionspartnern wurde eine signifikante intrazelluläre Umverteilung des MPR300 und eine Veränderung der Transportkinetik für lysosomale Proteine erst nach Verminderung der mRNA-Expression durch RNA-Interferenz bzw. knock-out eines der zytosolischen Clathrin-Adaptorproteine beschrieben. Die RNA induzierte Reduktion der Expression von Clathrin-Adaptorproteinen, die mit der MPR300-CT

interagieren und wichtig für intrazelluläre Transportschritte sind, bewirkt eine erhöhte Sekretionsrate lysosomaler Enzyme und /oder eine intrazelluläre Umverteilung des MPR300 (Dahms und Hancock, 2002). So resultiert die Expressionsverminderung der γ–Untereinheit von AP-1 in HeLa-Zellen durch RNA-Interferenz in einem Anstieg der Cathepsin D-Sekretion (78,5% im Medium) im Vergleich zu Kontrollzellen (47,5% im Medium, Ghosh et al., 2003b). Nach RNA-Interferenz vermittelter Erniedrigung der endogenen Expression eines der GGA-Proteine in HeLa-Zellen, die *in vitro* mit dem saurem Cluster Di-Leucin-Motiv in der zytoplasmatischen MPR300-Domäne interagieren (Zhu et al., 2001), wurde eine verminderte Abschnürungsrate von MPR300-Rezeptoren in Clathrin-beschichtete Vesikel im TGN, eine Umverteilung der MPR300-Rezeptoren aus dem TGN in endosomale Kompartimente und eine Fehlsortierung von Cathepsin D in das Medium beschrieben (Ghosh et al., 2003b).

6.6. Analyse der MPR300-abhängigen Endozytose lysosomaler Arylsulfatase B nach Überexpression von p66

Der MPR300 kann auch M6P-haltige lysosomale Enzyme an der Zelloberfläche binden und internalisieren. Nach Abschnürung von Clathrin-beschichteten Vesikeln an der Plasmamembran, Transport und Verschmelzung mit dem endosomalen Recycling-Kompartiment und Dissoziation der MPR300-Liganden Komplexe gelangen die lysosomalen Enzyme MPR300-unabhängig zum Lysosom (Ghosh et al., 2003a). Für die Internalisierung des Rezeptors sind das Tyrosin-haltige Sortierungssignal der MPR300-CT, AP-2 Adaptorproteine und Clathrin-Hüllproteine wichtig (Jadot et al., 1992; Harasaki et al., 2005).
Aufgrund der Interaktion von p66 mit der MPR300-CT im „Hefe Two-Hybrid“ System sollte die Hypothese überprüft werden, ob eine mögliche Interaktion *in vivo* die Endozytose des MPR300 beeinflusst. Zur Analyse der Endozytose des MPR300 wurde die M6P-abhängige Aufnahme des lysosomalen Enzyms Arylsulfatase B an p66 überexprimierenden BHK-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen bestimmt. Nach Überexpression von p66 wurde ein Anstieg der M6P-abhängigen Endozytoserate von [^{125}J]-ASB von etwa 13% im Vergleich zu GFP-transfizierten Kontrollzellen detektiert, der jedoch statistisch nicht signifikant war ($p>0.05$; student's t-Test; Abb. 15A). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass p66 weder mit der AP-2 abhängigen Internalisierung der MPR300 interferiert noch die Recyclingrate zur Plasmamembran beeinflußt. Weiterhin ist es wenig wahrscheinlich, dass p66 durch Störung des retrograden Transportweges zum TGN indirekt die Konzentration von MPR300 im Recyclingpool zur Plasmamembran verändert. Es liegen keine Befunde vor, wie sich die Erhöhung der zellulären Konzentration an AP-1 und -2 auf die Verteilung und den Transport der MPR300 auswirkt.

In der Literatur wurden bisher die zytosolischen, MPR300-CT interagierenden Clathrin-Adaptorproteine AP-1 und AP-2 beschrieben, deren Expressionshemmung die Internalisierungsrate der MPR300 erhöhen (Meyer et al., 2000; Harasaki et al., 2005). Hierbei wurden zwei Mechanismen diskutiert. Die Endozytoserate des MPR300 kann i) direkt durch Hemmung der Internalisierung an der Plasmamembran erniedrigt oder ii) indirekt durch Störung des retrograden Transportes des Rezeptors aus endosomalen Kompartimenten zum TGN erhöht sein. In HeLa-Zellen, deren endogene AP-2-Expression durch RNA-Interferenz inhibiert wurde, war die Zelloberflächenexpression von CD8-MPR300CT-Chimären, deren intrazelluläre Verteilung dem MPR300 entspricht, um den Faktor 3 erhöht (Harasaki et al., 2005). Die konstitutive, M6P-unabhängige Internalisierungsrate der CD8-MPR300CT-Chimären war in HeLa-Zellen mit inhibierter AP-2 Expression ebenfalls erhöht.

In Fibroblasten von AP-1-µ1A knock-out Mäusen war die MPR300 abhängige Endozytose von Arylsulfatase A im Vergleich zu Kontroll-Fibroblasten um den Faktor 7 erhöht (Meyer et al., 2000). Die erhöhte Endozytoserate wird verursacht durch eine erhöhte Internalisierungsrate des MPR300, da die MPR300-Konzentration an der Plasmamembran nicht verändert war (Meyer et al., 2001). Der Anstieg der MPR300-Internalisierung wird indirekt durch einen verminderten retrograden Transport aus endosomalen Kompartimenten zum TGN verursacht, der in einer Umverteilung und Akkumulation der MPR300 in endosomalen Kompartimenten resultiert.

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung von p66 bei der MPR300-abhängigen Endozytose lysosomaler Enzyme wäre die RNAi-vermittelte Reduzierung der endogenen p66-Expression in HeLa-Zellen. Mit dieser Methode kann die endogene Expression von Proteinen signifikant reduziert oder komplett inhibiert werden, deren Ausschaltung durch homologe Gen-Rekombination in der Maus möglicherweise letal wäre.

6.7. Analyse der Interaktion von p66 und dem MPR300 *in vivo*

Zur Analyse der *in vivo* p66-MPR300 Interaktion wurden BHK-Zellen verwendet, die p66 und den MPR300 transient überexprimieren. Nach Immunpräzipitation des humanen MPR300 sollte die Anwesenheit von p66 in den Präzipitaten durch Western-Blot-Analyse untersucht werden. In den Koimmunpräzipitations-Experimenten konnte jedoch keine Protein-Protein-Interaktion zwischen dem MPR300-Rezeptor und p66 detektiert werden.

Möglicherweise könnten Variationen der Pufferbedingungen, der Konzentration an Detergenzien und der Waschbedingungen dazu führen, Wechselwirkungen zwischen den beiden Proteinen zu detektieren. Es ist jedoch auch möglich, dass andere Adaptorproteine (z. B. AP-1, AP-2, GGA1-3) im Vergleich zu p66 mit höherer Affinität an die MPR300-CT

binden und die Interaktion mit p66 verhindern. *In vitro*-Bindungsexperimente (Pull-Down, Bia-Core) mit dem MPR300 oder der MPR300-CT und aufgereinigtem p66 wären eine experimentelle Option, um dieses Problem zu umgehen. Weiterhin kann die Interaktion zwischen p66 und MPR300 nur eine Subpopulation von Rezeptoren betreffen, z. B. phosphorylierte MPR300 in Subdomänen bestimmter Membranabschnitte, die nur Transportschritte betreffen, die mit den hier angewandten Methoden und den verwendeten Zellsystemen nicht nachweisbar sind. Der humane MPR300 umfaßt in L-Maus-Zellen fünf Phosphoisoformen, von denen bisher nur zwei als Casein-Kinase 2 Substrate identifiziert wurden (Rosorius et al., 1993). In welcher Stöchiometrie die verschiedenen potentiellen Phosphorylierungsstellen an welchen Membranen bzw. unter verschiedenen Bedingungen (z. B. Aktivierung der Proteinkinase A oder C) zu Veränderungen im Transportverhalten der MPR300 und der Interaktion auch mit p66 führen können, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Eine Protein-Protein-Interaktion *in vivo* zwischen p66 und dem MPR300 ist weniger wahrscheinlich, da keine Kolokalisaton der Proteine in Immunfluoreszenzanalysen detektiert wurde. Alle zytosolischen Adaptorproteine, die mit der MPR300-CT interagieren und wichtig für den intrazellulären Transport des Rezeptors sind, sind in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand an den äusseren Membranen von Kompartimenten lokalisiert, die der MPR300 beim intrazellulären Transport passiert. So kolokalisieren AP-1 und die GGA-Proteine am TGN/endosomalen Kompartimenten und AP-2 an der Plasmamembran mit dem MPR300 (Robinson und Bonifacino, 2001). Für die membranassoziierte p66-Fraktion, die nicht im Kernkompartiment lokalisiert ist, wäre eine Interaktion mit dem MPR300 theoretisch möglich. Da die Verteilung der membranassoziierten Fraktion ausserhalb des Kernkompartimentes nicht mit dem TGN, endosomalen Kompartimenten oder der Plasmamembran in Doppelimmunfluoreszenz-Analysen überlagerte, ist eine Protein-Protein Interaktion in diesen Kompartimenten weniger wahrscheinlich.

7. Zusammenfassung

1. Ein Antiserum gegen die C-terminale Domäne von p66 wurde in Western-Blot-Analysen, in der Immunpräzipitation und in Immunofluoreszenz-Analysen untersucht. In Western-Blot-Analysen aus Homogenaten verschiedener humaner epithelialer Zelllinien war eine Expression von p66 nur in HeLa-Zellen zu detektieren. In allen untersuchten Zelllinien war eine starke Expression eines homologen 93 kDa-Proteins nachweisbar. In metabolisch markierten, p66 transient-überexprimierenden BHK-Zellen wurde mit dem Antiserum spezifisch ein 66 kDa Protein präzipitiert. Diese Befunde belegen, dass p66 in BHK-Zellen hauptsächlich vom M1-Startcodon ausgehend translatiert wird.
2. Nach *in vitro* Translation der p66 cDNA in einem Reticulozytenlysat wurden zwei Banden von 66 kDa und 60 kDa detektiert, die wahrscheinlich durch Translation von zwei Startcodons (M1, M28) resultieren.
3. Nach Ultrazentrifugation von postnukleären Überständen wurde p66 sowohl in der zytosolischen Fraktion (25%) als auch in einer Gesamt-Membranfraktion (75%) detektiert. Aufgrund der fehlenden Transmembrandomänen und fehlender gpi-Anker-Konsensussequenz ist p66 wahrscheinlich kein integrales Membranprotein, sondern mit Membranen assoziiert.
4. Die beiden Konsensussequenzen für *N*-verbundene Glykosylierung $Asn^{345}GS$ und $Asn^{410}RT$ von p66 werden in BHK-Zellen *in vivo* nicht benutzt.
5. Es wurden keine phosphorylierten p66-Formen detektiert, so dass die Assoziation/ Dissoziation von p66 an Membranen wahrscheinlich nicht durch Phosphorylierung/ Dephosphorylierung reguliert wird.
6. In Immunfluoreszenzanalysen an transient transfizierten CHO-Zellen kolokalisiert ein p66-Myc Fusionsprotein im steady state mit dem Kernkompartiment-Marker DAPI.
7. Pulse-Chase Analysen zeigten, dass die Überexpression von p66 die MPR300 abhängige Sortierung von neusynthetisiertem Cathepsin D im Golgi-Apparat verbessert. Gleichzeitig war die Prozessierung von Cathepsin D nicht verändert.
8. In p66-überexprimierenden BHK-Zellen war die MPR300-abhängige Endozytose von Arylsulfatase B im Vergleich zu Kontrollzellen statistisch nicht signifikant um etwa 13% erhöht.
9. In Immunfluoreszenzanalysen wurde nach transienter Expression von p66 keine Veränderung der intrazellulären Verteilung der MPR300-Rezeptoren im Vergleich zu Kontrollzellen detektiert.
10. Zusammenfassend lassen die beschriebenen Beobachtungen die Vermutung zu, dass p66 möglicherweise den anterograden Transport des MPR300 verstärkt.

8. Literaturverzeichnis

Arighi, C. N., Hartnell, L. M., Aguilar, R. C., Haft, C. R., und Bonifacino, J. S. (2004) Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor J. Cell Biol. 165:123-133.

Ballif, B. A., Villen, J., Beausoleil, S. A., Schwartz, D., und Gygi, S. P. (2004) Phosphoproteomic analysis of the developing mouse brain. Mol. Cell Proteomics 3:1093-1101.

Beausoleil, S. A., Jedrychowski, M., Schwartz, D., Elias, J. E., Villen, J., Li, J., Cohn, M. A., Cantley, L. C., und Gygi, S. P. (2004) Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. Proc. Natl. Acad. Sci U S A. 101:12130-12135.

Bock, J. B., Klumpermann, J., Davanger, S., und Scheller, R. H. (1997) Syntaxin 6 functions in trans-Golgi network vesicle trafficking. Mol. Biol. Cell 8:1261-1271.

Bonifacino, J. S. (2004) The GGA proteins: adaptors on the move. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5:23-32.

Bonifacino J. S. und Glick, B. S. (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. Cell 116:153-166.

Bonifacino, J. S. und Rojas, R. (2006) Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 7:568-579.

Bradford (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

Braulke, T., Gartung, C., Hasilik, A., und von Figura, K. (1987) Is movement of mannose 6-phosphate-specific receptor triggered by binding of lysosomal enzymes? J. Cell Biol. 104:1735-1742.

Braulke, T. (1996): Origin of lysosomal proteins. In: Lloyd J. B., Mason R. W. (eds.) Subcellular Biochemistry: Biology of the lysosome, Vol. 27: 15-49, Plenum Press, New York.

Braulke T. (1999) Type-2 IGF receptor: a multi-ligand binding protein. Horm. Metab. Res. 31:242-246.

Byrd, J. C., Park, J. H., Schaffer, B. S., Garmoudi, F., und Mac Donald, R. G. (2000) Dimerization of the insulin-like growth facor/mannose 6-phosphat receptor. J. Biol. Chem. 275:18647-18656.

Byrd, J. C., und MacDonald, R. G. (2000) Mechanisms for high affinity mannose 6-phosphate ligand binding to the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. J. Biol. Chem. 275:18638-18646.

Carroll, K. S., Hanna, J., Simon, I., Krise, J., Barbero, P., und Pfeffer, S. R. (2001) Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. Science 292:1373-1376.

Chen, H. J., Remmler, J., Delaney, J. C., Messner, D. J., und Lobel, P. (1993) Mutational analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate/ insulin-like growth factor II receptor. A consensus casein kinase II site followed by 2 leucines near the carboxyl terminus

is important for intracellular targeting of lysosomal enzymes. J. Biol. Chem. 268:22338-22346.

Chen H. J., Yuan, J., Lobel, P. (1997): Mutational analysis of the cation-independent mannose 6- phosphate/ insulin-like growth factor II receptor. J. Biol. Chem. 272:7003-7012.

Childs, K. S., und Goodbourn, S. (2004) Identification of novel co-repressor molecules for Interferon Regulatory Factor-2. Nucleic Acids Research 31:3016-3026.

Crump, C. M., Xiang, Y., Thomas, L., Gu, F., Austin, C., Tooze, S. A., und Thomas, G. (2001) PACS-1 binding to adaptors is required for acidic cluster motif-mediated protein traffic. EMBO J. 20:2191-2201.

Cubitt, A., Heim, R., Adams, S., Boyd, A., Gross, L. und Tsien, R., (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. TIBS 20:448-455.

Dahms, N. M., und Hancock, M. K. (2002) P-type lectins. Biochim. Biopys. Acta. 1572:317-340.

Damke, H., Klumperman, J., von Figura, K., und Braulke, T. (1991) Effects of brefeldin A on the endocytic route. Redistribution of mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptors to the cell surface. J. Biol. Chem. 266:24829-24833.

Dell'Angelica, E. C., Shotelersuk, V., Aguilar, R. C., Gahl, W. A., and Bonifacino, J. S. (1999) Mol Cell. 3:11-21

Dell' Angelica, E. C., Puertollano, R., Mullins, C., Aguilar, R. C., Vargas, J. D., Hartnell, L. M., und Bonifacino, J. S. (2000) GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. J. Cell Biol. 149:81-94.

Dell' Angelica, E., und Payne, G. S: (2001) Intracellular Cycling of Lysosomal Enzyme Receptors: Cytoplasmatic Tails' Tales. Cell, 106:395-398.

Dennis, P. A., und Rifkin, D. B. (1991) Cellular activation of latent transforming growth factor beta requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 88:580-584.

Diaz, E., und Pfeffer, S. R. (1998): TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. Cell, 93:433-443.

Doray, B., Ghosh, P., Griffith, J., Geuze, H. und Kornfeld, S. (2002) Cooperation of GGAs and AP-1 in packaging MPRs at the trans-Golgi network. Science 297:1700-1703.

Duncan, M. C., Costaguta, G., Payne, G. S. (2003) Yeast epsin-related proteins required for Golgi-endosome traffic define a gamma-adaptin ear-binding motif. Nat. Cell Biol. 5:77-81.

Eskelinen, E. L., Tanaka, Y., und Saftig, P. (2003) At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. Trends Cell Biol. 13:137-145.

Figura von, K. und Hasilik, A. (1986) Lysosomal enzymes and their receptors. Annu. Rev. Biochem. 55:167-193.

Fingerhut, A., von Figura, K., und Höning, S. (2001) Binding of AP2 to sorting signals is modulated by AP2 phosphorylation. J. Biol. Chem. 276:5476-5482.

Gamroudi, F., Devi G., Slentz, D: H:, Schaffer, B. S. und Mac Donald, R.G. (1996) Truncated forms of the insulin-like growth factor(IGF II)/ mannose 6-phosphat receptor encompassing the IGF II binding site: characterization of a point mutation that abolishes IGF-II binding. Mol. Endocrinol. 10:642-651.

Ghosh, P., Dahms, N. M., und Kornfeld, S. (2003a) Mannose 6-Phosphate Receptors: New twists in the tale. Nature Reviews 4:202-212.

Ghosh, P., Griffith, J., Geuze, H. J., und Kornfeld, S. (2003b) Mammalian GGAs act together to sort mannose 6-phosphate receptors. J. Cell Biol., 163:755-766.

Ghosh, P., und Kornfeld, S. (2003) Phosphorylation-induced conformational changes regulate GGAs 1 and 3 function at the trans-Golgi network. J. Biol. Chem. 278:14543-1459.

Ghosh, P., und Kornfeld, S. (2004) The cytoplasmic tail of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor contains four binding sites for AP-1. Arch. Biochem. Biophys. 426:225-230.

Gieselmann, V., Pohlmann, R., Hasilik, A., von Figura, K. (1983) Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts. J. Cell Biol. 97:1-5.

Godar, S., Horejsi, V., Weidle, U. H., Binder, B. R., Hansmann, C., Stockinger, H. (1999) M6P/IGFII-receptor complexes urokinase receptor and plasminogen for activation of transforming growth factor-beta1. Eur. J. Immunol. 29:1004-1013.

Görlich D, und Kutay U. (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. Annu Rev Cell Dev Biol.;15:607-660.

Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. und Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J. Gen Virol. 36:59–74.

Greimel, P., Jabs, S.; Storch, S., Cherif, S. Honke, K., Braulke, T., und Thiem, J. (2006) In vitro sulfation of N-acetyl-lactosaminide by soluble recombinant human β-Gal-3'-sulfotransferase. Carbohydr. Res. 341:918-924.

Hanahan, D. (1985): Techniques for transformation of *E. coli*. Glover, D. M., eds., in: DNA cloning, IRL press, Oxford.

Hancock M. K., Haskins, D. J. Sun, G. und Dahms, N. M. (2002) Identification of residues essential for carbohydrate resognition by the insulin-like growth factor/mannose 6-phosphat receptor. J. Biol. Chem. 277:11255 –11264.

Harada, H., Fujita, T., Miyamoto, M., Kimura, Y., Maruyama, M., Furia, A., Miyata, T., und Taniguchi T. (1989) Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. Cell 58:729-739.

Harasaki, K., Lubben, N. B., Harbour, M., Taylor, M. J., und Robinson, M. S. (2005) Sorting of Major Cargo Glycoprotein's into Clathrin-Coated Vesicels. Traffic 6:1014-1026.

Hille-Rehfeld, A. (1995) Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. Biochim. Biophys. Acta. 1241:177–194.

Hirst, J., Lui, W. W., Bright, N. A., Totty, N., Seaman, M. N., und Robinson, M. S. (2000) A family of proteins with gamma-adaptin and VHS domains that facilitate trafficking between the trans-Golgi network and the vacuole/lysosome. J. Cell Biol. 149:67-80.

Höning, S., Ricotta, D., Krauss, M., Spate, K., Spolaore, B., Motley, A., Robinson, M., Robinson, C., Haucke, V., und Owen, D. J. (2005) Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2. Mol Cell 18:519-531.

Höflich, A., Wolf, E., Braulke, T., Koepf, G., Kesseler, R. U., Brem, G., Rascher, W., Blum, W., und Kiess, W. (1995) Does the overexpression of pro-insulin-like growth factor-II in transfected human embryonic kidney fibroblasts increase the secretion of lysosomal enzymes? Eur. J. Biochem. 15:172-178.

Honke, K., Tsuda, M., Koyota, S., Wada, Y., Iida-Tanaka, N., Ishizuka, I., Nakayama, J. and Taniguchi, N. (2001) Molecular cloning and characterization of a human beta-Gal-3'-sulfotransferase that acts on both type 1 and type 2 (Gal beta 1-3/1-4GlcNAc-R) oligosaccharides J. Biol. Chem. 276:267-274.

Jadot, M., Canfield, W. M., Gregory, W., und 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.

Johnson, K. F. und Kornfeld, S. (1992) A His-Leu-Leu sequence near the carboxyterminal terminus of the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is necessary for the lysosomal enzyme sorting function. J. Biol. Chem., 267:17110-17115.

Kang, J. X., Bell J., Beard, R. L., und Chandraratna, R. A. (1999) Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor mediates the growth-inhibitory effects of retinoids. Cell Growth. Differ. 10:591-600.

Klumpermann, J., Kuliawat, R., Griffith, J. M., Geuze, H. J. und Arvan, P. (1998) Mannose 6-phosphat receptors are sorted from immature secretory granulas via adaptor protein AP-1, clathrin, and syntaxin 6-positive vesicels. J.Cell Biol. 141:359-371.

Körner, C., Nurnberg, B., Uhde, M., und Braulke, T. (1995) Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor fails to interact with G-proteins. Analysis of mutant cytoplasmic receptor domains. J. Biol. Chem. 270:287-295.

Kornfeld, R., Bao, M., Brewer, K., Noll, C., und Canfield, W. M, (1998) Purification and multimeric structure of bovine N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase. J. Biol. Chem. 1273:23203-23210.

Kornfeld, S. und Mellman, I. (1989): The biogenesis of lysosomes. Annu. Rev. Cell Biol., 5:483-525.

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

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

Lin, S. X., Mallet, W. G., Huang, A. Y., und Maxfield, F. R. (2004) Endozytosed cation-independent mannose 6-phosphate receptor traffics via the endocytic recycling compartment en route to the trans-Golgi network and a subpopulation of late endosomes. Mol. Biol. Cell. 15:721-733.

Lobel, P., Dahms, N. M., Breitmeyer, J., Chirgwin, J. M., und Kornfeld, S. (1987) Cloning of the bovine 215-kDa cation-independent mannose 6-phosphate receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 84:2233-2237.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., und Randall, R. (1951) Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

Lui, W. W., Collins, B. M., Hirst, J., Motley, A., Millar, C., Schu, P., Owen, D. J., und Robinson, M. S. (2003) Binding partners for the COOH-terminal appendage domains of the GGAs and gamma-adaptin. Mol. Biol. Cell 14:23885-23898.

Mac Pherson, I. A. und Stoker, M. G. P. (1962) J. Virology, 16:147-152.

Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E. L., Hamann, J., Saftig, P., von Figura, K., und Schu, P. (2000). µ1A adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. EMBO J. 19:2193-2203.

Meyer, C., Eskelinen, E. L., Guruprasad, M. R., von Figura, K., und Schu, P. (2001) µ1A deficiency induces a profound increase in MPR300/IGF-II receptor internalization rate. J. Cell Sci. 114:4469-4476.

Misra, S., Puertollano, R., Kato, Y., Bonifacino, J. S., und Hurley, J. H. (2002) Structural basis for acidic-cluster-dileucine sorting-signal recognition by VHS-domains. Nature 415:933-937.

Motyka, B., Korbutt, G., Pinkoski, M. J., Heibein, J. A., Caputo, A., Hobman, M., Barry, M., Shostak, I., Sawchuk, T., Holmes, C. F., Gauldie, J., und Bleackley, R. C. (2000) Mannose 6-phosphate/insuline-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. Cell 103:491-500.

Muschol, N., Matzner, U., Tiede, S., Gieselmann, V., Ullrich, K., und Braulke, T. (2002) Secretion of phosphomannosyl-deficient arylsulphatase A and cathepsin D from isolated human macrophages. Biochem. J. 368:845-853.

Muschol, N., Storch, S., Ballhausen, D., Beesley, C., Westermann, J. C., Gal, A., Ullrich, K., Hopwood, J. J., Winchester, B., und Braulke, T. (2004) Transport, enzymatic activity, and stability of mutant sulfamidase (SGSH) identified in patients with mucopolysaccharidosis type III A. Hum. Mutat. 23:559-566.

Nakayama, K. und Wakatsuki, S. (2003) The structure of GGAs, the traffic controllers at the TGN sorting crossroads. Cell Structure and Function 28:431-442.

Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M. C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T., und Bonifacino, J. S. (1995) Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. Science 269:1872-1875.

Orsel, J. G., Sincock, P. M., Krise, J. P., und Pfeffer, S. R. (2000) Recognition of the 300-kDa mannose 6-phosphat receptor cytoplasmic domain by 47-kDa tail-interacting protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:9047 -9051.

Peden, A. A:, Park, G. Y., und Scheller, R. H. (2001) The di-leucine motif of vesicle – associated membrane protein 4 is required for it s localization and AP-1 binding. J. Biol. Chem. 276:49183-49187.

Peters, C., Schmidt, B., Rommerskirch, W., Rupp, K., Zuhlsdorf, M., Vingron, M., Meyer, H.E., Pohlmann, R., und von Figura K. (1990) Phylogenetic conservation of arylsulfatases. cDNA cloning and expression of human arylsulfatase B. J. Biol. Chem. 265:3374-3381.

Prekeris, R., Klumpermann, J., Chen, Y. A., und Scheller, R. H. (1998) Syntaxin 13 mediates cycling of plasma membran proteins via tubovesicular recycling endosomes. J. Cell Biol. 143:957-971.

Puck, T.T.; Cieciura, S. J., und Robinson, U. A. (1958) Genetics of somatic mammalian cells. J. Exp. Med. 108:945.

Puertollano, R., Randazzo, P. A., Presley, J. F., Hartnell, L. M., und Bonifacino, J. S. (2001a) The GGAs promote ARF-dependent recruitment of clathrin to the TGN. Cell 105:93-102.

Puertollano, R., Aguilar, R. C., Gorshkova, I., Crouch, R. J., und Bonifacino, J. S. (2001b) Sorting of mannose 6-phosphat receptors mediated by the GGAs. Science 292:1712-1716.

Rampazzo, A., Pivotto, F., Occhi, G., Tiso, N., Bortoluzzi, S, Rowen, L., Hood, L., Nava, A., und Danieli, G. A. (2000) Characterization of C14orf4, a novel intronless human gene containing a polyglutamine repeat, mapped to the ARVD1 critical region. Biochem. Biophys. Res. Commun. 278:766-774.

Rapoport, I., Yu, C. C., Cupers, P., Shoelson, S. E., und Kirchhausen, T. (1998) Dileucine-based sorting signals bind to the β-chain at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. EMBO J., 17:2148-2155.

Ricotta, D., Conner, S. D., Schmid, S. l., von Figura, K., und Höning, S. (2002) Phosphorylation of the AP2 mu subunit by AAK1 mediates high affinity binding to membrane protein sorting signals. J. Cell Biol. 156:791-795.

Riederer, M. A., Soldati, T., Shapiro, A. D., Lin, J., und Pfeffer, S. R. (1994) Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network. J. Cell Biol. 125:573-582.

Robinson, M. S., und Bonifacino, J. S. (2001) Adaptor-related proteins. Curr. Opin. Cell Biol. 13:444-453.

Robinson, M. S. (2004) Adaptable adaptors for coated vesicles. Trends Cell Biol. 14:167-174.

Rohrer, J. und Kornfeld, R. (2001) Lysosomal hydrolase mannose 6-phosphate uncovering enzyme resides in the trans-Golgi network. Mol. Biol. Cell 12:1623-1631.

Rosorius, O., Mieskes, G., Issinger, O.G., Körner, C., Schmidt, B., von Figura, K., und Braulke T. (1993) Characterization of phosphorylation sites in the cytoplasmic domain of the 300 kDa mannose-6-phosphate receptor. Biochem. J. 292:833-838.

Saiki, R. K., Gelfant, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higushi, R. M., Horn, G. T., Mullis, K. B., und Ehrlich, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491.

Saint-Pol, A., Yelamos, B., Amessou, M., Mills, I. G., Dugast, M., Tenza, D., Schu, P., Antony, C., McMahon, H. T., Lamaze, C., und Johannes, L. (2004) Clathrin adaptor epsinR is required for retrograde sorting on early endosomal membranes. Dev. Cell 6:525-538.

Schagger, H., und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166:368-379.

Scherer, W., Syverton, J., und Gey, G. (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. J. Exp. Med. 97:695-715.

Schmidt, B., Kiecke-Siemsen, C., Waheed, A., Braulke, T., und von Figura, K. (1995) Localization of the insulin-like growth factor II binding site to amino acids 1508-1566 in repeat 11 of the mannose-6-phosphate/ insulin like growth factor type II receptor. J. Biol. Chem., 270:14975-14982.

Schulze-Lohoff, E., Hasilik, A., und von Figura, K. (1985) Cathepsin D precursors in clathrin-coated organelles from human fibroblasts. J. Cell Biol. 101:824-829.

Scott, G. K , Gu, F., Crump, C. M., Thomas, L., Wan, L., Xiang, Y., und Thomas, G. (2003) The phosphorylation state of an autoregulatory domain controls PACS-1-directed protein traffic. EMBO J. 22:6234-6244.

Scott, G. K., Fei, H., Thomas, L., Medigeshi, G. R., und Thomas, G. (2006) A PACS-1, GGA3 and CK2 complex regulates CI-MPR trafficking. EMBO J. 25:4423-4435.

Seaman, M. N. (2004) Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. J. Cell Biol. 165:111-122.

Shiba, T., Takatsu, H., Nogi, T., Matsugaki, N., Kawasaki, M., Igarashi, N., Suzuki, M., Kato, R., Earnest, T., Nakayama, K., und Wakatsuki, S. (2002) Structural basis for recognition of acidic-cluster dileucine sequences by GGA1. Nature 415:937-941.

Shiba, Y., Takatsu, H., Shin, H. W., und Nakayama, K. (2002) γ-adaptin interacts directly with rabaptin-5 through its ear domain. J. Biochem. 131:327-336.

Storch, S. (1999) Wechselwirkungen von Proteinen mit den zytoplasmatischen Domänen der Mannose 6-Phosphat Rezeptoren; Dissertation, Georg-August Universität Göttingen.

Storch, S., Pohl, S., und Braulke, T. (2004) A dileucine motif and a cluster of acidic amino acids in the second cytoplasmic domain of the batten disease-related CLN3 protein are required for efficient lysosomal targeting. J. Biol. Chem. 279:53625-53634.

Storch, S., und Braulke, T. (2005) Transport of lysosomal enzymes. In: Lysosomes (P. Saftig, ed.) Georgetown: Landes Bioscience: Springer Science + Business Media, New York, 17-26.

Storrie, B., und Desjardins, M. (1996) The biogenesis of lysosomes is a kiss and run, continuous fusion and fission process? Bioessays 18:895-903.

Takatsu, H., Katoh, Y., Shiba, Y., und Nakayama, K. (2001) Golgi-localizing, γ-adaptin ear homology domain, ADP- ribolysation factor binding (GGA) proteins interact with acidic dileucine sequences with the cytoplasmatic domains of sorting receptors through their Vsp27p/Hrs/STAM (VHS) domains. J: Biol. Chem. 276:28541-28545.

Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., und Tanaka, N. (2001) IRF family of transcription factors as regulators of host defense. Annu. Rev. Immunol. 19:623-625.

Tiede, S., Storch, S., Lübke, T., Henrissat, B., Bargal, R., Raas-Rothschild, A., und Braulke, T. (2005a) Mucolipidosis II is caused by mutations in *GNPTA* encoding the alpha/ beta GlcNAc-1-phosphotransferase. Nat. Med., 11:1109-1112.

Tong, P. Y. und Kornfeld, S. (1989): Ligand interactions of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Comparison with the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. J. Biol. Chem., 264:7970-7975.

Tong, P. Y., Gregory, W., und Kornfeld, S. (1989): Ligand interactions of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. The stoichiometry of mannose 6-phosphate binding. J. Biol. Chem., 264:7962-7969.

Verheijen, F.W., und Mancini, G. M. S (2005) Lysosomal transporters and associated diseases. In: Lysosomes (P. Saftig, ed.) Georgetown: Landes Bioscience: Springer Science + Business Media, New York, 74-81.

Wan, L., Molloy, S., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Rybak, S. L., und Thomas, G. (1998) PACS-1 defines a novel gene family of Zytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization. Cell 94:205-216.

Wilde, A., und Brodsky, F. M. (1996) In vivo phosphorylation of adaptors regulates their interaction with clathrin. J. Cell Biol. 135:635-745.

York, S. J., Arneson, L. S., Gregory, W. T, Dahms, N. M., und Kornfeld, S. (1999) The rate of internalization of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is enhanced by multivalent ligand binding. J. Biol. Chem. 274:1164-1171.

Zhu, Y., Doray, B., Poussu, A., Letho, V. P., und Kornfeld, S. (2001) Binding of the GGA2 to the lysosomal enzyme sorting motif of the mannose 6-phosphat receptor. Science 292:1716-1718.

9. Anhänge

9.1. Lebenslauf

Name:	Adrian Daniel Meder
Geburtstag:	04.03.1979
Geburtsort:	Hamburg

Schulbildung:

1985 – 1989	kath. Grundschule St. Antonius in Hamburg
1989 – 1998	kath. Gymnasium St. Ansgar in Hamburg
1998	Abitur (Note: 2,0)

Studium:

seit SoSe 1999	Studium der Medizin an der Universität Hamburg
Sommer 2006	Ärztliche Prüfung mit der Note Gut (2,49) bestanden

Famulaturen:

März 2002	Ophthalmologischen Praxis Dr. Schwarzer, Hamburg
März 2003	Allgemeinen Chirurgie im Israelitischem Krankenhaus, Hamburg
Aug./ Sep. 2003	Orthopädie/Unfallchirurgie im St. Luke's Hospital, Malta
Aug./ Sep. 2004	Gefäßchirurgie im Tauranga Hospital, Neuseeland

Praktisches Jahr:

1.	Tertial Innere Medizin im Spital Dornach, Schweiz
2.	Tertial Orthopädie 1. Hälfte im Altonaer Kinderkrankenhaus (Hamburg) 2. Hälfte im AK Eilbek (Hamburg)
3.	Tertial Chirurgie im Spital Dornach, Schweiz

Weiterbildung:

Nov. 2006	Assistenzarzt in der Chirurgischen Klinik des Kantonspital Glarus, Schweiz.

Promotion:

Nov. 2002- Juli 2004	Stipendiat des Graduiertenkollegs 336 an der Universität Hamburg, Prof. Braulke, Universitätsklinikum Eppendorf, Klinik- und Poliklinik für Kinder und Jugendmedizin, Arbeitsbereich Molekularbiologie.

9.2. Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt Stephan Storch, der immer Zeit und Ruhe hatte, jegliche Frage zu beantworten und alle Versuche und Ideen in Experimente umzuwandeln.

Danken möchte ich auch Stephanie Kutschera, Nicola Ott, Stephan Tiede, Sandra Österreicher, Bettina Koch, Claudia Heine, Bernd Kübler, Sandra Pohl, Inke Stange, Juliane Bergmann, Chris Mühlhausen und Elke Hammer für 2 Jahre Rat und Tat in allen Lebenslagen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.
Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:……..