

**Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II
-Molekulare Zellbiologie-
am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktorin Prof. Dr. Dr. hc. Ulrike Beisiegel**

**Das *phosphotyrosin interaction domain containing
protein 1* als Adapterprotein von LRP1**

Dissertation

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

vorgelegt von

**Åsa Katerina Weinås
aus Göteborg**

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 17.02.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. H. Schmale

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. H.-J. Kreienkamp

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. A. Niemeier

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	7
1.1 LRP1	7
1.1.1 LRP1 als Signalrezeptor	10
1.1.2 Der PDGF-Signalweg als Beispiel für die Funktion von LRP1 in der Signalübermittlung	11
1.2 Adapterproteine mit PTB-Domäne.....	13
1.2.1 Beteiligung von PTB-Adapterproteinen bei der Signalübertragung am Beispiel des Dab1-Proteins	16
1.2.2 Die Rolle von PTB-Adapterproteinen in der Pathogenese der autosomal-rezessiven Hypercholesterinämie und anderer Erkrankungen	18
1.2.3 PTB-Adapterproteine der LRP1-ICD.....	19
1.3 PID1	22
1.4 Ziele der Arbeit.....	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.2 Methoden.....	32
3 Ergebnisse	45
3.1 Vektorklonierung	45
3.2 Proteinherstellung und Bindungsassays	53
3.2.1 Proteinherstellung.....	53
3.2.2 Proteinbindungsexperimente.....	55
3.3 Gewebeverteilung von PID1	61
3.3.1 Isoformenspezifische semiquantitative PCR-Untersuchung.....	61
3.3.2 <i>Real-time</i> PCR-Untersuchung (TaqMan).....	65
4 Diskussion	68
4.1 Vektorklonierung	68
4.2 Proteinherstellung und Bindungsassays	70
4.2.1 Proteinherstellung.....	70
4.2.2 Bindungsexperimente.....	71
4.3 Gewebeverteilung von PID1	74
4.3.1 Isoformenspezifische semiquantitative PCR-Untersuchung.....	74
4.3.2 <i>Real-time</i> PCR-Untersuchung (TaqMan).....	75
4.4 PID1-Expression während der Adipozytendifferenzierung	78
4.5 PID1-Expression in humanem Fettgewebe bei Individuen mit unterschiedlichem BMI	80
Zusammenfassung	81
Literaturverzeichnis	82
Anhang	89
Danksagung.....	89
Eidesstattliche Versicherung.....	90

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
ApoE	Apolipoprotein E
ApoER	ApoE-Rezeptor
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
ARH	autosomal rezessive Hypercholesterinämie
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCM	<i>cavernous cerebral malformation protein</i>
cDNA	komplementäre DNA
CM	Chylomikron
CR	Chylomikronen-Remnant
Dab	<i>disabled protein</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FE65	<i>amyloid beta precursor protein-binding family B member 1</i>
GEO-Profiles	<i>Gene Expression Omnibus</i> : Datenbank für Genexpressionsmuster
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GULP	<i>engulfment adaptor PTB domain containing 1</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
hMSC-Tert AD	humane mesenchymale Stammzellen, durch stabile Telomerase-Expression immortalisiert, adipozytär differenziert
HuH7	humane Hepatomzellen
IBMX	Isobutylmethylxanthin
ICD	Intrazelluläre Domäne
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
JIP	<i>junk-interacting protein</i>
JNK	c-Jun N-terminale-Kinase
kDa	Kilodalton
LDL	<i>low density lipoprotein</i>

LDLR	LDL-Rezeptor
LpL	Lipoprotein-Lipase
LRP1	<i>LDL receptor-related protein 1</i>
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinase
ME	Mercaptoethanol
MEK	MAPK-ERK-Kinase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NPxY	Asparagin-Prolin-x-Tyrosin
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PDZ	<i>PSD-95/discs large/ZO-1 domain</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PID1	<i>phosphotyrosin interaction domain containing protein 1</i>
PKA	Proteinkinase A
PKC α	Proteinkinase C α
PM	Plasmamembran
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PSD95	<i>post-synaptic density protein 95</i>
PTB	Phosphotyrosinbindung
Ras	kleines G-Protein
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SAM	<i>sterile alpha motif</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH2	<i>Src homology 2 domain</i>
Shc	<i>Src homology 2 domain containing transforming protein 1</i>
SNX17	<i>sorting nexin 17</i>
SrcK	zelluläre Kinase-Familie (Onkogenprodukt des <i>rous sarcoma virus</i>)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tbp	<i>TATA bindingprotein</i>

tPA	<i>tissue-type plasminogen activator</i>
üN	über Nacht
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
VLDLR	VLDL-Rezeptor
3T3-L1	präadipozytäre Zelllinie

1 Einleitung

Das *low density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) ist ein Rezeptor, der im Menschen in fast jedem Gewebe exprimiert wird. Er übernimmt eine Vielzahl von Funktionen, zu denen die rezeptorvermittelte Endozytose unterschiedlichster Liganden gehört, er ist aber auch in der Signaltransduktion aktiv. Eine wichtige Rolle spielt LRP1 z.B. im postprandialen Lipidstoffwechsel und bei Signalvorgängen im Zentralnervensystem. Um diese unterschiedlichen Aufgaben erfüllen zu können, interagiert LRP1 mit seiner intrazellulären Domäne (ICD) mit einer Reihe von Adapter- oder Gerüstproteinen, die den Kontakt zum Endozytose- bzw. Signaltransduktionsapparat der Zelle herstellen. Eines dieser Adapterproteine ist das kürzlich entdeckte *phosphotyrosin interaction domain containing protein 1* (PID1), welches im Rahmen dieser Arbeit näher betrachtet werden soll.

1.1 LRP1

LRP1 ist ein Mitglied der *low density lipoprotein* (LDL)-Rezeptorfamilie, die eine Gruppe membranständiger Rezeptoren mit strukturellen Gemeinsamkeiten umfasst und deren Name auf den zuerst entdeckten LDL-Rezeptor (LDLR) zurückgeht. Zu dieser Familie gehören außer LRP1 und dem LDLR der Apolipoprotein E-Rezeptor 2 (ApoER2), der *very low density lipoprotein receptor* (VLDLR), LRP1b, Megalin und weitere. Der LDL-Rezeptor war als das Protein entdeckt worden, dessen Funktionsverlust das Krankheitsbild der familiären Hypercholesterinämie verursacht. Die Untersuchungen der zugrunde liegenden Vorgänge auf zellulärer Ebene führten außerdem zur Entdeckung des Mechanismus der rezeptorvermittelten Endozytose (Yamamoto et al. 1984, Brown und Goldstein 1986).

Wie sich im Weiteren herausstellte, übernehmen die einzelnen Mitglieder der LDLR-Familie sehr unterschiedliche Aufgaben im Organismus, die weit über die reine Vermittlung von Endozytose hinausgehen und zu denen auch die Regulation von Signaltransduktionsvorgängen zählt.

Alle Rezeptoren der LDLR-Familie verfügen über eine extrazelluläre Domäne unterschiedlicher Größe, sowie über eine Transmembrandomäne, welche die

extrazelluläre mit der intrazellulären Domäne (ICD) verbindet. Auch die Größe der ICD variiert, enthält jedoch bei allen Familienmitgliedern eines oder mehrere sog. NPxY-Motive, die als Kontaktstelle für intrazelluläre Adaptoren fungieren können (Hussain et al. 1999).

LRP1 ist nach dem gleichen Prinzip aufgebaut (s. Abb. 1), allerdings ist es, ebenso wie das verwandte Megalin, sehr viel größer als die restlichen Mitglieder der Familie und besteht aus insgesamt 4525 Aminosäuren (Herz et al. 1988). Es wird besonders hoch in Leber und Gehirn exprimiert.

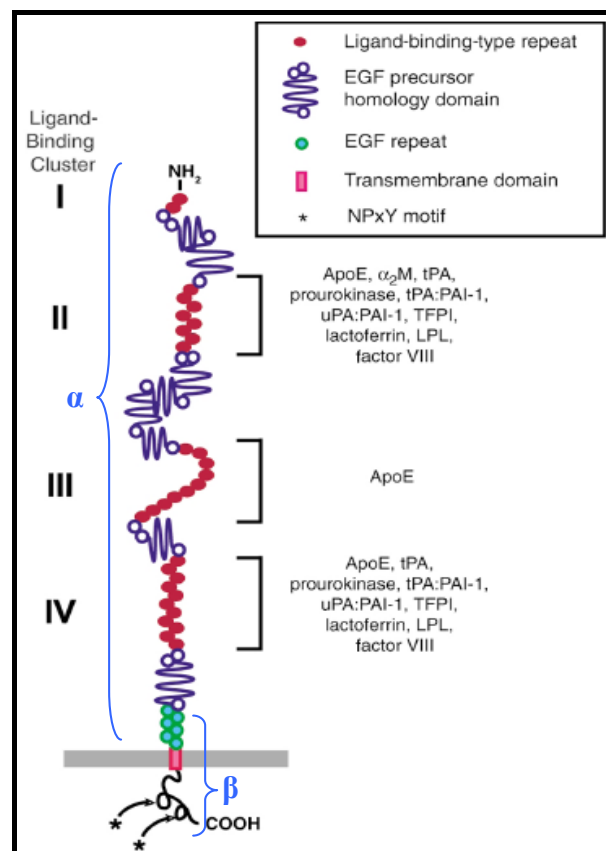


Abbildung 1: LRP1-Aufbau und -Liganden (modifiziert nach Herz und Strickland 2001)
 (*NPxY-Motiv: Asparagin-Prolin-x-Tyrosin, α : α -Kette, β : β -Kette)

Das gesamte LRP1-Protein ist etwa 600 kDa schwer und besteht aus der α -Kette (ca. 515 kDa), die komplett extrazellulär lokalisiert ist und vier Ligandenbindungsstellen enthält und aus der β -Kette (ca. 85 kDa), welche einen extrazellulären Anteil, weiterhin die Transmembrandomäne sowie die intrazelluläre Domäne (ICD) enthält und mit der α -Kette nichtkovalent verbunden ist. Die ICD ist bezogen auf die Gesamtgröße des Proteins sehr klein und besteht aus nur 100 Aminosäuren.

Nach dem gleichen Mechanismus wie die Proteine aus der Notch-Familie kann LRP1 proteolytisch prozessiert werden, was bedeutet, dass seine ICD von der Plasmamembran abgespalten werden kann (Quinn et al. 1999). Als Voraussetzung dafür muß zunächst die extrazelluläre Domäne mittels einer Metalloprotease dicht an der Transmembranregion abgeschnitten werden, anschließend kann die ICD durch eine γ -Sekretase-ähnliche Protease mitsamt der evtl. an sie gebundenen Adapterproteine von der Membrannenseite freigesetzt werden und z. B. in den Zellkern translozieren (May et al. 2002, Zurhove et al. 2008).

LRP1 bindet eine Vielzahl von Liganden - aktuell sind über 30 unterschiedliche bekannt - zu denen Partikel aus dem Lipoproteinstoffwechsel wie Apolipoprotein E (ApoE), Chylomikronenreste (sog. Remnants, CR) und die Lipoproteinlipase (LpL) gehören, weiterhin Protease/Protease-Inhibitorkomplexe, das *beta-amyloid precursor protein* (APP) und Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF (*platelet derived growth factor*), um eine Auswahl zu nennen (May et al. 2005).

Eine der am frühesten entdeckten Funktionen von LRP1 ist die schnelle, durch Apolipoprotein E vermittelte endozytotische Aufnahme von Chylomikronenremnants in die Leber und in andere Organe, wodurch LRP1 eine zentrale Rolle im postprandialen Lipoproteinstoffwechsel einnimmt (Beisiegel et al. 1989, Kowal et al. 1989). LRP1 erfüllt aber auch außerhalb des Lipidstoffwechsels wichtige Aufgaben, vor allem durch seine Rolle als Rezeptor der zellulären Signaltransduktion. So ist es beteiligt an Signaltransduktionsvorgängen während der embryonalen Entwicklung (Herz et al. 1992), bei der neuronalen Differenzierung und der Modulation neuronaler Signale (May und Herz 2003, Beffert et al. 2004, Qui et al. 2002), der Regulation von Zellmigration (Swertfeger et al. 2002, Zhu und Hui 2003), der Prozessierung anderer Proteine wie des APP (Uleroy et al. 2000) und es übernimmt eine Rolle bei Vorgängen, die eine Blutgefäßwandverdickung begünstigen bzw. verhindern können (Loukinova et al. 2002, Boucher et al. 2003).

Durch seine Einbindung in diese Vielzahl von physiologischen Vorgängen lässt sich allerdings auch seine mögliche Rolle bei der Entstehung verschiedener Erkrankungen erklären - anzuführen ist hier z.B. eine denkbare Beteiligung bei der Pathogenese der Demenz vom Alzheimer Typ und bei der Entstehung von Atherosklerose.

Im Weiteren sollen die bisher bekannten strukturellen Elemente und molekularen Mechanismen, die der Signaltransduktion durch LRP1 zugrunde liegen, erläutert und anhand einiger ausgewählter Beispiele veranschaulicht werden.

1.1.1 LRP1 als Signalrezeptor

Eine besondere Bedeutung bei der Signaltransduktion mittels LRP1 hat die intrazelluläre Domäne (ICD). Diese kann ihre Funktion auf zweierlei Weise ausüben:

Eine Möglichkeit ist die proteolytische Abspaltung und anschließende Translokation in den Zellkern oder andere Zellkompartimente. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Vorgang eine wichtige Rolle spielt bei der Regulation von Entzündungsreaktionen; die durch eine γ -Sekretase abgespaltene LRP1-ICD unterdrückt hierbei im Zellkern die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen (Zurhove et al. 2008).

Die andere Möglichkeit besteht darin, dass sich die LRP1-ICD verbunden mit dem Rezeptor in der Zellmembran an der Regulation und Koordination von Endozytose- und Signaltransduktionsvorgängen beteiligt.

Die LRP1-ICD enthält zwei NPxY-Motive, die den Kontakt zu weiteren intrazellulären Adapter- und Gerüstproteinen vermitteln.

NPxY steht für die Kombination der vier Aminosäuren Asparagin-Prolin-x-Tyrosin, wobei die Position „x“ von jeder beliebigen Aminosäure eingenommen werden kann. Im Fall von LRP1 steht an dieser Position im proximalen (der Plasmamembran näheren) NPxY-Motiv die Aminosäure Threonin (T), im distalen Motiv findet man dort Valin (V).

Eine genaue Zuordnung der NPxY-Motive zu bestimmten Funktionen bzw. Vorgängen innerhalb der Zelle lässt sich bisher nicht vornehmen, zunächst wurde vermutet, dass das distale Motiv eher für die Endozytosevermittlung vonnöten ist; dies aber konnte durch Versuche mit gentechnisch veränderten Mäusen nicht bestätigt werden. Mit größerer Sicherheit lässt sich allerdings dem proximalen Motiv eine Funktion innerhalb der Signaltransduktion während der embryonalen Entwicklung zuordnen, da Mutationen in diesem Motiv zu schweren Missbildungen der Leber führen, die bereits intrauterin bzw. perinatal letal sind (Roebroek et al. 2006).

Das Tyrosin der NPxY-Motive, aber auch Serin- und Threoninreste der LRP1-ICD können unter verschiedenen physiologischen Bedingungen phosphoryliert werden, was einen Einfluss auf die Affinität zu weiteren Adapterproteinen und damit auf die sich anschließende weitere Übermittlung von Signalen hat. Die exakten Mechanismen dieser Phosphorylierung sind aktuell noch nicht bis ins Detail erforscht; diskutiert werden Dimerisierung des Rezeptors und die Interaktion mit weiteren Proteinen wie Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C α (PKC α) (van der Geer 2002, Ranganathan et al. 2004).

1.1.2 Der PDGF-Signalweg als Beispiel für die Funktion von LRP1 in der Signalübermittlung

Bei dem Signal, das durch den Wachstumsfaktor PDGF (*platelet derived growth factor*) in glatte Muskelzellen der Blutgefäßwand vermittelt wird, interagiert LRP1 mit dem PDGF-Rezeptor und moduliert dessen Aktivität (s. Abb.2) (Boucher et al. 2002, Loukinova et al. 2002):

Eine Aktivierung des PDGF-Rezeptors führt zu einer Phosphorylierung der LRP1-ICD an deren distalem NPxY (bzw. NPVY)-Motiv mit Hilfe von Src-Kinasen. An dieses phosphorylierte NPVY-Motiv bindet das Adapterprotein Shc (*Src homology 2 domain containing transforming protein 1*), welches über eine Phosphotyrosin-bindende (PTB) Domäne verfügt und über diese an phosphoryliertes Tyrosin im Rahmen eines NPxY-Motivs binden kann (Barnes et al. 2001 und 2003). Shc vermittelt darauf folgend den Kontakt zu weiteren Proteinen aus dem Ras-Signalweg, welcher letztlich über die Aktivierung der MAP (mitogenaktivierte Proteinkinase)-Kinase in ein mitogenes Signal mündet und die Zelle zur Proliferation anregt (van der Geer und Pawson 1995, Pawson 1995).

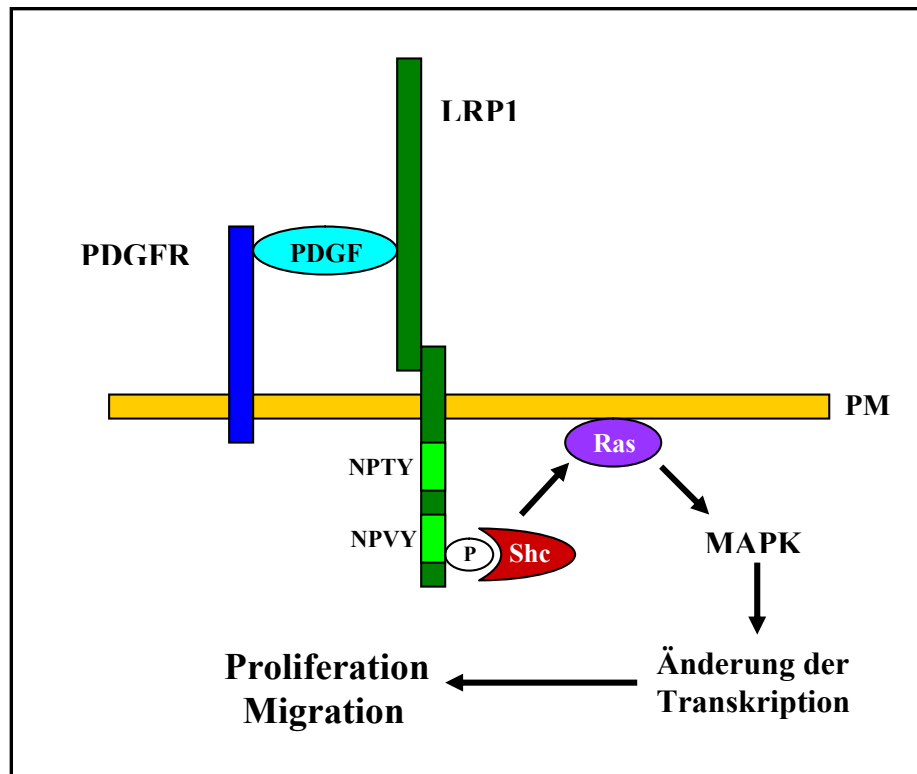


Abbildung 2: LRP1 in der Vermittlung des PDGF-Signals. PDGF-Bindung an den PDGF-Rezeptor führt zur Phosphorylierung von Tyrosin im distalen NPVY-Motiv der LRP1-ICD. Dort bindet anschließend Shc, welches über weitere Schritte das kleine G-Protein Ras aktiviert. Dieses wiederum aktiviert die MAP-Kinase, was über eine Kaskade weiterer Proteinkinasen eine Änderung der Genexpression und die Auslösung von Proliferation und Migration zur Folge hat. (PDGF: *platelet derived growth factor*, PM: Plasmamembran, MAPK: mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinase)

Ist dieser Signalweg ungebremst aktiv, kann die so erfolgende Verdickung der glatten Muskelzellen in Kombination mit anderen Faktoren wie cholesterinreicher Ernährung und Bluthochdruck die Entwicklung einer Atherosklerose begünstigen. Umgekehrt kann LRP1 jedoch der Atheroskleroseentstehung auch vorbeugen, indem es nach der Bindung von ApoE mit einem anderen intrazellulären Adapterprotein (Dab2) interagiert, worauf sich eine Signalkaskade anschließt, die das durch PDGF ausgelöste Proliferationssignal unterbindet (Boucher und Gotthardt 2004).

Dieses ist nur ein Beispiel für die unterschiedliche Art von Funktionen, die LRP1 bei biologischen Prozessen einnehmen kann.

Da die Beteiligung von LRP1 bei immer mehr Vorgängen nachgewiesen werden konnte, wurde verstärkt Forschung betrieben um zu verstehen, wie der gleiche Rezeptor diese zum Teil sehr unterschiedlichen Prozesse vermitteln kann.

Eine mögliche Erklärung dafür war recht bald gefunden: Es zeigte sich, dass die LRP1-ICD mit einer beträchtlichen Zahl an unterschiedlichen Adapterproteinen

interagieren kann, von denen vermutlich jedes für sich einen anderen Signalweg einleitet. Es wurden umfangreiche *yeast two-hybrid screens* durchgeführt, um möglichst viele der noch unbekanntenen intrazellulären Bindungspartner von LRP1 identifizieren zu können (Gotthardt et al 2000).

Zu den Proteinen, die an die LRP1-ICD mittels PTB-Domäne an die NPxY-Motive oder mit Hilfe anderer Proteininteraktionsdomänen an andere Bereiche der ICD binden können, zählen unter anderem FE65, Dab1, ARH, JIP1 und -2, GULP, SNX17, PSD95 sowie das bereits erwähnte Shc (Stolt und Bock 2006). Die Eigenschaften und Funktion einiger dieser Adapterproteine werden in einem späteren Kapitel vorgestellt.

Da die NPxY-Motive entscheidend sowohl für die Vermittlung des Endozytosesignals als auch für die Übertragung anderer Signale sind, sind die an diese andockenden Proteine mit PTB-Domäne von besonderem Interesse.

1.2 Adapterproteine mit PTB-Domäne

Adapterproteine sind relativ kleine Proteine, die nicht notwendigerweise über eigene katalytische Aktivität verfügen, aber sehr gut dafür ausgestattet sind, Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln. Um den Kontakt zu anderen Proteinen herstellen zu können, benötigen die Adapterproteine eine spezielle Bindungsdomäne, mit der sie an andere Proteine „andocken“: das können sog. PDZ (PSD-95/*discs large*/ZO-1)- oder SH2 (*Src homology 2*)-Domänen sein, aber auch PTB-Domänen. PTB steht hierbei für Phosphotyrosinbindung: Diese Art von Bindungsdomäne interagiert mit NPxY-Motiven, die sowohl in den intrazellulären Domänen aller Rezeptoren der LDLR-Familie enthalten sind, als auch bei einer Reihe anderer Transmembranproteine wie etwa den Tyrosinkinase-Rezeptoren (zu denen der Insulinrezeptor und andere Wachstumsfaktorrezeptoren gehören) oder bei den APP-Familienmitgliedern vorkommen (Chen et al. 1990, Bonifacino und Traub 2003, Uhlik et al. 2005). Die PTB-Adapterproteine stellen auf diese Weise den Kontakt der Transmembranrezeptoren zum Endozytoseapparat der Zelle her und regulieren den Transport von Partikeln im Zytosol, können aber auch als Bausteine für dynamische Multi-Protein-Signalkomplexe dienen (Stolt und Bock 2006).

Durch PTB-Proteine organisierte Signalkomplexe sind beteiligt an der Modulation vielfältiger physiologischer Prozesse wie etwa neuronale Entwicklung,

Immunantwort, Regulation des Gewebemilieus und Zellwachstum. Bis heute sind beim Menschen etwa 60 Proteine identifiziert, die PTB-Domänen enthalten, für sechs davon gilt als gesichert, dass sie eine entscheidende Rolle in der Pathogenese bestimmter erblicher Erkrankungen spielen.

PTB-Domänen sind nicht nur in der Lage, Peptide an einem NPxY-Motiv zu binden; inzwischen wurde für eine Reihe von PTB-Proteinen gezeigt, dass über diese Domänen auch Kopfgruppen von Phospholipiden gebunden werden können, wie sie z.B. an der Innenseite der Plasmamembran vorkommen (Stolt et al. 2003, Ravichandran et al. 1997, Mishra et al. 2002). 3-D-Strukturanalysen der PTB-Domänen der verbleibenden Proteine lassen vermuten, dass diese Fähigkeit eine Gemeinsamkeit aller PTB-Adapterproteine ist (Uhlik et al. 2005).

Interessanterweise stellte sich heraus, dass die PTB-Domänen einiger Adapterproteine auch an das unphosphorylierte Tyrosin im Rahmen des NPxY-Motivs binden. Mittlerweile ist bekannt, dass tatsächlich der überwiegende Teil der PTB-Proteine (nahezu 75 Prozent) unphosphoryliertes Tyrosin als Bindungsstelle bevorzugt, so dass die Bezeichnung „Phosphotyrosinbindungsdomäne“ etwas irreführend und eher im historischen Kontext zu betrachten ist.

Der prinzipielle Aufbau der PTB-Domäne ist bei allen PTB-Proteinen gleich, gebildet wird diese Domäne aus zwei annähernd orthogonalen β -Faltblättern, die ein β -Sandwich bilden, an dessen C-terminalem Ende sich eine lange α -Helix anschließt. Weiterhin enthalten die PTB-Domänen eine Peptidbindungsstelle zwischen Bereichen der β -Faltblätter und der α -Helix sowie eine Phospholipidbindungsstelle, die von Aminosäureresten des N-terminalen Proteinendes gebildet wird.

Anhand einiger struktureller Unterschiede und der Bevorzugung einer Bindung an phosphoryliertes versus unphosphoryliertes Tyrosin lassen sich die Proteine mit PTB in drei Gruppen einteilen: die sog. Shc-ähnlichen, IRS-ähnlichen und Dab-ähnlichen Proteine (s. Abb. 3).

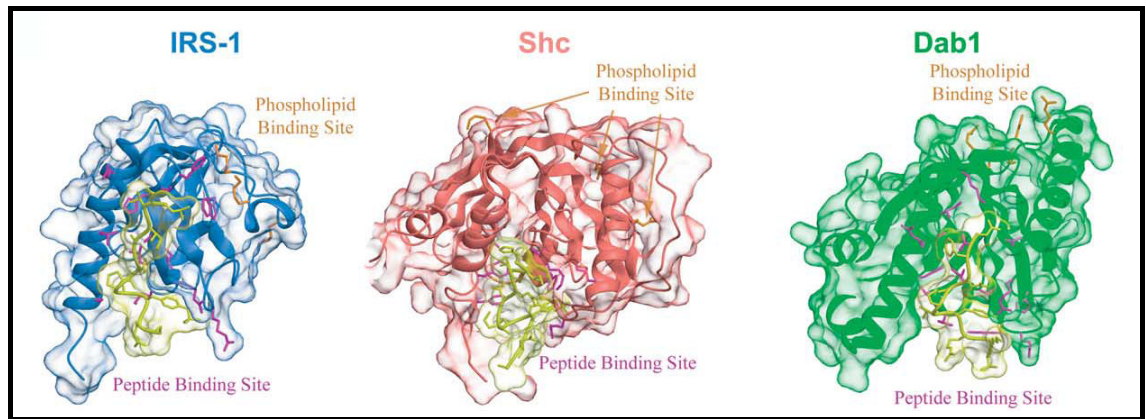


Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur der typischen Vertreter der drei Gruppen von PTB-Proteinen (nach Uhlik et al. 2005). Phospholipidbindungsstellen: orange hervorgehoben, Peptidbindungsstellen: violett markiert, gelb: gebundene Peptidliganden (IRS-1: IL-4-Rezeptor, Shc: TrkA-Rezeptor, Dab1: ApoER2)

Die ersten beiden Gruppen, Shc- und IRS-ähnliche, gleichen sich in Bezug auf ihre Phosphotyrosin-abhängige Bindung an das NPxY-Motiv, allerdings sind die IRS-ähnlichen PTB-Proteine insgesamt kleiner als die Shc-ähnlichen. Auch die Bindung an das phosphorylierte Tyrosin wird unterschiedlich koordiniert; bei den IRS-ähnlichen Proteinen erfolgt diese Bindung über zwei Argininreste der PTB-Domäne, bei den Shc-ähnlichen ist zusätzlich ein Lysinrest beteiligt.

Die Dab-ähnlichen PTB-Proteine hingegen gleichen hinsichtlich ihrer Größe und Struktur den Shc-ähnlichen, binden das Tyrosin im NPxY-Motiv aber im unphosphorylierten Zustand und stellen damit die größte Gruppe der PTB-Proteine. Die Bindung an dieses unphosphorylierte Tyrosin wird variabler koordiniert als bei den anderen beiden Gruppen und erfolgt über Kontakte zu unterschiedlichen Aminosäureresten der PTB-Domäne (Uhlik et al. 2005).

PTB-Proteine haben für gewöhnlich einen sehr einfachen Aufbau: Fasst man alle Gruppen zusammen, besteht etwa ein Drittel der Proteine nahezu ausschließlich aus der PTB-Domäne ohne Hinweis auf eine zusätzliche modulierende Untereinheit. Der größte Teil der verbleibenden PTB-Proteine besitzt ein weiteres Motiv für Protein-Protein-Interaktion und Domänen wie SH2 (*Src homology 2 domain*), PDZ oder SAM (*sterile alpha motif*), die ebenfalls Interaktionen vermitteln, ohne katalytisch aktiv zu sein.

Die Fähigkeit, Phospholipide zu binden, könnte dazu dienen, die räumliche Organisation der Adapterproteine für die Bildung von Signalkomplexen zu optimieren - so können die PTB-Proteine an die Phospholipide der

Plasmamembraninnenseite binden und sich auf diese Weise in räumlicher Nähe zu ihren Bindungsstellen an Transmembranrezeptoren aufhalten (Ravichandran et al. 1997, Takeuchi et al. 1998).

Die simple Architektur der PTB-Domänen enthaltenden Proteine und die Funktionen, die bisher bekannt sind, legen nahe, dass es sich hierbei um fast universell einsetzbare Adapter- und Gerüstproteine handelt, wobei die von ihnen organisierten Signalkomplexe und -kaskaden noch weitestgehend unerforscht sind.

Einige Vorgänge sind allerdings inzwischen bekannt, bei denen die Funktion, die PTB-Adapterproteine dabei erfüllen, recht genau aufgeklärt werden konnte. Zu diesen zählen die rezeptorvermittelte Endozytose von LDL-Partikeln durch den LDL-Rezeptor unter der Beteiligung des ARH-Adapterproteins, die Signalkaskade, die bei der Aktivierung bestimmter Wachstumsfaktorrezeptoren ausgelöst wird und in welcher das Shc-Adapterprotein die Verbindung zwischen aktiviertem Rezeptor und dem Ras-Signalweg darstellt, sowie die Beteiligung des Dab1-Proteins bei Signalvorgängen während der Hirnentwicklung.

1.2.1 Beteiligung von PTB-Adapterproteinen bei der Signalübertragung am Beispiel des Dab1-Proteins

Dab1 (*disabled-1*) wurde identifiziert als ein PTB-Protein, dessen Fehlen oder Funktionseinschränkung schwerwiegende Folgen hat. Es ist der Prototyp der Gruppe der Dab-ähnlichen PTB-Proteine und wird hauptsächlich im Nervensystem exprimiert. Dab1 bindet an NPxY-Motive aller Rezeptoren der LDLR-Familie und an das des APP. Fehlt funktionstüchtiges Dab1, so konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass schwere Hirnentwicklungsstörungen die Folge sind, gekennzeichnet durch Verlust der normalen Schichtung von Großhirnrinde und Hippokampus, sowie Kleinhirndysplasie (Rice et al. 1998, Howell et al. 1997). Die betroffenen Tiere leiden an gravierenden Koordinationsstörungen, wobei die daraus resultierende erschwerte Nahrungsaufnahme zum frühzeitigen Tod führt.

Dieses sind die gleichen Symptome, die auch bei der sog. „Reeler Maus“ zu beobachten sind: es handelt sich dabei um Tiere, bei denen das extrazelluläre Signalmolekül Reelin Mutationen aufweist oder aber um *knockout*-Mäuse, denen gleichzeitig der ApoE2-Rezeptor und der VLDL-Rezeptor fehlt (Lambert de Rouvroit und Goffinet 1998, Trommsdorff et al. 1999).

In weiteren Untersuchungen konnte anschließend gezeigt werden, dass die Komponenten Reelin, ApoER-2 bzw. VLDLR und Dab1 alle am gleichen Signalweg beteiligt sind:

Das extrazelluläre Signalmolekül Reelin bindet an einen der beiden Transmembranrezeptoren ApoER-2 oder VLDLR, was zur Dimerisierung des entsprechenden Rezeptors führt (s. Abb. 4). Daraufhin bindet Dab1 an das NPxY-Motiv der intrazellulären Rezeptordomäne, wird dann von Kinasen aus der Src-Familie phosphoryliert und kann anschließend mit weiteren Adapterproteinen interagieren. Eine Möglichkeit ist der dadurch vermittelte Kontakt zu einer PI-3 (Phosphatidylinositol-3)-Kinase-abhängigen Signalkaskade, durch die wiederum Mikrotubuli-assoziierte Proteine wie das Tau-Protein moduliert werden können, was letztlich Einfluß auf den axonalen Transport innerhalb von Neuronen hat und damit auf die neuronale Migration und Differenzierung (D'Arcangelo et al. 1999, Hiesberger et al. 1999, Howell et al. 2000, Bock und Herz 2003, Strasser et al. 2004).

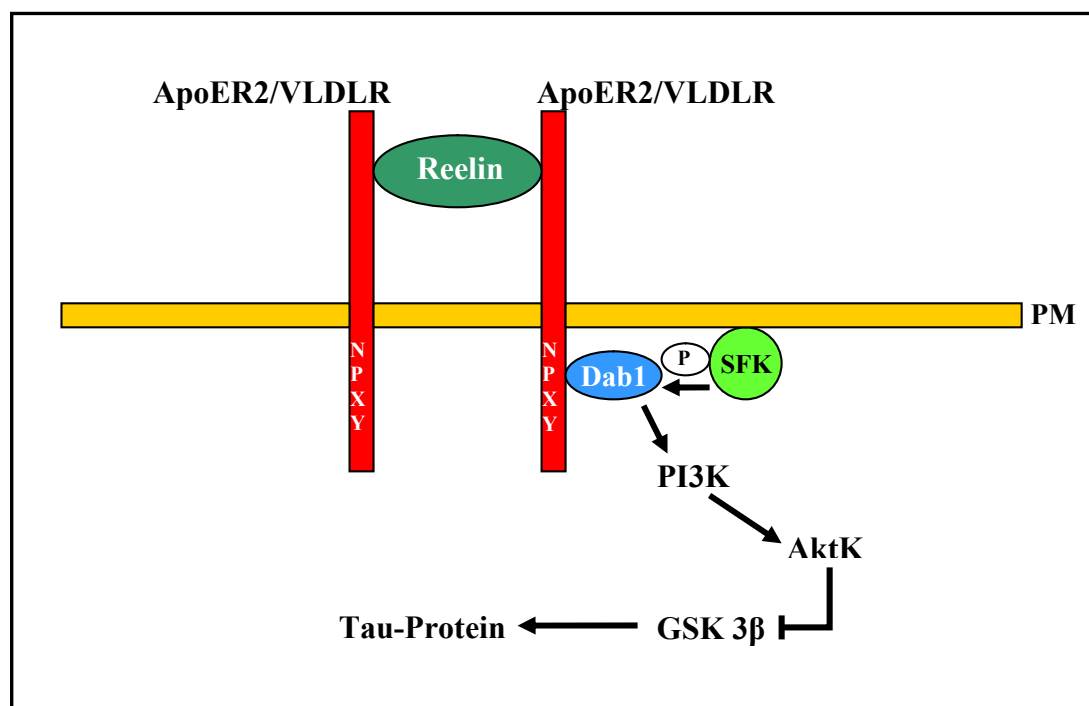


Abbildung 4: Die über ApoER2 und VLDL-Rezeptor vermittelte Reelin-Signalkaskade unter Beteiligung von Dab1. Bindung von Reelin führt zu Dimerisierung/Clustering von ApoER2 bzw. VLDLR. Dab1 interagiert mit dem NPxY-Motiv der intrazellulären Rezeptordomäne und wird von Kinasen der Src-Familie phosphoryliert, woraufhin es an PI3-Kinase bindet, die dadurch aktiviert wird. Die PI3-Kinase aktiviert daraufhin die Akt-Kinase, welche die Tau-Kinase GSK3β inhibiert. (PM: Plasmamembran, SFK: Kinase der Src-Familie, PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase, AktK: Akt-Kinase, GSK3β: Kinase des Tau-Proteins)

Es wurde inzwischen eine Vielzahl von weiteren Adapterproteinen identifiziert, die in der Lage sind, mit Dab1 zu interagieren, so dass dementsprechend auch eine große Vielfalt an durch Dab1-vermittelte Signalvorgängen denkbar ist.

Möglicherweise spielt dieser Signalübertragungsvorgang auch im erwachsenen Gehirn eine Rolle, zumal bekannt ist, dass der ApoER-2 und der VLDLR über die Modulation des Mechanismus der *long-term potentiation* eine Funktion bei Lernvorgängen und Gedächtnis einnehmen (Weeber et al 2002) und eine Beteiligung des Tau-Proteins bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert wird.

Auf die Bedeutung, die PTB-Adapterproteine durch ihren Funktionsverlust - z.B. infolge von Mutationen - bei der Entstehung von Erkrankungen des Menschen haben können, soll im folgenden Abschnitt eingegangen werden.

1.2.2 Die Rolle von PTB-Adapterproteinen in der Pathogenese der autosomal-rezessiven Hypercholesterinämie und anderer Erkrankungen

Bei der Untersuchung einer autosomal-rezessiven Form der Hypercholesterinämie hat sich gezeigt, dass der Erkrankung die Mutation eines Gens, welches für ein Protein mit PTB-Domäne kodiert, zu Grunde liegt (Garcia et al. 2001). Dieses Protein wurde der Erkrankung nach ARH genannt und gehört zur Gruppe der Dab1-ähnlichen PTB-Proteine. ARH bindet über seine PTB-Domäne an das NPxY-Motiv des LDL-Rezeptors und gleichzeitig mit einem anderen Bereich an die schwere Kette des Clathrins (s. Abb. 5). Clathrin gehört zur Gruppe der sog. "Coat-Proteine", die eine Formänderung der Plasmamembran möglich machen, was Voraussetzung für Endozytosevorgänge ist. Durch die Bindung an Clathrin stellt ARH den Kontakt zwischen dem LDL-Rezeptor und dem Endozytoseapparat der Zelle her, was in der Aufnahme des LDL in die Zelle mündet. Verliert ARH aufgrund einer Mutation entweder die Fähigkeit, an den LDL-Rezeptor zu binden oder an das Clathrin, findet keine Endozytose des LDL statt, welches dann im Blutplasma akkumuliert und einen Risikofaktor für Atherosklerose darstellt.

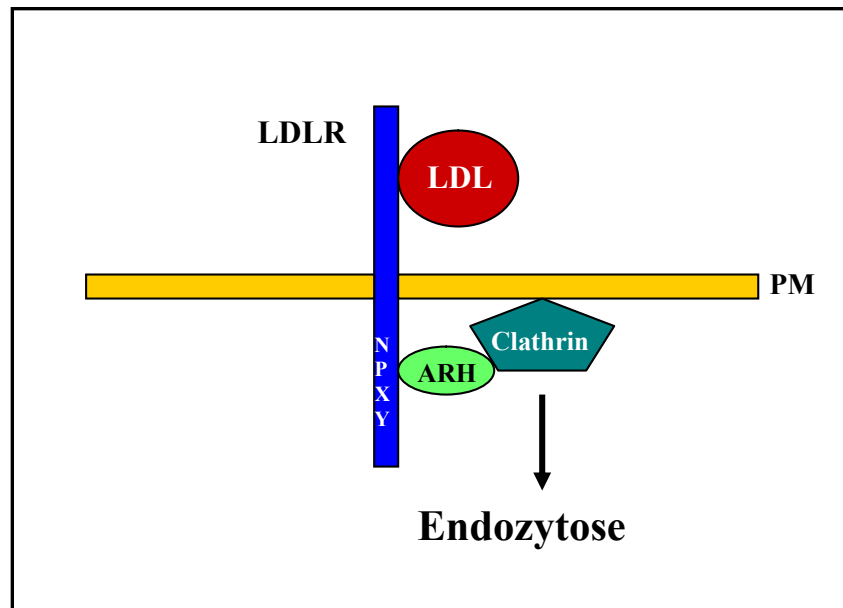


Abbildung 5: ARH vermittelt den Kontakt zum Endozytoseapparat der Zelle. Bindung von LDL an den LDL-Rezeptor setzt den Mechanismus der rezeptorvermittelten Endozytose in Gang. ARH interagiert mit dem NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne des LDLR und stellt dann über eine Bindung an Clathrin den Kontakt zum Endozytoseapparat her, was die Aufnahme des LDLR mit dem an ihn gebundenen LDL in die Zelle zur Folge hat. (LDL: *low density lipoprotein*, PM: Plasmamembran, ARH: autosomal rezessive Hypercholesterinämie Protein)

Weitere PTB-Adapterproteine, für die eine Beteiligung an der Pathogenese verschiedener erblicher Erkrankungen bekannt ist, auch wenn die genauen Mechanismen bis jetzt noch nicht geklärt sind, sind FE65 (*amyloid beta precursor protein-binding family B member1*) bei der Entstehung des Morbus Alzheimer (Hu et al. 2002), IRS-1 (Insulinrezeptorsubstrat1) bei der Entwicklung von Koronarer Herzkrankheit und Diabetes mellitus Typ II (Baroni et al. 1999, Porzio et al. 1999), IRS-2 und JIP-1 (*JNK-interacting protein1*) ebenfalls bei der Entwicklung von Diabetes mellitus Typ II (Mammarella et al. 2000, Waeber et al. 2000) sowie CCM2, das bei der Entstehung von cavernösen cerebralen Malformationen beteiligt ist, die sich im Krankheitsbild des familiären Schlaganfalls manifestieren (Liquori et al. 2003).

1.2.3 PTB-Adapterproteine der LRP1-ICD

Die aktuell bekannten Adapterproteine, die über eine PTB-Domäne an eines der oder beide NPxY-Motive der LRP1-ICD binden, sind FE65, Dab1 und -2, ARH, Shc, GULP (*engulfment adaptor PTB domain containing1*), PSD95, sowie JIP1 und -2, wobei es über die genauen Mechanismen der Signalkomplexbildung und die Art der dadurch vermittelten Signalwege bis jetzt nur wenige Erkenntnisse gibt.

FE65 ist ein Adapterprotein, welches über zwei PTB-Domänen verfügt. Über eine dieser PTB-Domänen bindet es an die LRP1-ICD, mit der anderen ist es in der Lage, an weitere NPxY-Motive wie z.B. an das des intrazellulären Anteils des *beta-amyloid precursor proteins* (APP) zu binden, so dass auf diese Weise ein Komplex bestehend aus LRP1, FE65 und APP hergestellt wird (Trommsdorf et al. 1998, Zambrano et al. 1997, Pietrzik et al. 2004). APP ist ein Transmembranprotein, für das angenommen wird, dass es eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der Alzheimerdemenz einnimmt, unter anderem deshalb, weil aus diesem Protein durch proteolytische Prozessierung das Amyloidpeptid β (A β) entsteht. Eines der morphologischen Korrelate der Alzheimerdemenz ist die Bildung von extrazellulären Plaques im Hirngewebe, welche aus aggregiertem A β bestehen (Xia 2003). LRP1 beeinflusst durch seine über den Adapter FE65 vermittelte Interaktion mit APP dessen proteolytische Prozessierung zu A β (Pietrzik et al. 2002); ob und welcher Weise dieser Umstand in der Pathogenese von Morbus Alzheimer eine Rolle spielt, ist bis heute nicht bekannt.

Über Dab1 und ARH ist im Zusammenhang mit LRP1 bekannt, dass beide Proteine jeweils an das distale NPxY-Motiv der LRP-ICD binden (Herz und Strickland 2001, Stolt und Bock 2006). Sichere Erkenntnisse zur jeweiligen Funktion gibt es noch nicht, es weist aber einiges darauf hin, dass ARH hier eine andere Aufgabe übernimmt als die in Verbindung mit dem LDLR bekannte Endozytosevermittlung (Jones et al. 2003).

Dab2 ist involviert bei der Übermittlung des Signals, welches durch Bindung von ApoE an LRP1 ausgelöst wird. Die Bindung von Dab2 an die LRP1-ICD hemmt in diesem Fall die durch PDGF ausgelöste Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen in der Blutgefäßwand, wodurch sich ein schützender Effekt vor Atherosklerose ergibt. Der zu Grunde liegende Mechanismus ist der durch Dab2 vermittelte Kontakt zum Endozytoseapparat der Zelle, infolge dessen der Komplex aus aktiviertem PDGF-Rezeptor, LRP1 und das an dieses gebundene ApoE endozytiert und damit die PDGF-Signalkaskade unterbrochen wird (Swertfeger et al. 2002, Boucher und Gotthardt 2004).

Dab2 wird außerdem beschrieben als Produkt eines Tumorsuppressorgens (Oleinikov et al. 2000, Morris et al. 2001).

Die Interaktion des Adapterproteins Shc mit LRP1 wurde oben im Zusammenhang mit dem PDGF-Signalweg erläutert. Shc hat darüber hinaus über seine Verbindung zum Ras-Signalweg eine generelle Bedeutung in Prozessen der Zellteilung und -differenzierung sowie der Regulation des Immunsystems (Olson und Marais 2000), so dass auch seine Beteiligung bei der Entstehung maligner Entartungen denkbar ist.

LRP1 erfüllt unter anderem auch eine Funktion bei der Phagozytose von apoptotischen Zellen und Zellresten, die durch Makrophagen erfolgt. Dieser Vorgang der LRP1-abhängigen Phagozytose wird durch das PTB-Adapterprotein GULP vermittelt und wurde sowohl bei Entzündungsreaktionen in der Lunge beobachtet, als auch in anderen Geweben wie etwa der Blutgefäßwand. In letzterem werden über den beschriebenen Mechanismus zusätzlich aggregierte LDL-Partikel phagozytiert, was wiederum einen interessanten Aspekt in der Pathogenese von Atherosklerose darstellt (Llorente-Cortés et al. 2000, Su et al. 2002, Patel et al. 2003). Darüber hinaus scheint GULP eine Funktion bei der Regulation von intrazellulärem Lipidtransport und Cholesterinhomöostase einzunehmen (Kiss et al. 2006).

GULP bindet Phosphotyrosin-unabhängig an das distale NPxY-Motiv (Ranganathan et al. 2004, Su et al. 2002).

Neuere Untersuchungen haben Einblick in die Rolle geben können, die das Adapterprotein PSD95 beim Zusammenwirken von LRP1 mit N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren in Neuronen einnimmt. PSD95 bindet hierbei an das distale NPxY-Motiv der durch Bindung von tPA (*tissue-type plasminogen activator*) aktivierten LRP1-ICD und vermittelt daraufhin den Kontakt zum NMDA-Rezeptor. Diese Komplexbildung führt zum Einstrom von Calcium-Ionen durch den NMDA-Rezeptor, worauf sich über weitere Schritte die Aktivierung des MAPK-Signalwegs anschließt (Martin et al. 2008).

JIP1 und -2 sind PTB-Adapterproteine, die Kontakt zu Komponenten des JNK (c-Jun N-terminale-kinase)-Signalwegs herstellen. Die Proteine des JNK-Signalwegs gehören zu einer Gruppe von MAP-Kinasen, die aktiviert werden, wenn Zellen mit inflammatorischen Cytokinen in Kontakt kommen oder Umweltstress (wie

z.B. Sauerstoffmangel) ausgesetzt sind. Die JNK-Gruppe der MAP-Kinasen ist beteiligt an Proliferations- und Differenzierungsvorgängen sowie an der Apoptose (Yasuda et al. 1999, Lutz et al. 2002). JIP1/2 können an das Motorprotein Kinesin assoziiert vorliegen und wären somit in der Lage, eine Rolle beim mikrotubulären Transport des an sie gebundenen LRP1 zu übernehmen (Verhey et al. 2001).

1.3 PID1

Das *phosphotyrosin interaction domain containing protein 1* (PID1) ist ein kürzlich identifiziertes Protein, welches eine PTB-Domäne enthält und über diese mit der LRP1-ICD interagieren kann.

Zunächst wurde es unabhängig von seiner Eigenschaft als Interaktionspartner von LRP1 als ein intrazelluläres Protein beschrieben, welches im Fettgewebe von übergewichtigen Personen in höherem Maße vorkommt als bei normalgewichtigen. Es wird vom PID1-Gen auf dem humanen Chromosom Nr.2 (2q 36.3) kodiert (Genbank Accession Nr. AY317148), besteht aus 250 Aminosäuren mit einem Gewicht von ca. 28 kDa und verfügt über eine PTB-Domäne. Untersuchungen zur Gewebeverteilung dieses Proteins zeigten dessen Expression, neben der im Fettgewebe beobachteten, vor allem im Herzgewebe und in der Skelettmuskulatur, aber kaum in anderen Geweben. Nach Überexpression von PID1 in murinen 3T3-L1 Adipozyten wurde ein verstärkender Effekt dieses Proteins auf die Proliferation beobachtet, die genauen Funktionen des Proteins in vivo sind aber bis jetzt noch unklar. Vermutet wird eine mögliche Beteiligung bei der Entwicklung von Adipositas (Wang et al. 2006).

Kurz darauf wurde im Rahmen eines Screeningprojekts zur Identifikation von Bindungspartnern von PTB-Adapterproteinen (vom Shc- und Dab-ähnlichen Typ) ein bisher unbekanntes an LRP1 bindendes PTB-Protein entdeckt. Auch dieses Protein wird aus 250 Aminosäuren gebildet und besteht hauptsächlich aus der PTB-Domäne, wobei allerdings nicht geklärt ist, zu welcher Gruppe der PTB-Proteine es gehört (Caratù et al. 2007).

Datenbankrecherche ergab, dass es sich hier um ein und dasselbe Protein (PID1) handelt, welches allerdings in drei verschiedenen Isoformen vorkommt. Das für PID1 kodierende Gen enthält drei Exons, wobei sich die drei Isoformen des Proteins jeweils durch ihr erstes Exon unterscheiden (s. Abb. 6). Die in dieser

Arbeit benutzten Namen für die Isoformen entstehen durch die Verwendung des Einbuchstabencodes der jeweils ersten (N-terminalen) vier Aminosäuren des Proteins: *mfsl*-, *mpri*- und *mwqp*-Isoform des PID1-Proteins.

Hierbei besteht die *mfsl*-Isoform aus 250 Aminosäuren (AS), die von 750 Basenpaaren (bp) des Gens kodiert werden, die beiden anderen Isoformen sind etwas kleiner: die *mpri*-Isoform besteht aus 248 AS, für die 744 bp des Gens kodieren und die *mwqp*-Isoform wird aus 217 AS gebildet, die von 651 bp kodiert werden.

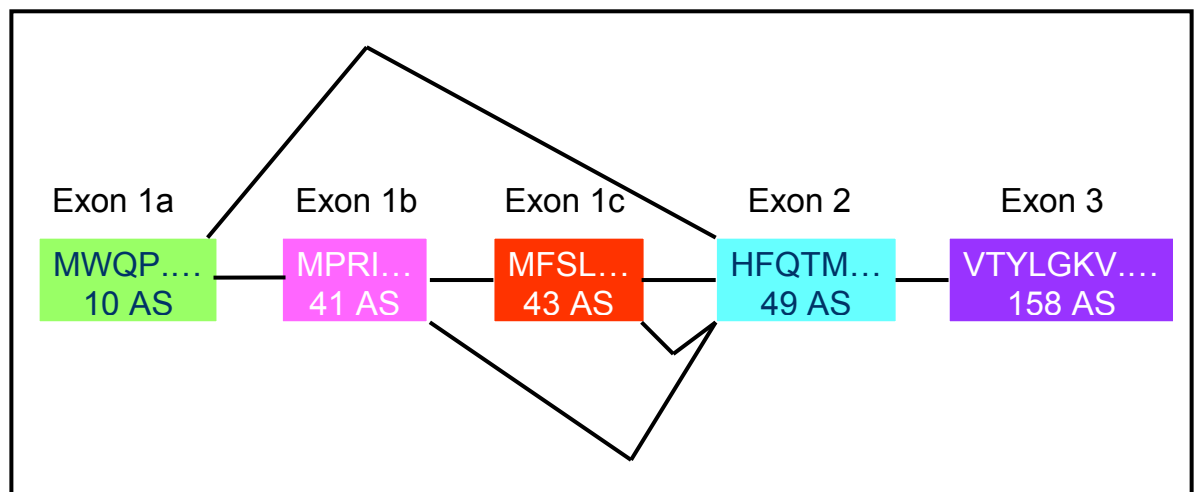


Abbildung 6: Schema der 3 PID1-Isoformen (Bezeichnung nach den jeweils N-terminalen AS-Sequenzen) *mwqp*: Exon 1a+2+3 (651 bp), *mpri*: Exon 1b+2+3 (744 bp), *mfsl*: Exon 1c+2+3 (750 bp)

Die beschriebenen Beobachtungen zur Bindung von PID1 an LRP1 sowie die höhere Expression im Fettgewebe übergewichtiger Individuen gehen auf Untersuchungen zurück, bei denen die *mfsl*-Isoform verwendet wurde. Die Untersuchungen zur Gewebeverteilung von PID1 sind laut Literatur mit einer Sonde durchgeführt worden, die zur Bindung an alle drei Isoformen befähigt sein müsste. Die biologische Bedeutung der Isoformen, ihre Gewebeverteilung und Bindungseigenschaften sind bisher nicht bekannt.

Aus den publizierten Daten ergibt sich die Frage, ob die beobachteten Veränderungen des Gehalts an PID1-mRNA bei Adipositas und der Effekt auf die Proliferation von Adipozyten über LRP1 vermittelt werden, welches unabhängig davon als Bindungspartner beschrieben wurde. Da LRP1 ubiquitär exprimiert wird, in besonders hohem Maß aber in der Leber, wäre eine Überprüfung der in

der Literatur beschriebenen PID1-Gewebeverteilung interessant, vor allem im Hinblick auf die sich daraus ergebenden möglichen LRP1/PID1-Interaktionen.

1.4 Ziele der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll ein Vektor, der die bakterielle Herstellung von Fusionsprotein erlaubt, für die drei bekannten Isoformen des PID1-Adapterproteins durch molekulare Klonierung hergestellt werden. Die auf diese Weise gewonnenen Fusionsproteine sollen anschließend für funktionelle Bindungsstudien mit der LRP1-ICD verwendet werden, um genauere Informationen über das Bindungsverhalten des PID1 gewinnen zu können. Zusätzlich soll damit die Voraussetzung für weitergehende Untersuchungen zur Detektion anderer potentieller Bindungspartner von PID1 und zu dessen möglicher Funktion im Organismus geschaffen werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Gewebeverteilung der drei Isoformen von PID1. Da PID1 als Bindungspartner des ubiquitär exprimierten LRP1 charakterisiert wurde, lässt sich erwarten, dass dieses Protein auch in anderen Geweben als in Fett-, Herz- und Skelettmuskelgewebe exprimiert wird. Die gewonnenen Erkenntnisse zum Gewebeverteilungsmuster von PID1 können dann dazu beitragen, Rückschlüsse auf dessen mögliche Funktion zu ziehen. Die Analyse der Proteinexpression in verschiedenen humanen Geweben soll mittels semiquantitativer und *real-time* PCR erfolgen.

Nach Möglichkeit soll außerdem versucht werden, die höhere Expression von PID1 im Fettgewebe adipöser im Vergleich zu normalgewichtigen Menschen nachzuvollziehen.

Zusätzlich soll das Expressionsmuster von PID1 während der Differenzierung von Adipozyten untersucht werden, da ein proliferationsfördernder Effekt des Proteins auf Adipozyten beschrieben worden ist. Diese Untersuchung soll an hMSC-Tert AD-Zellen (humane mesenchymale Stammzellen, durch stabile Telomerase-Expression immortalisiert, adipozytär differenziert) durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

Dieses Kapitel enthält eine Übersicht über die im Rahmen der Arbeit verwendeten Materialien und die zum Einsatz gekommenen Techniken.

2.1 Material

Antikörper

Anti LRP1 (85 kDa) “Dolly” (als 1.AK Verdünnung 1:1000 in 5% BSA in TBS-Tween), freundlich zur Verfügung gestellt von PD Dr. J. Heeren, Hamburg (Heeren et al. 2001)

AffiniPure Donkey anti-sheep Peroxidase-gekoppelt, Jackson ImmunoResearch (als 2.AK Verdünnung 1:10 000 in Blockpuffer)

Bakterien und Plasmide

E. coli DH5 α , Invitrogen

E. coli OneShot TOP10 Competent Cells, Invitrogen

E. coli BL21-Codon Plus-RP, Stratagene

pGex-KG, freundlich zur Verfügung gestellt von Dr. A. Laatsch, Hamburg

Enzyme

EcoRI, New England Biolabs

HindIII, New England Biolabs

T4-Ligase, New England Biolabs

Kits

AccuPrimeTaq DNA Polymerase High Fidelity PCR Kit, Invitrogen

NucleoSpin Plasmid, Macherey-Nagel

NucleoSpin Extrakt, Macherey-Nagel

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems

TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen

Taq PCR Master Mix Kit, Qiagen

Primer

Primer für Standard-PCR:

fett: verwendete Schnittstelle im 5'-Überhang für EcoRI bzw. HindIII

huPID1-1for (*mfs1*): 5'-GTG **GAA TTC** TAA TGT TCA GCC TGC CCC TTA G-3'(EcoRI)

huPID1-3for (*mwqp*): 5'-GTA **GAA TTC** TAA TGT GGC AGC CGG CCA CGG-3'(EcoRI)

huPID1-4for (*mpri*): 5'-GTG **GAA TTC** TAA TGC CAA GGA TTG CTG GCA AC-3'(EcoRI)

huPID1-2rev: 5'-GTG **AAG CTT** CAG CCA TCA TCG GAT TCC AAT TC-3' (HindIII)

huHGPRT-1for: 5'-CGT CGT GAT TAG TGA TG-3'

huHGPRT-2rev: 5'-TCC TTT TCA CCA GCA AGC TTG C-3'

(alle Primer von MWG)

TaqMan-Sonden:

huPID1_AoD (Assay ID: Hs00952182_m1); Context Sequence:

TCA CAG TGG CTG CAA GGT TAC CTA C

hTbp_AoD (Assay ID: Hs00270322_m1); Context Sequence:

CAG GTA ACA CAG GAA GGT GAA GAT G

(beide von Applied Biosystems)

RNA und cDNA

Human total RNA Master Panel II (humanes Gewebeprobenset), Clontech

Fettgewebeproben (human), freundlich zur Verfügung gestellt von Dr. A. M. Wolf, Ulm. Die Proben stammen von Patienten, die im Rahmen der von der Ethikkommission an der Universität Ulm am 8.7. 2003 (Nr. 112/2003) befürworteten Studie behandelt wurden. Die Patienten haben sich 2003-2008 in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Ulm auf Grund einer Erkrankung unterschiedlicher Genese einer Laparotomie unterzogen. Im Rahmen der OP wurde das Fettgewebe entnommen (nach entsprechender Aufklärung und Zustimmung).

Zelllinien

HuH7 (Humane Hepatomzellen; Pugh et al. 1988), freundlich zur Verfügung gestellt von S. Meisner, Hamburg

hMSC-TERT AD (Adipozytär differenzierte humane mesenchymale Stammzellen; Prawitt et al. 2008), freundlich zur Verfügung gestellt von D. Lasrich, Hamburg

Lösungen und Medien

Beadglycerinpuffer

20 mM Tris Cl (pH 7.4)

50% Glycerol

Blotting-Puffer

12.1 g Tris

56.2 g Glycin

1 L..... Methanol

Aqua dest. ad 5 L

Blockpuffer

TBS-Tween+5% Milchpulver

Coomassie-Lösung

45% H₂O

45% Ethanol

10% Essigsäure

0.252% Coomassie blue R-250

Entfärber (Coomassie)

1250 ml Ethanol

3250 ml Aqua dest.

500 ml Eisessig

Laemmlipuffer

50 mM Tris Cl (pH 6.8)

100 mM DTT

2% SDS

0.01% Bromphenolblau

10% Glycerol

Luria Broth-Medium (LB) (+Ampicillin)

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g Natriumchlorid

Aqua dest. ad 1 L, pH 7.5 mit Natronlauge

ggf. Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin

Luria Broth-Agar (LB) +Ampicillin

20 Tbl. Sigma LB-Agar auf 1L Aqua dest.

Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin

Phosphate buffered Saline (PBS)

40 g Natriumchlorid

1.0 g Kaliumchlorid

1.0 g Kaliumdihydrogenphosphat

5.75 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat

Aqua dest. ad 1 L, pH 7.4

SOC-Medium, Invitrogen

Terrific Broth-Medium (TB)

12 g Trypton

24 g Hefeextrakt

4ml Glycerin

Aqua dest. ad 1 L, direkt vor Gebrauch Zugabe von 0.1 Volumen 1M KHPO₄-Lösung (pH 7.5)

TBS

2 M NaCl

0.2 M Tris-Base

pH 7.6

TBS+Tween

TBS+0.1% Tween

TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE), 5x

54 g Tris

27.5 g Borsäure

20 mL..... 0.5 M Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)

pH 8.0 mit Essigsäure

Aqua dest. ad 1 L

YT-Medium, 2x

16g.....Tryptone

10g.....Yeast Extract

5g.....NaCl

Aqua dest. ad 1 L, pH 7.0

Zell-Lysis-Puffer (+Phosphatase-Inhibitoren)

100 mM NaCl
 2 mM EDTA
 2 mM EGTA
 50 mM HEPES
 1% NP40
 1 Tbl. Complete Protease Inhibitor
 50 mM NaF
 1 mM Na³VO₄
 5 mM β-Glycerophosphat
 Aqua dest. ad 10 ml

Zellkultur-Komplettmedium D-MEM, Gibco

4.5 g/l Glucose, 10 % FCS (fetales Kälberserum), 10 % Penicillin/Streptomycin

Chemikalien

Agarose	BMA
BSA (bovines Serumalbumin)	PAA Laboratories
ECL Plus Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare
EDTA	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Glycerin	Sigma
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham
IPTG	Sigma
LB-Agar	Sigma
Milchpulver	Töpfer Allgäu
Ponceau S (0.2% in 3% TCA)	Serva
Proteaseinhibitor Complete Mini	Roche
SDS	Serva
SDS-PAGE MES Laufpuffer	Invitrogen
Triton X 100	Merck
Tris	Merck
Tween-20	Sigma

Sonstige Reagenzien

Agarose Laufpuffer (6x)	Fermentas
DEPC-H ₂ O	Applied Biosystems
EcoRI-Buffer	New England Biolabs
GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas
Ligase-Buffer	New England Biolabs
Rainbow Marker RPN 800	Amersham
Stimulantien: Forskolin	Sigma
PDGF-BB	R&D Systems
PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat)	Calbiochem
Universal PCR Mastermix (2x)	Applied Biosystems

Gebrauchsmaterial

Chromatography Column Micro Bio-Spin	Bio-Rad
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Sarstedt
Falcon-Röhrchen	Falcon/Greiner
Filterpapier	Whatman/Schleicher&Schüll
Kanülen	Braun
Nitrozellulose-Membran	Whatman/Schleicher&Schüll
Pipettenspitzen	Sarstedt
Röntgenfilm Hyperfilm MP	Amersham
SDS-Gel NuPAGE 4-12% Bis-Tris	Invitrogen
Spritzen	Braun
Sterilfilter	Sarstedt
Zellschaber	Nunc

Geräte

Analysenwaage	Sartorius
Heizblock	Eppendorf
Laborpipetten	Finnpipette/Eppendorf/Abimed
Magnetrührer	IKA Labortechnik
Mastercycler gradient PCR-Gerät	Eppendorf
Photometer SmartSpec 3000	Bio-Rad
pH-Meßgerät MP-220	Mettler Toledo
PAGE/Western-Blot-Kammer	Invitrogen
Röntgenkassette Hypercassette	Amersham
Reinstwasseranlage	Millipore
Schüttelinkubator	Infors
Pipettierroboter Genesis freedom 200	Tecan
TaqMan PCR-Gerät Abi Prism 7900 HT	Applied Biosystems
Thermocycler PCR-Gerät	Biometra
Tischzentrifuge	Eppendorf
Ultraschallgerät Digital Sonifier	Branson
UV-Leuchttisch	Bachofer
Wasserbad	GFL
Wasserstrahlpumpe	Brand
Wipp-Schüttler Duomax 1030	Heidolph
Zellkulturbank HERASafe	Heraeus
Zentrifuge 6K15	Sigma
Zentrifuge Rotanta/TCR	Hettich

2.2 Methoden

2.2.1 Vektorklonierung

Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
Zwischenklonierung im TOPO-Vektor.....	34
DNA-Minipräparation.....	34
Vektorpräparation.....	34
Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen.....	35
DNA-Trennung im Agarosegel.....	35
DNA-Extraktion und -Aufreinigung aus Agarosegelen.....	35
DNA-Restriktion.....	35
DNA-Ligation.....	36
Plasmid-Transformation (<i>E.coli</i> DH5 α und Top10).....	36
DNA-Sequenzierung.....	37
Datenbankrecherche.....	37

2.2.2 Proteinherstellung und Bindungsassays

SDS-PAGE.....	37
Plasmidtransformation von <i>E.coli</i> BL21-Zellen.....	37
Schnelltest Proteinexpression in <i>E. coli</i> BL21.....	38
Glycerolstock für Bakterien.....	38
Screening Proteinexpression in <i>E. coli</i> BL21.....	38
Induktion und Reinigung von bakteriell exprimierten Fusionsproteinen.....	39
Stimulation HuH7-Zellen.....	40
Herstellung von HuH7-Zelllysat.....	40
Western-Blot.....	40
Bindungsassay.....	41

2.2.3 Untersuchung der PID1-Gewebeverteilung

cDNA-Synthese.....	42
TaqMan: <i>Real-time</i> PCR.....	42
Datenbankrecherche.....	44

2.2.1 Vektorklonierung

Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Die PCR führt enzymatisch in vitro zu einer exponentiellen Vervielfältigung eines definierten Abschnitts der DNA. Sie findet Anwendung in verschiedenen Bereichen von Forschung und Diagnostik, da sie eine sehr sensitive Nachweismethode für spezifische DNA-Sequenzen ist. Sie wird auch genutzt, um DNA-Fragmente für die Klonierung mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen bereitzustellen. Dafür werden Primer verwendet, die im 5'-Bereich nicht vollständig mit der Template-DNA übereinstimmen, sondern die Erkennungssequenz einer bestimmten Restriktionsendonuklease enthalten.

Für die (semiquantitative) Standard-PCR werden in dieser Arbeit verwendet:

Taq PCR Master Mix	25 µl
Primermix (10 µM)	4 µl
Template-DNA (0.1 pg-20 ng) und Aqua dest.	ad 50 µl

Bedingungen im Mastercycler:

	5 Min	95°C Initiale Denaturierung
35 Zyklen mit je	30 Sek	95°C Denaturierung
	30 Sek	55-59°C Annealing (Temperatur nach Primer)
	30 Sek	72°C Elongation
	8 Min	72°C Terminale Elongation
		Lagerung 4°C

Bei Verwendung des AccuPrimeTaq DNA Polymerase High Fidelity PCR Kits ergibt sich abweichend:

AccuPrime Taq High Fidelity Polymerase (5 U/µl)	0.2 µl
AccuPrime PCR Buffer I (10x)	5 µl
Primermix (10 µM)	2 µl
Template-DNA (0.1 pg-20 ng) und Aqua dest.	ad 50 µl

Bedingungen im Mastercycler:

	2 Min	94°C Initiale Denaturierung
30 Zyklen mit je	30 Sek	94°C Denaturierung
	30 Sek	59°C Annealing
	1 Min	68°C Elongation
		Lagerung 4°C

Zwischenklonierung im TOPO- Vektor

Dieser Schritt wird durchgeführt, um die Ausbeute an zur Verfügung stehender Insert-DNA für die eigentliche Klonierung in den pGex-KG-Vektor zu erhöhen. Zu diesem Zweck wird die durch PCR amplifizierte DNA der drei PID1-Isoformen in den TOPO-Vektor kloniert und anschließend in kompetente Zellen transformiert. Es wird das TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen nach Herstellerangaben benutzt (hierbei kann der PCR-Ansatz ohne weitere Vorbereitung verwendet werden - vorausgesetzt, das Produkt ist sauber und zeigt im Agarosegel nur eine Bande):

PCR-Produkt	4 µl
Salzlösung(200 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂)	1 µl
Aqua dest.	ad 5 µl
TOPO-Vektor	1 µl

5 Min Inkubation bei Raumtemperatur, anschließend bis zur Transformation auf Eis lagern.

DNA-Minipräparation

Hierfür werden zunächst die entsprechenden Bakterienflüssigkulturen auf LB/Amp.-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Am nächsten Tag werden mit Hilfe einer Pipettenspitze Einzelkolonien entnommen, welche in 4 ml LB/Amp.- bzw. TB/Amp.-Medium bei 37°C und 225 rpm im Schüttler über Nacht angezogen werden. Anschließend werden je 1.5 ml der Kultur in ein Eppendorf-Tube überführt und die Zellen durch Zentrifugation bei 4°C und 13 000 rpm für 30 Sek sedimentiert. Der Überstand wird danach verworfen und das Pellet weiterverarbeitet. Für die Plasmidisolierungen wird das Kit „NucleoSpin Plasmid“ nach dem mitgelieferten Protokoll inklusive des optionalen Waschschriffs verwendet. Die Elution der DNA erfolgt abschließend in 50 µl Aqua dest.

Vektorpräparation

Aus einem bei -80°C tiefgefrorenen Glycerolstock, der *E. coli* mit dem gewünschten Plasmid (pGex-KG-Vektor) enthält, wird mittels einer Impföse eine kleine Menge an Bakterien herausgekratzt und als 3-Ösen-Ausstrich auf eine LB/Amp.-Agarplatte aufgetragen. Diese wird bei 37°C über Nacht kultiviert, anschließend wird mit Hilfe einer Pipettenspitze eine Einzelkolonie entnommen, welche in LB/Amp.-Medium über Nacht schüttelnd bei 37°C und 225 rpm

inkubiert wird. Die Plasmidisolierung erfolgt am nächsten Tag durch Minipräparation.

Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die DNA-Konzentrationsbestimmungen erfolgen photometrisch mit Hilfe des „SmartSpec 3000“-Photometers. Die Proben werden vor dem Messen 1:50 verdünnt und ihre Absorption bei 260 nm gemessen.

DNA-Trennung im Agarosegel

1.2% Agarose wird in 1x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf < 50 °C wird Ethidiumbromid (Endkonzentration von $0.12 \mu\text{g/ml}$) zugegeben und die Lösung in einen Gelträger überführt. Nach dem Festwerden des Gels wird der Gelträger in die mit TBE (1x) gefüllte Gelkammer eingesetzt und der Taschenkamm unter Puffer aus dem Gel gezogen. Die aufzutragenden Proben werden mit Agaroselaufpuffer versetzt und in die Taschen gefüllt. Der Gellauf erfolgt für 45 bis 60 Min bei einer Spannung von 100 V. Sind anschließend unter UV-Licht klar definierte Banden im Gel zu sehen, ist das ein Zeichen für saubere DNA ohne Verunreinigungen.

DNA-Extraktion und -Aufreinigung aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird die gewünschte Bande unter UV-Licht möglichst schnell (um das Risiko von UV-Licht-induzierten Mutationen zu minimieren) mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend weiterverarbeitet. Hierfür wird das Kit „NucleoSpin Extract“ nach dem mitgelieferten Protokoll verwendet, wobei die auf diese Weise gereinigte DNA abschließend in $35 \mu\text{l}$ Aqua dest. aufgenommen wird.

DNA-Restriktion

Hierbei werden Restriktionsendonucleasen eingesetzt, die sequenzspezifische DNA-Doppelstränge erkennen und die DNA innerhalb dieser Bereiche schneiden. Die Erkennungssequenzen für diese Enzyme sind sog. „Palindrome“, die eine Länge von 4-8 bp haben. Der Verdau von DNA erfolgt im enzymespezifischen Restriktionspuffer. Pro μg zu verdauender DNA werden 1-2 U Enzym eingesetzt. In dieser Arbeit werden die Restriktionsenzyme EcoRI und HindIII mit EcoRI-Puffer verwendet. Der Verdau wird bei 37°C im Heizblock für 2 Std durchgeführt.

Ein Restriktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl setzt sich wie folgt zusammen:

EcoRI	1 µl
HindIII	1 µl
EcoRI Buffer (10x)	2 µl
DNA (150-200 ng) und Aqua dest.	ad 20 µl

DNA-Ligation

Hier kommt ein Enzym (Ligase) zum Einsatz, das DNA-Fragmente miteinander verbinden kann. Ein Ligationsansatz enthält etwa 100 ng geschnittene und gereinigte pGex-KG-Vektor-DNA und die einzufügende DNA jeweils einer der drei PID1-Isoformen im Verhältnis 1:1.5-2. Verwendet wird eine T4 DNA-Ligase mit ihrem enzyspezifischen Ligationspuffer; die Inkubation erfolgt für 2 Std bei Raumtemperatur.

Ein Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl hat folgende Zusammensetzung:

T4 Ligase	2 µl
Ligase Buffer (10x)	2 µl
Vektor-DNA (100 ng), Insert-DNA (150-200 ng) und Aqua dest.	ad 20 µl

Plasmid-Transformation (*E. coli* DH5α und Top10)

Pro Transformationsansatz wird ein 50 µl-Aliquot chemisch kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der Plasmid-DNA (leerer pGex-KG-Vektor oder Ligationsansatz bzw. pUC19 als interne Kontrolle der Transformationseffizienz) erfolgt eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend werden die Zellen für 30 Sek bei 42°C im Heizblock einem Hitzeschock ausgesetzt und dann 3 Min auf Eis abgekühlt. Danach wird dem Ansatz 250 µl SOC-Medium zugefügt und 1 Std schüttelnd inkubiert bei 37°C und 225 rpm. 50-200 µl dieses Ansatzes werden auf eine LB/Amp.-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden beim Sequenzierservice der MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland, als „ValueRead“ bzw. „Comfort Read“ mit kundendefinierten Primern in Auftrag gegeben. Als Template wurden jeweils 1-1.5 µg aus Minipräparation gewonnene Plasmid-DNA verwendet. Das diesem DNA-Gehalt entsprechende Volumen wird hierfür in ein Eppendorf-Tube pipettiert und die Flüssigkeit über Nacht bei RT verdunsten gelassen, so dass die DNA in getrockneter Form vorliegt. Später erfolgten die Sequenzierungen mit in Aqua dest. gelöster DNA; auf diese Weise werden genauere und ggf. mehrfache Untersuchungen ermöglicht („Comfort Read“).

Datenbankrecherche

Die Ergebnisse der DNA-Sequenzierung wurden mit Hilfe des Lasergene-Programms von DNASTar Inc. mit den in der NCBI-Datenbank aufgeführten Sequenzen der PID1-Isoformen des humanen Genomprojekts verglichen.

2.2.2 Proteinherstellung und Bindungsassays

SDS-PAGE

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen kommen 4-12%-ige Bis-Tris-Polyacrylamid-Gele zum Einsatz. Die proteinhaltigen Proben werden mit Laemmli-Puffer für 5 Min bei 95°C im Heizblock denaturiert und auf das Gel aufgetragen (20 µl pro Geltasche). Die Elektrophorese erfolgt für 15 Min bei konstanten 100 V und anschließend für etwa 50 Min bei 150 V in MES-Laufpuffer.

Plasmidtransformation von *E. coli* BL21-Zellen

Ein 100 µl-Aliquot der kompetenten Zellen wird auf Eis aufgetaut, wovon anschließend 50 µl verwendet werden. Nach dem Auftauen werden die Zellen in ein vorgekühltes 12 ml-Falcon-Tube überführt und in 1 µl 1:10 verdünntem 2-ME vorsichtig resuspendiert. Anschließend erfolgt eine 10-minütige Inkubation auf Eis; hierbei sollte alle 2 Min gemischt werden. Nach Zugabe von 1 µl der durch Minipräparation gewonnenen DNA des pGex-KG-Vektors mit der PID1 *mpri*-Isoform (verdünnt ad 10 ng/µl) werden die Zellen nach vorsichtigem Mischen 30 Min auf Eis inkubiert. Hiernach erfolgt ein Hitzeschock bei 42°C im Heizblock

für 20 Sek, dann 2 Min Lagerung auf Eis und schließlich Zugabe von 450 µl auf 42°C vorgewärmtes SOC-Medium und 1-stündige Inkubation im Schüttler bei 37°C und 225 rpm. 100 µl des Ansatzes werden auf LB/Amp.-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Schnelltest Proteinexpression in *E. coli* BL21

1 ml LB/Amp./Chloramphenicol-Medium wird mit einer Kolonie aus der oben beschriebenen Transformation beimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag Beimpfen von 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika mit 50 µl der Übernachtskultur und wieder für 2 Std schüttelnd inkubieren bei 37°C und 225 rpm. Anschließend wird ein 20 µl-Aliquot abgenommen für SDS-PAGE und zum Rest der Kultur IPTG ad 1 mM zur Induktion der Proteinexpression zugefügt; wiederum Schütteln unter o.g. Bedingungen. Nach dem Abkühlen der Kulturen auf Eis werden jeweils 20 µl-Aliquots für SDS-PAGE eingesetzt. Das SDS-Gel wird anschließend mit Coomassie-Lösung gefärbt. Überschüssige Farbe wird durch üN-Inkubation mit Coomassie-Entfärber entfernt.

Glycerolstock für Bakterien

1 ml der gewünschten Bakterienflüssigkultur wird mit 500 µl Glycerin versetzt und bei -20°C bzw. -80°C eingefroren.

Screening Proteinexpression in *E. coli* BL21

Dieser Versuch soll helfen, die Bedingungen für die bakterielle Proteinexpression zu optimieren. 50 ml vorgewärmtes YT/Amp/Chloramphenicol-Medium werden mit 1 ml der Übernachtskultur aus dem o.g. Schnelltest beimpft und bei 37°C und 225 rpm so lange geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0.6-0.8 erreicht ist (photometrische Messung gegen Medium). 1 ml dieser Kultur wird abgenommen, zentrifugiert, das Pellet 1x mit 500 µl PBS gewaschen, in Laemmlipuffer aufgenommen und später für SDS-PAGE eingesetzt. Die restliche Kultur wird auf 5 ml-Greiner-Tubes aufgeteilt und IPTG ad 0.5 mM zugegeben. Diese werden bei unterschiedlichen Temperaturen (20° und 37°C) bei 225 rpm schüttelnd inkubiert. Nach 1, 2 und 3 Stunden werden jeweils 0.5 ml-Aliquots abgenommen. Diese werden zentrifugiert, mit PBS gewaschen und in Laemmlipuffer aufgenommen,

um sie anschließend für das SDS-Gel einzusetzen. (Dieses wird wiederum mit Coomassie-Lösung gefärbt und dokumentiert.)

Induktion und Reinigung von bakteriell exprimiertem GST-Fusionsprotein

Bei dieser Methode nutzt man den Umstand aus, dass GST (Glutathion-S-Transferase) mit hoher Affinität an GSH (Glutathion) bindet.

Das exprimierte GST-Fusionsprotein bindet an die GSH-Sepharosebeads und kann so von den restlichen Zellbestandteilen/Proteinen getrennt werden.

200 ml YT/Amp/Chloramphenicol-Medium werden mit 4 ml der Übernachtskultur von transformierten BL21-Zellen beimpft und bei 37°C und 200 rpm geschüttelt, bis nach etwa 3 Std eine OD₆₀₀ von 0.6-0.8 erreicht ist. Von dieser Kultur wird ein Aliquot von 1 ml abgenommen, welches später für ein SDS-PAGE eingesetzt und entsprechend vorbehandelt wird. Zum Rest der Kultur wird IPTG ad 0.5 mM für die Induktion der Proteinexpression zugegeben und im Schüttler bei 28°C und 220 rpm für weitere 3 Std inkubiert. Nach 1, 2 und 3 Std wird jeweils ein 0.5 ml-Aliquot für die spätere SDS-PAGE-Analyse abgenommen. Nach Ablauf der 3 Std wird die Kultur auf 4 Falcon-Tubes à 50 ml verteilt und bei 4°C und 5000 rpm 10 Min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Pellets über Nacht bei -20°C eingefroren.

Die Pellets werden auf Eis aufgetaut und in je 1 ml kaltem PBS+Complete Mini Proteaseinhibitor resuspendiert. Anschließend erfolgt das Aufbrechen der Zellen durch Sonifizierung (3x10 Min bei 30%iger Intensität auf Eis). Die Suspension wird in 2 ml Eppendorf-Tubes überführt und bei 4°C und max rpm 2 Min zentrifugiert. Der Überstand wird danach abgenommen. Vom Überstand sowie dem in 1%iger SDS-Lösung resuspendierten Pellet wird je ein 0.5 ml-Aliquot für SDS-PAGE eingesetzt. Der Überstand wird mit PBS+Complete Mini Proteaseinhibitor ad 7 ml aufgefüllt und durch einen 0.45 µl Filter gegeben.

Für die Protein-Aufreinigung wird in einem 50 ml Falcon-Tube 1 ml GSH-Sepharose vorgelegt und mit 10 ml PBS+Proteaseinhibitor+1% TritonX100 äquilibriert. Dieses wird bei 4°C und 500 g für 5 Min zentrifugiert; der Überstand wird verworfen. Das filtrierte Bakterienzellysat wird zugegeben und bei 4°C rotierend für 1 Std inkubiert. Anschließend wird die Sepharose 3x mit 10 ml kaltem TBS+Proteaseinhibitor (zentrifugieren jeweils bei 4°C, 500 g für 5 Min) und danach 1x mit 5 ml Beadglycerinpuffer gewaschen. Zur längerfristigen Aufbewahrung wird die Sepharose mit 2 ml Beadglycerinpuffer aufgefüllt und bei

-20°C gelagert. Zum Lösen des GST-Fusionsproteins von der GSH-Sepharose wird das oben hergestellte Gemisch zunächst resuspendiert. 30 µl davon werden auf eine Säule gegeben (Micro Bio-Spin Chromatography Column von BioRad) und bei Raumtemperatur und 10 000 rpm 30 Sek zentrifugiert. Zum Eluieren des GST-PID1-Fusionsproteins werden 30 µl auf 95°C erhitzten 1x Laemmlipuffers auf die Säule gegeben und diese bei 95°C im Heizblock für 5 Min inkubiert. Das anschließend abzentrifugierte (RT, 10 000 rpm, 30 Sek) Eluat wird für das SDS-Gel eingesetzt.

Stimulation HuH7- Zellen

HuH7-Zellen werden in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml in je 10 ml in 10 cm-Kulturschalen mit Komplettmedium ausgesetzt und nach dem Absetzen mit frischem Komplettmedium über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird das Komplettmedium nochmals für zwei Stunden erneuert, bevor man mit verschiedenen Substanzen im Komplettmedium stimuliert. Zur Stimulation verwendet werden PDGF-BB, Forskolin und PMA. PDGF-BB wird mit einer Endkonzentration von 30 ng/ml eingesetzt; die Stimulationsdauer beträgt dabei 15 Min. Bei der Verwendung von Forskolin und PMA liegt die Stimulationszeit jeweils bei 20 Min; die eingesetzten Endkonzentrationen betragen hierbei für Foskoplin 10 µM und für PMA 150 nM. Alle Arbeiten mit lebenden Zellen werden bei 37°C durchgeführt.

Herstellung von HuH7- Zelllysat

Die Zellen werden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit 1 ml Zell-Lysis-Puffer pro Kulturschale überdeckt. Anschließend werden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst, durch mehrmaliges Aufziehen mittels Spritze und Kanüle homogenisiert und 30 Min. in Eppendorfgefäßen auf Eis stehen gelassen. Danach wird das Lysat 20 Min. bei 4°C und 14 000 rpm zentrifugiert, der klare Überstand abgenommen und für die Bindungsassays eingesetzt.

Western-Blot

Nach der SDS-PAGE werden die Proteine aus dem Gel in der Western-Blot-Kammer bei 350 mA für 1 Std auf eine Nitrocellulose-Membran überführt. Zur Visualisierung wird die Membran mit Ponceau S gefärbt, mit H₂O teilweise entfärbt und dokumentiert. Nach der anschließenden Entfärbung mit TBS-Tween

wird die Membran 1 Std in Blockpuffer inkubiert und anschließend 1x in TBS-Tween gewaschen. Die Inkubation mit der 1.AK-Lösung erfolgt rotierend im 50ml Greinertube über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wird 3x 10 Min mit TBS-Tween gewaschen und es erfolgt die Inkubation mit der 2.AK-Lösung für 45 Min. Danach wieder 3x-iges Waschen in TBS-Tween, Entfernen des Puffer mit Whatman-Papier und Auftragen der kurz zuvor angesetzten ECL-Lösung auf die noch feuchte Membran. Nach 2 Min Inkubation wird die Lösung entfernt; die Dokumentation erfolgt auf lichtempfindlichem Röntgenfilm.

Bindungsassay GST-PID1 an LRP1-ICD aus HuH7-Zellysat

Diese Methode (auch genannt „GST-pull down“) liefert eine Möglichkeit, Proteininteraktionen darzustellen bzw. Bindungspartner bestimmter Proteine zu detektieren. Hierfür wird ein an GSH-Sepharose gebundenes GST-Fusionsprotein mit Zellysat inkubiert und anschließend mittels Western-Blot oder Immunpräzipitation untersucht, welche Proteine an das Fusionsprotein gebunden haben.

Die Menge an GSH-Sepharose mit daran gebundenem GST-PID1-Fusionsprotein, die etwa 10 µg Protein enthält, wird 2x mit je 1 ml Zell-Lysispuffer gewaschen (zentrifugieren bei 4°C, 2000 rpm für 30 Sek). Vom HuH7-Zellysat werden 20 µl als „Input“-Aliquot für SDS-PAGE abgenommen. Das Fusionsprotein-Eluat wird mit 150 µg Gesamtprotein aus Zellysat rotierend bei 4°C für 4 Std inkubiert.

Anschließend wird die Suspension auf eine Säule gegeben (Micro Bio-Spin Chromatography Column von Biorad) und bei 4°C und 10 000 rpm 30 Sek zentrifugiert, von dem daraus erhaltenen Eluat werden 100 µl für den Einsatz im SDS-Gel abgenommen („Überstand“), der Rest wird verworfen. Die nun auf der Säule befindlichen Sepharosebeads werden 5x mit je 500 µl Lysispuffer gewaschen (zentrifugieren wie oben), dann wird 100 µl auf 95°C erhitzter 1x Lämmli-puffer auf die Säule gegeben und diese bei 95°C im Heizblock für 5 Min inkubiert. Das anschließend abzentrifugierte (RT, 10 000 rpm, 30 Sek) Eluat wird für das SDS-Gel eingesetzt. Die Bindung von LRP-ICD an PID1 wird mittels Anti-LRP-AK („Dolly“) im Western Blot sichtbar gemacht.

2.2.3 Untersuchung der PID1- Gewebeverteilung

cDNA- Synthese

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase kann aus RNA die dazu komplementäre cDNA hergestellt werden. Es wird das „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ von Applied Biosystems nach Herstellerangaben benutzt:

MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/μl)	2.5 μl
Reverse Transcription Buffer (10x)	5 μl
RNase Inhibitor (20 U/μl)	2.5 μl
dNTP-Mix (25x)	2 μl
Random Primers (10x)	5 μl
DEPC-H ₂ O	ad 25 μl
RNA (1 μg)	1 μg

Die cDNA-Synthese findet unter folgenden Bedingungen im Thermocycler statt:

10 Min	25°C
120 Min	37°C
15 Min	70°C
	Lagerung 4°C

TaqMan: Real-time PCR

Die *real-time*-quantitative-PCR ist eine spezielle PCR-Methode, die zusätzlich zur Amplifikation des DNA-Materials die Möglichkeit bietet, die Menge des amplifizierten DNA-Abschnitts zu bestimmen. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu; dies ermöglicht die Quantifizierung der PCR-Produkte während der Amplifikation durch Fluoreszenz-Messungen („*real-time*“). Eine gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente ist daher nicht notwendig.

Bei dieser PCR-Methode wird zusätzlich zu den *forward*- und *reverse*-Primern eine Sonde verwendet, die an einem Ende (5') mit dem Quencher, am anderen (3') mit dem Reporter-Fluoreszenzstoff FAM markiert ist. Wenn die Taq-Polymerase, die zusätzlich eine Exonuclease-Aktivität besitzt, diese Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich Quencher und Fluorophor voneinander: So kann die steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen

werden (s. Abb. 7). Hinzu kommt, dass diese sog. *minor groove binding*-Sonde exonübergreifend konstruiert wird, damit tatsächlich nur mRNA bzw. cDNA erkannt wird, was die hohe Spezifität dieser PCR-Methode garantieren soll. Die Bindungssequenz dieser Sonde wird als „*Context Sequence*“ bezeichnet.

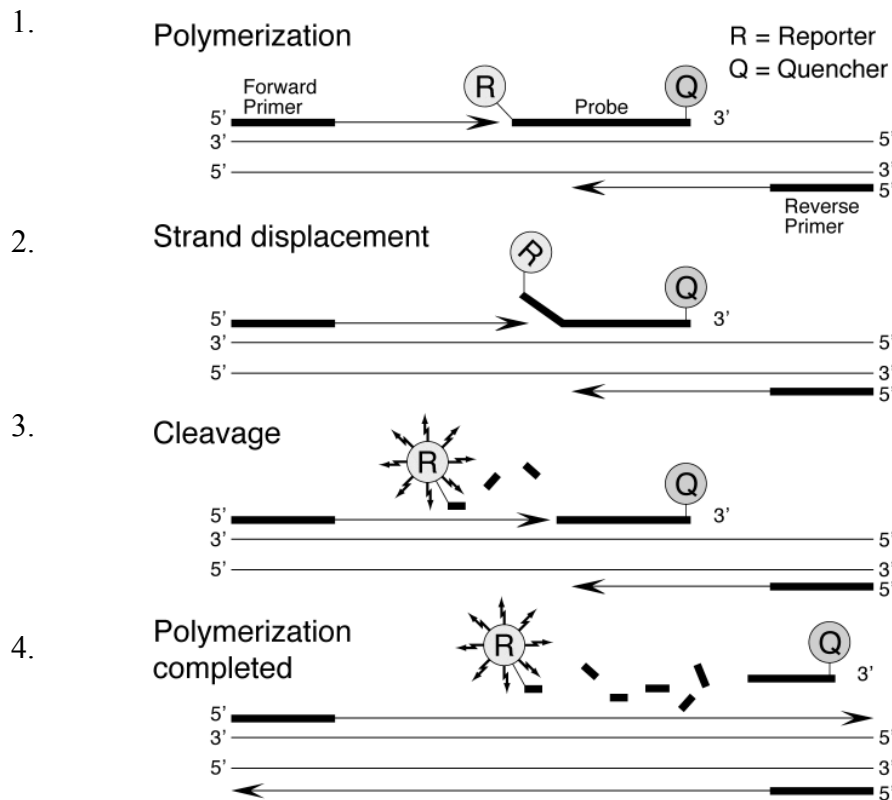


Abbildung 7: Ablauf *real-time-PCR* (<http://www.applied biosystems.com>)

Quantifizierung von Nukleinsäuren mit Hilfe der *real-time-PCR* und TaqMan-Sonden. 1. die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophor (FAM) wird bei intakten TaqMan Sonden durch den Quencher unterdrückt. 2.: Die Taq-Polymerase baut während eines PCR-Zyklus das 5'-Ende der Sonde ab. 3+4.: Der abgespaltene Reporter ist nun zur Fluoreszenz befähigt.

In dieser Arbeit werden die genspezifischen Primer für PID1 (*Assay on Demand*, AoD, siehe S. 26) von Applied Biosystems verwendet. Als *housekeeper* (Verhältnismaß) zur Quantifizierung der PCR dient bei Messungen der cDNA sowohl aus dem Fettgewebe, als auch aus dem Gewebeset und den hMSC-Tert-Zellen hTbp (humanes TATA *bindingprotein*) als Referenzgen.

Als Standardkurve wird die Formel:

„*virtually quantity* = $(10^{((Ct - 35)/(-3.3219))})$ “ zugrunde gelegt.

Das Expressionsniveau ist in den Abbildungen als virtuelle normalisierte Kopienzahl bezogen auf die Kopienzahl des Tbp dargestellt (*normalized copies gene of interest per 10⁴ copies tbp*).

Die TaqMan-Ansätze setzen sich wie folgt zusammen:

Universal Mix (2x)	15 µl
AoD	1.5 µl
cDNA (1:3-Verdünnung)	5 µl
DEPC-H ₂ O	ad 30 µl

Die Ansätze werden in eine 384-well Platte umpipettiert (4 wells à 5 µl) und anschließend gemessen.

Datenbankrecherche

Die Ergebnisse der PID1-Gewebeverteilung wurden über NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) mit denen der GEO (*Gene Expression Omnibus*)-Profiles-Datenbank verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo.html>). Hierbei handelt es sich um ein experimentelles System, mit dessen Hilfe die Expression von Genen in verschiedenen Geweben untersucht werden kann. Die Grundlage hierfür sind Mikrochips, auf die sämtliche durch das humane Genomprojekt identifizierte Gene aufgetragen sind. Auf diese kann RNA aus unterschiedlichen Geweben gegeben werden; Hybridisierungen zwischen den auf dem Chip aufgetragenen Genen und der Gewebe-RNA geben Auskunft über eine tatsächliche Expression im Gewebe und deren Stärke.

3 Ergebnisse

Dieses Kapitel gliedert sich in drei Teile: Im ersten Abschnitt (3.1) ist die molekulare Klonierung der PID1 Isoformen in den bakteriellen Proteinexpressionsvektor pGex-KG als Vorarbeit zu funktionellen Bindungsstudien mit der LRP-ICD dargestellt. Im zweiten Teil (3.2) werden die entsprechenden Bindungsexperimente und deren erforderliche Vorbereitung präsentiert. Im dritten Abschnitt (3.3) erfolgt die Darstellung der Versuche zur Charakterisierung der Gewebeverteilung von PID1 in menschlichen Organen, im Fettgewebe und während der Differenzierung von hMSC-Tert AD-Zellen.

3.1 Vektorklonierung

Die Konstruktion des Proteinexpressionsvektors geht von dem Plasmid pGex-KG aus, welches die Herstellung eines GST-Fusionsproteines erlaubt.

Zu diesem Zweck wurde die einzufügende PID1-cDNA mittels PCR amplifiziert, dabei mit Hilfe der Primer mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen versehen und in das präparierte und geschnittene Plasmid durch Ligation eingefügt. Dieses erfolgte wie im Abschnitt 2.2 beschrieben zunächst mittels PCR unter Verwendung einer Standard-Taq-Polymerase und ohne Zwischenklonierungsschritt in den TOPO-Vektor. Die PID1-cDNA wurde aus humanen Fettgewebeproben gewonnen.

Schema: pGex-KG-Vektor

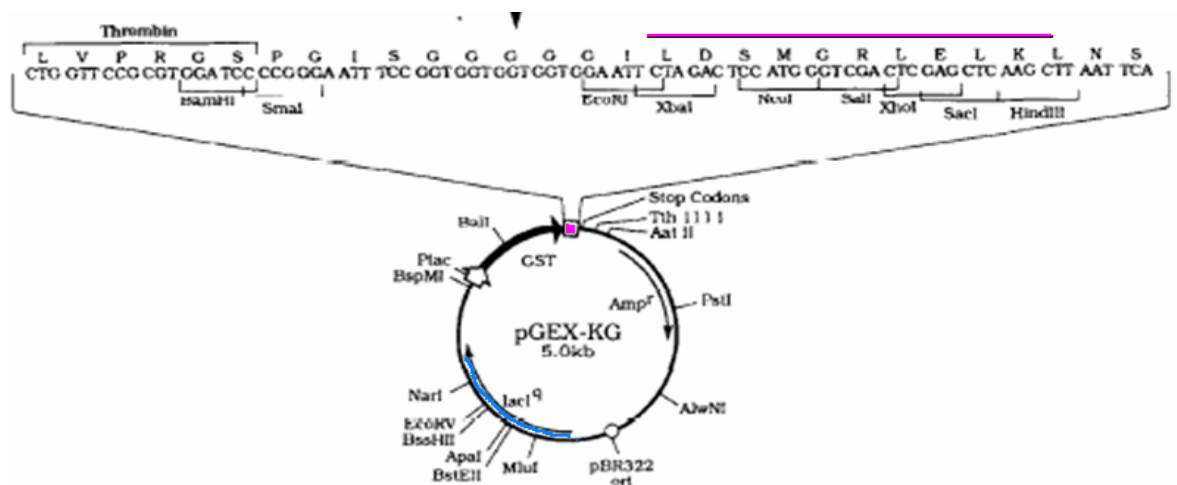


Abbildung 8: Vektorkarte pGex-KG (modifiziert nach Guan und Dixon, 1991)

pink: Region, in welche PID1-cDNA eingefügt wird; blau: Region, in der der Lac-Repressor kodiert wird (lacI-Gen). Die Proteinexpression kann durch IPTG, das die Blockierung des tac-Promotors (Ptac) durch den Lac-Repressor aufhebt, induziert werden.

Zunächst wurde der benötigte pGex-KG-Vektor präpariert, da dieser für alle weiteren Schritte benötigt wird. Parallel dazu wurde die PCR mit einer Taq-Polymerase zur Amplifizierung der PID1-Inserts durchgeführt; die Annealingtemperatur lag bei 55°C. Sowohl die *mwqp*- als auch die *mpri*-Isoform ließen sich unter diesen Bedingungen amplifizieren, wie eine anschließende Gelkontrolle zeigte, nicht aber die *mfs1*-Isoform. Deshalb wurde eine Temperaturgradienten-PCR für diese Isoform durchgeführt, um die ideale Annealingtemperatur zu bestimmen, bei der eine im Agarosegel sichtbare Menge an *mfs1*-DNA amplifiziert wird; sie liegt in diesem Fall bei etwa 59°C.

Als nächstes wurde die PCR für alle drei Isoformen mit der Annealingtemperatur von 59°C durchgeführt. Die Produkte dieser PCR (jeweils der Gesamtansatz von 50 µl) wurden auf ein Agarosegel aufgetragen (s. Abb.9), um nach der gelelektrophoretischen Trennung die einzelnen Fragmente ausschneiden („präparieren“) und weiterverarbeiten zu können.

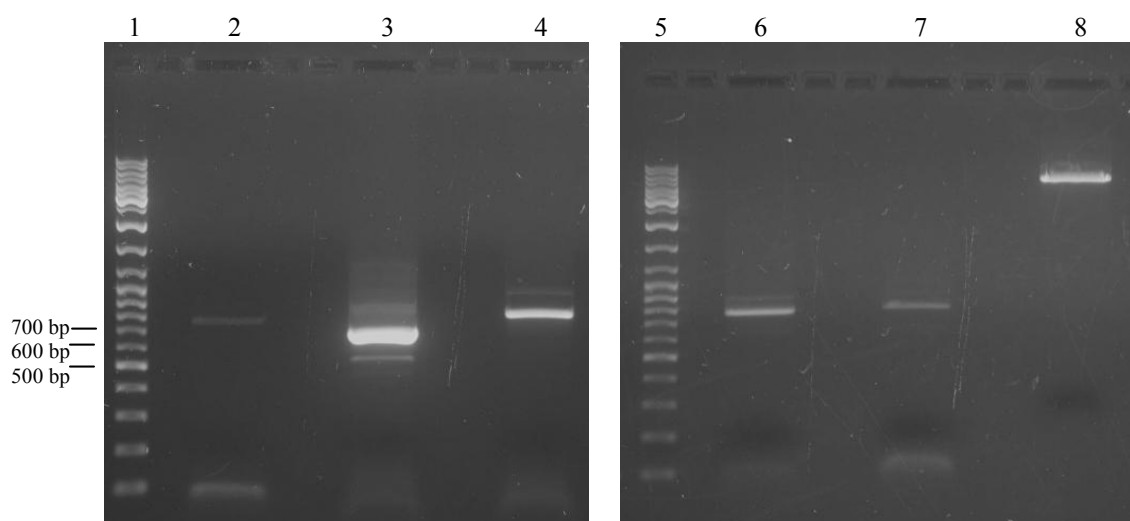


Abbildung 9: Präparatives Gel zur Isolierung der PID1-Fragmente und des geschnittenen (linearisierten) pGex-KG-Vektors (TBE, 1.2%). 1: 0.5 µg GeneRuler; 2: PID1 (*mfs1*); 3: PID1 (*mwqp*); 4: PID1 (*mpri*); 5: 0.5 µg GeneRuler; 6+7: PID1 (*mfs1*); 8: linearisierter Vektor (5 kb)

Nach der Gelextraktion wurde die gereinigte DNA in Aqua dest. aufgenommen, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII geschnitten und danach die Fragmente der drei PID1-Isoformen jeweils mit Hilfe der T4-Ligase in den ebenfalls mit EcoRI und HindIII geschnittenen leeren pGex-KG-Vektor ligiert.

Anschließend wurde dieser Ligationsansatz für die Transformation in chemokompetente DH5α-Zellen verwendet. Nach der Transformation wurde die

Plasmid-DNA mittels Minipräparation isoliert und zur Kontrolle erneut mit den Restriktionsenzymen geschnitten und auf ein Gel aufgetragen.

Bei erfolgreicher Klonierung wäre folgendes Bild in einer Spur zu erwarten: Der linearisierte Vektor mit einer Bande bei ca. 5 kB sowie die Fragmente der PID1-Isoformen bei ca. 600-750 bp.

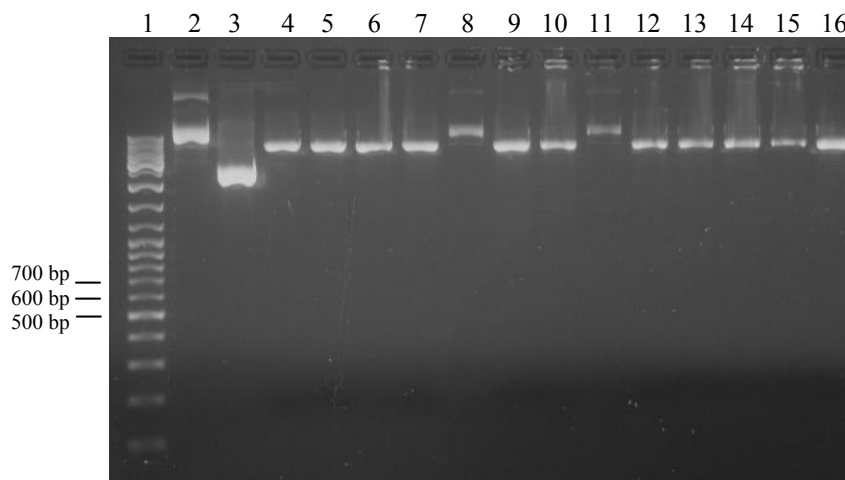


Abbildung 10: EcoRI- und HindIII-Kontrollrestriktion der pGex-KG-PID1 Ligationsklone (TBE, 1.2 %). 1: 0.5 µg GeneRuler; 3-7, 9, 10, 12-16: Restriktionsverdau der Ligationsprodukte; 2, 8, 11: ungeschnittene Kontrollen

Da allerdings nach Restriktionsverdau keine Fragmente im Bereich von ca. 600-750 bp sichtbar waren, sondern lediglich der geschnittene Vektor (s. Abb.10), war die Klonierung offensichtlich erfolglos, weshalb ein erneuter Klonierungsversuch mit etwas veränderten Bedingungen unternommen wurde. Hierfür wurde statt der Standard-Taq-Polymerase die AccuPrimeTaq-Polymerase verwendet, die durch ihre 3'-5'-Exonukleaseaktivität (sog. *proofreading*-Enzym) das Risiko für das Entstehen von Mutationen während der Amplifikation minimieren soll. Außerdem wurde ein Zwischenklonierungsschritt in den TOPO-Vektor unternommen, um die Ausbeute an zur Verfügung stehender Insert-DNA für die eigentliche Klonierung in den pGex-KG-Vektor zu erhöhen. Für diesen Schritt sind bereits geringste Mengen an DNA ausreichend.

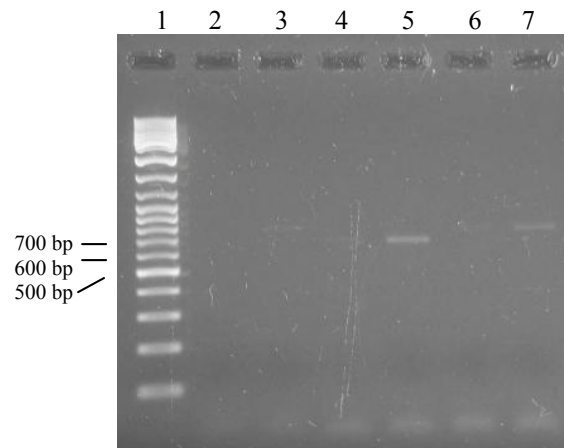


Abbildung 11: Kontrollgel der PID1 PCR-Produkte (AccuPrime Taq Polymerase) (TBE, 1,2 %). 1: 0,5 µg GeneRuler; 2, 3: PID1 (*mfsI*); 4, 5: PID1 (*mwqp*); 6, 7: PID1 (*mpri*)

Nachdem das Kontrollgel der PCR-Produkte einzelne definierte Banden gezeigt hatte (s. Abb.11), konnte der PCR-Ansatz direkt und ohne weitere Behandlung für das Klonieren in den TOPO-Vektor verwendet werden; hierfür werden weder zusätzliche Restriktionsenzyme noch Ligase benötigt. Anschließend wurde dieser TOPO-Klonierungsansatz zur Transformation in DH5 α -Zellen verwendet, aus denen die Plasmid-DNA danach wiederum mittels Minipräparation isoliert und mit EcoRI und HindIII geschnitten wurde. Der Restriktionsansatz wurde dann auf ein Gel aufgetragen (s. Abb.12), um die aus dem TOPO-Vektor herausgeschnittenen PID1-Inserts für die weitere Klonierung extrahieren zu können.

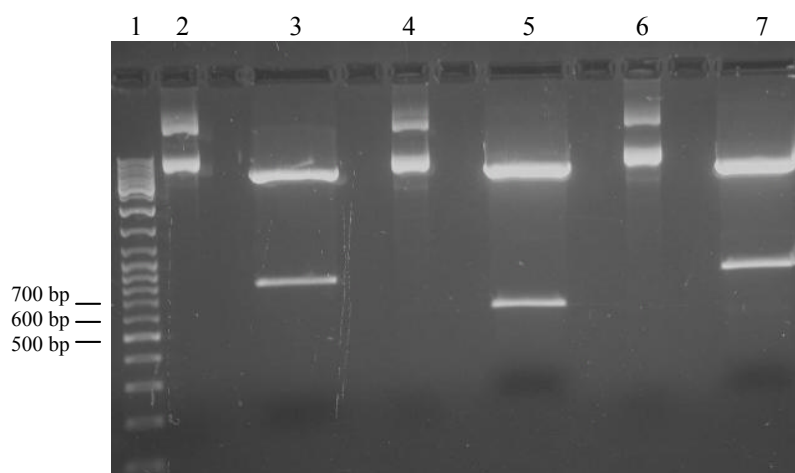


Abbildung 12: Präparatives Gel zur Isolierung der PID1-Fragmente nach Restriktionsverdau der TOPO-Ligationsprodukte mit EcoRI und HindIII (TBE, 1,2 %) 1: 0,5 µg GeneRuler; 3: TOPO+PID1 (*mfsI*); 5: TOPO+PID1 (*mwqp*); 7: TOPO+PID1 (*mpri*); 2, 4, 6: ungeschnittene Kontrollen

Auch nach dieser Gelextraktion wurde die so gereinigte DNA in Aqua dest. aufgenommen und dann mittels T4 Ligase in den geschnittenen leeren pGex-KG-Vektor eingefügt. Mit diesem Ligationsansatz wurden DH5 α -Zellen transformiert, die Plasmid-DNA durch Minipräparation isoliert, diese zur Kontrolle geschnitten und auf ein Gel aufgetragen.

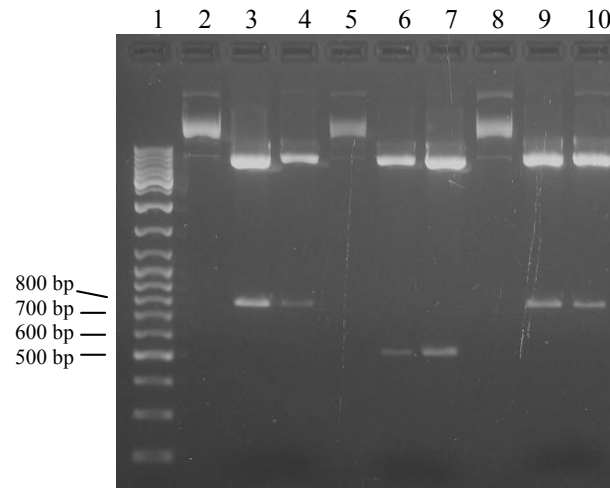


Abbildung 13: EcoRI- und HindIII-Kontrollrestriktion der pGex-KG-PID1 Ligationsklone (TBE, 1,2 %). 1: 0.5 μ g GeneRuler; 3, 4: pGex-KG+PID1 (*mfsI*); 6, 7: pGex-KG+PID1 (*mwqp*); 9, 10: pGex-KG+PID1 (*mpri*); 2, 5, 8: ungeschnittene Kontrollen

Dieser Versuch zeigt das erwartete Resultat (s. Abb.13): das parallele Vorhandensein von kleinen (ca. 600-750 bp) und großen Fragmenten (bei ca. 5 kb: linearisierter Vektor), was korrekte Klone in diesen Spuren anzeigt, allerdings sieht das Insert der *mwqp*-Isoform hier kürzer aus als erwartet (nur ca. 500 bp).

Nachdem der zweite Klonierungsversuch erfolgreich war, wurden die entsprechenden Proben zum Sequenzieren gegeben. Es stellte sich heraus, dass nur die *mpri*-Isoform des PID1 ohne eine die spätere Proteinstruktur verändernde Mutation hatte kloniert werden können.

Außerdem lieferten die Sequenzanalysen Hinweis darauf, dass die *mwqp*-Isoform - wie schon im Kontrollgel beobachtet - offenbar in einer weiteren, kürzeren Variante (ca. 500 bp) vorliegt. Es fehlt hierbei exakt Exon 2.

Datenbankrecherchen bestätigten diesen Umstand, so dass im weiteren von vier bekannten Isoformen des PID1 ausgegangen werden muss, die hier noch einmal vorgestellt werden sollen. Zunächst die zu Beginn der Arbeit bekannten Isoformen, die sich alle aus jeweils drei Exons zusammensetzen:

mpri: Exon 1b+2+3 (744 bp)

mfs1: Exon 1c+2+3 (750 bp)

mwqp 3: Exon 1a+2+3 (651 bp)

Außerdem kommt jetzt eine kurze Variante der *mwqp*-Isoform dazu, die nur aus zwei Exons besteht und bei der das mittlere Exon „übersprungen“ wird:

mwqp 2: Exon 1a+3 (504 bp)

Um sowohl die kurze als auch die lange Variante der *mwqp*-Isoform des Proteins für weitere Untersuchungen zur Verfügung zu stellen, sollte ein weiterer pGex-KG-Vektor mit der langen Variante kloniert werden. Die PID1-cDNA wurde zu diesem Zweck aus einem Set von verschiedenen humanen Organgewebeproben amplifiziert, da aus den bisher verwendeten Fettgewebeproben nur die kurze Form hatte gewonnen werden können.

Die Versuchsbedingungen der bisherigen Experimente wurden übernommen. Für die PCR der Organ- und Fettgewebeproben wurde die AccuPrime Taq Polymerase verwendet. Die PCR-Produkte wurden anschließend auf ein Gel aufgetragen, um die Länge der DNA-Fragmente bestimmen zu können.

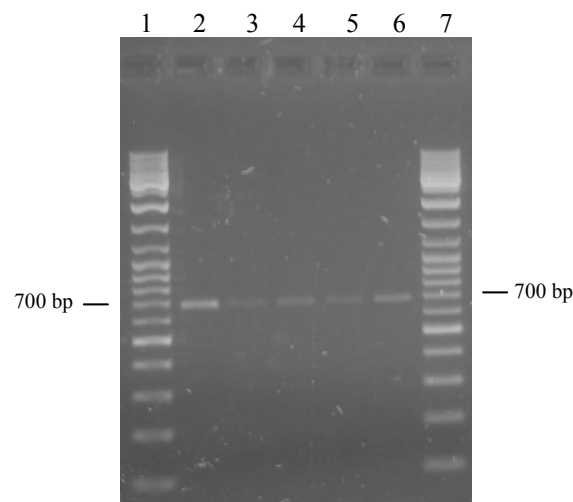


Abbildung 14: Kontrollgel der PID1 PCR-Produkte, *mwqp*-Isoform (TBE, 1.2 %)

1: 0.5 µg GeneRuler, 2: fetales Hirn, 3: Herz, 4: Nebenniere, 5: fetale Leber, 6: humanes Fettgewebe, 7: 0.5 µg GeneRuler

Bei der Gelkontrolle zeigt sich, dass die jeweilige Hauptbande der PCR-Produkte aus den verwendeten Geweben stets eine Länge von knapp unter 700 bp aufweist (s. Abb.14); dies entspricht der langen Variante der *mwqp*-Isoform.

Die PCR-Ansätze werden dann für die Klonierung in den TOPO-Vektor weiterverwendet, anschließend wieder mit EcoRI und HindIII geschnitten und zur Extraktion auf ein Gel aufgetragen:

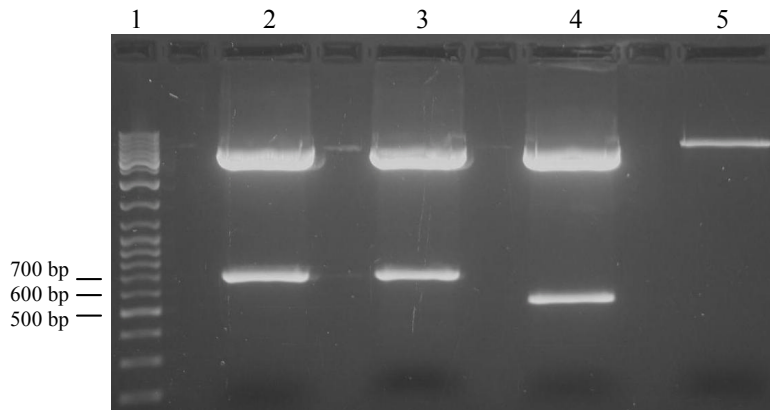


Abbildung 15: Präparatives Gel zur Isolierung der PID1-Fragmente (*mwqp*-Isoform) nach Restriktionsverdau der TOPO-Ligationsprodukte mit EcoRI und HindIII (TBE, 1,2 %)
1: 0,5 µg GeneRuler, 2: TOPO+PID1 fetales Hirn, 3: TOPO+PID1 fetale Leber, 4: TOPO+PID1 humanes Fettgewebe, 5: linearisierter pGex-KG-Vektor (5 kb)

Obwohl bei der Gelkontrolle der PCR-Produkte alle Fragmente die gleiche Länge von etwas unter 700 bp hatten, zeigt sich nun überraschenderweise nach dem Schritt der Zwischenklonierung in den TOPO-Vektor ein kürzeres Fragment dort, wo das aus dem humanen Fettgewebe gewonnene PID1-Insert eingesetzt wurde (s.Abb.15). Dieses Fragment hat eine Länge von ca. 500 bp, was der kurzen Variante der PID1-*mwqp*-Isoform entspricht.

Die PID1-Fragmente wurden mittels Gelextraktion gereinigt, mit T4 Ligase in den leeren geschnittenen pGex-KG-Vektor ligiert, danach zur Kontrolle nochmals geschnitten und auf einem Gel sichtbar gemacht.

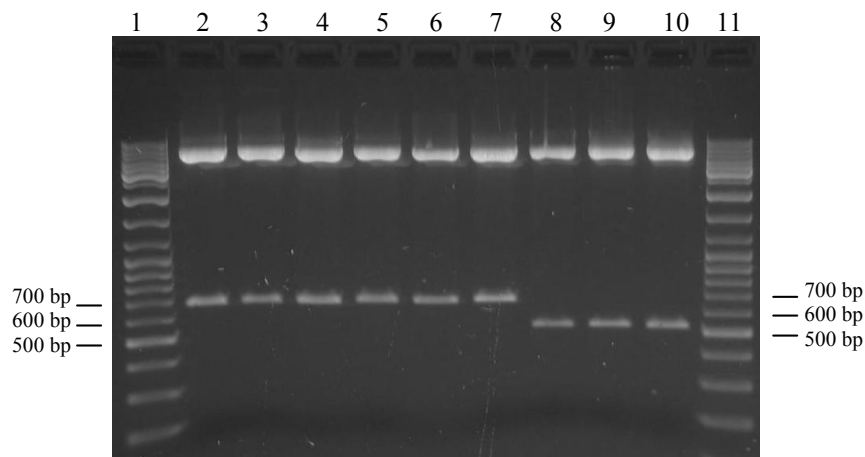


Abbildung 16: EcoRI- und HindIII-Kontrollrestriktion der pGex-KG-PID1 (*mwqp*-Isoform) Ligationsklone (TBE, 1.2 %). 1, 11: 0.5 µg GeneRuler; 2-4: Insert aus fet. Hirn; 5-7: Insert aus fet. Leber; 8-10: Insert aus humanem Fettgewebe gewonnen

Das gleichzeitige Vorhandensein von großen Fragmenten (5 kb: linearisierter Vektor) und kleinen Fragmenten (ca. 700 bzw. 500 bp: *mwqp*-Inserts) in derselben Spur zeigt an, dass auch die lange Variante der *mwqp*-Isoform erfolgreich in den pGex-KG-Vektor kloniert werden konnte, allerdings präsentiert sich das gleiche Bild, das vorher schon beobachtet wurde: Die PID1-Fragmente, die aus dem Fettgewebe gewonnen wurden, sind deutlich kürzer als jene, die aus anderen Organgewebe stammen und entsprechen der aus nur zwei Exons bestehenden Isoform (s. Abb.16); die anschließende Sequenzierung bestätigte dies.

Die Proben wurden wiederum zum Sequenzieren gegeben. Allerdings zeigten sich auch dieses Mal Mutationen in der DNA-Sequenz, die nicht ohne Folgen für die spätere Proteinstruktur bleiben würden, so dass die geplanten weiteren Experimente exemplarisch mit dem Expressionsvektor für die PID1-*mpri*-Isoform durchgeführt wurden.

3.2 Proteinherstellung und Bindungsassays

Bei der Proteinherstellung und -reinigung wird in der experimentellen Herangehensweise im Rahmen dieser Arbeit der Umstand ausgenutzt, dass Glutathion-S-Transferase (GST) mit hoher Affinität an Glutathion (GSH) bindet.

Das nach Transformation durch den pGex-KG-PID1-Vektor exprimierte GST-PID1-Fusionsprotein bindet an GSH-Sepharosebeads und kann so von den restlichen Zellbestandteilen/Proteinen getrennt werden.

Die für die Bindungsassays verwendete Methode liefert eine Möglichkeit, Proteininteraktionen darzustellen bzw. Bindungspartner bestimmter Proteine zu detektieren. Hierfür wird das an GSH-Sepharose gebundene GST-PID1-Fusionsprotein mit Zellysat inkubiert und anschließend mittels Western-Blot untersucht, welche Proteine an das Fusionsprotein gebunden haben.

3.2.1 Proteinherstellung

Zunächst sollte untersucht werden, ob das GST-PID1-Fusionsprotein von auf Proteinexpression spezialisierten Bakterienzellen nach Transformation mit dem zuvor dafür klonierten Vektor generell hergestellt wird. Zu diesem Zweck wurden BL21-Zellen mit dem pGex-KG-Vektor, der die DNA der *mpri*-Isoform enthält, transformiert und anschließend durch Zugabe von IPTG die Proteinexpression induziert. Wird das Fusionsprotein hergestellt, müsste es im SDS-Gel bei ca. 55 kDa sichtbar sein, da das Molekulargewicht von GST etwa 27 kDa und das von PID1 etwa 28 kDa beträgt.

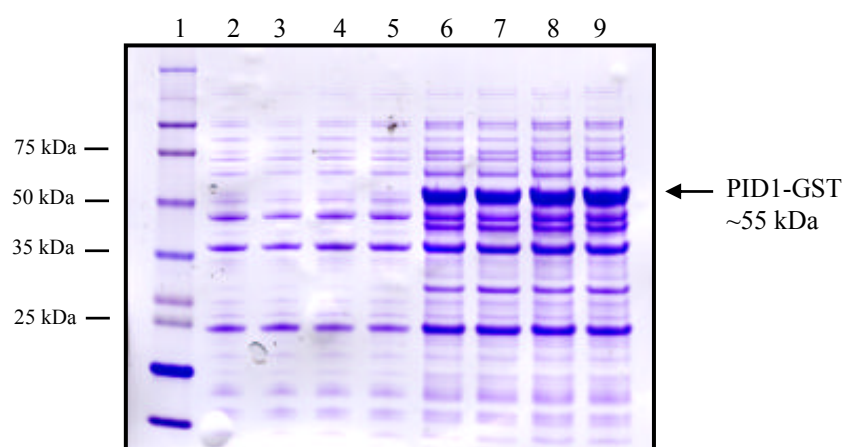


Abbildung 17: SDS-Gel (Coomassie) Schnelltest auf Proteinexpression in *E. coli* BL21

1: Rainbowmarker RPN 800, 2-5: nicht induzierte Kulturen, 6-9: induzierte Kulturen (Zugabe von IPTG), jeweils Klone 1-4

Die erwartete Bande ist im SDS-Gel vorhanden (s. Abb.17); dies lässt den Schluss zu, dass das GST-Fusionsprotein mit den angewandten Methoden exprimiert werden konnte.

Als nächstes sollten die optimalen Bedingungen für die Proteinexpression ermittelt werden. Hierfür wurde ein Screeningtest durchgeführt, bei dem die Parameter Temperatur und Inkubationszeit variiert wurden, um dann im Vergleich sehen zu können, unter welchen Bedingungen die Menge hergestellten Proteins am größten ist.

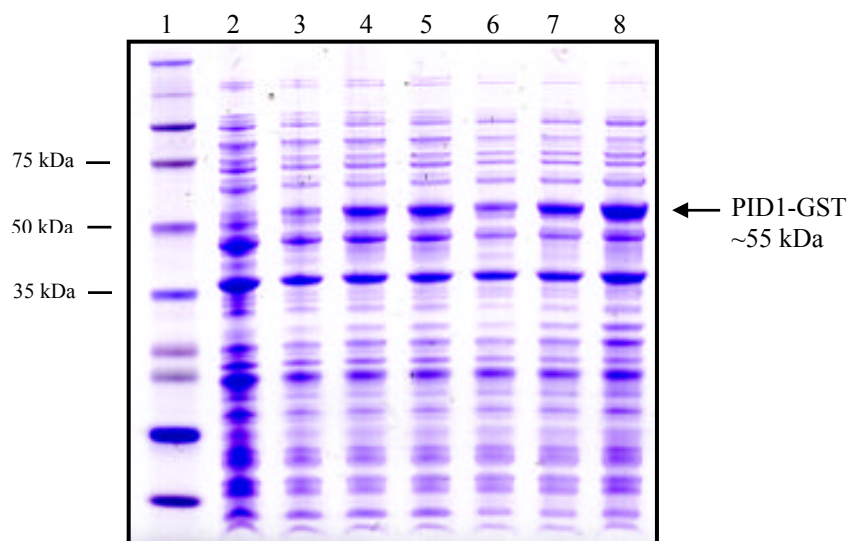


Abbildung 18: SDS-Gel (Coomassie) Screening Bedingungen für bakt. Proteinexpression.

1: Rainbowmarker RPN 800; 2: nicht induzierte; 3-8: induzierte Kulturen; 3-5: bei RT (Spur 3: 1, Spur 4: 2, Spur 5: 3 Std); 6-8: bei 37°C (Spur 6: 1, Spur 7: 2, Spur 8: 3 Std)

Das Ergebnis des Screenings zeigt, dass nach einer Inkubationszeit von 3 Std bei 37°C die höchste Ausbeute an synthetisiertem Fusionsprotein zu erwarten wäre (s. Abb.18). Dennoch wurde für die weiteren Experimente eine niedrigere Temperatur (28°C) gewählt, weil Rücksprache mit in der Isolierung von GST-Fusionsproteinen erfahrenen Kollegen und Lektüre der *current protocols* ergab, dass diese Art von Proteinen sehr dazu neigt, in schwer auflösbaren sog. Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) vorzuliegen, wenn die Inkubation nach der Induktion bei Temperaturen über 30°C erfolgt. Das Vorliegen des Proteins in diesen Einschlusskörperchen lässt sich im SDS-Gel nicht erkennen, führt aber zu Problemen bei der späteren Isolierung des Proteins und behindert Bindungsversuche.

Die Proteinexpression wurde dann mit einem größeren Ansatz und bei 28°C erneut durchgeführt und das GST-Fusionsprotein anschließend über verschiedene Schritte aus den Zellen isoliert, an GSH-Sepharose gebunden und gereinigt, was in einem SDS-Gel dokumentiert wurde:

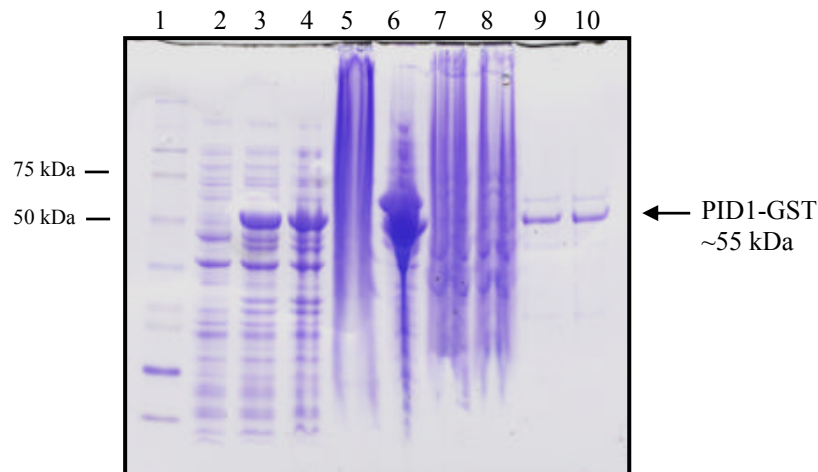


Abbildung 19: SDS-Gel (Coomassie) Proteinexpression und -reinigung.

1: Rainbowmarker RPN 800; 2: nicht induzierte Kultur; 3-10: induzierte Kulturen bei 28°C; 3: 2 Std, 4: 3 Std; 5: Überstand nach Sonifikation; 6: Pellet nach Sonifikation; 7: Überstand nach Sonifikation+ Zugabe von TritonX100; 8: Sepharose-Überstand; 9+10: PID1-GST-Eluat

Das Vorhandensein eines Proteins mit einer Größe von ca. 55 kDa in Spur 9 und 10 lässt den Schluss zu, dass das GST-PID1-Fusionsprotein mit den beschriebenen Methoden erfolgreich isoliert werden konnte (s. Abb.19). Die große Menge an Protein in Spur 6 lässt sich dadurch erklären, dass sich hier im nach Sonifikation verbleibenden Zelltrümmerpellet noch ungelöstes Protein befindet, welches wahrscheinlich in *inclusion bodies* vorliegt; das Bild von Spur 5, 7 und 8 kommt am ehesten durch eine Überladung der betreffenden Spur mit großen Proteinmengen zustande, weshalb sich hier keine einzelnen definierten Banden erkennen lassen.

3.2.2 Proteinbindungsexperimente

Zu Beginn sollte überprüft werden, ob das hergestellte PID1-GST-Fusionsprotein tatsächlich zur Bindung an LRP1(-ICD) befähigt ist. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Bindungsversuch durchgeführt, bei dem HuH7-Zelllysat, welches LRP1 in ausreichender Menge enthalten sollte, mit dem an GSH-Sepharose gebundenen PID1-GST inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurde das PID1-GST von der Sepharose getrennt und mittels LRP1- β -Antikörper im Western blot

untersucht, ob sich LRP1 im Eluat befindet, was bedeuten würde, dass es an PID1 gebunden haben muß.

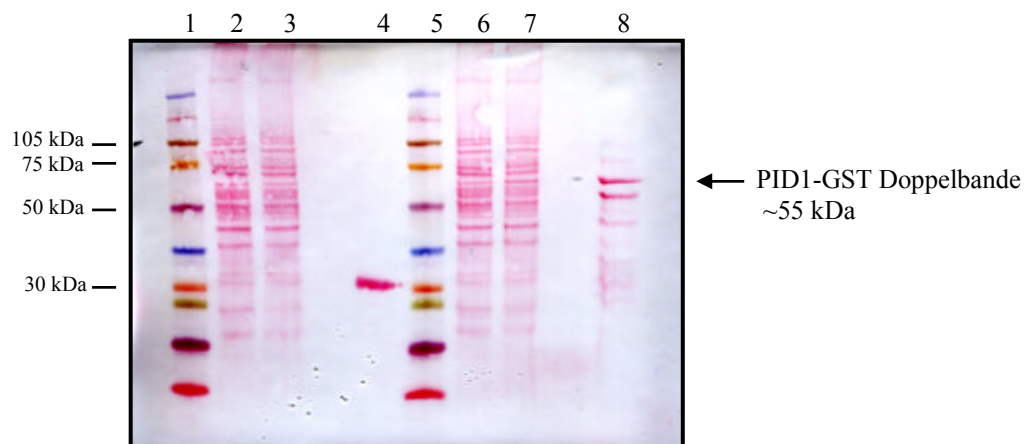


Abbildung 20: Western blot (Ponceau) PID1-GST/ HuH7-Lysat Bindungsassay.

1+5: Rainbowmarker RPN 800; 2-4: GST-Kontrolle; 2: Input, 3: Überstand, 4: GST+Input Eluat; 6-8: PID1-GST; 6: Input, 7: Überstand, 8: PID1-GST+Input Eluat

Nach der Ponceaufärbung des Western blots ist die erwartete Bande bei 55 kDa sichtbar (s. Abb.20). Dies lässt den Schluss zu, dass sowohl das GST-Protein als auch das PID1-GST-Fusionsprotein von der GSH-Sepharose getrennt werden konnte und im Eluat sichtbar wird. Die Banden, die bei dem Fusionsprotein unterhalb von 55 kDa zu erkennen sind, kommen wahrscheinlich durch inkomplett synthetisiertes PID1-GST zustande, da auch dieses über seinen N-terminalen GST-Anteil am GSH bindet und damit ebenfalls eluiert wird. Möglicherweise finden auch limitierte Proteolysevorgänge, bei denen kürzere Proteinfragmente entstehen, während der Inkubationszeit statt.

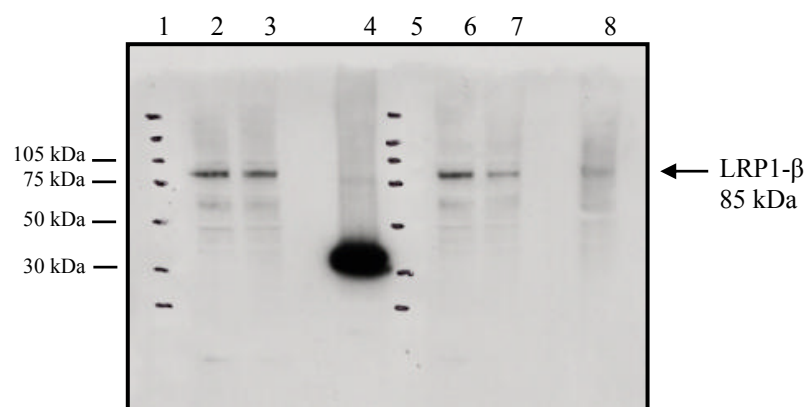


Abbildung 21: PID1-GST/ HuH7-Lysat Bindungsassay im Western blot mit LRP1- β -Antikörper. 1+5: Rainbowmarker RPN 800; 2-4: GST-Kontrolle; 2: Input, 3: Überstand, 4: GST+Input Eluat; 6-8: PID1-GST; 6: Input, 7: Überstand, 8: PID1-GST+Input Eluat

Die Banden bzw. Signale bei ca. 85 kDa zeigen vorhandene LRP1- β -Kette an, welche die ICD enthält (s. Abb.21). Das starke Signal in Spur 4 bei etwa 39 kDa lässt sich erklären durch eine Verunreinigung des GST-Kontrollproteins mit einem im Labor vorhandenen GST-Fusionsprotein, welches LRP1-ICD enthält und deshalb stark mit dem verwendeten Antikörper interagiert. Entscheidend ist jedoch, dass trotz dieser Kontamination keine Bande auf der Höhe der LRP1- β -Kette vorhanden ist, die GST-Kontrolle im Unterschied zum Fusionsprotein also nicht an die LRP1-ICD zu binden scheint.

Die vorliegenden Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass LRP1-ICD tatsächlich an PID1 bindet und deshalb im Eluat mittels spezifischer Antikörper nachzuweisen ist.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Phosphorylierung der LRP1-ICD, die durch Stimulation der HuH7-Zellen mit verschiedenen Substanzen (PDGF-BB, PMA und Forskolin) erreicht werden sollte, einen erkennbaren Einfluß auf die Bindung zwischen LRP1 und PID1 hat. Die Versuche folgen nach der Zellstimulation dem oben beschriebenen Prinzip.

Zunächst werden hier die Ergebnisse der Bindungsexperimente bei Stimulation mit PDGF im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle vorgestellt.

Die Stimulation mit PDGF-BB führt zu einer Phosphorylierung des Tyrosins, welches sich im terminalen NPxY-Motivs der LRP1-ICD befindet (Ranganathan et al. 2004). PDGF-BB wurde in einer Endkonzentration von 30 ng/ml eingesetzt; die Stimulationsdauer betrug 15 Min.

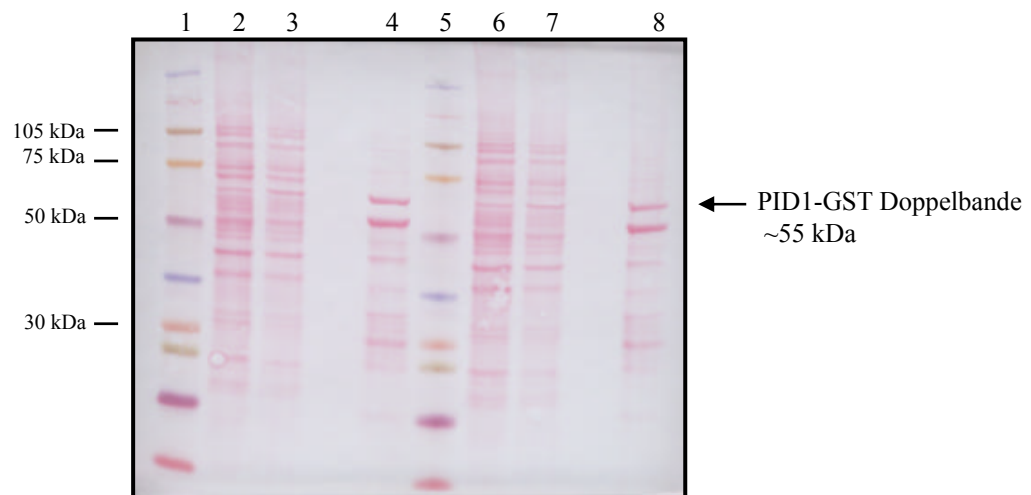


Abbildung 22: Western blot (Ponceau) PID1-GST/HuH7-Lysat Bindungsassay (stimuliert). 1+5: Rainbowmarker RPN 800; 2-4: unstimulierte Kontrolle; 2: Input, 3: Überstand, 4: PID1-GST+Input Eluat; 6-8: Stimulation mit PDGF; 6: Input, 7: Überstand, 8: PID1-GST+Input Eluat

Nach der Ponceaufärbung des Western blots präsentiert sich zunächst das gleiche Bild wie in dem Bindungsversuch ohne Stimulation (s. Abb.22): Das PID1-GST-Fusionsprotein ist im Eluat zu sehen, darunter befinden sich Fragmente inkomplett synthetisierten Proteins. Bis jetzt ist kein Unterschied zwischen der unstimulierten Kontrolle und des mit PDGF behandelten Anteils zu erkennen.

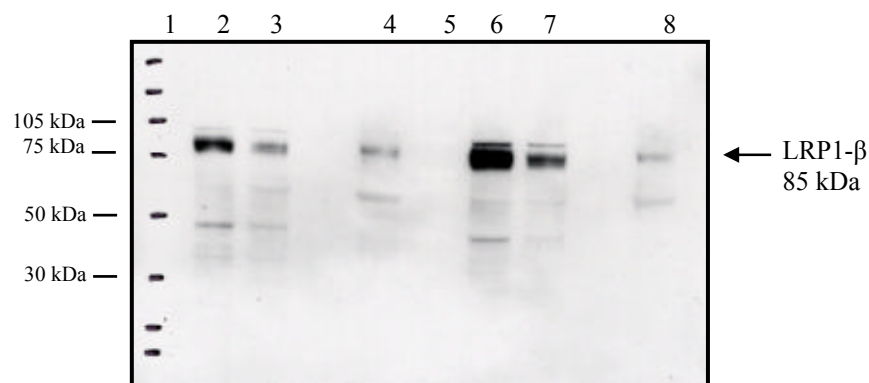


Abbildung 23: PID1-GST/HuH7-Lysat Bindungsassay (stimuliert) im Western blot mit LRP1-β-Antikörper. 1+5: Rainbowmarker RPN 800; 2-4: unstimulierte Kontrolle; 2: Input, 3: Überstand, 4: PID1-GST+Input Eluat; 6-8: Stimulation mit PDGF; 6: Input, 7: Überstand, 8: PID1-GST+Input Eluat

Die in den Spuren 2, 3, 4, 6, 7 und 8 sichtbaren Banden beim für LRP1-β charakteristischen Gewicht von 85 kDa lassen den Schluss zu, dass die β-Kette über die LRP1-ICD an das im Eluat befindliche PID1-GST-Fusionsprotein gebunden hat: Nach Interaktion mit dem LRP1-β-Ak wird die charakteristische Bande sichtbar (s. Abb.23). Die zusätzlichen diskreten Banden unterhalb von

85 kDa lassen sich durch unspezifische Bindungen des LRP1- β -Ak bzw. des Zweitantikörpers erklären, die erfahrungsgemäß auftreten können.

Im vorliegenden Bindungsassay wird zudem ein Unterschied in der Menge an LRP1- β im jeweiligen Input deutlich; diese ist größer im aus PDGF-stimulierten Zellen gewonnenen Lysat. Vergleicht man allerdings die Menge an LRP1- β im Eluat mit der jeweils eingesetzten Menge im Input, so ist der Anteil nach PDGF-Stimulation verhältnismäßig geringer.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Bindungsexperimente bei Stimulation mit PMA bzw. mit Forskolin präsentiert.

Der Einsatz von PMA bewirkt eine Serin- und Threoninphosphorylierung von zellulären Proteinen, u. a. der LRP1-ICD. Die Verwendung von Forskolin bewirkt in diesem Fall eine Serinphosphorylierung. PMA wurde in einer Endkonzentration von 150 nM und Forskolin von 10 μ M verwendet; die Stimulationsdauer betrug jeweils 20 Min.

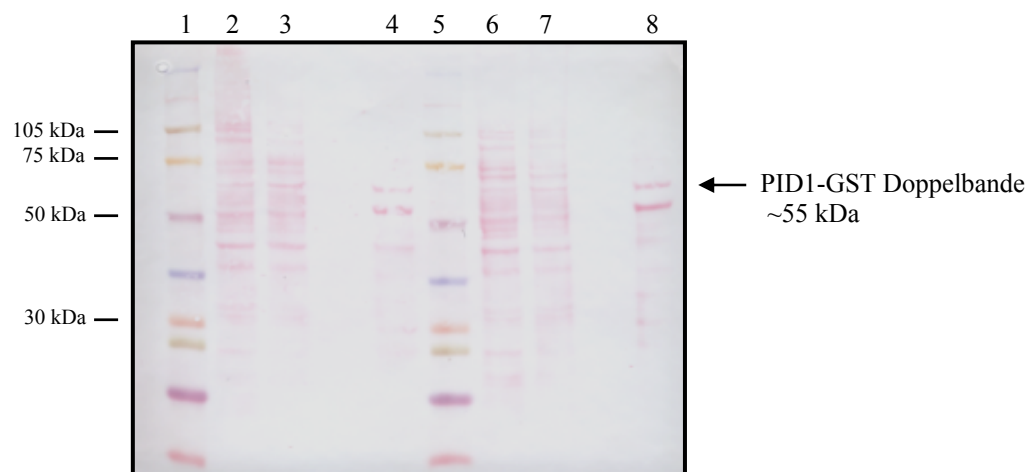


Abbildung 24: Western blot (Ponceau) PID1-GST/HuH7-Lysat Bindungsassay (stimuliert).
1+5: Rainbowmarker RPN 800; 2-4: Stimulation mit PMA; 2: Input, 3: Überstand, 4: PID1-GST+Input Eluat; 6-8: Stimulation mit Forskolin; 6: Input, 7: Überstand, 8: PID1-GST+Input Eluat

Die Ponceaufärbung des Western blots zeigt hier wiederum in beiden Fällen das PID1-GST-Fusionsprotein im Eluat nach dem bekannten Muster, ohne dass ein deutlicher Unterschied zwischen den verschiedenen stimulierten Anteilen erkennbar wäre (s. Abb 24).

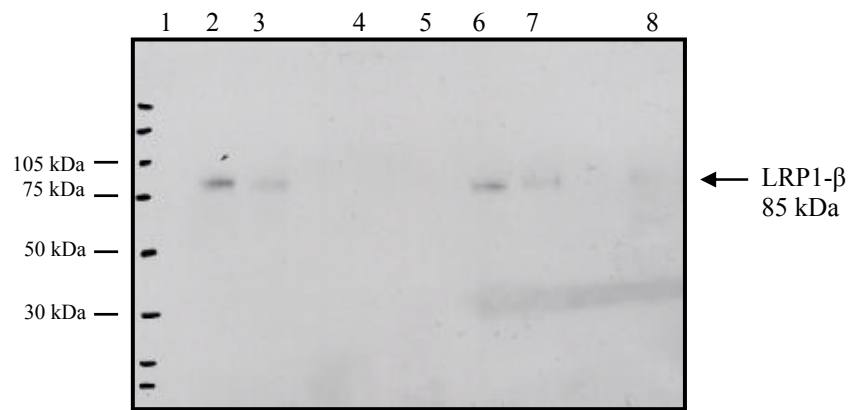


Abbildung 25: PID1-GST/HuH7-Lysat Bindungsassay (stimuliert) im Western blot mit LRP1- β -Antikörper. 1+5: Rainbowmarker RPN 800; 2-4: Stimulation mit PMA; 2: Input, 3: Überstand, 4: PID1-GST+Input Eluat; 6-8: Stimulation mit Forskolin; 6: Input, 7: Überstand, 8: PID1-GST+Input Eluat

Die Untersuchung mit dem spezifischen LRP1- β -Antikörper zeigt im Weiteren aber, dass unter diesen Bedingungen die LRP1-ICD nicht (Stimulation mit PMA) oder nur in sehr geringem Ausmaß (bei Stimulation mit Forskolin) an das PID1-GST-Fusionsprotein gebunden zu haben scheint (s. Abb.25).

3.3 Gewebeverteilung von PID1

Die Gewebeverteilung von PID1 wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden untersucht: zum einen mit Hilfe der semiquantitativen (Standard-) PCR, bei der die gleichen Primer wie für die Vektorklonierung verwendet wurden, zum anderen mittels *real-time*-PCR (TaqMan). Bei letzterer wurde eine Sonde als Reporter benutzt, die PID1 nicht-isoformenspezifisch bindet, da sie komplementär zum Bereich des Übergangs von Exon 2 auf Exon 3 ist und damit an alle Isoformen des PID1 mit Ausnahme der im Laufe der Arbeit entdeckten kurzen Variante der *mwqp*-Isoform, die Exon 2 nicht enthält, binden kann.

Darüber hinaus sollte untersucht werden, wie sich die Expression von PID1 während der Differenzierung von hMSC-Tert AD-Zellen verhält.

3.3.1 Isoformenspezifische semiquantitative PCR-Untersuchung

Als erstes wurde die Expression der PID1-*mwqp*-Isoform untersucht. Hierfür wurde eine Standard-Taq-Polymerase verwendet; die Annealingtemperatur lag bei 59°C.

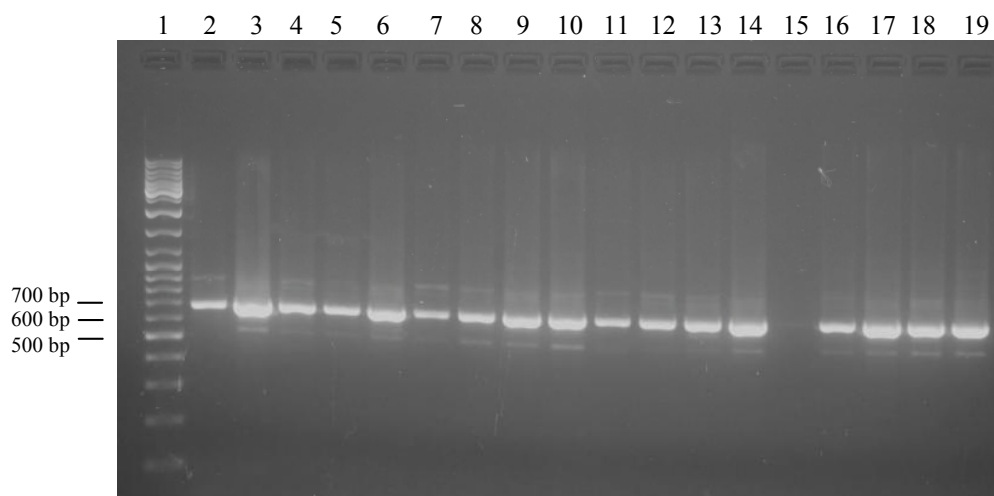


Abbildung 26: Expression von PID1 (*mwqp*-Isoform) in humanen Geweben (TBE, 1.2 %)

1: 0.5 µg GeneRuler, 2: Niere, 3: fet. Gehirn, 4: Leber, 5: Schilddrüse, 6: Herz, 7: Speicheldrüse, 8: Skelettmuskel, 9: Nebenniere, 10: fet. Leber, 11: Knochenmark, 12: Thymus, 13: Colon, 14: Uterus, 15: Lunge, 16: Luftröhre, 17: Gehirn, 18: Prostata, 19: Hoden

Das Ergebnis dieser PCR legt nahe, dass die *mwqp*-Isoform in allen hier untersuchten Geweben exprimiert wird (s. Abb.26). Einzige Ausnahme scheint die Lunge zu sein, wobei hier darauf hingewiesen werden muss, dass eine spätere Untersuchung der verwendeten Gewebe auf die Expression von Hypoxanthin-

Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRF; s. Abb.29) als Maß für ihren cDNA-Gehalt zeigte, dass die Lungengewebeprobe von nicht ausreichender Qualität war. Besonders hoch scheint die Expression der *mwqp*-Isoform im fetalen und im adulten Gehirn zu sein, ebenso im Herz, in Nebenniere und fetaler Leber, sowie im Uterus, Prostata und Hoden.

Weiterhin sollte für die Interpretation des Ergebnisses berücksichtigt werden, dass bei nahezu allen Versuchen zur DNA-Auftrennung im Agarosegel die Proben im Bereich der rechten Hälfte des Gels schneller gelaufen sind als die auf der linken Hälfte. Die erwartete Bande bei Expression der langen Variante der *mwqp*-Isoform liegt bei knapp unter 700 bp. Unter Berücksichtigung der ungleichmäßigen Verteilung der DNA-Fragmente im Gel lässt das Ergebnis dennoch den Schluss zu, dass es sich bei den hier sichtbaren deutlichen Banden tatsächlich um die erwartete *mwqp*-Isoform handelt.

Die bei einigen Gewebeproben zusätzlich auftretenden diskreten Banden bei ca. 500 bp könnten durch das Vorhandensein der kurzen *mwqp*-Isoform zustande kommen.

Als nächstes wurden die Gewebeproben hinsichtlich der Expression der PID1-*mpri*-Isoform untersucht. Die Bedingungen glichen hierbei den oben beschriebenen.

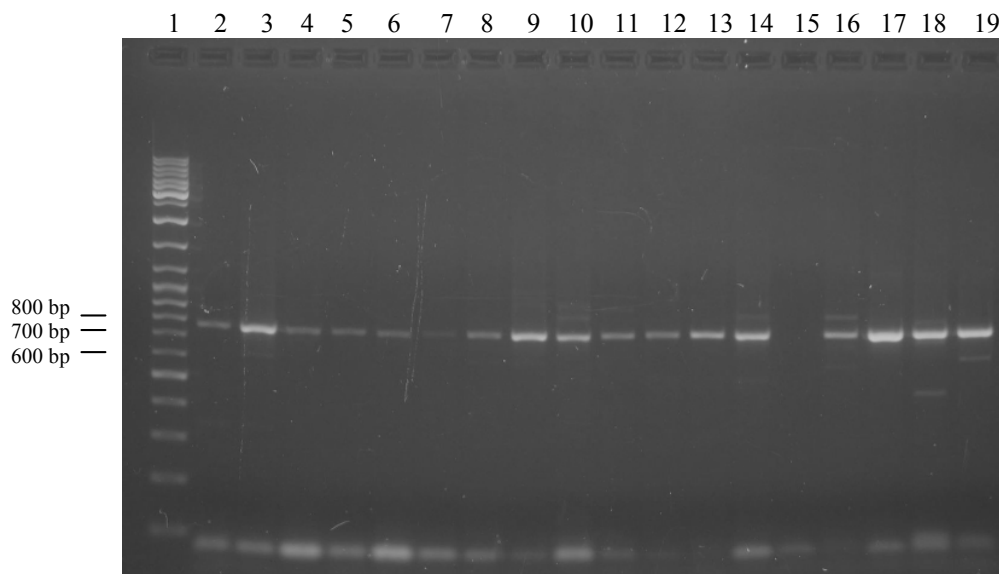


Abbildung 27: Expression von PID1 (*mpri*-Isoform) in humanen Geweben (TBE, 1,2 %)

1: 0,5 µg GeneRuler, 2: Niere, 3: fet. Gehirn, 4: Leber, 5: Schilddrüse, 6: Herz, 7: Speicheldrüse, 8: Skelettmuskel, 9: Nebenniere, 10: fet. Leber, 11: Knochenmark, 12: Thymus, 13: Colon, 14: Uterus, 15: Lunge, 16: Luftröhre, 17: Gehirn, 18: Prostata, 19: Hoden

Das hier gewonnene Ergebnis lässt ebenfalls auf eine Expression in allen untersuchten Geweben schließen (s. Abb.27), wobei auch hier die oben ausgeführten Erläuterungen Berücksichtigung finden müssen.

Es folgt nun die Untersuchung der Gewebeproben auf die Expression der PID1-*mfs1*-Isoform, bei der die Annealingtemperatur abweichend bei 57°C lag, was nach einer erneuten Überprüfung die optimale Temperatur für die hierbei verwendeten Primer zu sein schien.

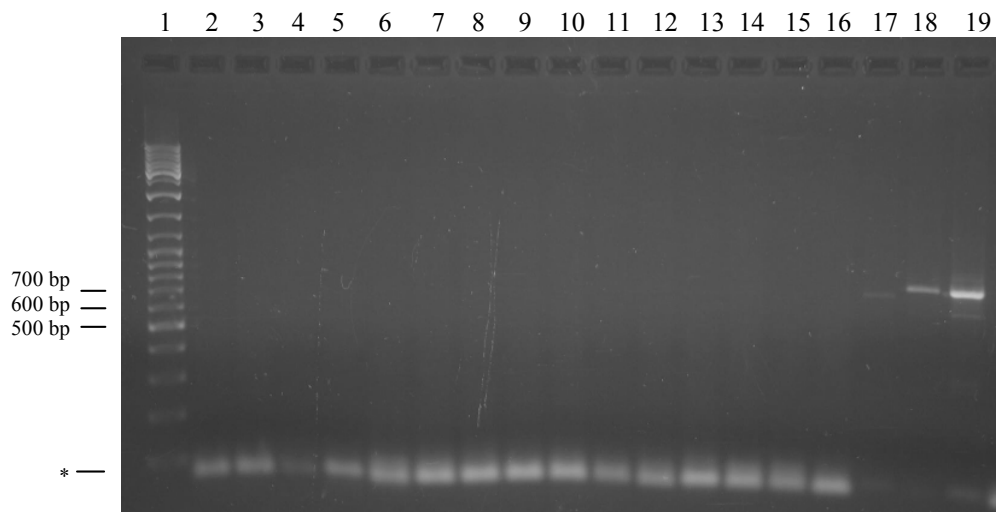


Abbildung 28: Expression von PID1 (*mfs1*-Isoform) in humanen Geweben (TBE, 1.2 %)

1: 0.5 µg GeneRuler, 2: Niere, 3: fet. Gehirn, 4: Leber, 5: Schilddrüse, 6: Herz, 7: Speicheldrüse, 8: Skelettmuskel, 9: Nebenniere, 10: fet. Leber, 11: Knochenmark, 12: Thymus, 13: Colon, 14: Uterus, 15: Lunge, 16: Luftröhre, 17: Gehirn, 18: Prostata, 19: Hoden. *: Primermultimere

Hier zeigt sich im Vergleich zu den beiden bisher untersuchten Isoformen ein deutlich anderes Ergebnis: nur in drei der Gewebeproben lässt sich eine Expression der *mfs1*-Isoform erkennen. Dieses sind Gehirn, Prostata und Hoden (s. Abb. 28). Allerdings muß hier darauf hingewiesen werden, dass bei Verwendung der Primer für die *mfs1*-Isoform bei allen Versuchen gehäuft eine Dimerisierung dieser Primer auftrat und das gewünschte Produkt nicht amplifiziert wurde.

Als Kontrolle bzw. Bezugswert des cDNA-Gehalts der Gewebeproben diente die Untersuchung der Expression von Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) als sog. *housekeeper* (ein ubiquitär in gleichem Umfang exprimiertes Gen) mittels spezifischer Primer:

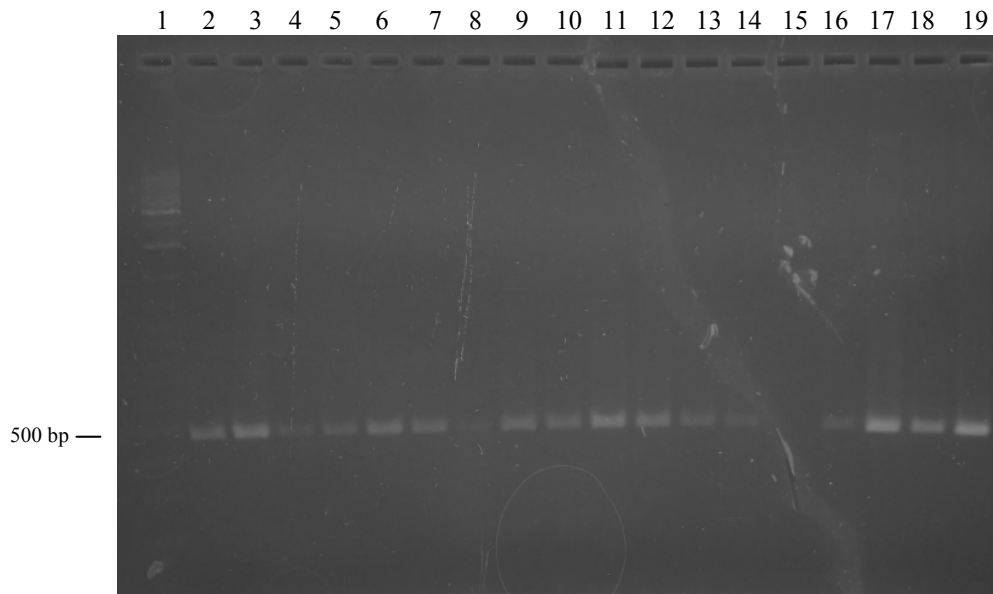


Abbildung 29: Expression von HGPRT in humanen Geweben (TBE, 1.2 %)

1: 0.5 µg GeneRuler, 2: Niere, 3: fet. Gehirn, 4: Leber, 5: Schilddrüse, 6: Herz, 7: Speicheldrüse, 8: Skelettmuskel, 9: Nebenniere, 10: fet. Leber, 11: Knochenmark, 12: Thymus, 13: Colon, 14: Uterus, 15: Lunge, 16: Luftröhre, 17: Gehirn, 18: Prostata, 19: Hoden

Hier wird deutlich, dass die Gewebeprobe „Lunge“ offenbar keine oder nicht genügend cDNA enthält, was für die Interpretation der Untersuchungen zur PID1-Expression zu berücksichtigen ist (s. Abb.29); diese Probe wurde deshalb für die weitere Analyse mittels TaqMan nicht verwendet. Auch andere Gewebeproben wie z.B. Leber und Skelettmuskel enthalten diesem Ergebnis nach sehr viel weniger cDNA als die Vergleichsproben, wohingegen Gehirn und Hoden vergleichsweise mehr enthalten. Korrekterweise müssen deshalb die PID1-PCR Ergebnisse auf die Amplifikation von HGPRT bezogen werden. Da hierbei weitere Ungenauigkeiten auftreten können, wurde die quantitative Analyse mit Hilfe der TaqMan *real-time*- PCR vorgenommen.

3.3.2 Real-time PCR-Untersuchung (TaqMan)

Die bisher durchgeführten PCR-Untersuchungen haben bereits einen Eindruck über das Expressionsmuster der PID1-Isoformen geliefert, genauere Aussagen lassen sich aufgrund der nur semiquantitativen Methode jedoch nicht machen. Die *real-time*-PCR bietet hingegen ein hohes Maß an Genauigkeit bzgl. des Umfangs, in dem ein Gen tatsächlich exprimiert wird (s. Kap. 2.2.3). Wie bereits erwähnt, wurden diese Untersuchungen nicht isoformenspezifisch durchgeführt, sondern beziehen sich auf die Gesamtheit der PID1-Isoformen mit Ausnahme der kurzen *mwqp*-Isoform, an welche die TaqMan-Sonde nicht bindet.

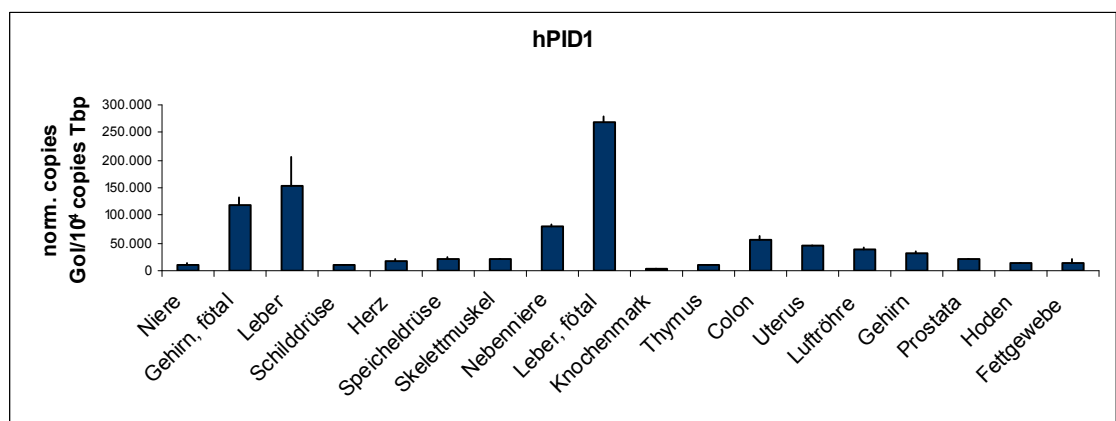


Abbildung 30: PID1-Expression in humanen Geweben. (GoI: *gene of interest*, Tbp: TATA bindingprotein)

Die höchste Expression von PID1 ist diesem Ergebnis zufolge in der Leber zu finden, sowohl in der adulten als auch in der fetalen. Hohe Expressionswerte sind außerdem im fetalen Gehirn und in der Nebenniere zu beobachten, wohingegen das Fettgewebe einen vergleichsweise niedrigen Wert aufweist (s. Abb.30). Dieses Verteilungsmuster deckt sich mit dem anderer Untersuchungen, die durch Datenbankrecherche gefunden wurden.

Als nächstes wurde untersucht, ob die PID1-Expression im Fettgewebe möglicherweise in einem erkennbaren Zusammenhang mit dem Körpergewicht der jeweiligen Person steht. Hierfür wurden Fettgewebeproben von normalgewichtigen (BMI unter 25) und übergewichtigen (BMI über 30) Personen verwendet.

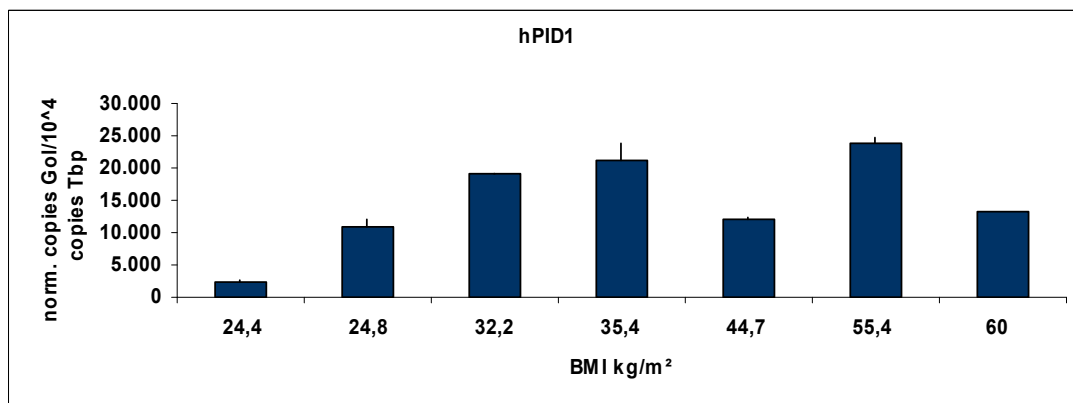


Abbildung 31: PID1-Expression in humanem Fettgewebe von Individuen mit unterschiedlichem BMI (n=7) (GoI: *gene of interest*, Tbp: *TATA bindingprotein*)

Die hier gewonnenen Ergebnisse lassen soweit keinen Zusammenhang erkennen, da sich weder eine mit steigendem BMI höhere noch eine niedrigere Expression von PID1 beobachten lässt (s. Abb.31).

Abschließend sollte gezeigt werden, ob und in welcher Form sich die Expression von PID1 während der Differenzierung von Adipozyten verändert.

Zu diesem Zweck wurde aus hMSC-Tert AD-Zellen die RNA zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten (Tag 0, 2, 5, 7, 10, 12, 14 und 16) isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde anschließend für die TaqMan-Analyse eingesetzt.

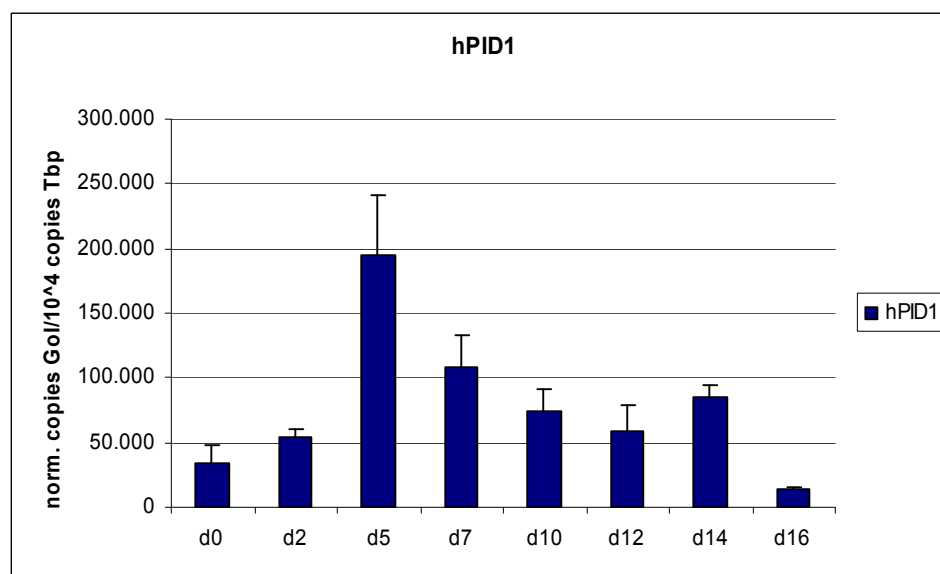


Abbildung 32: PID1-Expression in hMSC Tert AD Zellen zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten (GoI: *gene of interest*, Tbp: *TATA bindingprotein*)

PID1 wird diesem Ergebnis zufolge von Beginn an (Tag 0) exprimiert. Die Expression zeigt dann einen sprunghaften Anstieg von Tag 2 zu Tag 5. Im weiteren Verlauf bis zu Tag 16 fällt diese wieder ab, mit Ausnahme eines leichten erneuten Anstiegs an Tag 14 (s. Abb.32).

Diese Beobachtungen werden im Diskussionsteil mit dem zeitlichen Verlauf der LRP1-Expression in diesen Zelllinien in Beziehung gesetzt.

4 Diskussion

4.1 Vektorklonierung

Ein bakterieller Expressionsvektor für ein Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase (GST) und dem PTB-Adapterprotein PID1 konnte erfolgreich hergestellt werden, allerdings nur für eine Isoform des PID1-Proteins. Bei den Vektoren für die anderen Isoformen traten wiederholt Punktmutationen in der DNA-Sequenz auf, die einen Aminosäureaustausch zur Folge gehabt und in diesem Fall möglicherweise die Eigenschaften des kompletten Proteins verändert hätten. Zwar wurde bereits während der Arbeit die Polymerase für die PCR gewechselt und ein sog. *proofreading* Enzym verwendet (s. Kap. 3.1), welches laut Hersteller das Auftreten von Mutationen während der PCR minimieren soll; offenbar war dieses Enzym in seiner Funktion trotzdem nicht ausreichend. Für einen erneuten Versuch der Herstellung eines Vektors für das Protein sollte deshalb ein noch potenteres Enzym verwendet werden.

Zu Beginn der Arbeit war davon ausgegangen worden, dass PID1 in drei Isoformen vorliegt: *mfs1*-, *mpri*- und *mwqp*-Isoform. Während der Arbeitsgänge zur Vektorklonierung wurde bereits makroskopisch im Kontrollgel ein unerwartet kurzes Fragment der PID1-cDNA sichtbar. Nachdem das Ergebnis der Sequenzanalyse vorlag, zeigte sich, dass es sich hierbei um eine Variante der *mwqp*-Isoform handelt, welche ein Exon weniger enthält als die ursprünglich bekannte Form der entsprechenden cDNA und deshalb kürzer ist (nur 504 bp). Da diese Isoform somit nur zwei Exons enthält, soll sie im Weiteren als *mwqp2*-Isoform in Abgrenzung zur aus drei Exons bestehenden *mwqp3*-Isoform bezeichnet werden. Es kann also inzwischen von vier Isoformen des PID1 ausgegangen werden: *mfs1*-, *mpri*-, *mwqp2*- und *mwqp3*-Isoform (s. Abb. 33).

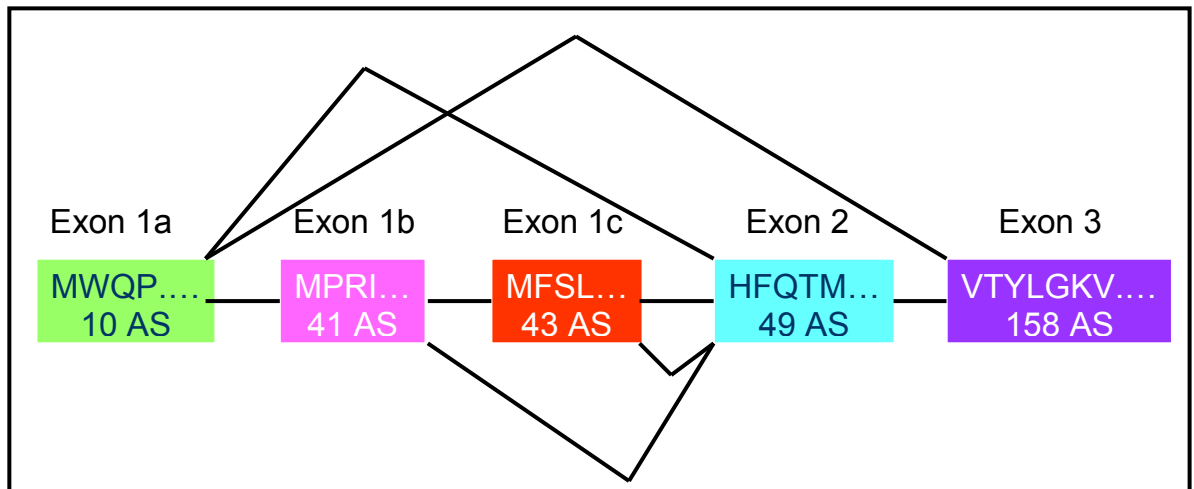


Abbildung 33: Schema der 4 PID1-Isoformen (Bezeichnung nach den jeweils N-terminalen AS-Sequenzen) *mpri*: Exon 1b+2+3 (744 bp), *mfsl*: Exon 1c+2+3 (750 bp), *mwqp3*: Exon 1a+2+3 (651 bp), *mwqp2*: Exon 1a+3 (504 bp)

Interessanterweise wurde diese neu entdeckte *mwqp2*-Isoform erst nach der Zwischenklonierung in den TOPO-Vektor sichtbar (s. Abb.13), während nach der zuvor durchgeführten ersten Amplifikation aus dem Fettgewebe bzw. aus anderen Geweben auf den jeweiligen Kontrollgelen nur die bekannte *mwqp3*-Isoform als Hauptbande zu sehen war (s. Abb.9). Es steht fest, dass die *mwqp2*-Isoform grundsätzlich vorhanden ist, ihre Sequenz ist in Datenbanken dokumentiert. Weshalb es bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten bei der Verwendung von Fettgewebe ausschließlich zur Isolierung der kurzen Variante kam, ist nicht klar. Es sind hierfür unterschiedliche Erklärungen möglich:

- *mwqp2* ist ein sehr viel besseres Substrat in der TOPO-Klonierungsreaktion als *mwqp3*
- *mwqp2* kann in Bakterien viel besser exprimiert werden, weil die zusätzlich in *mwqp3* enthaltenen Proteinsequenzen einen unbekanntem toxischen Einfluss auf die Bakterien ausüben
- auf beiden Seiten des *mwqp3*-Fragments befinden sich identische Primer, die sich nicht in den pGexKG-Vektor klonieren lassen

Bei späteren Experimenten der Arbeitsgruppe waren allerdings keine Auffälligkeiten bei der Klonierung des langen *mwqp3*-Fragments zu beobachten (persönliche Mitteilung von A. Rosche).

Eine sichere Aussage über das Vorkommen der *mwqp2*-Isoform ließe sich mit der *real-time*-PCR unter Verwendung von spezifischen TaqMan-Sonden sowohl für diese als auch für die *mwqp3*-Isoform treffen.

4.2 Proteinherstellung und Bindungsassays

4.2.1 Proteinherstellung

Das Fusionsprotein aus GST und der *mpri*-Isoform des PID1 konnte erfolgreich hergestellt werden; hierfür wurde ein eigens für diese Experimente klonierter Expressionsvektor verwendet. Die Versuchsbedingungen für Proteinexpression und -aufreinigung können noch optimiert werden: Denkbar wäre eine Absenkung der Temperatur während der Proteinexpression bei gleichzeitiger Verlängerung der Expressionsdauer. Hierbei wäre der zu erwartende Anteil verwertbaren Proteins deutlich erhöht, da mit verringerter Temperatur und langsamerer Proteinsynthese die Wahrscheinlichkeit der Bildung von *inclusion bodies* sinken sollte.

Inclusion bodies enthalten falsch gefaltete Proteine, die entstehen können, wenn innerhalb eines kurzen Zeitraums große Mengen an Protein hergestellt werden. Auf diese Weise schützt sich die Bakterienzelle vor großen Mengen fremden Proteins, das aggregiert bzw. unlöslich ist. In diesem Fall kann das Protein dann mit den gewöhnlichen Reinigungsprozeduren nur schwer und in geringen Mengen gewonnen werden. Senkt man zur Vermeidung dieses Vorgangs die Temperatur während der Expression, muss der Expressionszeitraum kompensatorisch verlängert werden (z.B. über Nacht), um ausreichende Mengen an Protein zur Verfügung zu stellen.

Der Umstand, dass sich nach dem Aufbrechen der Bakterienzellen durch Sonifikation im verbleibenden Zelltrümmerpellet, welches nicht weiterverwendet wird, noch eine relativ große Menge an Fusionsprotein zu befinden scheint (s. Abb.19), weist darauf hin, dass dieser Teil möglicherweise in den erwähnten Einschlusskörperchen lokalisiert ist. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, mit denen versucht werden kann, das Protein aus den Einschlusskörperchen wiederzugewinnen, diese sind allerdings recht aufwändig und garantieren keinen unbedingten Erfolg. Somit wären die oben beschriebenen Maßnahmen zur Vermeidung des Auftretens von *inclusion bodies* wahrscheinlich aussichtsreicher. Nach Durchführung aller Reinigungsschritte liegt das Fusionsprotein gebunden an Glutathion (GSH) vor; dies stellt keine Behinderung dar für Bindungsexperimente, wie sie in dieser Arbeit im Weiteren durchgeführt wurden.

Problematisch kann der GST-Anteil des Fusionsproteins allerdings bei der Untersuchung mit verschiedenen Antikörpern im Western Blot werden, da eine

große Zahl von spezifischen Antikörpern gegen andere Proteine zusätzlich mit GST interagiert, was eine korrekte Interpretation des Western Blots unmöglich macht. Diese Situation kommt dadurch zustande, dass für die biotechnologische Herstellung von Antikörpern in vielen Fällen ebenfalls ein GST-Fusionsprotein als Antigen genutzt wird, so dass die auf diese Weise produzierten Antikörper immer auch gegen GST reagieren.

Im Falle des im Rahmen dieser Arbeit hergestellten PID1-GST-Fusionsproteins gibt es die Möglichkeit, die Probleme, die dadurch beim Western Blot auftreten können, zu vermeiden indem man den GST-Anteil des Proteins entfernt. Dieses erfolgt mit Hilfe der Protease Thrombin, die das Fusionsprotein zwischen GST und PID1 trennen kann und dafür eine Schnittstelle benutzt, die im verwendeten pGex-KG-Vektor kodiert wird (s. Abb.8: Vektorkarte pGex-KG). So kann das Fusionsprotein mit Hilfe des GST-Anteils zunächst an GSH gebunden und auf diese Weise von den restlichen Zellbestandteilen getrennt werden; die anschließende Behandlung mit Thrombin trennt dann das PID1 vom an das GSH gebundene GST, so dass das reine PID1-Protein für weitere Experimente zur Verfügung steht.

4.2.2 Bindungsexperimente

Durch Inkubation von GST-PID1-Fusionsprotein mit HuH7-Zelllysat und anschließendem Bindungsnachweis mit Hilfe von Antikörpern gegen LRP1-ICD konnte gezeigt werden, dass PID1 Bindungspartner von LRP1 ist; bei diesen Experimenten wurde der Umstand genutzt, dass HuH7-Leberzellen (Hepatomzellen) große Mengen an LRP1 enthalten.

Die weiteren Bindungsexperimente mit Zelllysaten, die aus stimulierten HuH7-Zellen gewonnen wurden, sollten Aufschluss darüber geben, ob eine durch die Stimulation bewirkte Phosphorylierung der LRP1-ICD einen erkennbaren Einfluss auf das Bindungsverhalten von PID1 hat.

Zu diesem Zweck erfolgte zunächst eine Stimulation der Zellen mit PDGF-BB. Diese führt zu einer Phosphorylierung des Tyrosinrestes im distalen NPxY-Motiv der LRP1-ICD (Boucher et al. 2002, Loukinova et al. 2002).

Bei der Analyse im Western Blot zeigte sich, dass im Zelllysate der mit PDGF-BB stimulierten Zellen eine größere Menge an LRP1 erscheint als beim unstimulierten Lysat (s. Abb.23), obwohl von beiden Lysaten die gleiche Menge an

Gesamtprotein eingesetzt worden war, wie auch durch die Ponceau-Färbung der Membran gezeigt wird. Somit stellt sich hier die Frage, ob und in welcher Weise die Stimulation mit PDGF innerhalb von 15 Minuten die Menge an LRP1 in der Zelle erhöhen könnte. Eine mögliche Erklärung ist, dass unter Einfluss von PDGF der Abbau von LRP1 verlangsamt wird, so dass insgesamt eine größere Menge an LRP1 in der Zelle bzw. an der Zelloberfläche verbleibt. Eine andere Erklärung wäre die Verschiebung von LRP1 in Zellkompartimente, aus denen LRP1 unter den verwendeten Bedingungen effektiver herausgelöst werden kann. Die Beeinflussung der Expression von LRP1 durch PDGF als mögliche Ursache für die größere LRP1-Menge ist in diesem Versuch hingegen unwahrscheinlich, da die Zeitspanne zu kurz war, als dass eine Modifikation der Genexpression in Form von veränderter Proteinkonzentration hätte sichtbar werden können.

Interessanterweise scheint PID1 jedoch nicht stärker an die tyrosinphosphorylierte LRP1-ICD zu binden: Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle mit dem geringeren LRP1-Anteil im Input erscheint nach der PDGF-Stimulation eher weniger LRP1 im Eluat. Das würde bedeuten, dass PID1 weniger stark an diese Form des LRP1 gebunden haben muss, was ein Hinweis auf die Bevorzugung von unphosphoryliertem Tyrosin im Rahmen des NPxY-Motivs sein könnte. Diese Beobachtung stimmt gut mit Ergebnissen überein, die inzwischen in der Arbeitsgruppe durch *in vitro* Phosphorylierungsexperimente erhalten wurden. Demnach wird die Bindung von PID1 an das distale NPxY-Motiv der LRP1-ICD durch phosphoryliertes Tyrosin gehemmt (persönliche Mitteilung von B. Hoffzimmer).

Die Phosphorylierung von Serin- und/oder Threoninresten der LRP1-ICD erhöht den Grad der Tyrosinphosphorylierung des distalen NPxY-Motivs, was wiederum Einfluss auf dessen Interaktion mit PTB-Adapterproteinen hat. So konnte gezeigt werden, dass bei Vorliegen von phosphoryliertem Tyrosin die Endozytoserate der Zelle geringer ist als bei unphosphoryliertem Tyrosin (Ranganathan et al. 2004); unter diesem Umstand scheint die LRP1-ICD also in geringerem Maße mit PTB-Proteinen des Endozytoseapparats zu interagieren.

Die Serinphosphorylierung erfolgt durch Aktivierung der Proteinkinase A (PKA); dies kann z.B. durch Erhöhung des intrazellulären cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat)-Spiegels erreicht werden (Li et al. 2001). In dieser Arbeit wurde dazu Forskolin eingesetzt, welches bei HuH7-Zellen durch direkte

Aktivierung der Adenylatzyklase die intrazelluläre cAMP-Erhöhung bewirkt und damit zur PKA-Aktivierung führt.

Eine gleichzeitige Serin- und Threoninphosphorylierung der LRP1-ICD bewirkt die Aktivierung der Proteinkinase $C\alpha$ (PKC α); bei dieser Arbeit sollte dies durch den Einsatz des Phorbolesters PMA zur Stimulation erreicht werden.

Im Western Blot waren bei beiden Stimulationsverfahren ähnliche Mengen an LRP1 im Input zu beobachten, allerdings ließ sich ein Unterschied in der Bindung von PID1 an die LRP1-ICD der verschiedenen behandelten Zelllysate erkennen (s. Abb. 25).

Bei der mit PMA durchgeführten Stimulation (Serin- und Threoninphosphorylierung) ist LRP1 im Western Blot nicht nachweisbar. Dies lässt den Schluss zu, dass die LRP1-ICD aus dem verwendeten Zelllysate nicht an das Fusionsprotein gebunden hat.

Bei der Forskolin-Stimulation (Serinphosphorylierung) hingegen ist LRP1-ICD im Eluat nachweisbar - PID1 scheint hier an diese gebunden zu haben, wenn auch in viel geringerem Maß als im Vergleich zu den Versuchen mit unstimulierten Zellen. Hier ist eine größere Anzahl von Versuchen mit qualitativer Auswertung des Western Blots nötig.

Fasst man diese Beobachtungen zusammen, so könnte die mögliche Ursache für die anscheinend weniger starke Bindung von PID1 an die LRP1-ICD der stimulierten HuH7-Zellen an der dadurch verursachten Phosphorylierung der ICD liegen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass PID1 zu derjenigen Gruppe der PTB-Adapterproteinen gehört, die unphosphoryliertes Tyrosin im Rahmen des NPxY-Motivs für ihre Bindung bevorzugen.

Allerdings muss bedacht werden, dass die beobachteten Ergebnisse möglicherweise nicht auf die Phosphorylierung der LRP1-ICD zurückzuführen sind, sondern auch durch andere Interaktionen auf zellulärer Ebene zustande gekommen sein könnten. Dies aber kann im Rahmen eines solchen Bindungsassays nicht differenziert werden; hier sind deshalb weiterführende Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene notwendig.

4.3 Gewebeverteilung von PID1

4.3.1 Isoformenspezifische semiquantitative PCR-Untersuchung

Die isoformenspezifische Untersuchung der Gewebeverteilung von PID1 wurde mittels semiquantitativer PCR im Sinne einer qualitativen Analyse durchgeführt. Diese zeigte, dass sowohl die *mpri*- als auch die *mwqp3*-Isoform in allen untersuchten humanen Geweben exprimiert werden (s. Abb. 26 und 27). Die *mpri*-Isoform wird demnach im Vergleich zur *mwqp3*-Isoform insgesamt weniger stark exprimiert. Unter Berücksichtigung der beobachteten Unterschiede im Gesamtexpressionsniveau ist hier eine Korrelation des Expressionsniveaus in den einzelnen Gewebetypen zu erkennen: In fetalem bzw. adultem Gehirn, Herz, Nebenniere, fetaler Leber, Uterus, Prostata und Hoden ist für beide Isoformen im Vergleich zu den übrigen untersuchten Geweben eine jeweils höhere Expression zu beobachten.

Außerdem fällt auf, dass bei allen auf die Expression der *mwqp3*-Isoform untersuchten Geweben mit Ausnahme der Niere eine diskrete zusätzliche Bande bei etwa 500 bp zu sehen ist. Diese Banden könnten durch das Vorhandensein der kurzen *mwqp2*-Isoform zustande kommen; sie wären somit Zeichen dafür, dass diese Isoform ebenfalls in fast allen untersuchten Geweben exprimiert wird.

Das Expressionsmuster der *mfs1*-Isoform ist dieser PCR-Untersuchung zufolge deutlich von dem der beiden bzw. der drei anderen Isoformen zu unterscheiden. Eine Amplifizierung des für *mfs1* kodierenden Bereichs gelang nur aus den Geweben adultes Gehirn, Prostata, Hoden und Fettgewebe. Ob dieser Umstand tatsächlich bedeutet, dass diese Isoform des PID1 nur dort exprimiert wird, ist unklar, da die verwendeten Primer stark zur Dimerisierung neigen; das gewonnene Ergebnis spiegelt deshalb möglicherweise nicht die tatsächliche Gewebeverteilung wider. Entspräche das Ergebnis der Untersuchung den Umständen *in vivo*, könnte das ein Hinweis auf die Beteiligung der *mfs1*-Isoform an Vorgängen sein, die ausschließlich in diesen Geweben stattfinden.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Gewebeverteilung der PID1-Isoformen bzw. für das Vorkommen von unterschiedlichen Isoformen des PID1-Proteins generell könnte die Steuerung der Transkription durch verschiedene Promoterregionen auf der DNA sein, die jeweils vor dem ersten Exon der drei Isoformen des PID1 Gens liegen. Auf diese Weise könnte die Expression des PID1-Proteins durch unterschiedliche regulatorische Elemente auf DNA-Ebene

gesteuert werden, um die Menge an zur Verfügung stehendem Protein genau dem Bedarf des jeweiligen Gewebes anzupassen.

Um eine sichere Aussage zu Unterschieden im Expressionsmuster der einzelnen PID1-Isoformen treffen zu können, wäre die Untersuchung mittels spezifischer TaqMan-Sonde für jede der vier Isoformen der nächste Schritt.

4.3.2 *Real-time* PCR-Untersuchung (TaqMan)

Die nicht-isoformenspezifische quantitative Untersuchung der PID1-Expression in humanen Geweben mittels *real-time* PCR zeigt ein Vorkommen des Proteins in allen untersuchten Geweben (s. Abb.30). Die mit Abstand höchste Expression von PID1 ist dabei in der fetalen Leber zu beobachten. Die zweithöchste Expression zeigt sich in der adulten Leber. An dritter Stelle steht das fetale Gehirngewebe, an vierter Stelle der Gewebe mit besonders hoher PID1-Expression ist die Nebenniere einzuordnen. Interessanterweise ergibt die Analyse einen vergleichsweise niedrigen Expressionswert sowohl im Fettgewebe als auch in den Geweben von Herz und Skelettmuskel. Dies ist insofern erstaunlich, da in der Literatur das Vorkommen des PID1-Proteins als auf diese Gewebe beschränkt beschrieben worden ist (Wang et al. 2006). Hierbei muss erwähnt werden, dass die dort durchgeführte PCR-Methode nur semiquantitativ war.

Setzt man allerdings die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse in Bezug zu denen in der GEO-Profiles-Datenbank, so sind die beobachteten Verteilungsmuster von PID1 vergleichbar, denn auch hier werden besonders hohe Werte für die Gewebe Leber (*liver*), fetales Gehirn (*fetal brain*) und Nebenniere (*adrenal gland*) beschrieben (s. Abb.34). Ein Unterschied zur vorliegenden Arbeit besteht jedoch im vergleichsweise niedrigen Expressionswert im fetalen Lebergewebe. Möglicherweise ist dieser darin begründet, dass die jeweils untersuchten Gewebeproben zu unterschiedlichen Entwicklungszeiträumen gewonnen wurden, denn die Bezeichnung eines Gewebes als „fetal“ umfasst einen Zeitraum von der neunten Woche intrauterin bis zum Zeitpunkt der Geburt. Leider war es weder bei der in dieser Arbeit verwendeten Probe noch bei der in GEO-Profiles untersuchten möglich, nähere Information zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme zu erlangen.

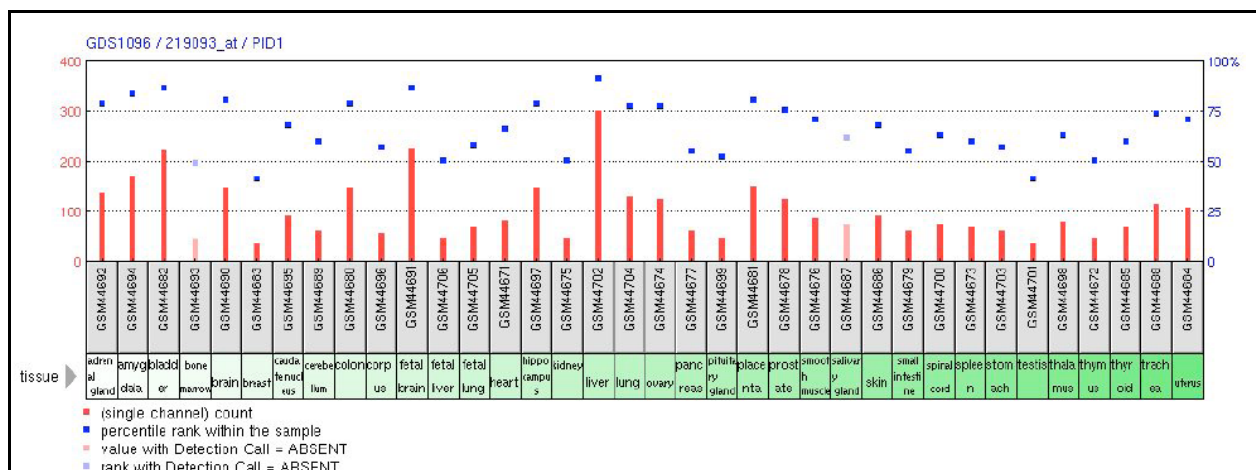


Abbildung 34: PID1-Expressionsmuster in humanen Geweben (Normalgewebe; RNA von verschiedenen Personen gepoolt) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/gds>) rote Balken: Menge an individuellen Transkripten je Probe gemessen in Counts (linke Y-Achse), blaue Quadrate: Genexpression im Verhältnis zu allen anderen Genen des Arrays in Prozent (rechte Y-Achse), verblaste Balken/Quadrate: Auswertung möglicherweise ungenau

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wird eine besonders hohe PID1-Expressionsrate in fetaler Leber und fetalem Hirn beobachtet, die insgesamt höher ist als in den gleichen Geweben erwachsener Individuen. Dies lässt Rückschlüsse auf die Beteiligung des Proteins an Signaltransduktionsprozessen während der Gehirn- bzw. Leberentwicklung zu, wie sie für seinen Bindungspartner LRP1 beschrieben werden (Herz et al. 1992, May und Herz 2003, Roebroek et al. 2006).

Die im Vergleich zu anderen adulten Geweben sehr hohe Expression von PID1 in der Leber könnte Ausdruck seiner Einbindung in die von LRP1 vermittelten Vorgänge bei der Regulation des postprandialen Lipoproteinstoffwechsels sein (Beisiegel et al. 1989, Kowal et al. 1989). Hierbei wäre eine Rolle bei der Herstellung des Kontakts der LRP1-ICD zum Endozytoseapparat der Zelle denkbar, um die schnelle ApoE-vermittelte Aufnahme von Chylomikronenremnants zu gewährleisten.

Die Nebennierenrinde ist einer der Hauptorte der Produktion von Steroidhormonen. Hier werden Glukokortikoide (z.B. Cortisol), Mineralokortikoide (Aldosteron) und schwach wirksame Androgene (Testosteron) hergestellt, deren Synthese in allen Fällen vom Cholesterin ausgeht (Lüllmann-Rauch 2003). Möglicherweise spielt auch hier die durch LRP1 vermittelte Aufnahme von Lipoproteinen zur Bereitstellung des benötigten Cholesterins eine Rolle, wobei wiederum PID1 als intrazellulärer Adapter beteiligt sein könnte.

Vergleicht man das PID1-Expressionsmuster mit dem für LRP1 ermittelten in der gleichen Datenbank, wird noch einmal deutlich, dass auch LRP1 wie erwartet hier in allen untersuchten Geweben exprimiert wird. Eine vergleichbar hohe Expressionsrate von PID1 und LRP1 zeigt sich demnach in adulter Leber und fetalem Gehirn (s Abb. 35).

Andere Gewebe, in denen sich die LRP1-Expression vergleichsweise hoch, aber überproportional zu der von PID1 darstellt, sind Lunge (*lung*), Ovar (*ovary*) sowie Rückenmark (*spinal cord*) und Kleinhirn (*cerebellum*). Dieser Umstand könnte eine Interaktion von LRP1 mit vornehmlich anderen Adapterproteinen als PID1 in diesen Geweben vermuten lassen.

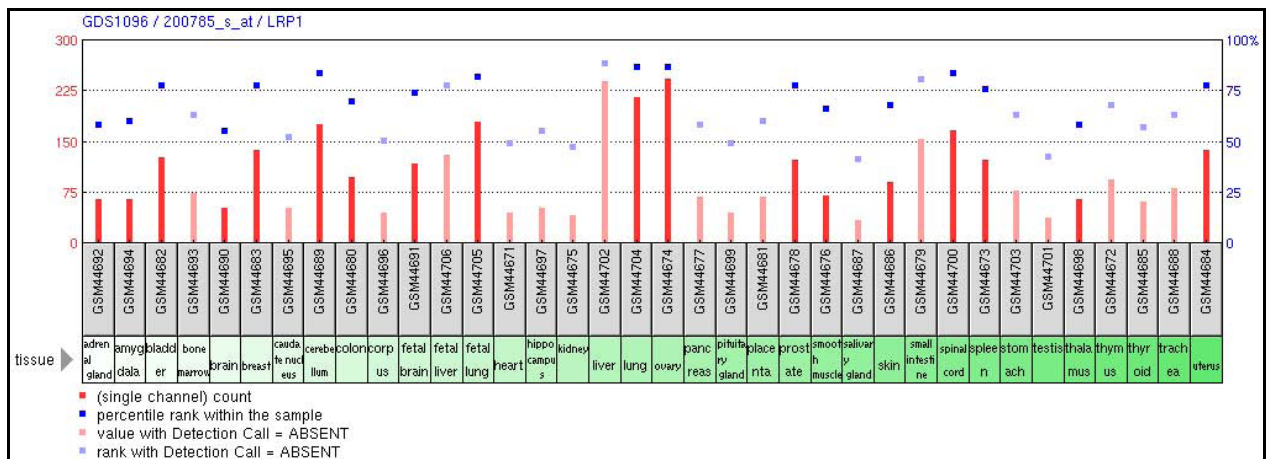


Abbildung 35: LRP1-Expressionsmuster in humanen Geweben (Normalgewebe; RNA von verschiedenen Personen gepoolt) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/gds>) rote Balken: Menge an individuellen Transkripten je Probe gemessen in Counts (linke Y-Achse), blaue Quadrate: Genexpression im Verhältnis zu allen anderen Genen des Arrays in Prozent (rechte Y-Achse), verblaste Balken/Quadrate: Auswertung möglicherweise ungenau

4.4 PID1-Expression während der Adipozytendifferenzierung

Die verwendeten hMSC-Tert AD-Zellen sind humane mesenchymale Stammzellen, die durch stabile Telomerase-Expression immortalisiert und adipozytär differenziert sind. Sie werden u.a. als Modell für die Untersuchung des Lipidstoffwechsels verwendet (Prawitt et al. 2008). Die Zellen werden in einem Kulturmedium angezchtet, dem Substanzen zugesetzt werden, die die Differenzierung zu Adipozyten gewährleisten. Zu diesen Substanzen gehören Dexamethason, IBMX (Isobutylmethylxanthin), Rosiglitazon, UO126 (ein MEK-Inhibitor) und Insulin.

PID1 wird in diesen Zellen von Beginn an (Tag 0) exprimiert. Die Expressionsrate steigt zwischen Tag zwei und fünf sprunghaft an. Bis zum Experimentende (Tag 16) nimmt sie wieder ab; Ausnahme ist ein leichter Anstieg an Tag 14 (s. Abb. 32). Vergleicht man den zeitliche Verlauf des Expressionsmusters mit dem bei LRP1 beobachteten, so zeigt sich, dass auch LRP1 vom frühesten untersuchten Zeitpunkt an (Tag 2) exprimiert wird und die Expression stetig ansteigt, bis ihr Maximum an Tag neun erreicht ist, also etwas später als bei PID1. Danach fällt die Expression abrupt ab, zeigt aber ebenfalls einen erneuten leichten Anstieg an Tag 14 (s. Abb. 36).

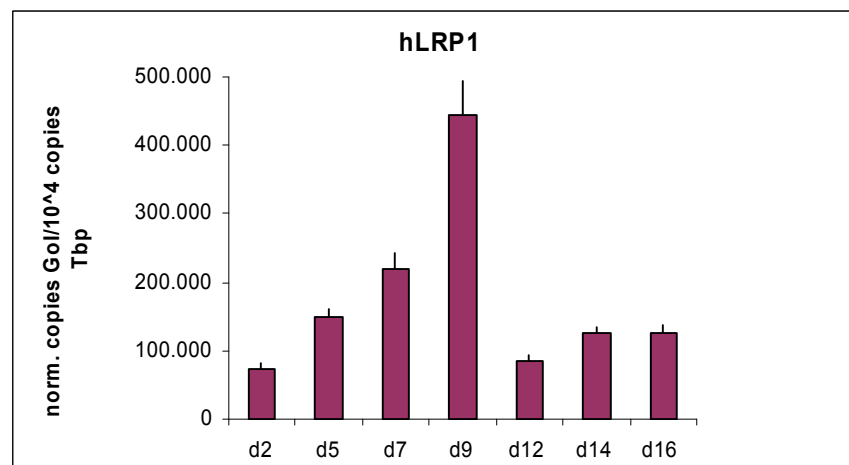


Abbildung 36: LRP1-Expression in hMSC Tert AD Zellen zu unterschiedlichen Differenzierungszeitpunkten (freundlich zur Verfügung gestellt von D. Lasrich, Hamburg) (GoI: *gene of interest*, Tbp: *TATA bindingprotein*)

Die Differenzierung der hMSC-Tert AD-Zellen wird *in vitro* durch die Zugabe der o. g. Substanzen gewährleistet, zu denen auch das Hormon Insulin zählt. Insulin stimuliert den Glukosetransport in Fett- und Skelettmuskelzellen und übernimmt zahlreiche weitere Funktionen im Organismus und auf zellulärer Ebene. Ein

entscheidender Umstand für die bei diesem Experiment gemachten Beobachtungen könnte die durch Insulin induzierte Erhöhung des LRP1-Gehalts an der Zelloberfläche von Adipozyten sein. Dies gilt als einer der bekannten Effekte von Insulin (Corvera et al. 1989, Zhang et al. 2004), und macht vermutlich eine Steigerung der LRP1-Expression erforderlich. Möglicherweise bewirkt die auf diese Weise gesteigerte Menge an LRP1 über einen Mechanismus im Sinne eines positiven *feedbacks* auch eine erhöhte Expression seines Adapterproteins PID1. Denkbar wäre auch, dass die durch Insulin zur verstärkten Expression angeschalteten Regulationsmechanismen gleichzeitig auf die Expression von PID1 wirken, das als Adapterprotein für LRP1 benötigt wird. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse lassen ein Zusammenwirken dieser beiden Proteine bei den Differenzierungsprozessen innerhalb der untersuchten Adipozyten vermuten.

Neueste Untersuchungen, die sich mit den möglichen physiologischen Funktionen von PID1 beschäftigen, haben weitere Hinweise auf dessen Beteiligung an Insulin-vermittelten Stoffwechselprozessen geliefert: So lässt sich bei Überexpression von PID1 in Adipozyten (3T3-L1) eine Verringerung des Insulin-stimulierten Glukosetransport in die Zellen beobachten (Zhang et al. 2009).

4.5 PID1-Expression in humanem Fettgewebe bei Individuen mit unterschiedlichem BMI

Mit dieser ebenfalls mit *real-time* PCR durchgeführten Untersuchung sollte versucht werden, die in der Literatur beschriebene höhere PID1-Expression bei übergewichtigen Individuen im Vergleich zu normalgewichtigen (Wang et al. 2006) nachzuvollziehen. Für die Definition des Übergewichts wurde der Bodymassindex (BMI: Körpergewicht in kg/ Körpergröße in m²) herangezogen. Als übergewichtig gilt demnach eine Person mit einem BMI von 30 oder darüber, normalgewichtig ist eine Person mit einem BMI zwischen 18,5 und 24,9 (Herold 2006).

Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente ließ sich jedoch keine Korrelation zwischen BMI und PID1-Expressionshöhe erkennen (s. Abb. 31). Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass im oben zitierten Experiment die Untersuchung der PID1-Expression mittels semiquantitativer PCR erfolgte, während in dieser Arbeit für diese Analyse die *real-time* PCR verwendet wurde, mittels derer sich genauere Aussagen über die Quantität der Expression treffen lassen.

Denkbar wäre auch, dass der hier verwendete Fettgewebeprobenumfang mit definiertem BMI zu klein ist, um ein repräsentatives Ergebnis zu erzielen. Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Gewebeprobe von Personen mit normalgewichtigen BMI von Individuen gewonnen wurden, die sich aufgrund einer bösartigen Erkrankung der operativen Therapie unterzogen hatten. Möglicherweise unterscheidet sich der Fettstoffwechsel dieser Personen von dem normalgewichtiger Gesunder.

Für zukünftige Untersuchungen wäre es sinnvoll, eine Fettgewebsdatenbank einzurichten, die auch Proben von normalgewichtigen und gesunden Individuen enthält, um gerade im Hinblick auf die Erforschung von Adipositasentwicklung eine ausreichend große Kontrollgruppe zur Verfügung zu stellen.

Zusammenfassung

Im Rahmen der experimentellen Arbeit konnte ein Vektor kloniert werden, der die bakterielle Herstellung von GST-Fusionsprotein mit der *mpri*-Isoform des PID1-Adapterproteins erlaubt.

Eine vierte Isoform des PID1-Proteins wurde nachgewiesen: Sie besteht aus einer verkürzten Form der bereits bekannten *mwqp*-Isoform (PID1-*mwqp2*).

Durch GST-*pull down* Experimente konnte der Nachweis erbracht werden, dass PID1 Bindungspartner von LRP1 ist. Die durchgeführten Bindungsexperimente liefern Hinweise auf eine bevorzugte Bindung von PID1 an unphosphoryliertes Tyrosin im distalen NPxY-Motiv der LRP1-ICD.

Die Untersuchungen zur Gewebeverteilung von PID1 bestätigten für die PID1-*mpri* und PID1-*mwqp3* eine ubiquitäre Expression in den untersuchten Humangeweben.

Die *mfs1*-Isoform wird nach den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten von adultem Gehirn, Prostata, Hoden sowie Fettgewebe exprimiert.

Die Untersuchung der PID1-Expression während der Adipozytendifferenzierung offenbarte einen der LRP1-Expression nahezu gleichen Verlauf; dies macht ein Zusammenwirken beider Proteine im Differenzierungsprozess wahrscheinlich.

Ausgehend von den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten ergeben sich keine Anhaltspunkte für einen Zusammenhang zwischen PID1-Expression im Fettgewebe und Übergewicht.

Die bis heute bekannten vielfältigen Funktionen, die LRP1 im Organismus übernimmt sowie die Rolle, die unterschiedliche PTB-Proteine bei der Entstehung bestimmter Erkrankungen spielen, lassen vermuten, dass auch PID1 eine noch unbekannte Bedeutung in wichtigen Stoffwechsel- und Entwicklungsprozessen zukommt.

Literaturverzeichnis

- Barnes H., Ackermann E., van der Geer P. (2003): v-Src induces Shc binding to tyrosine 63 in the cytoplasmatic domain of the LDL receptor-related protein 1. *Oncogene* **22**, 3589-3597
- Barnes H., Larsen B., Tyers M., van der Geer P. (2001): Tyrosine-phosphorylated low density lipoprotein receptor-related protein 1 (Lrp1) associates with the adaptor protein SHC in SRC-transformed cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 19119-19125
- Baroni M.G., D'Andrea M.P., Montali A., Pannitteri G., Barilla F., Campagna F., Mazzei E., Lovari S., Seccareccia F., Campa P.P., Ricci G., Pozzilli P., Urbinati G., Arca M. (1999): A common mutation of the insulin receptor substrate-1 gene is a risk factor for coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 2975-2980
- Beffert U., Stolt P.C., Herz J. (2004): Functions of lipoprotein receptors in neurons. *J. Lipid Res.* **45**, 403-409
- Beisiegel U., Weber W., Ihrke G., Herz J., Stanley K.K. (1989): The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* **341**, 162-164
- Bock H.H., Herz J. (2003): Reelin activates Src family tyrosine kinases in neurons. *Curr. Biol.* **13**, 18-26
- Bonifacino J.S., Traub L.M. (2003): Signals for sorting transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 395-447
- Boucher P., Gotthardt M. (2004): LRP and PDGF signaling: a pathway to atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* **14** (2), 55-60
- Boucher P., Gotthardt M., Li W.P., Anderson R.G., Herz J. (2003): LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science* **300**, 329-332
- Boucher P., Liu P., Gotthardt M., Hiesberger T., Anderson R.G., Herz J. (2002): Platelet-derived growth factor mediates tyrosine phosphorylation of the cytoplasmatic domain of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in caveolae. *J. Biol. Chem.* **277**, 15507-15513
- Brown M.S., Goldstein J.L. (1986): A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**, 34-47
- Caratù G., Allegra D., Bimonte M., Schiatarella G.G., D'Ambrosio C., Scaloni A., Napolitano M., Russo T., Zambrano N. (2007): Identification of the ligands of protein interaction domains through a functional approach. *Mol. & Cell. Proteomics* **6**, 333-345
- Chen W.J., Goldstein J.L., Brown M.S. (1990): NPXY, a sequence often found in cytoplasmatic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **265**, 3116-3123

- Corvera S., Graver D.F., Smith R.M. (1989): Insulin increases the cell surface concentration of alpha2-macroglobulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. Altered transit of the receptor among intracellular endocytotic compartments. *J. Biol. Chem.* **264**, 10133-10138
- D'Arcangelo G., Homayouni R., Keshvara L., Rice D.S., Sheldon M., Curran T. (1999): Reelin is a ligand for lipoproteinreceptors. *Neuron* **24**, 471-479
- Garcia C.K., Wilund K., Arca M., Zuliani G., Fellin R., Maioli M., Calandra S., Bertolini S., Cossu F., Grishin N., Barnes R., Cohen J.C., Hobbs H.H. (2001): Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science* **292**, 1394-1398
- Gotthardt M., Trommsdorf M., Nevitt M.F., Shelton J., Richardson J.A., Stockinger W., Nimpf J., Herz J. (2000): Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *J. Biol. Chem.* **275**, 25616-25624
- Heeren J., Grewal T., Jäckle S., Beisiegel U. (2001): Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. *J. Biol. Chem.* **276**, 42333-42338
- Herold G. (2006): Innere Medizin. Eigenverlag, 609
- Herz J., Clouthier D.E., Hammer R.E. (1992): LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* **71**, 411-421
- Herz J., Hamann U., Rogne S., Myklebost O., Gausepohl H., Stanley K.K. (1988): Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J.* **7**, 4119-4127
- Herz J., Strickland D.K. (2001): LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J. Clin. Invest.* **108**, 779-784
- Hiesberger T., Trommsdorf M., Howell B.W., Goffinet A., Mumby M.C., Cooper J.A., Herz J. (1999): Direct binding of reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* **24**, 481-489
- Howell B.W., Hawkes R., Soriano P., Cooper J.A. (1997): Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* **389**, 733-737
- Howell B.W., Herrick T.M., Hildebrandt J.D., Zhang Y., Cooper J.A. (2000): Dab1 tyrosine phosphorylation sites relay positional signals during mouse brain development. *Curr. Biol.* **10**, 877-885

- Hu Q., Cool B., Wang B., Hearn M.G., Martin G.M. (2002): A candidate molecular mechanism for the association of an intronic polymorphism of FE65 with resistance to very late onset dementia of the Alzheimer type. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 465-475
- Hussain M.M., Strickland D.K., Bakillah A. (1999): The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu. Rev. Nutr.* **19**, 141-172
- Jones C., Hammer R.E., Li W.P., Cohen C., Hobbs H.H., Herz J. (2003): Normal sorting but defective endocytosis of the low density lipoprotein receptor in mice with autosomal recessive hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* **278**, 29024-29030
- Kiss R.S., Ma Z., Nakada-Tsukui K., Brugnera E., Vassilou G., McBride H.M., Ravichandran K.S., Marcel Y.L. (2006): The lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP) adapter protein GULP mediates trafficking of the LRP ligand prosaposin, leading to sphingolipid and free cholesterol accumulation in late endosomes and impaired efflux. *J. Biol. Chem.* **281**, 12081-12092
- Kowal R.C., Herz J., Goldstein J.L., Esser V., Brown M.S. (1989): Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5810-5814
- Lambert de Rouvroit C., Goffinet A.M. (1998): The reeler mouse as a model of brain development. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **150**, 100-106
- Li Y., von Kerkhof P., Marzolo M.P., Strous G.J., Bu G. (2001): Identification of a major cyclic AMP-dependent protein kinase A phosphorylation site within the cytoplasmic tail of the low-density lipoprotein receptor-related protein: implication for receptor-mediated endocytosis. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1185-1195
- Liquori C.L., Berg M.J., Siegel A.M., Huang E., Zawistowski J.S., Stoffer T., Verlaan D., Balogun F., Hughes L., Leedom T.P., Plummer N.W., Canella M., Maglione V., Squitieri F., Johnson E.W., Rouleau G.A., Ptacek L., Marchuk D.A. (2003): Mutations in a gene encoding a novel protein containing a phosphotyrosine-binding domain cause type 2 cerebral cavernous malformations. *Am. J. Hum. Genet.* **73**, 1459-1464
- Llorente-Cortés V., Martínez-González J., Badimon L. (2000): LDL receptor-related Protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1572-1579
- Llorente-Cortés V., Costales P., Bernués J., Camino-Lopez S., Badimon L. (2006): Sterol regulatory element-binding protein-2 negatively regulates low density lipoprotein receptor-related protein transcription. *J. Mol. Biol.* **359**, 950-960
- Loukinova E., Ranganathan S., Kuznetsov S., Gorlatov N., Migliorini M.M., Loukinov D., Ulery P.G., Mikhailenko I., Lawrence D.A., Strickland D.K. (2002): Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *J. Biol. Chem.* **277**, 15499-15506

- Lüllmann-Rauch R. (2003): Histologie, Verstehen-Lernen-Nachschriften. *Georg Thieme Verlag*, 362-365
- Lutz C., Nimpf J., Jenny M., Boecklinger K., Enzinger C., Utermann G., Baier-Bitterlich G., Baier G. (2002): Evidence of functional modulation of the MEKK/JNK/cJunc signaling cascade by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *J. Biol. Chem.* **277**, 43143-43151
- Mammarella S., Romano F., Di Valerio A., Creati B., Esposito D.L., Palmirota L., Capani F., Vitullo P., Volpe G., Battista P., Della Loggia F., Mariani-Costantini R., Cama A. (2000): Interaction between the G1057D variant of IRS-2 and overweight in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2517-2521
- Martin A.M., Kuhlmann C., Trossbach S., Jaeger S., Waldron E., Roebroek A., Luhmann H.J., Laatsch A., Weggen S., Lessmann V., Pietrzik C.U. (2008): The functional role of the second NPXY motif of the LRP1 β -chain in tissue-type plasminogen activator-mediated activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Biol. Chem.* **283**, 12004-12013
- May P., Herz J. (2003): LDL receptor-related proteins in neurodevelopment. *Traffic* **4**, 291-301
- May P., Herz J., Bock H.H. (2005): Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2325-2338
- May P., Reddy Y.K., Herz J. (2002): Proteolytic processing of LRP mediates regulated release of its intracellular domain. *J. Biol. Chem.* **277**, 18736-18743
- Mishra S.K., Watkins S.C., Traub L.M. (2002): The autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) protein interfaces directly with the clathrin-coat machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 16099-16104
- Morris S.M., Cooper J.A. (2001): Disabled-2 colocalizes with the LDLR in clathrin-coated pits and interacts with AP-2. *Traffic* **2**, 111-123
- Oleinikov A.V., Zhao J., Makker S.P. (2000): Cytosolic adaptor protein Dab2 is an intracellular ligand of endocytotic receptor gp600/megalin. *Biochem. J.* **347**, 613-621
- Olson M.F., Marais R. (2000): Ras protein signalling. *Semin. Immunol.* **12**, 63-73
- Patel M., Morrow J., Maxfield F.R., Strickland D.K., Greenberg S., Tabas I. (2003): The cytoplasmic domain of the low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein, but not that of the LDL receptor, triggers phagocytosis. *J. Biol. Chem.* **278**, 44799-44807
- Pawson T. (1995): Protein modules and signaling networks. *Nature* **373**, 573-580
- Pietrzik C.U., Busse T., Merriam D.E., Weggen S., Koo E.H. (2002): The cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing. *EMBO J.* **21**, 5691-5700

- Pietrzik C.U., Yoon I.S., Jaeger S., Busse T., Weggen S., Koo E.H. (2004): FE65 constitutes the functional link between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein. *J Neurosci.* **24**, 4259-4265
- Porzio O., Federici M., Hribal M.L., Lauro D., Accili D., Lauro R., Borboni P., Sesti G. (1999): The Gly972—Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic beta cells. *J. Clin. Invest.* **104**, 357-364
- Prawitt J., Niemeyer A., Kassem M., Beisiegel U., Heeren J. (2008): Characterization of lipid metabolism in insulin-sensitive adipocytes differentiated from immortalized human mesenchymal stem cells. *Exp. Cell. Res.* **314**, 814-824
- Pugh J.C., Yaginuma K., Koike K., Summers J (1988): Duck hepatitis B virus (DHBV) particles produced by transient expression of DHBV DNA in a human hepatoma cell line are infectious in vitro. *J. of Virology* **62**, 3513-3516
- Qui Z., Strickland D.K., Hyman B.T., Rebeck G.W. (2002): α 2-macroglobulin exposure reduces calcium responses to N-methyl-D-aspartate via low density lipoprotein receptor-related protein in cultured hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* **277**, 14458-14466
- Quinn K.A., Pye V.J., Dai Y.P., Chesterman C.N., Owensby D.A. (1999): Characterization of the soluble form of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Exp. Cell. Res.* **251**, 433-441
- Ranganathan S., Liu C.X., Migliorini M.M., von Arnim C.A., Peltan I.D., Mikhailenko I., Hyman B.T., Strickland D.K. (2004): Serin and threonin phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein by protein kinase C α regulates endocytosis and association with adaptor molecules. *J. Biol. Chem.* **279** (39), 40536-40544
- Ravichandran K.S., Zhou M.M., Pratt J.C., Harlan J.E., Walk S.F., Fesik S.W., Burakoff S.J. (1997): Evidence for a requirement for both phospholipid and phosphotyrosine binding via the Shc phosphotyrosine-binding domain in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5540-5549
- Rice D.S., Sheldon M., D'Arcangelo G., Nakajima K., Goldowitz D., Curran T. (1998): Disabled-1 acts downstream of reelin in a signalling pathway that controls laminar organization in the mammalian brain. *Development* **125**, 3719-3729
- Roebroek A.J.M., Reekmans S., Lauwers A., Feyaerts N., Smeijers L., Hartmann D. (2006): Mutant Lrp1 knock-in mice generated by recombinase-mediated cassette exchange reveal differential importance of the NPXY motifs in the intracellular domain of LRP1 for normal fetal development. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 605-616
- Stolt P.C., Bock H.H. (2006): Modulation of lipoprotein receptor functions by intracellular adaptor proteins. *Cellular Signalling* **18**, 1560-1571

- Stolt P.C., Jeon H., Song H.K., Herz J., Eck M. J., Blacklow S.C. (2003): Origins of peptide selectivity and phosphoinositide binding revealed by structures of disabled-1 PTB domain complexes. *Structure* **11**, 569-579
- Strasser V., Fasching D., Hauser C., Mayer H., Bock H.H., Hiesberger T., Herz J., Weeber E.J., Sweatt J.D., Pramatarova A., Howell B., Schneider W.J., Nimpf J. (2004): Receptor clustering is involved in Reelin signaling. *Mol. Cell Biol.* **24**, 1378-1386
- Su H.P., Nakada-Tsukui K., Tosello-Trampont A.C., Li Y., Bu G., Henson P.M., Ravichandran K.S. (2002): Interaction of CED-6/GULP, an adapter protein involved in engulfment of apoptotic cells with CED-1 and CD91/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *J. Biol. Chem.* **277**, 11772-11779
- Swertfeger D.K., Bu G., Hui D.Y. (2002): Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E inhibition of smooth muscle cell migration. *J. Biol. Chem.* **277**, 14141-14146
- Takeuchi H., Matsuda M., Yamamoto T., Kanematsu T., Kikkawa U., Yagisawa H., Watanabe Y., Hirata M. (1998): PTB domain of insulin receptor substrate-1 binds inositol compounds. *Biochem. J.* **334**, 211-218
- Trommsdorff M., Borg J.P., Margolis B., Herz J. (1998): Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 33556-33560
- Trommsdorff M., Gotthardt M., Hiesberger T., Shelton J., Stockinger W., Nimpf J. (1999): Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* **97**, 689-701
- Uhlik M.T., Temple B., Bencharit S., Kimple A.J., Siderovski D.P., Johnson G.L. (2005): Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains. *J. Mol. Biol.* **345**, 1-20
- Ulerey P.G., Beers J., Mikhailenko I., Tanzi R.I., Rebeck G.W., Hyman B.T., Strickland D.K. (2000): Modulation of b-amyloid precursor protein processing by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *J. Biol. Chem.* **275**, 7410-7415
- Van der Geer P. (2002): Phosphorylation of LRP1: Regulation of transport and signal transduction. *TCM, Trends Cardiovascular Med.* **12**, 160-165
- Van der Geer P., Pawson T. (1995): The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 277-280
- Verhey K.J., Meyer D., Deehan R., Blenis J., Schnapp B.J., Rapoport T.A., Margolis B. (2001): Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J. Cell. Biol.* **152**, 959-970

- Waeber G., Delplanque J., Bonny C., Mooser V., Steinmann M., Widmann C., Maillard A., Miklossy J., Dina C., Hani E.H., Vionnet N., Nicod P., Boutin P., Froguel P. (2000): The gene MAPK8IP1, encoding islet-brain-1, is a candidate for type 2 diabetes. *Nat. Genet.* **24**, 291-295
- Wang B., Zhang M., Ni Y., Liu F., Fan H., Fei L., Pan X., Guo M., Chen R., Guo X. (2006): Identification and characterisation of NYGGF4, a novel gene containing a phosphotyrosine-binding (PTB) domain that stimulates 3T3-L1 preadipocytes proliferation. *Gene* **379**, 132-140
- Weeber E.J., Beffert U., Jones C., Christian J.M., Forster E., Sweatt J.D., Herz J. (2002): Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J. Biol. Chem.* **277**, 39944-39952
- Xia W. (2003): Amyloid inhibitors and Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Invest. Drugs* **4**, 55-59
- Yamamoto T., Davis C.G., Brown M.S., Schneider W.J., Casey M.L., Goldstein J.L., Russel D.W. (1984): The human LDLR: a cystein-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* **39**, 27-38
- Yasuda J., Whitmarsh A.J., Cavanagh J., Sharma M., Davis R.J. (1999): The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7245-7254
- Zambrano N., Buxbaum J.D., Minopoli G., Fiore F., De Candia P., De Renzis S., Faraonio R., Sabo S., Cheetham J., Sudol M., Russo T. (1997): Interaction of the phosphotyrosine interaction / phosphotyrosine binding-related domains of Fe65 with wild-type and mutant Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 6399-6405
- Zhang C., Chen X., Wang B., Liu F., Chi X., Tong M., Ni Y., Chen R., Guo X. (2009): Over-expression of NYGGF4 inhibits glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via attenuated phosphorylation of IRS-1 and Akt. *Acta Pharmacologica Sinica* **30**, 120-124
- Zhang H., Links P.H., Ngsee J.K., Tran K., Cui Z., Ko K.W.S., Yao Z. (2004): Localization of low density lipoprotein receptor-related protein 1 to caveolae in 3T3-L1 adipocytes in response to insulin treatment. *J. Biol. Chem.* **279**, 2221-2230
- Zhu Y., Hui D.Y. (2003): Apolipoprotein E binding to low density lipoprotein receptor-related protein-1 inhibits cell migration via activation of cAMP-dependent protein kinase A. *J. Biol. Chem.* **278**, 36257-36263
- Zurhove K., Nakajima C., Herz J., Bock H.H., May P. (2008): γ -Secretase limits the inflammatory response through the processing of LRP1. *Sci. Signal.* **1**, ra 15

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hartwig Schmale und Frau Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel für die Überlassung des Themas, die freundliche Unterstützung und das stete Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Vor allem Prof. Dr. Hartwig Schmale danke ich für die herzliche Betreuung dieser Arbeit und sein offenes Ohr bei fachlichen Fragen, für anregende Diskussionen und Ermunterung bei kurzzeitigen Motivationstiefs.

Für die freundliche Zusammenarbeit und praktische Hilfestellung danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Zellbiologie, insbesondere Anette Rosche, Dorothee Lasrich und Sebastian Meisner.

Außerdem möchte ich mich bei Kathrin Baumhöfer und Katharina Peters für die Hilfe bei Korrektur und Formatierung bedanken.

Ich danke von ganzem Herzen meinem Mann, Dr. Erik Fritzsche, für seine emotionale Unterstützung, ohne die ich sicher weniger Kraft für dieses Projekt gehabt hätte.

Eidesstattliche Versicherung

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

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

Hamburg, den 07.06.2009

Åsa Katerina Weinås