

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Für den gerichteten intrazellulären Transport des 46 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptors (MPR 46) entlang des Biosynthese- und Endocytoseweges sowie für die entsprechenden Recyclingwege sind verschiedene Signalstrukturen verantwortlich, die in der cytoplasmatischen Domäne des Rezeptors lokalisiert sind und bei Sortierungsprozessen in bestimmten zellulären Kompartimenten selektiv mit cytosolischen und membranständigen Proteinen wie den Adaptoren AP-1- AP-4, den Adaptor-ähnlichen Proteinen GGA1 und GGA3 und mit TIP 47 interagieren.

Im ersten Teil der Arbeit wurden mit Hilfe des *yeast-two-hybrid*-Systems eine Rattenhirn- und eine humane Hirn-cDNA-Bank nach potentiellen Interaktionspartner für die cytoplasmatische Domäne des 46 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptors (MPR46) durchsucht. Nach Untersuchung der Rattenhirn-Bank wurden 789 Klone identifiziert, die auf Histidin-Mangelmedium wuchsen und im  $\beta$ -Galactosidase-Test  $lacZ^+$  waren. Von 21 Klonen, die sequenziert wurden, wiesen 18 ein frühzeitiges Stopcodon auf. Bei den verbliebenen drei Klonen handelte es sich um funktionell irrelevante Proteine (Pancreas-Elastase, Endotheliales Wachstumsfaktor und Mitochondriale Cytochrom Oxidase).

Bei Untersuchung der humanen Hirnbank wuchsen 41 Klone auf Histidin-Mangelmedium, von denen drei einen  $lacZ^+$ -positiven Phänotyp zeigten. Zwei dieser Klone wiesen nach Sequenzierung ein frühzeitiges Stopcodon auf, die cDNA-Sequenz des dritten Klons konnte, infolge eines wiederholten vorzeitigen Abbruchs der Sequenzanalyse, vermutlich wegen einer 5'-GC-reicher Region, nicht ermittelt werden.

Die Suche nach potentiellen Interaktionspartnern für die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 mit Hilfe des *yeast-two-hybrid*-Systems wurde danach nicht weitergeführt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden durch affinitätschromatographische Aufreinigung der cytosolischen Fraktion des Rattenhirns sechs Proteine durch massenspektrometrische Analysen bzw. Edman-Abbau identifiziert und durch Westernblot-Analysen bestätigt, die spezifisch mit der cytoplasmatischen Domäne des MPR 46 interagieren: Talin (269 kDa), Myosin VII (230 kDa), Tiam 1 (205 kDa), Tubulin (55 kDa), Aktin (43 kDa) und Annexin III (33 kDa). Die gefundenen Interaktionen wurden durch Copräzipitations-Analysen verifiziert.

Durch Copräzipitation mit der mutierten cytoplasmatischen Domäne des MPR 46 konnte festgestellt werden, daß für die Wechselwirkung des MPR 46 mit Talin und Tiam 1 das Tyrosin-Signal (<sup>45</sup>YRGV<sup>48</sup>) nicht von entscheidender Bedeutung ist, da, bei Substitution der kritischen <sup>45</sup>Y und V<sup>48</sup> durch A keine Veränderung der Interaktion feststellbar war. Schließlich wurde die Lokalisation der identifizierten Proteine in Relation zu MPR 46 nach doppelimmun-fluoreszenzmikroskopischen Färbungen an MPR 46-überexprimierenden BHK- und an humanen SH-SY5Y-Neuroblastoma-Zellen verifiziert.

Aufgrund der beschriebenen Bedeutung einzelner Proteine bei der Modulation des Aktin-Cytoskeletts wurde die Abhängigkeit des intrazellulären Transportes der MPR von Aktin-Filamenten näher untersucht.

Bei Inkubation von MPR 46-überexprimierenden BHK-Zellen mit Latrunculin A, einem Aktin-depolymerisierenden Toxin, wurde die Endocytoserate der MPR 46 Konzentrations- und Zelltyp-abhängig um 45 %-90 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen reduziert. Die Endocytoserate des MPR 300 in BHK-Zellen, die diesen Rezeptor überexprimieren, sank auf 49 %-32 % nach Depolymerisierung des Aktin-Cytoskeletts im Vergleich zu intakten Kontrollzellen, was darauf hinweist, daß Aktin-Cytoskelett auch für die Internalisierung der MPR 300 erforderlich ist.

Dagegen erfolgt die MPR-vermittelte Sortierung neusynthetisierter lysosomaler Enzyme am *trans*-Golgi-Netzwerk unabhängig vom Aktin-Cytoskelett.