



**Untersuchungen zum Einfluss des bei
Patienten mit Lowe-Syndrom mutierten
humanen OCRL-Proteins auf endozytische
Prozesse in eukaryotischen Zellen**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
des Departments Biologie der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

vorgelegt von

Juliane Najm

aus Berlin

Hamburg 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Professor Dr. K. KUTSCHE
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. A. RODEWALD
Tag der Disputation: 12. Juni 2009

Hamburg, den 27. Mai 2009



Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

gewidmet dem Edison von Schöneberg

(denn die Gene dieses alten Narren leben immer noch...)

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen

I.	Zusammenfassung	1
II.	Einleitung	3
1.	Das Lowe-Syndrom	3
1.1	Klinik	4
1.2	Genetik	6
1.3	Funktion des OCRL-Proteins	6
2.	Endozytische Prozesse in eukaryotischen Zellen	9
2.1	Rezeptor-vermittelte Endozytose an der Plasmamembran	9
2.1.1	Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren	11
2.1.2	Transferrinrezeptor	12
2.1.3	„Low density lipoprotein“-Rezeptor	14
2.1.4	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor	15
3.	PtdIns(4,5)P₂ und Endozytose – mögliche Auswirkungen einer OCRL-Defizienz	16
4.	Ziel der Arbeit	19
III.	Material und Methoden	20
1.	Material	20
1.1.	Bakterienstämme	20
1.2	Zelllinien	20
1.3	Plasmide	21
1.3.1	Zur Verfügung gestellte Konstrukte	21
1.3.2	Ausgangsvektoren zur Herstellung neuer Konstrukte	21
1.3.3	Hergestellte Konstrukte	22
1.4	Oligonukleotide	22
1.4.1	Oligonukleotide für die <i>OCRL1</i> -Mutationsanalyse	23
1.4.2	Oligonukleotide für Klonierungen	24
1.4.3	Oligonukleotide für RT-PCR-Analysen	24
1.4.4	Oligonukleotide für Sequenzierungen	25
1.5	Antikörper	25
1.5.1	Primärantikörper	25

1.5.2	Sekundärantikörper	26
1.6	Chemikalien und Lösungsmittel	26
1.7	Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien	28
1.8	Computerprogramme und Datenbanken	29
1.9.	Medien, Zusätze, Puffer und Lösungen	30
1.9.1	Medien und Zusätze	30
1.9.1.1	Medien und Zusätze für die Bakterienkultivierung	30
1.9.1.2	Medien und Zusätze für die Bakterienkultivierung	30
1.9.2	Puffer und Lösungen	30
1.9.2.1	PCR-Puffer	30
1.9.2.2	Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese	31
1.9.2.3	Puffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot	31
1.9.2.4	Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz-Untersuchungen	32
1.9.2.5	Puffer und Lösungen für Endozytose-Experimente	32
1.9.2.6	Puffer und Lösungen zur DNA-Minipräparation von Plasmiden	32
1.9.2.7	Puffer und Lösungen zur DNA-Midipräparation von Plasmiden	33
1.9.2.8	Allgemeine Puffer	33
1.9.2.9	Lösungen für die cDNA-Synthese	33
1.10	Enzyme, Nukleinsäuren und Kits	33
1.10.1	Enzyme	33
1.10.2	Nukleotide	34
1.10.3	Längenstandards	34
1.10.4	Kits	34
1.11	Radioaktive Substanzen	34
2.	Molekularbiologische Arbeiten	35
2.1	Anzucht von <i>E.coli</i>	35
2.2	Präparation von Plasmid-DNA	35
2.2.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	35
2.2.2	Midi-Präparation von Plasmid-DNA	35
2.3	Isolierung und Amplifikation von genomischer DNA	36
2.3.1	Isolierung von genomischer DNA	36
2.3.2	Amplifikation von genomische DNA	36
2.4	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	36
2.5	Techniken zur Konzentrierung und Auftrennung von DNA	37

2.5.1	Aufreinigung von DNA und Restriktionsprodukten	37
2.5.2	Restriktionsenzymatische Spaltung von Plasmid-DNA	37
2.5.3	Agarosegelelektrophorese	37
2.6	Polymerase-Kettenreaktion	38
2.7	Kolonie-PCR	39
2.8	Prinzip der Reversen Transkriptions-PCR (RT-PCR)	39
2.8.1	RNA-Isolierung	39
2.8.2	Konzentrationsbestimmung von RNA	40
2.8.3	Auftrennung von RNA	40
2.8.4	cDNA-Synthese und RT-PCR	40
2.9	Zyklische DNA-Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Dideoxynukleotiden	40
2.10	Klonierungsexperimente	41
2.10.1	Klonierung mittels TOPO [®] TA -Technologie	41
2.10.2	Klonierung mittels Gateway [™] -Technologie	41
2.10.3	Ligation	42
2.10.4	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen mit Plasmid DNA	42
3.	Proteinbiochemische Methoden	42
3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
3.2	Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)	43
3.3	Immunologische Detektion immobilisierter Proteine auf PVDF-Membranen	44
3.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	44
3.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	44
3.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	45
4.	Zellbiologische Arbeitstechniken	45
4.1	Zellkultur	45
4.1.1	Allgemeine Kulturbedingungen	45
4.1.2	Passagieren von Zellen	46
4.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	46
4.1.4	Sterilisation der Deckgläschen	46
4.1.5	Beschichtung von Deckgläschen	46
4.1.6	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	47
4.2	Immunfluoreszenz-Analysen	47
4.3	Experimente zur Analyse endozytotischer Prozesse	49

4.3.1	Endozytose-Experimente mit Fluoreszenz-markierten Liganden in eukaryotischen Zellen	49
4.3.1.1	Qualitative Untersuchungen zur Aufnahme von Fluoreszenz-markiertem Transferrin, EGF und Dextran in eukaryotischen Zellen	49
4.3.1.2	Die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) als Methode zur Quantifizierung der Aufnahme von Fluoreszenz-markierten Liganden	49
4.3.1.3	Quantitative Bestimmung der Internalisierung von Fluoreszenz-markiertem Transferrin, EGF oder Dextran in Fibroblasten mittels FACS-Analyse	50
4.3.2	Endozytose-Experimente mit radioaktiv-markierten Liganden in primären Fibroblasten	51
4.3.2.1	Quantitative Bestimmung der Internalisierung von radioaktiv-markiertem „low density“ Lipoprotein (LDL)	51
4.3.2.2	Quantitative Bestimmung der Aufnahme von radioaktiv-markiertem Transferrin	51
4.3.2.3	Quantitative Bestimmung der Internalisierung von radioaktiv-markierter Arylsulfatase B	51
4.4	Quantitative Bestimmung der Anzahl der MPR300 in primären Fibroblasten	52
4.4.1	[¹²⁵ I]-ASB und [¹²⁵ I]-2C2-Bindungsassay	52
4.4.2	Quantitative Bestimmung der MPR300 auf der Zelloberfläche von primären Fibroblasten mittels FACS-Analyse	53
4.5	Umrechnung der experimentellen Werte in relative Werte	53

IV. Ergebnisse **54**

1.	Charakterisierung primärer Fibroblastenzellen von Patienten mit Lowe-Syndrom sowie einer obligaten Konduktorin	54
1.1	Vorbemerkungen	54
1.2	Nachweis der bereits bekannten Mutation im <i>OCRL1</i> -Gen in fünf Fibroblastenzelllinien von Patienten mit Lowe-Syndrom	54
1.3	Mutationsanalyse des <i>OCRL1</i> -Gens in drei Fibroblastenzelllinien von Patienten mit Lowe-Syndrom	58

1.4	Untersuchungen zum Einfluss von zwei Spleißmutationen und einer Mikrodeletion auf das Spleißen der <i>OCRL1</i> -hnRNA mit Hilfe der RT-PCR	59
1.5	Mutationsanalyse des <i>OCRL1</i> -Gens in einer holländischen Familie mittels RT-PCR-Analyse und Nachweis der Mutation mittels „Junction“-PCR	63
1.6	<i>OCRL1</i> -Expressionsanalyse in primären Fibroblastenzellen von Patienten mit Lowe-Syndrom mittels RT-PCR und Western-Blot-Analyse	68
2.	Zellbiologische Experimente zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von OCRL in COS-7-Zellen	70
2.1	Vorbemerkungen	70
2.2	Immunzytochemische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation verschiedener OCRL-Proteinvarianten	70
2.3	Analyse der subzellulären Lokalisation von Wildtyp-OCRL in COS-7-Zellen nach Koexpression verschiedener Rac1-Proteinvarianten	74
2.4	Untersuchung der subzellulären Lokalisation von OCRL in COS-7-Zellen nach EGF-Stimulation	76
3.	Experimente zur endozytischen Aufnahme von EGF und Transferrin in mit unterschiedlichen OCRL-Konstrukten transient transfizierten COS-7-Zellen	77
3.1	Herstellung von HA-OCRL-Konstrukten mit isolierter Phosphatase-Domäne, Expression in COS-7-Zellen und subzelluläre Verteilung	77
3.2	Rezeptor-vermittelte Endozytose von Fluoreszenz-markiertem epidermalem Wachstumsfaktor	79
3.3	Rezeptor-vermittelte Endozytose von Fluoreszenz-markiertem Transferrin	81
4.	Untersuchungen zur endozytischen Aufnahme verschiedener Liganden in primären Fibroblastenzellen von Patienten mit Lowe-Syndrom	84
4.1	Vorbemerkungen	84
4.2	Untersuchungen zur Internalisierung von Fluoreszenz-markiertem epidermalen Wachstumsfaktor in LS-Fibroblasten	84
4.3	Analyse der Rezeptor-vermittelten Endozytose von Transferrin	87

4.4	Untersuchungen zur LDL-Rezeptor-vermittelten Endozytose von radioaktiv-markiertem LDL	90
4.5	Untersuchungen zur Mannose-6-Phosphat Rezeptor-vermittelten Endozytose von radioaktiv-markierter Arylsulfatase B	91
4.6	Analyse der Gesamt- und Oberflächenbindung von [¹²⁵ I]-Arylsulfatase B	93
4.7	Quantitative Bestimmung der MPR300 auf der Zelloberfläche und im Zellinneren	94
4.8	Kolokalisationsstudien für den MPR300 mittels Immunfluoreszenz	96
V.	Diskussion	100
1.	<i>OCRL1</i>-Mutationen führen sehr wahrscheinlich zum Funktionsverlust des Proteins	100
2.	Die subzelluläre Lokalisation des OCRL-Proteins wird durch Wechselwirkung mit verschiedenen Interaktionspartnern vermittelt	102
3.	Die Überexpression von katalytisch aktiven OCRL-Proteinen hemmt die Endozytose von Transferrin, ohne die Internalisierung von EGF zu beeinflussen	105
4.	LS-Fibroblasten nehmen weniger Arylsulfatase B durch MPR300-vermittelte Endozytose auf als Kontroll-fibroblasten	108
5.	Modell für einen möglichen Pathomechanismus beim Lowe-Syndrom	111
VI.	Literaturverzeichnis	116
	Vorträge und Posterpräsentationen	127
	Danksagung	128
	Lebenslauf	129

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Absorption
A	Adenin
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AP	Adaptorkomplex
APPL1	" <u>A</u> daptor protein containing <u>p</u> hosphotyrosine interaction domain, <u>P</u> H domain and <u>l</u> eucine zipper <u>1</u> "
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Arf	ADP-Ribosylierungsfaktor
AS	Aminosäure
ASB	Arylsulfatase B
ASH	"[<u>A</u> SPM (abnormal spindle-like microcephaly-associated protein)/ <u>S</u> PD2 (spindle pole body2)/ <u>h</u> ydin]"
ATP	Adenosintriphosphat
BAA	Bisacrylamid
Bp	Basenpaar(e)
BSA	"bovine serum albumine" (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
CCP	"clathrin coated pit" (Clathrin-bedeckte Grube)
CCV	"clathrin coated vesicle" (Clathrin-bedeckter Vesikel)
CD	Kationen-abhängig
cDNA	„copy“-Desoxyribonukleinsäure" (komplementäre DNA)
COS-7	Fibroblasten-ähnliche Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze
cpm	counts per minute
C-Terminus	Carboxyterminus eines Proteins
dATP	desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	desoxy-Cytosin-Triphosphat
dGTP	desoxy-Guanosin-Triphosphat
DMEM	"Dulbecco´s Modified Eagle Medium" (Zellkulturmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„desoxyribonucleic acid" (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP, ddNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat, Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA1	„early endosome antigen 1“
EGF	„epidermale growth factor“
EGFR	EGF-Rezeptor
<i>et al.</i>	und Andere (<i>et altera</i>)
EtOH	Ethanol
F-Aktin	filamentöses Aktin
FBS	„fetal bovine serum" (fötales Rinderserum)
g, mg, μg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
G	Guanin

GAP	„GTPase activating protein“ (GTPase aktivierendes Protein)
GapDH	„Glycerin-aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase“ (Haushaltsgen)
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	GDP/GTP-bindendes Protein mit GTPase-Aktivität
h	Stunde („hour“)
HPLC	„high pressure liquid chromatography“ (Chromatographieverfahren)
HRP	„horseradish peroxidase“ (Meerrettich-Peroxidase)
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IPPC	„inositol polyphosphate phosphatase, catalytic domain homologue“
Kb	Kilobase
kDa	kilodalton
Km	Kanamycin
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LAMP-2	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein 2
LB	Luria-Broth-Medium
LDL	„low density lipoprotein“
LDLR	LDL-Rezeptor
LS	Lowe-Syndrom
m, cm, mm, µm, nm	Meter, Centimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
mA	Milliamper
M	Mol
M6P	Mannose-6-Phosphat
MEM	„Minimum Essential Medium“ (Zellkulturmedium)
min	Minute
mol, mmol, µmol, pmol	Mol, Millimol, Mikromol, Pikomol
MPR300	300 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MPR46	46 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MVB	„multi vesicular body“
NGF	„nerve growth factor“
NP40	nichtionisches Detergenz P40
mRNA	„messenger-RNA“ (Boten-Ribonukleinsäure)
N-Terminus	Aminoterminus eines Proteins
OCRL	„oculocerebrorenal syndrome of Lowe“
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PtdIns(4)P	Phosphatidylinositol-4-Phosphat
PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PtdIns(3,4,5) P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Protease-Inhibitor)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rab	„Ras-related in brain“
Rac	Protein mit GTPase-Aktivität („similar to ras-related C3 botulinum toxin substrate 1“)
Ras	GTPase, die in Ratten Tumore vom Sarcom-Typ induziert („rat sarcoma“)
Rho	Protein mit GTPase-Aktivität („Ras homology“)

RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
RNAi	RNA-Interferenz
RNAse	Ribonuklease A
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
sek.	Sekunden
Std.	Stunden
SH3	„Src homology“ (Proteindomäne)
T	Thymin
T61L	Mutation von Threonin nach Leucin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung („Tris-buffered saline“)
TBST	TBS + Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N'-N'-N'-N'-Tetramethylethyldiamin
TF	Transferrin
TfR	Transferrinrezeptor
TGN	<i>Trans</i> -Golgi-Netzwerk
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Momolaurat
U	Enzymeinheiten, „Units“ enzymatische Aktivität
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen („volume per volume“)
WB	Westernblot
w/v	Gewicht pro Volumen („weight per volume“)
WT	Wildtyp
Xq	langer Arm des X-Chromosoms
ZNS	zentrales Nervensystem

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

I. Zusammenfassung

Das Lowe-Syndrom (LS) ist eine X-chromosomal vererbte Multisystemerkrankung, die durch kongenitale Katarakt, selektive proximale Tubulopathie und mentale Retardierung gekennzeichnet ist. Mutationen im *OCRL1*-Gen führen zum LS. Das OCRL-Protein ist eine Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat [PtdIns(4,5)P₂]-spezifische 5-Phosphatase, die PtdIns(4)P produziert und primär am *Trans*-Golgi-Netzwerk und an frühen Endosomen lokalisiert ist. PtdIns(4,5)P₂ ist vor allem an der Plasmamembran zu finden, wo es als Ko-Rezeptor bei der Rekrutierung und Regulation von Plasmamembran-spezifischen akzessorischen Proteinen dient, und dadurch einen direkten Einfluss auf endozytotische Prozesse hat. Die Interaktion von OCRL mit für die Endozytose wichtigen Proteinen, wie Clathrin, AP-2, Rab5 und APPL1, sowie dessen Lokalisation an frühen endozytotischen Vesikeln lassen vermuten, dass eine durch OCRL vermittelte PtdIns(4,5)P₂-Dephosphorylierung an der Plasmamembran eine wichtige Rolle bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose spielen könnte. Dieser Annahme sollte in dieser Arbeit nachgegangen werden, indem Wildtyp-OCRL bzw. verschiedene Mutantenproteine exprimierende COS-7-Zellen und auch primäre Fibroblastenzellen von Patienten mit LS (LS-Fibroblasten) hinsichtlich ihrer Kapazität, verschiedene Liganden zu internalisieren, analysiert werden sollten.

Mit Hilfe von Koimmunfluoreszenzfärbungen wurde zunächst die subzelluläre Verteilung verschiedener OCRL-Proteinvarianten nach ektopischer Expression in COS-7-Zellen untersucht. Wildtyp-OCRL ist prominent am Golgi-Apparat lokalisiert – diese Lokalisierung ändert sich durch eine katalytisch inaktive 5-Phosphatase-Domäne nicht. Im Gegensatz dazu scheint die ASH-Domäne von OCRL für die Golgi-Lokalisation essentiell zu sein. Durch Expression der konstitutiv-aktiven Form der GTPase Rac1 bzw. EGF-Stimulation wird ektopisch exprimiertes Wildtyp-OCRL an die Plasmamembran von COS-7-Zellen transloziert, was die Hypothese stützt, dass OCRL an endozytotischen Prozessen beteiligt sein könnte. Mittels immunzytochemischer Experimente wurde die Internalisierung der Fluoreszenz-markierten Liganden EGF und Transferrin in OCRL-überexprimierenden COS-7-Zellen analysiert. Während die Überexpression von OCRL-Proteinvarianten mit intakter 5-Phosphatase-Domäne eine verminderte Internalisierung von Transferrin zur Folge hatte, wurde die

Transferrin-Aufnahme durch die Überexpression einer 5-Phosphatase inaktiven OCRL-Mutante nicht beeinflusst. Die Endozytose von EGF wurde durch keins der überexprimierten OCRL-Proteine verändert.

Um die Auswirkungen einer OCRL-Defizienz auf endozytotische Vorgänge zu untersuchen, wurden acht LS-Fibroblastenzelllinien genutzt. Die jeweils ursächliche Mutation im *OCRL1*-Gen konnte in diesen Zelllinien molekular-genetisch identifiziert bzw. verifiziert werden, und die OCRL-Defizienz wurde mittels Western-Blot Analyse bestätigt. In den LS-Fibroblasten zeigte sich im Vergleich zu Kontrollfibroblasten keine veränderte Aufnahme von Fluoreszenz-markiertem EGF oder Transferrin. Endozytosestudien mit den radioaktiv-markierten Liganden Arylsulfatase B (ASB) und „Low density lipoprotein“ (LDL) ergaben, dass die LDL-Internalisierung in Kontroll- und LS-Fibroblasten gleich war, im Gegensatz dazu aber für die ASB eine um bis zu 65% reduzierte Internalisierung in LS-Fibroblasten nachgewiesen werden konnte. Diese verminderte ASB-Aufnahme geht nicht auf eine reduzierte Anzahl der entsprechenden Rezeptoren (Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren) in den OCRL-defizienten Fibroblastenzellen zurück.

Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse vermuten, dass OCRL-abhängige Veränderungen der PtdIns(4,5)P₂-Homöostase das Rezeptor-Trafficking an der Plasmamembran auf unterschiedliche Weise beeinflussen können. So könnte eine durch eine OCRL-Defizienz bedingte Erhöhung der PtdIns(4,5)P₂-Konzentration zu einer intrazellulären Umverteilung der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren führen, wodurch möglicherweise die Konzentration dieser Rezeptoren im Recyclingpool zur Plasmamembran verringert wird und eine verminderte ASB-Aufnahme resultiert. Eine durch eine OCRL-Überexpression bedingte Erniedrigung der zellulären PtdIns(4,5)P₂-Konzentration könnte demgegenüber zu einer ineffizienten Rekrutierung von für die Transferrin-Internalisierung essentiellen akzessorischen Proteinen an die Plasmamembran führen, was eine verminderte Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Transferrin nach sich ziehen könnte.

II. Einleitung

1. Das Lowe-Syndrom

Das Lowe-Syndrom (LS; OMIM 309000), auch okulozerebrorenales Syndrom nach Lowe (OCRL) genannt, ist eine X-chromosomal vererbte Multisystemerkrankung, die in der Regel nur Männer betrifft und hauptsächlich mit Anomalien der Augen, der Nieren und des zentralen Nervensystems einhergeht. Die Krankheit tritt in allen Ethnien auf, ist aber mit einer Prävalenz von 1 zu 500.000 in der Allgemeinbevölkerung sehr selten. Die Erstbeschreibung des Krankheitsbildes erfolgte im Jahr 1952 durch Lowe und Mitarbeiter als „Syndrom mit Azidurie, verminderter Harnstoffproduktion der Nieren, Hydrophthalmus und geistiger Behinderung“ (Lowe *et al.* 1952). Das Auftreten und der Schweregrad der klinischen Merkmale variiert von einem Patienten zum anderen. Aufgrund der physischen und mentalen Einschränkungen der Betroffenen verläuft die Entwicklung allgemein stark verzögert. Charakteristisch für das LS ist das gewebsspezifische Auftreten der klinischen Merkmale. In der Abbildung 1 sind beispielhaft drei Patienten unterschiedlichen Alters mit LS gezeigt.

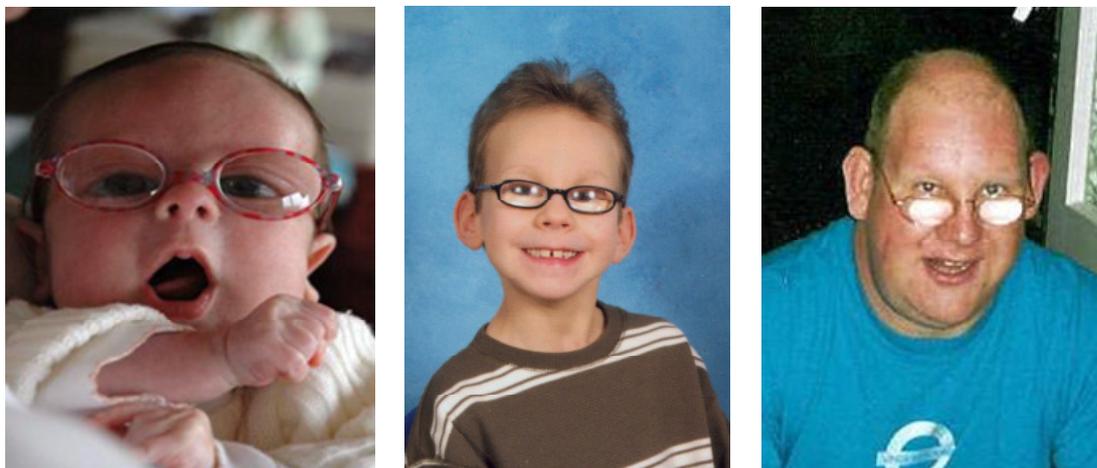


Abb. 1: Photographien ausgewählter Patienten mit LS

Neben der charakteristischen Augenproblematik, einem schmalen Gesicht und einer hohen Stirn zeigen Patienten mit LS in allen Altersgruppen keine besonderen fazialen Auffälligkeiten. Quelle: www.lowetrust.com; www.matthewdegorifoundation.org

1.1 Klinik

In der Regel wird bei den betroffenen Jungen direkt nach der Geburt oder in den ersten Lebenswochen eine beidseitige Trübung der Linsen, eine sogenannte Katarakt (Grauer Star), diagnostiziert (Abb. 2A). Die Linsen befinden sich anatomisch in den Hinterkammern der Augen zwischen Iris und Glaskörper und dienen der Fokussierung des Lichtes auf der Retina. Die Katarakt entsteht bereits *in utero*, vermutlich durch eine gestörte Migration oder Differenzierung der Linsenepithelzellen (Tripathi *et al.* 1986). Etwa die Hälfte der Patienten mit LS entwickelt innerhalb des ersten Lebensjahres einen erhöhten Augeninnendruck (Glaukom oder Grüner Star). Wenn dieser Zustand sich verschlechtert, kann es zu einer Schädigung des Sehnervs und damit verbunden zu Blindheit führen. Häufig treten auch Strabismus („Schielen“), Nystagmus („Augenzittern“) und im weiteren Verlauf typische Veränderungen der Kornea (Keloide, Abb. 2B) auf, die die Sicht der Patienten zusätzlich einschränken (Loi 2006). Konduktorinnen sind in der Regel klinisch unauffällig, sie zeigen aber typische Veränderungen der Linse in Form von kleinen punktförmigen Trübungen in der Peripherie, die durch eine Spaltlampenuntersuchung detektiert werden können (Abb. 2C).



Abb. 2: Kongenitale Augenveränderungen bei Patienten mit LS und einer Konduktorin

(A) Linsenbefund eines Patienten mit LS. Es ist eine Häufung von weißen unregelmäßigen Trübungen im Kern der Linse sichtbar. Abbildung aus Walton und Mitarbeiter, 2005. **(B)** Detaildarstellung des Auges von einem Patienten mit LS. Man sieht deutlich die Ausbildung einer wulstartigen Verdickung und Trübung der Kornea. Abbildung aus Rudolph und Mitarbeiter, 2004. **(C)** Linsenbefund bei einer Konduktorin für das LS. Es sind sektorale weiße Linsentrübungen umgeben von zahlreichen punktförmigen Trübungen in der Peripherie sichtbar (weiße Pfeile). Abbildung aus Röschinger und Mitarbeiter, 1999.

In den ersten Wochen und Monaten nach der Geburt funktionieren die Nieren der Patienten mit LS noch normal, aber innerhalb des ersten Lebensjahres entwickelt sich eine progressive Niereninsuffizienz, die hauptsächlich durch eine selektive proximale Tubulopathie charakterisiert ist (Vilasi *et. al.*, 2007; Bockenbauer *et al.* 2008). Dieses primäre Nierenproblem beim LS zeichnet sich durch einen vermehrten Verlust bestimmter Substanzen im Urin wie z.B. Kalzium, Albumin und anderer kleiner Proteine aus. Diese Substanzen werden normalerweise in dem Glomerulus des Nierennephrons aus dem Blut filtriert (Primärharn) und anschließend in dem proximalen Tubulus nach Bedarf mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose zurück resorbiert (Abb. 3).

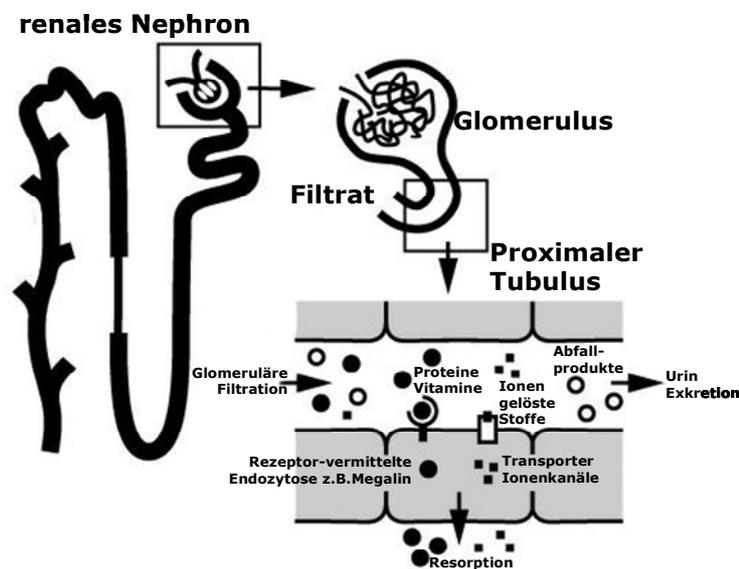


Abb. 3: Schematische Darstellung der Resorption im proximalen Tubulus eines Nephrons

Die Abbildung zeigt schematisch ein Nierennephron (links) als funktionelle Untereinheit der Niere. Rechts sind die Prozesse im proximalen Tubulus vergrößert dargestellt. Kleine Proteine wie Albumin oder proteingebundene Vitamine wie Retinol werden vom proximalen Tubulus durch Rezeptor-vermittelte Endozytose über den Megalin-Cubilin-Komplex resorbiert. Einige Substanzen wie Glucose und Aminosäuren werden mittels Symportcarrier im proximalen Tubulus aufgenommen.

In den Nieren der Patienten mit LS funktioniert diese Resorption in dem proximalen Tubulus nicht korrekt. Der Schweregrad der Nierenproblematik kann zwischen den einzelnen Patienten stark variieren und verschlechtert sich in der Regel mit zunehmendem Alter bis hin zum Nierenversagen (Loi 2006). Das begrenzt die durchschnittliche Lebenserwartung der Patienten auf etwa 35 bis 40 Jahre.

Nach der Geburt zeigen die Patienten mit LS eine ausgeprägte bis schwere Hypotonie, die oftmals mit dem Fehlen der Sehnenreflexe einhergeht. Die motorische Entwicklung ist verzögert und die mentalen Leistungen sind z.T. stark eingeschränkt. Die überwiegende Zahl der Patienten neigt zu Verhaltensauffälligkeiten wie Reizbarkeit und unkontrollierten Wutausbrüchen. Zwanghaftes Verhalten ist ebenfalls häufig anzutreffen (Kenworthy *et al.* 1993). Schätzungsweise die Hälfte der Patienten leidet nach dem 18. Lebensjahr unter Krampfanfällen und etwa 9% neigen im Erwachsenenalter zu Fieberkrämpfen (Loi 2006).

1.2 Genetik

Genau 40 Jahre nach der Erstbeschreibung des Krankheitsbildes wurde das ursächliche Gen für das LS, *OCRL1*, durch Nussbaum und Mitarbeiter identifiziert (Attree *et al.* 1992). Das *OCRL1*-Gen ist in der Region Xq26.1 lokalisiert, überspannt ca. 58 Kb und besteht aus 24 kodierenden Exons (Nussbaum *et al.* 1997). Es kodiert für ein Enzym aus dem Inositolphosphatstoffwechsel (Olivos-Glander *et al.* 1995; Suchy *et al.* 1995; Zhang *et al.* 1995), das eine signifikante Sequenzhomologie zu der 75 kDa Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat-5-Phosphatase II, dem Genprodukt des autosomalen *INPP5B*-Gens, aufweist (Attree *et al.* 1992). Bisher wurden mehr als 100 Genmutationen beschrieben, die mit einem Funktionsverlust des OCRL-Proteins einhergehen (Lin *et al.* 1997; Monnier *et al.* 2000). Etwa 30% der Mutationen liegen *de novo* vor (Monnier *et al.* 2000).

1.3 Funktion des OCRL-Proteins

Das OCRL-Protein ist eine ubiquitär exprimierte 5-Phosphatase mit einer molaren Masse von 105 kDa (Attree *et al.* 1992). Es ist intrazellulär am *Trans*-Golgi-Netzwerk (TGN), den frühen Endosomen, in Clathrin-beschichteten Transportvesikeln (CCV) und nach Wachstumsfaktorstimulation an der Plasmamembran lokalisiert (Olivos-Glander *et al.* 1995; Faucherre *et al.* 2005; Ungewickell *et al.* 2004; Choudhury *et al.* 2005; Erdmann *et al.* 2007). Das bevorzugte Substrat des Enzyms ist Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat [PtdIns(4,5)P₂], das durch das Protein zu Phosphatidylinositol-4-Phosphat [PtdIns(4)P] hydrolysiert wird. OCRL zeigt aber auch Substratspezifität gegenüber Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Trisphosphat [PtdIns (3,4,5)P₃] sowie

den löslichen Formen Inositol-(1,4,5)-Trisphosphat [Ins(1,4,5)P₃] und Inositol-(1,3,4,5)-Tetrakisphosphat [Ins(1,3,4,5)P₄] (Zhang *et al.* 1995). Phosphatidylinositole sind Bestandteile biologischer Membranen und fungieren in löslicher Form als intrazelluläre Botenstoffe. Vom OCRL-Protein werden zwei Transkriptvarianten exprimiert. Die eine Transkriptvariante kodiert für die Isoform A, die sich von der kürzeren, für die Isoform B kodierende Transkriptvariante durch die Anwesenheit eines 24 Bp langen Exons (18a) unterscheidet. Beide Isoformen sind in allen Geweben, mit Ausnahme des Gehirns, nachweisbar. Dabei ist die Isoform B in der Regel stärker exprimiert als Isoform A. Im Gehirn, insbesondere im Thalamus, der Großhirnrinde und im Hippocampus, findet sich hauptsächlich die Proteinvariante A (Johnson *et al.* 2003). Das OCRL-Protein weist drei funktionelle Domänen auf: die zentrale 5-Phosphatase-Domäne (IPPC), eine ASH-Domäne und eine C-terminale RhoGAP-Domäne (Abb. 4).

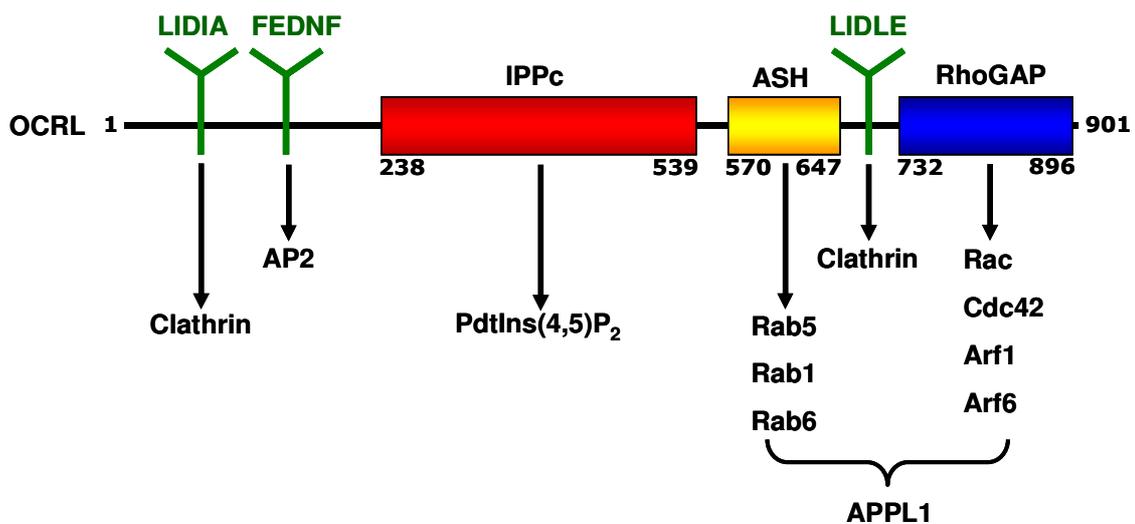


Abb. 4: Domänenstruktur von OCRL und bekannte Interaktionspartner

Die funktionellen Proteindomänen sind als farbige Kästchen dargestellt und spezifische Bindemotive (grün) sind angegeben. Die Pfeile zeigen auf die mit der jeweiligen Domäne/Motiv interagierenden Proteine. IPPc/■: Inositolpolyphosphat-5-Phosphatase-Domäne; ASH/■: ASPM, SPD-2, Hydin-Domäne; RhoGAP/■: GTPase aktivierendes Protein-ähnliche Domäne. Die schwarzen Zahlen geben die Aminosäurepositionen an.

Die **IPPC-Domäne** („inositol polyphosphate 5-phosphatase“) stellt die katalytische Einheit des Proteins dar und dient hauptsächlich der Hydrolyse von PI(4,5)P₂ zu PI(4)P. C-terminal von der IPPC-Domäne schließt sich eine **ASH-Domäne** an (**ASPM**, „abnormal spindle-like microcephaly-associated protein“; **SPD2**, „spindle pole body 2“; **Hydin**). ASH-Domänen sind in Proteinen zu finden, die mit Zilien, Flagellen, dem Zentrosom oder dem Golgi-Apparat assoziiert sind (Ponting 2006). OCRL interagiert über die ASH-Domäne mit verschiedenen Mitgliedern der Rab-Familie kleiner GTPasen, u.a. den Golgi-lokalisierten Rab1- und Rab6-Proteinen sowie dem endosomalen Rab5 (Hyvola *et al.* 2006). Die Integrität der ASH-Domäne von OCRL scheint auch für die Lokalisation des Proteins in der Zelle wichtig zu sein, denn Punktmutationen innerhalb der ASH-Domäne führen zu einer veränderten subzellulären Verteilung (Hyvola *et al.* 2006). Am C-terminalen Ende von OCRL befindet sich eine evolutionär konservierte, katalytisch inaktive **RhoGAP-Domäne** („GTPase activating protein“; Peck *et al.* 2002, Loovers *et al.* 2003, Faucherre *et al.* 2003). Dieser Bereich des Proteins vermittelt eine Bindung mit den kleinen Rho GTPasen Rac1 und Cdc42. Sowohl die aktive als auch die inaktive Form der Proteine kann an die RhoGAP-Domäne von OCRL binden (Faucherre *et al.* 2003). Die Interaktion mit Rac1 führt zu einer Translokation des OCRL-Proteins an die Plasmamembran (Faucherre *et al.* 2005). Es konnte auch gezeigt werden, dass verschiedene Mitglieder der Arf-Familie kleiner GTPasen, insbesondere Arf1 und Arf6, an die RhoGAP-Domäne binden können (Lichter-Konecki *et al.* 2006). Das Domänenmodul ASH-RhoGAP ist für die Bindung von OCRL an das Rab5-Effektorprotein APPL1 notwendig (Erdmann *et al.* 2007, McCrea *et al.* 2008). Interessanterweise führen alle bekannten Missensemutationen von Patienten mit LS in der ASH- und RhoGAP-Domäne zu einer verminderten Interaktion von OCRL und APPL1 (McCrea *et al.* 2008). Neben der Drei-Domänenstruktur besitzt OCRL verschiedene Protein-Bindemotive für Clathrin (LIDIA; LIDLE) und das Adaptorprotein AP-2 (FEDNF). AP-2 ist einer von vier verschiedenen Adaptorkomplexen, die die Sortierung von Proteinen in die CCVs vermitteln (Kirchhausen 1999; Nakatsu und Ohno 2003; Owen *et al.* 2004)

2. Endozytische Prozesse in eukaryotischen Zellen

Die Plasmamembran umschließt das Zytoplasma und dient als Abgrenzung zwischen dem Zellinneren und der extrazellulären Umgebung. Zur Aufrechterhaltung der Zellfunktionen und des intrazellulären Milieus ist es aber erforderlich, dass die Zellen mit ihrer Umgebung kommunizieren können. Daher besitzen eukaryotische Zellen spezielle Mechanismen, die einen Transport über die Plasmamembran ermöglichen. Die Aufnahme von extrazellulären Makromolekülen bezeichnet man als Endozytose und die Sekretion von neu synthetisierten Proteinen wie beispielsweise Hormonen und Antikörpern sowie von membranständigen Proteinen wie z.B. Rezeptoren wird Exozytose genannt.

2.1 Rezeptor-vermittelte Endozytose an der Plasmamembran

Bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose wird die Aufnahme eines Liganden durch einen spezifischen Rezeptor auf der Zelloberfläche reguliert. Die Bindung des Liganden erfolgt in vielen Fällen in abgegrenzten Bereichen der Zellmembran, den sogenannten Clathrin-bedeckten Gruben („clathrin coated pits“; CCPs). Einige Rezeptoren finden sich dort in besonders hoher Konzentration und erlauben so eine effiziente Endozytose. Andere Rezeptoren bilden nach Bindung des Liganden Dimere, wodurch die Formierung von neuen CCPs induziert wird (Dunn *et al.* 1984; Hopkins *et al.* 1985). Die Konzentrierung der Rezeptoren in den CCPs erfolgt aufgrund einer Interaktion zwischen spezifischen Erkennungssequenzen der Rezeptoren mit den Adaptorproteinen (APs; Kirchhausen 1993). Etwa 2% der Zelloberfläche von humanen Fibroblasten besteht aus CCPs (Anderson *et al.* 1977). Der wichtigste Bestandteil der CCPs ist Clathrin. Dabei handelt es sich um eine Struktur aus drei leichten (35 kDa) und drei schweren (180 kDa) Proteinketten, die zusammen das Clathrin-Triskelion bilden. Mehrere dieser Triskelia setzen sich zu Fünf- und Sechsecken zusammen und bilden ein Gitternetz auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran (Brodsky 1988). Die Verbindung zwischen Clathrin und Plasmamembran wird durch AP2 vermittelt (Ahle *et al.* 1988). Nach Bindung des Liganden erfolgt aufgrund der Interaktion verschiedener akzessorischer Proteine die Invagination des CCP und die Bildung eines Clathrin-beschichteten Vesikels (CCV) (Abb. 5).

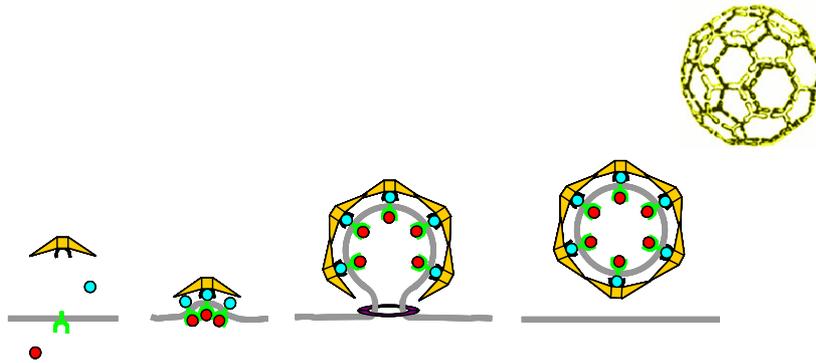


Abb. 5: Schematische Darstellung zur Bildung und Abschnürung eines Clathrin-beschichteten Vesikels von der Plasmamembran

Nach Bindung des Liganden (●) an den Rezeptor (Y) lagert sich das Adaptorprotein AP2 (●) an den Komplex an und rekrutiert Clathrin (Y) zur Membran (—). Die Membraneinstülpung schnürt sich unter Mitwirkung von Dynamin (○) in einem GTP-abhängigen Prozess von der Membran ab und bildet ein Clathrin-beschichtetes Vesikel (nach Alberts et al. 1995).

Der Mechanismus der Abschnürung ist nach wie vor nicht genau verstanden, aber eine wichtige Rolle spielt dabei die GTPase Dynamin (Takei *et al.* 1995; Hinshaw und Schmid 1995). Nachdem der Rezeptor-Ligand-Komplex im CCV in das Zellinnere gelangt ist, wird die Clathrinhülle des endozytotischen Vesikels in einem ATP-abhängigen Prozess entfernt (Rothman und Schmid 1986). Der intrazelluläre Weitertransport unterscheidet sich ab diesem Zeitpunkt für die einzelnen Rezeptoren und Liganden in Abhängigkeit von ihrer Struktur und Funktion. Einige Rezeptor-Ligand-Komplexe bleiben bestehen und werden gemeinsam wieder zur Zelloberfläche zurücktransportiert („Recycling“; z.B. der Transferrinrezeptor) (Dautry-Varsat *et al.* 1983). Andere Liganden hingegen dissoziieren von ihrem Rezeptor und gelangen über die Endosomen in die Lysosomen, wo sie enzymatisch abgebaut werden, während der Rezeptor zur Zelloberfläche zurücktransportiert wird (z.B. der LDL-Rezeptor) (Brown *et al.* 1983). Während die meisten Rezeptoren recycelt werden, gibt es aber auch die Möglichkeit, dass die Rezeptoren nach der Endozytose zusammen mit dem Liganden in die Lysosomen gelangen und dort abgebaut werden (z.B. der EGF-Rezeptor) (Herbst *et al.* 1994).

2.1.1 Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren

Eukaryotische Zellen besitzen zwei Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPRs), die nach ihren molaren Massen als MPR300 und MPR46 bezeichnet werden und vor allem dem Transport lysosomaler Enzyme dienen (Hille-Rehfeld 1995). In beiden Fällen handelt es sich um Typ I integrale Membranglykoproteine, die drei Strukturdomänen besitzen: eine N-terminale extrazytoplasmatische Domäne, eine Transmembrandomäne und eine C-terminale zytoplasmatische Domäne. Sie sind im TGN und in den endosomalen Kompartimenten, aber nicht in den Lysosomen lokalisiert (Bräulke 1996). Die subzelluläre Verteilung der beiden MPR ist ähnlich und überlagert sich mit den Transportwegen der lysosomalen Proteine (Bleekemolen *et al.* 1988). Allerdings ist etwa 3 bis 20% der Gesamtmenge an MPR300 einer Zelle, je nach Zelltyp, an der Plasmamembran zu finden. Das ist entweder auf eine Fehlsortierung der MPR300 im TGN (Lin *et al.* 2004) oder auf einen Recycling-Prozess aus den frühen bzw. späten Endosomen zurückzuführen (Tikkanen *et al.* 2000; Riederer *et al.* 1994). Der Mannose-6-Phosphat (M6P)-gesteuerte Transport von Liganden verläuft zum einen anterograd (vorwärtsgerichtet) vom TGN zu den Endosomen und zum anderen retrograd (rückwärtsgerichtet) zurück zum TGN. Der MPR300 zirkuliert außerdem zwischen den endosomalen Membranen und der Plasmamembran (Abb. 6).

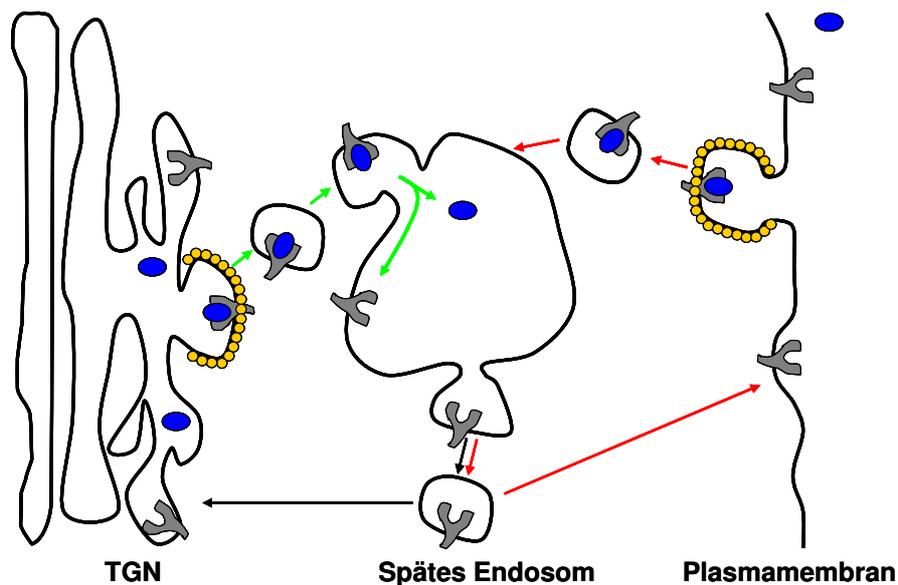


Abb. 6: M6P-vermittelte Transportprozesse in eukaryotischen Zellen

Die schematische Darstellung zeigt die intrazellulären Transportwege der MPRs (Y) und ihrer Liganden (●) zwischen dem TGN und den späten Endosomen sowie die Internalisierung von MPR300 an der Plasmamembran. Die Clathrin-abhängige (●) anterograde Route ist mit grünen Pfeilen markiert, und der retrograde Transportweg ist mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Clathrin-vermittelte Endozytose und der Transport aus endosomalen Kompartimenten an die Zelloberfläche sind durch rote Pfeile gezeigt.

Am Transport der lysosomalen Enzyme vom TGN zu den frühen Endosomen sind beide MPRs beteiligt. Die Bindung der Proteine an die MPRs erfolgt dabei über M6P-Reste, die als Sortierungssignale dienen. Im Anschluss an die Bindung werden die Rezeptor-Ligand-Komplexe über CCVs weitertransportiert. Nach Verlust der Clathrinhülle fusionieren diese dann mit den späten Endosomen (Kornfeld 1992; Hille-Rehfeld 1995). Aufgrund des niedrigeren endosomalen pH-Wertes dissoziieren die lysosomalen Proteine von den MPRs, und die MPRs werden mittels retrograden vesikulären Transportes zum TGN zurücktransportiert, wo sie erneut neu synthetisierte M6P-haltige Enzyme binden und zu den Endosomen transportieren können (Le Borgne und Hoflack 1998). Der aktive retrograde Transport verhindert, dass die MPRs in die Lysosomen transportiert und dort abgebaut werden (Bonifacino und Rojas 2006). Die lysosomalen Enzyme gelangen über die späten Endosomen zu ihrem Bestimmungsort, den Lysosomen.

2.1.2 Transferrinrezeptor

Nach Resorption über das Darmepithel werden die Fe^{3+} -Ionen im Blut mit Hilfe des Serum-Glykoproteins Transferrin zu den Zielzellen transportiert. Transferrin besitzt zwei Bindungsstellen für Fe^{3+} -Ionen und kann durch Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen werden. Der humane Transferrinrezeptor (TfR) ist ein dimeres, transmembranes Glykoprotein auf der Zelloberfläche. Er besteht aus zwei identischen, über Disulfid-Brücken verbundenen 90 kDa Untereinheiten (Schneider *et al.* 1982). Nach Bindung von Transferrin an seinen Rezeptor erfolgt die Clathrin-abhängige Aufnahme in die Zelle und der Transport zu den frühen Endosomen. Dort dissoziiert das Eisen aufgrund des niedrigen pH-Wertes vom Transferrin. Der Rezeptor bleibt jedoch mit dem Transferrin verbunden und gelangt in die Recycling-Endosomen, die einen effektiven Rücktransport des Rezeptor-gebundenen Transferrins zurück zur Zelloberfläche ermöglichen (Abb. 7).

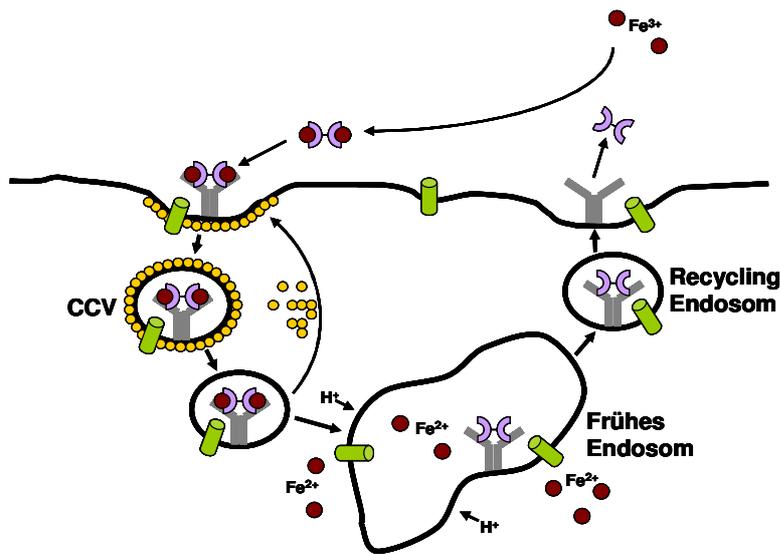


Abb. 7: Endozytose und Recycling des Transferrinrezeptors

Das Apo-Transferrin (Y) bindet freie Fe^{3+} -Ionen (\bullet) und wird dann in Form von Holo-Transferrin (\bullet) zusammen mit dem Transferrinrezeptor (Y) über CCVs aufgenommen und zu den frühen Endosomen transportiert. Dort wird das Eisen als Fe^{2+} -Ionen freigesetzt und mittels Eisen-Transporter (I) ins Zytoplasma transportiert. Der Rezeptor mit dem noch gebundenen Apo-Transferrin wird via Recycling-Endosom zur Plasmamembran zurücktransportiert. Der extrazelluläre neutrale pH-Wert bewirkt eine Freisetzung des Apo-Transferrins.

Die TfRs verlassen die Recycling-Endosomen über die Plasmamembran nach durchschnittlich 10 Minuten (McGraw und Maxfield 1990). Durch diesen vergleichsweise langsamen Zwischenschritt sind die Recycling-Endosomen die Hauptlokalisierung des intrazellulären Transferrins und seines Rezeptors. Da im extrazellulären Medium ein neutraler pH-Wert vorherrscht, löst sich das Transferrin an der Zelloberfläche vom Rezeptor und der TfR kann erneut eisenbeladenes Transferrin aufnehmen (Octave *et al.* 1983). Der intrazelluläre Transferrin-Zyklus dauert im Mittel ca. 16 Minuten (Omary und Trowbridge 1981).

2.1.3 „Low density lipoprotein“-Rezeptor

Die Aufnahme von Lipoproteinen geringer Dichte („low density lipoproteins“, LDL) in Zellen ist eines der am meisten untersuchten und deshalb auch am besten charakterisierten Systeme der Rezeptor-vermittelten Endozytose (Brown und Goldstein 1986). Der LDL-Rezeptor (LDLR) ist als Membranprotein auf der Oberfläche von nahezu allen Zelltypen exprimiert und dient der Regulation des Plasmacholesterinspiegels sowie der Aufrechterhaltung der zellulären Cholesterin-Homöostase. Die extrazelluläre Domäne des LDLR vermittelt die spezifische Bindung an das Apoprotein B-100, dem Proteinanteil der LDL-Nahrungsfette. In humanen Fibroblasten befinden sich zwischen 50 und 80 % der LDLR auf der Zelloberfläche in den bereits erwähnten CCPs (Goldstein *et al.* 1979). Diese spezifische Anreicherung der Rezeptoren ermöglicht eine effektive Internalisierung von LDL. Nachdem der Rezeptor-Ligand-Komplex die frühen Endosomen erreicht hat, dissoziiert das LDL aufgrund des sauren Milieus von seinem Rezeptor und akkumuliert im vesikulären Anteil des Endosoms (Maxfield und Yamashiro 1988). Im Gegensatz dazu finden sich die LDLR vermehrt in den tubulären Ausläufern des Endosoms (Geuze *et al.* 1987), die sich dann vom restlichen Organell ablösen und mit den Recycling-Endosomen fusionieren. Von dort erfolgt der Rücktransport der LDLR zur Zelloberfläche, von wo sie den Endozytosezyklus erneut durchlaufen können. Die abgespaltenen LDL-Partikel müssen von den frühen Endosomen aus der Degradation in den Lysosomen zugeführt werden. Dabei durchlaufen die frühen Endosomen einen Reifungsprozess (Dunn und Maxfield 1992), der mit einer Konformationsänderung hin zu kugelförmigen Vesikeln beginnt (Gruenberg *et al.* 1989), die auch als „multi vesicular bodies“ (MVBs) bezeichnet werden (Hopkins 1983; Dunn *et al.* 1986). Die MVBs mit den darin enthaltenen LDL-Partikeln bewegen sich aus der Peripherie der Zelle entlang der Mikrotubuli in die perinukleäre Region im Zentrum der Zelle (Gruenberg *et al.* 1989). Schließlich fusionieren diese späten Endosomen mit den Lysosomen und das endozytierte LDL wird abgebaut (Tabas 1995; Lange und Steck 1996). Der schematische Ablauf der LDL-Aufnahme ist in Abbildung 8 gezeigt.

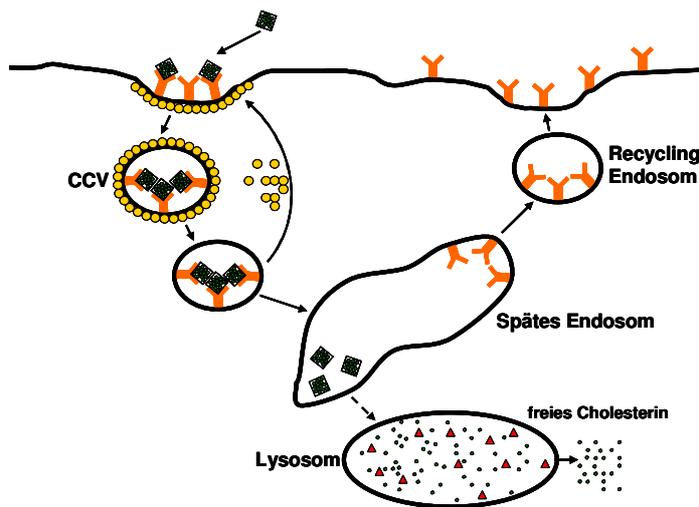


Abb. 8: Internalisierung und Recycling des LDL-Rezeptors

Nach Bindung des LDL-Partikels (■) an seinen Rezeptor (Y) wird dieser in einem Clathrin-abhängigen (○) Prozess aufgenommen und zu den Endosomen transportiert. Dort löst sich das LDL vom Rezeptor und wird zu den Lysosomen weitertransportiert, während der Rezeptor zur Oberfläche zurückbefördert wird. In den Lysosomen erfolgt der Abbau durch die sauren Hydrolasen (▲) und die Freisetzung des Cholesterins (●).

2.1.4 Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor

Bei der Regulation von Wachstum, Differenzierung und Teilung eukaryotischer Zellen spielen Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) eine wichtige Rolle. Dabei handelt es sich um Transmembranproteine, deren intrazelluläre Domänen Tyrosinkinaseaktivität besitzen, also die Fähigkeit die Tyrosin-Reste anderer Proteine zu phosphorylieren. Der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) ist ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe. Das 170 kDa große Glykoprotein ist gleichmäßig auf der Oberfläche von nahezu allen Epithel- und Stromazellen sowie auf bestimmten Glia- und Muskelzellen exprimiert und besitzt drei funktionelle Domänen: eine extrazelluläre Bindedomäne, eine zentrale Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne (Carpenter 2000; Ullrich und Schlessinger 1990). Am C-terminalen Ende des Proteins sind die Regionen für die Autophosphorylierung des Rezeptors lokalisiert (Wells 1999; Boulougouris und Elder 2002; Burgess *et al.* 2003), die der durch Ligandenbindung induzierten Dimerisierung folgt. Der Ligand des EGFR, der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), ist ein 53 Aminosäuren großes Signalmolekül, das bei zellulären Prozessen wie der Regulation von Zellproliferation und Differenzierung, Zellzyklus, Adhäsion und Apoptose eine Rolle spielt. Die Bindung von EGF an seinen Rezeptor induziert eine vermehrte Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe in neu entstehenden CCPs und entweder eine Homodimerbildung zwischen zwei EGFR-Molekülen oder eine Heterodimerbildung zwischen EGFR und einem anderen Mitglied aus dieser Rezeptorfamilie (Schlessinger 2002). In beiden Fällen folgt der Dimerisierung die

Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne (Yarden und Sliwkowski 2001) und die Clathrin-vermittelte Internalisierung der Rezeptor-Ligand-Komplexe (Bublil und Yarden 2007). Diese werden dann über die MVBs zu den Lysosomen transportiert, wo der Abbau von EGF und seinem Rezeptor erfolgt (Sorkin und Waters 1993). Abbildung 9 zeigt schematisch die EGF-vermittelte Endozytose des EGFR in einer eukaryotischen Zelle.

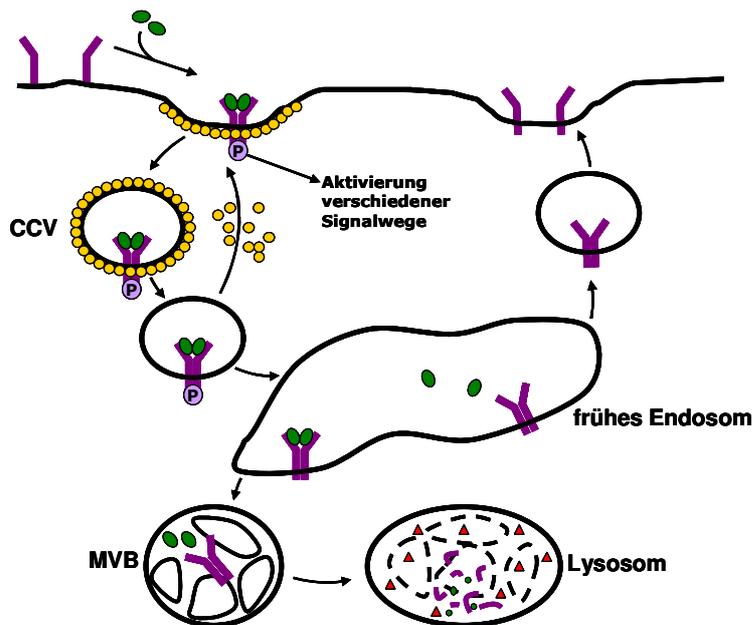


Abb. 9: EGF-Rezeptor-vermittelte Endozytose in eukaryotischen Zellen

Die Bindung von EGF (●) induziert eine Dimerisierung (Y) und Autophosphorylierung (P) des Rezeptors. Dieser wird über CCVs internalisiert und zu den Endosomen transportiert. Dort erfolgt entweder eine Sortierung zurück zur Plasmamembran oder ein Weitertransport von EGF und seinem Rezeptor via MVBs zu den Lysosomen, in denen die Degradation durch lysosomale Enzyme (▲) erfolgt.

3. PtdIns(4,5)P₂ und Endozytose – mögliche Auswirkungen einer OCRL-Defizienz

Bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose, insbesondere in der frühen Phase der Internalisierung, spielt das an der Plasmamembran lokalisierte Phosphoinositid PtdIns(4,5)P₂ eine entscheidende Rolle. Es fungiert als Ko-Rezeptor bei der Rekrutierung und Regulation von Plasmamembran-spezifischen akzessorischen Proteinen (Legendre-Guillemin *et al.* 2004). Alle bekannten Clathrin-Adaptorproteine (z.B. AP-2, AP180/CALM und Epsin) und andere endozytotische Faktoren, beispielsweise die für die Vesikelabschnürung wichtige GTPase Dynamamin, sind in der Lage, PtdIns(4,5)P₂ zu binden (Wenk *et al.* 2003; Gaidarov und Keen 1999; Owen *et al.* 2004). Im Vergleich zur Plasmamembran ist PtdIns(4,5)P₂ an intrazellulären Membranen kaum zu finden (Watt *et al.* 2002).

Für die Aufrechterhaltung der spezifischen PtdIns(4,5)P₂-Lokalisation an der Plasmamembran und für eine schnelle Dissoziation der akzessorischen Proteine nach erfolgter Internalisierung des endozytierten Vesikels ist es notwendig, dass das PtdIns(4,5)P₂ von den endozytierten Membranen entfernt wird (Di Paolo und Di Camilli 2006). Diese Aufgabe wird hauptsächlich von der PtdIns(4,5)P₂-spezifischen 5-Phosphatase Synaptojanin 2 wahrgenommen (McPherson *et al.* 1996), die durch die aktive Form (GTP-gebunden) der kleinen GTPase Rac1 an die Plasmamembran rekrutiert wird. So führt eine Synaptojanin 2-Defizienz zu einer Beeinträchtigung der frühen Phase der Rezeptor-vermittelten Endozytose von EGF und Transferrin (Rusk *et al.* 2003; Malecz *et al.* 2000). Da OCRL ebenfalls durch aktives Rac1 an die Plasmamembran transloziert wird (Faucherre *et al.* 2005), ist ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Dephosphorylierung von PtdIns(4,5)P₂ zu PtdIns(4)P durch OCRL an der Plasmamembran und der Rezeptor-vermittelten Endozytose denkbar. Gestützt wird diese Hypothese durch zahlreiche Interaktionspartner von OCRL (Clathrin, AP-2, Rab5), die in endozytotische Prozesse involviert sind. So konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich OCRL an den Clathrin-bedeckten Gruben befindet und nach Internalisierung mit dem Adaptorprotein APPL1 an frühen endozytierten Vesikeln kolokalisiert (Erdmann *et al.* 2007). Vorstellbar ist auch, dass eine OCRL-Defizienz zu einer unspezifischen Anreicherung von PtdIns(4,5)P₂ an intrazellulären Membranen (z.B. dem Golgi-Apparat) führt. Das wiederum könnte eine Fehlverteilung der an PtdIns(4,5)P₂-bindenden Proteine auslösen, die normalerweise an der Regulation der Rezeptor-vermittelten Endozytose an der Plasmamembran beteiligt sind (Abb. 10).

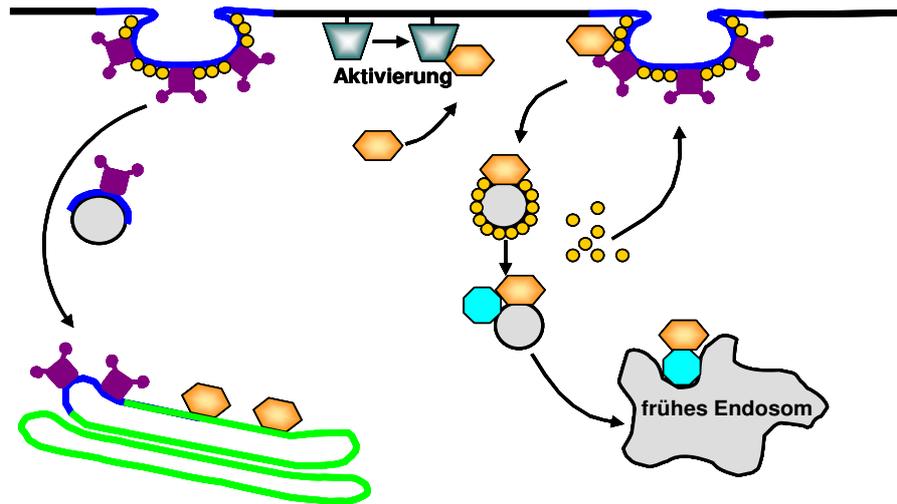


Abb. 10: Subzelluläre Lokalisation des OCRL-Proteins und mögliche Auswirkungen einer OCRL-Defizienz

Die Abbildung zeigt schematisch die Lokalisation des OCRL-Proteins (orange) am TGN, nach Rac1-Aktivierung (grün) an der Plasmamembran, an den Endosomen und an Clathrinbedeckten Transportvesikeln. OCRL kolokalisiert mit dem Adaptorprotein APPL1 (blau) an frühen endozytotischen Vesikeln und an einer Subpopulation früher Endosomen. Am Golgi ist die höchste Konzentration des Phosphoinositid PtdIns(4)P (grün) in der Zelle. Ein Fehlen des OCRL-Proteins könnte zu einer unspezifischen Akkumulation von PtdIns(4,5)P₂ (blau) am Golgi führen. Dadurch würden PtdIns(4,5)P₂-bindende, für die Endozytose benötigte Proteine, beispielsweise AP-2 (violett), zum Golgi transloziert werden und an der Plasmamembran fehlen (links).

In der Tat konnte bereits gezeigt werden, dass OCRL-defiziente Fibroblastenzellen von Patienten mit LS eine erhöhte intrazelluläre PtdIns(4,5)P₂-Konzentration aufweisen (Zhang *et al.* 1998; Wenk *et al.* 2003). In zahlreichen vorangegangenen Studien wurde demonstriert, dass eine Veränderung der intrazellulären PtdIns(4,5)P₂-Konzentration einen Einfluss auf die Rezeptorvermittelte Endozytose verschiedener Liganden hat (Malecz *et al.* 2000; Barbieri *et al.* 2001; Padron *et al.* 2003; Rusk *et al.* 2003). So konnte gezeigt werden, dass zu wenig PtdIns(4,5)P₂ die Endozytose von Transferrin hemmt, während zuviel PtdIns(4,5)P₂ zu einer verstärkten Internalisierung des Liganden führt (Padron *et al.* 2003).

4. Ziel der Arbeit

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war die Erforschung einer möglichen Beteiligung des OCRL-Proteins an endozytotischen Prozessen in eukaryotischen Zellen. Dabei wurden im Wesentlichen drei große Themenkomplexe bearbeitet.

Im ersten Teil der Arbeit sollten acht primäre Fibroblastenzelllinien von Patienten mit LS charakterisiert werden. Neben der Bestätigung der in Blutlymphozyten von Patienten mit LS gefundenen *OCRL1*-Mutation in fünf Fibroblastenzelllinien, sollte eine Mutationsanalyse des *OCRL1*-Gens in drei LS-Fibroblastenzelllinien durchgeführt werden, in denen die jeweils ursächliche genetische Veränderung noch nicht bekannt war. In einer holländischen Familie mit mehreren vom LS Betroffenen sollte durch eine *OCRL1*-RNA-Analyse die bisher nicht detektierte kausale Mutation aufgedeckt werden. Durch Untersuchungen auf Proteinebene sollte die genetische Veränderung im *OCRL1*-Gen in den Fibroblastenzelllinien bestätigt werden.

Im zweiten Abschnitt sollte die subzelluläre Verteilung des Wildtyp und verschiedener mutierter OCRL-Proteine nach ektoptischer Überexpression in COS-7-Zellen untersucht werden.

Im dritten Abschnitt sollte dann mit Hilfe von OCRL-überexprimierenden COS-7-Zellen bzw. primären, OCRL-defizienten Fibroblastenzellen von Patienten mit LS die Rezeptor-vermittelte Endozytose verschiedener Liganden, wie EGF und Transferrin, mittels immunzytochemischer Experimente analysiert werden. Zur Quantifizierung der erhaltenen Ergebnisse sollte die Methode der Durchflusszytometrie etabliert werden. Zudem sollte mit Hilfe von radioaktiv markierten Liganden die Menge an internalisierter Arylsulfatase B, ein lysosomales Enzym, sowie der Liganden Transferrin und LDL in den primären LS-Fibroblasten bestimmt und quantifiziert werden.

III. Material und Methoden

1. Material

1.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> DH10B	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80dlacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>deoR recA1 endA1 araD139</i> $\Delta(ara, leu)7697$ <i>galU galK</i> λ - <i>rpsL</i> (<i>Str^R</i>) <i>nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> DB3.1	F- <i>gyrA462 endA</i> $\Delta(sr1-recA)$ <i>mcrB mrr hsdS20</i> (r_B^-, m_B^-) <i>supE44</i> <i>ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20</i> (<i>Str^R</i>) <i>xyl5</i> λ - <i>leu mtl1</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> TOP10	F- $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80dlacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>deoR recA1 araD</i> <i>139</i> $\Delta(ara, leu)7697$ <i>galU galK rpsL</i> (<i>Str^R</i>) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme

Es ist jeweils der Name, die Eigenschaften und die Herkunft für die verwendeten Stämme angegeben.

1.2 Zelllinien

Name	Beschreibung	Herkunft	Firmenkennung
COS-7	Fibroblasten-ähnliche Zellen, Niere, Afrikanische grüne Meerkatze	DSMZ Braunschweig	ACC60
K1	dermale Fibroblasten eines gesunden 12-jährigen Jungen	Coriell Cell Respositories	GM00042
K2	dermale Fibroblasten einer gesunden erwachsenen Frau	UKE Hamburg, Kinderklinik	-
K3	dermale Fibroblasten eines gesunden erwachsenen Mannes	UKE Hamburg, Kinderklinik	-
LS1	dermale Fibroblasten eines 26-jährigen Mannes mit LS	Universitätsklinikum Jena	-
LS2	dermale Fibroblasten eines 11-jährigen Jungen mit LS	Kinderarztpraxis, Chemnitz	-
LS3	dermale Fibroblasten eines 1-jährigen Jungen mit LS	UKE Hamburg, Kinderklinik	-
LS4	dermale Fibroblasten eines Patienten mit LS unbekanntes Alters	Portugal, keine weiteren Angaben	-
LS5	dermale Fibroblasten eines 11-jährigen Jungen mit LS	Universitätsklinikum Essen	-
LS6	dermale Fibroblasten eines 10-jährigen Jungen mit LS	Coriell Cell Respositories	GM01676
LS7	dermale Fibroblasten eines männlichen Fetus (17SWS) mit LS	Coriell Cell Respositories	GM03265
LS8	dermale Fibroblasten eines 1-jährigen Jungen mit LS	UKE Hamburg, Kinderklinik	-
LS9	dermale Fibroblasten einer 43-jährigen Konduktorin	Universitätsklinikum Amsterdam	-

Tab. 2: Verwendete eukaryotische Zelllinien

Es ist jeweils der Name, die Beschreibung, die Herkunft und im Fall von käuflich erworbenen Zelllinien die Firmenkennung angegeben.

1.3 Plasmide

1.3.1 Zur Verfügung gestellte Konstrukte

	Konstrukt	Protein	Aminosäuren	Herkunft
OCRL	pENTR3C-OCRL+18a	Wildtyp-OCRL Isoform A (NM_000276.3)	2-901	AG Kutsche, UKE, Hamburg
	pENTR3C-OCRL-18a	Wildtyp-OCRL Isoform B (NM_001587.3)	2-893	AG Kutsche, UKE, Hamburg
	pMT2SM-HA-OCRL +18a	Wildtyp-OCRL Isoform A (NM_000276.3)	2-901	AG Kutsche, UKE, Hamburg
	pMT2SM-HA-OCRL -18a	Wildtyp-OCRL Isoform B (NM_001587.3)	2-893	AG Kutsche, UKE, Hamburg
	pMT2SM-HA-OCRL_493,500	OCRL mit Aminosäureaustausche R493A und R500T	2-893	AG Kutsche, UKE, Hamburg
	pMT2SM-HA-OCRL_ASH	OCRL mit Aminosäureaustausch V577E	2-893	AG Kutsche, UKE, Hamburg
Rac1	pRK5-MYC-Rac1	Wildtyp-Rac1 (NM_006908)	2-192	A. Schmidt, London, UK
	pRK5-FLAG-Rac1L61	konstitutiv-aktives Rac1 mit Aminosäure-austausch T61L	2-192	A. Schmidt, London, UK
	pRK5-MYC-Rac1N17	dominant-negatives Rac1 mit Aminosäure-austausch S17N	2-192	A. Schmidt, London, UK

Tab. 3: Konstrukte für die eukaryotische Expression, die bereits vorlagen

Angegeben sind jeweils der Name des Konstruktes, die Eigenschaften des kodierenden Proteins, die Anzahl der Aminosäuren sowie die Herkunft des Konstruktes.

1.3.2 Ausgangsvektoren zur Herstellung neuer Konstrukte

Vektor	Name	Eigenschaften	Herkunft
Eukaryotische Expressionsvektoren	pENTR/D-TOPO	Km ^r , ccdB	Invitrogen, Karlsruhe
	pENTR3C	Km ^r , ccdB	Invitrogen, Karlsruhe
GATEWAY-Vektoren	pMT2SM-HA-DEST	Amp ^r , HA- Epitop	AG Kutsche, UKE, Hamburg
	pcDNA-DEST53	Amp ^r , N-terminales EGFP-Fusionsprotein	Invitrogen, Karlsruhe
	pEGFP-C3	Km ^r , N-terminales EGFP-Fusionsprotein	Clontech Laboratories, Inc., Mountain View

Tab. 4: Übersicht über die Ausgangsvektoren zur Herstellung neuer Konstrukte

Es ist jeweils der Name, die Eigenschaften und die Herkunft für die verwendeten Vektoren angegeben.

1.3.3 Hergestellte Konstrukte

	Konstrukt	Oligonukleotide	Template	Aminosäuren
pENTR- Eingangskonstrukte	pENTR/D-TOPO-OCRL_IPPc	OCRL_IPPc_F OCRL_IPPc_R	pENTR3C-OCRL-18a	233-544
	pENTR/D-TOPO-OCRL_IPPc-CAAX(KRas)	OCRL_IPPc_F CAAX_KRas_R	pENTR3C-OCRL-18a	233-544
	pENTR/D-TOPO-OCRL_IPPc-CAAX(Rac1)	OCRL_IPPc_F CAAX_Rac1_R	pENTR3C-OCRL-18a	233-544

	Konstrukt	Herstellung	Aminosäuren
Ziel- konstrukte	pMT2SM-HA-OCRL_IPPc	Rekombination aus pENTR/D-TOPO-OCRL_IPPc	233-544
	pMT2SM-HA-OCRL_IPPc-CAAX(KRas)	Rekombination aus pENTR/D-TOPO-OCRL_IPPc-CAAX(KRas)	233-544
	pMT2SM-HA-OCRL_IPPc-CAAX(Rac1)	Rekombination aus pENTR/D-TOPO-OCRL_IPPc-CAAX(Rac1)	233-544
	pcDNA53-OCRL+18a	Rekombination aus pENTR ^T 3C-OCRL+18a	2-901
	pcDNA53-OCRL-18a	Rekombination aus pENTR 3C-OCRL-18a	2-893
	pcDNA53-OCRL_IPPc	Rekombination aus pENTR/D-TOPO-OCRL_IPPc	233-544
	pcDNA53-OCRL_IPPc-CAAX(KRas)	Rekombination aus pENTR/D-TOPO-OCRL_IPPc-CAAX(KRas)	233-544
	pcDNA53-OCRL_IPPc-CAAX(Rac1)	Rekombination aus pENTR/D-TOPO-OCRL_IPPc-CAAX(Rac1)	233-544
	pEGFP-C3-OCRL+18a	Rekombination aus pENTR3C-OCRL+18a	2-901
	pEGFP-C3-OCRL-18a	Rekombination aus pENTR3C-OCRL-18a	2-893
	pEGFP-C3-IPPc	Rekombination aus pENTR/D-TOPO-OCRL_IPPc	233-544
	pEGFP-C3-OCRL_IPPc-CAAX(KRas)	Rekombination aus pENTR/D-TOPO-OCRL_IPPc-CAAX(KRas)	233-544
	pEGFP-C3-OCRL_IPPc-CAAX(Rac1)	Rekombination aus pENTR/D-TOPO-OCRL_IPPc-CAAX(Rac1)	233-544

Tab. 5: Übersicht über die mittels GATEWAY-Technologie hergestellten Konstrukte

Für die Eingangskonstrukte ist jeweils der Name des Konstruktes, die für die PCR verwendeten Oligonukleotide, das Template für die PCR und die Anzahl der kodierenden Aminosäuren angegeben. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in Kapitel 1.4.2 nachzulesen. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und in einer Topoisomerasereaktion mit dem Eingangsvektor eingesetzt. Die Zielkonstrukte wurden ausschließlich über Rekombinationsreaktionen hergestellt. Es ist jeweils der Name, das Ursprungs-konstrukt und die Anzahl der kodierenden Aminosäuren angegeben.

1.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich® bezogen. Das Design der verwendeten Oligonukleotide (Primer) erfolgte i.d.R. manuell. Die Oligonukleotide wurden vor Gebrauch in 1 x TE gelöst, um eine Konzentration von 100 pmol/µl zu erhalten. Aliquots dieser Stammlösungen wurden anschließend auf 10 pmol/µl mit HPLC-H₂O verdünnt und in die PCR-Reaktion eingesetzt.

1.4.1 Oligonukleotide für die OCRL1-Mutationsanalyse

Tab. 6: Verwendete Oligonukleotide für die OCRL1-Mutationsanalyse

Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
OCRL1F	GGGAGCCAGTGTCTCGGATC
OCRL2R	GGTTCCTAAGCAAAACCTCAGG
OCRL3F	TCCAGGGAAGTAGATGCAG
OCRL3R	TGCAGTAATGACCGAGAAAA
OCRL4F	TGGTTGTAGTGAGTGGTTTTCTC
OCRL4R	GTTGAGTAAAAATCAAGCACATTC
OCRL5F	AAACATTTTATCCCATAGCAGTAT
OCRL5R	AATGGCCACTTTCCTCTGTATC
OCRL6F	AATTCTACTCAGTGAAAGACT
OCRL6R	CTGACTCTGCAATGACCATAGC
OCRL7F	TACCCTGGATATGTTGGATGTTAG
OCRL7R	ATTCTTTCTCTCGCTTTGCCAGG
OCRL8F	AACATATTTGCCTTGAGGAGA
OCRL8R	TAAATATCAACAGGCCACTGT
OCRL9F	GGAAGCGAAAAGAAAGAAC
OCRL9R	TGAACACCAAACATATAGCCA
OCRL10F	TGTTTCAACATATGGGACAGGAGG
OCRL10R	ATAATGGAATAACTCCCAGTGAGC
OCRL11F	GACATTAGAAATGTGGCAAAGATT
OCRL11R	AGTACACAGAACAAGCAACTGAAC
OCRL12F	GTTACTTTGGAAATGAGCTTG
OCRL12R	ACAGTATCTCACATTTAATC
OCRL13F	CCATTTTTCTTCTCTCCATCC
OCRL13R	CAATCTCATCTCCATCTAGGA
OCRL14F	CAGTGGCTTATCAACCTGATT
OCRL14R	GGGTCAGAAATAAGATCAAGCC
OCRL15F	ACCAGTGTGGTAGGTATTATGTTC
OCRL15R	TAACACCAAATAAATGAATG
OCRL16F	CCAAGGGAGATGAGCTAGAAGG
OCRL16R	TGTGCTAACACAGTGAGCAG
OCRL17F	GGAATAATCCAAGTACTTACTTCC
OCRL17R	TTAAACCAAGGGGATGGGAGTC
OCRL18F	TTGCTTCCCCTGGAGGTTTCC
OCRL18R	TTATCATTTGACATCCCCCGT
OCRL18aF	CTGTAAATTAATTCTAATCATA
OCRL18aR	ACAAATTCAGGGACCACAGTTA
OCRL19F	TGTGACTGTATCACCGGAGCACTG
OCRL19R	AGGTGTTGTGATTTCTATAGTAG
OCRL20F	GCTTCTGCTGCTCTTCTGATC
OCRL20R	GAGTTTGATCAAGTACTCATC
OCRL21F	GTGTGGCCTTCTCTCTG
OCRL21R	CTTCTCTATGGGCAATCTGC
OCRL22F	TTTTCTCACTGCCTGCCC
OCRL22R	GGATAAATGCACTAAGAGT
OCRL23F	TCCAGCCCTGAGGTTTTGCTTAGG
OCRL23R	TAAATCATTCTGAAATACTTGGAGC
IVS18_1F	GAGGAATGAATGGCTCTTTGGAA
IVS18_1R	CAGGAATTAATAAACTGAAATG
IVS18_2F	CCTCCATCAGTATTTAATCAAAGTC
IVS18_2R	CGAGGTAGGTCAAGCAGAAGAAG
IVS18_1Fneu	GGATTGTATGCAGAATCTCTTTGG
IVS18_1Rneu	GATACAATCACTCGCTCTGGCTAG
IVS18_2Fneu	GTGAACTAGGAAGGTGATTTGGAG
IVS18_2Rneu	CCTTTATTCAAGATGTCCTCTAAGC
IVS18_3F	GGTTCTAGTCTAAAATTGTATCAG
IVS18_3R	GCATTCTCCCACTACTGTTATC
IVS21_F1	GACCAGGTGGGTTCTACTGAC
IVS21_R1	GGTACTGTCAGCTACTGTGC
IVS21_F2	GGTTGTGTTGTTTCTACG
IVS21_R2	ACACCCTGCCTCACAATAGG
IVS21_F3	GACATTACCAGGAAGGATGG
IVS21_R3	GTCTAACTTCTATTATCTCC
IVS21_F4	CATCCATGCTAAGTGACATTG
IVS21_R4	GGAAGATGAAAGTAAGAGG
IVS21_F5	CATTGAGTGGACAGGGACC
IVS21_R-1	ATCAGCTTCACCAATTTACC

1.4.2 Oligonukleotide für Klonierungen

Tab. 7: Verwendete Oligonukleotide für Klonierungen

Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
OCRL_IPPc_F	CACCATGGAATATGTCAACATTGACTTTTCAGATTT
OCRL_IPPc_R	TCACCGGTACCTTCGTTTCATCCACAACCTTCAC
CAAX_KRas_R	TCATTACATAATTACACACTTTGTCTTTGACTTCTTTTTCTCTTTTACCATCTTTGCTCCGGTACC TTCGTTTCATCCACAACC
CAAX_Rac1_R	TCATTACAACAGCAGGCATTTTCTTCTCTTCTTTCACGGGAGGCGGGCAGAGCCGGTACCTTC GTTTCATCCACAACC

1.4.3 Oligonukleotide für RT-PCR-Analysen

Tab. 8: Verwendete Oligonukleotide für RT-PCR-Analysen

Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'		
OCRL-F1	ACTGTGCGAGGGTATGGAGATGAAG	4R (cDNA)	TGTTAGAAGCTATGTCAATC
OCRL-F2	AGAAAGCTCAGTCACAGCTTCTTG	5F (cDNA)	GTTCTCTCAGCTGTCCTTGC
OCRL-F3	CACCATGCGGAAGCTCTTTGTACC	6F (cDNA)	CCAGAAATTAGACTAAGG
OCRL-F4	AGAAAGTTCAACTGGTGCGCC	7F (cDNA)	CCTACTGGGATTCATCGGGAA
OCRL-F5	AGTTGAACATCATGAAACATGAGG	8R (cDNA)	GACCTCCCCTGCCCCAGATT
OCRL-F6	GTATGACTCTAAAACAGACCGGTG	10F (cDNA)	GGCTGTAGAGAGAGGTTTGC
OCRL-F7	GTGTACGCATCATGGACAGAATGG	11R (cDNA)	GCAAATATAAGAAGCATCATC
OCRL-F8	ATCCTGAACTCGGGAGAAGATAAG	12R (cDNA)	GGTGTGTGAAATACAATCTC
OCRL-F9	ACCTATTCAAATACGCCTGTCACC	13R (cDNA)	GTCTATAATTCAAATCTCCCAAC
OCRL-F10	ATAGCGTCAATGCCAACATGATCG	15F (cDNA)	CCAGCGACCACAAGCCTGTTAGC
OCRL-R1	ATGCTGTTCTTCTCATGCAACTG	17F (cDNA)	GACCTTTTGAGGGCTACTTGG
OCRL-R2	CTTCGTTTCATCCACAACCTTCACC	17R (cDNA)	CTTCTCTTTTGTAGTTGCCGAAAC
OCRL-R3	TTCTGGTACCAGCTAGATGAGTCC	18R (cDNA)	CATACACATCAAGAGAAATGTC
OCRL-R4	TTCCCGATGAATCCCAGTAGGCTG	21F (cDNA)	GTCATCTGTTACGAGCTGTATCAG
cDNA-fw	ATCGGCCCGCAGTCCGCTGTCCTG	Ex21_rev	GATCCGGGGATCATAAGCAGAGTC
cDNA-fw2	GCAAAGCGAGAGAAAGAATATGTC	22R (cDNA)	CTATGGCATCTCGGAAGCTGG
cDNA_rev	CATGTGACTCCGATAATTAAGCTG		
cDNA_rev2	TCCAATGCAGTAGATATCAGGAGG		
Ex18_rev	TCTCACTGGCACCTTCATCCAAAG		
nested_fw1	TGGAACCTGGAATGTGAATGGCCAG		
nested_rev1	GGTTCTAACCCGCTATCTGGGACTG		
Ex18a_fw	TGGCACATCCTTAGAGGCTCTGTG		
Ex18a_fw2	AGATTACTTCTTGACTATCAGTGG		
Ex18a_rev	CTACTAGAAGCCAGATCTCCTTGG		
Ex18a_rev2	TGGAACAGGTCCTCCTGGTGACAG		
OCRL_5'UTR	AGCTGTTCTCAAACGACACGCAG		
3F (cDNA)	GCATGTTCAAGATATCATTC		

1.4.4 Oligonukleotide für Sequenzierungen

Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
pMT2_seq	CACTCCCAGGTCCAAGTGCATAAG
M13 uni	GTGGGGCGACGGCCAGT
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC
cDNAT7	TAATACGACTCACTATAGGG
PIP_Seq_F	GTGCGAGAATGAGTTTTGTGG
PIP_Seq_R	GGAATCCAATGCAGTAGATATCAGG
IVS18_2neu_Rint	CTTAACAGAGTAAGAAATGGATGG
IVS18_2neu_Rint2	AGTCAATTAGAGGTGGAAGATGC

Tab. 9: Verwendete Oligonukleotide für Sequenzierungen

1.5 Antikörper

1.5.1 Primärantikörper

Antikörper	Antigen	Hergestellt in	Eingesetzte Verdünnung	Referenz/Firma
anti-HA	Hämagglutinin des humanen Influenza Viruses	Kaninchen	IF 1:200	Sigma, Taufkirchen
anti-HA	Hämagglutinin des humanen Influenza Viruses	Maus	IF 1:1000	Eurogentec, Köln
anti-c-myc	Humanes c-myc , AS 408-439	Maus	IF 1:100	Roche, Mannheim
anti-FLAGM2	Synthetisches Flag-Peptid	Maus	IF 1:100	Sigma, Taufkirchen
anti-GAPDH	Kaninchen GAPDH aus Muskel	Maus	WB 1:2000	Abcam, Cambridge, UK
anti-OCRL 1	Humanes OCRL, AS 40-56	Kaninchen	WB 1:100	Orbigen, San Diego, USA
anti-OCRL 2	Humanes OCRL, AS 940-954	Kaninchen	WB 1:100	Orbigen, San Diego, USA
anti-OCRL 3	Humanes OCRL, AS 1-200	Kaninchen	WB 1:1500	J.Lunardi, Universitaire de Grenoble, France
anti-OCRL 4	Humanes OCRL, 25 AS der 5' Region	Maus	WB 1:1000	S.Suchy, NIH, Bethesda, USA
anti-OCRL 5	Humanes OCRL, AS 1-237	Schaf	WB 1:1000	M.Lowe, University of Manchester, UK
anti-OCRL 6	Humanes OCRL, AS 2-16	Kaninchen	WB 1:600	A.Ungewickell, Washington University, Saint Loius, USA
anti-MPR300	Humaner MPR300, AS 2329-2492	Kaninchen	IF 1:200	S.Storch, UKE, Hamburg
anti-TfR	Humaner TfR, AS 3-28	Maus	IF 1:200	ZYMED®, San Francisco, USA
anti-EEA1	Humanes EEA1, AS 3-281	Maus	IF 1:100	BD Transduction, Heidelberg
anti-Rab5	Humanes Rab5, AS 1-215	Maus	IF 1:200	BD Transduction, Heidelberg
anti-Adaptin α	Murines Adaptin α, AS 38-215	Maus	IF 1:200	BD Transduction, Heidelberg
anti-LAMP-2	Humanes Lamp2	Maus	IF 1:100	Hybridoma Bank, Iowa, USA

Tab. 10: Verwendete Primärantikörper

Angegeben sind die Bezeichnung des Antikörpers, das Immunogen, das zur Immunisierung verwendete Tier sowie die Bezugsfirma. Die in den Experimenten eingesetzten Verdünnungen sind für Western-Blot (WB) und Immunfluoreszenz (IF) beschrieben.

1.5.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Antigen/Toxin	Konjugat	Hergestellt in	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
ECL™ Esel-Anti-Kaninchen - HRP	Kaninchen Immunglobulin G	Meerrettich-peroxidase	Esel	WB 1:10000	GE Healthcare, Freiburg
ECL™ Schaf-Anti-Maus - HRP	Maus Immunglobulin G	Meerrettich-peroxidase	Schaf	WB 1:10000	GE Healthcare, Freiburg
Alexa-Fluor® 546 Ziege-Anti-Kaninchen	Kaninchen Immunglobulin	Alexa-Fluor® 546	Ziege	IF 1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa-Fluor® 488 Ziege-Anti-Kaninchen	Kaninchen Immunglobulin	Alexa-Fluor® 488	Ziege	IF 1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa-Fluor® 546 Ziege-Anti-Maus	Maus Immunglobulin	Alexa-Fluor® 546	Ziege	IF 1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa-Fluor® 488 Ziege-Anti-Maus	Maus Immunglobulin	Alexa-Fluor® 488	Ziege	IF 1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
TexasRot-Phalloidin	Phallotoxin (Amanita phalloides)	Texas Red	-	IF 1:40	Invitrogen, Karlsruhe
MFP488-Phalloidin	Phallotoxin (Amanita phalloides)	MFP488	-	IF 1:40	Invitrogen, Karlsruhe

Tab. 11: Verwendete Sekundärantikörper und Farbstoffe

Angegeben sind die Bezeichnung des Antikörpers bzw. Toxins, das Antigen und Konjugat, das zur Immunisierung verwendete Tier sowie die Bezugsfirma. Die in den Experimenten eingesetzte Verdünnungen sind für Western-Blot (WB) und Immunfluoreszenz (IF) beschrieben.

1.6 Chemikalien und Lösungsmittel

Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BAA, 30%/0,8%)	Biorad, München
Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat (C ₂ H ₇ NO ₂)	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	Biorad, München
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche, Mannheim
Dextran, Fluorescein	Invitrogen, Karlsruhe
Dextransulfat	Pharmacia, Heidelberg
4', 6-Diamidino-2-phenyl-indole/2HCl (DAPI)	Serva, Heidelberg
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Pierce/Perbio, Bonn
Epidermal Growth Factor (EGF)-Alexa Fluor 488	Invitrogen, Karlsruhe
Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-	Merck, Darmstadt

Dihydrat (EDTA)	
Essigsäure (CH ₃ COOH)	Merck, Darmstadt
Ethanol (CH ₃ CH ₂ OH)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
FACS Flow Solution	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse Solution	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Clean Solution	BD Biosciences, Heidelberg
Fibronektin aus humanem Plasma	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ficoll 400	Amersham Bioscience, Freiburg
Formamid (CH ₃ NO)	Merck, Darmstadt
5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranoside (X-Gal)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glucose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Invitrogen, Karlsruhe
Heparin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol (C ₄ H ₁₀ O)	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat (C ₂ H ₃ CO ₂)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck, Darmstadt
Kanamycin-Sulfat	Fluka, Neu-Ulm
Lipofectamin TM 2000-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt
Methanol (CH ₃ OH)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nonidet P40 / Igepal	ICN, Eschwege
Normal Goat Serum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N`-2-ethanesulfonic acid (HEPES)	Serva, Heidelberg
Orange-G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pepstatin	Roche, Mannheim
Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF)	Roche, Mannheim
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyvinylalkohol 488 (Mowiol 488)	Fluka, Neu-Ulm
Propylgallate	Fluka, Neu-Ulm
RNase ERASE TM	MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA
Salpetersäure (HNO ₃)	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Saponin	Fluka, Neu-Ulm
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Texas Red [®] -X Phalloidin	Invitrogen, Karlsruhe
Transferrin Alexa Fluor 488	Invitrogen, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIZMA [®] BASE (Tris)	Invitrogen, Karlsruhe

Trypton	Becton Dickinson Sparks, MD, USA
Restore™ Western-Blot Stripping Puffer LiChrosolv® -HPLC-Wasser	Pierce/Perbio, Bonn Merck, Darmstadt

1.7 Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien

100 mm Polystyrol-Zellkulturschalen	Sarstedt, Nürnberg
35 mm Polystyrol-Zellkulturschalen	Sarstedt, Nürnberg
6-Loch und 12-Loch-Zellkulturplatten	Sarstedt, Nürnberg
Agarplatten	Greiner, Kremsmünster, Österreich
ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Drucker „Digital Graphic Printer“	SONY, Japan
Autoklav	Tecnomara, Fernwald
Brutschrank	Heraeus, Hannover
CO ₂ Water-Jacketed Inkubator	Nuaire™ US AUTOFLOW, USA
Glasdeckgläschen	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Digitalkamera	OLYMPUS, Hamburg
Durchflusszytometer	Becton und Dickinson, Heidelberg
Gelkammer „Sub-Cell GT“	BioRad, München
Heizblock (Typ: 52526101)	Liebig, Bielefeld
Hyperfilm ECL Röntgenfilme	GE Healthcare, Freiburg
Inkubator Shaker Model G25	New Brunswick Scientific. Co INC, Edison, New Jersey, USA
Kryoröhrchen	Nunc
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg
Kunststoff-Tubes (Falcon)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Laserscanmikroskop DMIRE2	Leica, Mannheim
Magnetrührer RET basic	IKA Labortechnik, Staufen i. Br.
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
PCR-Maschine „MJ Research PTC 200“	MJ Research, Inc., Watertown, USA
PCR-Tubes (0,5 ml)	Biozym Diagnostik GmbH, Oldenburg
Photometer „Biometer“	Eppendorf AG, Hamburg
PIPETBOY acu	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten „Finnpipetten“	Thermo Labsystems, Mannheim
PVDF (Polyvinylidendifluorid) Western Blotting Membranen	Roche, Mannheim
Schüttelapparat 3006	GFL, Burgwedel
Schüttelapparat „Centromat R“	B. Braun Biotech International, Melsungen
Semi-Dry-Blot-Apparatur	Biometra, Göttingen
Spannungsgeber „Power Pac 300“	BioRad, München
Spannungsgeber „Electrophoresis power supply ST305“	Life Technologies, Karlsruhe
Spannungsgeber „Electrophoresis power supply PS3002“	Life Technologies, Karlsruhe
Spannungsgeber „Standard Power Pack P25“	Biometra, Göttingen
Sterilwerkbank „HERA safe Typ 12/2, 1995“	Heraeus, Hannover
Sterilwerkbank „Lamin Air Instruments“	Heraeus, Hannover
Thermomixer „compact“	Eppendorf AG, Hamburg

Tischzentrifuge „Biofuge Pico“	Heraeus, Hannover
UV-Transilluminator „UVT-28M“	Herolab, Wiesloch
Vortex-Gerät „Vortex Genie 2 Heidolph Reex 2000“	Scientific Industries, INC., Bohemia, New York, USA
Waage „Sartorius ISO 9001“	Sartorius, Göttingen
Wasserbad „GFL 1083“	GFL, Burgwedel
Wasserbad „GFL 1003“	GFL, Burgwedel
Whatman-3mm-Chromatographie-Papier	Whatman, Dassel
Zentrifuge „Megafuge 1.0“	Heraeus, Hannover

1.8 Computerprogramme und Datenbanken

Datenbanken	Anwendung / Adresse
NCBI (Human Genome Resources)	Zugang zu cDNA-Sequenzen BLAST: Homologievergleiche von DNA-Sequenzen Vergleich der Sequenzen mit der SNP-Datenbank (BLAST-SNP) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
UCSC Genome Browser	Ermittlung der Exon-Intron-Struktur eines Gens (http://genome.ucsc.edu/)
Ensembl	Genom-Sequenzen physikalische Darstellung der Organisation des Genoms Darstellung bekannter Variationen (SNPs) in genomischer DNA (http://www.ensembl.org/index.html)
Computerprogramme	Anwendung / Adresse
RepeatMasker	Identifizierung repetitiver DNA-Sequenzen http://www.repeatmasker.org/cgi-in/WEBRepeatMasker
EditSeq (Dnastar)	Editieren von DNA-Sequenzen
MapDraw (Dnastar)	Ermittlung von Restriktionsschnittstellen in DNA-Sequenzen sowie Ermittlung der abgeleiteten Aminosäuresequenz einer cDNA-Sequenz
SeqMan	Auswertung von DNA-Sequenzen
Chromas 2.3	Editieren von DNA-Sequenzchromatogrammen http://www.technelysium.com.au/chromas.html
DIGI CAM Digital Camera Control	Dokumentation von Agarosegelen
Image J	Quantifizierung von Immunfluoreszenz-Aufnahmen http://rsbweb.nih.gov/ij/
CellQuest® Pro	Auswertung von FACS-Daten
Jasc Paint Shop Pro™ Version 7.0	Bearbeitung von Immunfluoreszenz-Aufnahmen

1.9 Medien, Zusätze, Puffer und Lösungen

1.9.1 Medien und Zusätze

1.9.1.1 Medien und Zusätze für die Bakterienkultivierung

LB-Medium:	10 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 10 g NaCl ad 1000 ml ddH ₂ O pH 7.0
Agar für Festmedien:	15 g Agar pro 1000 ml LB-Medium
Ampicillin:	1 ml pro 1000 ml von Stocklösung 150 mg/ml (in Aqua dest.)
Kanamycin:	1 ml pro 1000 ml von Stocklösung 25 mg/ml (in Aqua dest.)
SOC-Medium:	20 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 0,5 g NaCl ad 970 ml ddH ₂ O 10 ml steriles 1M MgSO ₄ 10 ml steriles 1M MgCl ₂ 10 ml sterile 40% Glucose

1.9.1.2 Medien und Zusätze für die Zellkultivierung

Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (D-MEM) mit L-Glutamin	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
F-12 Ham Medium mit L-Glutamin	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Chang Medium® mit L-Glutamin	Irvine Scientific, Santa Ana, USA
Opti-MEM® I serumreduziertes Medium mit L-Glutamin	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin-Lösung	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Rinderserum (FBS)	PAA Laboratories GmbH, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (D-PBS+/+)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
TrypLE™ -Express	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Fungizone, Amphotericin B	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe

Zusammensetzung der Kulturmedien:

Voll-Medium (D-MEM): 10% FBS
1% Penicillin/Streptomycin

Hungermedium (D-MEM): 0,1% BSA
1% Penicillin/Streptomycin

1.9.2 Puffer und Lösungen

1.9.2.1 PCR-Puffer

10x PCR-Puffer	15 mM MgCl ₂ Tris-Cl KCl (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 8.7	} genaue Konzentrationen werden vom Hersteller nicht angegeben
----------------	--	--

10x Coral Load PCR-Puffer	15 mM MgCl ₂ Tris-Cl KCl (NH ₄) ₂ SO ₄ Orange Dye Red Dye pH 8.7	} genaue Konzentrationen werden vom Hersteller nicht angegeben
Fail Safe PCR PreMix A-L	100 mM Tris-HCl (pH 8,3) 100 mM KCl 400 µM eines jeden dNTPs je nach Puffer 3-7 mM MgCl ₂ je nach Puffer 0-8 X Fail Safe PCR-Enhancer (mit Betain=Trimethylglycin)	

1.9.2.2 Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

10x Ladepuffer	25 ml Glycerin (100%) 25 ml 1x TBE 20 mg Orange-G
10x TBE	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA pH 8.0
Ethidiumbromid	0,05% (in Aqua dest.)

1.9.2.3 Puffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot

4xTrenngelpuffer	2 g SDS 91 g Tris pH 8,8 mit H ₃ PO ₄	} ad 500 ml bidest H ₂ O
4xSammelgelpuffer	2 g SDS 30,3 g Tris pH 6,8 mit H ₃ PO ₄	} ad 500 ml bidest H ₂ O
10xSDS-Laufpuffer	50,6 g Tris 288,4 g Glycin 40 g SDS pH 8,3	} ad 2000 ml bidest H ₂ O
4xLaemmli-Proben- Puffer	33% Glycerol 0,3 M DTT 6,7% SDS 0,01% Bromphenolblau 80 mM Tris-HCl (pH 6,8)	
Transferpuffer	25 mM Tris-HCl (pH 8,3) 150 mM Glycin 10% Methanol (v/v)	

10xTBST-Puffer	1,5 M NaCl 200 mM Tris-HCl (pH 7,4) 1% Tween 20
1xTBST-Antikörperlösung	0,4% Milchpulver (w/v) in 1x TBST

1.9.2.4 Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz-Untersuchungen

PBS+/-	0,5 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ } in 1 x PBS+/-
Hoch-Salz-PBS+/-	500 mM NaCl } in 1 x PBS+/-
PFA-Lösung	4% Paraformaldehyd (w/v) in 1 x PBS+/- sterilfiltrieren und Lagerung bei -20°C
Blockierungs-Lösung	2% BSA 3% Ziegen-Serum 0,5% Igepal (Nonidet P-40) } in 1 x PBS+/-
Antikörper-Lösung	3% Ziegen-Serum 0,1% Igepal (Nonidet P-40) } in 1 x PBS+/-

1.9.2.5 Puffer und Lösungen für Endozytose-Experimente

saurer Waschpuffer	0,5 M NaCl 0,2 M CH ₃ COOH } pH 2,5
M6P-Waschpuffer	2 mM Mannose-6-Phosphat in 1 x PBS

1.9.2.6 Puffer und Lösungen zur DNA-Minipräparation von Plasmiden

Lösung I	50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl, pH 8 10 mM EDTA
Lösung II	0,2 N NaOH 1% SDS (w/v)
Lösung III	4 M KAc (pH 5.5) 2 M Essigsäure
TE/RNase-Puffer	100 µl/ml RNase A in 1xTE

1.9.2.7 Puffer und Lösungen zur DNA-Midipräparation von Plasmiden

RES (Zellresuspension)	50 mM Tris (pH 8.0) 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase
LYS (Zelllyse)	200 mM NaOH 1% SDS (w/v)
NEU (Neutralisation)	3 M KAc (pH 5.5)
EQU (Säulenäquilibrierung)	750 mM NaCl 50 mM MOPS (pH 7.0) 15% Isopropanol (v/v) 0,15% Triton-X-100
WASH (Waschpuffer)	1 M NaCl 50 mM MOPS (pH 7.0) 15% Isopropanol (v/v)
ELU (Elutionspuffer)	1250 mM NaCl 50 mM Tris (pH 8,5) 15% Isopropanol (v/v)

1.9.2.8 Allgemeine Puffer

10x TE Puffer	100 mM Tris 10 mM EDTA pH 8 HCl
Ladepuffer für Sequenzreaktionen	25 mM EDTA 50 mg/ml Dextranblau } pH 8 eine Einheit von der Dextranblau/EDTA- Lösung mit 5 Einheiten Formamid mischen

1.9.2.9 Lösungen für die cDNA-Synthese

1x RT-Puffer	1:10 Verdünnung des 10x RT-Puffers mit RNase-freiem Wasser
RNase-Inhibitor (10 U/µl)	1:4 Verdünnung des RNase OUT Ribonuclease Inhibitors (40 U/µl) mit 1x RT-Puffer
Hexamer-Primer (100 µM)	1:15 Verdünnung der Hexamere (1,5 mM) mit RNase-freiem Wasser

1.10 Enzyme, Nukleinsäuren und Kits**1.10.1 Enzyme**

Restriktionsendonukleasen	NEB, Frankfurt a.Main Promega, Mannheim Fermentas, St. Leon-Rot
---------------------------	---

<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Phusion™ DNA-Polymerase	NEB, Frankfurt a.Main
Quick T4-DNA-Ligase	NEB, Frankfurt a.Main
Omniscript Reverse Transkriptase (4U/μl)	QIAGEN, Hilden
RNase OUT Ribonuclease Inhibitor, Recombinant (40 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
DNase I	Roche, Mannheim
RNase A	Invitrogen, Karlsruhe
Gateway LR Clonase Enzym Mix	Invitrogen, Karlsruhe
Advantage® cDNA-Polymerase Mix	BD Biosciences, Heidelberg
ExoSAP-IT®	USB® Europe, Staufen

1.10.2 Nukleotide

dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; je 10mM)	Invitrogen, Karlsruhe
---	-----------------------

1.10.3 Längenstandards

1 Kb DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
100 Bp DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Standard „Fast Ruler™“	Fermentas, St. Leon-Rot
Precision Plus Protein™ Standard	Biorad, München

1.10.4 Kits

BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Blood&Cell Culture DNA Midi Kit	QIAGEN, Hilden
Bradford Protein Assay	Biorad, München
ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagenzien	GE Healthcare, Freiburg
ECL™ Western Blotting Detection Reagenzien	GE Healthcare, Freiburg
GenomiPhi DNA Amplification Kit	Amersham Biosciences Europe, Freiburg
High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Böhlinger
JetQuick PCR Purification Spin Kit	GENOMED, Löhne
Nucleobond®Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel, Düren
Omniscript RT-Kit	QIAGEN, Hilden
pCR®2.1-TOPO®-Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
pENTR Directional TOPO® Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
QIAamp® DNA Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QIAshredder	QIAGEN, Hilden
Quick Ligation Kit	NEB, Frankfurt a. Main
RNeasy® Kit	QIAGEN, Hilden
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe

1.11 Radioaktive Substanzen

Die [¹²⁵I]-Arylsulfatase B und der [¹²⁵I]-markierte Antikörper 2C2 wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. T. Bräulke zur Verfügung gestellt. Die Iodierung von Transferrin und dem „Low density“ Lipoprotein (LDL) hat freundlicherweise Herr PD Dr. J. Heeren übernommen.

2. Molekularbiologische Methoden

2.1 Anzucht von *E.coli*

Für die Anzucht von *E.coli* wurde zuerst eine Flüssigvorkultur angezogen, indem 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit einer Einzelkolonie von einer Agar-Platte beimpft und für 6 h oder über Nacht bei 37°C und 220 Upm im Schüttelinkubator inkubiert wurden. Im Anschluss wurde ein Aliquot der Vorkultur im Verhältnis 1:50 bis 1:100 in frisches LB-Medium mit Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C und 220 Upm im Schüttelinkubator inkubiert.

2.2 Präparation von Plasmid-DNA

2.2.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Für analytische Zwecke wurde Plasmid-DNA mittels der Minipräparations-Methode isoliert, welche auf dem Prinzip der alkalischen Lyse basiert. Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurden 2 ml Übernachtskultur angezogen. 1,5 ml dieser Kultur wurden für 5 min bei 8.000 Upm abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 100 µl Lösung I resuspendiert. Danach wurden 200 µl Lösung II zugegeben, und die Suspension wurde durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) erfolgte die Zugabe von 300 µl Lösung III. Der Ansatz wurde gut gemischt, für 10 min auf Eis inkubiert und 5 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand enthält die Plasmid-DNA und wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 350 µl Isopropanol gefällt und 5 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA befindet sich im Pellet, und der Überstand wurde verworfen. Um aus dem Plasmid-DNA-Sediment mitisolierte RNA abzubauen, wurde dieses mit 100 µl TE/RNase-Puffer versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Es erfolgte eine Fällung durch Zugabe von 120 µl 88% Isopropanol/0,2 M K-Acetat, Schütteln und eine 10-minütige Inkubation bei RT. Der Ansatz wurde nochmals für 5 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment 5-10 min bei 37°C getrocknet. Anschließend wurde die isolierte Plasmid-DNA in 50 µl bidest. H₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Midi-Präparation von Plasmid-DNA dient dazu, größere Mengen von sehr sauberer DNA zu isolieren. Dabei muss von einem größeren Kulturvolumen ausgegangen werden, um ausreichend Plasmid-DNA aus den Bakterien zu gewinnen. Es werden häufig DNA-Midi-Präparationskits verwendet, um einen möglichst hohen Reinheitsgrad der gewonnenen DNA zu gewährleisten. In dieser Arbeit wurde der „NucleoBond® Xtra Midi Kit“ auf Basis der Ionenaustausch-Chromatografie nach Herstellerangaben verwendet. Die isolierte DNA wurde in 200 µl bidest. H₂O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.3 Isolierung und Amplifikation von genomischer DNA

2.3.1 Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA aus humanen Fibroblastenzellen wurden die Zellen, welche in Zellkulturflaschen mit 25 cm² oder 75 cm² Grundfläche konfluent waren, durch Trypsinierung geerntet und bei 900 Upm für 10 min bei 4°C pelletiert. Nach Waschen in PBS und wiederholter Zentrifugation wurde das Zellpellet in PBS aufgenommen. Die in den Zellen enthaltene DNA wurde dann entweder mit dem „QIAamp® DNA Mini Kit“ oder mit dem „Qiagen Blood&Cell Culture DNA Midi Kit“ nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.3.2 Amplifikation von genomischer DNA

Das „GenomiPhiTM DNA Amplification Kit“ wurde für die hocheffiziente, unspezifische Amplifikation gesamtgenomischer DNA genutzt. Bei dieser Methode können sowohl aufgereinigte DNAs (weniger als 1 ng) als auch unaufgereinigte Zelllysate als Matrize dienen. Dabei wird die DNA-Polymerase des Bakteriophagen Phi29 für die exponentielle DNA-Amplifikation benutzt. Die DNA-Amplifikationsreaktion ist eine isothermale (30°C) strangablösende Reaktion. Es sind keine Temperaturzyklen dafür notwendig. Das Prinzip des „GenomiPhi DNA Amplification Kits“ beruht darauf, dass Zufalls-Hexanukleotide an multiplen Stellen der denaturierten Matrizen-DNA hybridisieren. Dadurch können die Phi29-DNA-Polymerasemoleküle an diesen Stellen gleichzeitig mit der Replikation beginnen. Der stromaufwärts liegende Teil der neu amplifizierten DNA löst sich ab und dient als Matrize. Daran können die Primer erneut binden und eine weitere Replikation kann starten. Durch das Ablösen der Stränge und das erneute Binden der Hexanukleotide an die neu entstandenen Einzelstränge ist es möglich, eine große Menge an doppelsträngiger, hochmolekularer DNA zu amplifizieren.

2.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung von DNA-Konzentrationen erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Eine Absorptionseinheit entspricht dabei 50 mg/ml DNA. Die Bestimmung der Absorption bei 280 nm und die Bildung des Quotienten aus beiden Werten gibt einen Anhaltspunkt bezüglich der Reinheit der Präparation. Eine ausreichend reine Präparation sollte einen Quotienten A₂₆₀/A₂₈₀ von ~1,8 oder weniger aufweisen (A=Absorption).

2.5 Techniken zur Konzentrierung und Auftrennung von DNA

2.5.1 Aufreinigung der PCR- und Restriktionsprodukte

Eine Aufreinigung ist nötig, um die bei weiteren Arbeitsschritten störenden Primer, Enzyme, Nukleotide und kleineren DNA-Fragmente aus PCR- und Restriktionsprodukten zu entfernen. In dieser Arbeit wurde dafür der „Jetquick PCR Purification Spin Kit“ nach Herstellerangaben verwendet.

2.5.2 Restriktionsenzymatische Spaltung von Plasmid-DNA

Restriktionsendonukleasen werden aus Bakterien isoliert und dienen dort dem Schutz vor artfremder DNA. Im Labor kann mit ihrer Hilfe DNA an bestimmten Sequenzerkennungsstellen, meist Palindrome von vier bis acht Basenpaaren, geschnitten werden. Dabei entstehen entweder glatte („blunt ends“) oder überhängende Enden („sticky ends“). Die Spaltung dient u.a. dazu, die Quantität und auch die Qualität der in der DNA-Präparation gewonnenen Plasmid-DNA zu beurteilen und die DNA für die Klonierung vorzubereiten. Die enzymatische Hydrolyse von DNA wurde mit Enzymen der Firma Promega, Fermentas oder New England Biolabs (NEB) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen für die Restriktionsendonukleasen wurden den Herstellerangaben entsprechend gewählt. Doppelrestriktionen erfolgten bei übereinstimmenden Bedingungen (Puffer und Temperatur) gleichzeitig, bei unterschiedlichen Bedingungen aufeinander folgend. Pro Ansatz wurden für analytische Zwecke 0,2-1 µg und für präparative Zwecke 1-3 µg DNA bei einem Reaktionsvolumen von 20 µl und 0,5-1 U Enzym pro µg DNA eingesetzt. Zur Analyse der Restriktionsverdaus wurde die horizontale Agarosegelelektrophorese angewendet.

2.5.3 Agarosegelelektrophorese

Ziel der Agarosegelelektrophorese ist die Auftrennung von fragmentierter DNA bzw. die Darstellung von PCR-Produkten. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Agarose-Konzentrationen von 0,8-2% (w/v) gewählt. Die Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer aufgekocht, auf etwa 50°C abgekühlt und in eine geeignete Gelkammer mit Probenkamm gegossen. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard diente eine DNA-Leiter. Die angelegte Spannung und die Laufzeit waren abhängig von der Größe der Ladung. Im Falle von großen Restriktionsprodukten lagen sie bei ~ 100 V für ~ 2 h und im Falle von PCR-Produkten bei ~ 140 V für ~ 45 min. Abschließend wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entfernt und für 10 min in ein Bad mit einer 0,05%-igen Ethidiumbromid-Lösung gegeben. Ethidiumbromid hat die Eigenschaft, in die DNA zu interkalieren. Die Beurteilung der PCR-Produkte bzw. Restriktionsfragmente war dann unter UV-Durchleuchtung (254 nm, UVT 28M) möglich, da das Ethidiumbromid nach Anregung

durch UV-Licht rot leuchtet. Die Dokumentation erfolgte mit dem Computerprogramm „DIGI CAM Digital Camera Control“.

2.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, „polymerase chain reaction“) ist ein *in vitro*-Verfahren zur Amplifikation von DNA-Fragmenten unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase, der *Taq*-Polymerase, welche aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wird, sowie zweier Startoligonukleotide (Primer), die zu je einem Abschnitt der DNA komplementär sind. Die besondere Eigenschaft der *Taq*-Polymerase beruht auf der Stabilität gegenüber den Temperaturen, denen sie in den verschiedenen Zyklen einer PCR ausgesetzt ist. In der Regel wurden 10-500 pg Template (Matrize) mit je 10 pmol eines Forward- und Reverse-Oligonukleotids und 0,1-0,2 µl Polymerase verwendet. Diese wurden mit 10x PCR Puffer, Desoxynukleotiden (2,5 mM je Nukleotid) und Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 25 µl gebracht. Nach Denaturierung des PCR-Ansatzes (1 min, 94°C) wurden 30-35 Zyklen aus Denaturierung (30 s, 94°C), Anlagerung der Primer („annealing“, 30 s, 48-68°C) und Polymerisation (1-5 min, 72°C) durchlaufen. Die Anlagerungstemperatur richtet sich nach den Schmelzpunkten der verwendeten Primer, die Zeitdauer für die Polymerisation nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments, wobei die verwendeten Polymerasen unter diesen Bedingungen etwa 700-1.000 Bp pro min polymerisieren können. Um die Spezifität des entstehenden Produkts zu erhöhen, wurde in bestimmten Fällen eine so genannte „Touch-Down“ (TD)-PCR-Reaktion durchgeführt. Hierbei wurde die Annealingtemperatur anfangs hoch gewählt (z.B. 66°C), dann jedoch zweimal nach je drei Zyklen um 2°C gesenkt. Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurden hitzeresistente DNA-Polymerasen mit Korrektoreigenschaften („proofreading“), wie z.B. die Phusion™ DNA-Polymerase (NEB) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Reaktionen wurden in einem PTC-200 Thermocycler durchgeführt. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick für die PCR-Bedingungen für die *OCRL1*-Mutationsanalyse.

Exon	Primerpaar	Produktgröße (Bp)	TD-Programm	Puffer
1+2	OCRL1F+2R	~500	TD54	10 x coral
3	OCRL3F+3R	~260	TD58	10 x
4	OCRL4F+4R	~125	TD56	10 x
5	OCRL5F+5R	~245	TD58	10 x
6	OCRL6F+6R	~200	TD58	10 x
7	OCRL7F+7R	~230	TD56	10 x
8	OCRL8F+8R	~300	TD58	10 x
9	OCRL9F+9R	~235	TD58	10 x
10	OCRL10F+10R	~260	TD56	10 x

11	OCRL11F+11R	~260	TD58	10 x
12	OCRL12F+12R	~360	TD56	10 x
13	OCRL13F+13R	~240	TD58	10 x
14	OCRL14F+14R	~250	TD58	10 x
15	OCRL15F+15R	~240	TD56	FS A
16	OCRL16F+16R	~230	TD56	FS A
17	OCRL17F+17R	~300	TD56	FS A
18	OCRL18F+18R	~160	TD56	FS C
18a	OCRL18aF+18aR	~400	TD56	10 x
19	OCRL19F+19R	~500	TD56	10 x
20	OCRL20F+20R	~230	TD54	FS B
21	OCRL21F+21R	~230	TD54	FS H
22	OCRL22F+22R	~200	TD54	FS D
23	OCRL23F+23R	~265	TD56	FS A

Tab. 12: PCR-Bedingungen für die OCRL1-Mutationsanalyse

Für jedes OCRL1-Exon ist die Primerkombination, die PCR-Produktgröße, das verwendete PCR-Programm und der PCR-Puffer angegeben. TD= „Touch Down“-Programm, FS= „Fail Safe“ PCR-Puffer

2.7 Kolonie-PCR

Nach der TOPO®-Klonierung der PCR-Produkte in den Vektor pCR®2.1-TOPO und der Transformation nach *E.coli* wurden die weißen Bakterienkolonien von den Selektivplatten mit Hilfe von sterilen Pipettenspitzen gepickt und auf selektive Platten übertragen. Der an der Pipettenspitze verbliebene Rest der Kolonie wurde zu einem PCR-Reaktionsansatz hinzugefügt. Die für den Reaktionsansatz verwendeten Oligonukleotide waren die Standardprimer cDNAT7 und M13rev. Im Anschluss wurden die erhaltenen Kolonie-PCR-Produkte aufgereinigt und sequenziert.

2.8 Prinzip der Reversen Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR ist eine Form der PCR, die es ermöglicht, mRNA aus Zellen oder Geweben in cDNA umzuschreiben und zu analysieren. Der RT-PCR gehen die Isolation der RNA sowie die cDNA-Synthese aus RNA voraus.

2.8.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung totaler RNA aus humanen Fibroblastenzellen (ca. 1×10^6 Zellen) wurden die Zellen durch Trypsinierung von der Kulturflasche gelöst, in ein mit 10 ml Vollmedium vorgelegtes Reaktionsgefäß überführt und nach Zentrifugation bei 900 Upm und 4°C für 5 min einmal mit 1 x PBS gewaschen. Die Zellen wurden wiederum bei 900 Upm und 4°C für 5 min pelletiert und anschließend in 200 µl PBS resuspendiert. Die Isolierung der RNA

erfolgte mittels des „High Pure RNA Isolation Kit“ nach Angaben des Herstellers. Die gewonnene RNA wurde aliquotiert und dann bei -80°C gelagert.

2.8.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration von RNA in wässriger Lösung wurde in Einmalplastikküvetten im Photometer über die Absorption bestimmt. Als Maß für die Reinheit der Lösung wurde das Verhältnis Absorption bei 260nm/Absorption bei 280nm bestimmt. Dabei entspricht eine $\text{OD}_{260\text{nm}} = 1$ ungefähr 40 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger RNA.

2.8.3 Auftrennung von RNA

Die Auftrennung von RNA erfolgte in einem 1,5%igen Agarosegel. Zuvor wurden alle Gegenstände, Gefäße und die Arbeitsfläche gründlich mit RNase ERASE™ behandelt. Die RNA-Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und bei einer angelegten Spannung von 70V für 45 min laufen gelassen. Abschließend wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entfernt und für ~ 10 min in ein Bad mit einer 0,05%-igen Ethidiumbromid-Lösung gegeben. Die Dokumentation erfolgte mit dem Computerprogramm „DIGI CAM Digital Camera Control“.

2.8.4 cDNA-Synthese und RT-PCR

mRNA kann nicht direkt durch eine PCR amplifiziert werden. Zunächst muss sie in „copy DNA“ (cDNA) umgeschrieben werden, damit sie von der *Taq*-Polymerase erkannt wird. Der Vorgang des Umschreibens von mRNA in cDNA wird als Reverse Transkription bezeichnet und durch das Enzym Reverse Transkriptase katalysiert. Für die Erstellung von cDNA wurden 5 μl Gesamt-RNA und Omniscript® Reverse Transkriptase nach den Vorschriften der Hersteller verwendet. Hexamer-Primer dienten als Primer für die cDNA-Synthese, die in einem Volumen von 20 μl durchgeführt wurde. Solche Hexamere hybridisieren in zufälliger Weise an RNA-Moleküle und ermöglichen somit der Reversen Transkriptase durch die Bereitstellung eines kurzen doppelsträngigen Bereiches den Beginn der cDNA-Synthese. Die synthetisierte cDNA konnte als Matrize in eine RT-PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

2.9 Zyklische DNA-Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden

DNA-Sequenzierungen wurden nach der Didesoxy-Methode mit dem „ABI Prism Big Dye Terminator Kit“ und dem Sequenzierungsgerät ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer durchgeführt. Die Methode beruht auf dem Einbau von Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden in einer zyklischen DNA-Sequenzierung, bei der nur ein Primer und ein zuvor generiertes spezifisches PCR-Produkt als Matrize verwendet werden.

Didesoxynukleotide (ddNTPs) führen bei dieser Reaktion zum Kettenabbruch, sodass sich am 3'-Ende der polymerisierten DNA-Stränge stets ein Fluoreszenz-markiertes Nukleotid befindet. Die vier ddNTPs sind mit unterschiedlichen Fluorochromen konjugiert, welche während der Elektrophorese von einem Laser detektiert werden. Die Messung erfolgt elektronisch und durch eine Computerverarbeitung der Signale wird ein Chromatogramm erstellt.

2.10 Klonierungsexperimente

2.10.1 Klonierung mittels TOPO[®] TA -Technologie

Die TOPO[®] TA-Technologie ermöglicht die direkte Insertion von mit der *Taq*-DNA-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten in bestimmte Vektoren. Der wichtigste Bestandteil des „TOPO[®]TA -Cloning[®]-Kits“ ist das Enzym DNA-Topoisomerase I des *Vaccinia*-Virus. Es fungiert sowohl als Restriktionsenzym als auch als Ligase, indem es die Vektor-DNA spaltet und dabei kovalent an den Vektor bindet. Anschließend wird die Bindung der Topoisomerase I an den Vektor gelöst und gleichzeitig das PCR-Produkt in den Vektor ligiert. In dieser Arbeit wurden der „pCR[®]2.1-TOPO[®]-Cloning Kit“ und der „pENTR[™]/D-TOPO[®] -Cloning Kit“ verwendet.

2.10.2 Klonierung mittels Gateway[™]-Technologie

Die Gateway[™]-Technologie ersetzt herkömmliches Klonieren über Restriktion und Ligation durch Rekombinationsreaktionen, mit deren Hilfe ein DNA-Insert in einen gewünschten Vektor überführt wird. Diese Rekombinationen basieren auf der ortsspezifischen Rekombinationsreaktion des Bakteriophagen λ in *E.coli*, durch die er in seinem lysogenen Zyklus in das Genom des Bakteriums integrieren kann. Hierfür sind lediglich zwei spezifische, kurze DNA-Sequenzen, die so genannten Att-Stellen („attachment sites“) notwendig, die als Erkennungssequenzen für die Rekombination dienen. Um dieses System nutzen zu können, muss das zu klonierende DNA-Fragment zunächst zwischen zwei Att-Stellen in einen Eingangsvektor eingeführt werden. Von diesem Eingangsklon ist die Rekombination in jeden x-beliebigen Zielvektor über eine LR-Reaktion möglich, sofern er die entsprechenden Att-Stellen besitzt. Als LR-Reaktion wird demnach die Rekombination des DNA-Inserts aus einem Eingangsvektor in einen Zielvektor bezeichnet. In dieser Arbeit erfolgte eine Topoisomerase-unterstützte Klonierung in den Eingangsvektor pENTR[™]/D-TOPO. Als Zielvektoren wurden pMT2SM-HA-DEST, pEGFP-C3-DEST sowie pcDNA53-DEST verwendet. Eine detailliertere Beschreibung dieser Technologie ist auf der Internetseite der Firma Invitrogen nachzulesen (www.invitrogen.com). In dieser Arbeit wurden alle Gateway-Reaktionen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.10.3 Ligation

Sowohl der Vektor als auch die aufgereinigten PCR-Produkte müssen vor einer Ligation gespalten und zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme aufgereinigt werden. Die Ligation bezeichnet die Verknüpfung von zwei DNA-Fragmenten. Diese Reaktion wird durch das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert, welches eine Phosphodiester-Bindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe des einen und einer freien 3'-Hydroxylgruppe des anderen DNA-Endes ausbildet. Durch diese Reaktion können DNA-Fragmente in Vektorplasmide eingeführt und kovalent verbunden werden. Die Vektor-DNA sollte in dephosphoryliertem Zustand vorliegen, damit er nach dem Schneiden nicht religieren kann. Die Insert-DNA hingegen muss an ihren Enden Phosphatgruppen aufweisen. Für eine Ligation wurde die mit Hilfe von Restriktionsenzymen linearisierte Vektor-DNA zusammen mit einem dreifachen molaren Überschuss eines entsprechend geschnittenen DNA-Fragments eingesetzt. In dieser Arbeit wurde der "Quick Ligation Kit" nach Herstellerangaben verwendet. Das hatte den Vorteil, dass die Ligation in kurzer Zeit bei Raumtemperatur erfolgen konnte.

2.10.4 Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Für die Transformation von kompetenten *E.coli*-Zellen mit Plasmid-DNA werden die Bakterien auf Eis aufgetaut und pro Ansatz jeweils 100 µl Bakteriensuspension mit dem Ligationsansatz versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis erfolgt ein Hitzschock bei 42°C für 90 Sekunden und weitere 5 min Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 700 µl SOC-Medium wird die Zellsuspension für eine Stunde bei 37°C und 300 Upm im Schüttelinkubator inkubiert und im Anschluss auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

3. Proteinbiochemische Methoden

3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen durch die diskontinuierliche, eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Polyacrylamid (PAA) als Trägermedium hat den Vorteil, dass die Porengröße des Gels durch unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid (AA) und Bisacrylamid (BAA) variiert und an die Größe der Proteine angepasst werden kann. Der Zusatz von SDS zum Proteingemisch bewirkt, dass praktisch alle nicht kovalent gebundenen Wechselwirkungen in den nativen Proteinen zerstört werden und es dadurch zur Bildung eines SDS/Protein-Komplexes kommt. Dessen stark negative Ladung ist proportional zum Molekulargewicht des Proteins. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins in einem SDS-haltigen Gel wird somit durch den Vernetzungsgrad des Gels und durch das Molekulargewicht des unmodifizierten Proteins bestimmt. Die Polyacrylamid-

Gellösung (Trenngel) wurde zur Gelelektrophorese nach dem unten angegebenen Schema hergestellt, zwischen zwei Glasplatten in einer Mini-Gelapparatur (Mini-PROTEAN® II, Bio-Rad) gegossen und mit 200 µl Isobutanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isobutanol mit Wasser vollständig entfernt und nachfolgend das Sammelgel mit Geltaschen überschichtet, welches der Fokussierung der Protein/SDS-Komplexe vor der eigentlichen Auftrennung dient. Die Proteinproben wurden mit 4x Probenpuffer (Laemmli-Puffer) versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Dabei wurden pro Proteinprobe jeweils 10-30 µg Gesamtprotein verwendet. Zusätzlich wurde immer ein Proteingrößenstandard mit aufgetragen. Der Gellauf erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer bei 130 V.

	Trenngel		Sammelgel	
	12,5%	10%	5,0%	3,9%
bidest H ₂ O	1,65 ml	2,1 ml	1,95 ml	2,1 ml
4x Gelpuffer	1,25 ml	1,25 ml	0,84 ml	0,84 ml
30% AA/BAA (37,5:1)	2,1 ml	1,7 ml	0,6 ml	0,45 ml
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
10% APS (w/v)	85 µl	85 µl	85 µl	85 µl

Tab. 13: Zusammensetzung verschiedener Trenn- und Sammelgele

Angegeben ist die Rezeptur der unterschiedlich konzentrierten Trenn- und Sammelgele. Mengenangaben sind für ein Proteingel berechnet, (APS=Ammoniumpersulfat, AA/BisAA= Acrylamid/Bisacrylamid).

3.2 Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus den Polyacrylamid-Gelen wurden mittels einer Semi-Dry-Blot-Apparatur auf eine PVDF-Membran transferiert, wofür die negative Ladung der durch die SDS-PAGE entstandenen SDS/Protein-Komplexe genutzt wird (Elektro-Blot). Eine PVDF-Membran wurde auf die Größe des Gels zugeschnitten und für 1 min in 100% Methanol, für 1 min in bidest. H₂O und für 5 min in Transferpuffer inkubiert. Ebenso wurden die Polyacrylamidgele nach Entnahme aus der Elektrophoresekammer für 5 min in Transferpuffer äquilibriert, um störende Salze zu entfernen. Sechs Blatt auf Gelgröße zugeschnittenes 1 mm Whatman-Papier wurden mit Transferpuffer getränkt und der Blot wie folgt luftblasenfrei in der Blot-Apparatur aufgeschichtet:

- Anode
- 3 Blatt Whatman-Papier
- PVDF-Membran
- PAA-Gel
- 3 Blatt Whatman-Papier
- Kathode

Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei konstanter Stromstärke (4-5 mA/cm² Gelfläche) und je nach Proteingröße für 25-45 min. Nach Kennzeichnung der Membran erfolgte die immunologische Detektion der Proteine.

3.3 Immunologische Detektion immobilisierter Proteine auf PVDF-Membranen

Grundlage der immunologischen Detektion ist die Interaktion eines primären Antikörpers (AK) mit seinem Antigen. An diesen Komplex bindet in einer zweiten Antikörperreaktion ein sekundärer Antikörper. Die an den sekundären Antikörper konjugierte Peroxidase (HRP, „Horse Radish Peroxidase“, Meerrettich-Peroxidase) katalysiert eine Lichtreaktion, welche mit einem Röntgenfilm detektiert wird und dadurch die gebildeten Komplexe nachgewiesen werden können. Vor der Immundetektion wurde die PVDF-Membran zur Absättigung freier Proteinbindungskapazitäten auf der Membran mit 4% (w/v) Milchpulver in TBST für mindestens 30 min bei RT oder bei 4°C ÜN abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären protein- oder peptidspezifischen Antikörper erfolgte in Antikörperlösung für 1-2 h bei RT bzw. ÜN bei 4°C. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Membran mit 1xTBST für je 10 min entfernt. Die Detektion des primären Antikörpers erfolgte mit einem gegen diesen gerichteten HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde der Blot dreimal 15 min mit 1xTBST gewaschen. Die Identifizierung der vom Antikörper erkannten Proteine erfolgte über die Umsetzung eines Substrates durch HRP, wobei Chemilumineszenz entsteht. Dafür wurde der „ECL™ oder ECL Plus™ Western-Blotting Detection Kit“ nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die erzeugte Chemilumineszenz wurde durch Exposition der Membran auf Autoradiographie-Filmen (ECL-Hyperfilm) sichtbar gemacht. In einigen Fällen wurden die Antikörper nach der Detektion mittels „Restore™ Western-Blot Stripping Puffer“ entsprechend den Herstellerangaben heruntergewaschen, und es konnte eine neue Immundetektion erfolgen.

3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Quantifizierung von Proteinen in Lösung erfolgte entweder nach der Bradford-Methode oder für die Radioaktivitätsassays nach der Lowry-Methode.

3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Messung beruht auf der Absorptionsänderung des gebundenen Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau im Vergleich zum freien Farbstoff bei einer Wellenlänge von $\lambda=595$ nm in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Der Farbstoff reagiert dabei mit basischen und aromatischen Aminosäureresten unter Entstehung von Komplexen. Als Referenz der gemessenen Proteinkonzentration der Probe diente eine Eichkurve des

Standardproteins BSA (Bovines Serum-Albumin), hergestellt mit verschiedenen bekannten Konzentrationen (20, 40, 60, 80, 100, 120 und 140 µg/ml). Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde die Bradford-Reagenzlösung (Bradford Protein Assay) 1:5 mit Wasser verdünnt, davon 5 ml mit 3 µl der zu untersuchenden Probe vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Es wurde die OD₅₉₅ ermittelt, der erhaltene Messwert anschließend mit den Daten der Eichkurve verglichen und so die Proteinkonzentration bestimmt.

3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry besteht aus zwei Reaktionen. Der erste Schritt beruht auf der Biuretreaktion, nämlich auf der Bildung eines blau-violetten, quadratisch-planaren Komplexes zwischen den Peptidbindungen und den Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung. In einem zweiten Schritt wird Cu(II) zu Cu(I) reduziert. Dieses Cu(I) wiederum reduziert das gelbe Folin-Ciocalteu Reagenz (Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren) zu Molybdänblau. Die resultierende intensive Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Photometrie bei 760 nm vermessen.

4. Zellbiologische Arbeitstechniken

4.1 Zellkultur

4.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Für die Zellkulturexperimente wurden COS-7-Zellen sowie mehrere humane dermale Fibroblastenzelllinien verwendet. Diese Zellen wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 5% CO₂ und 37°C in Begasungsbrutschränken gehalten. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt. Die Zellen wurden als adhärente Monolayer-Kulturen in Polystyren-Gefäßen kultiviert. Dabei erfolgte die Kultivierung entweder in Zellkulturflaschen mit 25 cm² oder 75 cm² Grundfläche oder in 10 cm-Zellkulturschalen. Alle Zelllinien wurden in „Dulbecco´s modifiziertem Eagle Medium“ (DMEM) mit 10% fötalem Rinderserum (FBS) und 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Diese Zusammensetzung wird im folgenden Vollmedium genannt. Besonders langsam wachsende Fibroblastenzelllinien wurden zeitweilig in einer Mischung aus DMEM und Chang-Medium im Verhältnis 1:1 kultiviert, bis sie wieder eine entsprechende Vitalität erreicht hatten. Für Immunfluoreszenzstudien wurden die Zellen auf Deckgläschen in 12-Loch-Kulturplatten kultiviert.

4.1.2 Passagieren von Zellen

Zur kontinuierlichen Kultivierung wurden die Zellen etwa alle drei bis vier Tage (bei ungefähr 90% Konfluenz) auf neue Kulturgefäße umgesetzt. Dazu wurden die Zellen nach Absaugen des Kulturmediums einmal mit 10 ml PBS gewaschen, um im Rinderserum enthaltene Proteinaseinhibitoren zu entfernen. Durch Zugabe von 1-2 ml TrypLE-Express (Trypsin), Inkubation bei 37°C und leichtes Abklopfen wurden die Zellen von dem Gefäßboden gelöst. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit und Menge der benötigten Zellen wurden die Zellen mit frischem Vollmedium zwischen 1:2 und 1:15 verdünnt und auf frische Kulturschalen verteilt.

4.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden bei -150°C gelagert und bei Bedarf wieder aufgetaut. Dazu wurden die gefrorenen Zellaliquots in einem 37°C Wasserbad erwärmt und unmittelbar nach dem Auftauen in 10 ml Vollmedium resuspendiert. Die Zellen wurden bei 900 Upm für 5 min abzentrifugiert und das Sediment in 10 ml Vollmedium auf ein Kulturgefäß überführt. Zum Einfrieren der Zellen wurden diese mittels TrypLE-Express von der Kulturgefäß abgelöst und in 10 ml Vollmedium aufgenommen. Die Zellen wurden für 5 min bei 900 Upm abzentrifugiert und zur Vermeidung von Eiskristallen in 3 ml Einfriermedium (DMEM + 10% DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen auf 1 ml Aliquots verteilt, für 1 h bei 4°C abgekühlt, anschließend über Nacht bei -80°C gelagert und am folgenden Tag zu -150°C überführt.

4.1.4 Sterilisation der Deckgläschen

Vor Beschichtung der Glasdeckgläschen mit Fibronectin oder Poly-L-Lysin wurden diese zuvor sterilisiert. Hierzu wurden die Glasdeckgläschen (18 mm) in einem 50 ml Polystyren-Röhrchen mit 100% Ethanol gelagert. Wenn Zellen für ein Experiment auf 12-Loch-Platten ausgesät werden sollten, wurden einzelne Deckgläschen mit einer sterilen Pinzette entnommen und abgeflammt, bevor sie in die 12-Loch-Platten ausgelegt wurden. Im Anschluss wurden die Deckgläschen 3 x mit Wasser oder PBS gewaschen.

4.1.5 Beschichtung von Deckgläschen

Für Immunfluoreszenz-Experimente wurden eukaryotische Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichteten und Fibroblasten auf Fibronectin-beschichteten Glasdeckgläschen (18 mm) in 12-Loch-Kulturplatten kultiviert. Zur Beschichtung wurden die sterilen abgeflamten Glasdeckgläschen in der 12-Loch-Kulturplatte mit je 1 ml Poly-L-Lysin-Lösung (1 mg/ml) bzw. mit je 1 ml Fibronectin-Lösung (0,0001% in 1 x PBS) überschichtet. Die Inkubation erfolgte für 2-3 h bei RT. Danach wurde die Lösung abgezogen und die beschichteten Deckgläschen 3 x mit sterilem H₂O bidest. bzw. 1 x PBS gewaschen. Zur weiteren

Lagerung bei 4°C wurde erneut mit sterilem H₂O bidest. bzw 1 x PBS überschichtet, um eine Austrocknung der Deckgläschen zu vermeiden. Direkt vor der Kultivierung der Zellen wurde die Flüssigkeit abgezogen und durch Vollmedium ersetzt, damit die Zellen auf den beschichteten Glasdeckgläschen ausgesät werden konnten.

4.1.6 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Die in dieser Arbeit verwendete Transfektionsmethode mit dem LipofectaminTM2000-Reagenz beruht auf dem Prinzip der Lipofektion. Dazu werden kationische Lipide genutzt, die über ionische Interaktion mit der eingesetzten Plasmid-DNA Lipid-DNA-Komplexe bilden. Diese Komplexe werden dann mittels Endozytose von den Zellen aufgenommen, wodurch die DNA in das Zellinnere gelangt. Das optimale Verhältnis von DNA und LipofectaminTM2000-Reagenz wurde für die einzelnen Plasmide ausgetestet. Am Tag vor der Transfektion wurden 100.000 COS-7-Zellen auf Glasdeckgläschen ausgesät, so dass sie für die Transfektion etwa 80-90% Konfluenz erreichten. Zur Transfektion wurde Lösung I (50 µl OptiMEM-Medium und 1-2 µg Plasmid-DNA) und Lösung II (50 µl OptiMEM1 und 2-4 µl LipofectaminTM 2000-Reagenz) angesetzt, 5 min bei RT inkubiert und anschließend vermischt. Diese Transfektionslösung wurde 30 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die zu transfizierenden Zellen mit PBS gewaschen und dann mit 500 µl erwärmten OptiMEM-Medium bedeckt. Anschließend wurde die Transfektionslösung auf die Zellen gegeben, durch leichtes Schwenken die Lösung vermischt und 6 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach dieser Zeit ist in der Regel der Transfektionsvorgang abgeschlossen, und die Transfektionslösung wurde abgenommen. Die Zellen wurden in 1 ml Vollmedium oder Hungermedium für weitere 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und konnten nun für weiterführende Experimente verwendet werden.

4.2 Immunfluoreszenz-Analysen

Die subzelluläre Lokalisation von Proteinen und Kollokalisationsexperimente wurden mittels Immunfluoreszenz-Färbungen untersucht. Die COS-7-Zellen wurden auf Glasdeckgläschen in 12-Lochkulturplatten ausgesät und am folgenden Tag transient transfiziert (siehe Kap. 4.1.6). 24 h nach der Transfektion erfolgte die Immunfluoreszenz-Färbung. Die Fibroblastenzellen wurden ebenfalls auf Glasdeckgläschen ausgesät und am darauf folgenden Tag direkt gefärbt. Dafür wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS+/+ gewaschen und zur Fixierung anschließend 20 min in 500 µl PFA-Lösung auf einem Taumelschüttler inkubiert. Nach 3 x 10 min Waschen mit PBS+/+ folgte zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen eine Inkubation in 350 µl Blockierungslösung bei RT für 30-60 min unter leichtem Schwenken. Anschließend wurden die Zellen mit dem jeweiligen primären Antikörper in 50 µl Antikörper-Lösung für 2-3 h bei RT in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Hierfür wurde je Deckgläschen 50 µl Antikörper-Lösung mit dem jeweiligen Antikörper auf einen in der feuchten Kammer

liegenden Parafilm-Streifen aufgetropft und die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf die Lösung gelegt. Danach wurden die Deckgläschen in der 12-Loch-Kulturplatte zweimal mit 1 ml Hoch-Salz-PBS+ /+ und zweimal mit 1 ml PBS+ /+ für jeweils 10 min im Dunkeln bei RT gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen in 50 µl Antikörper-Lösung mit dem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten sekundären Antikörper für 1 h bei RT im Dunkeln, ebenfalls in der feuchten Kammer, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS+ /+ für jeweils 10 min wurden die Zellen anschließend in Mowiol-488 auf Objektträgern eingebettet. Falls TexasRot Phalloidin oder MFP488-Phalloidin zur F-Aktin-Färbung verwendet wurde, wurde das entsprechende Reagenz in einer Konzentration von 0,165 µM direkt in die jeweilige Antikörper-Lösung gegeben. Phalloidin ist das Gift des Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) und interagiert höchst spezifisch mit F-Aktin, nicht aber mit G-Aktin. Die simultane Darstellung von zwei Proteinen zur Untersuchung von Kollokationen wird durch die Verwendung von primären Antikörpern aus verschiedenen Spezies ermöglicht. Mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte sekundäre Antikörper dienen hierbei der Detektion der Primärantikörper. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem konfokalen Laserscan Inversmikroskop Leica DMIRE2 mit der zugehörigen Leica TCS-Software. Die Aufnahmen wurden anschließend mit dem Programm Jasc Paint Shop ProTM Version 7.0 (Jasc Software, Panningen, NL) weiterbearbeitet. Tabelle 14 gibt einen Überblick über die verwendeten Fluoreszenzkonjugate zum Nachweis der Proteine.

Name	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge
Fluorescein	488 nm	515 nm
Alexa-Fluor [®] 488	495 nm	519 nm
Alexa-Fluor [®] 546	556 nm	573 nm
Texas [®] Rot	591 nm	608 nm
MFP [®] 488	488 nm	519 nm

Tab. 14: Verwendete Fluoreszenzkonjugate

Angegeben sind der Name des jeweiligen Fluoreszenzkonjugats sowie dessen Anregungs- und Emissionswellenlänge.

4.3 Experimente zur Analyse endozytischer Prozesse

4.3.1 Endozytose-Experimente mit Fluoreszenz-markierten Liganden in eukaryotischen Zellen

4.3.1.1 Qualitative Untersuchungen zur Aufnahme von Fluoreszenz-markiertem Transferrin, EGF und Dextran in eukaryotischen Zellen

Die eukaryotischen Zellen (transient transfizierte COS-7 oder Fibroblasten) wurden über Nacht in Hungermedium inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Endozytosemedium frisch angesetzt (Tab. 15) und die Zellen mit jeweils 400 µl für 1 h bei 4°C vorinkubiert, um alle Oberflächenrezeptoren mit den Fluoreszenz-markierten Liganden abzusättigen. Im Anschluss wurden die Zellen für unterschiedliche Zeitintervalle auf 37°C gestellt, damit die Endozytose erfolgen konnte. Nach der Inkubation wurden oberflächengebundene Liganden durch zwei Waschschrte á 5 min mit einem sauren Waschpuffer entfernt und die Zellen mit 1 x PBS gespült. Danach erfolgte wie beschrieben die Fixierung und Immunfluoreszenz-Färbung der Zellen (siehe Kap. 4.2) sowie die Auswertung mit Hilfe der konfokalen Laserscanmikroskopie.

Ligand	Konjugat	Konzentration	Endozytosemedium
Transferrin	Alexa-Fluor®488	20 µg / ml	DMEM / 0,1% BSA / 20 mM Hepes
EGF	Alexa-Fluor®488	0,5 µg / ml	DMEM / 0,1% BSA
Dextran	Fluorescein	1 mg / ml	FBS / 10% BSA

Tab. 15: Zusammensetzung des Endozytosemediums für verschiedene Fluoreszenz-konjugierte Liganden

Angegeben ist das Konjugat, die eingesetzte Konzentration der Liganden sowie die Zusammensetzung des Endozytosemediums.

4.3.1.2 Die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) als Methode zur Quantifizierung der Aufnahme von Fluoreszenz-markierten Liganden

Die Durchflusszytometrie ist eine moderne Technik zur simultanen Analyse von chemischen und physikalischen Eigenschaften von Zellen. Sie hat gegenüber der konventionellen Immunzytochemie den Vorteil, dass vitale Zellen getestet werden, die keine Veränderung ihrer antigenen Eigenschaften durch Fixation erfahren haben. Die Methode basiert auf den verschiedenen Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften der einzelnen Zellen und zeichnet sich durch eine hohe Analysegeschwindigkeit, eine objektive Quantifizierung, eine hohe Empfindlichkeit sowie, aufgrund der großen gemessenen Zellanzahl, durch eine große statistische Sicherheit aus. Zur Durchführung

einer FACS-Analyse müssen zunächst die Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden, entweder durch Aufnahme einer Fluoreszenz-markierten Substanz in die Zelle (Endozytose) oder durch einen Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper gegen ein spezifisches Antigen. Der Farbstoff kann dann später im Gerät bei 488 nm zur Lichtemission angeregt werden. Photodetektoren registrieren selektiv die verschiedenen emittierten Lichtimpulse. Spezifische Filter für die einzelnen Farbstoffe lassen nur das Licht passieren, das charakteristisch für den jeweiligen Farbstoff ist. Das aufgefangene Emissionssignal erreicht dann über vier Dekaden logarithmische Verstärkung und wird als Zählimpuls registriert. Für diese Arbeit wurde ein analytisches 5-Parameter-Durchflusszytometer verwendet. Es kann zwei Lichtstreuungen und drei Fluoreszenzen verschiedener Wellenlängen gleichzeitig registrieren. Als Systemsoftware wurde CellQuest® Pro benutzt.

4.3.1.3 Quantitative Bestimmung der Internalisierung von Fluoreszenz-markiertem Transferrin, EGF oder Dextran in Fibroblasten mittels FACS-Analyse

Die humanen Fibroblasten wurden in 6-Loch-Kulturplatten in einer Dichte von 300.000 Zellen pro Loch ausgesät und für 2-3 Tage kultiviert. Am Vortag des Experimentes wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und für 24 h bei 37°C in Hungermedium inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Endozytosemedium frisch angesetzt (Tab. 16) und die Zellen mit jeweils 700 µl für 1 h bei 4°C inkubiert, um alle Oberflächenrezeptoren mit den Fluoreszenz-markierten Liganden abzusättigen. Im Anschluss wurden die Zellen für unterschiedliche Zeitintervalle auf 37°C gestellt, damit die Endozytose erfolgen konnte. Nach der Inkubation wurden oberflächengebundene Liganden durch zwei Waschschriffe á 5 min mit einem sauren Waschpuffer entfernt und die Zellen mehrfach mit 1 x PBS gespült. Dann wurden die Zellen mit 1 ml TrypLE-Express von der Kulturplatte gelöst, in 9 ml 1 x PBS aufgenommen und für 5 min bei 900 Upm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde abschließend in 500 µl eiskaltem FACS-Puffer (1 x PBS / 10% FBS) resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gestellt. Die Messung am FACS erfolgte unverzüglich.

Ligand	Konjugat	Konzentration	Endozytosemedium
Transferrin	Alexa-Fluor®488	50 µg / ml	DMEM / 0,1% BSA / 20 mM Hepes
EGF	Alexa-Fluor®488	1 µg / ml	DMEM / 0,1% BSA
Dextran	Fluorescein	1 mg / ml	1 x PBS / 10% FBS

Tab. 16: Zusammensetzung des Endozytosemediums für verschiedene Fluoreszenz-konjugierte Liganden

Angegeben ist das Konjugat, die eingesetzte Konzentration der Liganden sowie die Zusammensetzung des Endozytosemediums.

4.3.2 Endozytose-Experimente mit radioaktiv-markierten Liganden in primären Fibroblasten

4.3.2.1 Quantitative Bestimmung der Internalisierung von radioaktiv-markiertem „low density“ Lipoprotein (LDL)

Die humanen Fibroblasten wurden in 12-Loch-Kulturplatten in einer Dichte von 200.000 Zellen pro Loch ausgesät und für 1-2 Tage kultiviert. Am Vortag der Experimente wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und für 24 h bei 37°C in Hungermedium inkubiert. Am folgenden Tag wurde den Zellen 500 µl Hungermedium mit [¹²⁵I]-LDL in unterschiedlichen Konzentrationen (2,5; 10; 25; 50 µg / ml) für 60 min bei 37°C zur Aufnahme angeboten. Im Anschluss wurden die Zellen mehrfach nach folgendem Muster gewaschen: 1 x mit eiskaltem 1 x PBS, 2 x mit eiskaltem 1 x PBS / Heparin und 1 x mit eiskaltem 1 x PBS. Dann wurden die Zellen in 500 µl 0,1 N NaOH lysiert und die in den Proben enthaltene Radioaktivität im Gamma-Counter gemessen. Abschließend wurde die Proteinkonzentration der Zellpellets mit der Methode nach Lowry (siehe Kap. 3.4.2) bestimmt und die Radioaktivität in cpm / mg Protein umgerechnet.

4.3.2.2 Quantitative Bestimmung der Aufnahme von radioaktiv-markiertem Transferrin

Die humanen Fibroblasten wurden in 12-Loch-Kulturplatten in einer Dichte von 200.000 Zellen pro Loch ausgesät und für 1-2 Tage kultiviert. Am Vortag des Experimentes wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und für 24 h bei 37°C in Hungermedium inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für unterschiedliche Zeitintervalle (5 min bis 30 min) mit [¹²⁵I]-Transferrin (50 µg / ml [¹²⁵I]-Transferrin in 500 µl Hungermedium / 20mM HEPES) bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen 3 x mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen und oberflächengebundenes Transferrin durch zwei Waschschritte á 5 min mit einem sauren Waschpuffer entfernt und erneut mit 1 x PBS gespült. Anschließend wurde wie unter Kap. 4.3.2.1 beschrieben weiterverfahren.

4.3.2.3 Quantitative Bestimmung der Internalisierung von radioaktiv-markierter Arylsulfatase B

Die humanen Fibroblasten wurden in einer Dichte von 300.000 Zellen pro 35-mm-Zellkulturschale ausgesät und für 3-4 Tage kultiviert. Am Tag des Experimentes wurden die Zellen 3 x mit 1 x PBS gewaschen und für 1 h bei 37°C in Hungermedium vorinkubiert. Anschließend wurde den Zellen [¹²⁵I]-ASB (300.000 cpm in 700 µl Hungermedium) für weitere 3 h bei 37°C in An- oder Abwesenheit des kompetitiven Hemmstoffes Mannose-6-Phosphat (M6P, 10 mM) zur Aufnahme angeboten. Dann

wurden die Zellen auf Eis gestellt, um die Endozytose zu unterbinden, das radioaktive Medium entfernt und die Zellen 5 x mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Um die oberflächengebundene ASB zu entfernen, wurden die Zellen 2 x 5 min mit einer M6P-Waschpuffer umspült. Nach drei weiteren Waschschrritten mit eiskaltem 1 x PBS wurden die Zellen in 1 ml 1 x PBS abgeschabt, sedimentiert und solubilisiert. Es folgte die Messung der zellassozierten Radioaktivität am Gamma-Counter sowie die Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Methode nach Bradford (siehe Kap. 3.4.1). Die gemessene Radioaktivität wurde dann in cpm / mg Protein umgerechnet. Abschließend wurden die Proben unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert (siehe Kap. 3.1).

4.4 Quantitative Bestimmung der Anzahl der MPR300 in primären Fibroblasten

4.4.1 [¹²⁵I]-ASB und [¹²⁵I]-2C2-Bindungsassay

Um die Oberflächenzahl bzw. Gesamtzahl der MPR300 in Zellen zu bestimmen, kann entweder ein radioaktiv-markierter Ligand ([¹²⁵I]-ASB) oder ein radioaktiv-markierter Antikörper gegen den Rezeptor ([¹²⁵I]-2C2) verwendet werden. Die Fibroblasten wurden in einer Dichte von 300.000 Zellen pro 35-mm-Zellkulturschale ausgesät und für 3-4 Tage kultiviert. Am Tag des Experimentes wurden sie zuerst 3 x mit 1 x PBS gewaschen und für 1 h bei 37°C in Hungermedium vorinkubiert. Danach wurden die Zellen durch 3-maliges Waschen mit eiskaltem 1 x PBS auf 4°C abgekühlt und für 4 h mit [¹²⁵I]-ASB oder [¹²⁵I]-2C2 (600.000 cpm in 800 µl Hungermedium / 20 mM HEPES, pH 7,4) bei 4°C inkubiert. Dann wurde das radioaktive Medium entfernt und die Zellen 5 x mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Um die Rezeptor-gebundene [¹²⁵I]-ASB bzw. [¹²⁵I]-2C2 von der Zelloberfläche zu lösen, wurden die Zellen 3 x 5 min mit einem M6P-Waschpuffer bzw. einem sauren Waschpuffer gespült. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit 1 x PBS wurden die Zellen in 1 ml 1 M NaOH abgeschabt und die zellassozierte sowie die oberflächengebundene Radioaktivität (saurer / M6P-Waschpuffer) gemessen. Zur Bestimmung der Gesamtzahl der MPR300 bzw. der Gesamtbindekapazität für [¹²⁵I]-ASB wurden die Zellen zunächst mit Hungermedium / HEPES / 0,1% Saponin (w/v) bei 4°C für 45 min permeabilisiert. Es folgte eine zweistündige Inkubation entweder mit [¹²⁵I]-2C2-Antikörpern oder [¹²⁵I]-ASB (600.000 cpm in 800 µl Hungermedium / HEPES / 0,1% Saponin). Die Zellen wurden 5 x mit 1 x PBS / 0,1% Saponin gewaschen und in 1 ml 1 M NaOH lysiert. Anschließend wurde wie unter Kap. 4.3.2.1 beschrieben weiter verfahren.

4.4.2 Quantitative Bestimmung der MPR300 auf der Zelloberfläche von primären Fibroblasten mittels FACS-Analyse

Die humanen Fibroblasten ($1,5 \times 10^6$ Zellen) wurden mit 2 ml TrypLE-Express von der Kulturflasche gelöst, 2 x mit 10 ml 1 x PBS gewaschen und für jeweils 5 min bei 900 Upm abzentrifugiert. Dann wurde das Zellpellet in 500 μ l Antikörperlösung (1 x PBS / 3% BSA + anti-MPR300) resuspendiert und für 2 h auf Eis im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 3 x mit 10 ml eiskaltem 1 x PBS gewaschen und für jeweils 5 min bei 900 Upm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde wieder in 500 μ l Antikörperlösung (1 x PBS / 3% BSA + sekundärer Antikörper) resuspendiert und für 1 h auf Eis im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Zellen 3 x mit 10 ml eiskaltem 1 x PBS gewaschen und für jeweils 5 min bei 900 Upm abzentrifugiert, in 500 μ l eiskaltem FACS-Puffer (1 x PBS / 10% FBS) aufgenommen und bis zur Messung auf Eis gestellt. Die Messung am FACS erfolgte unverzüglich.

4.5 Umrechnung der experimentellen Werte in relative Werte

Für eine anschaulichere Darstellung im Ergebnisteil wurden die absoluten Werte der Radioaktivitätsmessungen (in cpm / mg Protein) und der FACS-Analysen für jede Fibroblastenzelllinie mit dem jeweiligen Mittelwert der drei Kontrollfibroblastenzelllinien ins Verhältnis gesetzt und als Balkendiagramm dargestellt.

IV. Ergebnisse

1. Charakterisierung primärer Fibroblastenzellen von Patienten mit Lowe-Syndrom sowie einer obligaten Konduktorin

1.1 Vorbemerkungen

Zu Beginn dieser Arbeit waren die fünf dermalen Fibroblastenzelllinien LS1 bis LS5 von Patienten mit Lowe-Syndrom unterschiedlichen Alters verfügbar. Die jeweilige Mutation im *OCRL1*-Gen war im Rahmen einer molekulargenetischen Diagnostik in DNA aus Lymphozyten gefunden worden. Diese Mutationen sollten in den Fibroblastenzellen nun bestätigt werden, um die Identität der Zelllinien zu verifizieren. Zusätzlich wurden die zwei Zelllinien LS6 und LS7 käuflich erworben. Die für das Lowe-Syndrom ursächliche Mutation war in diesen beiden Zelllinien nicht bekannt. Im Laufe der Arbeit kam eine weitere Patientenzelllinie, LS8, hinzu, bei der die genetische Veränderung im *OCRL1*-Gen ebenfalls unbekannt war. Für die letzten drei Zelllinien sollte eine Mutationsanalyse des *OCRL1*-Gens durchgeführt werden. Zusätzlich sollte im Rahmen dieser Arbeit die genetische Veränderung im *OCRL1*-Gen in einer Familie mit mehreren Betroffenen aufgedeckt werden. Für die entsprechenden Untersuchungen stand lediglich die Fibroblastenzelllinie einer obligaten Konduktorin zur Verfügung, da alle Betroffenen bereits verstorben waren. Eine Sequenzanalyse des *OCRL1*-Gens hatte keine krankheitsrelevante Veränderung in der aus Fibroblasten isolierten DNA ergeben.

1.2 Nachweis der bereits bekannten Mutation im *OCRL1*-Gen in fünf Fibroblastenzelllinien von Patienten mit Lowe-Syndrom

Zunächst sollten die bereits bekannten Mutationen im *OCRL1*-Gen in den Fibroblasten LS1 bis LS5 bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurde genomische DNA aus den Fibroblasten isoliert. Das *OCRL1*-Gen besteht aus 24 kodierenden Exons. Die Etablierung der optimalen PCR-Bedingungen für jedes Exon und den angrenzenden Intronsequenzen wurde zuvor an genomischen Kontroll-DNAs durchgeführt. Die PCR-Produktgrößen der einzelnen Exons lagen zwischen 125

Bp und 510 Bp. Für vier der fünf Zelllinien mit einer bekannten Veränderung im *OCRL1*-Gen wurde jeweils nur ein Exon amplifiziert und sequenziert.

In LS1 fand sich eine Transversion in der Spleißdonorstelle des Introns 20 (c.2341+1G→C). In LS4 ist der Spleißakzeptor im Intron 10 durch eine Transition verändert (c.940-1G→A). Diese Mutationen betreffen die hoch konservierten Dinukleotide der Spleißstellen, wodurch es sehr wahrscheinlich zu einer Veränderung im Spleißvorgang kommt. In LS2 liegt eine 2 Bp-Deletion im Exon 10 vor (c.875_876delTG), wodurch es zu einer Verschiebung des Leserahmens ab der Aminosäure 292 und zum Auftreten eines vorzeitigen Stopp-Kodons nach insgesamt 310 Aminosäuren kommt. Die letzten 19 COOH-terminalen Aminosäuren sind proteinfremd. In LS3 fand sich eine 1 Bp-Duplikation im Exon 21 des *OCRL1*-Gens (c.2414dupA), wodurch an Aminosäureposition 805 aus einem für die Aminosäure Threonin kodierenden Basentriplett ein vorzeitiges Stopp-Kodon entsteht. Abbildung 11 zeigt Ausschnitte aus den Sequenzchromatogrammen für die Fibroblastenzelllinien LS1 bis LS4 im Vergleich zu den dazugehörigen Wildtypsequenzen.

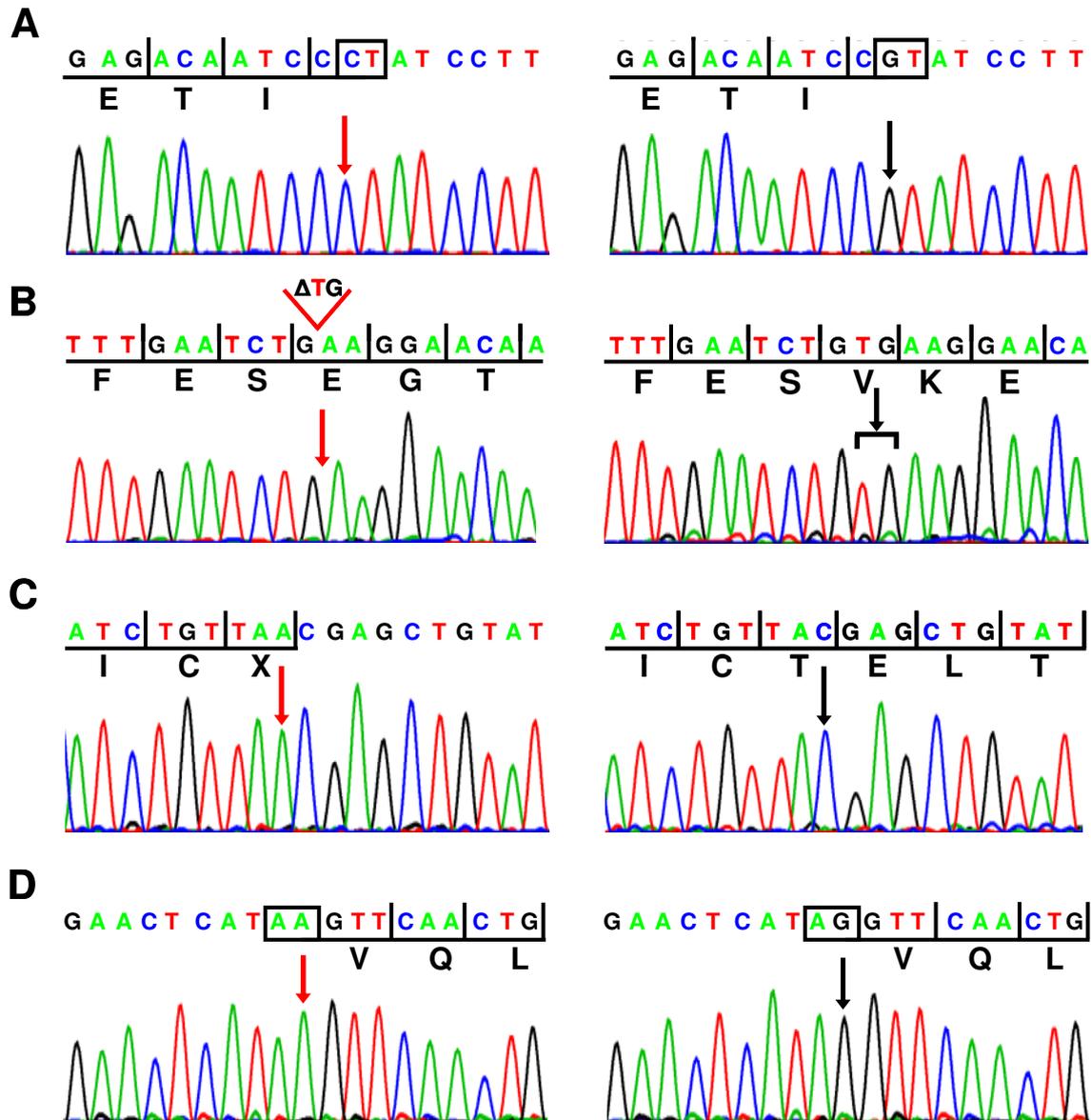


Abb. 11: Ausschnitte aus den Sequenzchromatogrammen des *OCRL1*-Gens von den vier Fibroblastenzelllinien LS1 bis LS4 und den entsprechenden Wildtypsequenzen

(A) Darstellung der Mutation c.2341+1G→C von LS1 (links) im Vergleich zur Wildtypsequenz (rechts). **(B)** Darstellung der 2 Bp-Deletion c.875_876delTG im *OCRL1*-Exon 10 von LS2 (links) und der entsprechenden Wildtypsequenz (rechts). **(C)** Darstellung der 1 Bp-Duplikation c.2414dupA von LS3 (links) verglichen mit einer Kontrollsequenz (rechts). **(D)** Darstellung der Mutation c.940-1G→A von LS4 (links) im Vergleich mit der Wildtypsequenz (rechts). Die Position der jeweiligen Mutation wurde mit einem roten Pfeil und die entsprechende Position in der Wildtypsequenz mit einem schwarzen Pfeil markiert. Jede der vier Basen wird durch eine andere Farbe dargestellt (A grün, T rot, C blau und G schwarz) und jeder Peak repräsentiert eine Base der Sequenz. Das schwarze Kästchen markiert die Akzeptor- bzw. Donorspleißstelle. Zusätzlich wurde der Leserahmen eingezeichnet und die dazugehörigen Aminosäuren im Ein-Buchstabencode angegeben.

In LS5 befindet sich auf dem X-Chromosom eine maximal 15 Kb umfassende Mikrodeletion, die die *OCRL1*-Exons 16 bis 18 beinhaltet und mittels PCR nachgewiesen werden kann. Dazu wurden die einzelnen Exons im Bereich der Deletion sowie die jeweils an die Deletion angrenzenden Exons aus DNA von LS5 und einer Kontrollzelllinie amplifiziert und die PCR-Produkte einer Agarosegelelektrophorese unterzogen. Im Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel waren nur Exon 15 und Exon 19 in der LS5-DNA als PCR-Produkt-Banden nachweisbar. Die Exons 16 bis 18 lagen im deletierten Bereich und konnten somit mittels PCR nicht amplifiziert werden. Im Gegensatz dazu konnten alle Exons in der Kontroll-DNA nachgewiesen werden (Abb. 12).



Abb. 12: Ausschnitt eines Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels mit den PCR-Produkten der *OCRL1*-Exons 15 bis 19 für LS5 und eine Kontrolle

Das Bild zeigt ein 1,5%iges Agarosegel, auf welches die PCR-Produkte der Exons 15 bis 19 des *OCRL1*-Gens von LS5 und einer Kontrollzelllinie (K) aufgetragen wurden. Die PCR-Produkte variieren in der Größe zwischen 220 und 510 Bp. Als Negativkontrolle (= Leerwert Ø) diente ein Ansatz ohne DNA. Eine 100 Bp-Leiter wurde links und rechts als Größenstandard aufgetragen. Die 300 Bp- und die 600 Bp-Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

1.3 Mutationsanalyse des *OCRL1*-Gens in drei Fibroblastenzelllinien von Patienten mit Lowe-Syndrom

Um die für das Lowe-Syndrom ursächliche Mutation zu identifizieren, wurden für jede der drei Zelllinien LS6 bis LS8 die 24 Exons des *OCRL1*-Gens amplifiziert, aufgereinigt und direkt sequenziert. Dabei zeigten die DNA-Sequenzen der LS-Zelllinien nach der datenbankgestützten Auswertung jeweils eine spezifische Veränderung in Form einer Punktmutation im *OCRL1*-Gen. Ungewöhnlich dabei war, dass die beiden Zelllinien LS6 und LS7 dieselbe Mutation, c.2530C→T, im Exon 22 tragen, wodurch an Aminosäureposition 844 aus einem für die Aminosäure Arginin kodierenden Basentriplett ein vorzeitiges Stopp-Kodon entsteht (p.R844X, Abb. 13A). Daher wurde in den weiterführenden Experimenten nur eine der beiden Zelllinien, LS6, verwendet. In der Zelllinie LS8 ließ sich die Nonsense-Mutation c.2428C→T (p.R810X) im Exon 21 identifizieren (Abb. 13B).

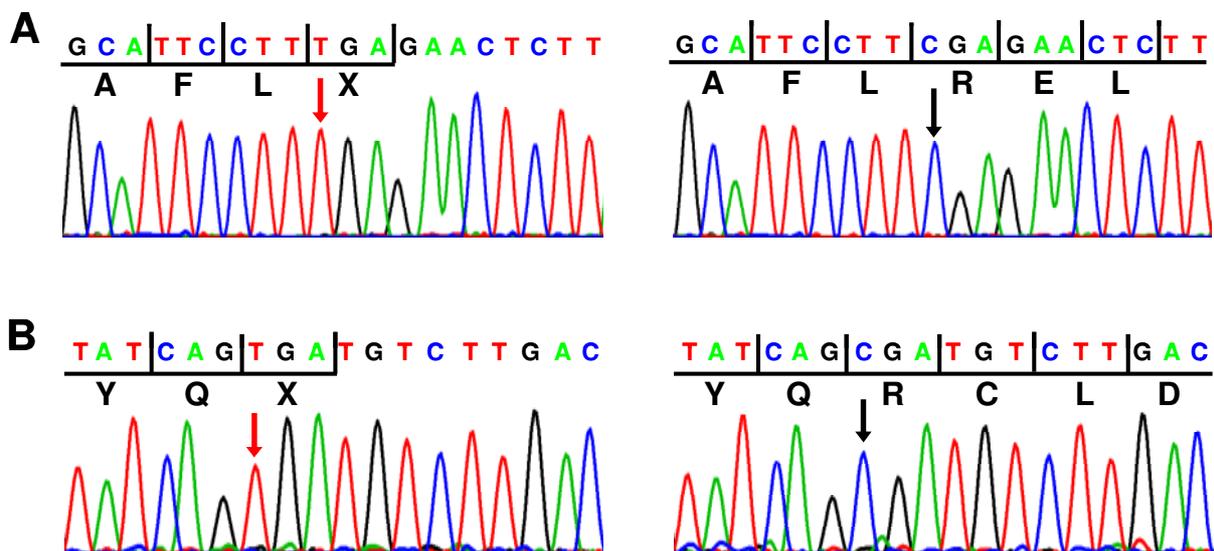


Abb. 13: Auszug aus den Sequenzchromatogrammen mit den *OCRL1*-Mutationen in den Fibroblastenzelllinien LS6 und LS8 im Vergleich zu Kontrollsequenzen

(A) Darstellung der Sequenzveränderung c.2530C→T (p.R844X) in der Zelllinie LS6 (links) und rechts die entsprechende Kontrollsequenz. **(B)** Darstellung der Mutation c.2428C→T (p.R810X) in LS8 (links) im Vergleich zu der Wildtypsequenz (rechts). Die Mutationen wurden mit einem roten Pfeil und die entsprechende Position in der Wildtypsequenz mit einem schwarzen Pfeil markiert. Jede der vier Basen wird durch eine andere Farbe dargestellt (A grün, T rot, C blau und G schwarz), und jeder Peak repräsentiert eine Base der Sequenz. Der Leserahmen wurde eingezeichnet und die dazugehörigen Aminosäuren im Ein-Buchstabencode angegeben.

1.4 Untersuchungen zum Einfluss von zwei Spleißmutationen und einer Mikrodeletion auf das Spleißen der *OCRL1*-hnRNA mit Hilfe der RT-PCR

Da die beiden intronischen Mutationen c.2341+1G→C von LS1 und c.940-1G→A von LS4 die hoch konservierten Spleißdeterminanten direkt betreffen, lag die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um Spleißmutationen handelt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, welche Auswirkungen die beiden Mutationen auf das Spleißen der *OCRL1*-hnRNA haben. Des Weiteren sollte analysiert werden, inwieweit die die drei *OCRL1*-Exons umfassende Mikrodeletion in LS5 Auswirkungen auf den Spleißvorgang hat. Zunächst wurde die Gesamt-RNA aus den entsprechenden Fibroblastenzellen isoliert. Um die Integrität der RNA zu überprüfen, wurde sie einer Agarosegelelektrophorese unterzogen. Abbildung 14 zeigt ein Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel, auf dem sich die zwei Banden der ribosomalen RNA (28S und 18S rRNA) sowie ein Schmier der ebenfalls isolierten mRNA-Moleküle erkennen lassen.

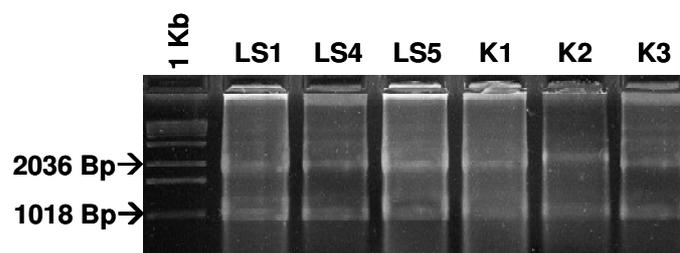


Abb. 14: Darstellung eines Agarosegels mit Gesamt-RNA aus humanen Fibroblastenzellen

Das Bild zeigt ein 0,8%iges Agarosegel mit der Gesamt-RNA aus den humanen Fibroblastenzellen LS1, LS4 und LS5 sowie von drei Kontrollzelllinien (K1 bis K3). Links wurde eine 1 Kb-Leiter als Größenstandard aufgetragen. Die 1018 Bp- und die 2036 Bp-Banden sind durch einen Pfeil markiert.

Im Anschluss wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR-Analyse untersucht. Um die Auswirkungen der Mutation c.2341+1G→C im Intron 20 auf den Spleißvorgang zu untersuchen, wurde ein RT-PCR-Produkt amplifiziert, das die *OCRL1*-Exons 19 bis 22 überspannt (RT-PCR 3 in Abb. 15). Zur Analyse der Spleißmutation c.940-1G→A im Intron 10 wurde ein Vorwärtsprimer im Exon 8 und ein Rückwärtsprimer im Exon 12 des *OCRL1*-Gens für die RT-PCR eingesetzt (RT-PCR 1 in Abb. 15).

Zur genaueren Untersuchung der Mikrodeletion (*OCRL1*-Exons 16 bis 18) wurde für die Generierung des RT-PCR-Produktes ein Vorwärtsprimer im Exon 15 und ein Rückwärtsprimer im Exon 19 verwendet (RT-PCR 2 in Abb. 15). Für alle LS- und Kontroll-cDNAs konnten mit den Primerkombinationen RT-PCR-Produkte amplifiziert werden. Dabei unterschieden sich die RT-PCR-Produkte von LS1 und LS5 in der Größe von denen der Kontrollen. Im Fall von LS4 war kein Größenunterschied im Agarosegel sichtbar (Abb. 15).

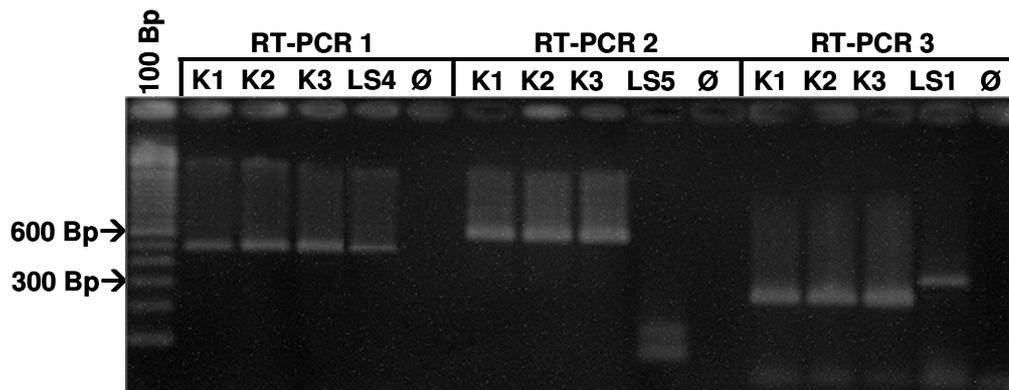


Abb. 15: Ausschnitt eines Agarosegels mit verschiedenen RT-PCR-Produkten von LS1, LS4 und LS5 und von Kontrollen

Das Bild zeigt ein 1,5%iges Agarosegel mit den RT-PCR-Produkten von den Fibroblastenzelllinien LS1, LS4 und LS5 und drei Kontrollen (K1 bis K3). Die RT-PCR-Produkte variieren in der Größe zwischen 100 Bp und 600 Bp. Als Negativkontrolle (= Leerwert Ø) diente ein Ansatz ohne cDNA. Eine 100 Bp-Leiter wurde links als Größenstandard aufgetragen. Die 300 Bp- und die 600 Bp-Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Primerkombinationen für die RT-PCRs 1 bis 3 sind dem Text zu entnehmen.

Die RT-PCR-Produkte der drei LS-Zelllinien wurden anschließend in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert. Die nach der Transformation erhaltenen weißen Kolonien wurden mit Hilfe der Kolonie-PCR untersucht. Die Kolonie-PCR-Produkte wurden aufgereinigt und direkt sequenziert. Die Auswertung von 25 Sequenzen von LS1 ergab, dass aufgrund der Mutation c.2341+1G→C des Spleißdonors im Intron 20 des *OCRL1*-Gens kein Wildtyptranskript mehr gebildet wird. Stattdessen ließen sich zwei unterschiedliche fehlgespleißte *OCRL1*-mRNAs im gleichen Verhältnis (12:13) nachweisen, die verschiedene Sequenzabschnitte des Introns 20 enthielten. In beiden Transkripten war das Exon 20 am 3'-Ende um 36 Bp verlängert und das Exon 21 im 5'-Bereich um 48 Bp verkürzt (Abb. 16B).

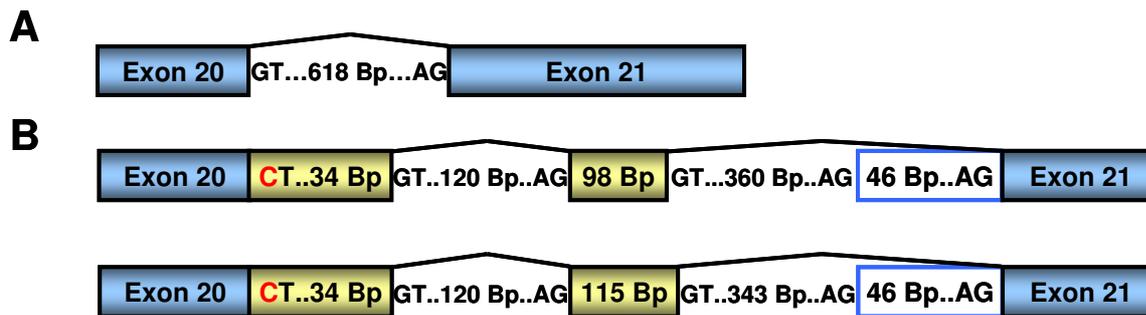


Abb. 16: Spleißvarianten der *OCRL1*-mRNA in der Zelllinie LS1

Die Abbildung zeigt schematisch Ausschnitte aus der *OCRL1*-Wildtyp-mRNA (**A**) und den *OCRL1*-Spleißvarianten der Zelllinie LS1 (**B**). Blaue Kästchen repräsentieren Exons und blau umrandete weiße Kästchen stellen fehlende Exonabschnitte in der *OCRL1*-mRNA dar. Gelbe Balken repräsentieren Intronbereiche, die in den *OCRL1*-Spleißvarianten nachweisbar waren. Die mutierte Base im Intron 20 ist rot hervorgehoben. Die natürlichen und kryptischen Spleißakzeptor- (AG) und -donorstellen (GT) sowie die Größe (Bp) der dazwischen liegenden Intronabschnitte sind angegeben.

Durch das Vorhandensein von Intron 20-Abschnitten in *OCRL1*-mRNAs von LS1 kommt es zu einer Verschiebung des Leserahmens ab der Aminosäureposition 781 und zum Auftreten eines vorzeitigen Stopp-Kodons nach weiteren 66 bzw. 72 für proteinfremde Aminosäuren kodierenden Basentriplets.

Die Sequenzanalyse der klonierten RT-PCR-Produkte von LS4 ergab ebenfalls das Fehlen von *OCRL1*-Wildtyptranskripten. Stattdessen waren zwei verschiedene *OCRL1*-Transkripte nachweisbar, die sich durch fehlerhaftes Spleißen des Exons 11 unterschieden. In einer Spleißvariante fehlte die erste Base von Exon 11 und in der anderen war das Exon 11 im 5'-Bereich um 47 Bp verkürzt (Abb. 17B). In beiden Spleißvarianten kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters ab dem Kodon 314 und zu einem vorzeitigen Stopp-Kodon nach weiteren, für 8 proteinfremde Aminosäuren kodierenden Basentriplets.

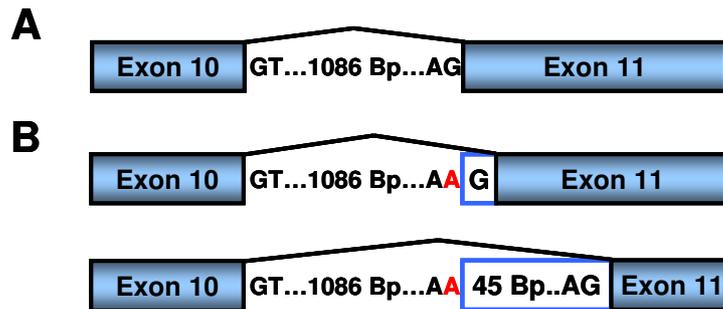


Abb. 17: Spleißvarianten der *OCRL1*-mRNA in der Zelllinie LS4

Die Abbildung zeigt schematisch Ausschnitte aus der *OCRL1*-Wildtyp-mRNA (**A**) und den *OCRL1*-Spleißvarianten der Zelllinie LS4 (**B**). Blaue Kästchen repräsentieren Exons und blau umrandete weiße Kästchen stellen fehlende Exonabschnitte in der *OCRL1*-mRNA dar. Die mutierte Base im Intron 10 ist rot hervorgehoben. Die natürlichen und kryptischen Spleißakzeptor- (AG) und -donorstellen (GT) sowie die Größe (Bp) der dazwischen liegenden Intronabschnitte sind angegeben.

Nach Auswertung der Sequenzen von LS5 zeigte sich, dass die drei *OCRL1*-Exons 16 bis 18 in der aus den Fibroblasten isolierten *OCRL1*-mRNA fehlten. Es ließen sich zwei Spleißvarianten unterscheiden, eine mit und eine ohne Exon 18a (Abb. 18B). Der Verlust der Exons 16 bis 18 führt zu einer *in frame* Deletion, sodass es zu keiner Verschiebung des Leserahmens kommt. Auffällig war das häufige Auftreten einer Spleißvariante inklusive Exon 18a in 18 von 20 der analysierten Sequenzen. Normalerweise findet sich in den meisten Geweben mengenmäßig deutlich mehr von der kürzeren *OCRL1*-Variante (ohne Exon 18a), wohingegen *OCRL1*-Transkripte inklusive Exon 18a verstärkt im Gehirn zu finden sind (Johnson et al. 2003).

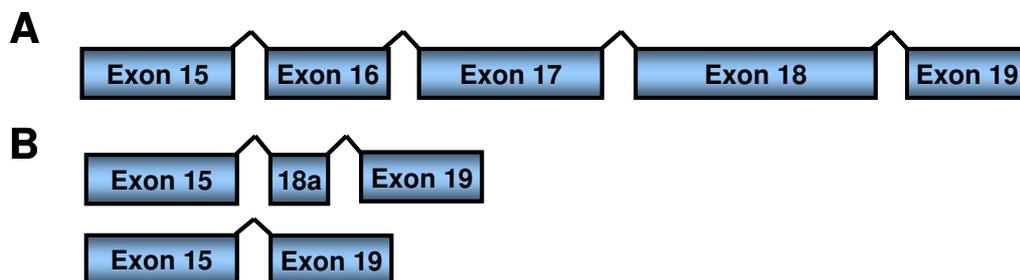


Abb. 18: Spleißvarianten der *OCRL1*-mRNA der Zelllinie LS5

Die Abbildung zeigt schematisch Ausschnitte aus der *OCRL1*-Wildtyp-mRNA (**A**) und den *OCRL1*-Spleißvarianten der Zelllinie LS5 (**B**). Die *OCRL1*-Exons sind durch blaue Balken dargestellt.

1.5 Mutationsanalyse des *OCRL1*-Gens in einer holländischen Familie mittels RT-PCR-Analyse und Nachweis der Mutation mittels „Junction“-PCR

Bis zu Beginn dieser Arbeit war die ursächliche Mutation im *OCRL1*-Gen in einer holländischen Familie, in der es mehrere Betroffene mit Lowe-Syndrom gab (Abb. 19), nicht bekannt. Die Sequenzanalyse des *OCRL1*-Gens an genomischer DNA der obligaten Konduktorin II-5 hatte keine pathogene Mutation aufgedeckt.

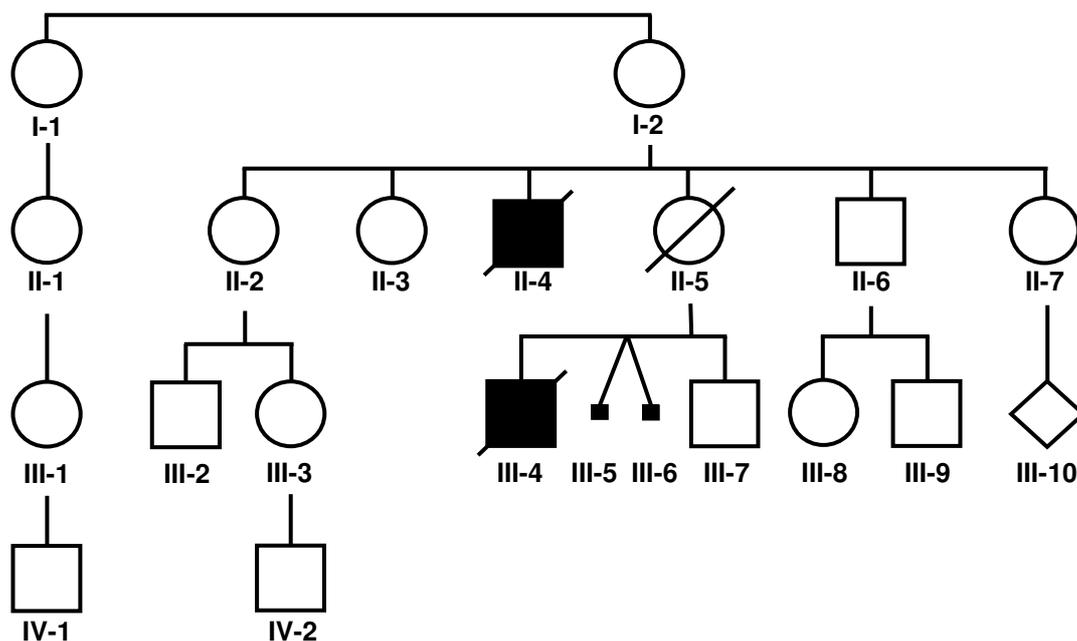


Abb. 19: Stammbaum einer holländischen Familie mit Lowe-Syndrom

Die Abbildung zeigt den Stammbaum einer holländischen Familie mit mehreren von Lowe-Syndrom betroffenen Familienmitgliedern. Weibliche Individuen sind als Kreise und männliche Individuen als Quadrate dargestellt. Personen unbekanntes Geschlechts sind durch eine Raute repräsentiert. Symbole bereits verstorbener Familienmitglieder sind durchgestrichen, und Symbole vom Lowe-Syndrom betroffener Individuen sind schwarz ausgefüllt.

Der molekulargenetische Nachweis für das Lowe-Syndrom sollte nun im Rahmen dieser Promotionsarbeit erbracht werden. Zu diesem Zweck stand die dermale Fibroblastenzelllinie LS9 der verstorbenen Konduktorin II-5 zur Verfügung. Aus den Fibroblastenzellen wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Für die RT-PCR-Analyse wurden zahlreiche Kombinationen von vorwärts und rückwärts gerichteten Oligonukleotiden verwendet, die die *OCRL1*-cDNA-Sequenz vollständig abdeckten. Es zeigte sich, dass bei LS9 Doppelbanden (mindestens zwei verschieden große Amplikons) für den die Exons 18 bis 22 überspannenden

Bereich der *OCRL1*-mRNA im Agarosegel auftraten, die bei einer Kontroll-cDNA nicht nachgewiesen werden konnten. In Abbildung 20 sind die RT-PCR-Produkte ausgewählter Primerkombinationen für LS9 und eine Kontrollzelllinie gezeigt.

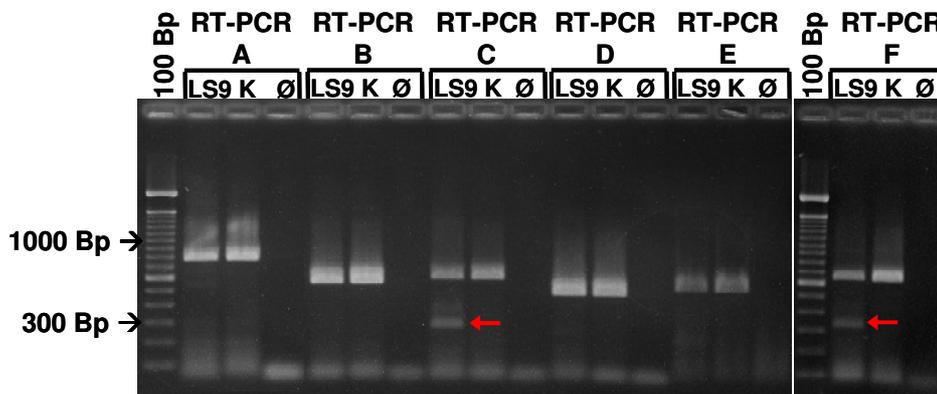


Abb. 20: Ausschnitte aus Agarosegelen mit verschiedenen RT-PCR-Produkten von LS9 und einer Kontrolle

Das Bild zeigt zwei 1,5%ige Agarosegele mit den Produkten der RT-PCRs A bis F für LS9 im Vergleich mit einer Kontroll-cDNA (K). RT-PCR A deckt den Bereich von *OCRL1*-Exon 16 bis Exon 21 ab. RT-PCR B beinhaltet die *OCRL1*-Exons 17 bis 21 und RT-PCR C Exons 17 bis 22. RT-PCR D umfasst die *OCRL1*-Exons 18 bis 21 und RT-PCR E die Exons 18 bis 22. RT-PCR F schließt die *OCRL1*-Exons 18 bis 23 ein. Die Wildtyp-RT-PCR-Produkte variieren in der Größe zwischen 500 Bp und 800 Bp, und die Größen der aberranten RT-PCR-Produkte liegen zwischen 200 Bp und 400 Bp. Nur im Agarosegel erkennbare aberrante RT-PCR-Produkte (roter Pfeil) wurden für die nachfolgenden Analysen weiterverwendet. Als Negativkontrolle (= Leerwert Ø) diente ein Ansatz ohne cDNA. Eine 100 Bp-Leiter wurde links als Größenstandard aufgetragen. Die 300 Bp- und die 1000 Bp-Banden sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet.

Im Fall von zwei deutlich erkennbaren, unterschiedlich großen PCR-Produkten (RT-PCR C und F) wurden diese in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert und Kolonie-PCRs durchgeführt. Die Kolonie-PCR-Produkte wurden aufgereinigt und direkt sequenziert. Die Auswertung der Sequenzchromatogramme ergab, dass neben dem Wildtyptranskript drei unterschiedliche, fehlgespleißte *OCRL1*-mRNAs nachweisbar waren. In einer Spleißvariante war das Exon 18 direkt an das Exon 22 gespleißt. In einer anderen war Exon 21 im 5'-Bereich um 48 Bp verkürzt. Zusätzlich ließ sich einmal eine komplexe Spleißvariante finden, die nach Exon 18 einen Sequenzabschnitt vom Intron 18 enthielt, gefolgt von einer 3 Bp-Insertion und einem im 5'-Bereich um 11 Bp verkürzten Exon 21. Die Abbildung 21 zeigt eine schematische Darstellung der verschiedenen Spleißvarianten in der Fibroblastenzelllinie LS9.

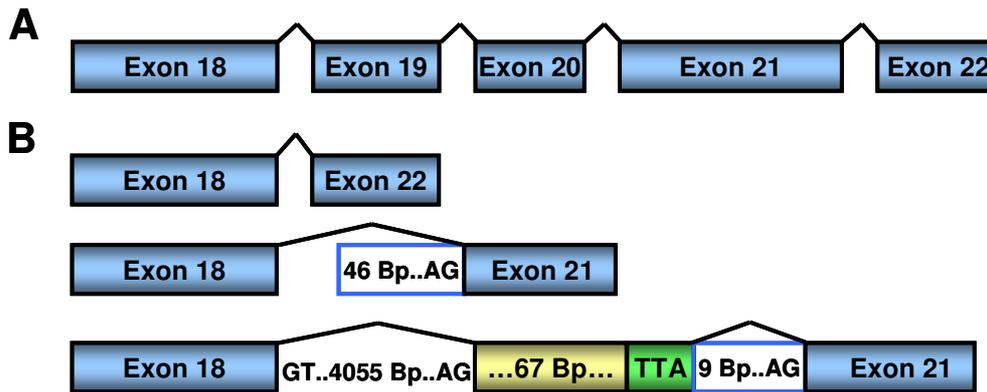


Abb. 21: Spleißvarianten der *OCRL1*-mRNA in der Zelllinie LS9

Die Abbildung zeigt schematisch Ausschnitte aus der *OCRL1*-Wildtyp-mRNA (**A**) und den drei *OCRL1*-Spleißvarianten der Zelllinie LS9 (**B**). Blaue Kästchen repräsentieren Exons und blau umrandete weiße Balken stellen fehlende Exonabschnitte in der *OCRL1*-mRNA dar. Der gelbe Balken repräsentiert einen intronischen Abschnitt, der in den *OCRL1*-Spleißvarianten nachweisbar war, und das grüne Kästchen stellt neu inserierte Basen dar. Die natürlichen und kryptischen Spleißakzeptor- (AG) und -donorstellen (GT) sowie die Größe (Bp) der dazwischen liegenden Intronabschnitte sind für die untere Spleißvariante angegeben.

Nach Auswertung der Sequenzen der klonierten RT-PCR-Produkte von LS9 wurde vermutet, dass es sich bei der genomischen Veränderung im *OCRL1*-Gen entweder um eine Inversion oder um eine Deletion im Bereich der Exons 18 bis 21 handeln müsste. Beiden Hypothesen wurde auf genomischer Ebene nachgegangen, indem verschiedene PCR-Primerkombinationen an der DNA von LS9 durchgeführt wurden. Nur bei Primerkombinationen, die eine mögliche Deletion überspannten, waren aus der DNA von LS9 „Junction-Fragmente“ mittels PCR amplifizierbar. Aus einer mitgeführten Kontroll-DNA konnten diese PCR-Produkte nicht amplifiziert werden, da die Größe der zu amplifizierenden Wildtyp-Amplikons 5 Kb oder größer gewesen wäre (Abb. 22).

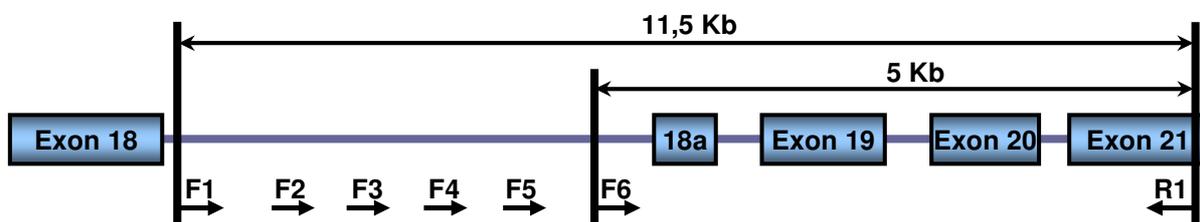


Abb. 22: PCR-Primerlage zum Nachweis einer Mikrodeletion in LS9

Die Abbildung zeigt schematisch einen Ausschnitt aus dem *OCRL1*-Gen mit der Lage der verschiedenen Vorwärts- und des Rückwärtsprimers zur Generierung von „Junction“-PCR-Fragmenten. Die Exons sind durch blaue Balken und die Introns durch blaue Linien dargestellt. Oberhalb der Exon-Intron-Struktur ist der maximale und minimale Abstand zwischen den Vorwärts- und dem Rückwärtsprimer in Kb angegeben und unterhalb sind die PCR-Primer als schwarze Pfeile eingezeichnet.

Die „Junction“-Fragmente der PCRs A, B und C wurden jeweils aus einer Kombination der Vorwärtsprimer F1, F2 bzw. F3 mit dem Rückwärtsprimer R1 generiert. Im Gegensatz dazu konnten aus der Kombination der Vorwärtsprimer F4, F5 bzw. F6 mit dem Rückwärtsprimer R1 keine PCR-Produkte aus DNA von LS9 amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Abbildung 23 zeigt ein Agarosegel mit den Produkten der PCRs A, B und C von LS9.

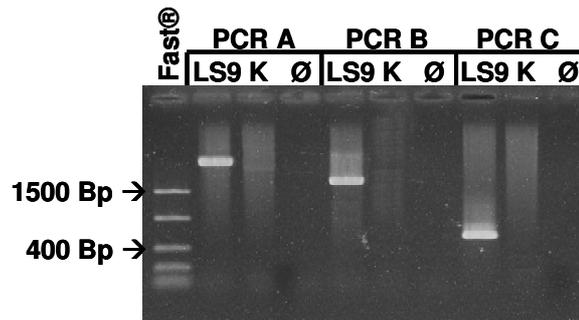


Abb. 23: Ausschnitt eines Agarosegels mit verschiedenen „Junction“-PCR-Fragmenten von LS9 im Vergleich mit einer Kontrolle

Das Bild zeigt ein 1,5%iges Agarosegel mit den verschiedenen „Junction“-PCR-Produkten aus den PCRs A bis C für LS9 im Vergleich mit einer Kontroll-DNA (K). Die Größe der PCR-Produkte von LS9 liegt für PCR A bei etwa 3300 Bp, für PCR B bei ~2000 Bp und für PCR C bei ca. 550 Bp. Als Negativkontrolle (= Leerwert Ø) diente ein Ansatz ohne DNA. Eine Fast®Ruler-Leiter wurde links als Größenstandard aufgetragen. Die 400 Bp- und die 1500 Bp-Banden sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet.

Das „Junction“-Fragment der PCR C wurde aufgereinigt und direkt sequenziert. Wie sich zeigte, fehlten in diesem PCR-Produkt 8285 Bp des *OCRL1*-Gens, wobei ein Bruchpunkt im Intron 18 und der zweite Bruchpunkt im Exon 21 lokalisiert war. Zwischen den Deletionsbruchpunkten konnte eine 3 Bp-Insertion (TTA) nachgewiesen werden (Abb. 24).

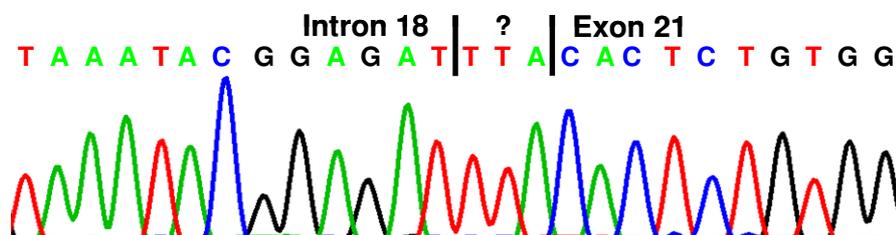


Abb. 24: Ausschnitt aus dem Sequenzchromatogramm eines Deletionsbruchpunkt-überspannenden „Junction“-PCR-Fragmentes von LS9

Dargestellt ist die DNA-Sequenz des „Junction“-Fragmentes aus der PCR C von LS9 im Bereich der Deletionsbruchpunkte in Intron 18 und Exon 21 des *OCRL1*-Gens. Jede der vier Basen wird durch eine andere Farbe dargestellt (A grün, C blau, G schwarz und T rot). Schwarze Längsstriche markieren die Deletionsbruchpunkte. Zwischen den beiden Deletionsbruchpunkten wurde das Basentriplett TTA inseriert.

Nach Bestimmung der Deletionsbruchpunkte auf molekularer Ebene war es nun möglich, eine Drei-Primer-PCR zu etablieren, mittels derer zwischen Wildtyp-Allel-tragenden Personen (in homozygotem oder hemizygotem Zustand), Konduktorinnen und betroffenen männlichen Personen in der holländischen Familie unterschieden werden konnte. Dafür wurden zwei vorwärts gerichtete Primer im Intron 18 - einer vor der Deletion liegend und einer im deletierten Bereich - zusammen mit einem rückwärts orientierten Primer am Ende von Exon 21 in der PCR an genomischer DNA kombiniert. Im Fall einer heterozygoten Konduktorin ist das „Junction“-PCR-Fragment als zweite Bande im Agarosegel sichtbar. Mit Hilfe dieser PCR konnten die weiblichen Familienmitglieder I-2, II-2, II-3, II-5 und III-3 molekulargenetisch als konstitutionelle Konduktorinnen für das Lowe-Syndrom identifiziert werden. Abbildung 25 gibt einen Überblick über das Auftreten des Deletion-tragenden Allels unter den Mitgliedern der holländischen Familie.

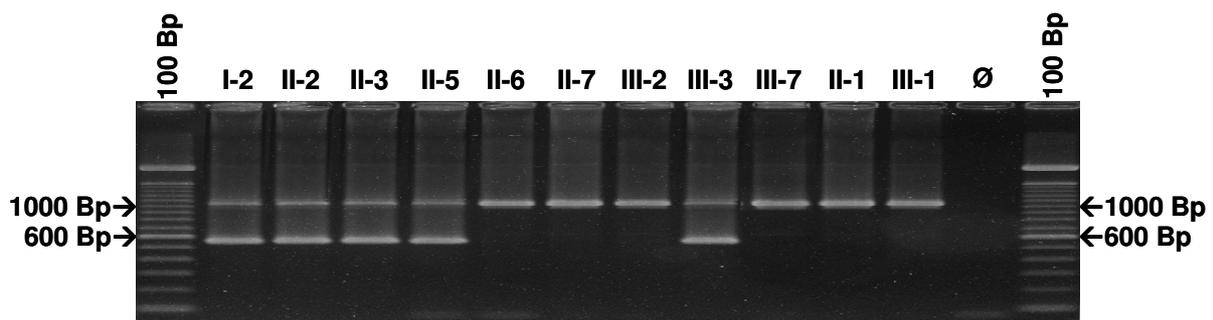


Abb. 25: Agarosegel mit Drei-Primer-PCR-Produkten einiger Mitglieder der holländischen Familie mit Lowe-Syndrom

Das Bild zeigt ein 1,5%iges Agarosegel mit den Produkten der Drei-Primer-PCR für die Individuen I-2, II-2, II-3, II-5, II-6, II-7, III-2, III-3, III-7, II-1 und III-1 der holländischen Familie. Die Größe der PCR-Produkte lag für das Wildtypallel bei ca. 1100 Bp und für das die Deletion tragende Allel bei etwa 550 Bp. Als Negativkontrolle (= Leerwert Ø) diente ein Ansatz ohne DNA. Eine 100 Bp-Leiter wurde links und rechts als Größenstandard aufgetragen. Die 600 Bp- und die 1000 Bp-Banden sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet.

1.6 *OCRL1*-Expressionsanalyse in primären Fibroblastenzellen von Patienten mit Lowe-Syndrom mittels RT-PCR und Western-Blot-Analyse

Um zu untersuchen, ob einige der *OCRL1*-Mutationen in den LS-Fibroblasten möglicherweise zu einem Abbau der mRNA („Nonsense-mediated mRNA decay“, NMD) führen, wurde eine qualitative Expressionsanalyse der *OCRL1*-mRNA durchgeführt. Für die cDNA-Synthese wurden Hexanukleotide und Gesamt-RNA aus den Fibroblastenzellen LS1 bis LS6 und LS8 sowie von den drei Kontrollen K1 bis K3 verwendet. Da LS7 dieselbe Mutation trägt wie LS6, wurde nur eine der beiden Zelllinien für alle weiteren Untersuchungen benutzt. Die erfolgreiche cDNA-Synthese wurde zunächst durch Amplifikation eines Haushaltsgens, der Fumarat-Hydratase (*FH*), bestätigt (Abb. 26A). Anschließend wurden zwei unterschiedliche Abschnitte des *OCRL1*-Gens (Exon 2 bis Exon 6 und Exon 21 bis Exon 23) amplifiziert und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Die Auswertung der Agarosegele zeigte, dass in allen Fibroblastenzelllinien die beiden Abschnitte der *OCRL1*-mRNA als RT-PCR-Banden sichtbar waren (Abb. 26B,C).

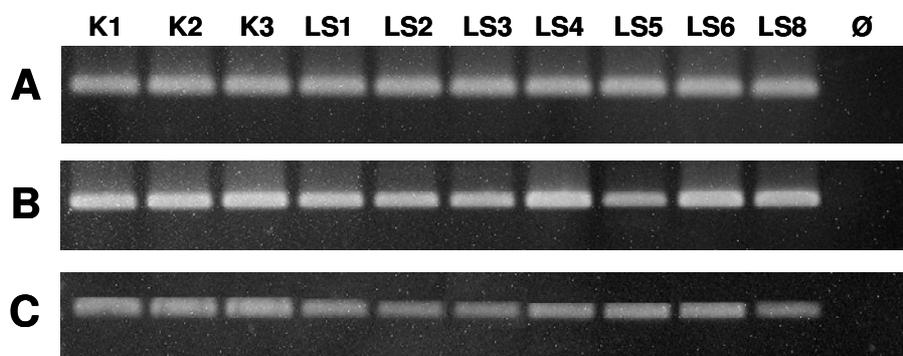


Abb. 26: Auschnitte verschiedener Agarosegele mit spezifischen RT-PCR-Produkten für das *OCRL1*-Gen sowie für das *FH*-Gen

Die Abbildung zeigt 1,5%ige Agarosegele mit den RT-PCR-Produkten der Kontrollfibroblasten K1 bis K3 und der LS-Fibroblastenzelllinien LS1 bis LS8 (ohne LS7) für die Exons 1 bis 3 der Fumarat-Hydratase mit einer Größe von 322 Bp (**A**), für ein *OCRL1*-Exon 2 bis 6 umfassendes Fragment mit 362 Bp Größe (**B**) und für die Exons 21 bis 23 des *OCRL1*-Gens mit einer Größe von 303 Bp (**C**). Als Negativkontrolle (= Leerwert Ø) diente ein Ansatz ohne cDNA.

Nachdem gezeigt wurde, dass in den LS-Fibroblastenzellen *OCRL1*-Transkripte vorhanden sind, sollte mittels Western-Blot (WB) Analyse untersucht werden, ob diese auch für die Proteinbiosynthese von OCRL-Protein genutzt werden. Für diesen Zweck wurden sechs verschiedene anti-OCRL-Antikörper (zwei käuflich erworbene und vier von anderen Arbeitsgruppen freundlicherweise zur Verfügung gestellte) im WB ausgetestet und vergleichende Analysen zwischen Kontroll- und Patientenfibroblasten-Proteinlysaten durchgeführt (Daten hier nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, dass der affinitätsaufgereinigte polyklonale anti-OCRL-Antikörper 4 (Olivos-Glander et al. 1995) am besten im WB funktionierte. In allen Kontrollfibroblasten war eine Bande bei 105 kDa nachweisbar, die das „full-length“ OCRL-Protein repräsentiert (Abb. 27). Im Gegensatz dazu konnte in sechs von sieben LS-Fibroblasten keine OCRL-Bande im Western-Blot detektiert werden. Im Lysat der Patientenzelllinie LS5 war eine Bande bei ca. 80 kDa präsent, die vermutlich ein trunkiertes OCRL-Protein darstellt (Abb. 27). In LS5 liegt die Exons 16 bis 18 umfassende *in frame* Mikrodeletion vor, und die vorhergesagte Größe eines um die entsprechenden Aminosäuren verkürzten OCRL-Proteins beträgt ca. 83 kDa, was der Bande von ca. 80 kDa im WB entsprechen könnte. In allen Fibroblastenlysaten konnte das Referenzprotein GAPDH detektiert werden (Abb. 27).

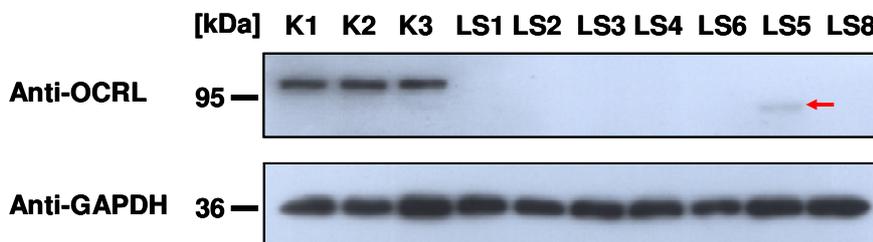


Abb. 27: Western-Blot Analyse zum Nachweis des OCRL-Proteins in Kontroll- und LS-Fibroblasten

Das aus den Fibroblastenzellen isolierte Gesamtprotein wurde mittels eines 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit einem affinitätsaufgereinigten polyklonalen anti-OCRL-Antikörper (Olivos-Glander et al. 1995) detektiert. Dargestellt ist die Detektion von „full-length“ OCRL (~105 kDa) verglichen mit dem Referenzprotein GAPDH (~36 kDa) in den drei Kontrollzelllinien K1 bis K3 und den sieben LS-Fibroblasten LS1 bis LS6 und LS8. Die Bande mit dem trunkierten OCRL-Protein von LS5 ist mit einem roten Pfeil markiert. Links sind zwei Molekulargewichte in kDa des verwendeten Proteinstandards angegeben.

2. Zellbiologische Experimente zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von OCRL in COS-7-Zellen

2.1 Vorbemerkungen

Wie bereits einführend erwähnt, konnte gezeigt werden, dass eine Koexpression des OCRL-Proteins bzw. dessen isolierter RhoGAP-Domäne mit verschiedenen Rac1-Proteinvarianten zu einer Translokation des OCRL-Proteins bzw. der RhoGAP-Domäne an die Plasmamembran führt (Faucherre *et al.* 2003, 2005). Darüberhinaus führt auch eine Stimulation mit dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF zu einer Translokation von OCRL und anderer humaner Phosphatasen (z.B. Synaptojanin 2 und SH2-Domäne enthaltende Inositol-5-Phosphatase SHIP2) an die Plasmamembran (Faucherre *et al.* 2005; Malecz *et al.* 2000; Pesesse *et al.* 2001). EGF steht in engem Zusammenhang mit Rac1, da es die Aktivierung der GTPase induziert (Marcoux und Vuori 2003). Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss verschiedener Rac1-Proteinvarianten auf die subzelluläre Lokalisation des OCRL-Proteins untersucht werden.

2.2 Immunzytochemische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation verschiedener OCRL-Proteinvarianten

Bevor der Einfluss einer Rac1-Koexpression bzw. EGF-Stimulation auf die subzelluläre Lokalisation des OCRL-Proteins untersucht werden konnte, sollte die subzelluläre Verteilung von OCRL und unterschiedlichen OCRL-Mutantenproteinen analysiert werden. Hierfür standen verschiedene OCRL-Konstrukte zur Verfügung: pMT2SM-HA-OCRL+18a (HA-OCRL+18a; entspricht der OCRL-Isoform A), pMT2SM-HA-OCRL-18a (HA-OCRL-18a; entspricht der OCRL-Isoform B), pMT2SM-HA-OCRL_R493A,R500T (HA-OCRL_R493A,R500T) und pMT2SM-HA-OCRL_V577E (HA-OCRL_V577E). HA-OCRL_R493A,R500T entspricht der OCRL-Isoform B mit den Missensemutationen R493A und R500T in der Phosphatase-Domäne, wodurch das HA-OCRL-Fusionsprotein katalytisch inaktiviert wird. HA-OCRL_V577E entspricht der OCRL-Isoform B mit der Missensemutation V577E in der ASH-Domäne, die bei einem Patienten mit LS gefunden wurde und für die gezeigt werden konnte, dass sie die Interaktion von OCRL mit dem Adaptorprotein APPL1 verhindert (McCrea *et al.* 2008). COS-7-Zellen wurden mit den verschiedenen OCRL-Konstrukten (Abb. 28A) transient

transfiziert und anschließend die OCRL-Fusionsproteine mit einem primären anti-HA-Antikörper und einem sekundären Alexa Fluor 546-konjugierten Antikörper nachgewiesen. Die Auswertung der Experimente wurde mit Hilfe der konfokalen Laserscanmikroskopie durchgeführt. In der Abbildung 28B ist beispielhaft für jede der OCRL-Proteinvarianten die subzelluläre Lokalisation gezeigt.

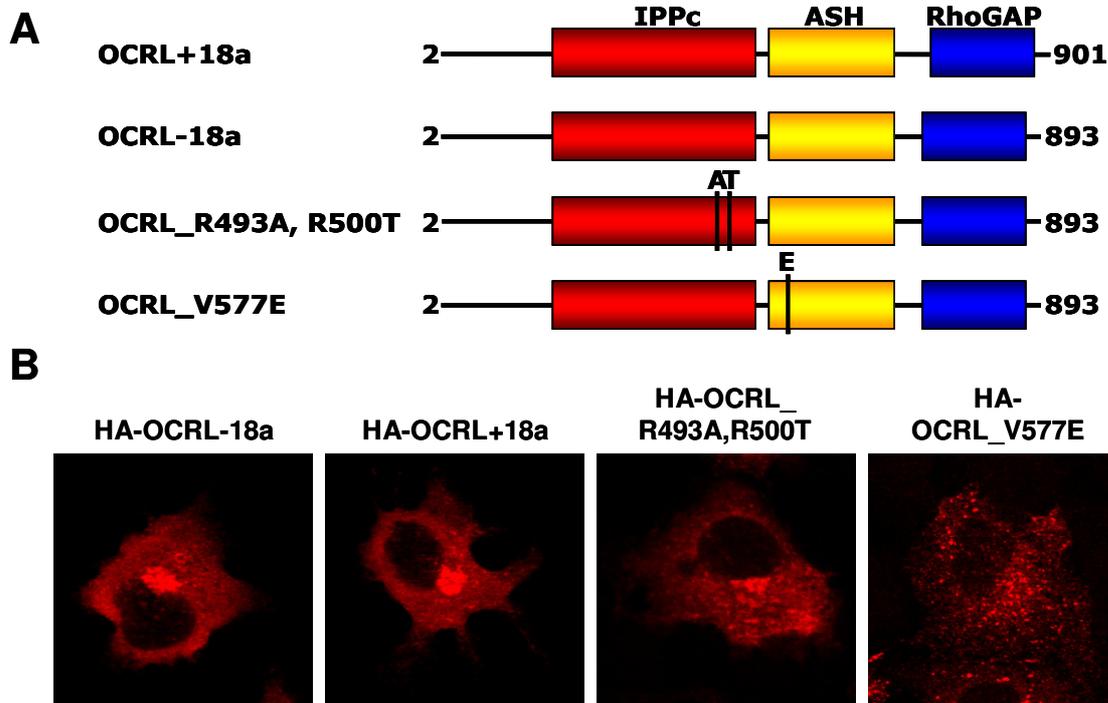


Abb. 28: Schematische Darstellung der Domänenstruktur und subzelluläre Lokalisation verschiedener OCRL-Proteinvarianten in COS-7-Zellen

(A) Die Domänenstruktur ist schematisch dargestellt: IPPc/■: Inositolpolyphosphat-5-Phosphatase-Domäne; ASH/■: ASPM, SPD-2, Hydin-Domäne; RhoGAP/■: GTPase aktivierendes Protein-ähnliche Domäne. Schwarze Zahlen beziffern die Aminosäuren. Die vertikalen Striche in der IPPc- und ASH-Domäne von OCRL geben die Positionen der Aminosäureaustausche (R493A, R500T und V577E) an. **(B)** COS-7-Zellen wurden mit den unterschiedlichen pMT2SM-HA-OCRL-Plasmiden transient transfiziert und die Fusionsproteine anschließend mit einem anti-HA-Primärantikörper und einem Alexa Fluor 546-konjugiertem Sekundärantikörper detektiert. Die Auswertung erfolgte an einem konfokalen Laserscanmikroskop.

Die Fusionsproteine HA-OCRL+18a und HA-OCRL-18a wiesen das für das OCRL-Protein charakteristische Verteilungsmuster in der Zelle auf. Die stärkste Konzentration war in der Nähe des Zellkerns, am Golgi-Apparat, zu beobachten. Eine vergleichbare Lokalisation war auch für HA-OCRL_R493A,R500T nachweisbar. Da sich die subzelluläre Verteilung der beiden Fusionsproteine HA-OCRL+18a und HA-OCRL-18a in der Immunfluoreszenz nicht unterschied, wurde in den weiterführenden Experimenten nur mit einem der beiden Plasmide

(pMT2SM-HA-OCRL-18a) weitergearbeitet. Die Überexpression von HA-OCRL_V577E ergab ein anderes Verteilungsmuster des Proteins in der Zelle. HA-OCRL_V577E war in vergrößerten, möglicherweise vesikulären Strukturen im Zytoplasma zu finden, und die Golgi-Lokalisation war nicht mehr erkennbar. Um zu untersuchen, in welchen Strukturen HA-OCRL_V577E in der Zelle akkumuliert, wurden Koloalisationsexperimente mit verschiedenen endogenen Markerproteinen durchgeführt. Dafür wurden COS-7-Zellen mit pMT2SM-HA-OCRL_V577E transient transfiziert und die Expression mittels eines primären anti-HA-Antikörpers und eines sekundären Alexa Fluor 546-konjugierten Antikörpers nachgewiesen. Parallel dazu wurden die verschiedenen endogenen Markerproteine mit einem jeweils spezifischen primären Antikörper und einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Die Auswertung der Immunfluoreszenzexperimente erfolgte mit Hilfe der konfokalen Laserscanmikroskopie. Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen in der Abbildung 30 zeigen die Kofärbung von HA-OCRL_V577E mit den frühen Endosomen, angefärbt durch endogenes EEA1 („early endosome antigen 1“; Abb. 29A, grün), dem Golgi-Apparat, nachgewiesen durch einen spezifischen anti-GM130-Antikörper gegen das *cis*-Golgi-Protein GM130 (Abb. 29B, grün) und den Lysosomen, visualisiert durch das Markerprotein LAMP-2 (Abb. 29C, grün).

Abb. 29: Subzelluläre Lokalisation von HA-OCRL_V577E und Kofärbung mit endogenen Markerproteinen in COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden mit pMT2SM-HA-OCRL_V577E transient transfiziert, und anschließend wurde durch die Verwendung eines primären anti-HA-Antikörpers und eines Alexa Fluor 546-konjugierten Sekundärantikörpers das OCRL-Fusionsprotein dargestellt (A-C, rot). In den überlagerten Bildern deuten pseudogelbe Bereiche auf Koloalisation hin. Die weißen Quadrate zeigen die vergrößerten Ausschnitte an (A-C, Überlagerung und Vergrößerung). **(A)** Parallel zum HA-Fusionsprotein wurde endogenes EEA1 mittels eines primären anti-EEA1-Antikörpers und eines sekundären Alexa Fluor 488-gekoppelten Antikörpers nachgewiesen (grün). **(B)** Gleichzeitig mit der OCRL-Proteinvariante wurde endogenes GM130 durch Verwendung eines anti-GM130-Antikörpers als Primärantikörper und eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert (grün). **(C)** Neben dem OCRL-Fusionsprotein wurde endogenes LAMP-2 mit Hilfe eines anti-LAMP-2-Antikörpers und eines sekundären Alexa Fluor 488-konjugierten Antikörpers sichtbar gemacht (grün). DNA wurde mit DAPI angefärbt (blau). Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Laserscanmikroskopie. (Abbildung auf der nachfolgenden Seite).

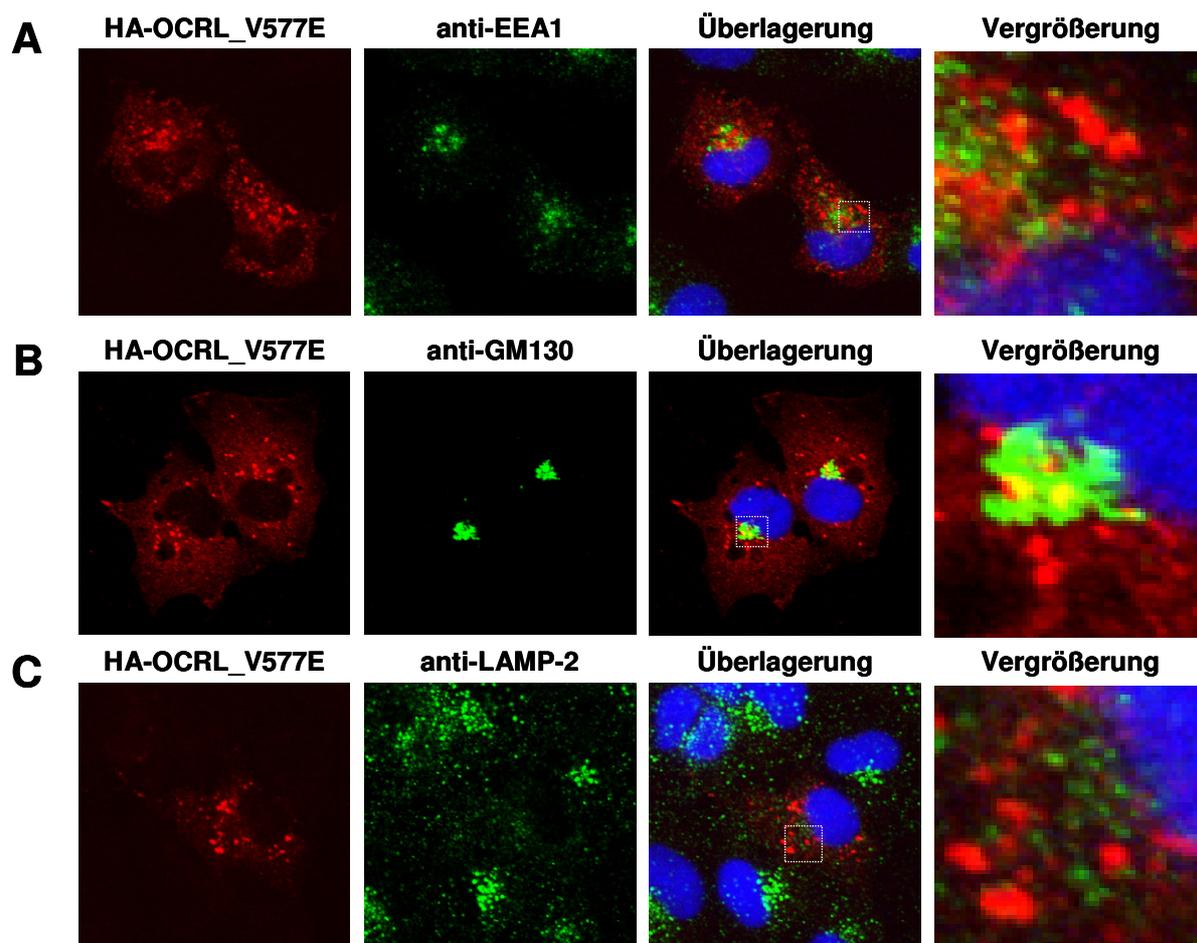


Abb. 29: Subzelluläre Lokalisation von HA-OCRL_V577E und Kofärbung mit endogenen Markerproteinen in COS-7-Zellen

Die Immunfluoreszenzexperimente ergaben, dass das OCRL-Fusionprotein HA-OCRL_V577E minimal mit EEA1 (Abb. 29A) und gar nicht mit LAMP-2 (Abb. 29C) kolokalisiert. Bei Überlagerung der Aufnahmen von HA-OCRL_V577E mit GM130 konnte eine partielle Kolokalisation im Bereich der Kernperipherie beobachtet werden (Abb. 29B, Überlagerung und Vergrößerung). Diese gelbe Pseudofärbung ist wahrscheinlich nicht spezifisch, da sie auf die verstärkte Konzentration der HA-OCRL_V577E-Akkumulate in der Peripherie des Zellkerns zurückzuführen ist. Das OCRL-Fusionprotein HA-OCRL_V577E ist somit nicht mehr am Golgi lokalisiert, sondern akkumuliert u.U. in sogenannten „inclusion bodies“. Das zeigt, dass die ASH-Domäne für die korrekte Golgi-Lokalisation des OCRL-Proteins wichtig ist.

2.3 Analyse der subzellulären Lokalisation von Wildtyp-OCRL in COS-7-Zellen nach Koexpression verschiedener Rac1-Proteinvarianten

Zunächst wurde der Einfluss von Rac1 auf die Lokalisation von OCRL untersucht. Hierfür standen drei verschiedene Rac1-Konstrukte zur Verfügung. Neben der Wildtypvariante lag eine dominant-negative Proteinversion vor, die durch einen Aminosäureaustausch von Serin nach Asparagin an der Position 17 (S17N) mit erhöhter Affinität an GEFs bindet. Nach Überexpression dieser Mutante in COS-7-Zellen bindet diese GTPase an zelluläre GEF-Proteine, wodurch die Aktivierung der endogen vorhandenen GTPasen blockiert wird. Ein Aminosäureaustausch von Threonin nach Leucin an der Position 61 (T61L) hingegen führt zu einer Erhöhung der GTPase-Aktivität und somit zu einer konstitutiv-aktiven Proteinvariante (Feig 1999; Ridley 2001). COS-7-Zellen wurden mit pMT2SM-HA-OCRL+18a bzw. pMT2SM-HA-OCRL-18a und einem der drei Plasmide pRK5-MYC-Rac1 (Wildtyp-Rac1), pRK5-MYC-RacN17 (dominant-negatives Rac1) oder pRK5-FLAG-RacL61 (konstitutiv-aktives Rac1) kotransfiziert. Die subzelluläre Lokalisation der HA-OCRL-Fusionsproteine wurde durch Verwendung eines primären anti-HA-Antikörpers und eines Alexa Fluor 546-gekoppelten Sekundärantikörpers dargestellt. Der Nachweis exprimierter MYC-Rac1- bzw. MYC-RacN17-Fusionsproteine erfolgte mittels eines primären anti-MYC-Antikörpers und eines sekundären Alexa Fluor 488-konjugierten Antikörpers. Die Expression von FLAG-RacL61 wurde durch einen anti-FLAG-Primärantikörper und einem Alexa Fluor 488-Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Auswertung wurde mit Hilfe der konfokalen Laserscanmikroskopie durchgeführt. Abbildung 30 zeigt Immunfluoreszenz-Aufnahmen mit der Koexpression von HA-OCRL-18a und den drei Rac1-Proteinvarianten. Die Ergebnisse der Koexpression mit HA-OCRL+18a unterschieden sich nicht von denen mit HA-OCRL-18a (Daten nicht gezeigt).

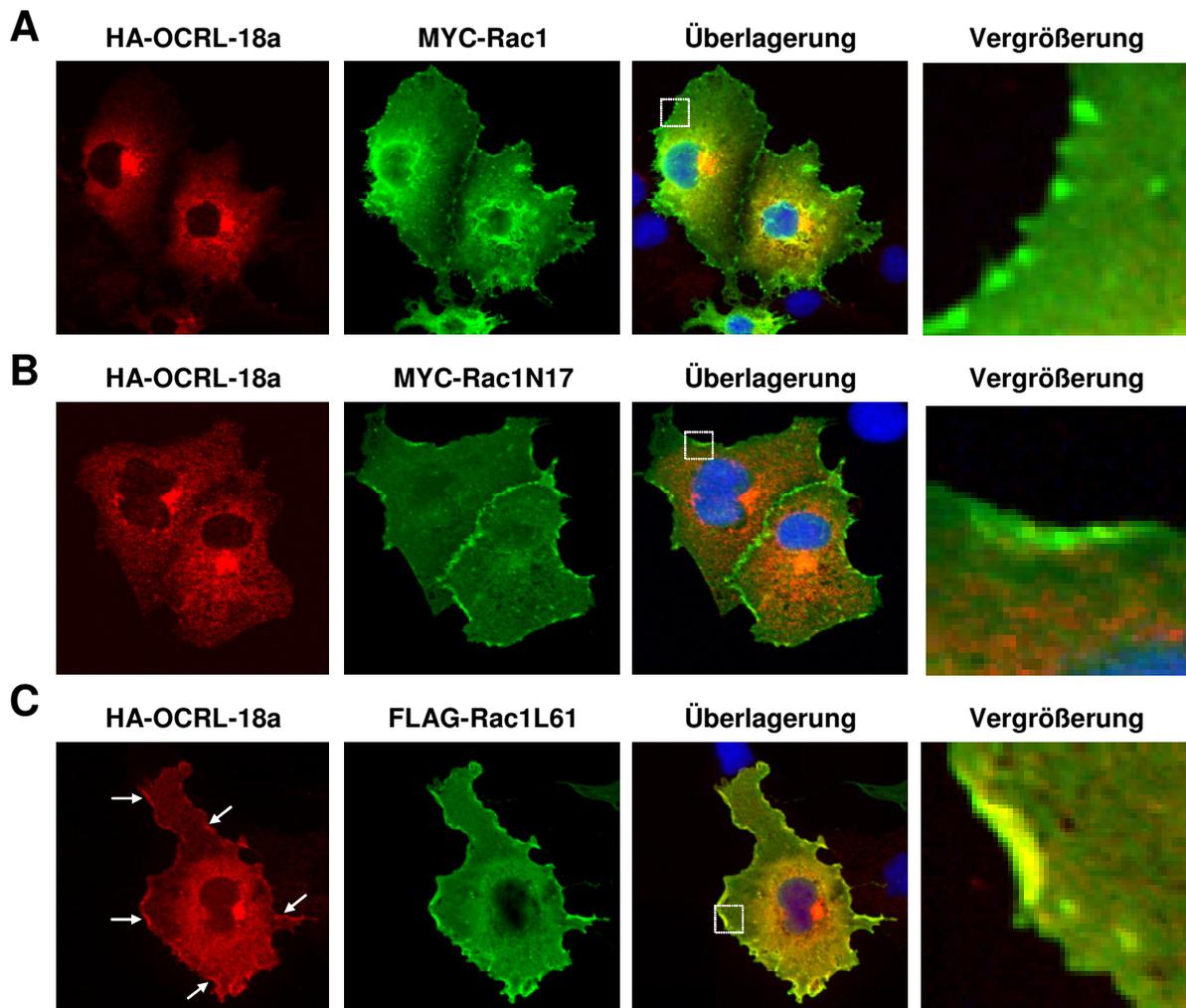


Abb. 30: Kolokalisation von HA-OCRL-18a mit verschiedenen Rac1-Proteinvarianten in COS-7-Zellen durch Immunfluoreszenz

COS-7-Zellen wurden jeweils mit pMT2SM-HA-OCRL-18a und **(A)** pRK5-MYC-Rac1, **(B)** pRK5-MYC-RacN17 oder **(C)** pRK5-FLAG-RacL61 kotransfiziert. Exprimiertes HA-OCRL-18a wurde mit einem primären anti-HA-Antikörper und einem sekundären Alexa Fluor 546-konjugiertem Antikörper nachgewiesen (A-C, rot). Die Detektion der MYC-Rac1-Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe eines anti-MYC-Primärantikörpers und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörpers (A-B, grün). FLAG-RacL61 wurde mittels eines primären anti-FLAG-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-konjugierten Sekundärantikörpers sichtbar gemacht (C, grün). Die Auswertung der Daten wurde mit Hilfe der konfokalen Laserscanmikroskopie durchgeführt. Das Auftreten von Pseudogelb zeigt Bereiche von Kolokalisation an. DNA wurde mit DAPI angefärbt (blau). Weiße Quadrate verweisen auf die vergrößerten Ausschnitte. Weiße Pfeile markieren eine Lokalisation des OCRL-Proteins an der Plasmamembran.

Die Lokalisation von HA-OCRL-18a ist sowohl nach Koexpression mit MYC-Rac1 als auch mit MYC-RacN17 unverändert (Abb. 30A und B, HA-OCRL-18a). Überexprimiertes MYC-Rac1 findet sich im Zytoplasma und verstärkt auch an der Zellperipherie, wo sich Zellfortsätze bilden (Abb. 30A, MYC-Rac1). Bei Überlagerung mit HA-OCRL-18a ist eine gelbe Pseudofärbung im Bereich der

Kernperipherie zu beobachten (Abb. 30A, Überlagerung). Die Koexpression von HA-OCRL-18a mit einer dominant-negativen Rac1-Proteinvariante, die im Zytoplasma und verstärkt an der Zellperipherie lokalisiert ist (Abb. 30B, MYC-RacN17), hatte ebenfalls keine Auswirkungen auf die subzelluläre Lokalisation des HA-OCRL-18a-Proteins (Abb. 30B, HA-OCRL-18a). Im Gegensatz dazu führte die Koexpression der konstitutiv-aktiven Proteinvariante FLAG-RacL61 zu einer Translokation des HA-OCRL-18a-Proteins an die Plasmamembran, was nach Überlagerung durch eine gelbe Pseudofärbung in diesem Bereich erkennbar ist (Abb. 30C; Überlagerung und Vergrößerung). Die durch diese Immunfluoreszenzexperimente erhaltenen Daten zeigen, dass die konstitutiv-aktive Proteinvariante von Rac1 (FLAG-RacL61) in der Lage ist, OCRL an die Plasmamembran zu rekrutieren.

2.4 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von OCRL in COS-7-Zellen nach EGF-Stimulation

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob nach einer EGF-Stimulation von HA-OCRL+18a- und HA-OCRL-18a-exprimierenden COS-7-Zellen die Translokation dieser Proteine an die Plasmamembran in den Zellen beobachtet werden kann. Hierfür wurden COS-7-Zellen mit pMT2SM-HA-OCRL+18a bzw. pMT2SM-HA-OCRL-18a transfiziert und über Nacht in Hungermedium inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit EGF für unterschiedliche Zeitintervalle (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 min). Die subzelluläre Lokalisation der HA-OCRL-Fusionsproteine wurde im Anschluss durch einen primären anti-HA-Antikörper und einen Alexa Fluor 546-konjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Auswertung der Experimente erfolgte mittels konfokaler Laserscanmikroskopie. Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen der HA-OCRL+18a-exprimierenden Zellen unterschieden sich nicht von denen HA-OCRL-18a exprimierender Zellen. Daher wurde in Abbildung 31 nur eine der Proteinvarianten (HA-OCRL-18a) gezeigt.

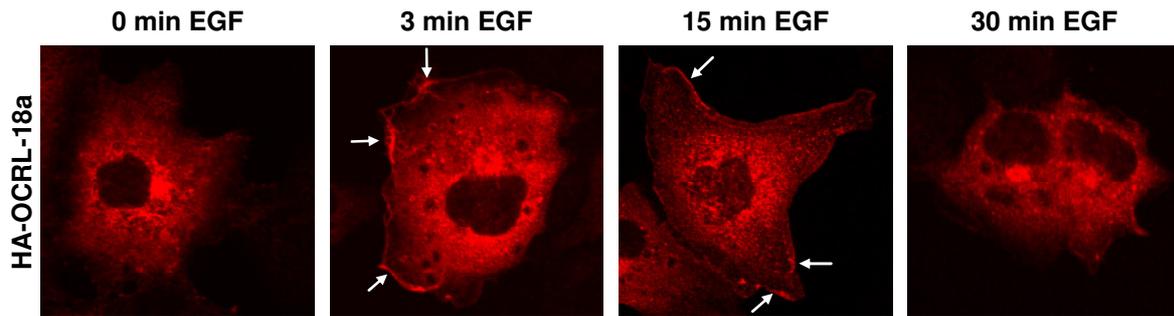


Abb. 31: Subzelluläre Lokalisation von HA-OCRL-18a nach EGF-Stimulation

COS-7-Zellen wurden mit pMT2SM-HA-OCRL-18a transient transfiziert. Den Zellen wurde 24 h nach Transfektion für weitere 12 h des Serum entzogen. Im Anschluss erfolgte eine Behandlung mit EGF für verschiedene Zeitintervalle (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 min). Das HA-OCRL-18a-Fusionsprotein wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit Hilfe eines primären anti-HA-Antikörpers und eines sekundären Alexa Fluor 546-Antikörpers sichtbar gemacht. Die Auswertung der Experimente erfolgte mittels konfokaler Laserscanmikroskopie. Weiße Pfeile markieren eine Lokalisation des OCRL-Proteins an der Plasmamembran.

Bereits nach 1 min EGF-Stimulation waren Zellen erkennbar, in denen ein geringer Teil des HA-OCRL-18a-Proteins an die Plasmamembran transloziert war (Daten nicht gezeigt). Nach 3 bis 5 min war dieses Phänomen in den meisten transfizierten Zellen zu beobachten. Nach etwa 10 bis 15 min nahm die Anzahl der Zellen mit HA-OCRL-18a an der Plasmamembran wieder ab, und nach ca. 30 min waren kaum noch Zellen nachweisbar, in denen HA-OCRL-18a an der Plasmamembran zu finden war.

3. Experimente zur endozytischen Aufnahme von EGF und Transferrin in mit unterschiedlichen OCRL-Konstrukten transient transfizierten COS-7-Zellen

3.1 Herstellung von HA-OCRL-Konstrukten mit isolierter Phosphatase-Domäne, Expression in COS-7-Zellen und subzelluläre Verteilung

Um u.a. den Einfluss der Phosphataseaktivität von OCRL auf die Endozytose zu untersuchen, wurde ein die Phosphatase-Domäne (IPPC) von OCRL umfassendes PCR-Fragment hergestellt. Des Weiteren wurden PCR-Produkte generiert, die neben der Phosphatase-Domäne von OCRL die Membranlokalisierungssequenz (CAAX-Motiv) von Rac1 bzw. K-Ras am C-terminalen Ende enthielten. Die CAAX-

Motive dienen der korrekten Membranlokalisation der monomeren GTPasen und sollten diese Aufgabe auch in den Fusionsproteinen übernehmen. Mit diesen Konstrukten sollte untersucht werden, inwieweit die Expression von IPPc und/oder die von IPPc-CAAX einen Einfluss auf endozytotische Prozesse hat. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden zunächst mittels einer Topoisomerasereaktion in den Vektor pENTR/D-TOPO eingebracht. Über eine Rekombinationsreaktion wurde das jeweilige PCR-Fragment in den eukaryotischen Expressionsvektor pMT2SM-HA-DEST überführt, wodurch nach Expression in eukaryotischen Zellen die N-terminal mit HA gekoppelten Fusionsproteine HA-OCRL_IPPc, HA-OCRL_IPPc-CAAX(Rac1) und HA-OCRL_IPPc-CAAX(KRas) gebildet werden. Um die subzelluläre Verteilung der drei HA-IPPc-Proteine zu vergleichen, wurden COS-7-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transient transfiziert und anschließend die IPPc-Fusionsproteine mit einem primären anti-HA-Antikörper und einem sekundären Alexa Fluor 546-konjugierten Antikörper nachgewiesen. Die Experimente wurden mit Hilfe der konfokalen Laserscanmikroskopie ausgewertet (Abb. 32).

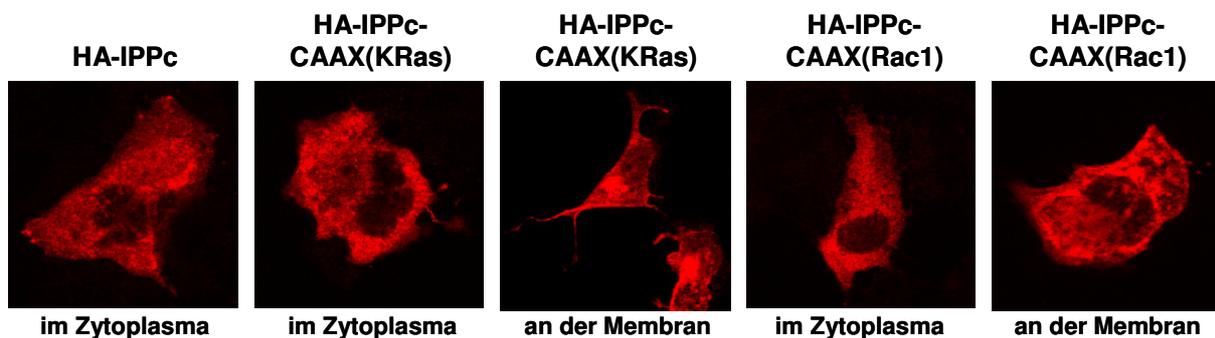


Abb. 32: Subzelluläre Lokalisation der IPPc-Proteinvarianten in COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden mit den unterschiedlichen pMT2SM-HA-IPPc-Plasmiden transient transfiziert und die Fusionsproteine anschließend mit einem anti-HA-Primärantikörper und einem Alexa Fluor 546-konjugiertem Sekundärantikörper detektiert. Die Auswertung erfolgte an einem konfokalen Laserscanmikroskop.

Überexprimiertes HA-IPPc war im gesamten Zytoplasma verteilt zu erkennen, wobei es zu keiner spezifischen Akkumulation des Proteins kam. Die beiden IPPc-Fusionsproteine mit dem CAAX-Motiv von Rac1 bzw. K-Ras hatten ein ähnliches Verteilungsmuster in der Zelle. Eine Membranlokalisation war in nur wenigen Zellen zu beobachten (etwa 1-5% der transfizierten Zellen). In den meisten Fällen unterschied sich die Verteilung der Proteine kaum von der des IPPc-Proteins ohne CAAX-Motiv (Abb. 32). Allerdings war eine Membranlokalisation

häufiger bei Zellen zu beobachten, die mit pMT2SM-HA-IPPC-CAAX(KRas) transfiziert worden waren (etwa 5% der transfizierten Zellen) als bei solchen mit pMT2SM-HA-IPPC-CAAX(Rac1). Aus diesem Grund wurden für die weiterführenden Experimente nur die beiden Konstrukte pMT2SM-HA-IPPC und pMT2SM-HA-IPPC-CAAX(KRas) verwendet.

3.2 Rezeptor-vermittelte Endozytose von Fluoreszenz-markiertem epidermalem Wachstumsfaktor

Um die Auswirkungen der Überexpression von verschiedenen OCRL-Proteinvarianten in eukaryotischen Zellen auf die Internalisierung von EGF zu studieren, sollte zunächst die Rezeptor-vermittelte Endozytose von Fluoreszenz-markiertem EGF mittels Immunfluoreszenzexperimenten untersucht werden. Hierfür wurde jeweils eines der fünf Proteine HA-OCRL-18a, HA-OCRL_R493A,R500T, HA-OCRL_V577E, HA-IPPC bzw. HA-IPPC-CAAX(KRas) in COS-7-Zellen überexprimiert. Die Zellen wurden anschließend über Nacht in Hungermedium kultiviert. Am nächsten Tag wurden die COS-7-Zellen für unterschiedliche Zeitintervalle (5, 10, 30 min) mit Alexa Fluor 488-konjugiertem EGF (EGF488) inkubiert. Die OCRL-Fusionsproteine wurden durch einen primären anti-HA-Antikörper und einen sekundären Alexa Fluor 546-gekoppelten Antikörper nachgewiesen. Die Experimente wurden mittels konfokaler Laserscanmikroskopie ausgewertet. In der Abbildung 33 sind transfizierte COS-7-Zellen gezeigt, die für 10 min Fluoreszenz-markiertes EGF aufgenommen haben. Das endozytierte EGF ist in einem sehr fein punktierten Muster im Zytoplasma verteilt und verstärkt in der Zellperipherie zu erkennen (Abb. 33, grün).

Abb. 33: Endozytose von EGF in mit verschiedenen OCRL-Konstrukten transfizierten COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden mit jeweils einem der Plasmide pMT2SM-HA-OCRL-18a, pMT2SM-HA-OCRL_R493A,R500T, pMT2SM-HA-OCRL_V577E, pMT2SM-HA-IPPC bzw. pMT2SM-HA-IPPC-CAAX(KRas) transient transfiziert und anschließend wurde den Zellen für 10 min Alexa Fluor 488-konjugiertes EGF (grün) zur Aufnahme angeboten. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte durch Verwendung eines primären anti-HA-Antikörpers und eines Alexa Fluor 546-konjugierten Sekundärantikörpers (rot). Die Auswertung wurde mit Hilfe eines konfokalen Laserscanmikroskopes durchgeführt. Transfizierte COS-7-Zellen wurden weiß umrandet und die DNA mit DAPI angefärbt (blau). Weiße Pfeile markieren eine Lokalisation des Proteins an der Plasmamembran, (Abbildung auf der nachfolgenden Seite).

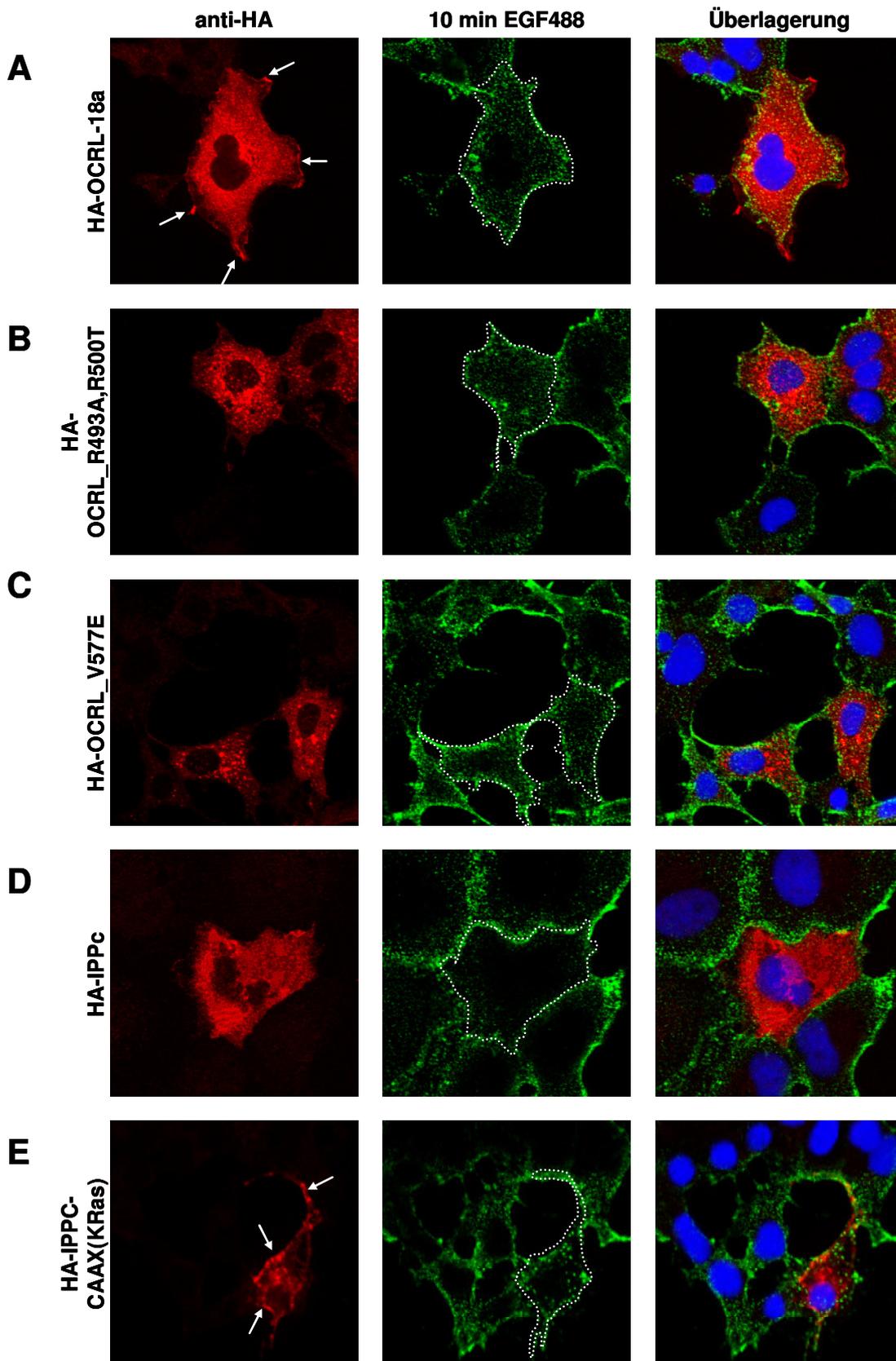


Abb. 33: Endozytose von EGF in mit verschiedenen OCRL-Konstrukten transfizierten COS-7-Zellen

Die qualitative Auswertung der Immunfluoreszenz-Aufnahmen verschiedener EGF-Endozytoseexperimente und unterschiedlicher Endozytosezeiten zeigte, dass COS-7-Zellen, die mit einem der fünf pMT2SM-HA-OCRL-Konstrukte transient transfiziert worden waren, in der gleichen Zeit vergleichbar viel EGF aufnehmen wie untransfizierte COS-7-Zellen (Abb. 33 A-E, grün). Insgesamt konnte kein Unterschied bei der Endozytose von EGF zwischen transfizierten und untransfizierten COS-7-Zellen nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte die EGF-induzierte Translokation des OCRL-Proteins nur bei der Wildtypvariante HA-OCRL-18a beobachtet werden. Die OCRL-Proteine mit den Missensemutationen in der IPPc- und ASH-Domäne sowie die isolierte IPPc-Domäne translozierten nicht an die Plasmamembran. Für das Protein HA-IPPc-CAAX(KRas) konnte im Vergleich zu transfizierten Zellen ohne EGF keine vermehrte Plasmamembranlokalisation nach EGF-Stimulation festgestellt werden

3.3 Rezeptor-vermittelte Endozytose von Fluoreszenz-markiertem Transferrin

Als nächstes sollte der Einfluss der Überexpression verschiedener OCRL-Proteinvarianten in eukaryotischen Zellen auf die Endozytose von Fluoreszenz-markiertem Transferrin untersucht werden. Dafür wurden COS-7-Zellen mit jeweils einem der fünf OCRL-Konstrukte pMT2SM-HA-OCRL-18a, pMT2SM-HA-OCRL_R493A,R500T, pMT2SM-HA-OCRL_V577E, pMT2SM-HA-IPPc bzw. pMT2SM-HA-IPPc-CAAX(KRas) transient transfiziert, und anschließend wurde ihnen über Nacht das Serum entzogen. Am nächsten Tag wurden die COS-7-Zellen für unterschiedliche Zeitintervalle (5, 10, 15 min) mit Alexa Fluor 488-konjugiertem Transferrin (TF488) inkubiert. Die OCRL-Fusionsproteine wurden mit Hilfe eines anti-HA-Primärantikörpers und eines sekundären Alexa Fluor 546-gekoppelten Antikörpers detektiert. Die Auswertung der Immunfluoreszenzexperimente erfolgte durch konfokale Laserscanmikroskopie. In der Abbildung 34 sind transfizierte COS-7-Zellen gezeigt, denen für 10 min Fluoreszenz-markiertes Transferrin zur Aufnahme angeboten worden war.

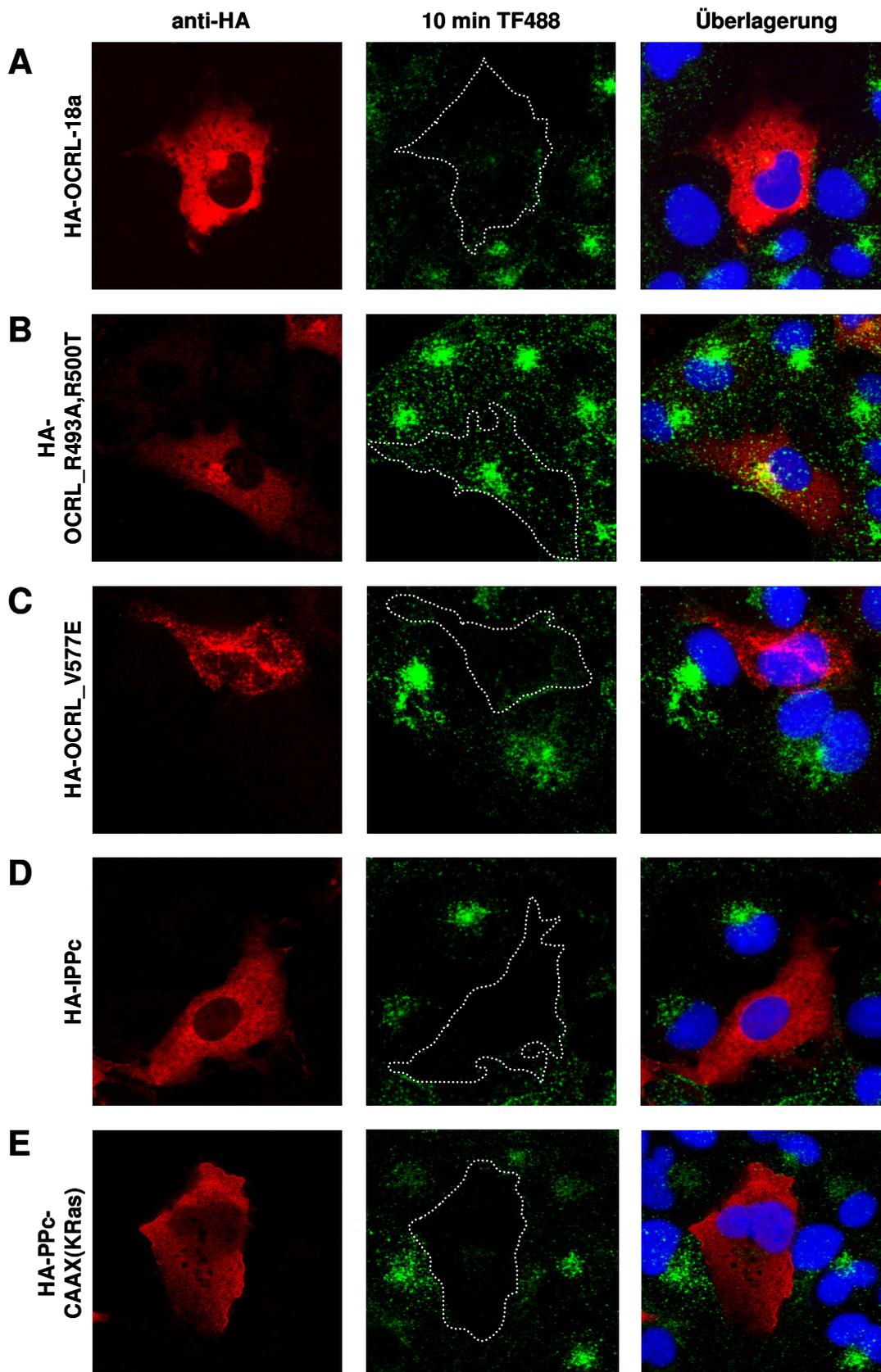


Abb. 34: Endozytose von Transferrin in mit verschiedenen OCRL-Konstrukten transfizierten COS-7-Zellen

Abb. 34: Endozytose von Transferrin in mit verschiedenen OCRL-Konstrukten transfizierten COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden mit jeweils einem der fünf Konstrukte pMT2SM-HA-OCRL-18a, pMT2SM-HA-OCRL_R493A,R500T, pMT2SM-HA-OCRL_V577E, pMT2SM-HA-IPPC bzw. pMT2SM-HA-IPPC-CAAX(KRas) transient transfiziert und anschließend wurde den Zellen für 10 min Alexa Fluor 488-konjugiertes Transferrin (grün) zur Aufnahme angeboten. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte durch Verwendung eines primären anti-HA-Antikörpers und eines Alexa Fluor 546-konjugierten Sekundärantikörpers (rot). Die Auswertung der Experimente erfolgte mittels konfokaler Laserscanmikroskopie. Transfizierte COS-7-Zellen wurden weiß umrandet und DNA mit DAPI angefärbt (blau; Abbildung auf der vorangegangenen Seite).

Das aufgenommene Transferrin (Abb. 34, grün) ist in einem punktierten Muster im Zytoplasma verteilt erkennbar. Es akkumuliert verstärkt an der Peripherie des Zellkerns. Nach qualitativer Auswertung der Immunfluoreszenz-Aufnahmen verschiedener Transferrin-Endozytoseexperimente und unterschiedlicher Endozytosezeiten wurde deutlich, dass nur HA-OCRL_R493A,R500T überexprimierende COS-7-Zellen das Transferrin in vergleichbarer Menge aufgenommen hatten wie untransfizierte COS-7-Zellen (Abb. 34B, grün). Die Überexpression der anderen vier OCRL-Proteinvarianten führte zu einer verminderten Aufnahme von Transferrin im Vergleich zu den umliegenden untransfizierten COS-7-Zellen bei allen Endozytosezeiten (Abb. 34A und C-E, grün; und Daten nicht gezeigt).

4. Untersuchungen zur endozytotischen Aufnahme verschiedener Liganden in primären Fibroblastenzellen von Patienten mit Lowe-Syndrom

4.1 Vorbemerkungen

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass eine Überexpression von Wildtyp-OCRL und verschiedener OCRL-Varianten keine Auswirkung auf die Internalisierung des EGF-Rezeptors hatte. Im Gegensatz dazu konnte beobachtet werden, dass COS-7-Zellen, die eine OCRL-Proteinvariante mit katalytisch-aktiver Phosphatase-Domäne überexprimierten [HA-OCRL-18a, HA-OCRL_V577E, HA-IPPC oder HA-IPPC-CAAX(KRas)], weniger Transferrin aufnahmen als untransfizierte COS-7-Zellen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass „zu viel“ OCRL-Protein unter bestimmten Bedingungen Auswirkungen auf endozytotische Prozesse haben kann. Von besonderem Interesse war nun die Frage, ob auch eine OCRL-Defizienz Effekte auf die Endozytose bestimmter Liganden hat. Um dieser Frage nachzugehen, konnte ein natürliches OCRL-defizientes Zellsystem, Fibroblastenzellen von Patienten mit Lowe-Syndrom (LS-Fibroblasten), genutzt werden (siehe Kapitel IV.1.6).

4.2 Untersuchungen zur Internalisierung von Fluoreszenz-markiertem epidermalen Wachstumsfaktor in LS-Fibroblasten

Um die Auswirkungen der OCRL-Defizienz auf die Internalisierung von EGF in den LS-Fibroblasten zu studieren, sollte die Rezeptor-vermittelte Endozytose von Fluoreszenz-markiertem EGF mit Hilfe der FACS-Analyse und durch Immunfluoreszenzstudien untersucht werden. Hierfür wurde den Kontrollfibroblasten K1 bis K3 und den LS-Fibroblasten LS1 bis LS6 und LS8 für definierte Zeiträume (5, 10, 15, 30 min) Alexa Fluor 488-konjugiertes EGF zur Aufnahme angeboten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das an der Oberfläche gebundene EGF abgewaschen und die Zellen für die Durchflusszytometrie in Suspension gebracht bzw. für die Immunfluoreszenzanalysen fixiert. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität in den Zellen, die der Menge an aufgenommenem EGF entspricht, erfolgte am

FACS, und die qualitative Auswertung der Immunfluoreszenzexperimente wurde mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. In der Abbildung 35A sind beispielhaft Fibroblastenzellen von LS1 und K1 gezeigt, die für 10 min Fluoreszenz-markiertes EGF endozytiert haben. Das EGF (grün) ist in einem sehr fein punktierten Muster im Zytoplasma verteilt. Nach Überlagerung mit einem Marker für die frühen Endosomen (EEA1, rot) kommt es im Zytoplasma der Zellen nur partiell zur gelben Pseudofärbung, was in der Ausschnittsvergrößerung sichtbar wird (Abb. 35A, Überlagerung und Vergrößerung). Die Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten ergab, dass die Kontroll- und LS-Fibroblasten in 10 min etwa gleich viel Fluoreszenz-markiertes EGF endozytiert hatten. Nur LS8 hatte verglichen mit den anderen Fibroblasten weniger EGF aufgenommen (Abb. 35B). Für die anderen untersuchten Zeitspannen wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt (Daten nicht gezeigt). Das in Abbildung 36B gezeigte Balkendiagramm repräsentiert die relativen Fluoreszenzintensitäten der Fibroblastenzelllinien bezogen auf den Mittelwert der absoluten Fluoreszenzintensitäten der drei Kontrollzelllinien. Es konnte für alle untersuchten Zeitspannen keine unterschiedliche Endozytose für EGF zwischen Kontroll- und LS-Fibroblasten nachgewiesen werden.

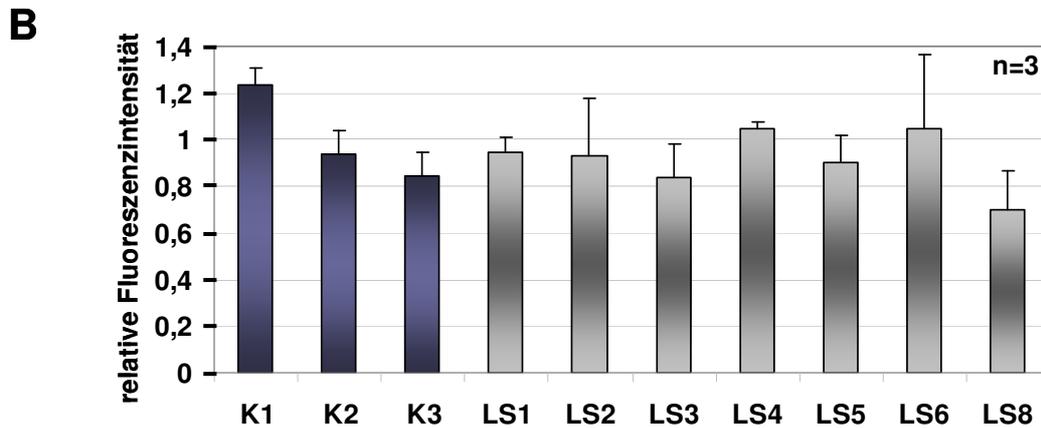
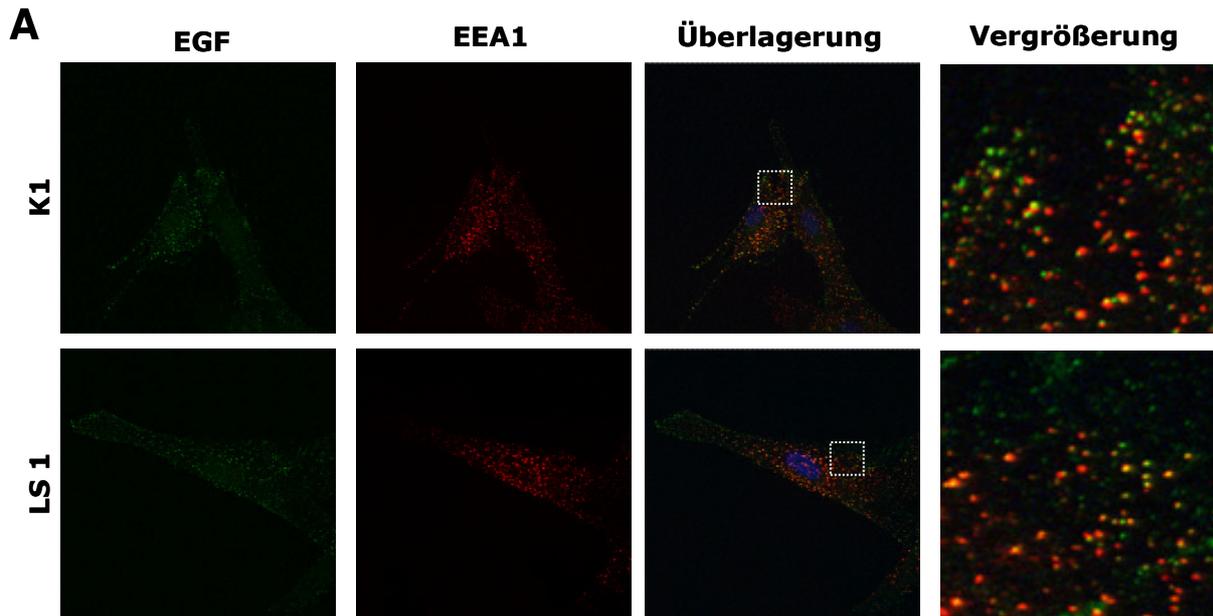


Abb. 35: Endozytose von Alexa Fluor 488-EGF in Kontroll- und LS-Fibroblasten

(A) Den Fibroblastenzellen, beispielhaft gezeigt für LS1 und die Kontrolle K1, wurde für 10 min Alexa Fluor 488-konjugiertes EGF (grün) zur Aufnahme angeboten. Als Gegenfärbung wurde ein Markerprotein der frühen Endosomen (EEA1, rot) verwendet. DNA wurde mit DAPI angefärbt (blau). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laserscanmikroskopes. In den überlagerten Bildern deuten pseudogelbe Bereiche auf Kolokalisation hin. Die weißen Quadrate zeigen die vergrößerten Ausschnitte an. **(B)** Das Balkendiagramm zeigt die relative Fluoreszenzintensität nach 10 min Endozytose von Alexa Fluor 488-gekoppeltem EGF in den Kontrollfibroblasten K1 bis K3 und in den LS-Fibroblasten LS1 bis LS6 und LS8 als Mittelwert aus drei unabhängigen EGF-Endozytose-Experimenten mit errechneter Standardabweichung. Der Mittelwert der Kontrollen wurde auf eins gesetzt.

4.3 Analyse der Rezeptor-vermittelten Endozytose von Transferrin

Als nächstes sollte untersucht werden, ob das Fehlen des OCRL-Proteins Auswirkungen auf die Aufnahme von Transferrin durch den Transferrinrezeptor (TfR) in LS-Fibroblasten hat. Für die Untersuchung der Internalisierung des TfR in den Fibroblastenzellen standen zwei unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Zum einen sollte die Endozytose mittels Fluoreszenz-gekoppeltem Transferrin untersucht werden. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität in den Zellen erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers und die qualitative Auswertung wurde an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Hierfür wurde den Kontrollfibroblasten K1 bis K3 und den LS-Fibroblasten LS1 bis LS6 und LS8 für definierte Zeitintervalle (5, 10, 15, 30, 60 min) das Alexa Fluor 488-konjugierte Transferrin zur Aufnahme angeboten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das an der Oberfläche gebundene Transferrin abgewaschen und die Zellen für die FACS-Analyse in Suspension gebracht bzw. für die Immunfluoreszenzstudien fixiert. Die am FACS gemessene Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen entsprach der aufgenommenen Menge an Transferrin. In Abbildung 36A sind beispielhaft Immunfluoreszenz-Aufnahmen der Fibroblasten LS1 und K1 gezeigt, denen für 10 min Fluoreszenz-markiertes Transferrin zur Aufnahme angeboten worden war. Das Transferrin (grün) ist in einem punktierten Muster im Zytoplasma verteilt erkennbar. Die Lokalisation des TfR wurde mittels eines anti-TfR-Antikörpers und eines sekundären Alexa Fluor 546-konjugierten Antikörpers (rot) nachgewiesen. Nach Überlagerung kommt es im Zytoplasma der Zellen aufgrund der Kolo-kalisation zur gelben Pseudofärbung, was in der Ausschnittsvergrößerung sichtbar wird (Abb. 36A, Überlagerung und Vergrößerung). Nach Auswertung der FACS-Daten zeigte sich, dass die drei Kontroll- und sechs LS-Fibroblasten etwa gleich viel Transferrin in allen untersuchten Zeiträumen (5, 10, 15, 30, 60 min) aufgenommen hatten. Nur LS4 hatte im Vergleich mit den anderen Fibroblasten in 10 min etwas weniger Transferrin endozytiert (Abb. 36B).

Als zweite Methode zur Quantifizierung der Endozytose des TfR diente die Aufnahme von radiaktiv markiertem Transferrin. Dazu wurden die Kontrollfibroblasten K1 bis K3 und die LS-Fibroblasten LS1 bis LS6 und LS8 für definierte Zeitintervalle (5, 10, 30 min) mit [^{125}I]-markiertem Transferrin inkubiert. Nach Ende der Endozytosezeit wurden die intrazelluläre Radioaktivität und die Proteinkonzentration der Zelllysate bestimmt. Nach Auswertung der Experimente für die unterschiedlichen Zeiträume wurde deutlich, dass die Ergebnisse mit denen der FACS-Analysen übereinstimmten. Die Menge an aufgenommenem Transferrin war bei drei Kontroll- und sechs LS-Fibroblasten etwa gleich. Nur LS4 hatte im Vergleich mit den anderen Fibroblasten wieder weniger Transferrin endozytiert (Abb. 36C und Daten nicht gezeigt). Die Balkendiagramme der Abbildung 36 repräsentieren relative Werte (siehe Kapitel III.4.5)

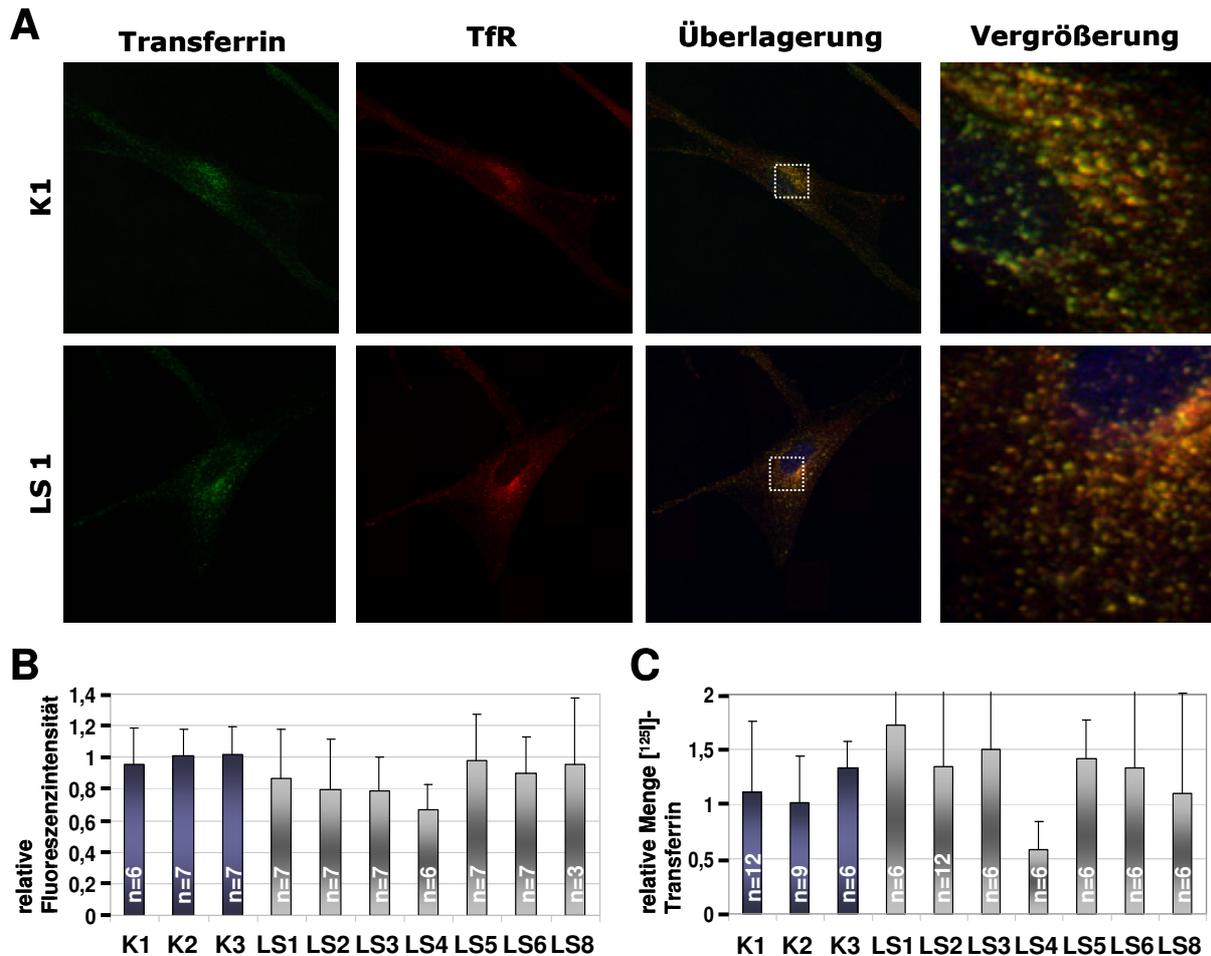


Abb. 36: Endozytose von Transferrin in Kontroll- und LS-Fibroblasten

Die Aufnahmen zeigen exemplarisch Fibroblastenzellen von LS1 und K1, die für 10 min Alexa Fluor 488-konjugiertes Transferrin (grün) aufgenommen haben. Als Gegenfärbung wurde ein anti-Transferrinrezeptor-Antikörper und ein sekundärer Alexa Fluor 546-Antikörper (TfR, rot) eingesetzt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Die Auswertung der Experimente wurde mit Hilfe der konfokalen Laserscanmikroskopie durchgeführt. In den überlagerten Bildern deuten pseudogelbe Bereiche auf Kolokalisation hin. Die weißen Quadrate zeigen die vergrößerten Ausschnitte an (**A**). Die Balkendiagramme geben die relative Fluoreszenzintensität nach 10 min Endozytose von Alexa Fluor 488-gekoppelten Transferrin in den Kontrollfibroblasten K1 bis K3 und in den Patientenfibroblasten LS1 bis LS6 und LS8 als Mittelwert von drei bis sieben unabhängigen Endozytose-Experimenten mit errechneter Standardabweichung (**B**) und die relative Menge an aufgenommener [¹²⁵I]-Transferrin-Radioaktivität in den Kontrollfibroblasten K1 bis K3 und in den Patientenfibroblasten LS1 bis LS6 und LS8 als Mittelwert von sechs bis zwölf unabhängigen Endozytose-Experimenten mit errechneter Standardabweichung an (**C**). Der Mittelwert der Kontrollen wurde jeweils auf eins gesetzt.

4.4 Untersuchungen zur LDL-Rezeptor-vermittelten Endozytose von radioaktiv-markiertem LDL

Für weitere Untersuchungen der endozytotischen Prozesse in LS-Fibroblasten standen radioaktiv-markierte Liganden zur Verfügung. Um zu untersuchen, ob die OCRL-Defizienz einen Einfluss auf die Endozytose des LDL-Rezeptors hat, wurde die Rezeptor-vermittelte Endozytose von radioaktiv markiertem LDL in den Kontrollfibroblasten K1 und K2 und den LS-Fibroblasten LS1 bis LS6 analysiert. Dazu wurde den Fibroblastenzellen [^{125}I]-markiertes LDL zur Aufnahme angeboten. Nach Ende der 60-minütigen Inkubationszeit wurden die intrazelluläre [^{125}I]-LDL-Radioaktivität und die Proteinkonzentration der Zelllysate bestimmt. Mit den erhaltenen Werten konnte die aufgenommene Radioaktivität pro mg Protein für jede Zelllinie berechnet werden. Diese Werte wurden dann mit dem Mittelwert der Kontrollen ins Verhältnis gesetzt und als Balkendiagramm dargestellt. Die Auswertung der Radioaktivitätsmessungen aus drei unabhängigen Experimenten ergab, dass die Menge an aufgenommenem LDL zwischen den Zelllinien schwankte. Die Fibroblasten K1 und LS2 hatten am meistens LDL endozytiert, gefolgt von der Kontrolle K2 und den LS-Fibroblasten LS4, LS5 und LS6. Am wenigsten LDL aufgenommen hatten die Zelllinien LS1 und LS3. Es war aber verglichen mit den Kontrollfibroblasten keine Tendenz zu einer reduzierten Aufnahme von LDL in den LS-Fibroblasten erkennbar (Abb. 37).

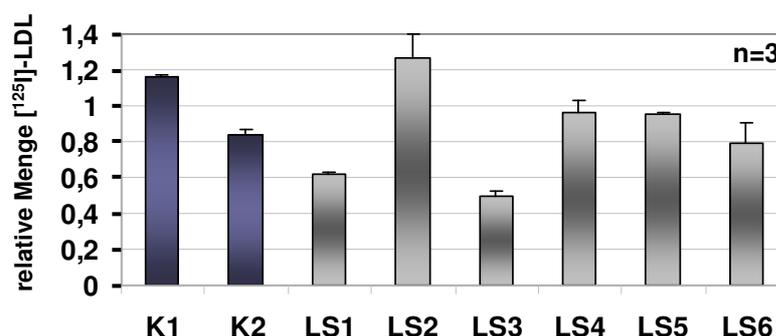
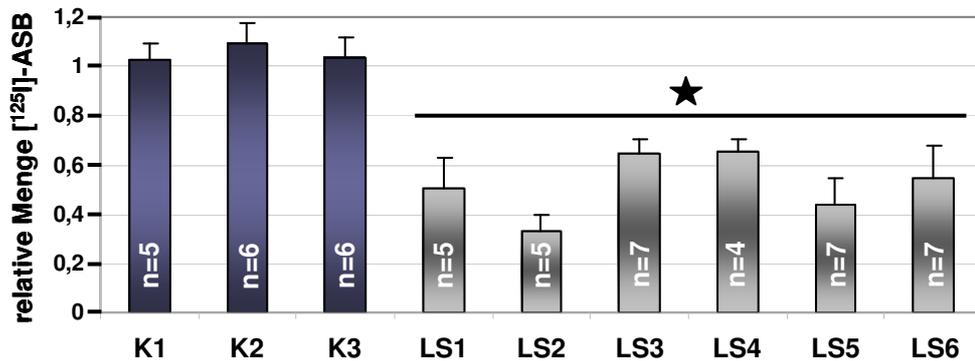
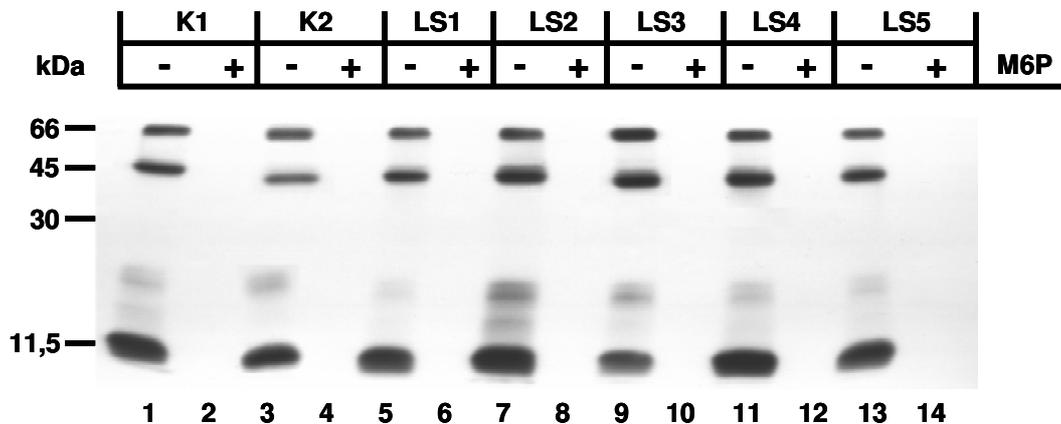


Abb. 37: Endozytose von [^{125}I]-LDL in Kontroll- und LS-Fibroblasten

Das Balkendiagramm zeigt die relative Menge an aufgenommener [^{125}I]-LDL-Radioaktivität in den Kontrollfibroblasten K1 und K2 und den LS-Fibroblasten LS1 bis LS6 als Mittelwert aus drei unabhängigen LDL-Endozytose-Experimenten mit errechneter Standardabweichung. Zur Analyse der LDL-Aufnahme in die Zellen wurden die in den Zellpellets enthaltene Radioaktivität im γ -Counter gemessen und die Proteinkonzentration bestimmt. Der Mittelwert aus den beiden Kontrollen wurde gleich eins gesetzt.

4.5 Untersuchungen zur Mannose-6-Phosphat Rezeptor-vermittelten Endozytose von radioaktiv-markierter Arylsulfatase B

Um den Einfluss von OCRL auf die Endozytose des MPR300 an der Plasmamembran zu untersuchen, wurde die Rezeptor-vermittelte Aufnahme eines affinitätsaufgereinigten rekombinanten lysosomalen Enzyms, der Arylsulfatase B (ASB; EC 3.1.6.12), in den Kontrollzelllinien K1 bis K3 und den LS-Fibroblasten LS1 bis LS6 analysiert. Dazu wurden die Fibroblastenzellen mit [¹²⁵I]-ASB in An- und Abwesenheit des kompetitiven Hemmstoffes M6P inkubiert, und im Anschluss wurde die intrazelluläre [¹²⁵I]-ASB-Radioaktivität und die Proteinkonzentration der Zellysate bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden als „aufgenommene Radioaktivität pro mg Protein“ für jede Zelllinie berechnet, mit dem Mittelwert der Kontrollen ins Verhältnis gesetzt und als Balkendiagramm dargestellt. Die Auswertung der Radioaktivitätsmessungen mehrerer unabhängiger Experimente ergab, dass die LS-Fibroblasten zwischen 35% und 65% weniger ASB aufgenommen hatten als die Kontrollfibroblasten (Abb. 38A). Diese Reduktion der MPR300-abhängigen Endozytose in den Patientenzellen war statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$; student's t-Test). 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. Dabei waren eine 64 kDa und eine 47 kDa Bande sowie zwei kleinere Banden bei 14,5 kDa und 11,5 kDa in der Fluorographie detektierbar (Abb. 38B, Spuren mit ungerader Nummer 1 bis 13). Die 64 kDa Bande entspricht der unprozessierten Vorstufe der ASB und die anderen Banden stellen prozessierte lysosomale ASB dar. Die Aufnahme der [¹²⁵I]-ASB in den Fibroblastenzellen ließ sich durch einen Überschuss an M6P vollständig hemmen (Abb. 38B, Spuren mit gerader Nummer 2 bis 14).

A**B****Abb. 38: Endozytose von [125I]-ASB in Kontroll- und LS-Fibroblasten**

(A) Das Balkendiagramm zeigt die relative Menge an aufgenommener [125I]-ASB-Radioaktivität in den Kontrollfibroblasten K1 bis K3 und den LS-Fibroblasten LS1 bis LS6 als Mittelwert aus vier bis sieben unabhängigen ASB-Endozytose-Experimenten mit errechneter Standardabweichung. Zur Analyse der ASB-Aufnahme in die Zellen wurde die in den Zellpellets enthaltene Radioaktivität im γ -Counter gemessen und die Proteinkonzentration bestimmt. Der Mittelwert aus den drei Kontrollen wurde gleich eins gesetzt. Der Unterschied zwischen Kontroll- und Patientenfibroblasten war statistisch hoch signifikant ($\star p < 0,001$) **(B)** Die Zellpellets wurden nach Solubilisierung durch SDS-PAGE aufgetrennt und die intrazelluläre radioaktiv markierte ASB durch Autoradiographie detektiert (beispielhaft gezeigt für K1, K2 und LS1 bis LS5). In den Spuren mit ungerader Nummer (1 bis 13) ist die aufgenommene ASB in Ab- (-) und in den Spuren mit gerader Nummer (2 bis 14) in Anwesenheit (+) von M6P im Medium dargestellt. Links sind einige Molekulargewichte in kDa des verwendeten Proteinstandards angegeben.

4.6 Analyse der Gesamt- und Oberflächenbindung von [¹²⁵I]-Arylsulfatase B

Um zu untersuchen, ob die reduzierte Aufnahme der radioaktiv-markierten ASB in den LS-Fibroblasten auf eine verringerte Anzahl von MPR300 auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren zurückzuführen ist, wurden verschiedene ASB-Bindungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden die Fibroblastenzellen mit [¹²⁵I]-ASB bei 4°C in An- bzw. Abwesenheit von Saponin inkubiert. Durch die Zugabe von Saponin bilden sich in der Plasmamembran Poren, die eine Erhöhung der Membranpermeabilität verursachen. Die niedrige Temperatur verhindert eine Aufnahme der ASB durch Rezeptor-vermittelte Endozytose. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die auf der Zelloberfläche (ohne Saponin) bzw. insgesamt (mit Saponin) gebundene [¹²⁵I]-ASB-Radioaktivität und die Proteinkonzentration der Zelllysate bestimmt. Mit den erhaltenen Werten konnte die „gebundene Radioaktivität pro mg Protein“ an der Zelloberfläche und im Zellinneren für jede Zelllinie berechnet werden. Diese Werte wurden dann mit dem Mittelwert der Kontrollen ins Verhältnis gesetzt und als Balkendiagramm dargestellt. Die Auswertung von drei unabhängigen ASB-Bindungsexperimenten ergab, dass die Menge an gebundener ASB sowohl auf der Zelloberfläche (Abb. 39A) als auch im Zellinneren (Abb. 39B) zwischen den drei Kontroll- und sechs LS-Fibroblastenzelllinien zum Teil stark variierte. Die Gesamtbindung der radioaktiv markierten ASB setzte sich dabei aus der Bindung der ASB an MPR300 und MPR46 zusammen. Die Zelllinien LS2 und LS4 hatten deutlich weniger ASB und die Fibroblasten LS1 und LS3 etwas mehr ASB auf der Oberfläche gebunden als die drei Kontrollen. LS5 und LS6 hatten etwa gleich viel ASB oberflächlich gebunden wie die Kontrollen (Abb. 39A). Bei der Gesamtbindung der ASB hatte nur LS2 einen auffällig niedrigeren Wert im Vergleich zu den anderen Fibroblasten (Abb. 39B). Trotz der Schwankungen in der Menge der gebundenen ASB zwischen den Zelllinien war keine Tendenz zu einer verringerten Bindung der ASB in den LS-Fibroblasten feststellbar, die eine Erklärung für die reduzierte Aufnahme von ASB in den Patientenzellen liefern könnte.

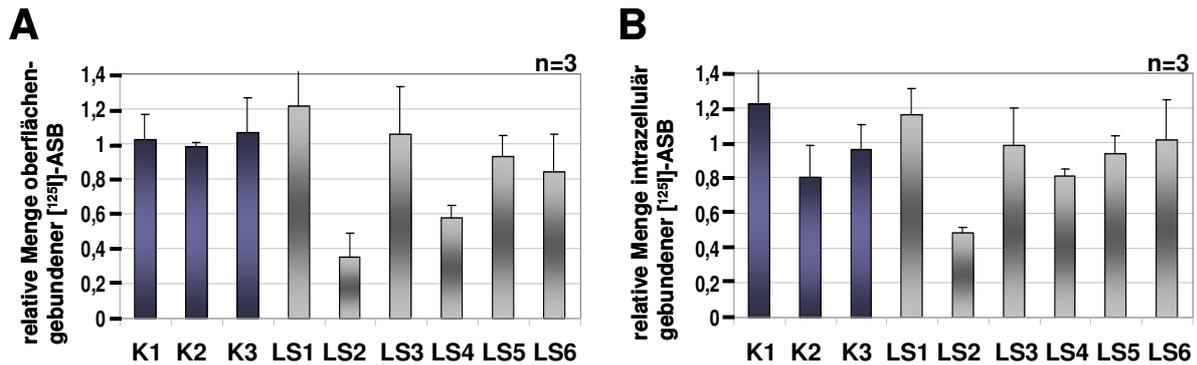


Abb. 39: Oberflächen- und Gesamtbindung von $[^{125}\text{I}]\text{-ASB}$ in Kontroll- und LS-Fibroblasten

Die Balkendiagramme repräsentieren die relative oberflächengebundene $[^{125}\text{I}]\text{-ASB}$ -Radioaktivität (**A**) sowie die relative intrazellulär gebundene $[^{125}\text{I}]\text{-ASB}$ -Radioaktivität (**B**) in den Kontrollfibroblasten K1 bis K3 und den LS-Fibroblasten LS1 bis LS6 als Mittelwert aus drei unabhängigen ASB-Bindungsexperimenten mit errechneter Standardabweichung. Zur Analyse der ASB-Bindung wurde die in den Zellysaten enthaltene Radioaktivität im γ -Counter gemessen und die Proteinkonzentration bestimmt. Der Mittelwert aus den drei Kontrollen wurde gleich eins gesetzt.

4.7 Quantitative Bestimmung der MPR300 auf der Zelloberfläche und im Zellinneren

Im nächsten Experiment sollte die Oberflächen- und Gesamtanzahl des MPR300 in den Fibroblastenzellen mittels eines spezifischen Antikörpers direkt bestimmt werden. Dafür standen zwei unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Zuerst sollte die Menge der MPR300 auf der Zelloberfläche und im Zellinneren durch Bindung des $[^{125}\text{I}]$ -markierten monoklonalen anti-MPR300-Antikörpers 2C2, der gegen die luminale Domäne des humanen MPR300 gerichtet ist, bestimmt werden. Dazu wurden die Fibroblastenzellen mit $[^{125}\text{I}]\text{-2C2}$ -Antikörper wieder bei 4°C in An- bzw. Abwesenheit von Saponin inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die auf der Zelloberfläche gebundene (ohne Saponin) bzw. die intrazelluläre (mit Saponin) $[^{125}\text{I}]\text{-2C2}$ -Radioaktivität und die Proteinkonzentration der Zellysate bestimmt. Mit den erhaltenen Werten wurde die „gebundene Radioaktivität pro mg Protein“ an der Zelloberfläche und im Zellinneren für jede Zelllinie berechnet. Diese Werte wurden dann mit dem Mittelwert der Kontrollen ins Verhältnis gesetzt und als Balkendiagramm dargestellt. Die Auswertung von acht unabhängigen Experimenten zeigte, dass die Menge an gebundenem $[^{125}\text{I}]\text{-2C2}$ -Antikörper in allen Zelllinien sehr ähnlich war und die Schwankungen zwischen den Zelllinien deutlich geringer waren als in

den ASB-Bindungsexperimenten (Abb. 40). Die Oberflächenbindung von [125 I]-2C2 repräsentiert die Menge der MPR300 auf der Zelloberfläche und die Gesamtbindung von [125 I]-2C2 entspricht der Gesamtanzahl der MPR300 in den Zellen. Es konnte keine unterschiedliche Bindung von radioaktiv-markiertem 2C2-Antikörper zwischen Kontroll- und LS-Fibroblasten festgestellt werden.

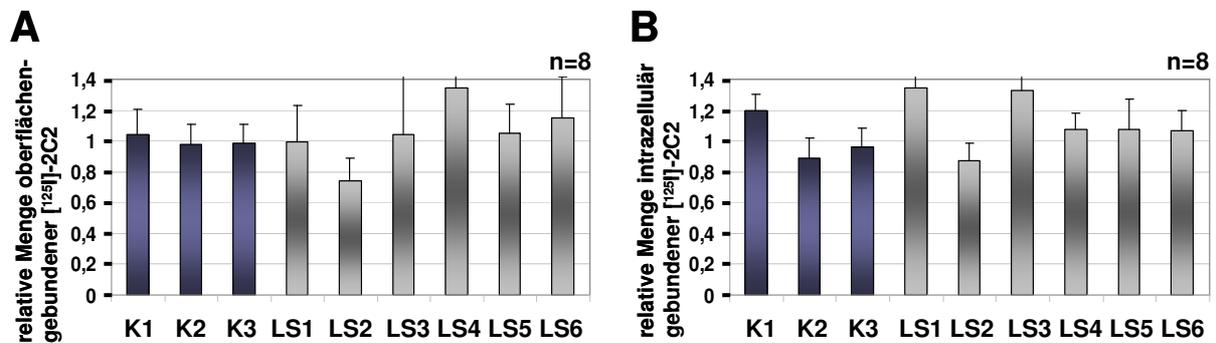


Abb. 40: Oberflächen- und Gesamtbindung des [125 I]-2C2-Antikörpers in Patienten- und Kontrollfibroblasten

Die Balkendiagramme stellen die relative oberflächengebundene [125 I]-2C2 Radioaktivität (**A**) sowie die relative intrazellulär gebundene [125 I]-2C2 Radioaktivität (**B**) in den Kontrollfibroblasten K1 bis K3 und den LS-Fibroblasten LS1 bis LS6 als Mittelwert aus acht unabhängigen 2C2-Bindungsexperimenten mit errechneter Standardabweichung dar. Zur Analyse der Bindung des 2C2-Antikörpers wurde die in den Zellysaten enthaltene Radioaktivität im γ -Counter gemessen und die Proteinkonzentration bestimmt. Der Mittelwert aus den drei Kontrollen wurde gleich eins gesetzt.

Als zweite Methode zur Quantifizierung der MPR300 in den Zellen wurden Immunfluoreszenzstudien durchgeführt. Dafür wurden die Fibroblasten mit einem spezifischen anti-MPR300-Antikörper inkubiert, der anschließend mit einem Fluoreszenz-gekoppelten sekundären Antikörper detektiert wurde. Die Messung der oberflächengebundenen Fluoreszenz in den Zellen erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers. Dafür wurden die vitalen Fibroblasten von dem Kulturgefäßboden gelöst, in Zellsuspension gebracht, bei 4°C nacheinander mit dem primären und sekundären Antikörpern inkubiert und die Fluoreszenzintensität der Zellen anschließend am FACS gemessen. Um die Gesamtanzahl der MPR300 in den Zellen zu bestimmen, wurde die konfokale Laserscanmikroskopie eingesetzt. Die Auswertung der am Mikroskop erstellten Bilder erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms „ImageJ“, wobei die Fluoreszenzintensität von insgesamt 50 Zellen jeder Fibroblastenzelllinie aus vier verschiedenen Experimenten bestimmt wurde. Die in Abbildung 41 gezeigten Balkendiagramme repräsentieren die relativen Fluoreszenzintensitäten der

Fibroblastenzelllinien bezogen auf den Mittelwert der absoluten Fluoreszenzintensitäten der drei Kontrollzelllinien (Abb. 41). Die Experimente bestätigten die bisherigen Ergebnisse, dass die Anzahl der MPR300 auf der Zelloberfläche und im Zellinneren der LS-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollfibroblasten nicht verändert ist.

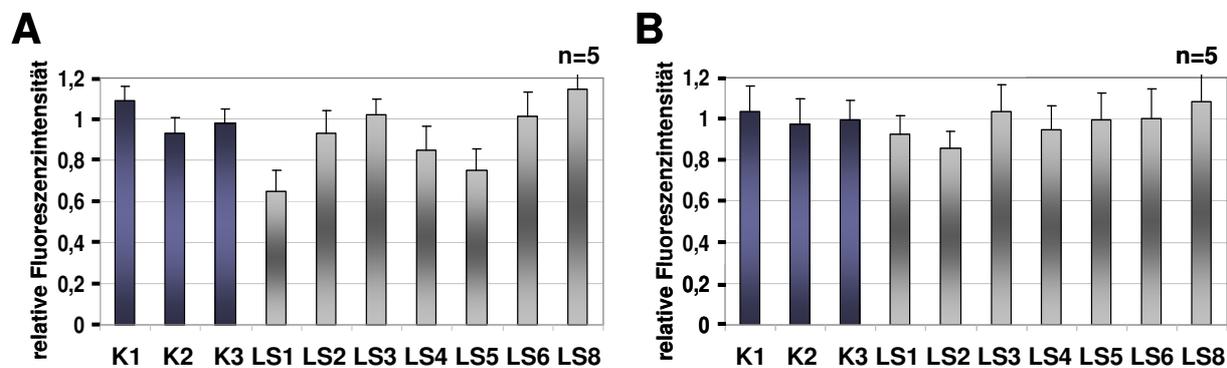


Abb. 41: Oberflächen- und Gesamtbinding von Fluoreszenz-markiertem anti-MPR300-Antikörper in Kontroll- und LS-Fibroblasten

Die Balkendiagramme zeigen die relative Menge an MPR300 auf der Zelloberfläche (**A**) und im Zellinneren (**B**) in den Kontrollfibroblasten K1 bis K3 und den LS-Fibroblasten LS1 bis LS6 und LS8 als Mittelwert aus fünf unabhängigen Messungen der Fluoreszenzintensität mit errechneter Standardabweichung. Zum Nachweis der MPR300 wurden die Zellen mit dem anti-MPR300-Antikörper und im Anschluss mit dem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die Menge der MPR300 auf der Zelloberfläche wurde im Durchflusszytometer bestimmt. Zur Analyse der Gesamtanzahl von MPR300 wurde die konfokale Laserscanmikroskopie und das Programm „ImageJ“ verwendet.

4.8 Kolokalisationsstudien für den MPR300 mittels Immunfluoreszenz

Da die Menge der MPR300 in den LS-Fibroblasten gegenüber den Kontrollfibroblasten unverändert war und somit nicht für die reduzierte Aufnahme der ASB verantwortlich sein konnte, lag die Vermutung nahe, dass die MPR300 in den LS-Fibroblasten möglicherweise fehllokalisiert sind. Daher wurden Kolokalisationsexperimente für den MPR300 mit verschiedenen Markerproteinen unterschiedlicher subzellulärer Kompartimente durchgeführt. Die Lokalisierung des MPR300 in der Zelle wurde mittels anti-MPR300-Antikörpers und eines sekundären Alexa Fluor 488-konjugierten Antikörpers nachgewiesen. Gleichzeitig erfolgte die Detektion der zu untersuchenden endogenen Markerproteine mit einem jeweils spezifischen primären Antikörper und einem Alexa Fluor 546-gekoppelten Sekundärantikörper (Abb. 42). Die Auswertung der

Immunfluoreszenzexperimente erfolgte mit Hilfe der konfokalen Laserscanmikroskopie. Die Aufnahmen zeigen, dass der MPR300 in LS- und Kontrollfibroblasten perinukleär am TGN und in vesikulären Strukturen lokalisiert (Abb. 42A-C, grün). Frühe Endosomen, durch endogenes EEA1 angefärbt, sind in einem punktierten Muster innerhalb des Zytoplasmas verteilt (Abb. 42A, rot). Nach Überlagerung kommt es im Zytoplasma der Zelle partiell zur gelben Pseudofärbung, was in der Ausschnittsvergrößerung sichtbar wird (Abb. 42A, Überlagerung und Vergrößerung). Aufgrund einer verstärkten Konzentration von EEA1 in der Peripherie des Zellkerns kommt es hier zu einer gelben Pseudofärbung, die aber nur bedingt als spezifisch anzusehen ist, da sie teilweise auf am TGN lokalisierten MPR300 zurückzuführen ist, der mit den frühen Endosomen überlagert (Abb. 42A, Überlagerung). Der perinukleär lokalisierte Golgi-Apparat wurde durch endogenes GM130 visualisiert (Abb. 42B, rot). Nach Überlagerung der Bilder konnte eine Kolo-kalisation von GM130 und MPR300 nachgewiesen werden (Abb. 42B, Überlagerung). Die Lysosomen, angefärbt durch endogenes LAMP-2, sind als punktförmiges Muster im Zytoplasma verteilt vor allem an der Peripherie des Zellkerns sichtbar (Abb. 42C, rot). In den überlagerten Bildern und auch in der Ausschnittsvergrößerung wird deutlich, dass LAMP-2 und MPR300 minimal kolo-kalisieren (Abb. 42C, Überlagerung und Vergrößerung). Mit der indirekten Doppelimmunfluoreszenz-Mikroskopie war in den LS-Fibroblasten keine veränderte intrazelluläre Verteilung des MPR300 mit den subzellulären Markern der frühen Endosomen (EEA1; Abb. 42B), des Golgi-Apparates (GM130; Abb. 42A) und der Lysosomen (LAMP-2; Abb. 42C) erkennbar. Auch in Kolo-kalisationsexperimenten für den MPR300 mit anderen Proteinen (Rab-5 für die frühen Endosomen, AP-1 für das TGN, TfR für die Recycling Endosomen) waren keine Unterschiede zwischen Kontroll- und LS-Fibroblasten erkennbar (Daten nicht gezeigt).

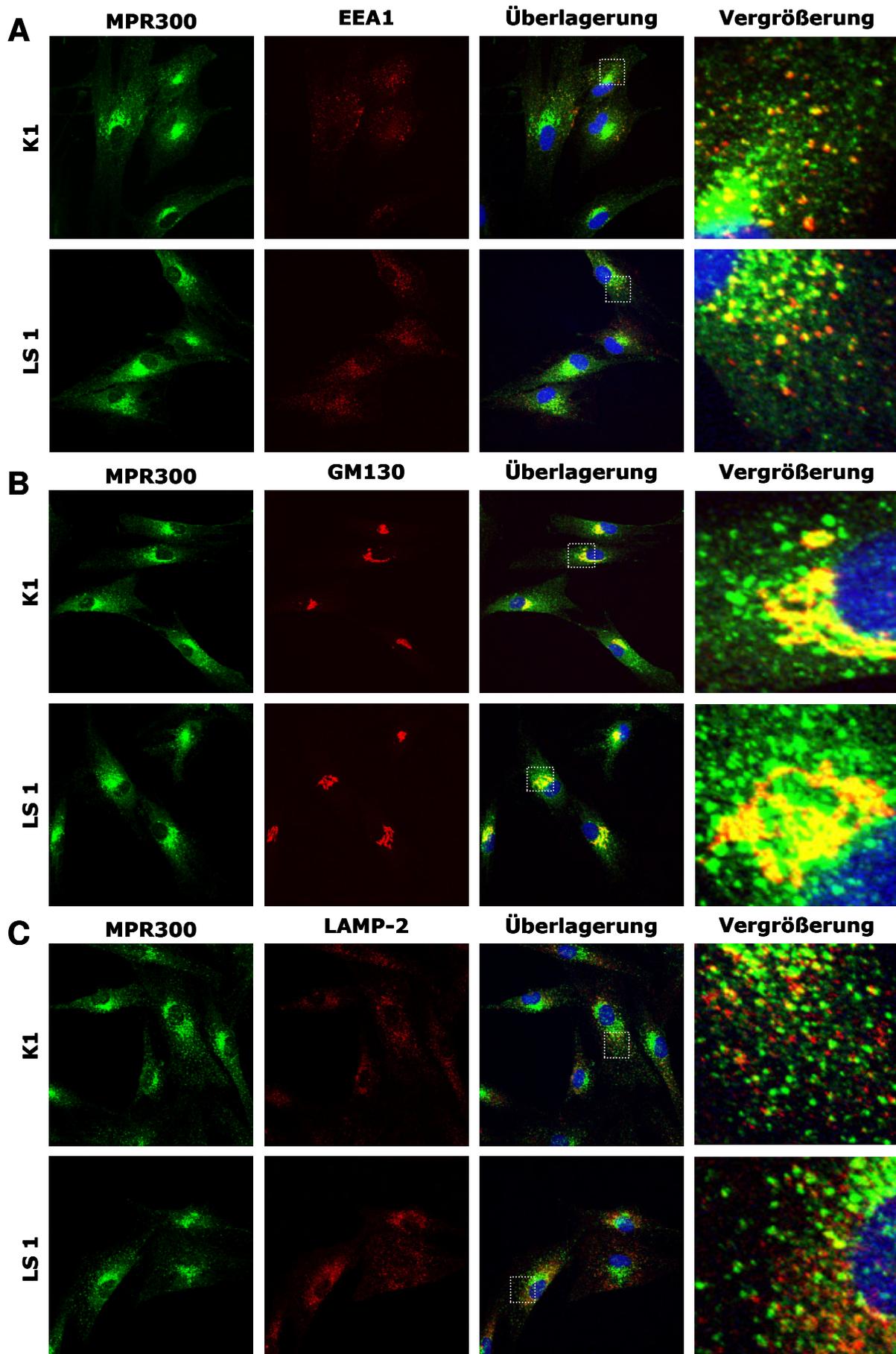


Abb. 42: Subzelluläre Lokalisation von endogenem MPR300 und Kofärbung mit verschiedenen endogenen Markerproteinen in humanen Fibroblasten

Abb. 42: Subzelluläre Lokalisation von endogenem MPR300 und Kofärbung mit verschiedenen endogenen Markerproteinen in humanen Fibroblasten

Die subzelluläre Lokalisation des MPR300, beispielhaft gezeigt für LS1 und eine Kontrolle, wurde durch die Verwendung des primären anti-MPR300-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-konjugierten Sekundärantikörpers dargestellt (A-C, grün). In den überlagerten Bildern deuten pseudogelbe Bereiche auf Kolo­kalisierung hin. Die weißen Quadrate zeigen die vergrößerten Ausschnitte an (A-C, Überlagerung und Vergrößerung). **(A)** Gleichzeitig mit MPR300 wurde endogenes EEA1 mittels eines primären anti-EEA1-Antikörpers und eines sekundären Alexa Fluor 546-gekoppelten Antikörpers nachgewiesen (rot). **(B)** Zusätzlich zu MPR300 wurde endogenes GM130 durch Verwendung eines anti-GM130-Antikörpers als Primärantikörper und eines Alexa Fluor 546-markierten Sekundärantikörpers detektiert (rot). **(C)** Neben MPR300 wurde endogenes LAMP-2 mit Hilfe eines anti-LAMP-2-Antikörpers und eines sekundären Alexa Fluor 546-konjugierten Antikörpers sichtbar gemacht (rot). DNA wurde mit DAPI ange­färbt (blau). Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Laserscanmikroskopie. (Abbildung auf der vorangegangenen Seite).

V. Diskussion

1. *OCRL1*-Mutationen führen sehr wahrscheinlich zum Funktionsverlust des Proteins

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden insgesamt neun primäre Fibroblastenzelllinien von Patienten mit LS und einer obligaten Konduktorin molekulargenetisch charakterisiert. Unter anderem lagen drei LS-Fibroblastenzelllinien und die Zelllinie einer obligaten Konduktorin vor, in denen die jeweils ursächliche Mutation im *OCRL1*-Gen noch nicht bekannt war. Nach Mutationsanalyse der 24 kodierenden Exons konnte in jeder dieser LS-Zelllinien eine genetische Veränderung im *OCRL1*-Gen identifiziert werden. Erstaunlicherweise wurde die gleiche hemizygote Nonsensemutation im Exon 22 (c.2530C→T / p.R844X) in zwei dieser LS-Fibroblastenzelllinien gefunden. Dieser Befund war ungewöhnlich, da zwei sporadische Patienten mit LS in der Regel nicht die gleiche Mutation im *OCRL1*-Gen tragen. Da es sich um zwei käuflich erworbene Zelllinien handelte, die von derselben Firma bezogen wurden, lag die Vermutung nahe, dass es sich möglicherweise um ein und dieselbe Zelllinie handeln könnte. Allerdings ist bekannt, dass die Transition von Cytosin nach Thymin in CpG-Dinukleotiden ein häufiger Mutationsmechanismus bei vielen genetischen Erkrankungen ist (Maddalena *et al.* 1988; Cooper und Krawczak 1990; Mort *et al.* 2008). Eine andere Erklärung für das Auftreten dieser Sequenzveränderung in zwei LS-Fibroblastenzelllinien wäre, dass beide Spender aus derselben Familie stammen könnten. Eine Literaturrecherche ergab, dass diese Mutation zuvor schon bei mindestens zwei sporadischen Patienten mit LS nachgewiesen worden war (Leahey *et al.* 1993; Lin *et al.* 1998). Es wäre durchaus denkbar, dass die gekauften LS-Fibroblasten von diesen beiden zuvor beschriebenen Patienten mit LS stammen könnten. In der dritten LS-Zelllinie konnte eine hemizygote Nonsensemutation im Exon 21 (c.2428C→T / p.R810X) nachgewiesen werden. Diese genetische Veränderung im *OCRL1*-Gen war zuvor noch nicht in der Literatur beschrieben worden.

Durch die Sequenzanalyse des *OCRL1*-Gens auf genomischer Ebene konnte vor Beginn dieser Arbeit in den primären Fibroblastenzellen einer obligaten Konduktorin aus einer holländischen Familie keine pathogene Veränderung nachgewiesen werden. Da es bei den Betroffenen in dieser Familie keinen Zweifel

an der klinischen Diagnose gab, wurde eine OCRL1-RNA-Analyse mittels RT-PCR und direkter Sequenzierung der erhaltenen Amplikons durchgeführt. Dadurch konnte eine 8285 Bp große intragenische Deletion im *OCRL1*-Gen identifiziert und damit der molekulargenetische Nachweis für das Lowe-Syndrom in der holländischen Familie erbracht werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die RNA-Analyse ein geeignetes Mittel ist, um genetische Veränderungen, die auf genomischer Ebene nicht nachzuweisen sind, zu detektieren.

Weiterhin konnten in fünf anderen Fibroblastenzelllinien von Patienten mit LS die schon in Blutlymphozyten nachgewiesenen genetischen Veränderungen verifiziert werden. Zwei dieser Mutationen (c.940-1G→A und c.2341+1G→C) betreffen hoch konservierte Spleißdeterminanten. Mit Hilfe von RT-PCR-Analysen wurde der Einfluss dieser Mutationen auf das Spleißen untersucht. Es zeigte sich, dass es in beiden Fällen zu einem fehlerhaften Spleißen der OCRL1-hnRNA kommt. Beim Menschen ist ein signifikanter Anteil der erblich bedingten Krankheiten auf Spleißmutationen zurückzuführen. Etwa 15 % aller krankheitsverursachenden Punktmutationen haben Einfluss auf das Spleißen der hnRNA (Krawczak *et al.* 1992). Ebenso konnte durch die RT-PCR-Analyse eine in einer der LS-Fibroblasten gefundene Mikrodeletion der *OCRL1*-Exons 16 bis 18 bestätigt werden. Durch Western-Blot-Analysen fand sich in sieben der acht Fibroblastenzelllinien von Patienten mit LS weder Wildtyp noch ein trunkiertes OCRL-Protein. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Studien überein, in denen gezeigt wurde, dass in Fibroblastenzellen mit Nonsensemutationen oder kleineren Rearrangements im *OCRL1*-Gen, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation führen sollen, kein verkürztes OCRL-Protein nachgewiesen werden kann (Lin *et al.* 1997, 1998; Kawano *et al.* 1998).

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass alle mit dem LS assoziierten Mutationen in *OCRL1* mit großer Wahrscheinlichkeit zu einem Nullallel führen. Dennoch ist möglich, dass es in anderen Geweben, wie Auge und Gehirn, zur Expression aberranter OCRL-Proteine kommt, die u.U. auch dominant-negative Effekte haben können. Diese Hypothese ist insbesondere im Hinblick darauf interessant, dass einige Patienten mit Morbus Dent Mutationen im *OCRL1*-Gen aufweisen (OMIM 300555) (Hoopes *et al.* 2005; Utsch *et al.* 2006, Sekine *et al.* 2007; Cho *et al.* 2008; Shrimpton *et al.* 2009). Morbus Dent ist eine X-chromosomal vererbte Erkrankung der Nieren, deren renale Symptome denen beim Lowe-Syndrom ähneln. Mutationen im *CLCN5*-Gen in Xp11.22, das für

einen renalen Chloridkanal kodiert, können bei etwa 60% der Patienten mit Morbus Dent nachgewiesen werden (OMIM 300009) (Hoopes *et al.* 2003). Erstaunlicherweise weisen Patienten mit Morbus Dent, die Mutationen im *OCRL1*-Gen haben, weder neurologische noch ophthalmologische klinische Merkmale des Lowe-Syndroms auf (Hoopes *et al.* 2005). Es wird davon ausgegangen, dass bei etwa 15% der Patienten mit Morbus Dent Mutationen im *OCRL1*-Gen vorliegen (Shrimpton *et al.* 2009). Da eine Mutationsanalyse von *OCRL1* und *CLCN5* bei ca. 25% der Patienten mit Morbus Dent keine pathogene Mutation aufdeckt, ist zu erwarten, dass es noch mindestens ein weiteres Gen für diese heterogene Erkrankung geben muss. Die phänotypischen Unterschiede zwischen dem Lowe-Syndrom und Morbus Dent könnten durch das unterschiedliche Verteilungsmuster der Mutationen im *OCRL1*-Gen bedingt sein. Alle bei Morbus Dent-Patienten gefundenen *OCRL1*-Mutationen sind im ersten Drittel des Gens lokalisiert sind, während die LS assoziierten Mutationen vor allem im hinteren Bereich von *OCRL1* liegen. Es wäre denkbar, dass trunkierende Mutationen im vorderen Abschnitt des Gens durch die Aktivierung eines alternativen Startkodons abgemildert werden können, wohingegen Abberationen im hinteren Teil des Gens zu einem Nullallel führen (Shrimpton *et al.* 2009).

2. Die subzelluläre Lokalisation des OCRL-Proteins wird durch Wechselwirkung mit verschiedenen Interaktionspartnern vermittelt

Durch die Überexpression der beiden OCRL-Isoformen A und B in COS-7-Zellen konnte die charakteristische subzelluläre Lokalisation des OCRL-Wildtypproteins am Golgi und an den frühen Endosomen bestätigt werden. Eine lysosomale Lokalisation des Proteins, die in einer Nierenzelllinie beobachtet wurde (Zhang *et al.* 1998), konnte in den COS-7-Zellen nicht nachgewiesen werden. Die in dieser Arbeit gezeigte subzelluläre Verteilung von Wildtyp-OCRL korreliert sehr gut mit den zuvor publizierten Daten zur OCRL-Lokalisation (Dressmann *et al.* 2000; Choudhury *et al.* 2005). Während der Fertigstellung dieser Dissertation wurde in einer Studie eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der beiden OCRL-Isoformen A und B vorgeschlagen (Choudhury *et al.* 2009). Diese Ergebnisse können mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht

nachvollzogen werden, da keine Experimente durchgeführt wurden, in denen COS-7-Zellen die beiden OCRL-Isoformen A und B gemeinsam exprimieren.

Die Analyse der katalytisch inaktiven OCRL-Isoform B mit den Aminosäureaustauschen von Arginin nach Alanin bzw. Threonin an den Positionen 493 und 500 in der 5-Phosphatase-Domäne (OCRL_R493A,R500T) ergab keine veränderte subzelluläre Lokalisation des Proteins im Vergleich zu OCRL-Wildtyp. Die Funktionalität der 5-Phosphatase-Domäne scheint somit nicht für die korrekte Lokalisation des OCRL-Proteins in der Zelle notwendig zu sein. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Choudhury und Mitarbeiter, die Lokalisationsexperimente mit einer OCRL-Deletionsmutante ohne 5-Phosphatase-Domäne durchgeführt hatten (Choudhury *et al.* 2005).

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen OCRL-Proteinvarianten führte die Überexpression der OCRL-Isoform B mit einem Aminosäureaustausch von Valin nach Glutamat an der Position 577 in der ASH-Domäne (OCRL_V577E; Addis *et al.* 2004) in COS-7-Zellen zu einer Akkumulation des Proteins in vergrößerten, möglicherweise vesikulären Strukturen im Zytoplasma. Durch Immunfluoreszenzexperimente konnte keine Kollokalisierung von OCRL_V577E mit den untersuchten Zellorganellen (Golgi-Apparat, Endosomen und Lysosomen) festgestellt werden. Aufgrund der Morphologie der nach Überexpression von OCRL_V577E beobachteten vesikulären Strukturen könnte es sich bei diesen Proteinansammlungen um sogenannte „inclusion bodies“ handeln.

OCRL interagiert über die ASH-Domäne mit den aktiven, GTP-gebundenen Rab-Proteinen Rab1, Rab5 und Rab6. Es konnte gezeigt werden, dass nach RNAi-induzierter Herunterregulation der Expression von Rab1 bzw. Rab6 weniger OCRL-Protein am Golgi-Apparat lokalisiert ist (Hyvola *et al.* 2006). Das lässt vermuten, dass diese beiden GTPasen über die Interaktion mit der ASH-Domäne von OCRL dessen Golgi-Lokalisation vermitteln. Durch die Bindung von Rab5 an OCRL wird OCRL an die frühen Endosomen rekrutiert. Für verschiedene artifizielle sowie eine bei einem Patienten mit LS gefundene Missensemutationen in der ASH-Domäne verhindern die Interaktion zwischen OCRL und den Rab-GTPasen und verursachen so eine Fehllokalisierung des OCRL-Proteins (Hyvola *et al.* 2006), wie sie auch in der hier vorliegenden Arbeit beobachtet wurde. Für Rab5 wurde ebenfalls gezeigt, dass es mit den PtdIns-3-Kinasen Vps34 und PI3K β , der PtdIns(3,4)P₂-spezifischen 4-Phosphatase sowie der PtdIns(4,5)P₂-spezifischen 5-Phosphatase II interagieren kann (Shin *et al.* 2005). Es wäre durchaus

denkbar, dass durch Rab5 das OCRL-Protein zusammen mit den anderen Kinasen und Phosphatasen zu einer bestimmten Position in der Zelle (z.B. den frühen Endosomen) rekrutiert wird, um dort an einer enzymatische Kaskade von Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen der Phosphatidylinositole mitzuwirken.

Die RhoGAP-Domäne von OCRL besitzt keine katalytische Aktivität gegenüber Rac1, kann aber eine Interaktion von OCRL mit Rac1 vermitteln (Faucherre *et al.* 2003; Lichter-Konecki *et al.* 2006; Erdmann *et al.* 2007). In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass nach Koexpression von Wildtyp-OCRL mit konstitutiv-aktivem Rac1 das OCRL-Protein an der Plasmamembran nachgewiesen werden kann. Die Translokation konnte nach Koexpression mit Wildtyp-Rac1 oder einer dominant-negativen Rac1-Proteinvariante nicht beobachtet werden. Diese Erkenntnisse decken sich mit den Ergebnissen anderer Studien, die zeigen konnten, dass die Koexpression von Wildtyp-OCRL oder dessen isolierter RhoGAP-Domäne mit Rac1-GTP zur Translokation von Wildtyp-OCRL bzw. der RhoGAP-Domäne an die Plasmamembran führt (Faucherre *et al.* 2003, 2005). Die Interaktion zwischen endogenem OCRL und konstitutiv-aktivem Rac1 in COS-7-Zellen wurde auch mittels Koimmunpräzipitation nachgewiesen (Faucherre *et al.* 2003). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch für die humane 5-Phosphatase Synaptojanin 2 gemacht, deren Translokation an die Plasmamembran gleichermaßen durch konstitutiv-aktives Rac1 stimuliert werden kann (Malecz *et al.* 2000). Die Aktivierung von Rac1 wird durch den epidermalen Wachstumsfaktor EGF vermittelt (Ieguchi *et al.* 2007). Für verschiedene humane 5-Phosphatasen konnte gezeigt werden, dass sie nach Stimulation mit EGF an die Plasmamembran translozieren (Malecz *et al.* 2000; Pesesse *et al.* 2001; Shin *et al.* 2005). Durch hier durchgeführte Immunfluoreszenzanalysen konnte über-exprimiertes OCRL-Wildtypprotein nach EGF-Stimulation ebenfalls an der Plasmamembran von COS-7-Zellen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von Faucherre und Mitarbeitern (2005) überein, die ebenfalls eine Translokation des OCRL-Proteins nach EGF-Stimulation aufzeigen konnten (Faucherre *et al.* 2005).

Interessanterweise führte eine EGF-Stimulation von COS-7-Zellen, die eine 5-Phosphatase inaktive OCRL-Mutante bzw. eine die V577E-Mutation in der ASH-Domäne aufweisende OCRL-Variante exprimieren, nicht zu einer Plasmamembrantranslokation dieser Proteine. Da die Translokation von OCRL

höchstwahrscheinlich durch die RhoGAP-Domäne vermittelt wird, war dieses Ergebnis überraschend. Es ist denkbar, dass die Mutationen in der Phosphatase- bzw. ASH-Domäne Auswirkungen auf die Konformation des OCRL-Proteins haben und dadurch nicht mehr mit Rac1 interagieren können. Ferner wäre vorstellbar, dass die Translokation durch zusätzliche Faktoren vermittelt wird, die eine katalytisch aktive Phosphatase-Domäne bzw. eine Interaktion mit der ASH-Domäne benötigen.

Diese Daten zusammengenommen zeigen, dass OCRL, ein Protein ohne Membranlokalisierungsmotive oder Konsensusregionen für Lipidmodifikationen, über seine multiple Domänenstruktur, insbesondere über die ASH-Domäne, Interaktionspartner von verschiedenen GTPasen ist, die die subzelluläre Lokalisation von OCRL vermitteln. Viele dieser mit OCRL interagierenden Proteine stehen in engem Zusammenhang mit endozytotischen Prozessen in der Zelle. Dies führte zur grundlegenden Frage der vorliegenden Arbeit, inwiefern das OCRL-Protein an der Rezeptor-vermittelten Endozytose beteiligt ist.

3. Die Überexpression von katalytisch aktiven OCRL-Proteinen hemmt die Endozytose von Transferrin, ohne die Internalisierung von EGF zu beeinflussen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss einer ektoptischen Überexpression verschiedener OCRL-Proteinvarianten auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose von EGF und Transferrin in COS-7-Zellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der unterschiedlichen HA-OCRL-Fusionsproteine keine Auswirkungen auf die Internalisierung von EGF hat. Eine Studie über Synaptojanin 2, einer zytosolischen 5-Phosphatase, die, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, nach EGF-Stimulation an die Plasmamembran transloziert, konnte im Gegensatz dazu zeigen, dass die Expression der isolierten, membranlokalisierten Phosphatase-Domäne des Proteins die Endozytose von EGF inhibiert, während die Expression einer katalytisch inaktiven, membranlokalisierten Phosphatase-Domäne von Synaptojanin 2 oder des Synaptojanin 2-Wildtypproteins keinen Einfluss auf die Endozytose von EGF hat (Malecz *et al.* 2000). Analog dazu konnte auch für Synaptojanin 1, einer zu Synaptojanin 2 homologen Gehirn-spezifischen 5-Phosphatase, die vor allem in den Endköpfchen der Synapsen lokalisiert ist,

gezeigt werden, dass eine ektopische Expression der isolierten Phosphatase-Domäne zu einer reduzierten Internalisierung von EGF führt (Krauss *et al.* 2003; Kim *et al.* 2006). Dieser unterschiedliche Einfluss der beiden Synaptojanin 5-Phosphatasen und OCRL auf die Internalisierung von EGF könnte damit erklärt werden, dass Synaptojanin 1 und 2 Interaktionspartner von Proteinen sind, die an der Endozytose des EGF-Rezeptors beteiligt sind, während OCRL mit akzessorischen Proteinen interagiert, die die Internalisierung anderer Rezeptoren regulieren.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die Überexpression der verschiedenen OCRL-Proteine Einfluss auf die Internalisierung von Transferrin hat. Dabei zeigte sich, dass nur eine Überexpression der katalytisch inaktiven Proteinvariante HA-OCRL_R493A,R500T eine effiziente Endozytose von Transferrin erlaubt. Bei allen anderen untersuchten OCRL-Proteinvarianten mit katalytisch intakter 5-Phosphatase-Domäne konnte eine mehr oder weniger stark reduzierte Aufnahme von Transferrin (nach 5, 10 oder 15 min), abhängig von der Stärke der Proteinexpression, in allen transfizierten Zellen beobachtet werden. Kürzlich wurde eine Studie veröffentlicht, die diesen Ergebnissen widerspricht. Darin wurde gezeigt, dass eine Überexpression der beiden OCRL-Isoformen A und B sowie einer OCRL-Isoform B ohne Phosphatase-Domäne (OCRL_Δ237-539) die Endozytose von Transferrin nicht beeinflussen, wohingegen die ektopische Expression der OCRL-Isoform A ohne Phosphatase-Domäne (OCRL_Δ237-539) die frühe Phase der Internalisierung (nach 2 und 5 min) von Transferrin inhibiert, während zu späteren Zeitpunkten (nach 15 und 30 min) eine normale Aufnahme von Transferrin nachgewiesen werden konnte (Choudhury *et al.* 2009). Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass die beiden OCRL-Isoformen A und B unterschiedliche zelluläre Funktionen übernehmen und dass nur die Isoform A in endozytotische Prozesse involviert ist. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Untersuchung der Endozytose ausschließlich die OCRL-Isoform B verwendet. Die Diskrepanz zu den hier vorgestellten Ergebnissen könnte damit erklärt werden, dass der beobachtete Endozytosedefekt abhängig von der Transferrinkonzentration ist. In dieser Arbeit wurde viermal mehr Transferrin verwendet als in der oben angeführten Studie. Dies könnte einen zusätzlichen Effekt auf die Expression der Transferrinrezeptoren und somit auf die Endozytoserate haben. Der Unterschied in der Endozytose von Transferrin zwischen der in dieser Arbeit verwendeten

katalytisch inaktiven OCRL-Proteinvariante und der OCRL-Deletionsmutante ohne Phosphatase-Domäne aus der genannten Studie könnte darin bestehen, dass das Fehlen der kompletten Phosphatase-Domäne die gesamte Proteinkonformation beeinflusst. Vermutlich würde sich das auf andere Protein-Proteininteraktionen von OCRL auswirken, was einen Endozytosedefekt erklären könnte. Warum dieser Effekt nur bei einer der beiden OCRL-Isoformen auftritt, ist allerdings nicht nachzuvollziehen. In der Publikation wurde auch angeführt, dass die Überexpression von 5-Phosphatase inaktiven OCRL-Mutanten der Isoformen A und B keinen Einfluss auf die Endozytose von Transferrin hat (Choudhury *et al.* 2009). Das wiederum entspricht den hier gemachten Beobachtungen. Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wäre es vorstellbar, dass die reduzierte Endozytose von Transferrin auf eine durch die Phosphatase-Domäne des OCRL-Proteins vermittelte Reduktion der intrazellulären PtdIns(4,5)P₂-Konzentration zurückzuführen ist, wie es z.B. für die Phosphatase-Domäne von Synaptojanin 1 demonstriert werden konnte (Kim *et al.* 2006). Eine Überexpression von Synaptojanin 1 oder dessen isolierter Phosphatase-Domäne führt ebenfalls zu einer reduzierten Internalisierung von Transferrin (Haffner *et al.* 2000; Krauss *et al.* 2003; Kim *et al.* 2006).

Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass eine chemisch induzierte Dephosphorylierung von PtdIns(4,5)P₂ an der Plasmamembran eine vollständige Inhibition der Transferrinaufnahme und eine reduzierte Endozytose von EGF bedingt (Varnai *et al.* 2006; Zoncu *et al.* 2007; Abe *et al.* 2008).

Die hier erläuterten Erkenntnisse zeigen, dass eine Überexpression von katalytisch aktiven 5-Phosphatasen und die damit einhergehende Reduktion der intrazellulären PtdIns(4,5)P₂-Konzentration sowohl die Endozytose von Transferrin als auch die Internalisierung von EGF negativ beeinflussen kann. Einen vergleichbaren Einfluss auf den intrazellulären PtdIns(4,5)P₂-Spiegel hat auch die Inaktivierung von PtdIns(4)P-spezifischen 5-Kinasen, die genau entgegengesetzt zu den 5-Phosphatasen arbeiten und durch die Phosphorylierung von PtdIns(4)P die PtdIns(4,5)P₂-Konzentration an der Plasmamembran aufrechterhalten. In eukaryotischen Zellen gibt es die drei Isoformen α , β und γ der 5-Kinasen, die alle primär an der Plasmamembran lokalisiert sind (Padron *et al.* 2003). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine durch RNAi-induzierte Herunterregulation der Expression der PtdIns(4)P-5-Kinase I β (PIP5KI β) zu einer reduzierten Internalisierung von Transferrin führt (Padron

et al. 2003). Ferner verursacht die ektopische Expression einer katalytisch inaktiven Variante der PIP5KI β eine verminderte Aufnahme von EGF (Barbieri *et al.* 2001). Analog dazu konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass die RNAi-vermittelte Herunterregulierung der Expression der PtdIns(4)P-5-Kinase I γ (PIP5KI γ) sowie die Überexpression einer katalytisch inaktiven Form von PIP5KI γ auch eine reduzierte Aufnahme von Transferrin zur Folge haben (Bairstow *et al.* 2006).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über den Einfluss einer OCRL-Überexpression auf die Aufnahme von Transferrin zusammen mit den Ergebnissen anderer Studien zeigen, dass sich eine verminderte zelluläre PtdIns(4,5)P₂-Konzentration negativ auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose von EGF und Transferrin auswirken kann. Da PtdIns(4,5)P₂ als Ko-Rezeptor bei der Rekrutierung und Regulation von Plasmamembran-spezifischen akzessorischen Proteinen benötigt wird, wäre es denkbar, dass die verminderte Internalisierung durch eine fehlerhafte Rekrutierung für die Endozytose benötigter Adaptorproteine verursacht wird. Die individuellen Unterschiede im Einfluss der verschiedenen 5-Phosphatasen und 5-Kinasen auf die Endozytose von Transferrin und EGF sind möglicherweise auf eine unterschiedlich starke Reduktion der PtdIns(4,5)P₂-Konzentration, z.B. lokal an bestimmten Regionen der Plasmamembran, zurückzuführen.

4. LS-Fibroblasten nehmen weniger Arylsulfatase B durch MPR300-vermittelte Endozytose auf als Kontrollfibroblasten

Mutationen im *OCRL1*-Gen stehen mit dem Verlust der katalytischen 5-Phosphatase-Aktivität des OCRL-Proteins in Zusammenhang (Suchy *et al.* 1995; Zhang *et al.* 1998; Faucherre *et al.* 2005; Lichter-Konecki *et al.* 2006). In Übereinstimmung damit konnte nachgewiesen werden, dass die PtdIns(4,5)P₂-Konzentration in OCRL-defizienten Fibroblastenzellen von Patienten mit LS höher ist als in Kontrollfibroblasten (Zhang *et al.* 1998; Wenk *et al.* 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde analysiert, ob dieser erhöhte PtdIns(4,5)P₂-Spiegel in den LS-Fibroblasten Einfluss auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose verschiedener Liganden hat. Es konnte gezeigt werden, dass die Internalisierung der Liganden Transferrin und EGF in den LS-Fibroblasten im Vergleich zu Kontrollfibroblasten

nicht verändert ist. Im Gegensatz dazu führt eine Herunterregulation der Synaptojanin 2-Expression durch RNAi, genauso wie die im vorangegangenen Abschnitt beschriebene Überexpression des Proteins, zu einer reduzierten Aufnahme von Transferrin und EGF (Rusk *et al.* 2003). Erstaunlicherweise hat die Überexpression von einer der drei PIP5KI-Isoformen α , β und γ eine genau gegenteilige Wirkung in Form einer erhöhten Endozytose von Transferrin (Padron *et al.* 2003). Die ektopische Expression von PIP5KI α , aber nicht von PIP5KI β , verursacht ebenso eine verstärkte Internalisierung von EGF (Barbieri *et al.* 2001).

Diese an sich widersprüchlichen Daten lassen vermuten, dass die PtdIns(4,5)P₂-Konzentration in der Zelle nicht alleine für die Veränderungen in der Rezeptor-vermittelten Endozytose von Transferrin und EGF verantwortlich ist, sondern dass auch noch andere Faktoren wie beispielsweise das Spektrum an Interaktionspartnern der jeweiligen 5-Phosphatase bzw. 5-Kinase eine Rolle dabei spielt.

Die Analyse der Endozytose von LDL ergab keine Unterschiede zwischen LS- und Kontrollfibroblasten. Eine reduzierte Aufnahme von LDL ist mit dem Krankheitsbild der Hypercholesterinämie assoziiert (Soutar und Naoumova 2007), daher waren diese Ergebnisse nicht überraschend, da Hypercholesterinämie kein charakteristisches klinisches Merkmal des Lowe-Syndroms ist.

Weiterhin wurde die MPR300-vermittelte Aufnahme lysosomaler ASB in den LS-Fibroblasten bestimmt. In den LS-Fibroblasten wurde eine Reduktion der MPR300-abhängigen Endozytose von [¹²⁵I]-ASB um bis zu 65% im Vergleich zu den Kontrollfibroblasten detektiert, die statistisch hoch signifikant war ($p < 0.001$; student's t-Test). Die Internalisierung des MPR300 ist direkt abhängig von AP-2 und Clathrin (Harasaki *et al.* 2005), beides OCRL-interagierende Proteine. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die OCRL-Defizienz in den LS-Fibroblasten mit der AP-2-abhängigen Internalisierung der MPR300 interferiert oder die Recyclingrate der MPR300 zur Plasmamembran beeinflusst. Ebenso wäre denkbar, dass der Verlust des OCRL-Proteins den retrograden Transportweg der MPR300 zum TGN stört und dadurch indirekt die Konzentration von MPR300 im Recyclingpool zur Plasmamembran verändert wird. Ebenso wäre möglich, dass die Anzahl von MPR300 an der Zelloberfläche oder die Gesamtzahl an MPR300 in den LS-Fibroblasten reduziert ist. Dieser Hypothese wurde nachgegangen, aber

die Untersuchungen konnten keine Hinweise für eine veränderte Anzahl der MPR300 auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren der LS-Fibroblasten liefern. Eine Verbindung zwischen OCRL und den Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren konnte bereits in anderen Studien nachgewiesen werden (Ungewickell *et al.* 2004; Choudhury *et al.* 2005). Darin wurde u.a. gezeigt, dass eine Überexpression von OCRL sowie einer 5-Phosphatase inaktiven Mutante von OCRL zu einer nicht genauer spezifizierten Umverteilung der MPR300 führt (Ungewickell *et al.* 2004). In der zweiten Studie wurde eine Relokalisation der MPR300 zu vergrößerten endosomalen Strukturen nach Überexpression der OCRL-Deletionsmutante OCRL_Δ237-539 beobachtet (Choudhury *et al.* 2005). Die Autoren postulieren eine Störung im Rücktransport der MPR300 von den Endosomen zum TGN, da die Endozytose von Shiga Toxin in OCRL-überexprimierenden Zellen inhibiert war. In derselben Publikation wurde beschrieben, dass eine RNAi-induzierte Reduktion der endogenen OCRL-Expression ebenfalls einen Effekt auf die subzelluläre Verteilung der MPR300 in Form einer Relokalisation der MPR300 zu vergrößerten frühen Endosomen hat. Aufgrund dieser Daten wäre denkbar, dass die reduzierte Internalisierung der ASB in den OCRL-defizienten LS-Fibroblasten durch eine intrazelluläre Fehlverteilung der MPR300 bedingt sein könnte.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden daher Kolokalisationsexperimente von MPR300 mit verschiedenen Markerproteinen in LS- und Kontrollfibroblasten durchgeführt, um die subzelluläre Verteilung der MPR300 zu untersuchen. Dabei konnten die MPR300 perinukleär am TGN und in Endosomen nachgewiesen werden. Die Immunfluoreszenzaufnahmen lieferten keinen Hinweis dafür, dass die Lokalisierung der MPR300 in den LS-Fibroblasten verändert ist.

Eine weitere Möglichkeit den Endozytosedefekt der ASB in den LS-Fibroblasten zu erklären, wäre eine verlangsamte Rezeptorkinetik: obwohl die Anzahl der MPR300 auf der Zelloberfläche von LS- und Kontrollfibroblasten gleich ist, könnte die Internalisierung der Rezeptoren in den LS-Fibroblasten nach erfolgter Ligandenbindung verzögert sein. Alternativ könnte das Recycling der MPR300 nach Dissoziation der ASB vom Rezeptor in den frühen Endosomen in den LS-Fibroblasten verzögert sein. Dieser Hypothese konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgegangen werden, da die entsprechenden Reaktionsschritte nur mit einem Fluoreszenz-markierten Liganden, nicht aber mit einem radioaktiv-

markierten Liganden analysiert werden können, und erstere nicht verfügbar waren.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein spezifischer Defekt bei der MPR300-vermittelten Internalisierung von ASB in den LS-Fibroblasten identifiziert werden. Die reduzierte ASB-Endozytose könnte darauf beruhen, dass die durch die OCRL-Defizienz bedingte erhöhte PtdIns(4,5)P₂-Konzentration in den LS-Fibroblasten eine Redistribution der MPR300 verursacht und dadurch indirekt die Konzentration dieser Rezeptoren im Recyclingpool zur Plasmamembran reduziert.

5. Modell für einen möglichen Pathomechanismus beim Lowe-Syndrom

Der Mechanismus, wie der Funktionsverlust des OCRL-Proteins zum klinischen Krankheitsbild des Lowe-Syndroms führen kann, ist bisher noch immer nicht identifiziert. Wie bereits im ersten Abschnitt erwähnt, konnten Mutationen im *OCRL1*-Gen auch bei Patienten mit Morbus Dent identifiziert werden (Hoopes *et al.* 2005; Utsch *et al.* 2006, Sekine *et al.* 2007; Cho *et al.* 2008; Shrimpton *et al.* 2009). Interessant daran ist, dass Mutationen in dem zweiten mit Morbus Dent assoziierten Gen, *CLCN5*, mit einem Defekt in der Rezeptor-vermittelten Endozytose im proximalen Tubulus in Verbindung stehen. Der vom *CLCN5*-Gen kodierte Chloridkanal CLC-5 ist in subapikalen Endosomen der Nierenepithelzellen lokalisiert und dient der Ansäuerung des endosomalen Lumens (Devuyst *et al.* 1999). Es konnte gezeigt werden, dass ein Defekt dieses Chloridkanals zu einer spezifischen Beeinträchtigung der Megalin-vermittelten Endozytose führt, da der Rücktransport der Rezeptoren von den Endosomen zur Plasmamembran gestört ist (Christensen *et al.* 2003). Da sowohl Mutationen in *CLCN5* als auch in *OCRL1* zum klinischen Bild des Morbus Dent führen, liegt die Vermutung nahe, dass OCRL ebenfalls an endozytotischen Prozessen beteiligt ist. Diese Hypothese wird zusätzlich gestützt durch die Assoziation von OCRL mit Adaptorprotein APPL1. Die Interaktion der beiden Proteine wird über die ASH- und RhoGAP-Domänen vermittelt (Erdmann *et al.* 2007). Es konnte gezeigt werden, dass alle in Patienten mit LS identifizierte Missensemutationen in diesen beiden Domänen die Bindung von OCRL mit APPL1 unterbinden, ohne die Interaktion von OCRL mit anderen Interaktionspartnern, wie beispielsweise Clathrin oder Rac1, zu beeinflussen (Erdmann *et al.* 2007; McCrea *et al.* 2008).

APPL1 ist ein an spezifischen frühen Endosomen lokalisiertes Rab5-Effektorprotein, das OCRL indirekt mit dem endozytotischen Adaptor GIPC verbindet (Erdmann *et al.* 2007). GIPC ist in der Lage, Megalin spezifisch zu binden, und scheint an der Megalin-vermittelten Endozytose von niedermolekularen Proteinen im proximalen Tubulus beteiligt zu sein (Lou *et al.* 2002). Unterstützt wird diese Annahme durch Knock-out-Mausmodelle für GIPC und Megalin, die in beiden Fällen eine tubuläre Proteinurie aufweisen, wie sie auch beim Lowe-Syndrom und bei Morbus Dent beobachtet wird (Leheste *et al.* 1999; Naccache *et al.* 2006). Im Kontext mit den renalen Gemeinsamkeiten zwischen dem Lowe-Syndrom und Morbus Dent wäre somit denkbar, dass OCRL *in vivo* in einem Komplex mit APPL1 und GIPC vorliegt und dadurch die Megalin-vermittelte Endozytose von niedermolekularen Proteinen im proximalen Tubulus reguliert. Gestützt wird diese Hypothese durch eine Untersuchung von Norden und Mitarbeitern (2002), in der gezeigt wird, dass Urin von Patienten mit LS und Morbus Dent weniger Megalin enthält als der von Kontrollpersonen.

Bei homozygoten Megalin-Knockout-Mäusen finden sich zudem Fehlbildungen der Augen (Willnow *et al.* 1996). Die kongenitalen Katarakte beim LS beruhen auf einer gestörten Migration oder Differenzierung der Linsenepithelzellen (Tripathi *et al.* 1986). Die Versorgung des Linsenepithels mit Nährstoffen erfolgt via Endozytose und auch Transzytose aus dem Kammerwasser (Brown *et al.* 1990), dass vor allem Albumin und andere Proteine, sowie Ionen, Ascorbin- und Hyaluronsäure enthält. Interessanterweise wurde ein Zusammenhang zwischen einer veränderten Albuminkonzentration im Auge und einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer Katarakt postuliert (Sabah *et al.* 2007). Mutationen in dem für Megalin kodierenden, humanen *LRP2*-Gen sind mit dem Donnai-Barrow-Syndrom (OMIM 222448) assoziiert. Dabei handelt es sich um eine autosomal-rezessive Erkrankung, die einige klinische Merkmale, wie beispielsweise eine tubuläre Proteinurie, Anomalien der Augen (u.a. Iriskoloboma und Netzhautablösung) und mentale Retardierung, mit dem Lowe-Syndrom teilt (Kantarci *et al.* 2007).

Erwähnenswert ist auch, dass APPL1 zusammen mit GIPC an der Regulation der Endozytose der Rezeptortyrosinkinase TrkA, einem Rezeptor für den Nervenwachstumsfaktor NGF, beteiligt ist. TrkA leitet NGF-induzierte Signale für Überleben, Differenzierung und Wachstum von Neuronen weiter, und ist somit essentiell für die Entwicklung und Funktion des Nervensystems (Lin *et al.* 2006;

Varsano *et al.* 2006). Es wäre denkbar, dass ein Komplex aus OCRL, APPL1 und GIPC an der Regulation der Endozytose von TrkA beteiligt. Auf Basis dieser Hypothese ließen sich die neurologischen und kognitiven Defizite bei Patienten mit LS durch eine gestörte TrkA-Signalkaskade erklären.

Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über den spezifischen Einfluss von OCRL auf die Internalisierung von Transferrin und ASB zusammen mit den Literaturdaten lässt sich ein Zusammenhang zwischen dem Lowe-Syndrom und der spezifischen Rezeptor-vermittelten Endozytose postulieren.

Ein mögliches Modell für den in dieser Arbeit nachgewiesenen Einfluss von OCRL auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose von Transferrin und Arylsulfatase B ist in Abbildung 43 gezeigt. Bei einer physiologischen OCRL-Expression befindet sich das Protein primär am TGN und den frühen Endosomen und kann aufgrund bestimmter Stimuli hin, beispielsweise durch eine EGF-induzierte Rac1-Aktivierung, an die Plasmamembran translozieren (Abb. 43A). Dort ist es beteiligt an der Rekrutierung des Adaptorkomplexes AP-2 sowie eines bestimmten Spektrums an akzessorischen Proteinen, die für die Endozytose spezifischer Rezeptoren (z.B. MPR300 und Transferrinrezeptor) notwendig sind. Im weiteren Verlauf der Internalisierung der Rezeptoren wird das PtdIns(4,5)P₂ der endozytierten Vesikel durch OCRL in PtdIns(4)P umgewandelt. Dieser Prozess ist essentiell, um beispielsweise die Clathrinhülle vom Vesikel zu entfernen. Der endozytische Vesikel wird nach Verlust der Clathrinhülle zu den frühen Endosomen transportiert (Abb. 43A).

In OCRL-defizienten Zellen, z.B. von Patienten mit Lowe-Syndrom, ist die PtdIns(4,5)P₂-Konzentration aufgrund der fehlenden 5-Phosphatase-Aktivität von OCRL erhöht (Abb. 43B). Nach Internalisierung der MPR300 kann aufgrund der fehlenden Dephosphorylierung von PtdIns(4,5)P₂ durch OCRL die Clathrinhülle nicht vom internalisierten Vesikel entfernt werden, und die Vesikel akkumulieren zusammen mit den Rezeptoren. Dadurch wird indirekt die Konzentration der MPR300 im Recyclingpool zur Plasmamembran reduziert und die Endozytose von ASB inhibiert (Abb. 43B).

Eine Überexpression des OCRL-Proteins führt zu einer möglicherweise lokalen Erniedrigung der intrazellulären PtdIns(4,5)P₂-Konzentration an der Plasmamembran (Abb. 43C), wodurch insbesondere für die Transferrinaufnahme essentielle Adaptorproteine nicht mehr binden können. Dadurch wird spezifisch die Rezeptor-vermittelte Endozytose von Transferrin gehemmt (Abb. 43C).

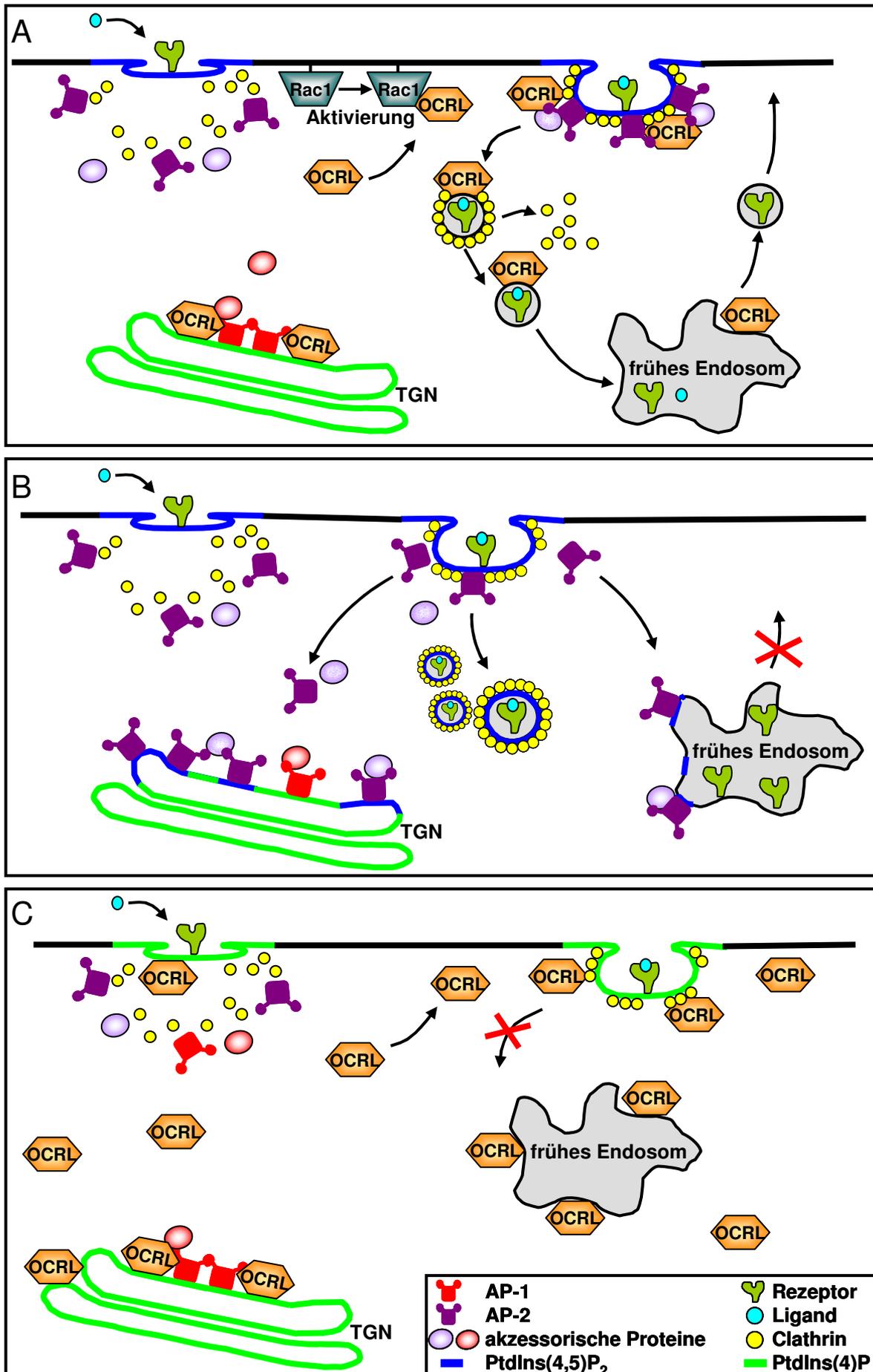


Abb. 43: Modell für den Einfluss von OCRL auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose von Transferrin und Arylsulfatase B

Abb. 43: Modell für den Einfluss von OCRL auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose

(A) OCRL befindet sich primär am TGN, den frühen Endosomen und nach Rac1-Aktivierung an der Plasmamembran. Dorthin rekrutiert es das Adaptorprotein AP-2 und verschiedene akzessorische Proteine. Im weiteren Verlauf der Internalisierung des Rezeptors wird das PtdIns(4,5)P₂ des endozytierten Vesikels durch OCRL zu PtdIns(4)P umgewandelt. Dieser Prozess ist essentiell für das Entfernen der Clathrinhülle. Der endozytische Vesikel wird nach Verlust der Clathrinhülle zu den frühen Endosomen transportiert **(B)** In OCRL-defizienten Zellen ist die PtdIns(4,5)P₂-Konzentration erhöht. Nach Internalisierung der Rezeptoren kann aufgrund der fehlenden Dephosphorylierung von PtdIns(4,5)P₂ durch OCRL die Clathrinhülle nicht vom internalisierten Vesikel entfernt werden, und die Vesikel akkumulieren zusammen mit den Rezeptoren. Dadurch wird indirekt die Konzentration der Rezeptoren im Recyclingpool zur Plasmamembran reduziert und die Endozytose inhibiert. Gleichzeitig führt die unspezifische Anreicherung von PtdIns(4,5)P₂ an den intrazellulären Membranen zu einer Umverteilung der PtdIns(4,5)P₂-bindenden Proteine **(C)** Eine Überexpression des OCRL-Proteins führt zu einer lokalen Erniedrigung der intrazellulären PtdIns(4,5)P₂-Konzentration an der Plasmamembran, wodurch für die Internalisierung wichtige akzessorische Proteine nicht mehr binden können. Dadurch wird die Rezeptor-vermittelte Endozytose gehemmt, (Abbildung auf der vorangegangenen Seite).

V. Literaturverzeichnis

Abe N, Inoue T, Galvez T, Klein L, Meyer T. (2008) Dissecting the role of PtdIns(4,5)P₂ in endocytosis and recycling of the transferrin receptor. *J Cell Sci.* 121 (Pt 9):1488-94.

Addis M, Loi M, Lepiani C, Cau M, Melis MA. (2004) OCRL mutation analysis in Italian patients with Lowe syndrome. *Hum Mutat.* 23(5):524-5.

Ahle S, Mann A, Eichelsbacher U, Ungewickell E. (1988) Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane. *EMBO J.* 7(4):919-29.

Anderson RG, Goldstein JL, Brown MS. (1977)

A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localise in coated pits on the cell surface of human fibroblasts. *Nature.* 270(5639):695-9.

Attre O, Olivos IM, Okabe I, Bailey LC, Nelson DL, Lewis RA, McInnes RR, Nussbaum RL. (1992) The Lowe oculocerebrorenal syndrome gene encodes a novel protein highly homologous to inositol polyphosphate-5-phosphatase. *Nature.* 358:239-242.

Bairstow SF, Ling K, Su X, Firestone AJ, Carbonara C, Anderson RA. (2006) Type Iγ661 phosphatidylinositol phosphate kinase directly interacts with AP2 and regulates endocytosis. *J Biol Chem.* 281(29):20632-42.

Barbieri MA, Heath CM, Peters EM, Wells A, Davis JN, Stahl PD. (2001) Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase-1β is essential for epidermal growth factor receptor-mediated endocytosis. *J Biol Chem.* 276(50):47212-6.

Bleekemolen JE, Stein M, von Figura K, Slot JW, Geuze HJ. (1988) The two mannose 6-phosphate receptors have almost identical subcellular distributions in U937 monocytes. *Eur J Cell Biol.* 47(2):366-72.

Bockenbauer D, Bokenkamp A, van't Hoff W, Levtchenko E, Kist-van Holthe JE, Tasic V, Ludwig M. (2008) Renal phenotype in Lowe Syndrome: a selective proximal tubular dysfunction. *Clin J Am Soc Nephrol.* 3(5):1430-6.

Boulougouris P, Elder JB. (2002) Epidermal growth factor receptor and transformation. *Surg Today.* 32(8):667-71. Review.

Bonifacino JS, Rojas R. (2006) Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(8):568-79. Review.

Braulke T. (1996) Origin of lysosomal proteins. *Subcell Biochem.*;27:15-49. Review.

Brodsky FM. (1988) Living with clathrin: its role in intracellular membrane traffic. *Science.* 242(4884):1396-402. Review.

Brown MS, Anderson RG, Goldstein JL. (1983) Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins. *Cell.* 32(3):663-7. Review.

Brown MS, Goldstein JL. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 232(4746):34-47. Review.

- Brown HG, Pappas GD, Ireland ME, Kuszak JR.** (1990) Ultrastructural, biochemical, and immunologic evidence of receptor-mediated endocytosis in the crystalline lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (12):2579-92.
- Bublil EM, Yarden Y.** (2007) The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr Opin Cell Biol.* 19(2):124-34.
- Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S.** (2003) An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell.* 12(3):541-52. Review.
- Carpenter G.** (2000) The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling. *Bioessays.* 22(8):697-707. Review.
- Cau M, Addis M, Congiu R, Meloni C, Cao A, Santaniello S, Loi M, Emma F, Zuffardi O, Ciccone R, Sole G, Melis MA.** (2006) A locus for familial skewed X chromosome inactivation maps to chromosome Xq25 in a family with a female manifesting Lowe syndrome. *J Hum Genet.* 51(11):1030-6.
- Chavrier, P. and Goud, B.** (1999). The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 466-475.
- Cho HY, Lee BH, Choi HJ, Ha IS, Choi Y, Cheong HI.** (2008) Renal manifestations of Dent disease and Lowe syndrome. *Pediatr Nephrol.* 23(2):243-9.
- Choudhury R, Diao A, Zhang F, Eisenberg E, Saint-Pol A, Williams C, Konstantakopoulos A, Lucocq J, Johannes L, Rabouille C, Greene LE, Lowe M.** (2005) Lowe syndrome protein OCRL1 interacts with clathrin and regulates protein trafficking between endosomes and the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell.* 16(8):3467-79.
- Choudhury R, Noakes CJ, McKenzie E, Kox C, Lowe M.** (2009) Differential clathrin binding and subcellular localization of OCRL1 splice isoforms. *J Biol Chem.* 284(15):9965-73.
- Christensen EI, Devuyt O, Dom G, Nielsen R, Van der Smissen P, Verroust P, Leruth M, Guggino WB, Courtoy PJ.** (2003) Loss of chloride channel CLC-5 impairs endocytosis by defective trafficking of megalin and cubilin in kidney proximal tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(14):8472-7.
- Cooper DN, Krawczak M.** (1990) The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease: patterns and predictions. *Hum Genet.* 85(1):55-74. Review.
- Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF.** (1983) pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(8):2258-62.
- Devuyt O, Christie PT, Courtoy PJ, Beauwens R, Thakker RV.** (1999) Intrarenal and subcellular distribution of the human chloride channel, CLC-5, reveals a pathophysiological basis for Dent's disease. *Hum Mol Genet.* 8(2):247-57.
- Di Paolo G, De Camilli P.** (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature.* 443(7112):651-7. Review.

- Donaldson JG, Honda A.** (2005) Localization and function of Arf family GTPases. *Biochem Soc Trans.* 33(Pt 4):639-42. Review.
- Dressman MA, Olivos-Glander IM, Nussbaum RL, Suchy SF.** (2000) Ocr1, a PtdIns(4,5)P(2) 5-phosphatase, is localized to the trans-Golgi network of fibroblasts and epithelial cells. *J Histochem Cytochem.* 2000 Feb;48(2):179-90.
- Dunn WA, Hubbard AL.** (1984) Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by hepatocytes in the perfused rat liver: ligand and receptor dynamics. *J Cell Biol.* 98(6):2148-59.
- Dunn WA, Connolly TP, Hubbard AL.** (1986) Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by rat hepatocytes: receptor pathway. *J Cell Biol.* 102(1):24-36.
- Dunn KW, Maxfield FR.** (1992) Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. *J Cell Biol.* 117(2):301-10.
- Erdmann KS, Mao Y, McCrea HJ, Zoncu R, Lee S, Paradise S, Modregger J, Biemesderfer D, Toomre D, De Camilli P.** (2007) A role of the Lowe syndrome protein OCRL in early steps of the endocytic pathway. *Dev Cell.* 13(3):377-90.
- Faucherre A, Desbois P, Satre V, Lunardi J, Dorseuil O, Gacon G.** (2003) Lowe syndrome protein OCRL1 interacts with Rac GTPase in the trans-Golgi network. *Hum Mol Genet.* 12(19):2449-56.
- Faucherre A, Desbois P, Nagano F, Satre V, Lunardi J, Gacon G, Dorseuil O.** (2005) Lowe syndrome protein Ocr1 is translocated to membrane ruffles upon Rac GTPase activation: a new perspective on Lowe syndrome pathophysiology. *Hum Mol Genet.* 14(11):1441-8.
- Falcone S, Cocucci E, Podini P, Kirchhausen T, Clementi E, Meldolesi J.** (2006) Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. *J Cell Sci.* 119(Pt 22):4758-69.
- Feig LA.** (1999) Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat Cell Biol.* 1(2):E25-7.
- Fisher CE, Howie SE.** (2006) The role of megalin (LRP-2/Gp330) during development. *Dev Biol.* 296(2):279-97. Review.
- Gaidarov I, Keen JH.** (1999) Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J Cell Biol.* 146(4):755-64.
- Geuze HJ, Slot JW, Schwartz AL.** (1987) Membranes of sorting organelles display lateral heterogeneity in receptor distribution. *J Cell Biol.* 104(6):1715-23.
- Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS.** (1979) Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature.* 279(5715):679-85.
- Gropman A, Levin S, Yao L, Lin T, Suchy S, Sabnis S, Hadley D, Nussbaum R.** (2000) Unusual renal features of Lowe syndrome in a mildly affected boy. *Am J Med Genet.* 95(5):461-6.
- Gruenberg J, Griffiths G, Howell KE.** (1989) Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J Cell Biol.* 108(4):1301-16.

- Haffner C, Di Paolo G, Rosenthal JA, de Camilli P.** (2000) Direct interaction of the 170 kDa isoform of synaptojanin 1 with clathrin and with the clathrin adaptor AP-2. *Curr Biol.* 10(8):471-4.
- Hall A.** (1994) Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol.* 10:31-54. Review.
- Harasaki K, Lubben NB, Harbour M, Taylor MJ, Robinson MS.** (2005) Sorting of major cargo glycoproteins into clathrin-coated vesicles. *Traffic.* 6(11):1014-26.
- Herbst JJ, Opresko LK, Walsh BJ, Lauffenburger DA, Wiley HS.** (1994) Regulation of postendocytic trafficking of the epidermal growth factor receptor through endosomal retention. *J Biol Chem.* 269(17):12865-73.
- Hille-Rehfeld A.** (1995) Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 1241(2):177-94. Review.
- Hinshaw JE, Schmid SL.** (1995) Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature.* 374(6518):190-2.
- Hodgson SV, Hckmat JZ, Hughes E, Crolla JA, Dubowitz V, Bobrow M.** (1986) A balanced de-novo X/autosome translocation in a girl with manifestation of Lowe syndrome. *Am J Med Genet* 23:837-847.
- Hoopes RR Jr, Raja KM, Koich A, Hueber P, Reid R, Knohl SJ, Scheinman SJ.** (2004) Evidence for genetic heterogeneity in Dent's disease. *Kidney Int.* 65: 1615-1620.
- Hoopes RR Jr, Shrimpton AE, Knohl SJ, Hueber P, Hoppe B, Matyus J, Simckes A, Tasic V, Toenshoff B, Suchy SF, Nussbaum RL, Scheinman SJ.** (2005) Dent Disease with mutations in OCRL1. *Am J Hum Genet.* 76(2):260-7.
- Hopkins CR.** (1983) The importance of the endosome in intracellular traffic. *Nature.* 304(5928):684-5.
- Hopkins CR, Miller K, Beardmore JM.** (1985) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and epidermal growth factor receptors: a comparison of constitutive and ligand-induced uptake. *J Cell Sci Suppl.* 3:173-86.
- Hyvola N, Diao A, McKenzie E, Skippen A, Cockcroft S, Lowe M.** (2006) Membrane targeting and activation of the Lowe syndrome protein OCRL1 by rab GTPases. *EMBO J.* 25(16):3750-61.
- Ieguchi K, Ueda S, Kataoka T, Satoh T.** (2007) Role of the guanine nucleotide exchange factor Ost in negative regulation of receptor endocytosis by the small GTPase Rac1. *J Biol Chem.* 2007 282(32):23296-305.
- Jänne PA, Suchy SF, Bernard D, MacDonald M, Crawley J, Grinberg A, Wynshaw-Boris A, Westphal H, Nussbaum RL.** (1998) Functional overlap between murine Inpp5b and Ocr11 may explain why deficiency of the murine ortholog for OCRL1 does not cause Lowe syndrome in mice. *J Clin Invest.* 101(10):2042-53.

Johnson JM, Castle J, Garrett-Engle P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD, Santos R, Schadt EE, Stoughton R, Shoemaker DD. (2003) Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science*. 302 (5653):2141-4.

Kantarci S, Al-Gazali L, Hill RS, Donnai D, Black GC, Bieth E, Chassaing N, Lacombe D, Devriendt K, Teebi A, Loscertales M, Robson C, Liu T, MacLaughlin DT, Noonan KM, Russell MK, Walsh CA, Donahoe PK, Pober BR. (2007) Mutations in LRP2, which encodes the multiligand receptor megalin, cause Donnai-Barrow and facio-oculo-acoustico-renal syndromes. *Nat Genet*. 39(8):957-9.

Kawano T, Indo Y, Nakazato H, Shimadzu M, Matsuda I. (1998) Oculocerebrorenal syndrome of Lowe: three mutations in the OCRL1 gene derived from three patients with different phenotypes. *Am J Med Genet*. 77(5):348-55.

Kenworthy L, Park T, Charnas LR. (1993) Cognitive and behavioural profile of the oculocerebrorenal syndrome of Lowe. *Am J Med Genet*. 46:297-303.

Kim S, Kim H, Chang B, Ahn N, Hwang S, Di Paolo G, Chang S. (2006) Regulation of transferrin recycling kinetics by PtdIns[4,5]P2 availability. *FASEB J*. 20(13):2399-401.

Kirchhausen T, Toyoda T. (1993) Immunoelectron microscopic evidence for the extended conformation of light chains in clathrin trimers. *J Biol Chem*. 268(14):10268-73.

Kirchhausen T. (1999) Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 15:705-32. Review.

Kornfeld S. (1992) Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem*. 61:307-30. Review.

Krauss M, Kinuta M, Wenk MR, De Camilli P, Takei K, Haucke V. (2003) ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Iγ. *J Cell Biol*. 162(1):113-24.

Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet*. 90: 41-54.

Kubota T, Sakurai A, Arakawa K, Shimazu M, Wakui K, Furihata K, Fukushima Y. (1998) Identification of two novel mutations in the OCRL1 gene in Japanese families with Lowe syndrome. *Clin Genet*. 54(3):199-202.

Lamaze C., Chuang T.H., Terlecky, L.J., Bokoch, G.M. and Schmid, S.L. (1996). Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature* 382, 177-179.

Lange Y, Steck TL. (1996) The role of intracellular cholesterol transport in cholesterol homeostasis. *Trends Cell Biol*. 6(6):205-8.

Leahey AM, Charnas LR, Nussbaum RL. (1993) Nonsense mutations in the OCRL-1 gene in patients with the oculocerebrorenal syndrome of Lowe. *Hum Mol Genet*. 4:461-463.

Le Borgne R, Hoflack B. (1998) Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* 1404(1-2):195-209. Review.

Legendre-Guillemain V, Wasiak S, Hussain NK, Angers A, McPherson PS. (2004) ENTH/ANTH proteins and clathrin-mediated membrane budding. *J Cell Sci.* 117(Pt 1):9-18. Review.

Leheste JR, Rolinski B, Vorum H, Hilpert J, Nykjaer A, Jacobsen C, Aucouturier P, Moskaug JO, Otto A, Christensen EI, Willnow TE. (1999) Megalin knockout mice as an animal model of low molecular weight proteinuria. *Am J Pathol.* 155(4):1361-70.

Lichter-Konecki U, Farber LW, Cronin JS, Suchy SF, Nussbaum RL. (2006) The effect of missense mutations in the RhoGAP-homology domain on ocr1 function. *Mol Genet Metab.* 89(1-2):121-8.

Lin T, Orrison BM, Leahey AM, Suchy SF, Bernard DJ, Lewis RA, Nussbaum RL. (1997) Spectrum of mutations in the OCRL1 gene in the oculocerebrorenal syndrome. *Am J Hum Genet.* 60:1384-1388.

Lin T, Orrison BM, Suchy SF, Lewis RA, Nussbaum RL. (1998) Mutations are not uniformly distributed throughout the OCRL1 gene in Lowe syndrome patients. *Mol Genet Metab.* 64(1):58-61.

Lin SX, Mallet WG, Huang AY, Maxfield FR. (2004) Endocytosed 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(2):721-33.

Lin DC, Quevedo C, Brewer NE, Bell A, Testa JR, Grimes ML, Miller FD, Kaplan DR. (2006) APPL1 associates with TrkA and GIPC1 and is required for nerve growth factor-mediated signal transduction. *Mol Cell Biol.* 26(23):8928-41.

Loi M. (2006) Lowe Syndrome Review. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 1:16 doi:10.1186/1750-1172-1-16

Loovers HM, Veenstra K, Snippe H, Pesesse X, Erneux C, van Haastert PJ. (2003) A diverse family of inositol 5-phosphatases playing a role in growth and development in *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem.* 278(8):5652-8.

Loovers HM, Kortholt A, de Groote H, Whitty L, Nussbaum RL, van Haastert PJ. (2007) Regulation of phagocytosis in *Dictyostelium* by the inositol 5-phosphatase OCRL homolog Dd5P4. *Traffic.* 8(5):618-28.

Lou X, McQuistan T, Orlando RA, Farquhar MG. (2002) GAIP, GIPC and Galphai3 are concentrated in endocytic compartments of proximal tubule cells: putative role in regulating megalin's function. *J Am Soc Nephrol.* 13(4):918-27.

Lowe CU, Terrey M, MacLachan EA. (1952) Organic aciduria, decreased renal ammonia production, hydrophthalmos and mental retardation. *Am J Dis Child.* 83:164-184.

- Lowe M.** (2005) Structure and function of the Lowe syndrome protein OCRL1. *Traffic*. (9):711-9. Review.
- Maddalena A, Spence JE, O'Brien WE, Nussbaum RL.** (1988) Characterization of point mutations in the same arginine codon in three unrelated patients with ornithine transcarbamylase deficiency. *J Clin Invest*. 82(4):1353-8.
- McCrea HJ, Paradise S, Tomasini L, Addis M, Melis MA, De Matteis MA, De Camilli P.** (2008) All known patient mutations in the ASH-RhoGAP domains of OCRL affect targeting and APPL1 binding. *Biochem Biophys Res Commun*. 369(2):493-9.
- McCrea HJ, De Camilli P.** (2008) Mutations in phosphoinositide metabolizing enzymes and human disease. *Physiology (Bethesda)*. 24:8-16. Review.
- McGraw TE, Maxfield FR.** (1990) Human transferrin receptor internalization is partially dependent upon an aromatic amino acid on the cytoplasmic domain. *Cell Regul*. 1(4):369-77.
- McPherson PS, Garcia EP, Slepnev VI, David C, Zhang X, Grabs D, Sossin WS, Bauerfeind R, Nemoto Y, De Camilli P.** (1996) A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature*. 379(6563):353-7.
- Miaczynska M, Christoforidis S, Giner A, Shevchenko A, Uttenweiler-Joseph S, Habermann B, Wilm M, Parton RG, Zerial M.** (2004) APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell*. 116(3):445-56.
- Monnier N, Satre V, Lerouge E, Berthoin F, Lunardi J.** (2000) *OCRL1* mutation analysis in French Lowe syndrome patients: implications for molecular diagnosis strategy and genetic counselling. *Hum*. 16:157-165.
- Mort M, Ivanov D, Cooper DN, Chuzhanova NA.** (2008) A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. *Hum Mutat*. 29(8):1037-47.
- Mueller OY, Hartsfield JK Jr, Gallardo LA, Essig Y-P, Miller KL, Papemhausen PR, Tedesco TA.** (1991) Lowe oculocerebrorenal syndrome in a female with a balanced X;20 translocation: Mapping of the X chromosome breakpoint. *Am J Hum Genet* 49:804-811.
- Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR.** (1997) Endocytosis. *Physiol Rev*. 77(3):759-803. Review.
- Naccache SN, Hasson T, Horowitz A.** (2006) Binding of internalized receptors to the PDZ domain of GIPC/synectin recruits myosin VI to endocytic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(34):12735-40.
- Nakatsu F, Ohno H.** (2003) Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. *Cell Struct Funct*. 28(5):419-29. Review.
- Niedergang F, Chavrier P.** (2005) Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. *Curr Top Microbiol Immunol*. 291:43-60. Review.
- Nobes CD, Hall A.** (1995) Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans*. 23(3):456-9. Review.

- Nobes CD, Hawkins P, Stephens L, Hall A.** (1995) Activation of the small GTP-binding proteins rho and rac by growth factor receptors. *J Cell Sci.* 108 (Pt 1):225-33.
- Norden AG, Lapsley M, Igarashi T, Kelleher CL, Lee PJ, Matsuyama T, Scheinman SJ, Shiraga H, Sundin DP, Thakker RV, Unwin RJ, Verroust P, Moestrup SK.** (2002) Urinary megalin deficiency implicates abnormal tubular endocytic function in Fanconi syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 13(1):125-33.
- Nussbaum RL, Orrison BM, Janne PA, Charnas L, Chinault AC.** (1997) Physical mapping and genomic structure of the Lowe syndrome gene *OCRL1*. *Hum Genet.* 99:145-150.
- Octave JN, Schneider YJ, Crichton RR, Trouet A.** (1983) Iron mobilization from cultured hepatocytes: effect of desferrioxamine B. *Biochem Pharmacol.* (22):3413-8.
- Olivos-Glander IM, Jänne PA, Nussbaum RL.** (1995) The oculocerebrorenal syndrome gene product is a 105-kD protein localized to the Golgi complex. *Am J Hum Genet.* 57(4):817-23.
- Omary MB, Trowbridge IS.** (1981) Biosynthesis of the human transferrin receptor in cultured cells. *J Biol Chem.* 256(24):12888-92.
- Ooms LM, Horan KA, Rahman P, Seaton G, Gurung R, Kethesparan DS, Mitchell CA.** (2009) The role of the inositol polyphosphate 5-phosphatases in cellular function and human disease. *Biochem J.* 419(1):29-49. Review.
- Owen DJ, Collins BM, Evans PR.** (2004) Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:153-91. Review.
- Padrón D, Wang YJ, Yamamoto M, Yin H, Roth MG.** (2003) Phosphatidylinositol phosphate 5-kinase Ibeta recruits AP-2 to the plasma membrane and regulates rates of constitutive endocytosis. *J Cell Biol.* 162(4):693-701.
- Peck J, Douglas G 4th, Wu CH, Burbelo PD.** (2002) Human RhoGAP domain-containing proteins: structure, function and evolutionary relationships. *FEBS Lett.* 528 (1-3):27-34. Review.
- Peters C, Schmidt B, Rommerskirch W, Rupp K, Zühlendorf M, Vingron M, Meyer HE, Pohlmann R, von Figura K.** (1990) Phylogenetic conservation of arylsulfatases. cDNA cloning and expression of human arylsulfatase B. *J Biol Chem.* 265(6):3374-81
- Pesesse X, Dewaste V, De Smedt F, Laffargue M, Giuriato S, Moreau C, Payrastre B, Erneux C.** (2001) The Src homology 2 domain containing inositol 5-phosphatase SHIP2 is recruited to the epidermal growth factor (EGF) receptor and dephosphorylates phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in EGF-stimulated COS-7 cells. *J Biol Chem.* 276(30):28348-55.
- Ponting CP.** (2006) A novel domain suggests a ciliary function for ASPM, a brain size determining gene. *Bioinformatics.* 22(9):1031-5.
- Richards W, Donnel GN, Wilson WA, Stowens D, Perry T.** (1965) The oculocerebrorenal syndrome of Lowe. *Am J Dis Child.* 109:185-203.

Ridley AJ. (2001) Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic*. 2(5):303-10. Review.

Riederer MA, Soldati T, Shapiro AD, Lin J, Pfeffer SR. (1994) Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network. *J Cell Biol*. 125(3):573-82.

Röschinger W, Muntau AC, Rudolph G, Roscher AA, Kammerer S. (2000) Carrier assessment in families with lowe oculocerebrorenal syndrome: novel mutations in the OCRL1 gene and correlation of direct DNA diagnosis with ocular examination. *Mol Genet Metab*. 69(3):213-22.

Rothman JE, Schmid SL. (1986) Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles. *Cell*. 46(1):5-9.

Rudolph G, Kalpadakis P, Röschinger W, Haritoglou C, Kammerer S, Boergen KP, Kampik A. (2004) Clinical and genetic results with reference to corneal alterations in Lowe-syndrome *Ophthalmologe*. 101(6):595-9.

Rusk N, Le PU, Mariggio S, Guay G, Lurisci C, Nabi IR, Corda D, Symons M. (2003) Synaptojanin 2 functions at an early step of clathrin-mediated endocytosis. *Curr Biol*. 13(8):659-63. Erratum in: *Curr Biol*. 13(19):1746.

Sabah JR, Schultz BD, Brown ZW, Nguyen AT, Reddan J, Takemoto LJ. (2007) Transcytotic passage of albumin through lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 48(3):1237-44.

Santy, L.C. and Casanova, J.E. (2001) Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D. *J. Cell Biol*. 154, 599-610.

Satre V, Monnier N, Berthoin F, Ayuso C, Joannard A, Jouk PS, Lopez-Pajares I, Megabarne A, Philippe HJ, Plauchu H, Torres ML, Lunardi J. (1999) Characterization of a germline mosaicism in families with Lowe syndrome, and identification of seven novel mutations in the OCRL1 gene. *Am J Hum Genet*. 65(1):68-76.

Schlessinger J. (2002) Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell*. 110(6):669-72. Review.

Schneider C, Sutherland R, Newman R, Greaves M. (1982) Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9. *J Biol Chem*. 257(14):8516-22.

Sekine T, Nozu K, Iyengar R, Fu XJ, Matsuo M, Tanaka R, Iijima K, Matsui E, Harita Y, Inatomi J, Igarashi T. (2007) OCRL1 mutations in patients with Dent disease phenotype in Japan. *Pediatr Nephrol*. 22(7):975-80.

Shin HW, Hayashi M, Christoforidis S, Lacas-Gervais S, Hoepfner S, Wenk MR, Modregger J, Uttenweiler-Joseph S, Wilm M, Nystuen A, Frankel WN, Solimena M, De Camilli P, Zerial M. (2005) An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *J Cell Biol*. 170(4):607-18.

- Shrimpton AE, Hoopes Jr RR, Knohl SJ, Hueber P, Reed AA, Christie PT, Igarashi T, Lee P, Lehman A, White C, Milford DV, Sanchez MR, Unwin R, Wrong OM, Thakker RV, Scheinman SJ.** (2009) OCRL1 Mutations in Dent 2 Patients Suggest a Mechanism for Phenotypic Variability. *Nephron Physiol.* 112(2):p27-p36.
- Sorkin A, Waters CM.** (1995) Endocytosis of growth factor receptors. *Bioessays.* 15(6):375-82.
- Sorkina T, Bild A, Tebar F, Sorkin A.** (1999) Clathrin, adaptors and eps15 in endosomes containing activated epidermal growth factor receptors. *J Cell Sci.* 112 (Pt 3): 317-27.
- Soutar AK, Naoumova RP.** (2007) Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 4(4):214-25.
- Suchy SF, Olivos-Glander IM, Nussbaum RL.** (1995) Lowe syndrome, a deficiency of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 5-phosphatase in the Golgi apparatus. *Hum Mol Genet.* 12:2245-50.
- Suchy SF, Nussbaum RL.** (2002) The deficiency of PIP2 5-phosphatase in Lowe syndrome affects actin polymerization. *Am J Hum Genet.* 71(6):1420-7.
- Tabas I.** (1995) The stimulation of the cholesterol esterification pathway by atherogenic lipoproteins in macrophages. *Curr Opin Lipidol.* 6(5):260-8. Review.
- Takei K, McPherson PS, Schmid SL, De Camilli P.** (1995) Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature.* 374(6518):186-90.
- Tikkanen R, Obermüller S, Denzer K, Pungitore R, Geuze HJ, von Figura K, Höning S.** (2000) The dileucine motif within the tail of MPR46 is required for sorting of the receptor in endosomes. *Traffic.* 1(8):631-40.
- Tripathi RC, Cibis GW, Tripathi BJ.** (1986) Pathogenesis of cataracts in patients with Lowe's syndrome. *Ophthalmology.* 93:1046-1051.
- Ullrich A, Schlessinger J.** (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* 61(2):203-12. Review
- Ungewickell AJ, Majerus PW.** (1999) Increased levels of plasma lysosomal enzymes in patients with Lowe syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(23):13342-4.
- Ungewickell A, Ward ME, Ungewickell E, Majerus PW.** (2004) The inositol polyphosphate 5-phosphatase Ocr1 associates with endosomes that are partially coated with clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(37):13501-6.
- Utsch B, Bökenkamp A, Benz MR, Besbas N, Dötsch J, Franke I, Fründ S, Gok F, Hoppe B, Karle S, Kuwertz-Bröking E, Laube G, Neb M, Nuutinen M, Ozaltin F, Rascher W, Ring T, Tasic V, van Wijk JA, Ludwig M.** (2006) Novel OCRL1 mutations in patients with the phenotype of Dent disease. *Am J Kidney Dis.* 48(6):942.e1-14.

- Varnai P, Thyagarajan B, Rohacs T, Balla T.** (2006) Rapidly inducible changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels influence multiple regulatory functions of the lipid in intact living cells. *J Cell Biol.* 175(3):377-82.
- Varsano T, Dong MQ, Niesman I, Gacula H, Lou X, Ma T, Testa JR, Yates JR 3rd, Farquhar MG.** (2006) GIPC is recruited by APPL to peripheral TrkA endosomes and regulates TrkA trafficking and signaling. *Mol Cell Biol.* 26(23):8942-52.
- Vilasi A, Cutillas PR, Maher AD, Zirah SF, Capasso G, Norden AW, Holmes E, Nicholson JK, Unwin RJ.** (2007) Combined proteomic and metabolomic studies in three genetic forms of the renal Fanconi syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol.* 293(2):F456-67.
- Walton DS, Katsavounidou G, Lowe CU.** (2005) Glaucoma with the oculocerebrorenal syndrome of Lowe. *J Glaucoma.* 14(3):181-5.
- Watt SA, Kular G, Fleming IN, Downes CP, Lucocq JM.** (2002) Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta1. *Biochem J.* 363(Pt 3):657-66.
- Wells A.** (1999) EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol.* 31(6):637-43. Review.
- Wenk MR, Lucast L, Di Paolo G, Romanelli AJ, Suchy SF, Nussbaum RL, Cline GW, Shulman GI, McMurray W, De Camilli P.** (2003) Phosphoinositide profiling in complex lipid mixtures using electrospray ionization mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 21(7):813-7.
- Williams C, Choudhury R, McKenzie E, Lowe M.** (2007) Targeting of the type II inositol polyphosphate 5-phosphatase INPP5B to the early secretory pathway. *J Cell Sci.* 120 (Pt 22):3941-51.
- Yamashiro DJ, Maxfield FR.** (1988) Regulation of endocytic processes by pH. *Trends Pharmacol Sci.* 9(6):190-3. Review.
- Yarden Y, Sliwkowski MX.** (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(2):127-37. Review.
- Zhang X, Jefferson AB, Auethavekiat V, Majerus PW.** (1995) The protein deficient in Lowe syndrome is a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 5-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(11):4853-6.
- Zhang X, Hartz PA, Philip E, Racusen LC, Majerus PW.** (1998) Cell lines from kidney proximal tubules of a patient with Lowe syndrome lack OCRL inositol polyphosphate 5-phosphatase and accumulate phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem.* 273(3):1574-82.
- Zoncu R, Perera RM, Sebastian R, Nakatsu F, Chen H, Balla T, Ayala G, Toomre D, De Camilli PV.** (2007) Loss of endocytic clathrin-coated pits upon acute depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(10):3793-8.

Vorträge mit Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Kongressen präsentiert:

Juliane Najm, Vanessa van Rahden, Jörg Heeren, Thomas Braulke und Kerstin Kutsche. (2008) Reduzierte Aufnahme von Arylsulfatase B durch den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor in Fibroblastenzellen von Patienten mit Lowe-Syndrom. Tagung der Norddeutschen Humangenetiker, November 2008, Lübeck.

Poster mit Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Kongressen präsentiert:

Juliane Ganswindt, Andreas Gal, Thomas Braulke und Kerstin Kutsche. (2007) Reduced endocytosis of mannose-6-phosphate receptors in fibroblasts of patients with Lowe syndrome. 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik vom 7.-10.3.2007, Bonn.

Vanessa van Rahden, Juliane Najm, Jörg Heeren, Thomas Braulke und Kerstin Kutsche. (2009) OCRL1-dependent alterations of receptor-mediated ligand internalization. 1. Gemeinsame Kongress der Deutschen und Schweizerischen Gesellschaften für Zellbiologie vom 24.-27.03.2009, Konstanz.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Kerstin Kutsche für die engagierte und qualifizierte Betreuung dieser Arbeit, für vielen konstruktive Ratschläge und weiterführende Diskussionen und besonders für die kritische Durchsicht des Manuskriptes bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Andreas Rodewald bedanke ich mich für das Interesse an dieser Arbeit und für die bereitwillige Übernahme der Zweitbetreuung. Darüber hinaus möchte ich mich für die schnelle und kompetente Begutachtung der Dissertation bedanken.

Herrn Prof. Dr. Andreas Gal danke ich für seine immer freundlichen Worte und seine hilfreiche Unterstützung, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Humangenetik und für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Ich danke dem Kuratorium der Werner Otto Stiftung für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Braulke und Herrn PD Dr. Jörg Heeren für die Einführung und Hilfestellung bei den Experimenten mit radioaktiven Substanzen.

Ein dickes Dankeschön geht an Inka Jantke, für die tatkräftige und hervorragende Unterstützung bei der Mutationsanalyse.

Bei Vanessa van Rahden möchte ich mich herzlich für ihre große Hilfe im letzten halben Jahr des praktischen Teils dieser Arbeit bedanken. Die Zusammenarbeit mit Dir hat mir unglaublich viel Spaß gemacht und vieles hätte ich alleine in der kurzen Zeit gar nicht geschafft. Vielen Dank dafür!!!

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Kutsche & Rosenberger möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft bedanken. Ganz besonders danke ich Fanny, der kleinen und der großen Steffi für viele lustige Mittagspausen.

Besonders danken möchte ich meinem Bruder Christoph, meiner Mutter und Detlef für ihre stete Unterstützung.

Das größte Dankeschön gilt meinem Ehemann, Osama Najm, der mir auch in den schwersten Stunden immer tröstend zur Seite gestanden hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Juliane Najm, geb. Ganswindt
geboren am 22.Juli 1979 in Berlin

Schulbildung

Sep. 1986 – Juni 1992	Grundschule
Sep. 1992 – Juni 1996	Gymnasium
Sep. 1996 – Juni 1997	Highschool (Schüleraustausch)
Sep. 1997 – Juni 2000	Gymnasium
Juni 2000	Abitur

Studium

Okt. 2000 – Juli 2002	Biologiestudium, Universität Potsdam
Juli 2002	Vordiplom
Okt. 2002 – Nov. 2005	Biologiestudium, Universität Hamburg Humanbiologie, Schwerpunkt Humangenetik Pharmazeutische Biologie Mikrobiologie
Feb. 2005 – Nov. 2005	Diplomarbeit am Institut für Humangenetik, UKE Hamburg: „Mutationsanalyse des <i>CASK</i> -Gens und funktionelle Analysen putativer Spleißmutationen in <i>CASK</i> bzw. <i>NRXN1</i> “ 1. Betreuer: Prof. Dr. Alexander Rodewald 2. Betreuerin: Prof. Dr. Kerstin Kutsche
Dez. 2005 – Juni 2009	Doktorarbeit am Institut für Humangenetik, UKE Hamburg: „Untersuchungen zum Einfluss des bei Patienten mit Lowe-Syndrom mutierten humanen OCRL-Proteins auf endozytotische Prozesse in eukaryotischen Zellen“ 1. Betreuerin: Prof. Dr. Kerstin Kutsche 2. Betreuer: Prof. Dr. Alexander Rodewald