

**AUSWIRKUNGEN EINER DEPLETION DER
HUMANEN INOSITOL-POLYPHOSPHAT
5-PHOSPHATASE OCRL AUF TRANSPORTWEGE DES
MANNOSE 6-PHOSPHAT-REZEPTORS**

Dissertation

zur Erlangung der Würde des

Doktors der Naturwissenschaften

des Fachbereichs Biologie,
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg



vorgelegt von

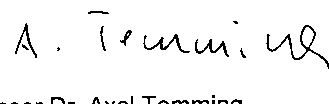
Vanessa Alexandra van Rahden

aus Bremervörde

Hamburg 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Prof. Dr. K. KUTSCHE
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Frau Priv.-Doz. Dr. S. LÜTHJE
Tag der Disputation: 01. Juli 2011

Hamburg, den 17. Juni 2011

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Temming' with a stylized flourish at the end.

Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Fachbereichs Biologie

INHALTSVERZEICHNIS

I	Abkürzungsverzeichnis	V
II	Abbildungsverzeichnis	VIII
III	Tabellenverzeichnis	X
1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Das Lowe-Syndrom	3
2.2	Domänenstruktur des OCRL-Proteins	4
2.3	Der endozytotische Transportweg und OCRL	6
2.4	Der retrograde Transportweg und OCRL	9
2.5	Der lysosomale Transport saurer Hydrolasen über den M6P-Rezeptor	11
3	ZIEL DER ARBEIT	14
4	MATERIAL UND METHODEN	15
4.1	Material	15
4.1.1	Bakterienstämme und Zelllinien	15
4.1.2	Plasmide	15
4.1.2.1	Zur Verfügung gestellte Konstrukte	15
4.1.2.2	Ausgangsvektoren für die Erstellung neuer Konstrukte	16
4.1.2.3	Hergestellte Konstrukte	17
4.1.3	Oligonukleotide	18
4.1.3.1	Zur Sequenzierung verwendete Oligonukleotide	19
4.1.3.2	Zu Klonierungszwecken verwendete Oligonukleotide	20
4.1.3.3	Verwendete siRNA	20
4.1.4	Antikörper	20
4.1.4.1	Primärantikörper	21
4.1.4.2	Sekundärantikörper	22
4.1.5	Chemikalien und Lösungsmittel	22
4.1.6	Kits, Enzyme, Nukleotide und Standards	24
4.1.7	Radioaktive Substanzen	24
4.1.8	Medien und Zusätze	25
4.1.8.1	Medien und Zusätze für molekularbiologische Arbeiten	25
4.1.8.2	Medien und Zusätze für zellbiologische Arbeiten	25
4.1.9	Puffer und Lösungen	26
4.1.9.1	Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten	26
4.1.9.2	Puffer und Lösungen für biochemische und zellbiologische Arbeiten	27
4.1.10	Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien	30
4.1.11	Verwendete Computerprogramme und Datenbanken	32
4.2	Molekularbiologische Methoden	32

4.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und PCR-vermittelte Mutagenese	32
4.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	34
4.2.3	Aufreinigung der PCR-Produkte	34
4.2.4	Restriktionsanalyse von DNA	35
4.2.5	DNA-Ligation	35
4.2.6	Klonierung mittels TOPO®-Klonierungs-Technologie	35
4.2.7	Klonierung mittels Gateway™-Technologie	35
4.2.8	Hitzeschock-Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> - (<i>E. coli</i> -) Zellen mit Plasmid-DNA	36
4.2.9	Kultivierung von Bakterien	36
4.2.10	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	36
4.2.11	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	37
4.2.12	Photometrische Quantifizierung der Plasmid-DNA	37
4.2.13	DNA-Sequenzierung	37
4.3	Biochemische und zellbiologische Methoden	38
4.3.1	Zellkultur eukaryotischer Zellen	38
4.3.1.1	Auftauen von Zellen	38
4.3.1.2	Passagieren von Zellen	39
4.3.1.3	Einfrieren von Zellen	39
4.3.2	Methoden zur Transfektion eukaryotischer Zellen	39
4.3.2.1	Transiente Transfektion mit Plasmid-DNA	39
4.3.2.2	Transiente Transfektion mit siRNA zur Unterdrückung der Expression eines gewünschten Gens	40
4.3.2.3	Verwendung des Flp-In™ Systems zur stabilen Transfektion eukaryotischer Zellen	41
4.3.3	Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen	41
4.3.4	Proteinkonzentrationsmessung mit dem BCA-Test	42
4.3.5	Bestimmung der Sekretion lysosomaler Enzyme	42
4.3.6	Biotinylierung	43
4.3.6.1	Zelloberflächenbiotinylierung zur Detektion von Plasmamembranständigen Rezeptoren	44
4.3.6.2	Zelloberflächenbiotinylierung zur Quantifizierung der Internalisierung und Berechnung der Internalisierungsrate	45
4.3.7	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
4.3.8	Western-Blot	46
4.3.9	Immunologische Detektion auf PVDF-Membran	47
4.3.10	Immunfluoreszenzanalysen	48
4.3.11	Experimente mit dem radioaktiven Schwefel-Isotop Schwefel-35 (³⁵ S)	49
4.3.11.1	Immunpräzipitation (IP)	49
4.3.11.2	Bestimmung der MPR300-Halbwertszeit	49
4.3.11.3	Detektion der Reifung des lysosomalen Enzyms Cathepsin Z	51

4.3.11.4	Detektion des retrograden Transports von MPR46 <i>in vivo</i>	52
5	ERGEBNISSE	54
5.1	Untersuchungen zum Einfluss des OCRL-Proteins auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose	54
5.1.1	Generierung von stabil OCRL-überexprimierenden CV1-Zellen	54
5.1.2	Untersuchung der TfR-Internalisierung in stabil OCRL-überexprimierenden CV1-Zellen mittels Zelloberflächenbiotinylierung	55
5.1.3	Unterdrückung der Translation des OCRL-Proteins in HeLa-Zellen durch eine OCRL-spezifische siRNA	57
5.1.4	Zelloberflächenbiotinylierung des TfR zur Bestimmung des Plasmamembran-Anteils in OCRL-depletierten HeLa-Zellen	58
5.1.5	Quantifizierung der relativen Internalisierung und Bestimmung der Internalisierungsrate des TfR in OCRL-depletierten HeLa-Zellen mittels Zelloberflächenbiotinylierung	60
5.1.6	Zelloberflächenbiotinylierung zur Bestimmung des MPR300-Anteils an der Plasmamembran in OCRL-depletierten HeLa-Zellen	61
5.1.7	Quantitative Untersuchungen zur Internalisierung des MPR300 in OCRL-depletierten HeLa-Zellen mittels Zelloberflächenbiotinylierung	63
5.2	Untersuchungen verschiedener Transportwege des M6P-Rezeptors in OCRL-depletierten Zellen	65
5.2.1	Biochemische Quantifizierung der MPR300-Proteinmenge in OCRL-depletierten HeLa-Zellen	65
5.2.2	Berechnung der Halbwertszeit des MPR300 in OCRL-depletierten HeLa-Zellen	66
5.2.3	Immunzytochemische Analysen zur subzellulären Lokalisation des MPR300 nach OCRL-Depletion in HeLa-Zellen	67
5.2.4	Untersuchungen zur Koloalokalisation des MPR300 mit Markerproteinen subzellulärer Zellkompartimente	69
5.2.5	Biochemische Quantifizierung der Proteinmenge der endosomalen Marker Rab5, EEA1, SNX1 und Rab7 in OCRL-depletierten HeLa-Zellen	73
5.2.6	Quantifizierung des retrograden MPR46-Transports in einer modifizierten HEK-293-Zelllinie nach OCRL-Depletion	75
5.2.7	Immunzytochemische Analysen zur subzellulären Lokalisation des MPR46 in OCRL-depletierten HeLa-Zellen	76
5.2.8	Untersuchungen zum anterograden Transport lysosomaler Enzyme in OCRL-depletierten HeLa-Zellen	77
5.2.9	Analysen zur Sekretion lysosomaler Enzyme in das extrazelluläre Medium nach siRNA-Depletion von OCRL in HeLa-Zellen	79

5.2.10	Immunzytochemische Betrachtung der Lysosomenmorphologie und biochemische Quantifizierung der lysosomalen Marker Lamp1 und Lamp2 in OCRL-depletierten HeLa-Zellen	82
5.3	Untersuchungen zur Funktion von OCRL und/oder OCRL-Domänen für den retrograden Transport	84
5.3.1	Komplementierung der MPR300-Fehlverteilung nach OCRL-Depletion durch Überexpression verschiedener OCRL-Proteinvarianten in HeLa-Zellen	84
5.3.2	Immunzytochemische Bestimmung der Verteilung von Phosphoinositiden in OCRL-depletierten HeLa-Zellen	87
5.3.3	Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der Adaptorproteine AP1, AP2 und AP3 in HeLa-Zellen nach OCRL-Depletion	88
5.4	Untersuchungen zur Rolle des OCRL-Proteins in verschiedenen zellulären Prozessen	90
5.4.1	Biochemische Quantifizierung des Phosphorylierungszustandes der Serin/Threonin-Kinase Akt in HeLa-Zellen nach OCRL-Depletion	90
5.4.2	Untersuchungen zum Einfluss einer OCRL-Depletion auf das Aktin-Zytoskelett in HeLa-Zellen	91
6	DISKUSSION	93
6.1	Der verminderte retrograde M6P-Rezeptor-Transport nach OCRL-Depletion geht mit einer erhöhten MPR300-Endozytose einher	93
6.2	Die Phosphatase-Aktivität von OCRL könnte für die Rekrutierung von Adaptorproteinen und/oder Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts im frühen retrograden Transportweg wichtig sein	99
7	LITERATURVERZEICHNIS	104
	Posterpräsentationen	115
	Danksagung	116

I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
³⁵ S	Schwefel-35
A	Alanin
Amp	Ampicillin
Abb.	Abbildung
AP	Adaptorprotein
APPL1	<i>adaptor protein containing pH domain, PTB domain and Leucine zipper motif</i>
AS	Aminosäure
ASB	Arylsulfatase B
ASH	ASPM, SPD2, Hydin
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Att	<i>attachment</i>
BAR	Bin/ Amphiphysin/Rvs
BCA	Bicinchoninsäure
bidest.	bidestiliert
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
Cath D	Cathepsin D
Cath Z	Cathepsin Z
CCP	<i>clathrin-coated pits</i> ; Clathrin-bedeckte Gruben
CCV	<i>clathrin-coated vesicles</i> ; Clathrin-bedeckte Vesikel
cDNA	<i>copy</i> -Desoxyribonukleinsäure
Ci, mCi, µCi	Curie, Millicurie, Mikrocurie
cm, mm, µm, nm	Centimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
cLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i> ; Konfokales Laser-Scanning Mikroskop
c-Terminus	Carboxyterminus eines Proteins
Cys	Cystein
ddNTP	Di-Desoxy-Ribonukleosid-Triphosphat
d. h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Ribonukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EEA1	<i>early endosomal antigen 1</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i> ; Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> ; Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> , und andere
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FBS	Fötales Rinderserum
GDI	Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitor
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	<i>hour</i> ; Stunde

HA	Hämagglutinin des humanen Influenzavirus
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i> ; Hanks Salzlösung
HEK-293	<i>human embryonic kidney</i> Zellen
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
Hyg	Hygromycin
IF	Immunfluoreszenz
IGFII	<i>insulin-like growth factor II</i>
Ins(1,4,5)P ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
Ins(1,3,4,5)P ₄	Inositol-1,3,4,5-Tetrakisphosphat
IPIP27	<i>inositol polyphosphate phosphatase interacting protein of 27 kDa</i>
IPPC	<i>inositol polyphosphate phosphatase, catalytic</i>
Kan	Kanamycin
KD	<i>knockdown</i>
kDa	Kilodalton
kg, g, mg, µg, ng	Kilogramm, Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LS	Lowe Syndrom
M, mM	Molar, Millimolar
M6P	Mannose 6-Phosphat
mA	Milliampere
Met	Methionin
min	<i>minute</i> ; Minute
MPR300	300 kDa Mannose 6-Phosphat Rezeptor
MPR46	46 kDa Mannose 6-Phosphat Rezeptor
nmol, pmol	Nanomol, Pikomol
NP-40	Nichtionisches Detergenz P40
NPF	<i>nucleation promoting factor</i>
N-Terminus	Aminoterminus eines Proteins
N-WASP	<i>neural Wiskott Aldrich Syndrome protein</i>
OCRL	<i>oculocerebrorenal syndrome of Lowe</i> ; okulo-zerebro-renales Syndrom nach Lowe
OD	Optische Dichte
PACS	<i>phosphofurin acidic-cluster sorting protein-1</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAPS	3'-Phosphoadenosin 5'-Phosphosulfat
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PI(4)P	Phosphatidylinositol-4-Phosphat
PI(3,5)P ₂	Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PI(3,4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-3,4,5-Tetrakisphosphat
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PX	<i>phox homology</i>
R	Arginin
RhoGAP	<i>Rho GTPase-activating protein</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

SDS	<i>Sodium-Dodecylsulfate</i> ; Natrium-Dodecylsulfat
sec	<i>second</i> ; Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNX	<i>sorting nexin</i>
SOC	<i>super optimal broth</i>
STxB	Shiga Toxin-Untereinheit B
T	Threonin
Tab.	Tabelle
Tf	Transferrin
TfR	Tf-Rezeptor
TGN	<i>trans</i> Golgi Netzwerk
TIP47	<i>tail interacting protein of 47 kDa</i>
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
V5	P/V-Protein des Paramyxovirus SV5
VPS	<i>vacuolar sorting protein</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
WASH	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein and SCAR homolog</i>
WB	<i>Western Blot</i>
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>

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

II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 2.1:	Aufnahmen von ausgewählten Patienten mit LS.	3
Abb. 2.2:	Domänenstruktur der Inositol-Polyphosphat 5-Phosphatase OCRL-Isoform a.	6
Abb. 2.3:	Clathrin-vermittelte Endozytose eines Zelloberflächenrezeptors.	8
Abb. 2.4:	Schematische Darstellung der am retrograden Transport beteiligten Proteine.	10
Abb. 2.5:	Transportwege der M6P-Rezeptorformen.	11
Abb. 2.6:	Aufbau der M6P-Rezeptoren.	12
Abb. 5.1:	Generierung von WT- und Phosphatase-defizienten OCRL-Konstrukten und biochemischer Nachweis der Expression nach stabiler Transfektion der Konstrukte in CV1-Zelllinien.	55
Abb. 5.2:	Bestimmung der relativen Internalisierung und der Internalisierungsrate des TfR in stabil OCRL-überexprimierenden CV1-Zellen mittels Zelloberflächenbiotinylierung.	56
Abb. 5.3:	Optimierung der OCRL-Depletion durch eine OCRL-spezifische siRNA.	58
Abb. 5.4:	Bestimmung des Anteils an Plasmamembran-ständigen TfR in OCRL- bzw. GFP-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen durch Zelloberflächenbiotinylierung.	59
Abb. 5.5:	Berechnung der relativen Internalisierung sowie der Internalisierungsrate des TfR nach Zelloberflächenbiotinylierung in OCRL-depletierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen.	61
Abb. 5.6:	Ermittlung des MPR300-Anteils an der Plasmamembran durch Zelloberflächenbiotinylierung von OCRL- bzw. GFP-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen.	62
Abb. 5.7:	Bestimmung der relativen Internalisierung und der Internalisierungsrate des MPR300 in OCRL- bzw. GFP-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen mittels Zelloberflächenbiotinylierung.	64
Abb. 5.8:	Quantifizierung der MPR300-Proteinmenge in OCRL- bzw. GFP-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen.	65
Abb. 5.9:	Berechnung der Halbwertszeit des MPR300 in OCRL- bzw. GFP-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen.	67
Abb. 5.10:	Subzelluläre Verteilung des MPR300 in OCRL- bzw. GFP-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen.	68
Abb. 5.11:	Kolokalisationsstudien des MPR300 mit GM130, TGN46 und EEA1 in HeLa-Zellen nach OCRL- bzw. GFP-siRNA-Transfektion.	70
Abb. 5.12:	Kolokalisation des MPR300 mit EEA1, Rab5, TfR, SNX1 sowie Rab7-GFP in HeLa-Zellen nach OCRL- bzw. Kontroll-siRNA-Transfektion.	72
Abb. 5.13:	Quantifizierung der Proteinmenge von Rab5, EEA1, SNX1 und Rab7 in OCRL- bzw. GFP-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen.	74

Abb. 5.14:	Quantitative Bestimmung des retrograden MPR46-Transports in einer <i>OCRL</i> - bzw. <i>GFP</i> -siRNA-transfizierten 293HMY-Zelllinie.	76
Abb. 5.15:	Subzelluläre Lokalisation des MPR46 in HeLa-Zellen nach <i>OCRL</i> - bzw. <i>GFP</i> -siRNA-Transfektion.	77
Abb. 5.16:	Biochemische Detektion der unterschiedlichen Formen des Cath D-Proteins in <i>OCRL</i> - bzw. <i>GFP</i> -siRNA-transfizierten HeLa-Zellen.	78
Abb. 5.17:	Detektion der Prozessierung des Cath Z-Proteins in <i>OCRL</i> - bzw. <i>GFP</i> -siRNA-transfizierten HeLa-Zellen durch radioaktive Markierung mit ³⁵ S.	79
Abb. 5.18:	Quantifizierung der Sekretion von radioaktiv-markiertem Pro-Cath Z in HeLa-Zellen nach <i>OCRL</i> - bzw. <i>GFP</i> -siRNA-Transfektion.	80
Abb. 5.19:	Bestimmung der Enzymaktivitäten der lysosomalen Enzyme β -Hexosaminidase und β -Galaktosidase nach Sekretion ins extrazelluläre Medium aus HeLa-Zellen nach <i>OCRL</i> - bzw. <i>GFP</i> -siRNA-Transfektion.	81
Abb. 5.20:	Immunzytochemische und biochemische Analysen zur Lokalisation und Proteinmengenbestimmung von Lamp1 und Lamp2 in <i>OCRL</i> - bzw. <i>GFP</i> -siRNA-transfizierten HeLa-Zellen.	83
Abb. 5.21:	Überexpression von siRNA-resistenten <i>OCRL</i> -Proteinvarianten in <i>OCRL</i> -siRNA-transfizierten HeLa-Zellen.	85
Abb. 5.22:	Komplementierung der MPR300-Fehlverteilung in <i>OCRL</i> -depletierten HeLa-Zellen durch Überexpression von siRNA-resistenten <i>OCRL</i> -Proteinvarianten.	87
Abb. 5.23:	Visualisierung der subzellulären Verteilung von Phosphoinositiden in <i>OCRL</i> - und <i>Lamin A</i> -siRNA-transfizierten HeLa-Zellen durch Überexpression von GFP-gekoppelten PH-Domänen.	88
Abb. 5.24:	Subzelluläre Lokalisation der Adaptorproteine AP1, AP2 und AP3 in HeLa-Zellen nach <i>OCRL</i> - bzw. <i>GFP</i> -siRNA-Transfektion.	89
Abb. 5.25:	Bestimmung der Menge an phosphoryliertem Akt in <i>OCRL</i> - bzw. <i>GFP</i> -siRNA-transfizierten HeLa-Zellen nach EGF-Stimulierung.	90
Abb. 5.26:	Phalloidin-Färbung zur Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts in HeLa-Zellen nach <i>OCRL</i> - bzw. <i>GFP</i> -siRNA-Behandlung.	92
Abb. 6.1:	Auswirkungen einer <i>OCRL</i> -Depletion auf den Transportweg des M6P-Rezeptors.	98
Abb. 6.2:	Modelle zur Regulation des frühen retrograden Transports durch <i>OCRL</i> .	103

III TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 4-1:	Verwendete Bakterienstämme und Zelllinien.	15
Tab. 4-2:	Vorliegende Konstrukte für die eukaryotische Expression.	16
Tab. 4-3:	Übersicht über Vektoren zur Herstellung neuer Konstrukte.	16
Tab. 4-4:	Übersicht über die mit Hilfe verschiedener Methoden hergestellten Eingangsvektoren für die Gateway™-Technologie.	17
Tab. 4-5:	Übersicht über die mithilfe der Gateway™-Technologie hergestellten Konstrukte.	17
Tab. 4-6:	Übersicht über die mithilfe der QuikChange®-Technologie hergestellten Konstrukte.	18
Tab. 4-7:	Verwendete Oligonukleotide für die Sequenzanalyse.	19
Tab. 4-8:	Zu Klonierungszwecken verwendete Oligonukleotide.	20
Tab. 4-9:	Sequenz und Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten siRNA.	20
Tab. 4-10:	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper.	21
Tab. 4-11:	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper.	22
Tab. 4-12:	Verwendete Computerprogramme.	32
Tab. 4-13:	Verwendete Datenbanken.	32
Tab. 4-14:	Verwendete Zelllinien und dazugehörige Zellkulturmedien.	38
Tab. 4-15:	Verwendete Substrate zur Aktivitätsbestimmung der lysosomalen Enzyme.	42
Tab. 4-16:	Reaktionsansätze zur Bestimmung der intrazellulären und sekretierten Menge des jeweiligen lysosomalen Enzyms.	43
Tab. 4-17:	Gießprotokoll zur Herstellung von Trenn- und Sammelgelen.	46

1 ZUSAMMENFASSUNG

Das Lowe-Syndrom (LS) ist eine X-chromosomal erbliche Multisystemerkrankung, die durch mentale Retardierung, Hypotonie, kongenitale Katarakt und selektive proximale Tubulopathie gekennzeichnet ist. Verursacht wird das LS durch Mutationen im *OCRL*-Gen, das für die Inositol-Polyphosphat 5-Phosphatase OCRL kodiert, ein Protein, das bevorzugt das Phosphoinositid Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat [PI(4,5)P₂] zu Phosphatidylinositol-4-Phosphat [PI(4)P] dephosphoryliert. OCRL ist primär am *trans* Golgi-Netzwerk (TGN) lokalisiert; darüber hinaus wurde OCRL auch am frühen Endosom, an der Plasmamembran und an endozytotischen Vesikeln detektiert. Die weitläufige subzelluläre Verteilung lässt eine Beteiligung von OCRL an Transportprozessen zwischen Golgi und Endosom sowie Plasmamembran und Endosom vermuten.

In Hautfibroblasten von Patienten mit LS wurde in einer früheren Arbeit eine reduzierte Aufnahme des lysosomalen Enzyms Arylsulfatase B über den Mannose 6-Phosphat (M6P)-Rezeptor beobachtet, was zu der Annahme führte, dass OCRL eine allgemeine Funktion bei der Clathrin-vermittelten Endozytose von Zelloberflächenproteinen spielen könnte. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde in dieser Arbeit die siRNA (*small interfering* RNA)-vermittelte Depletion von OCRL in HeLa-Zellen etabliert. Mittels Zelloberflächenbiotinylierungsexperimenten wurde die Clathrin-abhängige Endozytose von zwei Rezeptoren, dem Transferrin- und dem 300 kDa schweren M6P-Rezeptor (MPR300), analysiert. Für den Transferrin-Rezeptor ergab sich im Vergleich zu Kontrollzellen keine veränderte Internalisierung nach OCRL-Depletion. Dieses Ergebnis konnte durch Verwendung von über das Flp-In-System erzeugte, stabil OCRL-überexprimierende CV1-Zellen bestärkt werden. Aufgrund dieser Daten wird für OCRL keine allgemeine Funktion in der Clathrin-abhängigen Endozytose angenommen. Mit der oben erwähnten Biotinylierungsmethode konnte jedoch sowohl eine erhöhte Menge an Plasmamembran-ständigen MPR300 als auch eine erhöhte Internalisierungsrate des MPR300 in OCRL-depletierten Zellen detektiert werden. Da diese Ergebnisse vermutlich nicht auf eine gestörte Endozytose zurückzuführen waren, wurden weitere Experimente zum M6P-Rezeptor-Trafficking in OCRL-depletierten Zellen durchgeführt. In einem *pulse-chase*-Experiment wurde zunächst die Halbwertszeit des MPR300 bestimmt, die, wie auch die MPR300-Gesamt-Proteinmenge, unverändert war. In Immunfluoreszenzexperimenten konnte eine Relokalisation des MPR300 in vergrößerten, vesikulären Strukturen beobachtet werden, die mittels Kolokalisationsexperimenten als Intermediärformen des frühen Endosoms charakterisiert wurden. Unter Verwendung einer den MPR46 (46 kDa schwere M6P-Rezeptor-Variante)-stabil exprimierenden HEK-293-Zelllinie in einem radioaktiven Sulfatidierungsexperiment wurde nach OCRL-Depletion ein um etwa 54 % verminderter Rücktransport des M6P-Rezeptors vom Endosom zum TGN detektiert. Ein weiteres *pulse-chase*-Experiment zur Messung der extrazellulären Aktivität saurer Hydrolasen, den Liganden des M6P-Rezeptors, erbrachte keinen Hinweis auf eine erhöhte Sekretion dieser lysosomalen Enzyme ins extrazelluläre Medium. Zusammengefasst führten diese Daten zu der Annahme, dass der verminderte retrograde M6P-

Rezeptor-Transport durch eine erhöhte MPR300-Menge an der Plasmamembran und eine gesteigerte Internalisierung dieses Rezeptors in OCRL-depletierten Zellen kompensiert wird. In Immunfluoreszenzanalysen konnten darüber hinaus mehr und größere, durch den Marker Lamp1 detektierbare Lysosomen in OCRL-depletierten HeLa-Zellen als in Kontrollzellen identifiziert werden. Die veränderte Lysosomenmorphologie ließ auf einen verminderten Proteinabbau in diesem Zellkompartiment, vermutlich bedingt durch eine reduzierte Menge lysosomaler Enzyme, schließen. Die Untersuchung des anterograden Transportwegs vom TGN zum Lysosom, den neu synthetisierte lysosomale Enzyme durchlaufen, mittels verschiedener radioaktiver und biochemischer Methoden ergab jedoch in OCRL-depletierten Zellen nur marginale Veränderungen.

In dieser Arbeit konnte durch die umfassende und detaillierte Analyse der verschiedenen M6P-Rezeptor-Transportwege gezeigt werden, dass der retrograde Transport vom Endosom zum TGN - sehr wahrscheinlich der vom frühen Endosom ausgehende Transport - in OCRL-depletierten Zellen wesentlich vermindert ist. Damit einhergehend kommt es vermutlich zu einer vermehrten Einschleusung der M6P-Rezeptoren in den endozytotischen Transportweg. In Komplementationsexperimenten wurde gezeigt, dass der 5-Phosphataseaktivität von OCRL eine wesentliche Rolle beim M6P-Rezeptor-Trafficking in der Zelle zukommt. Die OCRL-vermittelte Dephosphorylierung von $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ zu $\text{PI}(4)\text{P}$ könnte lokal am frühen Endosom für den retrograden Transport wichtig sein: Zum einen könnten durch die Generierung von $\text{PI}(4)\text{P}$ die Adaptorproteine AP1 und EpsinR zum Endosom rekrutiert werden, so dass der Clathrin- und Retromer-abhängige retrograde Transport am frühen Endosom initiiert wird. Zum anderen könnte eine zeitlich und örtlich kontrollierte Menge an $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ am frühen Endosom für die Aktin-Polymerisation im Bereich der sich bildenden Vesikel benötigt werden. Hinweise auf ein verändertes Aktin-Zytoskelett in OCRL-depletierten Zellen gaben u. a. in dieser Arbeit durchgeführte Immunfluoreszenzanalysen. Die Bedeutung der Inositol-Polyphosphat 5-Phosphatase OCRL für das M6P-Rezeptor-Trafficking weist daraufhin, dass in einigen Geweben von Jungen mit LS intrazelluläre Transportwege in ihrer Funktion beeinträchtigt sein könnten.

2 EINLEITUNG

2.1 Das Lowe-Syndrom

Das Lowe-Syndrom (LS), auch okulo-zerebro-renales Syndrom nach Lowe (OCRL) genannt, ist eine seltene, X-chromosomal vererbte Multisystemerkrankung mit einer Prävalenz von etwa 1 in 500.000 Geburten (Loi, 2006). Erstmals beschrieben wurde sie im Jahr 1952 von Charles Lowe und Kollegen als „Syndrom mit Azidurie, verminderter Harnstoffproduktion, Hydrophthalmus und mentaler Retardierung“ (Lowe et al., 1952). Bei Patienten mit LS, die in der Regel männlich sind (Abb. 2.1), sind vor allem die Augen, das zentrale Nervensystem und die Nieren betroffen. Die Jungen haben eine helle Gesichtsfarbe und eine hohe, prominente Stirn (Loi, 2006).



Abb. 2.1: Aufnahmen von ausgewählten Patienten mit LS. Die Bilder zeigen von links nach rechts Fotografien von Patienten mit LS frühkindlichen bis jugendlichen Alters. Quelle: www.matthewdegorifoundation.org; www.lowe-syndrom.de/.

Bereits *in utero* bildet sich eine beidseitige Katarakt. Postnatal wird die Augenfehlbildung oftmals durch Nystagmus und Entwicklung eines Glaukoms oder Keloids begleitet (Loi, 2006). Zum Zeitpunkt der Geburt liegt bei den Patienten eine Hypotonie vor, die zu respiratorischen Problemen im ersten Lebensabschnitt führen kann. Die fehlerhafte Entwicklung des zentralen Nervensystems führt oftmals im weiteren Krankheitsverlauf zu einer moderaten bis schweren mentalen Retardierung mit Verhaltensauffälligkeiten, wie aggressivem oder zwanghaftem Verhalten (Kenworthy et al., 1993). Auch epileptische Anfälle und Fieberkrämpfe können auftreten (Charnas et al., 1988). Im Gegensatz zu den Augen- und ZNS-Auffälligkeiten tritt der Nierenphänotyp in Form einer selektiven Dysfunktion des proximalen Tubulus erst innerhalb der ersten Lebensmonate auf. Bei dieser Form der Niereninsuffizienz kommt es zu einer verminderten Resorption bestimmter, kleinerer Moleküle im proximalen Tubulus der Niere, was zu Albuminurie, Aminoazidurie, Hyperkalziurie und lysosomaler Enzymurie führt (Bockenbauer et al., 2008). Die Niereninsuffizienz ist mit zunehmendem Alter progressiv und neben den Folgen der Hypotonie die häufigste Todesursache für das frühzeitige Versterben der Patienten mit LS zwischen Ende der zweiten und Beginn der vierten Lebensdekade (Loi, 2006).

Verursacht wird das LS durch Mutationen im OCRL-Gen, das in Xq25 lokalisiert ist. Das 24 Exon umfassende Gen ist ubiquitär exprimiert und kodiert für eine Inositol-Polyphosphat 5-

Phosphatase, dem OCRL-Protein (Attree et al., 1992; Nussbaum et al., 1997). Die Mutationen sind in der Regel „privat“, d. h. fast jeder Patient hat eine andere OCRL-Mutation, und führen zu einem Funktionsverlust des OCRL-Proteins (Lin et al., 1997; Monnier et al., 2000). Bei der Mehrheit der Patienten mit LS sind die Mütter Überträgerinnen, tragen also die OCRL-Mutation in heterozygotem Zustand. Etwa 30 % der Patienten weisen dagegen eine *de novo* Mutation im OCRL-Gen auf (Monnier et al., 2000).

2.2 Domänenstruktur des OCRL-Proteins

Das Produkt des OCRL-Gens hat ein Molekulargewicht von 105 kDa (Olivos-Glander et al., 1995) und zeigt eine hohe Sequenzhomologie zu der Inositol-Polyphosphat 5-Phosphatase INPP5B (Attree et al., 1992). Durch alternatives Spleißen können zwei unterschiedliche OCRL-Isoformen mit einer Länge von 901 bzw. 893 Aminosäuren (AS) entstehen, die sich durch die An- bzw. Abwesenheit von acht AS, kodiert vom alternativen Exon 18a, unterscheiden. Beide Isoformen kommen in allen bisher untersuchten Körpergeweben vor. Einzige Ausnahme bildet das Gehirn, in dem ausschließlich die OCRL-Isoform a zu finden ist, die die acht alternativen AS aufweist. In den übrigen Geweben ist dagegen Isoform b dominierend (Johnson et al., 2003). Bisher konnte nicht geklärt werden, warum beim LS trotz der offensichtlich ubiquitären Expression des OCRL-Gens lediglich drei Körpergewebe betroffen sind. Ein Ansatzpunkt liefert INPP5B, die als kompensatorische 5-Phosphatase bei OCRL-Defizienz fungiert. Dies wird durch mit Wildtyp-Mäusen verbleichbare *Ocrl*-Knockout-Mäuse und der Beobachtung einer erhöhten, murinen *Inpp5b*-Expression im Vergleich zur humanen *INPP5B*-Expression gestützt (Janne et al., 1998).

Ursprünglich wurde OCRL als Golgi-Protein mit einer Lokalisation am *trans* Golgi-Netzwerk (TGN) der Zelle beschrieben (Olivos-Glander et al., 1995; Dressman et al., 2000). Wenig später wurde OCRL auch an endosomalen Strukturen und Clathrin-bedeckten Vesikeln detektiert (Ungewickell et al., 2004; Choudhury et al., 2005). Auch eine Plasmamembran-Lokalisation nach Stimulierung mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) (Faucherre et al., 2005) sowie eine Lokalisation an endozytotischen Transportvesikeln (Erdmann et al., 2007) wurde beobachtet. OCRL weist eine Multidomänenstruktur auf, die in Abb. 2.2 schematisch für Isoform a dargestellt ist.

Die katalytisch aktive IPPc- (*inositol polyphosphate phosphatase, catalytic*-) Domäne umfasst die AS 237-539 (Choudhury et al., 2005). Sie vermittelt vor allem die Hydrolyse des Membran-gebundenen Phosphoinositids Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat [PI(4,5)P₂] an der D-5-Position des Inositolrings zu Phosphatidylinositol-4-Phosphat [PI(4)P]. Da OCRL zu den Inositol-Polyphosphat 5-Phosphatasen vom Typ II gehört, wird auch das Phosphoinositid Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat [PI(3,4,5)P₂] sowie die wasserlöslichen Inositol-phosphate Inositol-1,4,5-Trisphosphat [Ins(1,4,5)P₃] und Inositol-1,3,4,5-Tetrakisphosphat [Ins(1,3,4,5)P₄] als Substrat erkannt. (Zhang et al., 1995; Zhang et al., 1998). Zudem konnte eine geringe Aktivität gegenüber Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat [PI(3,5)P₂] nachgewiesen werden (Schmid et al., 2004). Ein Sequenzhomologievergleich mit bekannten 5-Phosphatasen

führte zur Identifikation von zwei konservierten AS-Sequenzmotiven, (F/I)WXGDXN(F/Y)R und (R/N)XP(S/A)(W/Y)(C/T)DR(I/V)(L/I), die sich an den AS-Positionen 418-426 und 493-502 der IPPc-Domäne von OCRL befinden (Majerus et al., 1999). Austausch dieser konservierten AS führen zu einer stark reduzierten bis fehlenden Phosphatase-Aktivität (Jefferson und Majerus, 1996).

Neben der katalytisch aktiven IPPc-Domäne wurden darüber hinaus diverse Protein-Interaktionsdomänen und -motive identifiziert. Im N-Terminus von OCRL befindet sich ein FEDNF-Motiv, dass eine Interaktion mit dem endozytotischen Adaptorprotein AP2 vermittelt (Ungewickell et al., 2004). Zudem konnte erst kürzlich eine PH- (*pleckstrin homology*-) Domäne identifiziert werden, die sich über die AS 1-119 erstreckt (Mao et al., 2009). Im Gegensatz zu vielen bisher charakterisierten PH-Domänen (Lemmon, 2004) zeigt die PH-Domäne des OCRL-Proteins jedoch keinerlei Phosphoinositid-Bindungskapazität (Mao et al., 2009). Stattdessen konnte eines der beiden Clathrin-Bindemotive von OCRL, LIDI, in dieser Domäne lokalisiert werden (Choudhury et al., 2009; Mao et al., 2009). Das zweite Clathrin-Bindemotiv, LIDLE, befindet sich in der RhoGAP- (*Rho GTPase-activating protein*-) ähnlichen-Domäne am C-Terminus von OCRL (Choudhury et al., 2005; Erdmann et al., 2007). Beide Clathrin-Boxen ermöglichen eine Bindung der schweren Kette von Clathrin und eine Lokalisation von OCRL an Clathrin-bedeckten Vesikeln (Choudhury et al., 2005; Mao et al., 2009). Direkt benachbart zur LIDLE-Box befinden sich die vom alternativen Exon 18a kodierten acht AS. Es konnte gezeigt werden, dass die OCRL-Isoform a vermehrt an Clathrin-bedeckten Transportintermediaten lokalisiert ist (Choudhury et al., 2009), vermutlich bedingt durch die Ausbildung einer Schleife bei Anwesenheit der acht AS, die einen besseren Zugang zu Clathrin ermöglicht (Erdmann et al., 2007; Choudhury et al., 2009).

Die RhoGAP-ähnliche-Domäne umfasst die AS 679-901 der OCRL-Isoform a (Erdmann et al., 2007). Sie weist eine hohe Ähnlichkeit zu anderen RhoGAP-Domänen auf, jedoch befindet sich anstelle des katalytischen Arginins ein Glutamin (Peck et al., 2002), wodurch die fehlende RhoGAP-Aktivität erklärt werden kann (Lichter-Konecki et al., 2006). Über die RhoGAP-ähnliche-Domäne wird eine Interaktion mit den RhoGTPasen Rac1 und Cdc42 vermittelt, die sowohl im aktiven, als auch im inaktiven Zustand gebunden werden (Faucherre et al., 2003). Zudem konnte eine Interaktion mit den TGN-assoziierten GTPasen Arf1 und Arf6 über diese Domäne gezeigt werden (Lichter-Konecki et al., 2006).

In der Linkerregion zwischen IPPc- und RhoGAP-ähnlicher-Domäne konnte eine ASH- (*ASPM*, *SPD2*, *Hydin*-) Domäne identifiziert werden (Ponting, 2006), die sich von AS-Position 564-678 erstreckt (Erdmann et al., 2007). Zusammen mit der RhoGAP-ähnlichen Domäne ermöglicht sie die Interaktion mit dem endosomalen Adaptorprotein APPL1 (*adaptor protein containing PH domain, PTB domain and Leucine zipper motif*) (Erdmann et al., 2007) sowie den PH-Domänen-Proteinen IPIP27A und IPIP27B (*inositol polyphosphate phosphatase interacting protein of 27 kDa*; Swan et al., 2010; Noakes et al., 2011). Darüber hinaus konnte eine OCRL-Interaktion mit Mitgliedern der Rab-Proteinfamilie nachgewiesen werden, die von der ASH-Domäne vermittelt wird. Für die Bindung müssen die Rab-GTPasen im aktiven, GTP-gebundenen Zustand vorliegen (Hyvola et al., 2006; Fukuda et al., 2008; Rodriguez-Gabin et al., 2010; Hou et al.,

2011). Bisher bekannte Rab-Interaktionspartner sind Rab1a/b, Rab3a/b/c/d, Rab5a/b/c, Rab6a/b, Rab8a/b, Rab13, Rab14, Rab22b, Rab31 und Rab35. Die Bindung an Rab-Proteine ist essentiell, da sie die korrekte Lokalisation von OCRL gewährleistet. Dabei sind Rab1a und Rab6 für die OCRL-Rekrutierung an den Golgi-Apparat und Rab5 für die Rekrutierung an das frühe Endosom verantwortlich (Hyvola et al., 2006).

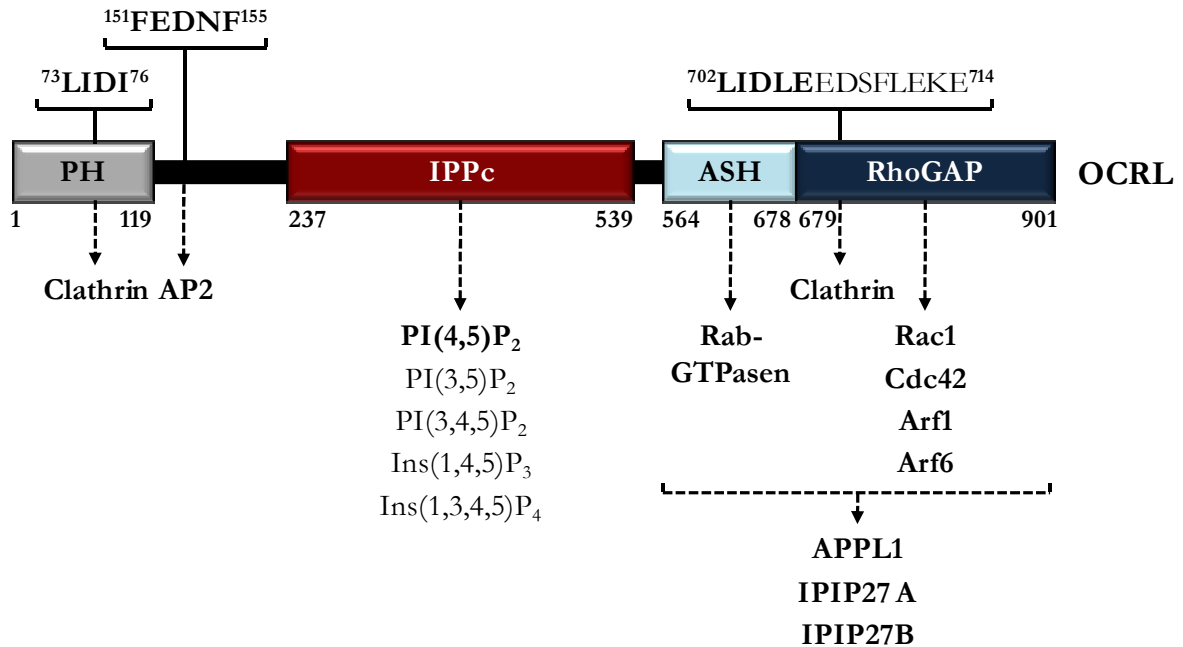


Abb. 2.2: Domänenstruktur der Inositol-Polyphosphat 5-Phosphatase OCRL-Isoform a. Dargestellt sind die funktionellen OCRL-Proteindomänen in Form farbiger Kästchen. Oberhalb der Domänenstruktur sind die OCRL-Bindemotive (fett gedruckt) sowie die acht alternativen AS der Isoform a mit Angabe der AS-Positionen abgebildet. Unterhalb der Domänenstruktur zeigen die schwarzen Pfeile auf die Proteininteraktionspartner sowie die Substrate von OCRL. Das Hauptsubstrat ist fett gedruckt. Die AS-Positionen der OCRL-Proteindomänen sind unterhalb der Domänenstruktur angegeben. PH: *pleckstrin homology*; IPPc: *inositol polyphosphate phosphatase, catalytic*; ASH: *ASPM, SPD2, Hydin*; RhoGAP: *RhoGTPase activating protein*.

2.3 Der endozytotische Transportweg und OCRL

Die Lokalisation von OCRL an der Plasmamembran sowie an endozytotischen, Clathrin-bedeckten Vesikeln lässt eine Funktion von OCRL in der Clathrin-vermittelten Endozytose (*clathrin-mediated endocytosis*, CME) vermuten. Dieser Transportprozess dient der Internalisierung von Plasmamembran-ständigen Proteinen und ist in Abb. 2.3 schematisch für einen Zelloberflächenrezeptor dargestellt. Initiiert wird die CME durch Ausbildung Clathrin-bedeckter Gruben (*clathrin coated pits*, CCP) an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran, die einen Durchmesser von etwa 10-300 nm aufweisen (Heuser, 1980). Hauptbestandteil der CCPs ist das Clathrin, das aus drei leichten (35 kDa) und drei schweren (180 kDa) Proteinketten besteht. Zusammen bilden sie das Clathrin-Triskelion. Bei Assemblierung dieser Clathrin-Triskelia kommt es zur Ausbildung einer Gitternetzstruktur (Ungewickell und Branton, 1981; Pearse und Crowther, 1987). Die Rekrutierung der Clathrin-Triskelia an die Plasmamembran wird von verschiedenen Adaptorproteinen vermittelt, die wiederum über Bindung an das an der Plasmamembran vorherrschende Phosphoinositid PI(4,5)P₂ rekrutiert werden (Ungewickell und

Hinrichsen, 2007). Die zentrale Rolle bei der Clathrin-Bindung nimmt das tetramere Adaptorprotein AP2 ein, da es in nahezu allen CCPs an der Plasmamembran enthalten ist (Keyel et al., 2006), und die siRNA-vermittelte Depletion der AP2-Untereinheiten eine fast vollständige Eliminierung der CCPs hervorruft (Hinrichsen et al., 2003; Motley et al., 2003). AP2 ermöglicht zudem zusammen mit anderen, monomeren Adaptorproteinen die selektive Rekrutierung des Proteincargos in die CCPs. Insgesamt vier verschiedene Erkennungssequenzen wurden in der zytoplasmatischen Domäne der Zelloberflächenproteine identifiziert, die von den Adaptorproteinen erkannt werden können (Ungewickell und Hinrichsen, 2007). Für OCRL konnte nachgewiesen werden, dass es *in vitro* die Ausbildung des Clathrin-Gitternetzes stimuliert (Choudhury et al., 2005; Mao et al., 2009). Eine Beteiligung von OCRL an der Clathrin-Assemblierung der CME konnte bisher nicht gezeigt werden.

Die Krümmung der Membran wird einerseits durch die Ausbildung der Clathrin-Gitternetzstruktur (Hinrichsen et al., 2006), andererseits durch verschiedene akzessorische Proteine vermittelt, die schließlich eine vollständige Invagination der Membran und Ausbildung eines Clathrinbedeckten Vesikels (CCV) bewirken. Mögliche akzessorische Proteine für diesen Prozess sind SNX9 (*sorting nexin 9*) und Amphiphysin, die sowohl eine Krümmung der Membran generieren und stabilisieren können, als auch an Clathrin und AP2 binden. Zudem rekrutieren sie die zytoplasmatische GTPase Dynamin an den Hals des entstehenden CCVs (David et al., 1996; Lundmark und Carlsson, 2003; Lundmark und Carlsson, 2004; Peter et al., 2004; Yoshida et al., 2004). Dynamin ermöglicht daraufhin die Abschnürung des CCVs von der Plasmamembran (Praefcke und McMahon, 2004).

Die CCV-Bildung ist zudem an eine Modulation des Aktin-Zytoskeletts gekoppelt (Yarar et al., 2005). Die Rekrutierung des Nukleationsfaktors Arp2/3 und des NPFs (*nucleation promoting factor*) N-WASP (*neural Wiskott Aldrich Syndrome protein*) an den entstehenden CCV lässt auf eine Arp2/3-vermittelte Aktin-Assemblierung schließen (Merrifield et al., 2004). Die Aktivität von N-WASP ist abhängig von PI(4,5)P₂ (Rohatgi et al., 1999; Rohatgi et al., 2000). Bei einer erhöhten PI(4,5)P₂-Konzentration kommt es an Vesikeln zu einer vermehrten, N-WASP-abhängigen Bildung von sogenannten Aktin-Kometen, bestehend aus F-Aktin und Aktin-bindenden Proteinen, die für die Vesikelmotilität essentiell sind (Rozelle et al., 2000). Auch in LS-Fibroblasten, die einen erhöhten PI(4,5)P₂-Level aufweisen (Zhang et al., 1998), wurden vermehrt Aktin-Kometen detektiert (Allen, 2003). OCRL könnte daher über Modulation der PI(4,5)P₂-Konzentration an der Regulierung des Aktin-Zytoskeletts während der CME beteiligt sein.

Im letzten Schritt der CME kommt es in Abhängigkeit von ATP zum Abstreifen der Clathrinhülle, vermittelt durch den DnaJ-Kofaktor Auxilin und dem Hitzeschockprotein Hsc70 (Gall et al., 2000; Pishvaei et al., 2000; Greener et al., 2001; Lemmon, 2001). Zudem scheint die Dephosphorylierung von PI(4,5)P₂ durch die Inositol-Polyphosphat 5-Phosphatase Synaptojanin 1 wichtig für die Deassemblierung von Clathrin zu sein (Cremona et al., 1999; Harris et al., 2000). Aufgrund der Lokalisation von OCRL an endozytotischen Vesikeln und PI(4,5)P₂ als bevorzugtes Substrat wird eine Beteiligung von OCRL am Abstreifungsprozess der Clathrinhülle postuliert (Erdmann et al., 2007; Mao et al., 2009).

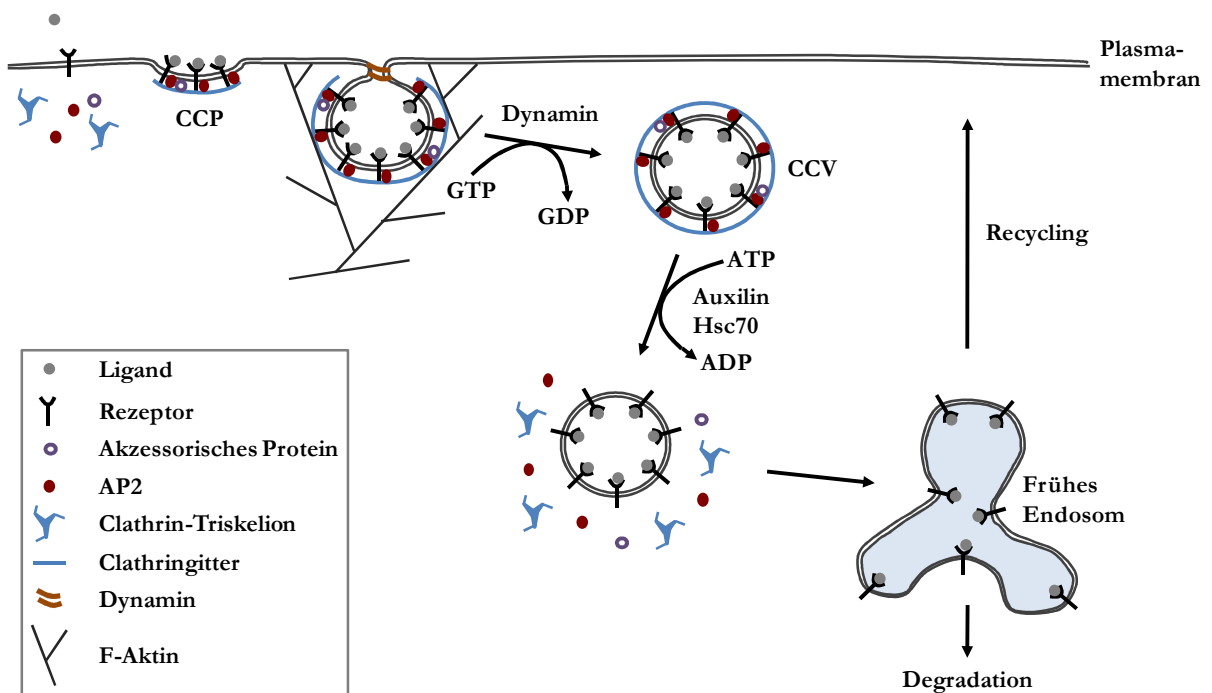


Abb. 2.3: Clathrin-vermittelte Endozytose eines Zelloberflächenrezeptors. Das Adaptorprotein AP2 wird über Interaktion mit Phosphoinositiden und mit der zytoplasmatischen Domäne Liganden-gebundener Rezeptoren an die Plasmamembran rekrutiert, von wo aus AP2 die Rekrutierung von Clathrin steuert. Die Invagination des dadurch entstehenden Clathrin-bedeckten Vesikels (CCP) wird von Clathrin und akzessorischen Proteinen sowie durch Modulierung des Aktin-Zytoskeletts vermittelt. Die GTPase Dynamin ermöglicht die GTP-abhängige Abschnürung des Clathrin-bedeckten Vesikels (CCV). Das Abstreifen der Clathrinhülle wird von Auxilin und Hsc70 in Abhängigkeit von ATP vermittelt. Der endozytotische Vesikel entlässt seine Fracht ins frühe Endosom. Die Rezeptor-Ligand-Komplexe werden daraufhin entweder zur Plasmamembran zurücktransportiert (Recycling) oder im Lysosom degradiert (Degradation).

Der im Vesikel enthaltene Cargo kann nun in Abhängigkeit des transportierten Rezeptors unterschiedliche Destinationen erreichen. Der Eisentransporter Transferrin (Tf) ist ein Beispiel für den Recycling-Transportweg. Nach Clathrin-abhängiger Endozytose des Eisen-gebundenen Tfs über den Tf-Rezeptor (TfR) erfolgt eine Fusion des Vesikels mit dem frühen Endosom. Nach Dissoziation des Eisens vom Tf aufgrund der pH-Wert-Senkung wird der Rezeptor-Ligand-Komplex zurück zur Plasmamembran transportiert (Recycling) (Qian et al., 2002). Im Gegensatz zum Recycling ist aber auch eine Degradation des Protein-Cargos im Lysosom möglich. Ein Beispiel für den degradativen Transportweg ist der EGF-Rezeptor (EGFR). Nach Endozytose des Rezeptor-Ligand-Komplexes wird dieser vom frühen Endosom zum Lysosom transportiert. Dort erfolgt der Abbau des EGFR und seines Liganden um die EGFR-vermittelten Signaltransduktionskaskaden zu unterbinden (Sorkin und Goh, 2009).

2.4 Der retrograde Transportweg und OCRL

Neben der primären Golgi-Verteilung sowie der Lokalisation an der Plasmamembran und an endozytotischen Vesikeln ist ein beträchtlicher Anteil des OCRL-Proteins über die Rab5-Interaktion am frühen Endosom lokalisiert (Hyvola et al., 2006). Das frühe Endosom ist neben der Sortierung von endozytierten Proteinen für den degradativen oder Recycling-Transportweg (siehe 2.3) auch am Proteintransport zu biosynthetischen/sekretorischen Kompartimenten beteiligt. Dieser Prozess wird als retrograder Transportweg bezeichnet und liefert Proteincargo an das TGN, an Golgi-Membranen und in einigen Fällen an das endoplasmatische Reticulum (Johannes und Popoff, 2008). Pflanzliche und bakterielle Toxine, wie Ricin und Shiga Toxin, können auf ihrem Weg in die Zelle ebenfalls diesen Transportweg durchlaufen (Sandvig und van Deurs, 2005). Retrograde Transportvesikel können sowohl nach Formation von Clathrin- als auch Clathrin-unabhängigen Hüllen gebildet werden (Abb. 2.4). Für die Shiga Toxin-Untereinheit B (STxB) konnte eine Beteiligung von Clathrin und dessen Adaptorprotein EpsinR nachgewiesen werden (Lauvrak et al., 2004; Saint-Pol et al., 2004). Auch für den Mannose 6-Phosphat- (M6P-) Rezeptor (siehe 2.5) wurde EpsinR als essentiell für den retrograden Transport identifiziert (Saint-Pol et al., 2004). Zudem konnte eine Involvierung der Clathrin-Adaptorproteine AP1 und AP3 (Meyer et al., 2000; Medigeschi und Schu, 2003) sowie des AP1-Bindungspartners PACS1 (*phosphofurin acidic-cluster sorting protein 1*) für den Rücktransport des M6P-Rezeptors zum TGN gezeigt werden (Scott et al., 2006).

Eine ebenfalls wichtige Funktion im retrograden Transportweg nimmt das Retromer ein. Hierbei handelt es sich um einen Vesikelhüllen-ähnlichen Proteinkomplex, der in der Knospungshefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt wurde (Seaman et al., 1997; Seaman et al., 1998). In Säugerzellen besteht das Retromer aus einem VPS26- (*vacuolar sorting protein 26*-) VPS29-VPS35-Trimer (Haft et al., 2000) und einem SNX-Dimer (Rojas et al., 2007). SNX-Proteine binden unabhängig vom VPS26-VPS29-VPS35-Trimer an stark-gewölbte Bereiche des frühen Endosoms. Dies wird ermöglicht durch die Phosphatidylinositol-3-Phosphat- [PI(3)P-] und PI(3,5)P₂-bindende PX- (*phox homology*-) Domäne sowie der BAR- (Bin/Amphiphysin/Rvs-) Domäne in den SNX-Proteinen (Cozier et al., 2002; Zhong et al., 2002; Carlton et al., 2004). Erkennung und Bindung der zytoplasmatischen Bereiche des Protein-Cargos, wie z. B. des M6P-Rezeptors, erfolgt schließlich über Vps35. (Nothwehr et al., 1999; Nothwehr et al., 2000; Arighi et al., 2004). Die dafür benötigte Rekrutierung des VPS26-VPS29-VPS35-Trimers an das Endosom wird durch das SNX-Dimer (Rojas et al., 2007) und die Interaktion mit Rab7 vermittelt (Rojas et al., 2008).

Zusätzlich zum frühen, retrograden Transport vom frühen Endosom wurde ein später Transportweg zurück zum TGN beschrieben. Dieser ist abhängig von Rab9 und dessen Effektor, TIP47 (*tail interacting protein of 47 kDa*), und wird am späten Endosom initiiert (Lombardi et al., 1993; Diaz und Pfeffer, 1998) (Abb. 2.4). Es konnte gezeigt werden, dass Rab9 und TIP47 für den retrograden Transport von M6P-Rezeptoren benötigt werden (Lombardi et al., 1993; Riederer et al., 1994; Diaz und Pfeffer, 1998).

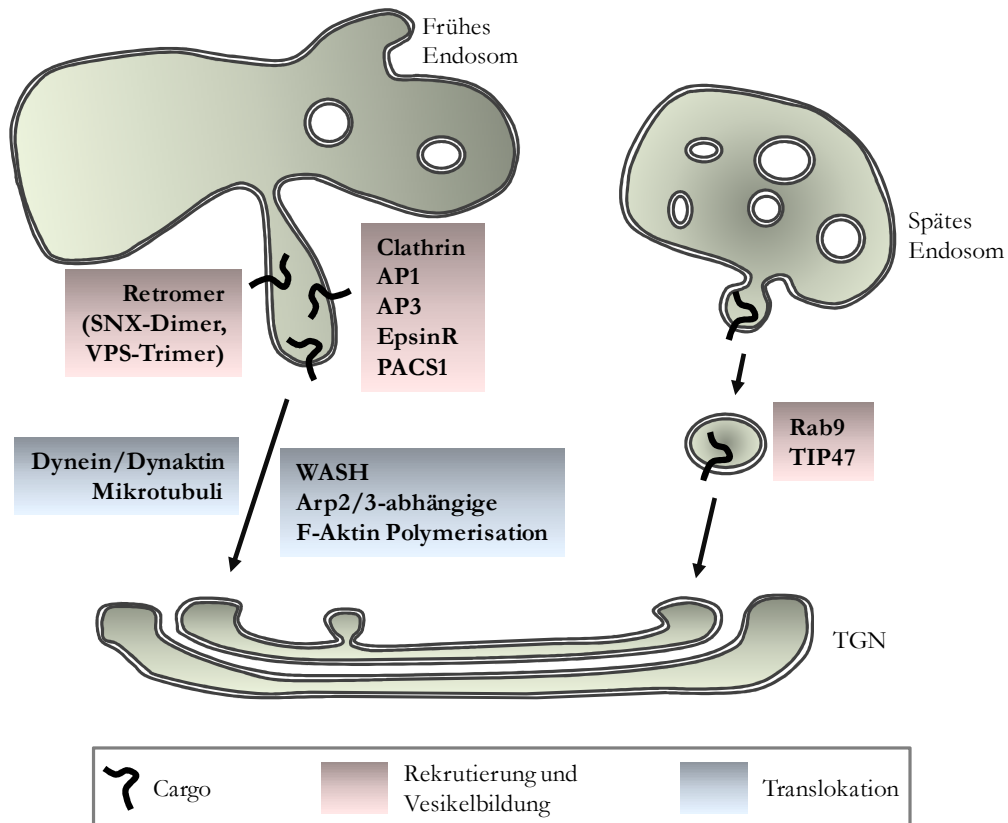


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der am retrograden Transport beteiligten Proteine. Am frühen Endosom sind das Retromer sowie Clathrin und Adaptorproteine (AP1, AP3, EpsinR und PACS1) an der Rekrutierung des Cargos sowie der Vesikelbildung beteiligt. Der Vesikel-Transport erfolgt in Abhängigkeit der Motorproteine Dynein/Dynaktin, von Mikrotubuli und einer WASH-vermittelten Arp2/3-abhängigen F-Aktin-Polymerisation. Am späten Endosom erfolgt die Cargo-Rekrutierung und Vesikelbildung über Rab9 und TIP47. TGN: *trans* Golgi Netzwerk.

Der Mechanismus des zytoplasmatischen Transports retrograder Transportvesikel ist weitestgehend ungeklärt (Johannes und Popoff, 2008). Bei Retromer-assoziierten, tubulären Strukturen kommt es zu einer Assoziation mit Mikrotubuli (Bonifacino und Hurley, 2008). Als molekularer Motor für den retrograden Transport von STxB und M6P-Rezeptoren konnte der Dynein/Dynaktin-Komplex identifiziert werden (Hehnl et al., 2006; Hong et al., 2009). Zudem wurde eine Beteiligung des Retromer-assoziierten NPFs WASH (*Wiskott-Aldrich syndrome protein and SCAR homolog*) am retrograden Transport nachgewiesen, indem WASH die Verbindung der Transportvesikel mit Mikrotubuli und eine F-Aktin-Polymerisation in Abhängigkeit von Arp2/3 vermittelt (Gomez und Billadeau, 2009).

Auch eine Funktion von OCRL im retrograden Transportweg wird postuliert. Nach transienter Überexpression eines OCRL-Wildtyp- (WT-) Proteins und einer OCRL-Variante mit fehlender Phosphatase-Domäne sowie Depletion des OCRL-Proteins mittels siRNA konnte eine Relokalisation eines stabil-überexprimierten M6P-Rezeptors in vergrößerten, endosomalen Strukturen beobachtet werden (Choudhury et al., 2005). Aufgrund dieser Daten wurde auf einen Defekt im retrograden Transport geschlossen. Dieser wurde für den Transport von STxB in OCRL-überexprimierenden Zellen bestätigt. Ein direkter Beweis für einen gestörten, retrograden Transport bei vorliegender OCRL-Defizienz konnte jedoch nicht erbracht werden (Choudhury et

al., 2005). Auch die Frage nach der genauen Funktion des OCRL-Proteins in diesem Transportprozess bleibt nach wie vor offen.

2.5 Der lysosomale Transport saurer Hydrolasen über den M6P-Rezeptor

Sowohl der endozytotische (siehe 2.3) als auch der retrograde (siehe 2.4) Transportweg wird vom M6P-Rezeptor durchlaufen. Dieser Rezeptor eignet sich daher als Modell für die Analyse beider Transportrouten. In der Zelle wurden zwei unterschiedliche M6P-Rezeptor-Formen mit einer molaren Masse von 46 (MPR46) bzw. 300 kDa (MPR300) als einzige Mitglieder der Lectine vom p-Typ identifiziert (Dahms und Hancock, 2002). Sie weisen eine relativ lange Halbwertszeit von ungefähr 20 h auf und zyklisieren kontinuierlich zwischen TGN, Endosom und Plasmamembran (Dahms et al., 2008) (Abb. 2.5).

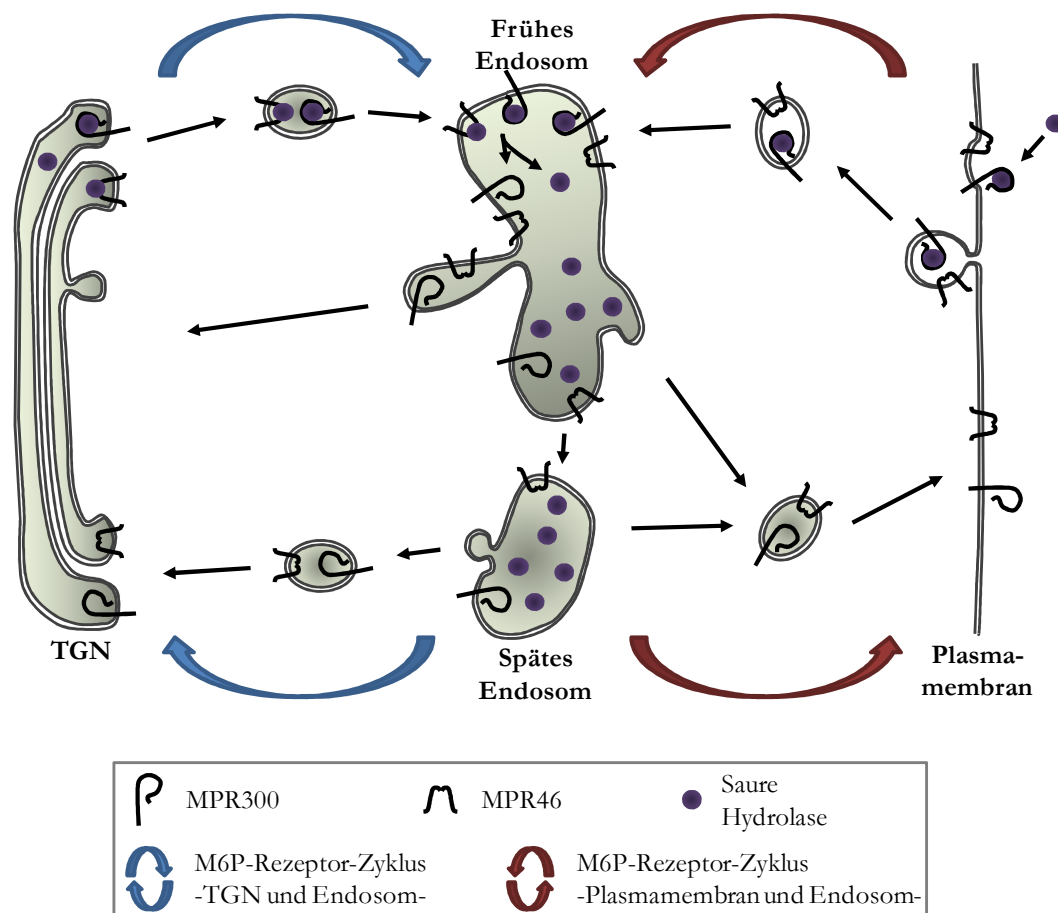


Abb. 2.5: Transportwege der M6P-Rezeptorformen. Der MPR300 und der MPR46 zyklisieren zum einen zwischen *trans* Golgi-Netzwerk (TGN) und Endosom und zum anderen zwischen Plasmamembran und Endosom. Am TGN können beide M6P-Rezeptorformen saure Hydrolasen binden und zum Endosom transportieren. An der Plasmamembran bindet nur der MPR300 saure Hydrolasen. Der Ligand dissoziiert schließlich am Endosom wieder vom Rezeptor. Die freien M6P-Rezeptoren werden entweder vom frühen oder vom späten Endosom zurück zum TGN oder zur Plasmamembran transportiert.

M6P-Rezeptoren gehören zu den integralen Membran-Glykoproteinen vom Typ I und dienen dem Transport lysosomaler Enzyme. Diese werden über spezifische M6P-Bindungsstellen in der extrazytoplasmatischen Domäne der M6P-Rezeptoren gebunden. Eine Übersicht zum

Aufbau der M6P-Rezeptoren ist in Abb. 2.6 dargestellt. Der monomere MPR300 besitzt eine extrazytoplasmatische Region mit 15 repetitiven Abschnitten (Lobel et al., 1988), die zwei M6P-Bindungsstellen in Abschnitt 3 und 9 enthält (Hancock et al., 2002). Im Gegensatz zum MPR46 besitzt der MPR300 zudem weitere Erkennungssequenzen, mithilfe derer eine M6P-unabhängige Bindung zusätzlicher Liganden, wie IGFII (*insulin-like growth factor II*-) und Retinolsäure, ermöglicht wird (Schmidt et al., 1995; Kang et al., 1999). Die extrazytoplasmatische Domäne des MPR46 weist eine Ähnlichkeit zu den repetitiven Abschnitten des MPR300 auf (Dahms et al., 2008) und enthält eine einzige M6P-Bindungssequenz (Tong und Kornfeld, 1989). In der Membran liegt eine dimerisierte Form des MPR46 vor (Dahms und Hancock, 2002), weshalb analog zum MPR300 eine gleichzeitige Bindung von zwei M6P-Resten erfolgt (Bräulke und Bonifacio, 2009). Zusätzlich zu den Liganden-Bindungsstellen konnten in beiden M6P-Rezeptoren verschiedene Sortierungsmotive identifiziert werden, die in die zytoplasmatische Domäne eingebettet sind und verschiedenartig modifiziert werden können (Meresse et al., 1990; Schweizer et al., 1996).

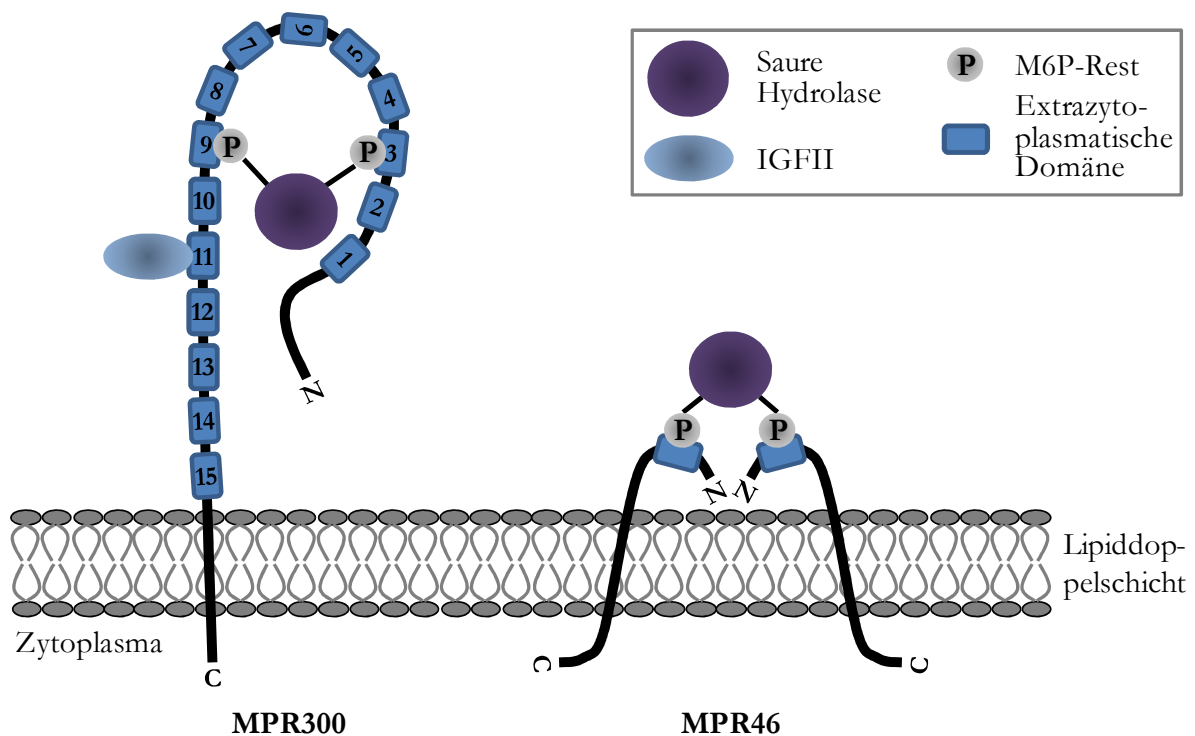


Abb. 2.6: Aufbau der M6P-Rezeptoren. Der MPR300 weist 15 repetitive Abschnitte in der extrazytoplasmatischen Domäne auf. Saure Hydrolasen können über einen M6P-Rest an Abschnitt 3 und 9, IGFII an Abschnitt 11 binden. Der MPR46 liegt als Dimer in der Membran vor. Die extrazytoplasmatische Domäne des MPR46 zeigt Ähnlichkeit zu den repetitiven Sequenzen des MPR300 und kann je einen M6P-Rest binden. Das N- und C-terminale Ende ist angegeben [Abbildung nach Bräulke und Bonifacio (2009)].

Die Liganden der M6P-Rezeptoren, die sauren Hydrolasen, dienen der Degradation von Makromolekülen im Lysosom (Bräulke und Bonifacio, 2009). Bisher wurden bereits über 50 solcher lysosomaler Enzyme identifiziert. Nach Synthese der sauren Hydrolasen und Translokation ins ER-Lumen erfolgt ein vesikulärer Transport ins Golgi-Kompartiment. Dort wird die Markierung der Enzyme mit M6P-Resten von zwei nacheinander agierenden Enzymen vermittelt

(Lazzarino und Gabel, 1989; Kornfeld et al., 1999; Rohrer und Kornfeld, 2001). Im späten Golgi-Kompartiment werden die M6P-markierten lysosomalen Enzyme vom M6P-Rezeptor erkannt und gebunden (Rohrer und Kornfeld, 2001). Für den Transport ins Endosom erfolgt eine Verpackung des Rezeptor-Ligand-Komplexes in Adaptorprotein AP1-positive CCVs, die von den Sortierungssignalen in der zytoplasmatischen Domäne der M6P-Rezeptoren vermittelt wird (Campbell und Rome, 1983; Schulze-Lohoff et al., 1985; Johnson und Kornfeld, 1992). Der Großteil der M6P-Rezeptor-positiven Vesikel wird zum frühen Endosom transportiert (Ludwig et al., 1991; Press et al., 1998; Waguri et al., 2003). Die Dissoziation des Liganden vom M6P-Rezeptor erfolgt vermutlich während der Reifung vom frühen zum späten Endosom, bedingt durch den dabei sinkenden pH-Wert (Braulke und Bonifacino, 2009). Anschließend werden die sauren Hydrolasen durch Fusion des späten Endosoms mit dem Lysosom ins lysosomale Lumen transportiert (Storrie und Desjardins, 1996). Lysosomale Enzyme können auf ihrem Weg vom TGN zum Lysosom, auch anterograde Transport genannt, weitere Prozessierungsschritte durchlaufen. Ein Beispiel hierfür ist die aspartatische Protease Cathepsin D (Cath D). Cath D liegt beim Transport vom TGN zum Lysosom in drei unterschiedlichen Formen vor. Am TGN bindet ein 52 kDa schweres Pro-Cath D an den M6P-Rezeptor und wird zum endosomalen Kompartiment transportiert. Nach Dissoziation vom Rezeptor wird ein Propeptid abgespalten und es entsteht ein Cath D-Intermediat von 48 kDa. Im Lysosom reift das Cath D-Intermediat schließlich zum aktiven, zwei-kettigen Cath D, das aus einer leichten, N-terminalen Kette (14 kDa) und einer schweren, C-terminalen Kette (34 kDa) besteht (Zaidi et al., 2008).

Im Gegensatz zu den lysosomalen Enzymen wird der M6P-Rezeptor über den retrograden Transportweg zum TGN zurücktransportiert (siehe 2.4), wo er erneut M6P-markierte saure Hydrolasen binden kann. Etwa 3-10 % der Gesamt-M6P-Rezeptormenge wird an die Plasmamembran transportiert, wo der M6P-Rezeptor anschließend über die CME wieder in die Zelle transportiert wird (siehe 2.3; Braulke und Bonifacino, 2009). Obwohl beide M6P-Rezeptorformen an der Plasmamembran lokalisiert sind, ist jedoch nur der MPR300 in der Lage, an der Zelloberfläche Liganden zu binden und somit zuvor M6P-Rezeptor-unabhängig sekretierte, lysosomale Enzyme zu reinternalisieren (Dahms et al., 2008). Dies ist auf das verminderte MPR46-Bindungsvermögen bei leicht alkalischen Bedingungen, wie dem an der Zelloberfläche vorliegenden pH von 7,4, zurückzuführen (Tong und Kornfeld, 1989).

3 ZIEL DER ARBEIT

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war die Erforschung einer möglichen Funktion des humanen OCRL-Proteins in verschiedenen Transportprozessen eukaryotischer Zellen im allgemeinen und im M6P-Rezeptor-Transportweg im speziellen.

Zunächst sollte der Annahme nachgegangen werden, ob OCRL eine generelle Rolle bei der CME in eukaryotischen Zellen spielt, so z.B. im endozytotischen Transport des TfR und des M6P-Rezeptors. Dazu sollten stabil OCRL-überexprimierende CV1-Zellen generiert und verwendet werden.

Aufgrund einer in der Dissertation von Juliane Najm (2009) beobachteten, reduzierten Internalisierung des lysosomalen Enzyms Arylsulfatase B in Fibroblasten von Patienten mit LS sollte der Transportweg des M6P-Rezeptors in OCRL-defizienten Zellen detailliert untersucht werden. Hierfür wurde ein transientes Zellsystem etabliert, für das mithilfe von *small interfering* RNAs (siRNAs) eine Depletion des OCRL-Proteins in HeLa-Zellen erzielt wurde. Es sollten Experimente zur Bestimmung der Proteinmenge, der Halbwertszeit und der Lokalisation des M6P-Rezeptors durchgeführt werden. Zudem sollte der anterograde und retrograde Transport des M6P-Rezeptors sowie die Sekretion lysosomaler Enzyme und die Lysosomenmorphologie analysiert werden. Darüber hinaus sollte geklärt werden, welche OCRL-Domäne in die entsprechende zelluläre Funktion von OCRL involviert ist.

Schließlich sollte neben der Untersuchung verschiedener Transportwege auch ein möglicher Einfluss von OCRL auf andere zelluläre Prozesse, wie Signaltransduktionswege und das Aktin-Zytoskelett, analysiert werden.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Bakterienstämme und Zelllinien

Tab. 4-1: Verwendete Bakterienstämme und Zelllinien. Aufgeführt ist die jeweilige Bezeichnung, die genetische Eigenschaft bzw. der Zelltyp, die Herkunft und, soweit vorhanden, eine Referenz für die verwendeten Bakterienstämme und Zelllinien. ATCC: American Type Culture Collection.

	Bezeichnung	Eigenschaft/Zelltyp	Herkunft	Referenz
Bakterienstämme	<i>E. coli</i> DH10B	F- <i>mcrA</i> D(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80d <i>lacZ</i> DM15 D <i>lacX</i> 74 <i>deoR recA1</i> <i>endA1 araD139 D(ara, leu)</i> 7697 <i>galU</i> <i>galK l- rpsL</i> (Str ^R) <i>nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe)	
	<i>E. coli</i> TOP10	F- D(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80d <i>lacZ</i> DM15 D <i>lacX</i> 74 <i>deoR recA1</i> <i>araD139 D(ara, leu)</i> 7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe)	
Zelllinie	HeLa	Adhärente Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (human)	ATCC (USA)	Scherer <i>et al.</i> (1953)
	HEK-293	Adhärente, embryonale Nierenzelllinie (human)	ATCC (USA)	Graham <i>et al.</i> (1977)
	Flp-In TM -CV1	Adhärente Fibroblasten aus Nieren der Grünen Meerkatze	Invitrogen (Karlsruhe)	
Stabil-überexprimierende Zelllinie	293HMY	stabil MPR46-überexprimierende HEK-293-Zelllinie	Prof. Dr. S. R. Pfeffer, Kalifornien, USA	Itin <i>et al.</i> (1997)
	CAT-Flp-In-CV1	stabil Chloramphenicol- Acetyltransferase-überexprimierende CV1-Zelllinie	diese Arbeit	
	OCRL ^{WT} -Flp-In-CV1	stabil OCRL ^{WT} -überexprimierende CV1-Zelllinie	diese Arbeit	
	OCRL ^{R493A/R500T} -Flp-In-CV1	stabil OCRL ^{R493A/R500T} - überexprimierende CV1-Zelllinie	diese Arbeit	

4.1.2 Plasmide

4.1.2.1 Zur Verfügung gestellte Konstrukte

Tab. 4-2: Vorliegende Konstrukte für die eukaryotische Expression. Angegeben sind jeweils der Name des Konstruktes, der Name des Inserts mit Genbank-Eintragsnummer, der Umfang der vom Insert kodierten Proteinsequenz sowie die Herkunft des Konstruktes.

Name des Konstrukts	Proteinbezeichnung (Genbank Eintragsnummer)	kodierte Amino- säuren	Herkunft
pEGFP-N1_FAPP1-PH	Wildtyp-FAPP1 (NM_019091.3)	1-101	T. Balla (NIH, Bethesda, USA)
pEGFP-N1_PLCδ-PH	Wildtyp-PLCδ (NM_001130964.1)	1-170	T. Balla (NIH, Bethesda, USA)
pENTR3C_OCRL ^{WT+18a}	Wildtyp-OCRL Isoform A (NM_000276.3)	2-901	AG Kutsche (UKE,
pENTR3C_OCRL ^{WT-18a}	Wildtyp-OCRL Isoform B (NM_001587.3)	2-893	AG Kutsche (UKE, Hamburg)
pGreenLantern-Rab7	Wildtyp-Rab7 (NM_004637.5)		S. Linder (Hamburg)
pMT2SM-HA- Dest_OCRL ^{WT+18a}	Wildtyp-OCRL Isoform A (NM_000276.3)	2-901	AG Kutsche (UKE, Hamburg)
pMT2SM-HA- Dest_OCRL ^{WT-18a}	Wildtyp-OCRL Isoform B (NM_001587.3)	2-893	AG Kutsche (UKE, Hamburg)

4.1.2.2 Ausgangsvektoren für die Erstellung neuer Konstrukte

Tab. 4-3: Übersicht über Vektoren zur Herstellung neuer Konstrukte. Neben dem Vektornamen sind die Eigenschaften und die Herkunft angegeben.

	Name des Konstrukts	Eigenschaften	Herkunft
Gateway- Eingangsvektoren	pENTR3C	Km ^r , <i>ccdB</i>	Invitrogen, Karlsruhe
	pENTR/D-TOPO	Km ^r , <i>ccdB</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Gateway- Zielvektoren	pEF5/FRT/V5-DEST	Amp ^r , Hyg ^r , <i>ccdB</i> , FRT-Seq., Cm ^r , V5-Epitop	Invitrogen, Karlsruhe
	pMT2SM-HA-DEST	Amp ^r , HA- Epitop	AG Kutsche, UKE, Hamburg

4.1.2.3 Hergestellte Konstrukte

Mittels PCR-vermittelter Mutagenese + Restriktion/Ligation oder Topoisomerase-Reaktion hergestellte Gateway™-Eingangskonstrukte

Tab. 4-4: Übersicht über die mit Hilfe verschiedener Methoden hergestellten Eingangsvektoren für die Gateway™-Technologie. Angegeben sind die Konstruktnamen, die bei der PCR eingesetzten Oligonukleotide und Templates, die gewählte Methode zur Herstellung der Konstrukte sowie der Umfang der vom Insert kodierten Proteinsequenz.

Name des Konstrukts	Oligonukleotide	Template	Methode	Kodierte AS
pENTR3C_ OCRL ^{R493A/R500T+18a}	OCRL-Phos_F OCRL-Phos_R OCRL-R493A/R500T_F OCRL-R493A/R500T_R	pENTR3C_ OCRL ^{WT+18a}	PCR-vermittelte Mutagenese + Restriktion/ Ligation	2-901
pENTR3C_ OCRL ^{R493A/R500T-18a}	OCRL-Phos_F OCRL-Phos_R OCRL-R493A/R500T_F OCRL-R493A/R500T_R	pENTR3C_ OCRL ^{WT-18a}	PCR-vermittelte Mutagenese + Restriktion/ Ligation	2-893
pENTR/D- TOPO_OCRL ^{WT+18a}	OCRL_F+ATG+CACC OCRL_R-Ohne Stopp	pENTR3C_ OCRL ^{WT+18a}	Topoisomerase- Reaktion	1-900
pENTR/D-TOPO_ OCRL ^{R493A/R500T+18a}	OCRL_F+ATG+CACC OCRL_R-Ohne Stopp	pENTR3C_ OCRL ^{R493A/R500T+18a}	Topoisomerase- Reaktion	1-900

Mittels Gateway™-Technologie hergestellte Zielkonstrukte für die eukaryotische Expression

Tab. 4-5: Übersicht über die mithilfe der Gateway™-Technologie hergestellten Konstrukte. Angegeben sind der Name der Konstrukte, die Herstellungsmethode und der Umfang der vom Insert kodierten Proteinsequenz.

Name des Konstrukts	Herstellung	Kodierte AS
pEF5/FRT/V5- DEST_OCRL ^{WT+18a}	Rekombination aus pENTR/D- TOPO_OCRL ^{WT+18a}	1-900
pEF5/FRT/V5-DEST_ OCRL ^{R493A/R500T+18a}	Rekombination aus pENTR/D- TOPO_OCRL ^{R493A/R500T+18a}	1-900
pMT2SM-HA-Dest_ OCRL ^{R493A/R500T+18a}	Rekombination aus pENTR3C_ OCRL ^{R493A/R500T+18a}	2-901
pMT2SM-HA-Dest_ OCRL ^{R493A/R500T-18a}	Rekombination aus pENTR3C_ OCRL ^{R493A/R500T-18a}	2-893

Mittels QuikChange®-Technologie hergestellte Gateway™-Zielkonstrukte für die eukaryotische Expression

Tab. 4-6: Übersicht über die mithilfe der QuikChange®-Technologie hergestellten Konstrukte. Angegeben sind der Name der Konstrukte, die in der PCR-verwendeten Oligonukleotide und Templates sowie der Umfang der vom Insert kodierten Proteinsequenz.

Name des Konstrukts	Oligonukleotide	Template	Kodierte AS
pMT2SM-HA-Dest_ OCRL ^{WT+18a} _rescue	siRNA Rescue OCRL 6a siRNA Rescue OCRL 6b	pMT2SM-HA-Dest_ OCRL ^{WT+18a}	2-901
pMT2SM-HA-Dest_ OCRL ^{WT-18a} _rescue	siRNA Rescue OCRL 6a siRNA Rescue OCRL 6b	pMT2SM-HA-Dest_ OCRL ^{WT-18a}	2-893
pMT2SM-HA-Dest_ OCRL ^{R493A/R500T+18a} _rescue	siRNA Rescue OCRL 6a siRNA Rescue OCRL 6b	pMT2SM-HA-Dest_ OCRL ^{R493A/R500T+18a}	2-901
pMT2SM-HA-Dest_ OCRL ^{R493A/R500T-18a} _rescue	siRNA Rescue OCRL 6a siRNA Rescue OCRL 6b	pMT2SM-HA-Dest_ OCRL ^{R493A/R500T-18a}	2-893

4.1.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide für Klonierungen und Sequenzierungen wurden manuell designt und von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Vor der Verwendung wurde eine Stocklösung der entsalzten, lyophilisierten Oligonukleotide mit einer Konzentration von 100 pmol/μl in 1x TE hergestellt. Als Gebrauchslösung der verwendeten Oligonukleotide wurde eine 1:10-Verdünnung der Stocklösung mit Aqua bidest. eingesetzt.

Die verwendeten siRNAs wurden von unterschiedlichen Firmen bezogen. Die entsalzten, lyophilisierten Duplex-siRNAs wurden nach Herstellerangaben gelöst und eine Stocklösung mit einer Konzentration von 20 pmol/μl in 1x siRNA-Puffer hergestellt.

4.1.3.1 Zur Sequenzierung verwendete Oligonukleotide

Tab. 4-7: Verwendete Oligonukleotide für die Sequenzanalyse. Angegeben ist jeweils die Bezeichnung und Sequenz.

Bezeichnung	Oligonukleotid-Sequenz (5'-3')
M13 uni	GTGGGGCGACGGCCAGT
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC
OCRL-cDNA-fw2	GCAAAGCGAGAGAAAGAATATGTC
OCRL-cDNA-rev	CATGTGACTCCGATAATTAAGCTG
OCRL-cDNA-rev2	TCCAATGCAGTAGATATCAGGAGG
OCRL-Ex18a-fw	TGGCACATCCTTAGAGGCTCTGTG
OCRL-Ex18a-fw2	AGATTACTTCTTGACTATCAGTGG
OCRL-Ex18a-rev	CTACTAGAAGCCAGATCTCCTTGG
OCRL-Ex18a-rev2	TCTCACTGGCACCTTCATCCAAAG
OCRL-Ex21a-rev	GATCCGGGGATCATAAGCAGAGTC
OCRL-F1	ACTGTCGAGGGTATGGAGATGAAG
OCRL-F3	CACCATGCGGAAGCTCTTTGTACC
OCRL-F4	AGAAAGTTCAACTGGTGCGCC
OCRL-F5	AGTTGAACATCATGAAACATGAGG
OCRL-F6	GTATGACTCTAAACAGACCGGTG
OCRL-F7	GTGTACGCATCATGGACAGAATGG
OCRL-F8	ATCCTGAACTCGGGAGAAGATAAG
OCRL-F9	ACCTATTCAAATACGCCTGTCACC
OCRL-F10	ATAGCGTCAATGCCAACATGATCG
OCRL-3F	GCAATGTTCAAGATATCATTC
OCRL-5F	GTTCTCTCAGCTGTCTTGC
OCRL-6F	CCAGAAATTAGACACTAAGG
OCRL-7F	CCTACTGGGATTCATCGGGAA
OCRL-10F	GGCTGTAGAGAGAGGTTTGC
OCRL-15F	CCAGCGACCACAAGCCTGTTAGC
OCRL-17F	GACCTTTTGAGGGCTACTTGG
OCRL-21F	GTCATCTGTTACGAGCTGTATCAG
OCRL-nested-fw1	TGGAACCTTGGAATGTGAATGGCCAG
OCRL-nested-rev1	GGTTCTAACCCGCTATCTGGAGACTG
OCRL-R1	ATGCTGTTCTTCTCATGCAACTG
OCRL-R2	CTTCGTTTCATCCACAACCTTCACC
OCRL-R3	TTCTGGTACCAGCTAGATGAGTCC
OCRL-R4	TTCCCGATGAATCCCAGTAGGCTG
OCRL-4R	TGTTAGAAGCTATGTCAATC
OCRL-8R	GACCCTCCCGCTGCCAGATT
OCRL-11R	GCAAATATAAGAAGCATCATC
OCRL-12R	GGTGTGTGAAATACAAATCTC
OCRL-13R	GTCTATAATTCAAATCTCCCAAC
OCRL-17R	CTTCTCCTTTTGAGTTGCCGAAAC
OCRL-18R	CATACACATCAAGAGAAATGTC
OCRL-22R	CTATGGCATCTCGGAAGCTGG
pEGFP_N1_F	CTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCC
pEGFP_N1_R	CGTCCAGCTCGACCAGGATG

4.1.3.2 Zu Klonierungszwecken verwendete Oligonukleotide

Tab. 4-8: Zu Klonierungszwecken verwendete Oligonukleotide. Angegeben ist jeweils die Bezeichnung und Sequenz.

Bezeichnung	Oligonukleotid-Sequenz (5'-3')
OCRL+ATG+CACC_F	CACCATGGAGCCCGCTCCCGGTCGGAG
OCRL-Ohne Stopp_R	GTCTTCTTCGCTCCCAAGCAGAAAG
OCRL-Phos_F	ACATGCATGCCTGATGCCAATGAGG
OCRL-Phos_R	AAAAGTACTGGCTGTCATTAAGTTTAGG
OCRL-R493A/R500T_F	GGAAATGCGCGGTTCAGCCTGGTGTGACACAATTC
OCRL-R493A/R500T_R	GAATTGTGTCACACCAGGCTGGAACCGCGCATTTCC
siRNA Rescue OCRL 6a	AGACTTTCCGGTACCTTCGTTCGTCTACGACTTTTACA CCAATATGGAAGAGGGCGCTA
siRNA Rescue OCRL 6b	TAGCGCCCTCTTCCATATTGGTGTAAAAGTCGTAGAC GAACGAAGGTACCGGAAAGTCT

4.1.3.3 Verwendete siRNA

Tab. 4-9: Sequenz und Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten siRNA. Angegeben ist die Bezeichnung, Sequenz und Herkunft der jeweiligen siRNA. P = Phosphatrest.

Bezeichnung	siRNA-Sequenz	Herkunft
<i>GFP</i> -siRNA	5'-PGCAAGCUGACCCUGAAGUUC AU GCCGUUCGACUGGGACUUCAAG-P-5'	Thermo Scientific Dharmacon (Schwerte)
<i>Lamin A</i> -siRNA	AACUGGACUCCAGAAGAACA	Eurofins MWG Operon (Ebersberg)
<i>OCRL</i> -siRNA	5'-GGGUGAAGGUUGUGGAUGAUU-3'	Thermo Scientific Dharmacon (Schwerte)

4.1.4 Antikörper

4.1.4.1 Primärantikörper

Tab. 4-10: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper. Angegeben ist jeweils der Name des Primärantikörpers, das erkannte Antigen, der Wirtsorganismus für die Herstellung des Antikörpers und dessen Hersteller bzw. Vertriebsfirma. Außerdem ist die jeweilige Verdünnung des Antikörpers für die Anwendung im Western-Blot (WB) und/oder in der Immunfluoreszenzanalyse (IF) angegeben.

Antikörper	Antigen	Hergestellt in	Verdünnung	Hersteller
anti-Adaptin α	Murines Adaptin α	Maus	IF 1:500	BD Transduction (Heidelberg)
anti-Adaptin δ	Humanes Adaptin α	Maus	IF 1:100	BD Transduction (Heidelberg)
anti-Adaptin γ	Murines Adaptin α	Maus	IF 1:100	BD Transduction (Heidelberg)
anti-AKT	Murines AKT	Kaninchen	WB 1:500	Cell Signaling – NEB (Frankfurt a. Main)
anti-Phospho-AKT Ser473	Murines p(Ser473)-AKT	Kaninchen	WB 1:500	Cell Signaling – NEB (Frankfurt a. Main)
anti-Cathepsin D	Humanes Cathepsin D	Ziege	WB 1:200	Santa Cruz (Heidelberg)
anti-Cathepsin Z	Humanes Cathepsin Z	Ziege	IP 12 μ l pro Ansatz	Santa Cruz (Heidelberg)
anti-EEA1	Humanes EEA1	Maus	IF 1:500 WB 1:2.500	BD Transduction (Heidelberg)
anti-GDI	Bovines GDI	Kaninchen	WB 1:1.000	S. R. Pfeffer (Stanford Universität, Kalifornien, USA)
anti-GM130	GM130 aus der Ratte	Maus	IF 1:200	BD Transduction (Heidelberg)
anti-HA	Hämagglutinin des humanen Influenza-Virus	Maus	IF 1:1.000	Covance (München)
anti-LAMP1	Humanes Lamp1	Maus	IF 1:150 WB 1:500	DSHB (Iowa, USA)
anti-LAMP2	Humanes Lamp2	Maus	IF 1:150 WB 1:500	DSHB (Iowa, USA)
anti-MPR300_1	Humanes MPR300	Kaninchen	IP 1 μ l pro Ansatz	S. R. Pfeffer (Stanford Universität, Kalifornien, USA)
anti-MPR300_2	Humanes MPR300	Kaninchen	IF 1:200 WB 1:2.000	S. Höning (Universität zu Köln, Köln)
anti-MPR46	Bovines MPR46	Maus	IF 1:150	DSHB (Iowa, USA)
anti-OCRL	Humanes OCRL	Maus	WB 1:1.000	S. Suchy (NIH, Bethesda, USA)
anti-Rab5	Humanes Rab5	Maus	IF 1:500 WB 1:1.000	BD Transduction (Heidelberg)
anti-Rab7	Humanes Rab7	Maus	WB 1:750	Abcam (Cambridge, UK)
anti-SNX1	Humanes SNX1	Maus	IF 1:100 WB 1:2.000	BD Transduction (Heidelberg)
anti-TfR	Humanes TfR	Maus	IF 1:500 WB 1:2.000	ZYMED® (San Francisco, USA)
anti-TGN46	Humanes TGN46	Schaf	IF 1:100	AbD Serotec (Düsseldorf)
anti- α -Tubulin (Clone DM 1A)	Humanes α -Tubulin	Maus	WB 1:2.000	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

4.1.4.2 Sekundärantikörper

Tab. 4-11: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper. Es ist die jeweilige Antikörperbezeichnung, das Antigen, das Antikörperkonjugat, der Wirtsorganismus sowie der Hersteller der Antikörper angegeben. Außerdem wurde eine Angabe zu der in dieser Arbeit eingesetzten Verdünnung für Western-Blot (WB) und Immunfluoreszenzanalysen (IF) gemacht.

Antikörper	Antigen	Konjugat	Hergestellt in	Verdünnung	Hersteller
AlexaFluor®-488 Esel anti-Schaf	Schaf Immuno- globuline	Alexa®-Fluor- 488	Esel	IF 1:1.000	Molecular Probes (Karlsruhe)
AlexaFluor-488® Ziege anti- Kaninchen	Kaninchen Immuno- globuline	Alexa®-Fluor- 488	Ziege	IF 1:1.000	Molecular Probes (Karlsruhe)
AlexaFluor®-488 Ziege anti-Maus	Maus Immuno- globuline	Alexa®-Fluor- 488	Ziege	IF 1:1.000	Molecular Probes (Karlsruhe)
AlexaFluor®-546 Ziege anti- Kaninchen	Kaninchen Immuno- globuline	Alexa®-Fluor- 546	Ziege	IF 1:1.000	Molecular Probes (Karlsruhe)
AlexaFluor®-546 Ziege anti-Maus	Maus Immuno- globuline	Alexa®-Fluor- 546	Ziege	IF 1:1.000	Molecular Probes (Karlsruhe)
anti-V5-HRP	P/V-Protein des Paramy- xovirus SV5	Meerrettich- Peroxidase	Maus	WB 1:5.000	Invitrogen (Karlsruhe)
ECL™ Esel anti- Kaninchen-HRP	Kaninchen Immuno- globulin G	Meerrettich- Peroxidase	Esel	WB 1:7.000- 30.000	GE Healthcare (Freiburg)
ECL™ Schaf anti- Maus-HRP	Maus Immuno- globulin G	Meerrettich- Peroxidase	Schaf	WB 1:7.000- 15.000	GE Healthcare (Freiburg)
Esel anti-Ziege IgG HRP	Ziege Immuno- globulin G	Meerrettich- Peroxidase	Kaninchen	WB 1:25.000	Santa Cruz (Heidelberg)

4.1.5 Chemikalien und Lösungsmittel

Acrylamid/Bisacrylamid (30%; 37,5:1)

Agar

Agarose

Ammoniumacetat (C₂H₇NO₂)

Ammoniumpersulfat (APS)

Ampicillin-Natriumsalz

Biorad (München)

Invitrogen (Karlsruhe)

Invitrogen (Karlsruhe)

Merck (Darmstadt)

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

β-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	Biorad (München)
Borsaure (H_3BO_3)	Merck (Darmstadt)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Complete Mini Protease Inhibitor Cockail Tabletten	Roche (Mannheim)
Cycloheximid	Merck (Darmstadt)
D-Glucose	Merck (Darmstadt)
4', 6-Diamidino-2-phenyl-indole/2HCl (DAPI)	Serva (Heidelberg)
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck (Darmstadt)
2,5-Diphenyloxazol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dithiothreitol (DTT)	Pierce/Perbio (Bonn)
D-Mannose 6-Phosphat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Epidermal Growth Factor (EGF), human	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Essigsäure (CH_3COOH)	Merck (Darmstadt)
Ethanol (CH_3CH_2OH)	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin	Thermo Scientific (Bonn)
EZview™ Red Streptavidin Affinity Gel	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ficoll 400	Amersham Bioscience (Freiburg)
Formamid (CH_3NO)	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Invitrogen (Karlsruhe)
HisPur Ni-NTA	Thermo Scientific (Bonn)
Isopropanol ($C_4H_{10}O$)	Merck (Darmstadt)
Kaliumacetat (KAc; KCH_3COO)	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck (Darmstadt)
Kalziumchlorid ($CaCl_2$)	Merck (Darmstadt)
Kanamycin-Sulfat	Fluka (Neu-Ulm)
L-Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Lipofectamine™ 2000-Reagenz	Invitrogen (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	Merck (Darmstadt)
Methanol (CH_3OH)	Merck (Darmstadt)
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (Darmstadt)
Natriumdesoxycholat	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
4-Nitrophenyl β-D-Galactopyranosid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
4-Nitrophenyl N-Acetyl β-D Glucosaminid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Natriumacetat ($C_2H_3NaO_2$)	Merck (Darmstadt)
Nonidet P40 / Igepal	ICN (Eschwege)
Normal Goat Serum	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Orange-G	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Phosphorsaure (H_3PO_4)	Merck (Darmstadt)
Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Polyvinylalkohol 488 (Mowiol488)	Fluka (Neu-Ulm)
Propylgallate	Fluka (Neu-Ulm)
Protein-A-Agarose	Roche (Mannheim)
Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow	Amersham Bioscience (Freiburg)
Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
5x siRNA-Puffer	Thermo Scientific Dharmacon (Schwerte)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Texas Red®-X Phalloidin	Invitrogen (Karlsruhe)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
TRIZMA® BASE (Tris)	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypton	Becton Dickinson (Heidelberg)
Restore™ Western-Blot Stripping Puffer	Thermo Scientific (Bonn)
Wasser für Chromatographie (HPLC)	Merck (Darmstadt)

4.1.6 Kits, Enzyme, Nukleotide und Standards

BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific (Bonn)
BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
Immobilon™ Western	Millipore (Schwalbach)
JetQuick PCR Product Purification Spin Kit	Genomed (Löhne)
NucleoBond® Xtra Maxi Kit	Macherey/Nagel (Düren)
pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
QuikChange® Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene (Waldbronn)
Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix	Invitrogen (Karlsruhe)
PfuULTRA™ HF DNA Polymerase	Stratagene (Waldbronn)
Quick Ligase	NEB (Frankfurt a. Main)
Restriktionsendonukleasen	Promega (Mannheim), NEB (Frankfurt a. Main), Fermentas (St. Leon-Rot)
RNase A	Invitrogen (Karlsruhe)
T4 DNA Ligase	NEB (Frankfurt a. Main)
Taq DNA Polymerase	Qiagen (Hilden)
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Invitrogen (Karlsruhe)
DNA-Standard Fast-Ruler™	Fermentas (St. Leon-Rot)
PageRuler™ Plus Prestained Protein	Fermentas (St. Leon-Rot)
100 Bp DNA-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)
1 Kb DNA-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)

4.1.7 Radioaktive Substanzen

Schwefel-35, 5mCi, Na_2SO_4 in 1 ml H_2O	Perkin Elmer (Rodgau)
--	-----------------------

Tran³⁵S Label™, 10 mCi/ml
L-[35S]Methionin, 10 mCi/ml

MP Biomedicals (Eschwege)
Hartmann Analytic (Braunschweig)

4.1.8 Medien und Zusätze

4.1.8.1 Medien und Zusätze für molekularbiologische Arbeiten

LB-Medium:	10 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 10 g NaCl ad 1000 ml Aqua dest. pH 7,0
Agar für Festmedien:	15 g/l Agar in LB-Medium
Ampicillin:	1 ml/l LB-Medium von Stocklösung 250 mg/ml (in Aqua dest.)
Kanamycin:	1 ml/l LB-Medium von Stocklösung 25 mg/ml (in Aqua dest.)
SOC-Medium:	20 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 0,5 g NaCl ad 970 ml Aqua dest. 10 ml steriles 1M MgSO ₄ 10 ml steriles 1M MgCl ₂ 10 ml sterile 40 % Glucose

4.1.8.2 Medien und Zusätze für zellbiologische Arbeiten

Medien und Zusätze für die Zellkultivierung

Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (D-MEM) mit L-Glutamin	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
D-MEM ohne L-Cystein, L-Glutamin, L-Methionin	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
D-MEM ohne Phenol-Rot	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
Minimal essentielles Medium- (MEM-) α	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
Opti-MEM® I serumreduziertes Medium mit GlutaMAX™	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
Fötale Rinderserum (FBS)	PAA Laboratories GmbH (Karlsruhe)
Dialysiertes FBS	selbst hergestellt
Hygromycin (50 mg/ml)	Calbiochem (Darmstadt)
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
L-Glutamin, 200 mM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
L-Methionin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
MEM-Aminosäuren	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
MEM-nicht-essentielle Aminosäuren	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
MEM-Vitamin-Lösung	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
Natrium-Pyruvat, 100 mM	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin (100 U/ml; 100 mg/ml)	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
Phenol-Rot	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
TrypLE™ Express	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)

Für Experimente benötigte Spezialmedien

Einfriermedium	10 % DMSO in Vollmedium (siehe 4.3.1)
Entzugsmedium	0,1 % BSA 1 % Penicillin/Streptomycin in DMEM
Met-freies Entzugsmedium	1 % dialysiertes FBS 1 % Penicillin/Streptomycin in DMEM ohne Methionin
Sulfat-freies MEM- α	1,8 mM CaCl_2 5,36 mM KCl 0,39 mM MgCl_2 116,36 mM NaCl 1,01 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5,56 mM D-Glucose 1 mM Natrium-Pyruvat 0,28 mM L-Ascorbinsäure 26,19 mM NaHCO_3 Phenol-Rot zur Anfärbung pH 7,4 100 ml/l MEM-Aminosäuren 50 ml/l MEM-nicht-essentielle Aminosäuren 50 ml/l MEM-Vitamin-Lösung

4.1.9 Puffer und Lösungen**4.1.9.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten*****Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli (Mini-Präparation)***

Lösung I	50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA
Lösung II	0,2 N NaOH 1% SDS (w/v)
Lösung III	4 M KAc, pH 5,5 2 M Essigsäure
Isopropanol/KAc	2 M KAc 88% Isopropanol
1x TE-Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA pH 7,5
TE/RNase-Puffer	100 $\mu\text{l/ml}$ RNase A in 1xTE-Puffer

Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli (Maxi-Präparation)

RES (Zellsuspension)	50 mM Tris, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase
LYS (Zelllyse)	200 mM NaOH 1% SDS (w/v)
NEU (Neutralisation)	3 M KAc, pH 5,5
EQU (Säulenäquilibrierung)	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Isopropanol (v/v) 0,15% Triton-X-100 (v/v)
WASH (Waschpuffer)	1 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Isopropanol (v/v)
ELU (Elutionspuffer)	1,25 M NaCl 50 mM Tris, pH 8,5 15% Isopropanol (v/v)

Agarose-Gelelektrophorese

10x TBE	890 mM Borsäure 20 mM EDTA 890 mM Tris pH 8,0
10x Ladepuffer	25 ml Glycerin 25 ml 1x TBE 20 mg Orange G
Ethidiumbromid-Lösung	0,05% Ethidiumbromid (w/v)

PCR-Puffer

10x Cloned Pfu DNA Polymerase Reaction Buffer	100 mM KCl 20 mM MgSO ₄ 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 200 mM Tris-HCl, pH 8,8 1% Triton® X-100 (v/v) 1 mg/ml nukleasefreies BSA
---	--

4.1.9.2 Puffer und Lösungen für biochemische und zellbiologische Arbeiten***Zelllyse***

RIPA-Lysepuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl, pH 8 0,5% DOC (w/v) 1% NP-40 (v/v) 0,1% SDS (w/v)
-----------------	---

SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE)

4x Trenngelpuffer	2 g SDS 91 g Tris ad 500 ml Aqua dest. pH 8,8 mit H ₃ PO ₄
4x Sammelgelpuffer	2 g SDS 30,3 g Tris ad 500 ml Aqua dest. pH 6,8 mit H ₃ PO ₄
4x Laemmlipuffer (SDS-Ladepuffer)	0,01% Bromphenolblau (v/v) 33% Glycerol (v/v) 6,7% SDS (w/v) 0,3 M DTT 80 mM Tris-HCl, pH 6,8
10x SDS-Laufpuffer	288,4 g Glycin 40 g SDS 60,6 g Tris ad 2000 ml Aqua bidest. pH 8,3

Western-Blot + Immundetektion

Transferpuffer	150 mM Glycin 25 mM Tris 10 % Methanol (v/v) pH 8,3
10x PBST	4 g KCl 4,8 g KH ₂ PO ₄ 160 g NaCl 28,8 g Na ₂ HPO ₄ 20 ml Tween 20 ad 2000 ml Aqua dest. pH 7,2
10x TBST	1,5 M NaCl 200 mM Tris-HCl, pH 7,4 1% Tween 20 (v/v)
Antikörperlösung für Antikörper von: <i>Cell Signaling Technology; MPR300 (S. Höning), Invitrogen</i>	5% BSA in 1x TBST (w/v) (TBST/BSA)
<i>Abcam, anti-OCRL (R. L. Nussbaum), BD Transduction Laboratories, DSHB</i>	0,5% Milchpulver in 1x TBST (w/v) (TBST/M)
<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	5% Milchpulver in 1x PBST (w/v) (PBST/M)

Zellkultur

10x PBS ^{-/-}	2 g KCl 2,4 g KH ₂ PO ₄ 80 g NaCl
------------------------	---

14,4 g Na_2HPO_4
ad 1000 ml Aqua dest.

Sekretion lysosomaler Enzyme

5x Reaktionspuffer	500mM NaAc , pH 4,4 0.5% Triton X-100
Lysepuffer	10mM NaH_2PO_4 , pH 6,0 150mM NaCl 0.5% Triton X-100
Stopppuffer	500mM Glycin 500mM Na_2CO_3 , pH 10,0

Zelloberflächenbiotinylierung

HBSS	1,3 mM CaCl_2 5,6 mM Glucose 5,4 mM KCl 0,4 mM KH_2PO_4 0,5 mM MgCl_2 0,6 mM MgSO_4 137 mM NaCl 4,2 mM NaHCO_3 0,3 mM Na_2HPO_4 pH 7,4
Wasch-HBSS	5 mM Tris-HCl, pH 7,4 in HBSS
Glutathion-Puffer	1 mM EDTA 50 mM Glutathion 75 mM NaCl frisch dazu: 10% FBS (v/v) frisch dazu: 75 mM NaOH

Immunfluoreszenzanalysen

1x $\text{PBS}^{+/+}$	0,9 mM CaCl_2 0,52 mM MgCl_2 0,16 mM MgSO_4 in 1x $\text{PBS}^{-/-}$
Hochsalzpuffer	500 mM NaCl in 1x $\text{PBS}^{+/+}$
Fixierlösung	4% Paraformaldehyd (w/v) in 1x $\text{PBS}^{+/+}$
Blockierlösung	2% BSA (w/v) 3% Ziegen-Serum (v/v) 0,5% Igepal (v/v) in 1x $\text{PBS}^{+/+}$
Antikörperlösung	3% Ziegen-Serum (v/v) 0,1% Igepal (v/v) in 1x $\text{PBS}^{+/+}$

Mowiol-Einbettmedium	25% Propylgallatlösung (v/v) (2,5 g in 50 ml 1x PBS ^{+/+} und 50 ml 100% Glycerol) 75% Mowiol488-Lösung (v/v) (20 g in 80 ml 1x PBS ^{+/+})
----------------------	---

Experiment zur MPR300-Halbwertszeit

TD-Puffer	137 mM NaCl 25 mM Tris-HCl, pH 7,4 0.7 mM Na ₂ HPO ₄ 5 mM KCl
-----------	--

Cathepsin Z-Reifungsexperiment

1x Neufeld-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,5 0,6 M NaCl 0,1 % SDS 0,05 % Nonidet P-40
1x IMM-Lysepuffer	0,5 % Natriumdesoxycholat 1 % Triton X-100 in PBS ^{-/-}
1x IMM-Lysepuffer/KCl	2 M KCl in IMM-Lysepuffer
PPO-Lösung	10 % 2,5-Diphenyloxazol (w/v) in DMSO

4.1.10 Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien

12-Loch-Zellkulturplatten	Sarstedt (Nürnberg)
35 mm Polystyrol-Zellkulturschalen	Sarstedt (Nürnberg)
60 mm Polystyrol-Zellkulturschalen	Sarstedt (Nürnberg)
100 mm Polystyrol-Zellkulturschalen	Sarstedt (Nürnberg)
ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems (Darmstadt)
Agarplatten	Greiner (Kremsmünster, Österreich)
Autoklav	Tecnomara (Fernwald)
Brutschrank	Heraeus (Hannover)
CO ₂ Water-Jacketed Inkubator	Nuaire™ US AUTOFLOW (USA)
Digitalkamera	OLYMPUS (Hamburg)
Drucker "Digital Graphic Printer"	SONY (Japan)
Filmentwickler OPTIMAX X-Ray Film Processor	Protec® (Oberstenfeld-Gronau)
GelAir Drying System	BioRad (München)
GD 2000 Vacuum Gel Dryer System	Amersham Bioscience (Freiburg)
Gelkammer "Sub-Cell GT"	BioRad (München)
Glasdeckgläschen	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Heizblock (Typ: 52526101)	Liebisch (Bielefeld)
Inkubator Shaker Model G25	New Brunswick Scientific. Co INC (Edison, New Jersey, USA)
Kryoröhrchen	Nunc (Langenselbold)
Kunststoff-Tubes (Falcon)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf AG (Hamburg)

Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf AG (Hamburg)
Laserscanmikroskop DMIRE2	Leica (Mannheim)
Magnetrührer RET basic	IKA Labortechnik (Staufen i. Br.)
Objektträger	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
PCR-Maschine "MJ Research PTC 200"	MJ Research, Inc. (Watertown, USA)
PCR-Tubes (0,5 ml)	Biozym Diagnostik GmbH (Oldenburg)
<i>PhosphorImager</i> "Typhoon FLA 7000"	GE Healthcare (Freiburg)
Photometer "Biometer"	Eppendorf AG (Hamburg)
PIPETBOY acu	IBS Integra Biosciences (Fernwald)
Pipetten "Finnpipetten"	Thermo Labsystems (Mannheim)
PVDF (Polyvinylidendifluorid) Western Blotting Membranen	Roche (Mannheim)
Röntgenfilme (Cronex 5)	AGFA (Berlin)
Schüttelapparat 3006	GFL (Burgwedel)
Schüttelapparat "Centromat R"	B. Braun Biotech International (Melsungen)
Semi-Dry-Blot-Apparatur	Biometra (Göttingen)
Spannungsgeber "Electrophoresis power supply ST305"	Life Technologies (Karlsruhe)
Spannungsgeber "Electrophoresis power supply PS3002"	Life Technologies (Karlsruhe)
Spannungsgeber "Power Pac 300"	BioRad (München)
Spannungsgeber "Standard Power Pack P25"	Biometra (Göttingen)
Sterilwerkbank "HERA safe Typ 12/2, 1995"	Heraeus (Hannover)
Sterilwerkbank "Lamin Air Instruments"	Heraeus (Hannover)
Szintillationszähler "TRICARB 2900"	Perkin Elmer (Rodgau)
Thermomixer "compact"	Eppendorf AG (Hamburg)
Tischzentrifuge "Biofuge Pico"	Heraeus (Hannover)
UV-Transilluminator "UVT-28M"	Herolab (Wiesloch)
Vortex-Gerat "Vortex Genie 2 Heidolph Reex 2000"	Scientific Industries, INC. (Bohemia, New York, USA)
Waage "Sartorius ISO 9001"	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad „GFL 1003“	GFL (Burgwedel)
Wasserbad „GFL 1083“	GFL (Burgwedel)
Whatman-3mm-Chromatographie-Papier	Whatman (Dassel)
Zentrifuge „Megafuge 1.0“	Heraeus (Hannover)

4.1.11 Verwendete Computerprogramme und Datenbanken

Tab. 4-12: Verwendete Computerprogramme. Angegeben sind die Datenbank, die Anwendung sowie, falls vorhanden, die Internetadresse.

Computerprogramme	Anwendung/Internetadresse
EditSeq (Dnastar)	Editieren von DNA-Sequenzen
MapDraw (Dnastar)	Ermittlung von Restriktionsschnittstellen in DNA-Sequenzen
SeqMan	Auswertung von DNA-Sequenzen
DIGI CAM Digital Camera Control	Dokumentation von Agarosegelen
Image J	Densitometrische Auswertung von Western Blots, http://rsbweb.nih.gov/ij/
MetaMorph®-Software	Quantitative Auswertung von Immunfluoreszenzanalysen, http://www.moleculardevices.com/Products/Software/Meta-Imaging-Series/MetaMorph.html

Tab. 4-13: Verwendete Datenbanken. Angegeben sind die Datenbank, die Anwendung sowie die Internetadresse.

Datenbanken	Anwendung/Internetadresse
NCBI (Human Genome Resources)	Zugang zu cDNA-Sequenzen, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/
Blast	Homologievergleiche von DNA-Sequenzen, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
PubMed	Literaturrecherche, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und PCR-vermittelte Mutagenese

Der Einsatz hitzestabiler DNA-Polymerasen in der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ermöglicht die spezifische *in vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten. Diese Methode basiert auf dem Prinzip der zyklischen Vervielfältigung eines DNA-Abschnitts, der von zwei Oligonukleotiden (Primern) flankiert wird. In dieser Arbeit diente die PCR der Amplifikation von DNA-Fragmenten sowie der Erzeugung von Punktmutationen in DNA-Konstrukten. Dafür wurden je nach Herstellerangaben, meist jedoch 2-10 ng Template-DNA, je 10 pmol eines 5'- und 3'-Primers sowie 0,2 µl (1 U) Polymerase eingesetzt und diese in einem Reaktionsvolumen von 25 µl mit 10x PCR Puffer, Desoxy-Ribonukleosid-Triphosphaten (dNTPs; 2,5 mM je dNTP) und Aqua bidest. versetzt.

Im Anschluss an die Denaturierung des PCR-Ansatzes (3 min, 95°C) wurden 30 Zyklen durchlaufen, die sich aus Denaturierung (30 sec, 95°C), Primer-Anlagerung (*annealing*, 30 sec, 48-68°C) und Polymerisation (Elongation, 1-4 min, 72°C) zusammensetzten. Anhand der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide kann die Temperatur für eine effiziente Primer-Anlagerung bestimmt werden. Die Dauer der Elongation richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Templates, wobei pro Minute etwa 500-1000 Basenpaare (Bp) von den DNA-Polymerasen polymerisiert werden können.

Für Klonierungen wurden spezielle DNA-Polymerasen verwendet, die eine Korrektoreigenschaft (*proofreading*) aufgrund einer 3'→5'-Exonuklease-Aktivität aufwiesen. Um ein gezieltes Einführen von Punktmutationen in DNA-Sequenzen zu ermöglichen, wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Zum einen wurde sich der PCR-vermittelten Mutagenese bedient (Ito et al., 1991). Zum anderen wurde die QuikChange® Site-directed Mutagenesis-Technologie von Stratagene angewandt.

In der PCR-vermittelten Mutagenese ermöglichte der Einsatz von spezifischen Oligonukleotiden, die die gewünschten Basenaustausche aufwiesen, die Generierung von zwei überlappenden, etwa 35 Bp langen DNA-Fragmenten in zwei getrennten PCR-Reaktionen. Nach Aufreinigung der amplifizierten PCR-Produkte, die nun die gewünschte Mutation enthielten, wurden diese in einer darauf folgenden PCR-Reaktion als Template eingesetzt (*Megaprime*-PCR). Für diesen Reaktionsansatz wurden jeweils 1 µl einer 1:10-Verdünnung der beiden PCR-Produkte sowie Puffer, dNTPs und Polymerase gegeben und ein Drei-Zyklen-Programm gestartet (Programm 1). Nach anschließender Zugabe der 5'- und 3'-Primer wurden weitere 19 Zyklen durchlaufen, wodurch die Amplifikation des Gesamtfragments ermöglicht wurde (Programm 2). Das Produkt enthielt nun die gewünschte Punktmutation und konnte je nach Art der Klonierung per Restriktionsspaltung und Ligation oder mit Hilfe der TOPO®-Klonierungs-Technologie in den Gateway™-Zielvektor eingebaut werden. Zur Überprüfung der Integrität der PCR-Produkte wurde die Plasmid-DNA einer DNA-Sequenzierung unterzogen.

Megaprime PCR-Ansatz

1 µl PCR-Produkt 1 → 1:10-Verdünnung
 1 µl PCR-Produkt 2 → 1:10-Verdünnung
 0,5 µl dNTPs (10 pmol/µl)
 2,5 µl 10x PCR-Puffer
 0,2 µl Polymerase
 ad 25 µl Aqua bidest.

Zugabe der Primer zum Megaprime-Ansatz

+1 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
 +1 µl Primer 2 (10 pmol/µl)

Programm 1:

1. 95°C / 3 min
 2. 95°C / 15 sec
 3. 40°C / 20 sec
 4. 72°C / 3-5 min
 5. *go to 2 / 2 times*
 6. end

Programm 2:

1. 95°C / 3 min
 2. 95°C / 15 sec
 3. 55°C / 10 sec
 4. 72°C / 4 min
 5. *go to 2 / 19 times*
 6. 72°C / 10 min
 7. end

Die QuikChange[®] *Site-directed Mutagenesis*-Technologie liefert dagegen eine schnelle und effiziente Methode Punktmutationen in ein gewünschtes DNA-Konstrukt (Insert) einzuführen, das zuvor bereits in einen Plasmid-Vektor kloniert wurde. Dafür werden zwei Oligonukleotide generiert, die jeweils komplementär zu gegenüberliegenden Sequenzen des Inserts sind und die gewünschten Basenaustausche enthalten. Die erstellten Oligonukleotide werden in einer PCR-Reaktion zusammen mit dem Plasmid-Vektor und einer Pfu Turbo[®]-Polymerase eingesetzt, wodurch die gewünschten Basenaustausche in den neu amplifizierten Plasmid-Vektor eingeführt werden. Um das Ausgangsplasmid zu eliminieren, wurde anschließend eine Restriktion mit dem Enzym DpnI durchgeführt. Diese Endonuklease erkennt spezifisch Methylierungsstellen der DNA und zerschneidet den zuvor in Bakterien vervielfältigten und damit methylierten Ausgangsvektor. Die QuikChange[®]-Mutagenese wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Um zu ermitteln, ob die Basenaustausche korrekt eingeführt wurden, wurde die Plasmid-DNA sequenziert.

4.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung fragmentierter DNA nach ihrer Größe sowie die Darstellung von PCR-Produkten. Der Agarosegehalt des Gels richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente und liegt zwischen 0,8-2,0 % (w/v), wobei das Laufverhalten des Fragments umgekehrt proportional zum Logarithmus seines Molekulargewichts ist, d. h. größere Fragmente wandern langsamer durch die Poren des Agarosegels als kleinere. Die Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat der DNA bewirken eine negative Gesamtladung, weshalb die DNA in einem angelegten elektrischen Feld von der Kathode zur Anode wandert.

Für die Herstellung eines Agarosegels wurde die benötigte Agarosemenge in 1x TBE-Puffer aufgekocht. Die Agaroselösung wurde anschließend auf etwa 50°C abgekühlt, in einen mit Probekämmen versehenen Gelschlitten gegossen und nach dem Auspolymerisieren in eine mit 1x TBE-Puffer befüllte Gelelektrophoresekammer gegeben. Die zu analysierenden Proben wurden mit Ladepuffer versetzt ($\frac{1}{4}$ Volumen Ladepuffer (Orange G), $\frac{3}{4}$ Volumen Probe) und in die Gel-taschen gegeben. Die Gelelektrophorese erfolgte bei ca. 140 V für 60 min. Zuletzt wurde das Gel in einer 0,05 %-igen Ethidiumbromid-Lösung für mindestens 15 min angefärbt. Aufgrund seiner planaren Struktur ist dieser Farbstoff in der Lage reversibel zwischen die Basen der DNA zu interkalieren, was anschließend durch Anregung mit UV-Licht (312 nm) auf einem Transilluminator-Tisch sichtbar gemacht werden kann. Die Dokumentation erfolgte mit dem *DIGI CAM Digital Camera Control*-Programm.

4.2.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Verwendung des *Jetquick PCR Product Purification Spin Kits* nach Herstellerangaben ermöglichte eine Aufreinigung der PCR-Produkte. Dadurch war es möglich, für weitere Arbeitsschritte störende Oligonukleotide, kleinere DNA-Fragmente und Enzymreste zu entfernen.

4.2.4 Restriktionsanalyse von DNA

Für eine herkömmliche Klonierung über Restriktion und Ligation wurden die PCR-Produkte zunächst einer Restriktionsanalyse unterzogen. Spezifische, meist palindromische 4- bis 8-stellige Nukleotidsequenzen werden von Restriktionsendonukleasen des Typs II erkannt, die dann in der unmittelbaren Umgebung die Phosphodiester-Bindungen der vorliegenden DNA hydrolysieren. Dabei entstehen enzymabhängig doppelsträngige, glatte (*blunt ends*) oder 3'- bzw. 5'-überhängende Enden (*sticky ends*). Die Restriktionsanalyse wurde nach Angaben der jeweiligen Enzymhersteller Promega, NEB oder Fermentas durchgeführt. Dazu wurden pro Ansatz ca. 0,1-2 µg DNA und 0,5-1 U Enzym in einem Reaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt. Die Restriktionsspaltung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (siehe 4.2.2).

4.2.5 DNA-Ligation

Nach Erzeugung von sowohl glatten als auch 3'- bzw. 5'-überhängenden Restriktionsenden wurden die PCR-Produkte durch Verwendung der T4-DNA-Ligase bzw. der Quick Ligase der Firma NEB in einen mithilfe von Restriktionsenzymen linearisierten und aufgereinigten Vektor ligiert. Ligasen ermöglichen eine kovalente Verbindung von DNA-Fragmenten, indem sie Phosphodiesterbindungen zwischen den 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen freier DNA-Enden ausbilden. Für die Ligation wurde das PCR-Produkt in einem molaren Überschuss zu der Vektor-DNA gegeben und nach Angaben der Hersteller mit Ligase (1 U) und dem dazugehörigen Puffer inkubiert.

4.2.6 Klonierung mittels TOPO[®]-Klonierungs-Technologie

Die TOPO[®]-Klonierungs-Technologie ist eine schnelle und effiziente Klonierungsstrategie zur Restriktionsenzym-unabhängigen Insertion eines PCR-Produkts in einen Plasmidvektor. Bei der TOPO[®]-Klonierung wird die Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus verwendet, die sowohl DNA spalten als auch ligieren kann. Zunächst kommt es zu einer spezifischen Bindung des Enzyms an die doppelsträngige Vektor-DNA. Durch Spaltung des Phosphodiester-Rückgrats eines Strangs durch die Topoisomerase I wird ein einzelsträngiger 3'-Überhang erzeugt (Shuman, 1991), der daraufhin in das doppelsträngige PCR-Produkt eindringt, einen Teil des unteren Strangs ersetzt und an das PCR-Produkt ligiert wird. Diese Reaktion ermöglicht z. B. die Generierung eines sogenannten Eingangsvektors (*entry vector*), der als Ausgangsvektor zur Klonierung eines bestimmten DNA-Fragments in verschiedene Zielvektoren (*destination vector*) des Gateway[™]-Systems verwendet werden kann. Die TOPO[®]-Klonierungs-Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers Invitrogen durchgeführt.

4.2.7 Klonierung mittels Gateway[™]-Technologie

Durch lokusspezifische Rekombinationsreaktionen bietet die Gateway[™]-Technologie eine universell einsetzbare Alternative zur herkömmlichen Klonierungsstrategie über Restriktion und Ligation. Die Eigenschaft des Bakteriophagen Lambda während des lysogenen Zyklus in das

Genom eines Bakteriums integrieren zu können, liefert die Grundlage dieser Technologie. Um eine Integration des zu klonierenden Inserts in den GatewayTM-Zielvektor zu ermöglichen, wird dieses von zwei spezifischen kurzen DNA-Sequenzen, den sogenannten Att-Stellen (*attachment sites*), flankiert. Mittels herkömmlicher Klonierung (Restriktion und Ligation) oder mittels TOPO[®]-Technologie ist das Einfügen des Inserts zwischen die Att-Stellen möglich. Der so erzeugte Eingangsklon wird zusammen mit einem Zielvektor mit äquivalenten Att-Stellen in einer Enzym-vermittelten LR-Reaktion eingesetzt. In dieser Reaktion wird das Insert über Rekombination zwischen den Att-Stellen des Eingangsklons und des Zielvektors in den Zielvektor integriert. Zur Erstellung eines Gateway-kompatiblen Zielvektors ist lediglich der Einbau einer GatewayTM-Leserahmen-Kassette mit Att-Stellen in einen gewöhnlichen Plasmidvektor erforderlich. Die GatewayTM-Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers Invitrogen durchgeführt.

4.2.8 Hitzeschock-Transformation kompetenter *Escherichia coli*- (*E. coli*-) Zellen mit Plasmid-DNA

Tiefgefrorene, chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 100 µl der Bakteriensuspension wurde mit ca. 100 ng Plasmid-DNA versetzt und vermischt. Es erfolgte eine Inkubation von 30 min auf Eis. Die optimale Aufnahme der DNA wurde mit der Durchführung eines Hitzeschocks für 90 sec bei 42°C erzielt. Anschließend wurden die Bakterien für 5 min auf Eis abgekühlt und mit 700 µl SOC- (*super optimal broth*-) Medium versetzt. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei 37°C und starkem Schütteln wurden die Zellen bei 8.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Bakterien in der zurückbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde dann auf selektiven LB- (*lysogeny broth*-) Agarplatten ausgestrichen.

4.2.9 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung der transformierten *E. coli* für eine Minipräparation erfolgte durch Animpfen von 2 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie, für eine Maxipräparation durch Animpfen von 200 ml LB-Medium mit einer 2 ml LB-Vorkultur. Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen über Nacht bei 220 rpm und 37°C im Inkubationsschüttler inkubiert.

4.2.10 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung der in den *E. coli* vervielfältigten Plasmid-DNA wurde zunächst für analytische Zwecke eine Minipräparation auf Grundlage der alkalischen Lyse durchgeführt. Die Bakterien einer 2 ml LB-Übernachtskultur wurden zu diesem Zweck für 5 min bei 8.000 rpm pelletiert und in 100 µl der Lösung I resuspendiert. Die Initiation der basischen Zellyse erfolgte durch Zugabe von 200 µl Lösung II. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurde die Lyse durch Neutralisation mit 300 µl Lösung III abgestoppt. Die Suspension wurde vollständig durchmischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Pelletierung der Zelltrümmer durch Zentrifugation für 5 min bei 14.000 rpm und RT wurde der Überstand in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt

und die darin enthaltene Plasmid-DNA mit 350 µl Isopropanol gefällt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA bei 14.000 rpm für 5 min bei RT abzentrifugiert und zur Degradation eventuell mitgefällter RNA in 100 µl RNase A-haltigem TE-Puffer für 20 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 125 µl Isopropanol/KAc und 10minütiger Inkubation bei RT wurde die gewonnene Plasmid-DNA-Lösung gereinigt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA bei 14.000 rpm für 5 min bei RT pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet getrocknet und in 50 µl Aqua bidest. resuspendiert. Zur Langzeitlagerung wurde die Plasmid-DNA bei -20°C eingefroren.

4.2.11 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Um eine effektive Transfektion von eukaryotischen Zellen mit der hergestellten Plasmid-DNA zu gewährleisten, war eine hohe Menge und ein hoher Reinheitsgrad erforderlich, der mit der hier angewendeten Minipräparation nicht erzielt werden konnte. Daher wurde für Transfektionsversuche eine Plasmid-DNA eingesetzt, die durch Anionenaustausch-Chromatographie mit dem NucleoBond® Xtra Maxi Kit der Firma Macherey/Nagel gewonnen wurde. Die gefällte DNA wurde in 200-1000 µl Aqua bidest. gelöst und zur Langzeitlagerung bei -20°C eingefroren.

4.2.12 Photometrische Quantifizierung der Plasmid-DNA

Die Konzentration der gewonnenen Plasmid-DNA wurde photometrisch im Spektralphotometer *BioPhotometer* durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm ermittelt, wobei eine optische Dichte von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Zur Bestimmung der Reinheit der Plasmid-DNA wurden zudem die enthaltenen Proteine detektiert, die ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen. Der Quotient A der Absorption beider Wellenlängen ($A_{260/280}$) gilt somit als Maß für die Reinheit der Plasmid-DNA und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

4.2.13 DNA-Sequenzierung

Um die zuvor isolierte Plasmid-DNA auf korrekte PCR-Amplifikation und Integration des enthaltenen Inserts zu überprüfen, wurde die Plasmid-DNA sequenziert. Die DNA-Sequenzierungen wurden mit dem ABI Prism Dye Terminator Kit und dem ABI 16-Kapillar-Sequenzierer (ABI Prism® 3500 Genetic Analyzer) der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Dabei wurde das Prinzip der Didesoxy-Methode nach Sanger angewandt (Sanger *et al.*, 1977); neben dNTPs werden in der zyklischen Sequenzierungsreaktion eines spezifischen PCR-Produkts auch Fluoreszenzmarkierte Di-Desoxy-Ribonukleosid-Triphosphate (ddNTPs) eingesetzt. Der Einbau eines solchen ddNTPs in den entstehenden DNA-Strang erzeugt den Abbruch der Sequenzierungsreaktion. Da die Integration der ddNTPs in die entstehenden DNA-Stränge zufällig erfolgt, sind diese von unterschiedlicher Länge und je nach Didesoxynukleotid mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert, der bei der anschließenden Kapillarelektrophorese mithilfe eines Lasers detektiert wird. Anhand der Größe und der Fluoreszenzmarkierung der PCR-Fragmente kann so das Sequenzchromatogramm einer Probe erstellt werden.

4.3 Biochemische und zellbiologische Methoden

4.3.1 Zellkultur eukaryotischer Zellen

Für die Kultivierung der verwendeten adhärenenten Zelllinien wurden Begasungsinkubatoren mit einer konstanten Temperatur von 37°C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ verwendet. Sterile Bedingungen wurden durch das Arbeiten unter einer Sterilwerkbank gewährleistet. Für die Kultivierung der Zelllinien wurden Zellkulturschalen mit einer Wachstumsfläche von 25 π cm² verwendet. Für den Einsatz in biochemischen und zellbiologischen Experimenten wurden die Zellen auf Zellkulturschalen mit Wachstumsflächen von 25 π cm², 9 π cm² oder 3 π cm² ausgesät. Für Immunfluoreszenzstudien fand die Kultivierung der Zelllinien auf Glasdeckgläschen in 12-Loch-Kulturplatten statt. Angegeben in Tab. 4-14 sind die für zellbiologische und biochemische Experimente verwendeten Zelllinien sowie die zur Kultivierung benötigten Medien und deren Zusätze. Diese werden im folgenden Vollmedium genannt.

Tab. 4-14: Verwendete Zelllinien und dazugehörige Zellkulturmedien. Angegeben sind die für zellbiologische und biochemische Experimente verwendete Zelllinien sowie die zur Kultivierung benötigten Medien und deren Zusätze. Diese werden im folgenden Vollmedium genannt.

Zelllinie	Medium	Zusätze
HeLa	DMEM	7,5 % FBS (v/v) 1 % P/S (v/v)
293HMY	α -MEM	7,5 % FBS (v/v) 1 % P/S (v/v) 250 μ g/ml Geneticin (v/v)
Flp-In TM -CV1	DMEM	10 % FBS (v/v) 1 % P/S (v/v) 100 μ g/ml Zeocin (v/v)
stabil- überexprimierende Flp-In-CV1	DMEM	10 % FBS (v/v) 1 % P/S (v/v) 200 μ g/ml Hygromycin (v/v)

4.3.1.1 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen von gefrorenen Zellsuspensionen wurden diese aus einer -150°C-Gefriertruhe entnommen und in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C soweit angetaut, bis nur noch wenige Eiskristalle sichtbar waren. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon mit bereits vorgelegten 8 ml Vollmedium überführt und bei 900 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 10 ml frischem Vollmedium resuspendiert und in eine Zellkulturschale mit einer Wachstumsfläche von 25 π cm² gegeben. Die weitere Kultivierung erfolgte in einem Begasungsinkubator.

4.3.1.2 Passagieren von Zellen

Je nach Bedarf, meist jedoch zweimal wöchentlich wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80-100 % auf neue Kulturschalen ausgesät. Da es sich um adhärenzte Zelllinien handelte, mussten diese zunächst von dem Kulturgefäß abgelöst werden. Dazu wurde das Vollmedium abgesaugt, die Zellen zur Entfernung von im Medium befindlichen Proteinen mit 3-5 ml 1x PBS gewaschen und durch Zugabe von 2 ml TrypLE™ Express von der Kulturschale gelöst. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop beobachtet und die Trypsinreaktion nach vollständiger Ablösung mit 8 ml Vollmedium abgestoppt. Nach Resuspension durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen dann je nach Wachstumsgeschwindigkeit in einem Verhältnis von 1:2-1:20 mit Vollmedium in einem Volumen von 10 ml verdünnt und auf ein neues Kulturgefäß überführt.

4.3.1.3 Einfrieren von Zellen

Für die Langzeitlagerung von Zelllinien wurden diese in einem Gefrierschrank bei -150°C weggefroren. Die Zellen mussten zunächst durch Trypsinieren mit TrypLE™ Express von der Zellkulturschale gelöst werden. Zum Abstoppen der Trypsinreaktion wurde 8 ml Vollmedium zu den Zellen gegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension in einem 15 ml Falcon bei 900 rpm und 5 min bei RT abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in eiskaltem Einfriermedium zur Vermeidung von Eiskristallen durch das enthaltene DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Pro Kryoröhrchen wurde 1 ml Einfriermedium benötigt, wobei zumeist 2-3 Kryoröhrchen mit der Suspension eines Zellpellets befüllt werden konnten. Zur Sicherstellung eines konstanten Runterkühlens der Zellsuspensionen wurden diese in einem mit Isopropanol befüllten Einfrierbehälter platziert, ü. N. bei -80°C gelagert und am darauf folgenden Tag bei -150°C weggefroren.

4.3.2 Methoden zur Transfektion eukaryotischer Zellen

4.3.2.1 Transiente Transfektion mit Plasmid-DNA

Für die transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit Plasmid-DNA wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 verwendet, das auf dem Prinzip der Lipofektion basiert. Es handelt sich um ein kationisches Lipid, das aufgrund der negativen Ladungseigenschaften der DNA durch ionische Wechselwirkungen mit dieser einen Komplex bilden kann. Der Lipid-DNA-Komplex kann dann durch Internalisierungsprozesse an der Plasmamembran diese überwinden und so die Plasmid-DNA in die Zelle transportieren. Das optimale Verhältnis von DNA zu Transfektionsreagenz wurde dabei auf ein Verhältnis von 1:2 festgelegt.

Vorbereitend für die Lipofektion wurden die Zellen mit einer Konfluenz von 60-80 % auf Glasdeckgläschen in 12-Lochplatten ausgesät. Am Folgetag wurden Transfektionslösung I (100 µl OptiMEM + 1-2 µg Plasmid-DNA) und Transfektionslösung II (100 µl OptiMEM + 2 µl Lipofectamine™ 2000) angesetzt, 5 min bei RT inkubiert, vermischt und für weitere 30 min bei RT inkubiert. Die Inkubationszeit konnte genutzt werden um die zu transfizierenden Zellen mit 1 ml 1x PBS zu waschen und mit 600-800 µl vorgewärmtem OptiMEM zu überschichten. Die

Zellen wurden dann tröpfchenweise mit dem Transfektionsansatz versetzt und nach vorsichtigem Schwenken der Kulturschalen bei 37°C und 5 % CO₂ für ca. 6 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium von der Kulturschale abgesaugt, die Zellen je nach Experiment mit 1 ml Vollmedium oder Entzugsmedium bedeckt und für weitere 16-20 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Bei der HeLa-Zelllinie wurde zudem eine reverse Transfektion durchgeführt, d. h. die Zellen wurden erst während der Inkubation der Transfektionslösungen ausgesät. Dabei wurden 100-250 µl der Zellsuspension in Vollmedium ohne P/S auf die Glasdeckgläschen gegeben und anschließend mit der Transfektionslösung versetzt. Es erfolgte eine Inkubation für 16-18 h bei 37°C und 5 % CO₂ in einem Begasungsininkubator ohne Mediumswechsel.

4.3.2.2 Transiente Transfektion mit siRNA zur Unterdrückung der Expression eines gewünschten Gens

Bei der RNA-Interferenz wird mithilfe der bereits beschriebenen Lipofektion (4.3.2.1) eine als siRNA bezeichnete, synthetisch hergestellte RNA in die zu transfizierenden Zellen eingebracht. Bei der siRNA handelt es sich um eine 19-23 Bp lange, doppelsträngige RNA, die an ihren Enden je zwei überstehende Nukleotide aufweist. In der Zelle wird die siRNA auf Argonautenproteine des RISC- (*RNA-induced silencing complex*-) Komplexes übertragen, wodurch dieser aktiviert wird. Der RNA-Doppelstrang wird entwunden und gespalten, wobei der Einzelstrang mit der geringeren thermodynamischen Stabilität am 5'-Ende zum Leitstrang wird und im RISC-Komplex verbleibt. Die zum Leitstrang komplementäre mRNA wird vom RISC-Komplex gebunden und durch die Endonukleaseaktivität der Argonautenproteine abgebaut. Die Methode der RNA Interferenz eignet sich daher zum gezielten Abschalten eines beliebigen Gens. Dabei muss lediglich die Nukleotidsequenz des Zielgens bekannt sein um eine spezifische siRNA gegen dieses Gen zu generieren.

Bei der siRNA-Transfektion wurde nach dem Prinzip der reversen Transfektion verfahren. Zunächst wurden Transfektionslösung I (1,75-2 ml OptiMEM + 700-900 pmol siRNA) und Transfektionslösung II (1,75-2 ml OptiMEM + 35-40 µl Lipofectamine™ 2000) angesetzt, 5 min bei RT inkubiert, vermischt und für weitere 30 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden je nach Versuch HeLa-Zellen mit einer Konfluenz von 20 % oder 293HMY-Zellen mit einer Konfluenz von 60 % in Vollmedium ohne P/S auf Zellkulturschalen mit einer Wachstumsfläche von 25 π cm² ausgesät. Der Transfektionsansatz wurde dann tröpfchenweise auf den Zellen verteilt und die Kulturschalen vorsichtig geschwenkt. In dieser Arbeit sollte die Expression des OCRL-Gens mit einer OCRL-spezifischen siRNA (Dharmacon) unterbunden werden. Hierfür wurde eine siRNA-Transfektion von 72 h bei 37°C und 5 % CO₂ durchgeführt. Als Kontrolle wurde eine gegen GFP (Dharmacon) oder *Lamin A* (MWG Biotech) gerichtete siRNA verwendet.

Sollte nach Abschalten der OCRL-Expression durch siRNA eine Rekonstruktion der OCRL-Expression durch siRNA-resistente OCRL-Konstrukte erfolgen, wurde eine reverse Transfektion mit entsprechender Plasmid-DNA, wie unter 4.3.2.1 beschrieben, durchgeführt.

4.3.2.3 Verwendung des Flp-In™ Systems zur stabilen Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Herstellung stabil transfizierter Zellen wurde mit dem Flp-In™ System der Firma Invitrogen erzielt. Die verwendeten Flp-In™-CV1-Zellen enthalten einen definierten Lokus im Genom, in dem eine cDNA-Sequenz eingebaut und anschließend das von der cDNA kodierte Protein stabil überexprimiert werden kann. Um dies zu ermöglichen, wird die cDNA-Sequenz über kurze, flankierende Erkennungssequenzen in einen Eingangsvektor kloniert und in die Zellen transfiziert. Zusätzlich erforderlich ist die Kotransfektion einer Flp-Rekombinase mithilfe eines Expressionsvektors. Die Flp-Rekombinase ermöglicht dann über die flankierenden Erkennungssequenzen der cDNA die Rekombination zwischen Eingangsvektor und definiertem Lokus im Genom der Zelle. Die Selektion auf transfizierte Klone wird über eine zusätzlich integrierte Hygromycinresistenz ermöglicht. Der proteinbiochemische Nachweis der stabilen Überexpression des gewünschten Proteins kann über ein C-terminales V5-Epitop erbracht werden.

Am Vortag der Transfektion wurden $1,2 \times 10^6$ Flp-In™-CV1-Zellen auf eine Zellkulturschale mit einer Wachstumsfläche von $25 \pi \text{ cm}^2$ ausgesät. Am nächsten Tag wurden Transfektionslösung I (400 μl OptiMEM + 1,2 μg des gewünschten DNA-Plasmids + 9 μg des Flp-Rekombinase-Vektors) und Transfektionslösung II (400 μl OptiMEM + 20 μl Lipofectamine™ 2000) angesetzt und eine Transfektion, wie unter 4.3.2.1 beschrieben, durchgeführt. Nach 6-stündiger Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsansatz wurde dieser abgesaugt und durch 10 ml Vollmedium (ohne Zeocin und Hygromycin) ersetzt. Die Zellen wurden dann für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ im Begasungsbrutschrank inkubiert und anschließend mit Selektionsmedium (Vollmedium + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hygromycin) versetzt. Zur besseren Selektion positiver Klone, wurden die Zellen am nächsten Tag trypsiniert und in 6-Loch-Kulturplatten umgesetzt. Nach mehrwöchiger Selektion mit ansteigender Hygromycinkonzentration (bis 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) im Selektionsmedium und erfolgter Koloniebildung stabil transfizierter Zellen wurden die erstellten Zelllinien mithilfe immunologischer Detektion der V5-Markierung auf die stabile Protein-Überexpression der jeweils integrierten cDNA getestet. Eine Flp-In™-CV1-Zelllinie mit einem stabil überexprimierten Chloramphenicol-Acetyltransferase-Protein diente in nachfolgenden Versuchen als Kontrolle.

4.3.3 Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen

Für die Herstellung von Zelllysaten aus adhärent wachsenden Zellen wurden diese, sofern nicht anders beschrieben, je nach Wachstumsfläche mit einer festgelegten Menge RIPA-Puffer + Protease-Inhibitoren versetzt und für 10-15 min bei 4°C inkubiert. Sollte die Phosphorylierung bestimmter Proteine untersucht werden, wurden zusätzlich Phosphatase-Inhibitoren zum RIPA-Puffer gegeben. Die mechanische Lyse erfolgte mit einem Zellschaber. Anschließend wurde das Lysat in ein Zentrifugationsröhrchen überführt, durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und durch Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C von Zelltrümmern befreit.

4.3.4 Proteinkonzentrationsmessung mit dem BCA-Test

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das BCATM-Protein Assay Kit der Firma Thermo Scientific verwendet. Dieser Test nutzt die Reduktion zweiwertiger Kupferionen zu einwertigen Kupferionen durch die Reaktion mit dem zu vermessenden Proteinlysate. Es kommt zur Chelatisierung der entstehenden Cu⁺-Ionen mit Bicinchoninsäure- (BCA-) Molekülen, was letztlich zur Bildung eines lilafarbenen Reaktionsprodukts führt. Dessen Absorption verhält sich bei 562 nm hinreichend linear zur Proteinkonzentration und kann photometrisch gemessen werden.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Berechnung der Proteinkonzentrationen der gemessenen Proteinlysate wurde eine Eichkurve des Standardproteins BSA (Bovines Serumalbumin) mit definierten Konzentrationen (100, 200, 400, 600, 800 und 1000 mg/ml) mitgeführt.

4.3.5 Bestimmung der Sekretion lysosomaler Enzyme

Dieses Experiment ermöglicht die Quantifizierung der M6P-Rezeptor-unabhängigen Sekretion saurer Hydrolasen ins extrazelluläre Medium. Um die Menge der sekretierten Enzyme zu ermitteln, wird ein Enzym-spezifisches Substrat gelöst in 5x Reaktionspuffer (= Substratpuffer) zum Zellüberstand gegeben (Tab. 4-15). In einer enzymatischen Reaktion kommt es zur Freisetzung von p-Nitrophenol, das schließlich photometrisch vermessen werden kann.

Tab. 4-15: Verwendete Substrate zur Aktivitätsbestimmung der lysosomalen Enzyme.

Lysosomales Enzym	Substrat
β -Hexosaminidase	5 mM p-Nitrophenyl-N-Acetyl- β -D-Glukosaminid
β -Galaktosidase	10 mM p-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid

Der Sekretionsversuch sollte in HeLa-Zellen nach Transfektion mit OCRL-spezifischer siRNA, wie unter 4.3.2.2 beschrieben, durchgeführt werden. Als Kontrolle wurde GFP-spezifische siRNA verwendet. Nach 48 h wurden die siRNA-transfizierten Zellen auf Zellkulturschalen mit einer Wachstumsfläche von 9 π cm² mit einer Konfluenz von 40 % ausgesät. Etwa 60 h nach siRNA-Transfektion wurde das Vollmedium entfernt und durch 1 ml Phenol-Rot-freies DMEM + 10 mM M6P (Sekretionsmedium) ersetzt. Das M6P sättigt die Zelloberflächen-ständigen M6P-Rezeptoren ab und verhindert so eine Reinternalisierung der zuvor sekretierten lysosomalen Enzyme. Nach Inkubation für 24 h bei 37°C wurde der Zellüberstand gesammelt, die Zellen 2x mit eiskaltem 1x PBS^{-/-} gewaschen und anschließend in 200 μ l eiskaltem Zellysepuffer + Protease-Inhibitoren lysiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 14.000 rpm und 4°C von Zelltrümmern befreit.

Zur Ermittlung der intrazellulären und sekretierten Menge an lysosomalem Enzym erfolgte in Doppelbestimmung eine Inkubation mit dem Substrat nach folgendem Schema (Tab. 4-16):

Tab. 4-16: Reaktionsansätze zur Bestimmung der intrazellulären und sekretierten Menge des jeweiligen lysosomalen Enzyms.

Lysosomales Enzym	Reaktionsansatz zur Bestimmung der intrazellulären Enzymmenge	Reaktionsansatz zur Bestimmung der sekretierten Enzymmenge
β -Hexosaminidase	50 μ l Zelllysats + 350 μ l Sekretionsmedium + 100 μ l Substratpuffer → 1 h, 37°C	400 μ l Zellüberstand + 100 μ l Substratpuffer → 1 h, 37°C
β -Galaktosidase	50 μ l Zelllysats + 350 μ l Sekretionsmedium + 100 μ l Substratpuffer → 4 h, 37°C	400 μ l Zellüberstand + 100 μ l Substratpuffer → 4 h, 37°C

Im Anschluss an die Inkubation bei 37°C wurde die enzymatische Reaktion mit 500 μ l Stopppuffer abgestoppt und das gebildete p-Nitrophenol bei 405 nm photometrisch vermessen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration im Zelllysats durch Anwendung des BCA-Assays (4.3.4) kann die Menge an sekretiertem Enzym auf die intrazelluläre Gesamtmenge bezogen werden um so die absolute Sekretion saurer Hydrolasen zu erfassen.

4.3.6 Biotinylierung

Bei der biochemischen Methode der Biotinylierung verwendet man das wasserlösliche Vitamin Biotin, das die Eigenschaft hat an eine Vielzahl von Makromolekülen zu binden. Der entscheidende Vorteil liegt dabei in der geringen Größe des Biotins, da es so zum einen bei entsprechender Anzahl von Biotinbindungsstellen innerhalb eines Moleküls zur Ausbildung einer Mehrfach-Biotinylierung kommen kann, zum anderen bleiben die biologischen und chemischen Eigenschaften des Moleküls erhalten. Für die in dieser Arbeit angestrebte Biotinylierung von Proteinen an der Zelloberfläche wurde das Thiol-spaltbare und Amin-reaktive Biotinylierungsreagenz Sulfo-NHS-SS-Biotin verwendet, das aufgrund der Ladung des gebundenen Succinimidyl-Rings die Zellmembran nicht durchdringen kann. Unter der Voraussetzung einer intakten Zellmembran reagiert die Estergruppe dieses Reagenzes nur mit den primären Aminogruppen von Proteinen an der Zelloberfläche, also mit der α -Aminogruppe der ersten Aminosäure des Proteins sowie der ϵ -Aminogruppe von Lysinen in dem Protein. Zur Reduzierung einer mit dieser Interaktion verbundenen, sterischen Hinderung des gebundenen Proteins, wurden in dieser Arbeit Biotinmoleküle mit verlängerten Verbindungsarmen verwendet (Biotin-*crosslinker*). Die Isolierung des biotinylierten Proteins kann nach der Zelllyse durch die Präzipitation mit Streptavidin-konjugierten Agarosekügelchen (hier: EZview™ Red Streptavidin Affinitätsigel) ermöglicht werden. Streptavidin wird aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* gewonnenes und ist ein 53 kDa schweres Homotetramer. Die Dissoziationskonstante $K(d)$ des Biotin-Streptavidin Komplexes liegt bei ca. 10^{-14} M und stellt damit eine der stärksten nicht-kovalenten Bindungen in der Natur dar.

In dieser Arbeit sollte mit der Methode der Zelloberflächenbiotinylierung der Einfluss des OCRL-Proteins auf die Verteilung des MPR300 und des TfR an der Plasmamembran sowie deren Internalisierung ins Zellinnere untersucht werden. Bei der Verwendung von HeLa-Zellen wurden diese 72 h vor dem Biotinylierungsassay, wie unter 4.3.2.2 beschrieben, mit OCRL-spezifischer siRNA sowie GFP-spezifischer Kontroll-siRNA transfiziert.

4.3.6.1 Zelloberflächenbiotinylierung zur Detektion von Plasmamembranständigen Rezeptoren

Biotinylierung

Am Vortag der Biotinylierung wurden HeLa-Zellen oder über das Flp-In™-System transfizierte CV1-Zellen mit einer Konfluenz von 50 % auf Zellkulturschalen mit einer Wachstumsfläche von $9 \pi \text{ cm}^2$ ausgesät und mit Entzugsmedium versetzt. Zu Versuchsbeginn wurden die benötigten Zellkulturschalen auf Eis gestellt und dreimal mit 2,5 ml eiskaltem 1x HBSS-Puffer gewaschen. Die Biotinylierung erfolgte nach Zugabe von 1,5 ml eiskaltem HBSS-Puffer + 0,5 mg/ml Biotin auf einem Schüttler für 15 min bei 4°C. Ungebundenes Biotin wurde durch zweimaliges Waschen mit 2,5 ml eiskaltem Wasch-HBSS und zweimaliges Waschen mit 2,5 ml eiskaltem 1x HBSS-Puffer entfernt.

Zellyse

Die Zellen wurden in 600 µl RIPA-Puffer + Protease-Inhibitoren für 10 min auf Eis lysiert und anschließend nach Behandlung mit einem Zellschaber in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Zur Entfernung von Zelltrümmern erfolgte eine Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C. Die Zellysate wurden nach Messung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Verfahren, wie unter 4.3.4 beschrieben, auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt. Zur späteren Überprüfung der Vergleichbarkeit der Lysate wurde ein 80 µl Aliquot zurückbehalten, mit 4x Laemmli-Puffer versetzt und als Rohlysat bei -20°C gelagert.

Präzipitation der biotinylierten Rezeptoren mit Streptavidin

Pro Ansatz wurden 40 µl Streptavidin-Agarose-Kügelchen eingesetzt. Diese mussten zunächst einem Waschschrift unterzogen werden. Dafür wurde die benötigte Menge an Streptavidin-Agarose-Kügelchen mit einer abgeschnittenen Spitze in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben und zweimal mit je 500 µl RIPA-Puffer versetzt, vorsichtig invertiert und bei 8.700 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Zellysate wurden nun auf die vorbereiteten Kügelchen gegeben und für mindestens 2 h oder über Nacht bei 4°C in einem Rotationsgerät invertiert. Nach Zentrifugation bei 8.700 rpm und 4°C wurde der Überstand verworfen und die Streptavidin-Agarose-Kügelchen zweimal mit je 500 µl RIPA versetzt und erneut bei 8.700 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Nach Durchführung der Waschschrift wurde 40 µl RIPA + Protease-Inhibitoren sowie 25 µl 4x Laemmli zu den Kügelchen gegeben. Nach Durchmischung wurde das Präzipitat bis zur weiteren Analyse mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Immundetektion, wie im folgenden unter 4.3.7, 4.3.8 und 4.3.9 beschrieben, bei -20°C gelagert.

4.3.6.2 Zelloberflächenbiotinylierung zur Quantifizierung der Internalisierung und Berechnung der Internalisierungsrate

Mit diesem Biotinylierungsexperiment kann eine Aussage über die Quantität der internalisierten Rezeptoren nach einem bestimmten Zeitraum gemacht werden, in dem die Menge der präzipitierten, also internalisierten Rezeptoren auf die Gesamtmenge der Rezeptoren im Rohlysat normalisiert werden. Es ist zudem eine Bestimmung der Internalisierungsrate möglich, in dem der prozentuale Anteil an internalisierten Rezeptoren im Verhältnis zu den Plasmamembranständigen Rezeptoren vor Beginn der Endozytose errechnet wird.

Biotinylierung

Die Biotinylierung von HeLa-Zellen oder über das Flp-In™-System transfizierte CV1-Zellen wurde durchgeführt, wie bei 4.3.6.1 unter dem Absatz *Biotinylierung* beschrieben.

Endozytose

Zur Quantifizierung der Endozytose wurden die Zellschalen mit 2 ml Endozytosemedium versetzt und für Zeitpunkte von 2–15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder auf Eis gestellt und das Endozytosemedium entfernt um ein schnelles Abstoppen der Endozytose zu gewährleisten. Die Zellen wurden dann mit 2 ml Glutathion-Puffer bedeckt und auf einem Schüttler für 25 min bei 4°C inkubiert. Dann wurde der Puffer entfernt und durch 2 ml neuen Glutathion-Puffer ersetzt. Dies diente der Eliminierung des gebundenen Biotins an nicht internalisierten Zelloberflächenrezeptoren. Die Effizienz dieses Vorgangs wurde durch die Inkubation einer Schale mit Glutathion-Puffer überprüft, die zuvor nicht bei 37°C erwärmt wurde. Sollte die Endozytoserate ermittelt werden, wurde mit einer Zellschale verfahren, wie unter 4.3.6.1 beschrieben, um den Anteil der Rezeptoren an der Zelloberfläche vor Einsetzen der Internalisierung bestimmen zu können.

Zellyse

Die Zellyse wurde durchgeführt, wie bei 4.3.6.1 unter dem Absatz *Zellyse* beschrieben.

Präzipitation der biotinylierten Rezeptoren mit Streptavidin

Die Präzipitation der Biotin-gebundenen Rezeptoren wurde durchgeführt, wie bei 4.3.6.1 unter dem Absatz *Präzipitation der biotinylierten Rezeptoren mit Streptavidin* beschrieben.

4.3.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die Methode der eindimensionalen, diskontinuierlichen SDS-PAGE unter denaturierenden und nach Bedarf reduzierenden Bedingungen angewandt (Laemmli, 1970). Die Proteine werden für diese Methode vorbereitend mit dem anionischen Tensid SDS in sättigender Konzentration versetzt und bei 95°C für 5 min erhitzt. Dabei kommt es zum Aufbrechen der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur durch Unterbrechung von Wasserstoffbrückenbindungen und Strecken des Moleküls. Zusätzlich kommt es zu einer

Maskierung der Eigenladung des Proteins durch Ausbildung von SDS-Protein-Komplexen, was zu einer konstanten, negativen Ladungsverteilung führt. Die Proteine können nun ihrer Größe nach in der SDS-PAGE aufgetrennt werden. Als Trägermedium für das SDS-Gel wird Polyacrylamid verwendet, dessen Konzentration den Vernetzungsgrad und damit die Porengröße des Gels bestimmt. Die Wanderungsgeschwindigkeit des jeweiligen Proteins wird damit durch dessen Molekulargewicht bestimmt.

Für die Gelelektrophorese wurde die Trenngel-Polyacrylamid-Lösung nach der unten angegebenen Rezeptur hergestellt und zwischen zwei Glasplatten in eine Minigel-Apparatur (BioRad) gegossen. Um eine gleichmäßige Oberfläche zu gewährleisten, wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach abgeschlossener TEMED- und APS-katalysierter Polymerisation wurde das Isopropanol vollständig entfernt. Nachfolgend wurde auf das Trenngel ein Sammelgel gegossen und mit Probenkämmen versehen. In diesem werden die SDS-Protein-Komplexe vor der eigentlichen Auftrennung im Trenngel aufkonzentriert. Die Proteinproben wurden mit 4x SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer) versetzt, für 5 min bei 95°C aufgeköcht, zentrifugiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese in 1x SDS-Laufpuffer erfolgte bei 90 V durch das Sammelgel und bei 150-160 V durch das Trenngel. Zur Überprüfung der molekularen Masse der Proteine wurde zusätzlich ein Proteinmassenstandard aufgetragen.

Tab. 4-17: Gießprotokoll zur Herstellung von Trenn- und Sammelgelen.

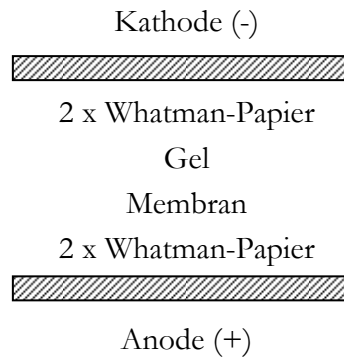
	Trenngel			Sammelgel
	6,5 %	10,0 %	12,5 %	5,0 %
Aqua bidest. [ml]	6,5	5	4,2	7,8
4x Trenngelpuffer [ml]	3,1	3,1	3,1	-
4x Sammelgelpuffer [ml]	-	-	-	3,4
30 % Acryl-/Bisacrylamid (37,5:1) [ml]	2,7	4,2	5	2,4
10 % SDS (w/v) [µl]	125	125	125	-
TEMED [µl]	6,5	6,5	6,5	12,5
10 % APS (w/v) [µl]	125	125	125	125

4.3.8 Western-Blot

Der Transfer von Proteinen aus dem SDS-Gel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran erfolgte aufgrund der negativen Ladung der SDS-Proteinkomplexe im Elektrophoretogramm.

Die PVDF-Membran wurde auf die Größe des Gels zugeschnitten und für 30 sec in 100 %igem Methanol aktiviert. Anschließend wurde sie für 1 min in Aqua bidest. gewaschen und für 5 min in Transferpuffer inkubiert. Vier 1 mm dicke Whatman-Filterpapiere wurden ebenfalls auf Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer äquilibriert. Die Polyacrylamidgele wurden aus der Gelelektrophoresekammer entnommen und kurz in Transferpuffer geschwenkt, um störende Salze zu entfernen.

Aufbau des Western-Blot-Sandwichs (luftblasenfrei) in einem Semidry-Blotter:



Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte für 60-90 min bei konstanter Stromstärke ($3,5 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche). Die auf der PVDF-Membran immobilisierten Proteine konnten in einer Immundetektion nachgewiesen werden.

4.3.9 Immunologische Detektion auf PVDF-Membran

Für die Detektion der auf der PVDF-Membran immobilisierten Proteine ist zunächst die Bindung eines primären Antikörpers an das spezifische Epitop im nachzuweisenden Protein notwendig. Es kommt zur Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes. Anschließend kann ein mit Meerrettich-Peroxidase- (HRP-) konjugierter, sekundärer Antikörper an die F_c -Region des primären Antikörpers binden. Nach Zugabe von Wasserstoffperoxid findet eine HRP-katalysierte Oxidation von Luminol statt. Das instabile Intermediärprodukt dieser Reaktion befindet sich in einem angeregten Zustand und fällt unter Lichtemission in seinen Grundzustand zurück (Chemilumineszenz), die durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert werden kann.

Zur Absättigung freier Bindungsstellen auf der PVDF-Membran erfolgte nach dem Proteintransfer eine Inkubation mit einer Blockierlösung für 45-90 min bei RT. Diese bestand je nach verwendetem Primärantikörper aus 5 % (w/v) Milchpulver in 1x TBS-T (Antikörper von Abcam, BD Transduction Laboratories, Cell Signaling Technology, Invitrogen sowie zur Verfügung gestellte, selbst hergestellte Antikörper) oder aus 10 % (w/v) Milchpulver in 1x PBS-T (Antikörper von Santa Cruz). Die Ausbildung der Antigen-Antikörper-Komplexe fand während der Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht unter leichtem Schwenken bei 4°C statt. Abhängig vom verwendeten Primärantikörper wurde dieser in TBS-T/BSA, TBS-T/M oder PBS-T/M verdünnt (siehe 4.1.9.2). Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Membran mit 1x TBS-T bzw. 1x PBS-T für je 10 min entfernt. Die Bindung des HRP-konjugierten Sekundärantikörpers an die F_c -Domäne des primären Antikörpers erfolgte während einer einstündigen Inkubation bei RT. Die Membran wurde danach dreimal für je 15 min mit 1x TBS-T bzw. 1x PBS-T gewaschen. Abschließend wurde die Membran für ca. 3 min mit einer ECL-Substratlösung (Immobilon™ Western – *Chemiluminescent HRP-substrate*) inkubiert und die entstehende Chemilumineszenz durch Exposition der Membran auf Röntgenfilm sichtbar gemacht. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte in einem speziellen Entwicklergerät (X-Ray Film Processor). Für die erneute Immundetektion mit einem weiteren Primärantikörper konnten die bisher gebundenen Antikörper durch Inkubation mit dem Restore™ Western-Blot Stripping

Puffer oder mit 0,2 M NaOH für ca. 20 min von den auf der Membran immobilisierten Proteinen gelöst werden.

4.3.10 Immunfluoreszenzanalysen

In dieser Arbeit sollte die subzelluläre Lokalisation verschiedener Proteine bzw. die Kolo-kalisation zwischen zwei Proteinen in den siRNA-transfizierten HeLa-Zellen untersucht werden. Um dies zu ermöglichen wurde die Methode der Immunfluoreszenzanalyse angewendet.

Zunächst wurden unbeschichtete Glasdeckgläschen (18 mm) durch Einlegen in 70 % Ethanol und kurzes Abflammen sterilisiert und anschließend in 12-Loch-Platten platziert. Nach zweimaligem Waschen der Deckgläschen mit 1 ml sterilem Aqua bidest. wurden siRNA-transfizierte HeLa-Zellen 24-60 h nach der Transfektion mit einer Konfluenz von 20-80 % auf die Deckgläschen ausgesät.

72 h nach der siRNA-Transfektion wurde das Zellmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit eiskaltem 1x PBS^{+/+} gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurden diese mit 500 µl Paraformaldehyd-Lösung überschichtet und bei leichtem Schwenken der 12-Loch-Platten für 10 min bei RT inkubiert. Nach Entfernung der Fixierlösung wurden die Zellen daraufhin dreimal für je 10 min mit 1x PBS^{+/+} unter Schwenken gewaschen. Die Inkubation der Zellen in 400 µl Blockierlösung für 45 min bei RT und leichtem Schwenken ermöglichte eine Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Nach Auftropfen des primären Antikörpers, verdünnt in einer Antikörperlösung, auf einem in einer feuchten Kammer platzierten Parafilm wurden die Glasdeckgläschen mit der Zelleseite auf der Antikörperverdünnung platziert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen für 2-3 h im Dunkeln. Nach Bindung des primären Antikörpers wurden die Zellen zunächst zweimal für 10 min mit einem Hochsalzpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Nach einem weiteren zweimaligen Waschschritt für je 10 min mit 1x PBS^{+/+} unter leichtem Schwenken wurden die Zellen für 1 h mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten sekundären Antikörpern in Antikörperlösung in der feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Zusätzlich wurde DAPI zu dieser sekundären Antikörperlösung gegeben. Dieser Farbstoff lagert sich an AT-reiche Regionen der DNA an und ermöglicht somit die Visualisierung des Zellkerns. Nach einer finalen Waschung für 3x 10 min mit 1x PBS^{+/+} wurden die Glasdeckgläschen mit Mowiol-Einbettmedium auf einem Objektträger fixiert. Für die Auswertung der Präparate wurde das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop (*confocal laser scanning microscope*; cLSM) Leica DMIRE2 mit der entsprechenden Leica TCS-Software (*TCS confocal software*) verwendet, das eine Darstellung definierter Zellebenen ermöglicht.

Sollten darüber hinaus die Vesikelgrößen der Zelle bestimmt werden, wurden Zellen mit identischer Vergrößerung und Intensität gescannt und anschließend mit dem Metamorph-Programm ausgewertet. Die Vesikel wurden mit einem Auswahlwerkzeug definiert und die Fläche bestimmt. Dies ermöglichte eine Einteilung in eine willkürlich gewählte Vesikelgrößenverteilung.

4.3.11 Experimente mit dem radioaktiven Schwefel-Isotop Schwefel-35 (^{35}S)

4.3.11.1 Immunpräzipitation (IP)

Mithilfe der IP kann ein gewünschtes Protein (Protein X) aus einem Zelllysate aufkonzentriert und präzipitiert werden. Dies ist möglich durch die Zugabe eines Antikörpers, der spezifisch gegen ein Epitop des Proteins X gerichtet ist und über die F_{ab} -Region an dieses bindet. Um diesen Antikörper-Antigen-Komplex aus dem Proteingemisch zu präzipitieren, werden mit Protein A oder G beschichtete Agarose- oder Sepharose-Kügelchen zum Lysat gegeben. Protein A und G stammt aus der Zellwand von bestimmten Bakterienstämmen und hat die Eigenschaft mit hoher Spezifität an die F_c -Region der meisten Säugetier-Antikörper zu binden. Durch Denaturierung können die präzipitierten Proteine wieder von den Kügelchen gelöst und in der SDS-PAGE aufgetrennt werden.

In dieser Arbeit wurde die IP zum Nachweis radioaktiv-markierter Proteine verwendet. Die Protein A- oder G-beschichteten Kügelchen wurden durch dreimaliges Waschen gereinigt, zum Proteinlysate gegeben und für 15-60 min bei RT oder 4°C rotiert um unspezifische Bindungen zu minimieren. Durch Zentrifugation konnte der Überstand von den Kügelchen getrennt und mit einem spezifischen Antikörper versetzt werden. Die Antikörper-Antigen-Komplexbildung erfolgte bei Rotation für 1,5 h bis 16 h bei RT oder 4°C. Anschließend wurden erneut Protein A- oder G-Kügelchen zum Lysat gegeben und für 30-60 min bei RT oder 4°C rotiert. Um wiederholt unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden zusätzliche Waschschriffe durchgeführt und die Kügelchen anschließend in unverdünntem Laemmli-Puffer aufgenommen. Nach Denaturierung bei 95°C für 5 min wurde der Überstand vollständig auf eine SDS-PAGE aufgetragen.

4.3.11.2 Bestimmung der MPR300-Halbwertszeit

Um die Halbwertszeit eines Proteins zu bestimmen, wird ein *pulse-chase* Experiment durchgeführt. Während der *pulse*-Phase wird eine Zelle mit ^{35}S -markiertem Methionin (Met) und Cystein (Cys) versetzt. Neu-synthetisierte Proteine enthalten somit die radioaktiv-markierten Aminosäuren. Anschließend erfolgt der Entzug der Radioaktivität in der *chase*-Phase. Bei der Protein-Neusynthese werden ausschließlich nicht-radioaktiv-markierte Proteine gebildet. Die während der *pulse*-Phase synthetisierten radioaktiv-markierten Proteine gelangen zu ihren Bestimmungsorten und werden schließlich abgebaut. Anhand der Menge des noch verbliebenen, radioaktiv-markierten Proteins zum Zeitpunkt X kann die Halbwertszeit des Proteins berechnet werden.

Die Halbwertszeit des MPR300 sollte in HeLa Zellen nach Transfektion mit OCRL-spezifischer siRNA, wie unter 4.3.2.2 beschrieben, bestimmt werden. Als Kontrolle wurde GFP-spezifische siRNA verwendet. Nach 24 h wurden die siRNA-transfizierten Zellen auf 6-Loch-Platten mit einer Konfluenz von 35 % ausgesät.

pulse-chase des MPR300

Zum Zeitpunkt einer fast vollständigen Runterregulierung des OCRL-Proteins wurden die Zellen einmal mit 1 ml TD-Puffer gewaschen und mit 1 ml Met-/Cys-freiem Vollmedium für

30 min bei 37°C in einem Begasungsinkubator inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500 µl Tran³⁵S Label™ (MP Biomedicals) in Met-/Cys-freiem Vollmedium und eine *pulse*-Phase für 60 min bei 37°C in einem Begasungsinkubator. Die radioaktiv-markierten Aminosäuren wurden möglichst vollständig durch zweimaliges Waschen mit 1 ml Vollmedium entfernt. Nach Zugabe von 2 ml Met-/Cys-haltigem Vollmedium erfolgte eine Inkubation unterschiedlicher Zeiträume von 3 bis 48 h bei 37°C im Begasungsinkubator.

Zellyse

Zum Abstoppen der *chase*-Phase wurden die Zellkulturschalen auf Eis gestellt und dreimal mit 1 ml eiskaltem 1x PBS^{-/-} gewaschen. Die Zellen wurden mit 500 µl RIPA-Puffer + Protease-Inhibitoren versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert um eine vollständige Lyse zu gewährleisten. Zur Entfernung von Zelltrümmern wurde das Lysat bei 55.000 rpm und 4°C zentrifugiert.

IP des MPR300

Es erfolgte eine IP wie unter 4.3.11.1 beschrieben. Es wurde eine 1:4 Suspension von Protein A-Agarose (Roche) in 1x PBS^{-/-} eingesetzt. Das Zellysat wurde mit 80 µl dieser Suspension versetzt und für 15 min bei RT in einem Rotationsgerät vorinkubiert. Die Protein A-Agarose-Kügelchen wurden durch Zentrifugation bei 12.000 rpm, 4°C sedimentiert und der Überstand mit 1 µl anti-MPR300-Antikörper (selbst hergestellt, Prof. Dr. Suzanne R. Pfeffer, Kalifornien, USA) versetzt. Zur Ausbildung der Antikörper-Antigen-Komplexe erfolgte eine Inkubation im Rotationsgerät für 1.5 h bei RT. Zur Präzipitation dieser Komplexe wurde das Lysat mit 80 µl der Protein A-Agarose Kügelchen versetzt und für 30 min bei RT im Rotationsgerät inkubiert. Nach Sedimentierung der Kügelchen durch Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4°C wurden diese dreimal mit 500 µl RIPA + Protease-Inhibitoren und einmal mit 500 µl 1x PBS^{-/-} gewaschen. Die Kügelchen wurden dann in 50 µl 5x Laemmli-Puffer + 10 % β-Mercaptoethanol aufgenommen und bei 95°C für 5 min denaturiert. Mit dem Überstand wurde eine SDS-PAGE mit einem 6,5 %igem Trenngel durchgeführt, wie unter 4.3.7 beschrieben.

Quantifizierung des radioaktiv-markierten MPR300 im Phosphor-Imager

Zur Quantifizierung des radioaktiv-markierten MPR300 im *Phosphor-Imager* musste dem Trenngel zunächst das Wasser entzogen werden. Hierfür wurde dieses auf zwei Whatman-Papiere gelegt. Das Whatman-Papier unter dem Gel wurde mit Wasser befeuchtet. Der Whatman-Gel-Stapel wurde dann in einer Gel-Trocknungsapparatur platziert und mit Frischhaltefolie bedeckt. Nach 1.5 h bei 72°C waren Gel und Whatman durch den Entzug der Feuchtigkeit miteinander verschmolzen und wurden für 3-5 Tage in einer photostimulierbaren Speicher-Phosphor Kassette platziert. Eine Speicher-Phosphor Oberfläche ermöglicht die Speicherung von radioaktiver Strahlung. Die Oberfläche wurde dann in einem *Phosphor-Imager* ausgelesen und mithilfe des digitalen Bildes die Halbwertszeit des MPR300 bestimmt. Ein *Phosphor-Imager* ermöglicht die Umwandlung der gespeicherten Energie in Lichtemission durch Anregung mit einem im Gerät befindlichen Laser. Das abgegebene Licht wird von Photovervielfachern linear in ein digitales Graustufen-Bild umgewandelt.

4.3.11.3 Detektion der Reifung des lysosomalen Enzyms Cathepsin Z

In dieser Arbeit sollte die Reifung des lysosomalen Enzyms Cathepsin Z während des Transports zum Lysosom untersucht werden. Um die Bildung der verschiedenen Formen dieses Enzyms in der Zelle nachzuweisen, wurde das Prinzip des *pulse-chase* Experiments, wie unter 4.3.11.2 beschrieben, angewandt. Das in der *pulse*-Phase gebildete Cathepsin Z wurde mit dem prozessierten Cathepsin Z nach einer *chase*-Phase von 5 h verglichen. Der Versuch wurde in HeLa-Zellen nach vorhergehender Transfektion mit OCRL- bzw. GFP-spezifischer siRNA, wie unter 4.3.2.2 beschrieben, durchgeführt. 48 h nach siRNA-Transfektion wurden die Zellen mit einer Konfluenz von 50 % auf Zellkulturschalen mit einer Wachstumsfläche von $3,1 \pi \text{ cm}^2$ ausgesät. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit 1 ml 1x PBS^{-/-} gewaschen und mit 1 ml Met-freiem Entzugsmedium versetzt. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C im Begasungsininkubator wurde das Entzugsmedium entfernt und 700 µl Met-freiem Entzugsmedium + 100 µCurie (µCi) ³⁵S-Met (Hartmann Analytic) zu den Zellen gegeben. Es erfolgte eine *pulse*-Phase von 1 h bei 37°C im Begasungsininkubator. Das *pulse*-Medium wurde durch eine Waschung mit 1 ml 1x PBS^{-/-} möglichst gründlich entfernt. Gegebenenfalls wurde eine *chase*-Phase mit 750 µl Met-freiem Entzugsmedium + 250 µg/ml Met + 10 mM M6P für 5 h bei 37°C im Begasungsininkubator vorgenommen. Die Zellkulturschalen wurden dann auf Eis gestellt und nach zweimaligem Waschen mit 1 ml eiskaltem 1x PBS^{-/-} mit 1,2 ml IMM-Lysepuffer + Protease Inhibitoren versetzt. Der Überstand der Zellen, die eine fünfstündige *chase*-Phase durchlaufen hatten, wurde abgenommen und 700 µl dieses Überstandes mit 500 µl IMM-Lysepuffer + Protease Inhibitoren versetzt.

IP von Cathepsin Z

Es erfolgte eine IP wie unter 4.3.11.1 beschrieben. Es wurde eine 1:2 Suspension von Protein G-Sepharose in 1x PBS^{-/-} eingesetzt. Das Zelllysate und der Überstand wurde mit 40 µl dieser Suspension versetzt und für 1 h bei 4°C in einem Rotationsgerät vorinkubiert. Die Protein G-Sepharose-Kügelchen wurden durch Zentrifugation bei 3.000 rpm, 4°C sedimentiert und der Überstand mit 12 µl anti-Cathepsin Z-Antikörper (Santa Cruz, USA) versetzt. Zur Ausbildung der Antikörper-Antigen-Komplexe erfolgte eine Inkubation im Rotationsgerät für 16 h bei 4°C. Zur Präzipitation dieser Komplexe wurde das Lysat mit 40 µl der Protein G-Sepharose-Kügelchen versetzt und für 1 h bei 4°C im Rotationsgerät inkubiert. Nach Sedimentierung der Kügelchen durch Zentrifugation bei 3.000 rpm und 4°C wurden diese nacheinander mit 500 µl 1x Neufeld-Waschpuffer, 1x IMM-Lysepuffer, 1x IMM-Lysepuffer/KCl und 0,1x PBS^{-/-} gewaschen. Die Kügelchen wurden dann in 130 µl 2x Laemmli-Puffer aufgenommen und bei 95°C für 5 min denaturiert. Mit dem Überstand wurde eine SDS-PAGE mit einem 12,5 %igem Trenngel durchgeführt, wie unter 4.3.7 beschrieben.

Detektion der Cathepsin Z-Formen mittels Fluorographie

Das Polyacrylamid-Trenngel wurde vom Sammelgel abgetrennt und für dreimal 20 min in Dimethylsulfoxid (DMSO) geschwenkt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 16 h in einer 2,5-Diphenyloxazol- (PPO-) Lösung, einem organischen Szintillator. Zum Eintrocknen wurde

das Gel in Zellophanfolie gebettet und in einem Trocknungs-Ofen für 2,5 h vollständig getrocknet. Das Gel wurde darauf in einer Entwicklerkassette einem Röntgenfilm exponiert und für unterschiedliche Zeiträume, mindestens aber 24 h zur Verstärkung des Signals auf -80°C gelagert. Der Röntgenfilm konnte dann in einem Entwicklergerät (X-Ray Film Processor) entwickelt werden. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine fluorographische Auswertungsmethode, da es beim radioaktiven Zerfall von ^{35}S zu einer Interaktion der β -Partikel mit dem Szintillator PPO kommt, wodurch Licht emittiert wird. Der Röntgenfilm wird an dieser Stelle schwarz gefärbt.

4.3.11.4 Detektion des retrograden Transports von MPR46 *in vivo*

Mit dieser Methode kann die MPR46-Menge bestimmt werden, die *in vivo* den retrograden Transportweg vom endosomalen Kompartiment zum TGN durchläuft. Es wird eine modifizierte HEK- (*human embryonic kidney*-) 293-Zelllinie verwendet (im folgenden 293HMY genannt; (Itin et al., 1997)), die eine MPR46-Variante stabil überexprimiert (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Suzanne R. Pfeffer, Kalifornien, USA). Diese MPR46-Variante enthält einen Histidin-Rest (HIS), eine c-myc-Markierung sowie eine Tyrosin-Sulfatidierungsstelle. Bei korrektem Rücktransport des modifizierten MPR46 zum TGN kann die Tyrosin-Sulfatidierungsstelle von der dort lokalisierten Tyrosin-Sulfotransferase erkannt und sulfatidiert werden. Als Substrat wird [^{35}S]3'-Phosphoadenosin 5'-Phosphosulfat ([^{35}S]PAPS) verwendet, das im Zytoplasma aus ATP und Sulfat synthetisiert wird.

In dieser Arbeit sollte der retrograde Transport des modifizierten MPR46 nach Runterregulierung des OCRL-Proteins *in vivo* in den 293HMY Zellen untersucht werden (Sincock et al., 2003). Dazu wurde eine siRNA Transfektion mit OCRL-spezifischer siRNA durchgeführt. GFP-spezifische siRNA wurde als Kontrolle verwendet. Die transfizierten 293HMY Zellen wurden für 3 Tage in 10 ml Sulfat- und Antibiotika-freiem Vollmedium + 20 mM Chlorat bei 37°C im Begasungsininkubator inkubiert. Das Chlorat bewirkt eine reversible Inhibierung der ATP-Sulfurylase, eines der beiden für die Synthese von [^{35}S]PAPS benötigten Enzyme (Baeuerle und Huttner, 1986). Zusätzlich wird die Bildung von [^{35}S]PAPS durch den Entzug von Sulfat verhindert. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Tyrosin-Sulfatidierungsstelle zum Zeitpunkt des Experiments im nicht sulfatidierten Zustand vorlag. Am Tag des Versuches wurde das Medium dann mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cycloheximid versetzt und die Zellen für 2 h bei 37°C im Begasungsininkubator inkubiert. Dadurch wurde die Proteinneusynthese inhibiert und neu-synthetisierte MPR46 an ihren Bestimmungsort transportiert. Für die Synthese von [^{35}S]PAPS wurden die Zellen mit 400 mCi [^{35}S]Natrium-Sulfat (Perkin-Elmer) in 4 ml Sulfat- und Antibiotikum-freiem Vollmedium + 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cycloheximid versetzt und für 2 h bei 37°C im Begasungsininkubator inkubiert. Regelmäßiges Schwenken verhinderte dabei ein Austrocknen der Zellen. Diese wurden dann dreimal mit eiskaltem 1x PBS^{-/-} auf Eis gewaschen und in 1 ml RIPA + Protease Inhibitoren für 15 min lysiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 55.000 rpm und 4°C aus dem Lysat entfernt.

Präzipitation des modifizierten MPR46

Die HIS-Markierung des modifizierten MPR46 weist eine starke Bindung an bivalente Eisen-
ionen wie Nickel oder Cobalt auf. Durch Zugabe von $[\text{Ni}^{2+}]$ Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-
NTA) kann der MPR46 daher aus dem Lysat präzipitiert werden.

Das Lysat wurde mit 40 μl einer 1:2 Suspension Ni-NTA in RIPA + Protease Inhibitoren
versetzt und für 45 min bei RT rotiert. Die Ni-NTA-Kügelchen wurden durch Zentrifugation bei
6.000 rpm und 1 min sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Kügelchen
dreimal mit 1 ml RIPA + Protease Inhibitoren gewaschen. Die Kügelchen wurden mit 150 μl
RIPA + Protease Inhibitoren + 25 mM EDTA versetzt und für 5 min bei RT inkubiert um den
Komplex zwischen Ni^{2+} und der NTA-Agarose zu lösen. Nach erneuter Zentrifugation wurde
der Überstand in ein Szintillations-Röhrchen überführt und die Radioaktivität im β -Counter
vermessen. Die relative Sulfatidierung des MPR46 wurde ermittelt, indem die gemessene Radio-
aktivität auf die zuvor ermittelte Proteinkonzentration bezogen wurde.

5 ERGEBNISSE

5.1 Untersuchungen zum Einfluss des OCRL-Proteins auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose

Aufgrund der Interaktion mit Proteinen aus dem endozytotischen Transportweg, Lokalisation an der Plasmamembran, endozytotischen Vesikeln und frühem Endosom sowie des für die Bildung Clathrin-bedeckter Gruben benötigten Substrats PI(4,5)P₂ wird eine direkte Beteiligung des OCRL-Proteins an der Clathrin-abhängigen, Rezeptor-vermittelten Endozytose vermutet. In der Dissertation von Juliane Najm (2009) wurde eine Beeinträchtigung der Clathrin-abhängigen Internalisierung des Eisentransporters Tf über den TfR in COS-7-Zellen nach transienter Überexpression von katalytisch aktiven OCRL-Proteinvarianten aufgedeckt. Für eine korrekte Tf-Internalisierung wird die Phosphatase-Domäne von OCRL benötigt. Die transiente Überexpression hatte jedoch den Nachteil unterschiedlicher Expressionslevel in den OCRL-überexprimierenden Zellen. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, sollten stabil OCRL-überexprimierende Zelllinien hergestellt und die Tf-Internalisierung erneut analysiert werden.

5.1.1 Generierung von stabil OCRL-überexprimierenden CV1-Zellen

Für die Generierung der stabil OCRL-überexprimierenden CV1-Zellen wurde das Flp-InTM-System verwendet. Diese Technologie gewährleistet die Integration der gewünschten cDNA an einen definierten Ort im Genom der verwendeten Zelllinie. Als Modellzelllinie wurde die Flp-InTM-CV1-Linie ausgewählt, bei der es sich um eine Vorläuferlinie der COS-7-Zellen handelt. Die in Abb. 5.1 A schematisch dargestellten OCRL-Konstrukte wurden zur stabilen Integration ins CV1-Genom verwendet. Im Gegensatz zu den transient transfizierten OCRL-Konstrukten (Juliane Najm, 2009) enthielten die hier generierten Konstrukte aufgrund der inzwischen postulierten Beteiligung der OCRL-Isoform a an der Tf-Endozytose (Choudhury et al., 2009) das alternative Exon 18a. Neben einem OCRL-WT-Konstrukt (OCRL^{WT}) wurde auch ein Phosphatase-defizientes OCRL-Konstrukt (OCRL^{R493A/R500T}) generiert, indem Mutationen in die cDNA-Sequenz eingeführt wurden, die zum Austausch zweier für die katalytische Aktivität essentieller Aminosäuren führten (siehe 2.2). Zur Detektion der überexprimierten Proteinvarianten wurde eine V5-Markierung am C-Terminus von OCRL angefügt (Abb. 5.1 A). Als Kontrolle möglicher Transfektionsartefakte wurde eine stabil CAT- (Chloramphenicol-Acetyltransferase-) überexprimierende CV1-Zelllinie hergestellt. Die generierten CV1-Zelllinien wurden anschließend in der Immundetektion mit einem anti-V5-Antikörper auf Expression der überexprimierten Proteine untersucht. Im dargestellten Blot entsprechen die detektierten Banden von überexprimiertem OCRL^{WT} bzw. OCRL^{R493A/R500T} der erwarteten Masse von 105 kDa (Abb. 5.1 B). Die Intensität der detektierten Bande nach OCRL^{R493A/R500T}-Überexpression ist jedoch schwächer als die nach OCRL^{WT}-Überexpression. Die Bande nach Überexpression von CAT entspricht ebenfalls der erwarteten Größe von 25 kDa (Abb. 5.1 B).

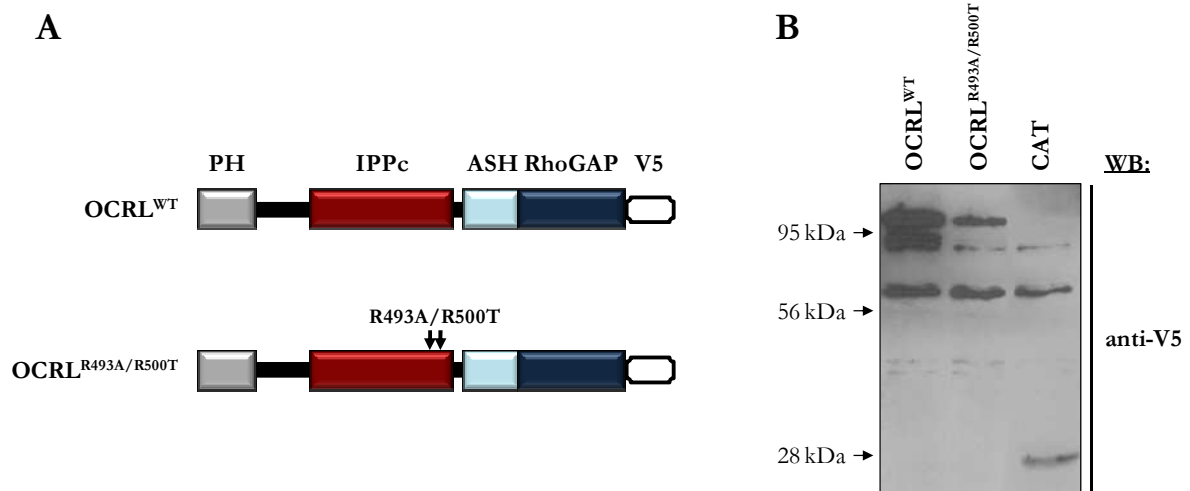


Abb. 5.1: Generierung von WT- und Phosphatase-defizienten OCRL-Konstrukten und biochemischer Nachweis der Expression nach stabiler Transfektion der Konstrukte in CV1-Zelllinien. (A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von OCRL^{WT} und Phosphatase-defizientem OCRL (OCRL^{R493A/R500T}). Die entsprechenden Konstrukte wurden für die Generierung stabil OCRL-überexprimierender CV1-Zellen verwendet. Beide OCRL-Konstrukte enthalten das alternative Exon 18a sowie eine C-terminale V5-Markierung. (B) CV1-Zellen wurden nach Transfektion der OCRL-Konstrukte sowie eines Chloramphenicol-Acetyltransferase- (CAT-) Konstruktes als Transfektionskontrolle in der Immundetektion mit einem anti-V5-Antikörper auf Expression der überexprimierten Proteine untersucht. Das Ergebnis ist im abgebildeten Blot dargestellt. Die erwarteten Bandengrößen liegen bei 105 kDa (OCRL^{WT} und OCRL^{R493A/R500T}) sowie bei 25 kDa (CAT). Bei etwa 65 und 90 kDa wurden unspezifische Banden detektiert. Die Molekulargewichte des Massenstandards sind links des Blots abgebildet. PH: *Pleckstrin homology*; IPPc: *inositol polyphosphate phosphatase, catalytic*; ASH: *ASPM, SPD-2, Hydin*; RhoGAP: *Rho GTPase-activating protein*; WB: Western-Blot.

5.1.2 Untersuchung der TfR-Internalisierung in stabil OCRL-überexprimierenden CV1-Zellen mittels Zelloberflächenbiotinylierung

Nach Generierung der stabil-transfizierten CV1-Zelllinien sollte nun die Internalisierung von Tf bei stabiler Überexpression der OCRL-Proteinvarianten bestimmt werden.

Analog zu den Experimenten in der Dissertation von Juliane Najm (2009) sollten immunocytochemische Methoden verwendet werden, um die Internalisierung des TfR-Ligand-Komplexes zu untersuchen. Im Gegensatz zu den zuvor verwendeten COS-7-Zellen konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse jedoch kein internalisiertes Tf in den CV1-Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Daher sollte die Methode der Zelloberflächenbiotinylierung für die Analyse der Tf-Endozytose durch Markierung und Detektion des Rezeptors angewandt werden. Um dies zu ermöglichen, wurden die Zelloberflächenproteine der stabil OCRL^{WT}-, OCRL^{R493A/R500T}- und CAT-überexprimierenden CV1-Zelllinien mit einem Zellmembran-impermeablen Biotin-*cross-linker* markiert. Ungebundenes Biotin wurde entfernt, und pro Transfektionsansatz wurde ein Zellaliquot zur Detektion von Plasmamembran-ständigen TfR direkt lysiert. Die anderen Ansätze wurden für 2 bzw. 5 min zur Initiation der TfR-Endozytose bei 37°C inkubiert. Nach Abstoppen der Endozytose wurde Oberflächen-gebundenes Biotin entfernt, und die Zellen wurden lysiert. Abschließend wurden die biotinylierten Proteine durch Zugabe von Streptavidin-Agarose aus den Rohlysaten (Gesamt-TfR) präzipitiert. Präzipitat und Rohlysate wurden nach Western-Blot in der Immundetektion mit einem anti-TfR-Antikörper analysiert.

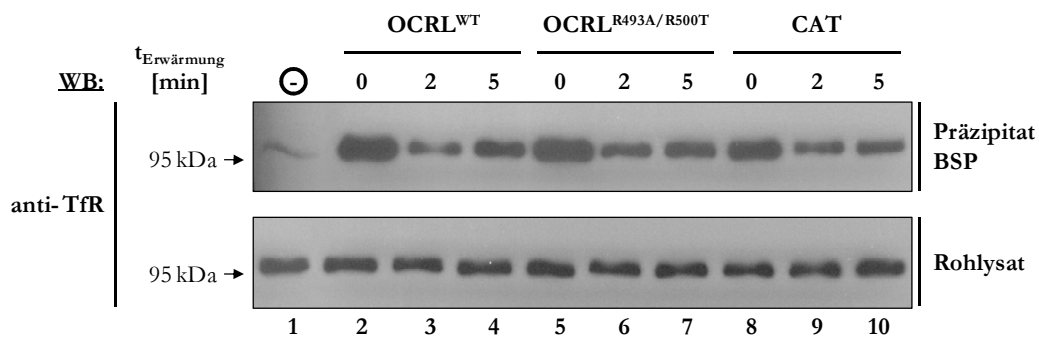
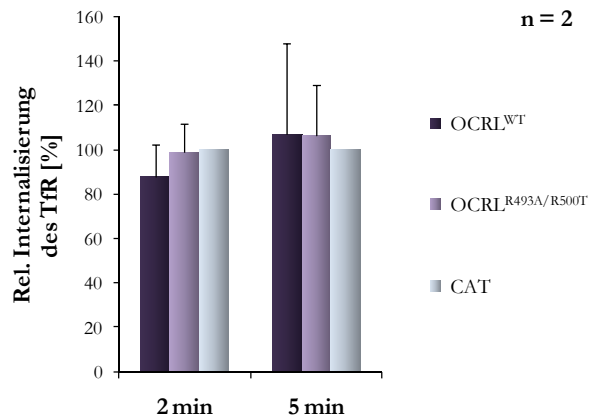
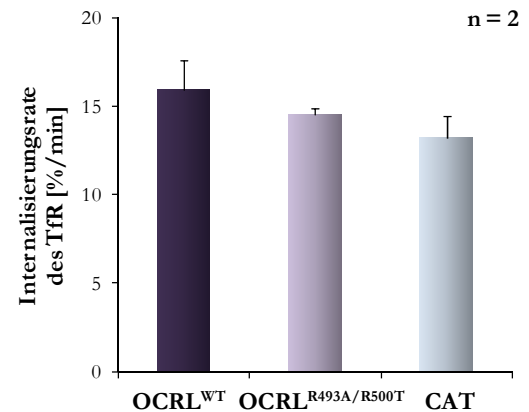
A**B****C**

Abb. 5.2: Bestimmung der relativen Internalisierung und der Internalisierungsrate des Tfr in stabil OCRL-überexprimierenden CV1-Zellen mittels Zelloberflächenbiotinylierung. Stabil OCRL^{WT}-, OCRL^{R493A/R500T}- und CAT-überexprimierende CV1-Zelllinien wurden an der Zelloberfläche mit Biotin markiert. Ungebundenes Biotin wurde durch einen Waschschritt entfernt. Anschließend wurden die Zellen entweder sofort lysiert (Spuren 2, 5 und 8) oder für 2 bzw. 5 min erwärmt (Spuren 3-4, 6-7 und 9-10). Nach Entfernung des Oberflächenbiotins durch reduzierenden Glutathion-Puffer wurden die Zellen lysiert. Zusätzlich wurde eine Kontrolle zur Effizienz des Glutathion-Puffers mitgeführt (Spur 1). Die Präzipitation der biotinylierten Rezeptoren wurde mittels Streptavidin-Agarose durchgeführt. Präzipitat (oberer Blot) und Rohlysate (unterer Blot) wurden nach Western-Blot durch Immundetektion mit einem anti-Tfr-Antikörper untersucht. Die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards sind in kDa auf der linken Seite des Blots abgebildet. Die dargestellten Blots zeigen repräsentative Ergebnisse von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Biotinylierungsansätzen. **(B)** Quantifizierung der relativen Internalisierung des Tfr pro Zeiteinheit. Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Wert der Tfr-Internalisierung nach Überexpression der OCRL-Proteinvarianten im Vergleich zur CAT-CV1-Zelllinie (100 %). Der densitometrisch ermittelte Wert der internalisierten Tfr im Präzipitat wurde auf die Gesamt-Tfr-Menge im Rohlysate normalisiert und ein Mittelwert mit Standardabweichung gebildet. **(C)** Berechnung der mittleren Internalisierungsrate. Der 0 min-Wert wurde auf 100 % gesetzt und der prozentuale Anteil der nach 2 und 5 min internalisierten Tfr berechnet. Nach Bildung von Mittelwert und Standardabweichung konnte die mittlere Internalisierungsrate in %/min bestimmt werden (n = 2). BSP: Biotin-Streptavidin-Präzipitation, WB: Western-Blot.

Abb. 5.2 A zeigt ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Zelloberflächenbiotinylierungen. Die 0 min-Bande im abgebildeten Blot des Präzipitats gibt die Menge an Plasmamembran-ständigen Tfr vor Beginn der Internalisierung wieder. Die 2 und 5 min-Banden spiegeln die Menge der nach diesen Zeitpunkten internalisierten Tfr wieder. Vergleicht man die Zeitreihen der OCRL^{WT}-, OCRL^{R493A/R500T}- und CAT-CV1-Zellen miteinander, ist kein Unterschied in der Tfr-Internalisierung zu erkennen. Diese Beobachtung konnte nach densitometrischer Quantifizierung der Bandenintensitäten nach 2 und 5 min bestätigt werden.

Das abgebildete Balkendiagramm stellt die relative Menge an internalisierten TfR von OCRL^{WT}- und OCRL^{R493A/R500T}-CV1-Zellen prozentual zur CAT-überexprimierenden Zelllinie dar; es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied (Abb. 5.2 B).

Zur Berechnung der TfR-Internalisierungsrate wurde der densitometrisch ermittelte 0 min-Wert auf 100 % gesetzt, da dieser die maximal mögliche Menge an internalisierbaren TfR repräsentiert. Nach Berechnung des prozentualen Anteils an internalisierten TfR nach 2 und 5 min wurde die mittlere TfR-Internalisierungsrate gebildet und im abgebildeten Balkendiagramm dargestellt (Abb. 5.2 C). Die berechneten Internalisierungsraten von ca. 16 %/min für OCRL^{WT}-, 15 %/min für OCRL^{R493A/R500T}- und 13 %/min für CAT-CV1-Zellen sind miteinander vergleichbar.

5.1.3 Unterdrückung der Translation des OCRL-Proteins in HeLa-Zellen durch eine *OCRL*-spezifische siRNA

Nach stabiler Überexpression der OCRL-Proteinvarianten konnte keine veränderte Tf-Internalisierung detektiert werden. Um die Auswirkung der bei LS vorliegenden OCRL-Defizienz auf endozytotische Transportwege zu untersuchen, sollte ein stabiles, reproduzierbares Modellsystem entwickelt werden. Die bisher verwendeten primären Hautfibroblastenlinien von Patienten mit LS (Najm, 2009) wiesen aufgrund zahlreicher Subkultivierungen bereits sehr langsames Wachstum sowie starke Wachstumsschwankungen untereinander auf und waren daher für viele der geplanten Versuche nicht einsetzbar.

Durch Transfektion einer immortalisierten Zelllinie mit einer *OCRL*-spezifischen siRNA sollte daher ein transientes System der OCRL-Depletion erzeugt werden (*OCRL knockdown*). Als Zelllinie wurden HeLa-Zellen ausgewählt, da diese einfach zu kultivieren und zu transfizieren sind. Zudem enthalten sie kein endogenes INPP5B, das als kompensatorische Inositol-Polyphosphat 5-Phosphatase bei OCRL-Defizienz gilt (Cui et al., 2010). Die verwendete siRNA erkennt einen 19 Bp langen Abschnitt von 1601 bis 1619 Bp der *OCRL*-cDNA-Sequenz, die für das C-terminale Ende der Phosphatase-Domäne kodiert. Zur Kontrolle des *OCRL knockdowns* (*OCRL KD*) auf Spezifität und Bestimmung der optimalen Transfektionsbedingungen wurde die *OCRL*-spezifische siRNA für 48 bzw. 72 h in HeLa-Zellen transient transfiziert. Als Transfektionskontrolle wurde in einem parallelen Ansatz eine für das Grün-fluoreszierende Protein- (*green fluorescent protein*; GFP) oder für das Kernprotein Lamin A- (nicht gezeigt) spezifische siRNA transfiziert. Zur Detektion des OCRL-Proteinlevels wurden die Zelllysate nach Western-Blot in der Immundetektion mit einem anti-OCRL-Antikörper untersucht. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen einen Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitor (GDI) verwendet (Abb. 5.3 A).

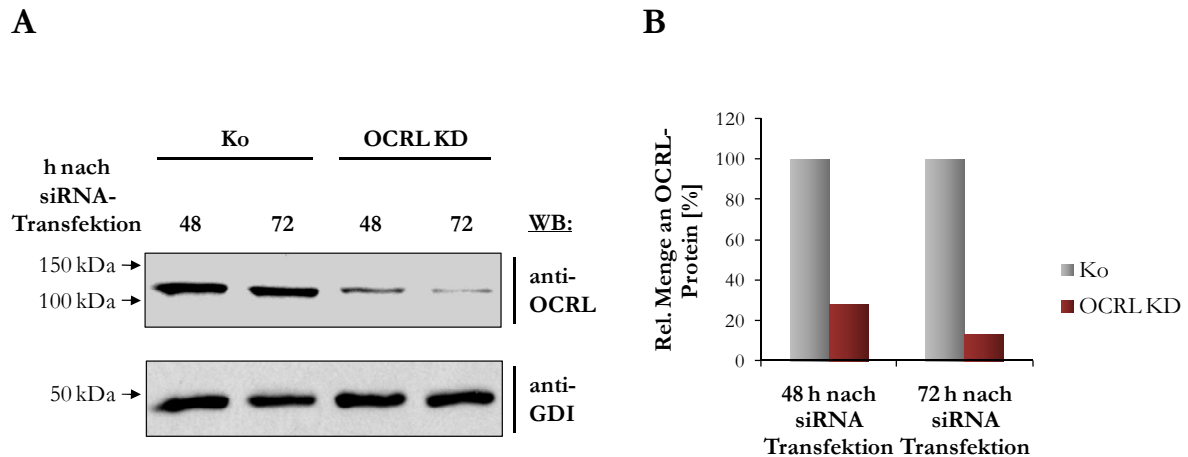


Abb. 5.3: Optimierung der OCRL-Depletion durch eine OCRL-spezifische siRNA. (A) Zur Ermittlung der maximal zu erzielenden Effizienz einer OCRL-Depletion mittels siRNA wurden HeLa-Zellen für 48 bzw. 72 h mit einer OCRL-spezifischen siRNA (OCRL KD) transfiziert. Als Transfektionskontrolle wurde eine GFP-spezifische siRNA (Ko) verwendet. Nach Lyse der Zellen wurde nach Western-Blot eine Immundetektion mit einem anti-OCRL-Antikörper durchgeführt. Der obere Blot zeigt die verbliebene Menge an OCRL. Im unteren Blot ist die Menge an GDI zu sehen, das als Ladekontrolle verwendet wurde. Links neben den Blots sind die Molekulargewichte des verwendeten Massenstandards abgebildet. (B) Darstellung der relativen Menge an OCRL nach siRNA-Transfektion. Zur Berechnung wurde die densitometrisch ermittelte Menge an OCRL auf die GDI-Menge normalisiert und der prozentual verbliebene Anteil an OCRL in OCRL-depletierten Zellen relativ zu den Kontrollzellen berechnet. WB: Western-Blot.

Der Einsatz von OCRL-spezifischer siRNA erzeugte im Vergleich zu den Kontrollzellen eine starke OCRL-Depletion, wobei diese nach 72 h am effektivsten war. Nach densitometrischer Quantifizierung der Bandenintensitäten konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Die relative Menge des OCRL-Proteins betrug nach 48 h siRNA-Transfektion ca. 28 % im Vergleich zu den Kontrollzellen, wogegen sie nach 72 h bei nur noch 13 % lag (Abb. 5.3 B). Für die im Folgenden beschriebenen funktionellen Analysen wurde daher, sofern nicht anders beschrieben, eine siRNA-Transfektion von 72 h in HeLa-Zellen vorgenommen. Zudem wurde bei jedem nachfolgenden Experiment die Effizienz der siRNA-vermittelten OCRL-Depletion mit einem anti-OCRL-Antikörper in der Immundetektion sichergestellt.

5.1.4 Zelloberflächenbiotinylierung des TfR zur Bestimmung des Plasmamembran-Anteils in OCRL-depletierten HeLa-Zellen

Nach Etablierung der OCRL-Depletion mittels siRNA sollte nun durch Verwendung der Zelloberflächenbiotinylierung geklärt werden, ob ein transienter OCRL KD einen Einfluss auf die Rezeptor-vermittelte Tf-Endozytose hat. Zunächst wurde der Anteil an TfR an der Plasmamembran bestimmt. Dazu wurden HeLa-Zellen nach Transfektion mit OCRL- bzw. GFP-spezifischer siRNA an der Zelloberfläche mit Zellmembran-undurchlässigem Biotin markiert. Nach Lyse der Zellen wurden die biotinylierten, Plasmamembran-ständigen TfR präzipitiert. Anschließend wurden das Präzipitat und das Rohlysat in der Immundetektion durch Verwendung eines anti-TfR-Antikörpers untersucht. Die repräsentativen Blots in Abb. 5.4 A zeigen keinen optischen Unterschied in der Bandenstärke zwischen OCRL KD- und Kontrollzellen. Zur Bestimmung der TfR-Menge an der Zelloberfläche wurde eine densitometrische Quantifizierung der

Bandenintensitäten durchgeführt. Die relative Menge von Plasmamembran-ständigen TfR nach OCRL KD wurde aus fünf voneinander unabhängig durchgeführten Zelloberflächenbiotinylierungen prozentual zu den Kontrollzellen bestimmt und ist im abgebildeten Balkendiagramm dargestellt (Abb. 5.4 B). Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen OCRL KD- und Kontrollzellen detektiert.

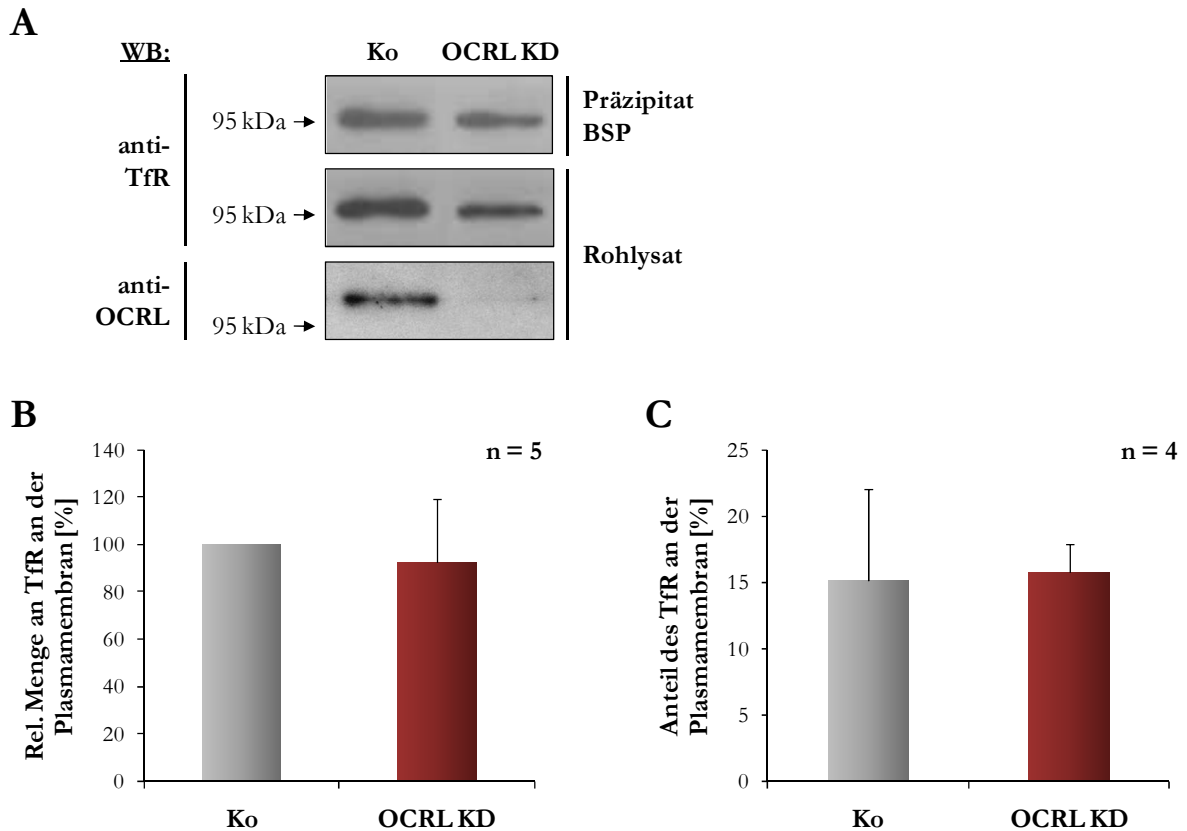


Abb. 5.4: Bestimmung des Anteils an Plasmamembran-ständigen TfR in *OCRL*- bzw. *GFP*-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen durch Zelloberflächenbiotinylierung. HeLa-Zellen wurden für 72 h mit *OCRL*- (*OCRL* KD) bzw. *GFP*-spezifischer siRNA als Kontrolle (Ko) transfiziert. Anschließend wurde eine Zelloberflächenbiotinylierung durchgeführt. Nach Entfernung von ungebundenem Biotin, Lyse der Zellen und Präzipitation der biotinylierten Oberflächenproteine mit Streptavidin wurden Präzipitat (oberer Blot) und Rohlysate (mittlerer Blot) nach Western-Blot mittels Immundetektion mit einem anti-TfR-Antikörper analysiert. Die Effizienz der siRNA-Transfektion wurde im Rohlysate durch Western-Blot und Immundetektion mit einem anti-OCRL-Antikörper überprüft (unterer Blot). Die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards sind auf der linken Seite der Blots abgebildet. Die gezeigten Blots stellen repräsentative Ergebnisse von fünf voneinander unabhängig durchgeführten Biotinylierungsversuchen dar, deren quantitative Auswertung in den abgebildeten Balkendiagrammen dargestellt ist. In **(A)** wurde die relative TfR-Menge an der Zelloberfläche nach OCRL KD prozentual zu den Kontrollzellen ermittelt, indem die densitometrisch bestimmte Menge des Zelloberflächen-TfR im Präzipitat auf die Gesamt-TfR-Menge im Rohlysate normalisiert und ein Mittelwert mit Standardabweichung gebildet wurde. In **(B)** wurde der absolute TfR-Anteil an der Plasmamembran im Verhältnis zur Gesamtmenge berechnet. Dazu wurden Präzipitat und Rohlysate aus vier von fünf Versuchen für eine direkte Vergleichbarkeit nebeneinander aufgetragen und unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren der prozentuale Anteil des TfR an der Plasmamembran mit dazugehöriger Standardabweichung ermittelt und im Balkendiagramm dargestellt. BSP: Biotin-Streptavidin-Präzipitation, WB: Western-Blot.

Um zusätzlich die absolute Menge an Zelloberflächen-ständigen TfR im Verhältnis zur Gesamtmenge des TfR zu ermitteln, wurden Präzipitat und Rohlysate aus vier von fünf Versuchen für eine direkte Vergleichbarkeit nebeneinander aufgetragen und densitometrisch vermessen. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren wurde der prozentuale TfR-Anteil an der

Plasmamembran im Verhältnis zur TfR-Gesamtmenge berechnet. Das Balkendiagramm zeigt eine vergleichbare, absolute Menge an Zelloberflächen-ständigen TfR von ca. 15 % in den Kontrollzellen und ca. 16 % in den OCRL KD-Zellen (Abb. 5.4 C).

5.1.5 Quantifizierung der relativen Internalisierung und Bestimmung der Internalisierungsrate des TfR in OCRL-depletierten HeLa-Zellen mittels Zelloberflächenbiotinylierung

Nach Detektion einer unveränderten TfR-Menge an der Plasmamembran nach OCRL KD wurde im Folgenden die TfR-Internalisierung in OCRL-depletierten Zellen untersucht. Dazu wurden HeLa-Zellen mit *OCRL*- bzw. *GFP*-spezifischer siRNA transfiziert. Anschließend wurde eine Zelloberflächenbiotinylierung, wie unter 5.1.2 beschrieben, durchgeführt.

Die Blots in Abb. 5.5 A zeigen ein repräsentatives Ergebnis. Vergleicht man die Banden des Präzipitats von OCRL KD- und der Kontrollzellen miteinander, so scheint nach 2 und 5 min eine verminderte Internalisierung nach OCRL KD vorzuliegen. Für eine genauere Aussage wurden die Bandenintensitäten des Präzipitats und des Rohlysats densitometrisch quantifiziert, und die relative Menge an internalisierten TfR wurde für 2 (n = 5) und 5 min (n = 7) nach OCRL KD prozentual zu den Kontrollzellen bestimmt. Das abgebildete Balkendiagramm zeigt, dass kein statistisch signifikanter Unterschied in der TfR-Internalisierung zwischen OCRL KD- und Kontrollzellen vorliegt (Abb. 5.5 B). Das abgebildete Balkendiagramm in Abb. 5.5 C zeigt die mittleren TfR-Internalisierungsraten von fünf unabhängigen Zelloberflächenbiotinylierungen, die durch Einbeziehung des 0 min-Wertes berechnet wurden (siehe 5.1.2). Die mittleren TfR-Internalisierungsraten von ca. 19 %/min in den Kontrollzellen und 21 %/min in den OCRL KD-Zellen weisen keinen statistisch signifikanten Unterschied auf.

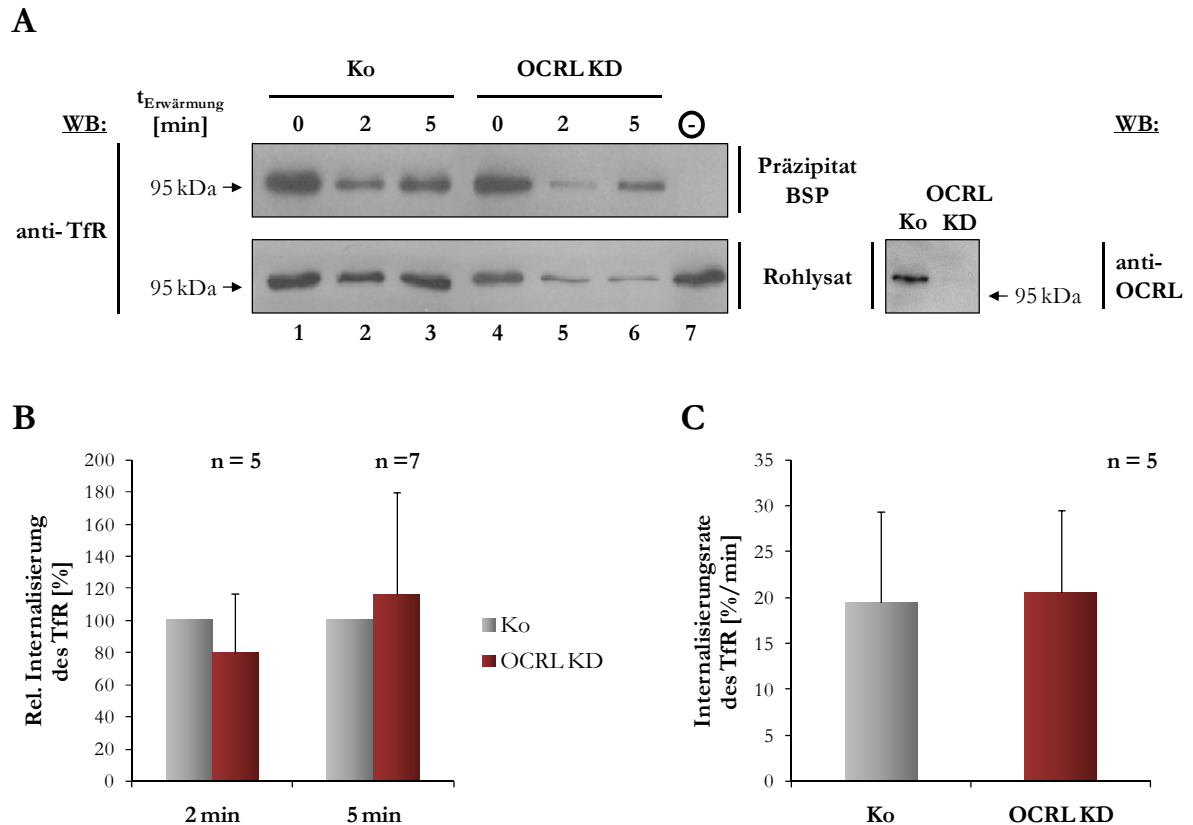


Abb. 5.5: Berechnung der relativen Internalisierung sowie der Internalisierungsrate des TfR nach Zelloberflächenbiotinylierung in OCRL-depletierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen. (A) OCRL⁻ (OCRL KD) bzw. GFP-spezifische siRNA als Kontrolle (Ko) wurde für 72 h in HeLa-Zellen transfiziert. Anschließend wurde eine Zelloberflächenbiotinylierung durchgeführt. Nach Entfernung von ungebundenem Biotin wurden die Zellen entweder sofort lysiert (Spuren 1 und 4) oder für 2 bzw. 5 min erwärmt (Spuren 2-3 und 5-6). Danach erfolgte eine Entfernung des Oberflächenbiotins durch Glutathion-Puffer und Lyse der Zellen. Zusätzlich wurde eine Kontrolle zur Effizienz des Glutathion-Puffers mitgeführt (Spur 7). Die Präzipitation biotinylierter Rezeptoren wurde mittels Streptavidin-Agarose erzielt. Präzipitat (oberer Blot) und Rohlysate (unterer Blot, links) wurden nach Western-Blot durch Immundetektion mit einem anti-TfR-Antikörper untersucht. Die Effizienz der siRNA-Transfektion wurde im Rohlysate durch Western-Blot und Immundetektion mit einem anti-OCRL-Antikörper überprüft (unterer Blot, rechts). Die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards sind in kDa auf der linken (anti-TfR) bzw. der rechten (anti-OCRL) Seite der Blots abgebildet. Die dargestellten Blots zeigen repräsentative Ergebnisse von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Biotinylierungsansätzen. **(B)** Quantitative Auswertung der relativen Internalisierung des TfR pro Zeiteinheit. Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Wert der TfR-Internalisierung nach OCRL KD mit Standardabweichung im Verhältnis zu den Kontrollzellen. Zur Berechnung wurde der densitometrisch ermittelte Wert der internalisierten TfR im Präzipitat nach 2 (n = 5) bzw. 5 min (n = 7) auf die Gesamt-TfR-Menge im Rohlysate normalisiert. **(C)** Berechnung der mittleren Internalisierungsrate. Die TfR-Menge im Präzipitat wurde auf die TfR-Menge im Rohlysate normalisiert und der prozentuale Anteil der nach 2 und 5 min internalisierten TfR im Verhältnis zum 0 min-Wert (100 %) berechnet. Nach Bildung von Mittelwert und Standardabweichung konnte die mittlere Internalisierungsrate in %/min bestimmt werden (n = 5). BSP: Biotin-Streptavidin-Präzipitation, WB: Western-Blot.

5.1.6 Zelloberflächenbiotinylierung zur Bestimmung des MPR300-Anteils an der Plasmamembran in OCRL-depletierten HeLa-Zellen

Nach OCRL KD wurde also eine normale TfR-Internalisierung beobachtet. In der Dissertation von Juliane Najm (2009) wurde dagegen eine reduzierte Internalisierung des lysosomalen Enzyms Arylsulfatase B (ASB) in primären Hautfibroblasten von Patienten mit LS beschrieben. Die ASB-Internalisierung wird wie die TfR-Internalisierung Clathrin-abhängig vermittelt und

erfolgt über den MPR300, der in der Zelle für den Transport saurer Hydrolasen zum Lysosom zuständig ist (siehe 2.5). Es sollte daher die Endozytose des MPR300 nach OCRL KD genauer untersucht werden. Dafür wurde zunächst die MPR300-Menge an der Plasmamembran bestimmt. HeLa-Zellen wurden mit *OCRL*- bzw. *GFP*-spezifischer siRNA transfiziert. Anschließend wurde eine Zelloberflächenbiotinylierung, wie unter 5.1.4 beschrieben, durchgeführt. Präzipitat und Rohlysate wurden nach Durchführung einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot durch Verwendung eines anti-MPR300-Antikörpers in der Immundetektion analysiert.

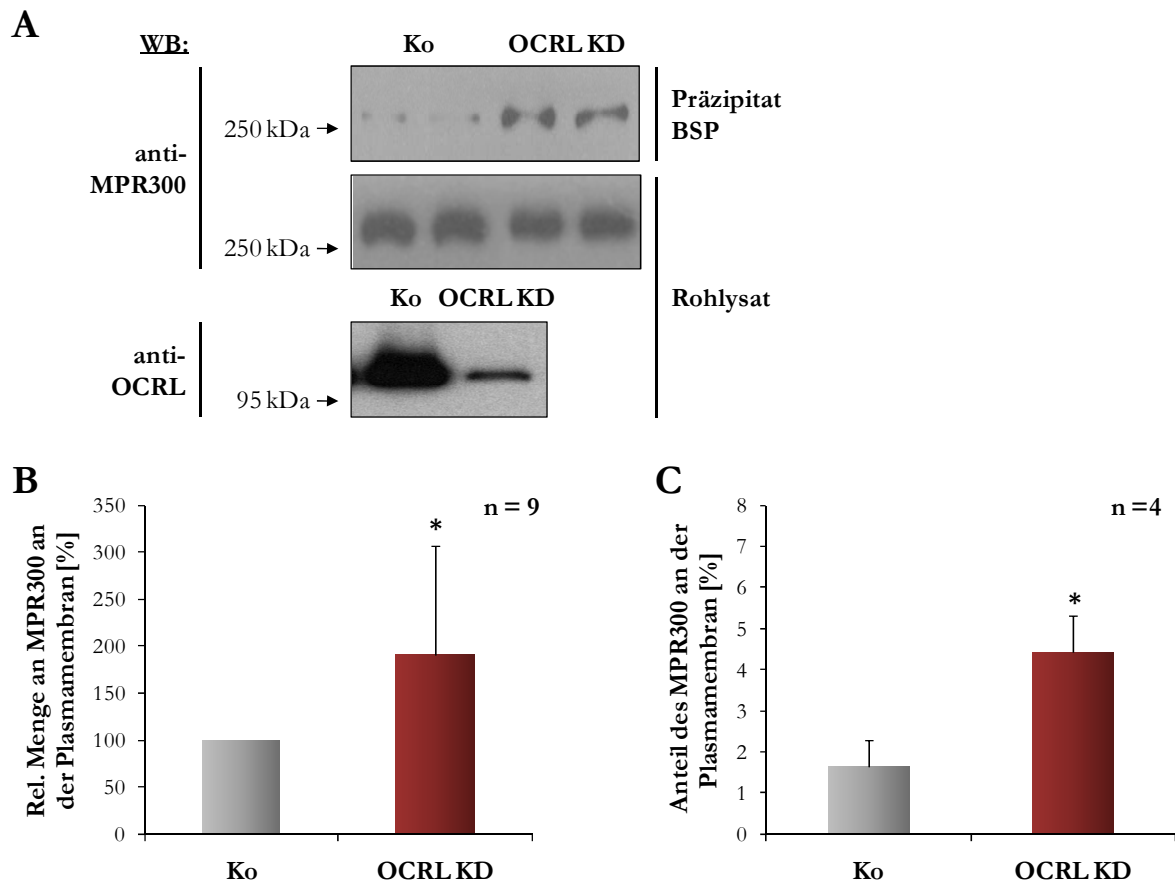


Abb. 5.6: Ermittlung des MPR300-Anteils an der Plasmamembran durch Zelloberflächenbiotinylierung von *OCRL*- bzw. *GFP*-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden für 72 h mit *OCRL*- (*OCRL* KD) bzw. *GFP*-spezifischer siRNA als Kontrolle (Ko) transfiziert. Im Anschluss erfolgte eine Zelloberflächenbiotinylierung. Nach Entfernung von ungebundenem Biotin, Lyse der Zellen und Präzipitation der biotinylierten Oberflächenproteine mit Streptavidin, wurden Präzipitat (oberer Blot) und Rohlysate (mittlerer Blot) nach Western-Blot mittels Immundetektion mit einem anti-MPR300-Antikörper analysiert. Die Effizienz der siRNA-Transfektion wurde im Rohlysate durch Western-Blot und Immundetektion mit einem anti-OCRL-Antikörper überprüft (unterer Blot). Die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards sind auf der linken Seite der Blots abgebildet. Die gezeigten Blots stellen repräsentative Ergebnisse von neun voneinander unabhängig durchgeführten Biotinylierungsversuchen dar, deren quantitative Auswertung in den abgebildeten Balkendiagrammen dargestellt ist. **(A)** zeigt die relative Menge des MPR300 an der Zelloberfläche. Die densitometrisch ermittelte Menge des Zelloberflächen-MPR300 im Präzipitat wurde auf die Gesamt-MPR300-Menge im Rohlysate normalisiert. Die mittlere Menge an Zelloberflächen-MPR300 in *OCRL*-depletierten Zellen ist relativ zu den Kontrollzellen prozentual mit errechneter Standardabweichung dargestellt. In **(B)** wurde der absolute Anteil der MPR300 an der Plasmamembran im Verhältnis zur Gesamtmenge berechnet. Präzipitat und Rohlysate aus vier von neun Versuchen wurden für eine direkte Vergleichbarkeit nebeneinander aufgetragen und unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren der prozentuale Anteil des MPR300 an der Plasmamembran mit dazugehöriger Standardabweichung berechnet. BSP: Biotin-Streptavidin-Präzipitation, WB: Western-Blot, *: $p < 0,05$.

In Abb. 5.6 A sind repräsentative anti-MPR300-Blots abgebildet. Im Präzipitat sind die Bandenintensitäten in den Kontrollzellen deutlich schwächer als nach OCRL KD. Die densitometrische Quantifizierung der Bandenintensitäten von Präzipitat und Rohlysate bestätigte diese Beobachtung (Abb. 5.6 A). Die im Balkendiagramm wiedergegebene, relative MPR300-Menge an der Zelloberfläche aus neun voneinander unabhängig durchgeführten Zelloberflächenbiotinylierungen zeigt im Vergleich zu den Kontrollzellen, dass in OCRL-depletierten Zellen etwa die doppelte Menge an MPR300 an der Plasmamembran lokalisiert ist. Diese Beobachtung ist statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Zudem wurde die absolute Menge an Zelloberflächen-ständigen MPR300 im Verhältnis zur Gesamtmenge des MPR300 bestimmt (siehe 5.1.4). Die densitometrische Quantifizierung der Bandenintensitäten aus vier von neun Versuchen ergab einen absoluten MPR300-Anteil an der Plasmamembran von 2 % in den Kontrollzellen (Abb. 5.6 B). Nach OCRL KD kam es dagegen zu einer Erhöhung des Anteils an Plasmamembran-ständigen MPR300 auf ca. 4 %, was einem statistisch signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollzellen entspricht ($p < 0,05$).

5.1.7 Quantitative Untersuchungen zur Internalisierung des MPR300 in OCRL-depletierten HeLa-Zellen mittels Zelloberflächenbiotinylierung

Nach OCRL KD konnte bereits eine erhöhte Menge an Plasmamembran-ständigen MPR300 detektiert werden. Mithilfe der Zelloberflächenbiotinylierung sollte daraufhin geklärt werden, ob es ebenfalls zu einer vermehrten Internalisierung des MPR300 in OCRL-depletierten Zellen kommt. Nach Transfektion mit OCRL- bzw. GFP-spezifischer siRNA wurden HeLa-Zellen, wie unter 5.1.2 beschrieben, einer Zelloberflächenbiotinylierung unterzogen. Die Detektion des MPR300 erfolgte durch Verwendung eines anti-MPR300-Antikörpers in der Immundetektion (siehe 5.1.6). Repräsentative anti-MPR300-Blots der Präzipitate und Rohlysate sind in Abb. 5.7 A abgebildet. Nach 2 und 5 min MPR300-Internalisierung scheint die Bandenintensität im Präzipitat nach OCRL KD im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht zu sein. Diese Beobachtung wurde durch densitometrische Quantifizierung der Bandenintensitäten von Präzipitaten und Rohlysaten bestätigt. Die relative Menge an nach 2 ($n = 6$) und 5 min ($n = 9$) internalisierten MPR300 nach OCRL KD wurde prozentual zu den Kontrollzellen bestimmt. Das abgebildete Balkendiagramm zeigt nach 2 min eine Verdopplung bzw. nach 5 min eine Verdreifachung der MPR300-Internalisierung nach OCRL KD im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 5.7 B). Diese Zunahme der MPR300-Internalisierung ist statistisch signifikant ($p < 0,05$). Aus drei voneinander unabhängigen Zelloberflächenbiotinylierungen wurde die mittlere Internalisierungsrate des MPR300 berechnet (siehe 5.1.2). Das Balkendiagramm in Abb. 5.7 C zeigt eine MPR300-Internalisierungsrate von ca. 13 %/min nach OCRL KD, was einem statistisch signifikanten Unterschied zu der in den Kontrollzellen ermittelten Rate von ca. 9 %/min entspricht ($p < 0,05$).

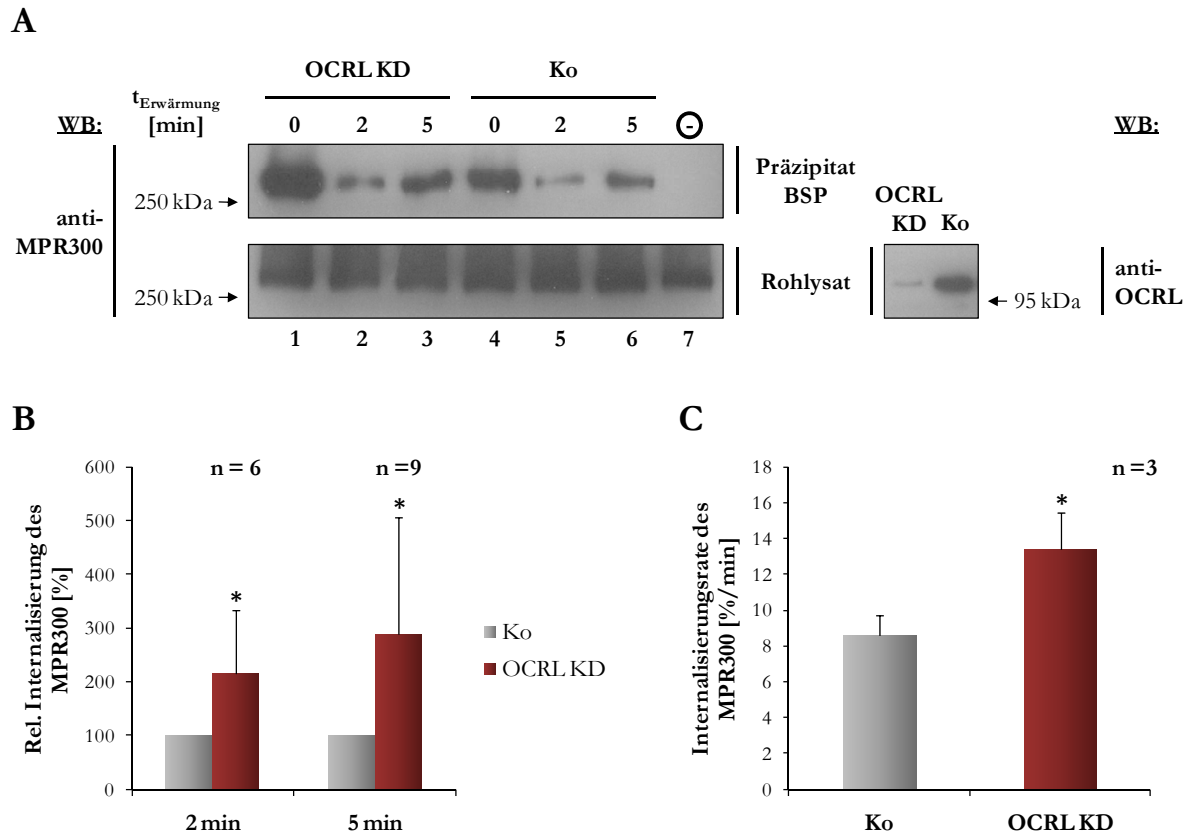


Abb. 5.7: Bestimmung der relativen Internalisierung und der Internalisierungsrate des MPR300 in *OCRL*- bzw. *GFP*-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen mittels Zelloberflächenbiotinylierung. (A) Nach 72-stündiger Transfektion mit *OCRL*- (*OCRL* KD) bzw. *GFP*-spezifischer siRNA als Kontrolle (Ko) in HeLa-Zellen wurde eine Zelloberflächenbiotinylierung durchgeführt. Nach Entfernung von ungebundenem Biotin wurden die Zellen entweder sofort lysiert (Spuren 1 und 4) oder für 2 bzw. 5 min erwärmt (Spuren 2-3 und 5-6). Das Zelloberflächenbiotin wurde durch Zugabe von Glutathion-Puffer entfernt und die Zellen lysiert. Zusätzlich wurde eine Kontrolle mitgeführt (Spur 7). Die Präzipitation der biotinylierten Rezeptoren wurde mittels Streptavidin-Agarose erzielt. Präzipitat (oberer Blot) und Rohlysate (unterer Blot, links) wurden nach Western-Blot durch Immundetektion mit einem anti-MPR300-Antikörper untersucht. Die Effizienz der siRNA-Transfektion wurde im Rohlysate durch Western-Blot und Immundetektion mit einem anti-OCRL-Antikörper überprüft (unterer Blot, rechts). Die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards sind in kDa auf der linken (anti-MPR300) bzw. der rechten (anti-OCRL) Seite der Blots abgebildet. Die dargestellten Blots zeigen repräsentative Ergebnisse von drei unabhängig voneinander durchgeführten Biotinylierungsansätzen. (B) Quantitative Auswertung der relativen Internalisierung des MPR300 für 2 (n = 6) und 5 min (n = 9). Im Balkendiagramm ist der prozentuale Wert der MPR300-Internalisierung nach *OCRL* KD im Verhältnis zu den Kontrollzellen mit Standardabweichung dargestellt. Zur Berechnung wurden die densitometrisch ermittelten Werte der internalisierten MPR300 im Präzipitat auf die Gesamt-MPR300-Menge im Rohlysate normalisiert. (C) Berechnung der mittleren Internalisierungsrate. Die Menge des MPR300 im Präzipitat wurde auf die Menge des MPR300 im Rohlysate normalisiert. Im Verhältnis zum 0 min-Wert wurde der prozentuale Anteil der nach 2 und 5 min internalisierten MPR300 berechnet. Nach Bildung von Mittelwert und Standardabweichung konnte die mittlere Internalisierungsrate in %/min bestimmt (n = 3). BSP: Biotin-Streptavidin-Präzipitation, WB: Western-Blot, *: p<0,05.

5.2 Untersuchungen verschiedener Transportwege des M6P-Rezeptors in OCRL-depletierten Zellen

5.2.1 Biochemische Quantifizierung der MPR300-Proteinmenge in OCRL-depletierten HeLa-Zellen

Die veränderte Endozytose des MPR300, nicht jedoch des TfR, lässt auf einen Einfluss des OCRL-Proteins auf den MPR300-Transportweg schließen. In weiterführenden Versuchen sollte nun der gesamte MPR300-Transportweg untersucht werden, um die Funktion von OCRL in diesem Transportprozess zu klären. Der Anstieg der MPR300-Menge an der Zelloberfläche kann beispielsweise durch eine veränderte Gesamtmenge oder Lebenszeit des MPR300 nach OCRL KD bedingt sein. Zur Bestimmung der MPR300-Proteinmenge wurden HeLa-Zellen mit *OCRL*- bzw. *GFP*-spezifischer siRNA transfiziert und das Zelllysats anschließend in der Immundetektion mit einem anti-MPR300-Antikörper untersucht. Als Ladekontrolle wurde Tubulin mit einem anti-Tubulin-Antikörper detektiert.

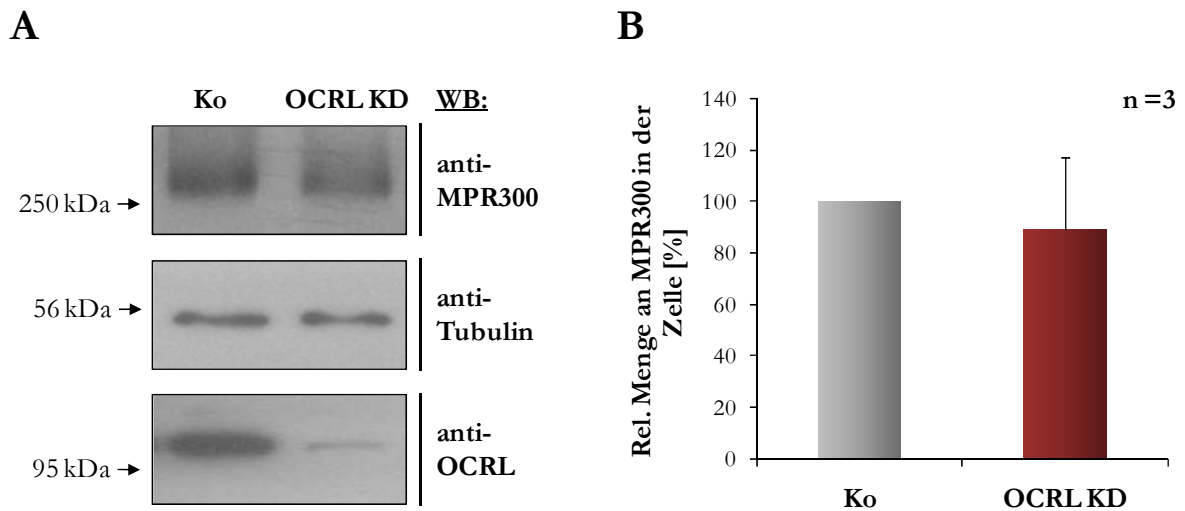


Abb. 5.8: Quantifizierung der MPR300-Proteinmenge in *OCRL*- bzw. *GFP*-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen. (A) HeLa-Zellen wurden für 72 h mit *OCRL*- (OCRL KD) bzw. *GFP*-spezifischer siRNA als Kontrolle (Ko) transfiziert und anschließend lysiert. Die abgebildeten Blots zeigen die Menge an MPR300 (oberer Blot), Tubulin (mittlerer Blot) und OCRL (unterer Blot) nach Western-Blot und Immundetektion mit entsprechend spezifischen Antikörpern. (B) Quantifizierung der relativen Menge an zellulären MPR300 aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Der MPR300-Wert wurde gegen Tubulin normalisiert und die mittlere Menge an zellulärem MPR300 nach OCRL KD prozentual zu den Kontrollzellen mit dazugehöriger Standardabweichung berechnet.

In den abgebildeten Blots ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Ergebnissen dargestellt (Abb. 5.8 A). Die Bandenintensitäten des MPR300-Blots und der Ladekontrolle wurden densitometrisch quantifiziert. Das Balkendiagramm zeigt die relative Gesamtmenge des MPR300 nach OCRL KD prozentual zu den Kontrollzellen (n = 3); sie weist keinen statistisch signifikanten Unterschied auf (Abb. 5.8 B).

5.2.2 Berechnung der Halbwertszeit des MPR300 in OCRL-depletierten HeLa-Zellen

Da keine veränderte Gesamtmenge des MPR300 in OCRL-depletierten Zellen vorliegt, sollte die Lebensdauer neu-synthetisierter MPR300 ermittelt werden. Hierzu wurde ein *pulse-chase* Experiment mit dem radioaktiven Schwefel-Isotop ^{35}S zur Bestimmung der MPR300-Halbwertszeit durchgeführt. HeLa-Zellen wurden mit OCRL- bzw. GFP-spezifischer siRNA transfiziert. Noch vor Erreichen des Maximums der OCRL-Depletion wurden die Zellen für eine *pulse*-Phase von 1 h mit ^{35}S -markiertem Cys/Met zur radioaktiven Markierung neu-synthetisierter Proteine versetzt. Anschließend erfolgte eine *chase*-Phase durch Inkubation mit „kaltem“ Cys/Met für unterschiedliche Zeitpunkte. Nach 3 h wurde der erste Zeitpunkt durch Lyse der Zellen gestoppt. Dieser Zeitpunkt wurde als 0 h-Wert angesehen, da eine Abnahme bestimmt werden sollte und neu-synthetisierte, radioaktiv-markierte Proteine erst zu diesem Zeitpunkt ihr Maximum erreicht hatten. Nach Kollektion aller weiteren *chase*-Zeiten wurde der MPR300 mit einem anti-MPR300-Antikörper aus dem Rohlysate präzipitiert. Nach Durchführung einer SDS-PAGE mit dem Präzipitat wurde das Gel in einer Speicher-Phosphor-Kassette exponiert. Die Auswertung erfolgte mit einem *Phosphor-Imager*. In Abb. 5.9 A ist ein digitales Bild einer *Phosphor-Imager*-Analyse abgebildet, das ein repräsentatives Ergebnis zweier unabhängig voneinander, in Doppelbestimmung durchgeführter Halbwertszeit-Experimente darstellt. Die detektierten Banden spiegeln die Menge an radioaktiv-markiertem MPR300 wider. Sowohl in den Kontrollzellen als auch nach OCRL KD ist eine konstante Abnahme von ^{35}S -MPR300 mit zunehmender *chase*-Zeit zu erkennen. Einzige Ausnahme ist die erste 0 h-Bande nach OCRL KD. Hier ist die Bandenintensität im Verhältnis zur 15 h-Bande vermindert. Da dies auf einen technischen Fehler zurückzuführen war, wurde dieser Wert in der weiteren quantitativen Analyse nicht berücksichtigt.

Zur Bestimmung der Abbaurate des MPR300 wurden die Banden des *Phosphor-Imager*-Bildes densitometrisch vermessen. Der 0 h-Wert wurde als maximal mögliche Menge an MPR300 gesehen. Nach Berechnung des prozentualen MPR300-Anteils nach unterschiedlichen *chase*-Zeiten wurde dieser logarithmisch aufgetragen und so die Konstanten der Abbaurate ermittelt (Abb. 5.9 B). Diese Konstanten dienten dann zur Berechnung der MPR300-Halbwertszeiten. Das abgebildete Balkendiagramm zeigt eine Halbwertszeit von etwa 16 h in den Kontrollzellen und einen statistisch nicht signifikanten Anstieg auf etwa 20 h in OCRL-depletierten Zellen (Abb. 5.9 C).

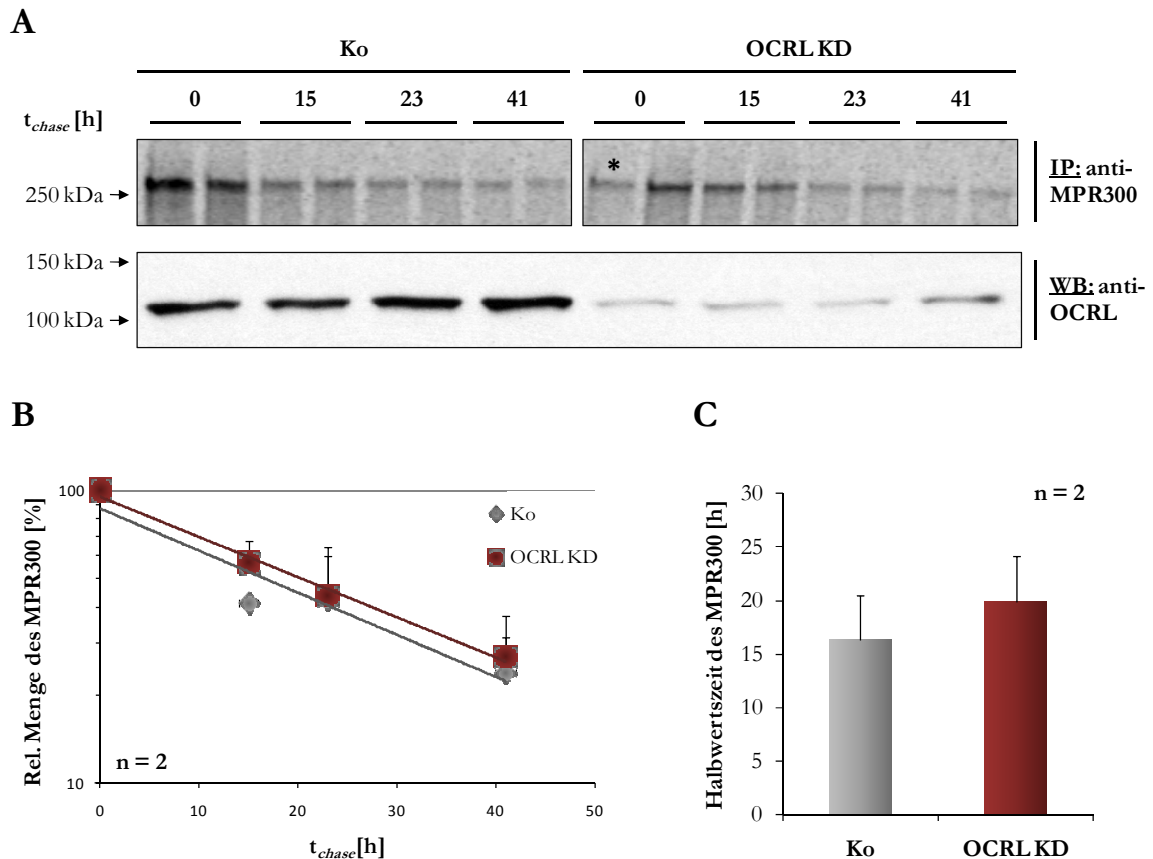


Abb. 5.9: Berechnung der Halbwertszeit des MPR300 in OCRL- bzw. GFP-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen. (A) HeLa-Zellen wurden mit OCRL- (OCRL KD) bzw. GFP-spezifischer siRNA als Kontrolle (Ko) transfiziert. Noch vor Erreichen des Maximums der OCRL-Depletion wurden die Zellen für eine *pulse*-Phase von 1 h mit 35 S-markiertem Cys/Met inkubiert. Danach erfolgte eine *chase*-Phase für 3–44 h mit „kaltem“ Cys/ Met und anschließende Lyse der Zellen. Aufgrund des Synthese-Maximums der radioaktiv-markierten Proteine nach 3 h wurde dieser Wert als 0 h-Wert betrachtet. Der MPR300 wurde mit einem anti-MPR300-Antikörper aus dem Rohlysate präzipitiert. Nach Durchführung einer SDS-Page wurde das Gel nach Trocknung und Platzierung in einer Speicher-Phosphor-Kassette im *Phosphor-Imager* ausgewertet. Das digitale, obere Bild zeigt die jeweils vorhandene Menge an radioaktiv-markiertem MPR300 in den Zellen nach entsprechender *chase*-Zeit und stellt ein repräsentatives Ergebnis aus zwei voneinander unabhängig in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten dar. Im unteren Blot wurde das Rohlysate nach Western-Blot mittels Immundetektion mit einem anti-OCRL-Antikörper untersucht. Die Molekulargewichte des verwendeten Massenstandards sind auf der linken Seite der Blots aufgeführt. Die mit * markierte Bande wurde nicht für die quantitative Auswertung verwendet. (B) Berechnung der Abbaurate des MPR300. Das digitale Bild des *Phosphor-Imagers* wurde densitometrisch ausgewertet. Der prozentual verbliebene Anteil an radioaktiv-markiertem MPR300 in den Zellen wurde mit dazugehöriger Standardabweichung relativ zum 0 min-Wert (100 %) bestimmt und im abgebildeten Diagramm mit logarithmischer Skalierung aufgetragen. So konnten die jeweiligen Konstanten der Abbauraten berechnet werden. (C) Halbwertszeit des MPR300. Mithilfe der errechneten Konstanten der Abbauraten konnte die MPR300-Halbwertszeit ermittelt werden. Das Diagramm zeigt die mittlere MPR300-Halbwertszeit der OCRL KD- und Kontrollzellen mit errechneter Standardabweichung. IP: Immunpräzipitation, WB: Western-Blot.

5.2.3 Immunzytochemische Analysen zur subzellulären Lokalisation des MPR300 nach OCRL-Depletion in HeLa-Zellen

Sowohl Proteinmenge als auch Lebensdauer des MPR300 in OCRL-depletierten Zellen waren mit denen der Kontrollzellen vergleichbar. Daher sollte im Folgenden die subzelluläre Verteilung des endogenen MPR300 mittels immunzytochemischer Färbungen analysiert werden. Hierfür wurden HeLa-Zellen nach Transfektion mit OCRL- bzw. GFP-spezifischer siRNA fixiert

und zur Detektion des MPR300 mit einem anti-MPR300-Antikörper, gefolgt von einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper behandelt (MPR300, grün). Die Anfärbung der DNA erfolgte mittels DAPI (blau). Die Immunfluoreszenzpräparate wurden mit einem cLSM ausgewertet. In Abb. 5.10 A sind je zwei repräsentative Aufnahmen abgebildet. Der MPR300 weist in den Kontrollzellen eine typische, in der Literatur beschriebene perinukleäre Verteilung auf. Nach OCRL KD liegt dagegen eine weniger kompakte Verteilung des MPR300 in zum Teil stark vergrößerten vesikulären Strukturen (weiße Pfeile) vor. Dieser qualitative Unterschied konnte quantitativ durch Anwendung des Metamorph-Programms bestätigt werden, indem Kontrollzellen und Zellen nach OCRL KD mit identischer Vergrößerung und Laser-Stärke aufgenommen wurden ($n = 20$) und der Anteil der Vesikel innerhalb einer willkürlich gewählten Vesikelgrößenverteilung pro Zelle bestimmt wurde. Das Ergebnis im abgebildeten Balkendiagramm zeigt für die OCRL-depletierten Zellen einen deutlich erhöhten Vesikel-Anteil innerhalb der arbiträren Vesikelgrößen 61-80 und ≥ 81 im Vergleich zu den Kontrollzellen, wogegen der Anteil von Vesikeln der Größe ≤ 40 stark vermindert ist (Abb. 5.10 B). Diese detektierten Unterschiede sind höchst signifikant ($p < 0,001$).

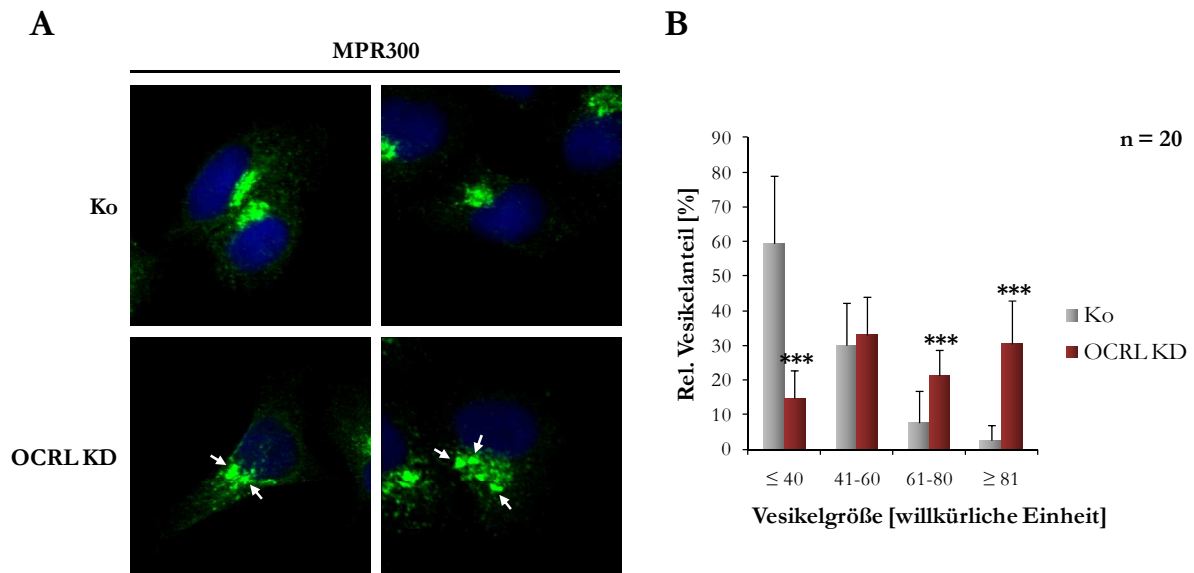


Abb. 5.10: Subzelluläre Verteilung des MPR300 in OCRL- bzw. GFP-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen. **(A)** Nach Transfektion von HeLa-Zellen mit OCRL- (OCRL KD) bzw. GFP-spezifischer siRNA als Kontrolle (Ko) für 72 h wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzanalyse fixiert. Die Lokalisation des MPR300 wurde mit einem anti-MPR300-Antikörper, gefolgt von einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt (MPR300, grün). Die weißen Pfeile in den OCRL-depletierten Zellen weisen auf vergrößerte, MPR300-positive vesikuläre Strukturen hin. Zusätzlich wurde die DNA mit DAPI angefärbt (blau). Die Immunfluoreszenzpräparate wurden an einem cLSM ausgewertet. **(B)** Quantitative Bestimmung der relativen Größe von MPR300-positiven vesikulären Strukturen. Es wurden jeweils 20 Zellen für die Auswertung mit dem Programm Metamorph mit identischer Vergrößerung und Laserintensität aufgenommen. Pro Zelle wurde die Größe von 29 Vesikeln vermessen und der mittlere Anteil der Vesikel innerhalb einer willkürlich gewählten Vesikelgrößenverteilung durch Bildung der Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt. ***: $p < 0,001$.

5.2.4 Untersuchungen zur Kolokalisation des MPR300 mit Markerproteinen subzellulärer Zellkompartimente

Zur Charakterisierung der vergrößerten, MPR300-positiven vesikulären Strukturen wurde eine immunzytochemische Kolokalisationsstudie mit den subzellulären Markerproteinen GM130 (Golgi Marker 130), TGN46 und EEA1 (*early endosomal antigen 1*) durchgeführt. Kolokalisationen können durch die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe detektiert werden. Bei räumlicher Nähe eines grün- und eines rot-markierten Proteins wird in der Überlagerung beider Proteine eine gelbe Pseudofärbung sichtbar. Dies kann dann als Hinweis für eine identische, subzelluläre Verteilung gewertet werden.

Für die Kolokalisationsstudie wurden HeLa-Zellen mit *OCRL*- bzw. *GFP*-spezifischer siRNA transfiziert und anschließend fixiert. Der MPR300 wurde über einen anti-MPR300-Antikörper detektiert, die Markerproteine durch Verwendung spezifischer Antikörper. Abb. 5.11 zeigt repräsentative Ergebnisse der am cLSM ausgewerteten Immunfluoreszenzpräparate. In Abb. 5.11 A wurde ein Alexa Fluor 488-gekoppelter Sekundärantikörper zur Visualisierung des MPR300 verwendet (MPR300, grün). Als Markerprotein des *cis* Golgi-Apparats wurde GM130 durch Verwendung eines anti-GM130-Antikörpers sowie eines Alexa Fluor 546-gekoppelten Sekundärantikörpers detektiert (Markerprotein GM130, rot). Sowohl *OCRL* KD- als auch Kontrollzellen zeigen kaum Pseudogelb-gefärbte Bereiche in der Überlagerung, wobei die Abgrenzung von MPR300-positiven und GM130-positiven Bereichen im *OCRL* KD noch deutlicher zu sein scheint. Eine Kolokalisation der beiden Proteine liegt nicht vor.

Zur Detektion einer möglichen Kolokalisation zwischen dem MPR300 und dem TGN-Marker TGN46 in Abb. 5.11 B wurde zur Darstellung des MPR300 ein Alexa Fluor 546-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet (MPR300, rot) sowie ein anti-TGN46-Antikörper, gefolgt von einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper zur Detektion von TGN46 eingesetzt (Markerprotein TGN46, grün). Die Färbung des TGN46 zeigt einen qualitativen Unterschied zwischen Kontrollzellen und *OCRL*-depletierten Zellen. Während der TGN46 in den Kontrollzellen eine typische Verteilung aufweist, die den perinukleären Golgi-Zisternen ähnelt, ist nach *OCRL* KD zusätzlich zur perinukleären Verteilung eine über das Zytoplasma verteilte, vesikuläre Lokalisation zu erkennen. Das Überlagerungsbild von Kontrollzellen und *OCRL*-depletierten Zellen weist in einigen Bereichen eine gelbe Pseudofärbung auf, was auf eine partielle Kolokalisation von MPR300 und TGN46 hindeutet.

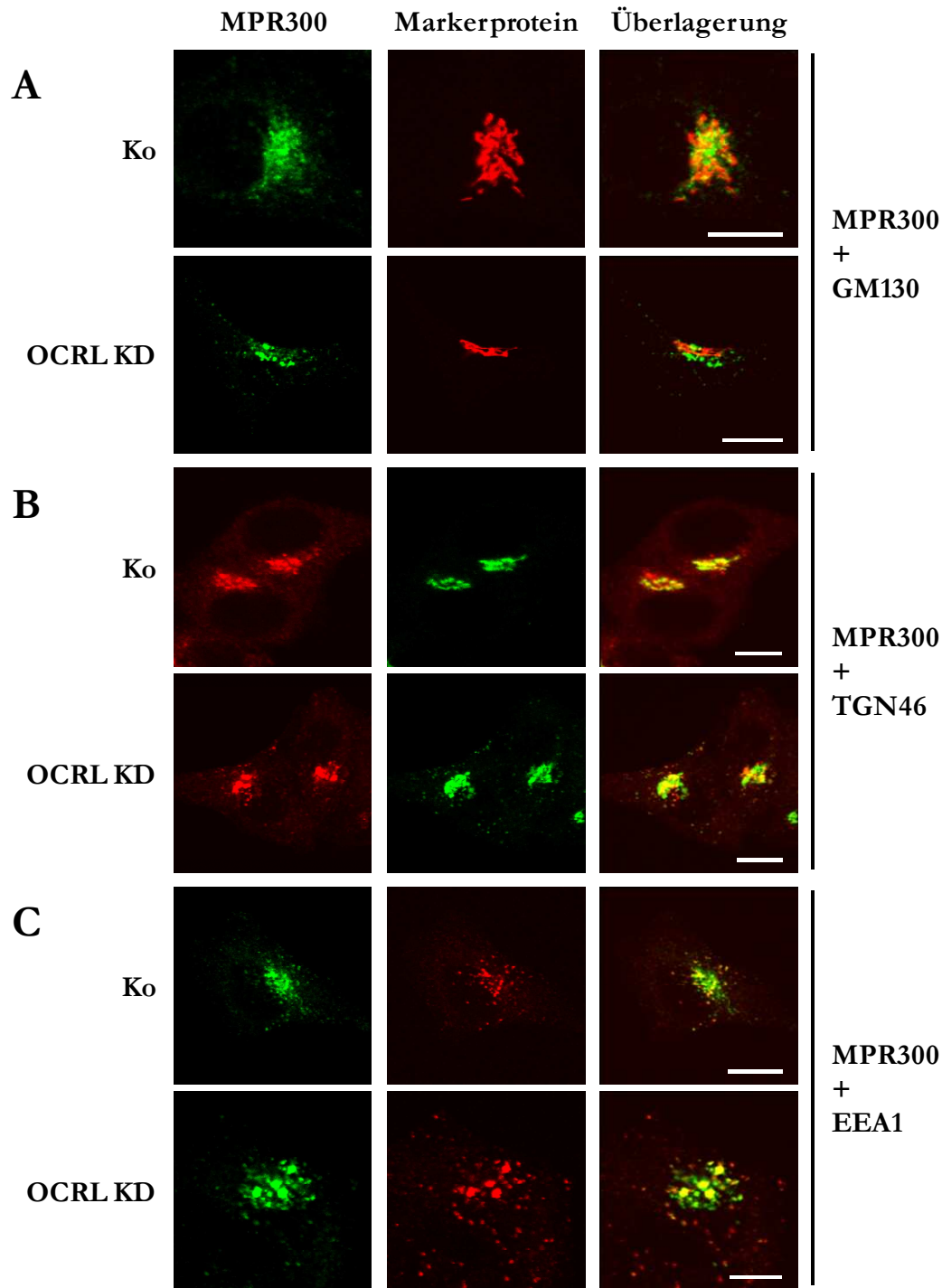


Abb. 5.11: Kolokalisationsstudien des MPR300 mit GM130, TGN46 und EEA1 in HeLa-Zellen nach *OCRL*- bzw. *GFP*-siRNA-Transfektion. HeLa-Zellen wurden für 72 h mit *OCRL*⁻ (OCRL KD) bzw. *GFP*-spezifischer siRNA als Kontrolle (Ko) transfiziert und anschließend für eine Immunfluoreszenzanalyse fixiert. Der MPR300 wurde durch Verwendung eines anti-MPR300-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488- [(A; C), MPR300, grün] bzw. Alexa Fluor 546-gekoppelten [(B), MPR300, rot] Sekundärantikörpers detektiert. Zusätzlich wurde die Verteilung von GM130 durch Verwendung eines anti-GM130-Antikörpers, gefolgt von einem Alexa Fluor 546-gekoppelten Sekundärantikörpers [(A), Markerprotein GM130, rot], von TGN46 durch Verwendung eines anti-TGN46-Antikörpers, gefolgt von einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörpers [(B), Markerprotein TGN46, grün] sowie von EEA1 durch Verwendung eines anti-EEA1-Antikörpers, gefolgt von einem Alexa Fluor 546-gekoppelten Sekundärantikörpers [(C), Markerprotein EEA1, rot] dargestellt. In der Überlagerung weisen pseudogelbe Färbungen auf eine Kolokalisation des MPR300 mit dem jeweiligen Markerprotein hin. Die Immunfluoreszenzbilder wurden an einem cLSM aufgenommen. Die weißen Balken in der Überlagerung entsprechen einer Größe von 10 μ m.

In Abb. 5.11 C sollte die räumliche Verteilung des MPR300 und des Markerproteins für frühe Endosomen, EEA1, zueinander ermittelt werden. Die Detektion des MPR300 erfolgte durch Verwendung eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörpers (MPR300, grün), die Visualisierung von EEA1 durch Verwendung eines anti-EEA1-Antikörpers, gefolgt von einem Alexa Fluor 546-gekoppelten Antikörpers (Markerprotein EEA1, rot). Im Vergleich zu den Kontrollzellen weist EEA1 nach OCRL KD eine Lokalisation an zum Teil stark vergrößerten frühen Endosomen auf. Die Kontrollzelle zeigt lediglich eine partielle Kolo-kalisation zwischen MPR300 und EEA1, belegt durch die in einigen Bereichen detektierbare gelbe Pseudofärbung in der Überlagerung. Nach OCRL KD weisen dagegen alle MPR300-positiven, vergrößerten vesikulären Strukturen eine gelbe Pseudofärbung in der Überlagerung mit EEA1 auf. Dies deutet auf eine Lokalisation des MPR300 in vergrößerten Endosomen in OCRL-depletierten Zellen hin.

Zur genaueren Bestimmung der Lokalisation des MPR300 im endosomalen Kompartiment wurden weitere Kolo-kalisationsstudien mit endosomalen Markerproteinen durchgeführt. Für den Nachweis einer möglichen Kolo-kalisation zwischen MPR300 und den Markerproteinen für frühe Endosomen, EEA1 und Rab5, dem frühen Endosomen- und Recycling Endosomen-Marker TfR sowie dem Retromer-spezifischen Markerprotein SNX1 wurden HeLa-Zellen nach Transfektion mit *OCRL*- bzw. *GFP*-spezifischer siRNA für die Immunfluoreszenzanalyse fixiert. Der MPR300 wurde durch Verwendung eines anti-MPR300-Antikörpers sowie eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörpers visualisiert (MPR300, grün). Die Markerproteine wurden mit einem anti-EEA1, anti-Rab5, anti-TfR bzw. einem anti-SNX1-Antikörper, gefolgt von einem Alexa Fluor 546-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert (Markerprotein, rot). Zur Ermittlung des Kolo-kalisationsverhaltens von MPR300 und des späten Endosomen-Markers Rab7 wurden HeLa-Zellen mit einer *OCRL*- und einer *Lamin A*-spezifischen siRNA transfiziert. Zur Detektion von Rab7 wurden die Zellen zusätzlich über Nacht mit einem Rab7-GFP-Konstrukt transfiziert. Der MPR300 wurde durch Verwendung eines anti-MPR300-Antikörpers sowie eines Alexa Fluor 546-gekoppelten Sekundärantikörpers visualisiert (MPR300, grün).

Die Immunfluoreszenzpräparate wurden am cLSM ausgewertet. Abb. 5.12 zeigt repräsentative Ergebnisse der OCRL KD-Zellen. Die Markerproteine EEA1, Rab5, TfR sowie SNX1 lokalisieren an stark vergrößerten endosomalen Strukturen, zeigen aber ansonsten keine Veränderung in der subzellulären Verteilung im Vergleich zu den Kontrollzellen (Daten nicht gezeigt). Die Überlagerung dieser vier Markerproteine mit dem MPR300 ergab eine deutliche gelbe Pseudofärbung, was auf eine Kolo-kalisation hindeutet. Das Rab7-GFP-Protein zeigt dagegen eine mit den Kontrollzellen (Daten nicht gezeigt) vergleichbare Verteilung an endosomalen Strukturen. In der Überlagerung von Rab7-GFP mit dem MPR300 ist nur in einigen wenigen Bereichen eine gelbe Pseudofärbung zu erkennen.

Aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse kann also von einer verstärkten Lokalisation des MPR300 an vergrößerten, Retromer-positiven, frühen Endosomen ausgegangen werden.

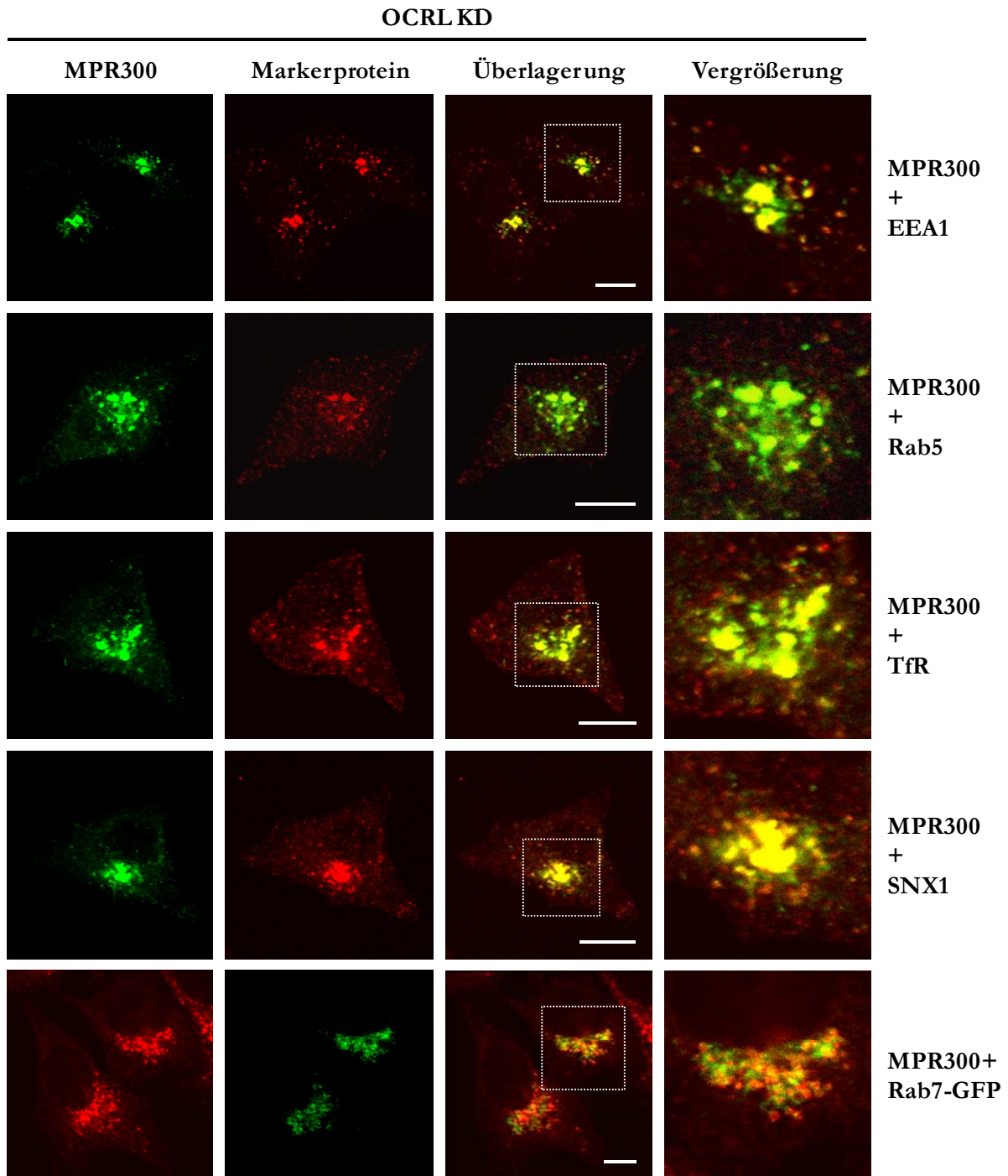


Abb. 5.12: Kolokalisation des MPR300 mit EEA1, Rab5, TfR, SNX1 sowie Rab7-GFP in HeLa-Zellen nach *OCRL*- bzw. Kontroll-siRNA-Transfektion. HeLa-Zellen wurden für 72 h mit *OCRL*- (*OCRL* KD) bzw. *GFP*- oder *Lamin A*- (bei Rab7-GFP-Überexpression) spezifischer siRNA als Kontrolle (Ko) transfiziert und anschließend für die Immunfluoreszenzanalyse fixiert. Die Detektion des MPR300 erfolgte durch einen anti-MPR300-Antikörper, gefolgt von einem Alexa Fluor 488- (MPR300, grün) bzw. Alexa Fluor 546-gekoppelten (MPR300, rot) Sekundärantikörper. Die Detektion der endosomalen Markerproteine EEA1, Rab5, TfR und SNX1 erfolgte durch Verwendung eines anti-EEA1-Antikörpers, eines anti-Rab5-Antikörpers, eines anti-TfR-Antikörpers und eines anti-SNX1-Antikörpers, gefolgt von einem Alexa Fluor 546-gekoppelten Sekundärantikörper (Markerprotein, rot). Die Visualisierung von Rab7 wurde durch Überexpression einer GFP-konjugierten Rab7-Proteinvariante erzielt (Markerprotein Rab7, grün). Pseudogelbe Färbungen in der Überlagerung und Vergrößerung weisen auf eine Kolokalisation von MPR300 und Markerprotein hin. Der in der Vergrößerung gezeigte Ausschnitt ist in den Überlagerungsbildern mit einer weißen, gepunkteten Linie markiert. Die Auswertung der Immunfluoreszenzpräparate erfolgte an einem cLSM. Der weiße Balken in der Überlagerung entspricht einer Größe von 10 µm.

5.2.5 Biochemische Quantifizierung der Proteinmenge der endosomalen Marker Rab5, EEA1, SNX1 und Rab7 in OCRL-depletierten HeLa-Zellen

Aufgrund der immunzytochemisch beobachteten Relokalisation einiger Markerproteine in vergrößerte Strukturen des endosomalen Kompartiments ergab sich die Frage, ob eine Erhöhung der Gesamtmenge dieser Markerproteine vorliegt. Es sollte daher die Proteinmenge von EEA1, Rab5, SNX1 und Rab7 bestimmt werden. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit *OCRL*- bzw. *GFP*-spezifischer siRNA transfiziert und anschließend lysiert. Das Zelllysate wurde in der Immun-detektion durch Verwendung von Markerprotein-spezifischen Antikörpern auf Expression der verschiedenen Markerproteine analysiert. Als Ladekontrolle wurde Tubulin mit einem anti-Tubulin-Antikörper detektiert. In Abb. 5.13 sind repräsentative Blots aus vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen abgebildet. Zur Bestimmung der relativen, zellulären Menge der Markerproteine wurden die Blots densitometrisch ausgewertet. Die relative Gesamtmenge der Markerproteine nach OCRL KD wurde prozentual zu den Kontrollzellen berechnet. In den abgebildeten Balkendiagrammen ist das Ergebnis für Rab5 (Abb. 5.13 A), EEA1 (Abb. 5.13 B), SNX1 (Abb. 5.13 C) und Rab7 (Abb. 5.13 D) dargestellt. In den OCRL-depletierten Zellen konnte eine leicht erhöhte relative Gesamtproteinmenge für Rab5, EEA1 und Rab7 im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert werden, wobei die EEA1-Menge am stärksten erhöht war. Das notwendige Signifikanzniveau wurde jedoch für keines dieser Proteine erreicht.

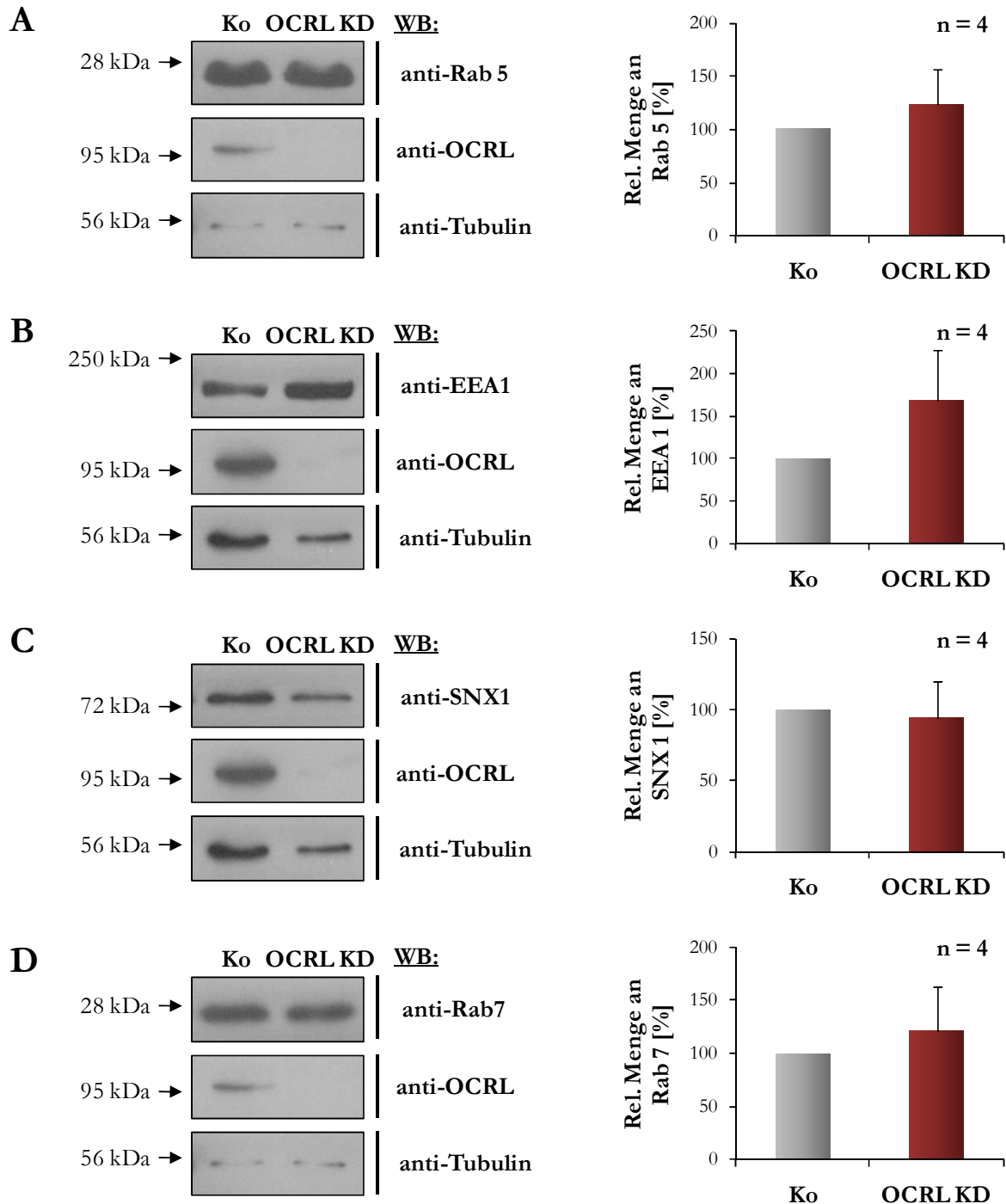


Abb. 5.13: Quantifizierung der Proteinmenge von Rab5, EEA1, SNX1 und Rab7 in *OCRL*- bzw. *GFP*-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden nach 72-stündiger Transfektion mit *OCRL*- (*OCRL* KD) bzw. *GFP*-spezifischer siRNA als Kontrolle (Ko) lysiert. **(A-D)** Im oberen Blot wurde die Proteinmenge des endosomalen Markerproteins Rab5 **(A)**, EEA1 **(B)**, SNX1 **(C)** bzw. Rab7 **(D)** durch Verwendung eines anti-Rab5-, eines anti-EEA1-, eines anti-SNX1- bzw. eines anti-Rab7-Antikörpers in der Immundetektion nach Western-Blots detektiert. Im mittleren Blot ist jeweils die Kontrolle für den *OCRL* KD zu sehen, wofür ein anti-*OCRL*-Antikörper in der Immundetektion eingesetzt wurde. Der untere Blot zeigt jeweils die Immundetektion von Tubulin mit einem anti-Tubulin-Antikörper. Die Blots zeigen repräsentative Ergebnisse von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Molekulargewichte des verwendeten Massenstandards sind links neben den Blots angegeben. Rechts von den Blots ist die quantitative Auswertung der Proteinmenge der unterschiedlichen Markerproteine in Form von Balkendiagrammen dargestellt. Die densitometrisch ermittelten Werte der Markerproteinbanden wurden auf die Tubulin-Werte normalisiert, und die relative Menge der Markerproteine nach *OCRL* KD wurde prozentual zu den Kontrollzellen durch Bildung des Mittelwertes und der Standardabweichung berechnet. WB: Western-Blot.

5.2.6 Quantifizierung des retrograden MPR46-Transports in einer modifizierten HEK-293-Zelllinie nach OCRL-Depletion

Die in OCRL-depletierten HeLa-Zellen beobachtete verstärkte MPR300-Lokalisation in endosomalen Strukturen kann auf einen Defekt im retrograden Transport des MPR300 zum TGN hindeuten. Für die quantitative Analyse des retrograden Transportweges wurde eine HEK-293-Zelllinie verwendet (im Folgenden 293HMY-Zelllinie genannt), die eine modifizierte Version des kleinen M6P-Rezeptors, MPR46, stabil überexprimiert. Dieser modifizierte MPR46 weist eine N-terminale Mehrfachmarkierung auf, die sich aus sechs Histidinresten (HIS), einer c-Myc-Markierung und einer Tyrosin-Sulfatidierungsstelle zusammensetzt. Durchläuft dieser MPR46 den retrograden Transportweg, wird die Tyrosin-Sulfatidierungsstelle von der TGN-spezifischen Tyrosin-Sulfotransferase erkannt und Schwefel von dessen Substrat 3'-Phosphoadenosin 5'-Phosphosulfat (PAPS) übertragen. Durch Zugabe von ^{35}S kann im Zytoplasma in einer 2-Schritt-Reaktion [^{35}S]PAPS erzeugt werden (Itin et al., 1997). Dadurch kommt es zu einer radioaktiven Markierung des modifizierten MPR46 (Abb. 5.14 A), die anschließend quantifiziert werden kann. Der Rücktransport des MPR46 zum TGN entspricht dem retrograden Transport des MPR300, da beide M6P-Rezeptoren identische Transportwege in der Zelle durchlaufen (siehe 2.5).

Zunächst wurden 293HMY-Zellen mit OCRL- bzw. GFP-spezifischer siRNA transfiziert. Am Tag des Versuches wurden die Zellen in einer *pulse*-Phase von 2 h mit ^{35}S versetzt. Nach Rücktransport des MPR46 zum TGN konnte dieser nun von der Tyrosin-Sulfotransferase sulfatidiert werden. Anschließend wurden die Zellen lysiert und der modifizierte MPR46 wurde über die HIS-Markierung aus dem Rohlysate präzipitiert. Im Szintillations-Counter wurde die absolute Menge an sulfatidiertem MPR46 gemessen. Nach Abgleich auf die Proteinkonzentration wurde die relative Menge an sulfatidiertem MPR46 in den OCRL-depletierten Zellen prozentual zu den Kontrollzellen bestimmt. Im abgebildeten Balkendiagramm ist das gemittelte Ergebnis von zwei voneinander unabhängig in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen dargestellt (Abb. 5.14 B). Es zeigt eine statistisch hoch signifikante Reduktion der relativen Sulfatidierung des MPR46 nach OCRL KD auf ca. 46 % ($p < 0,01$) und somit einen verminderten retrograden Transport des modifizierten MPR46 in OCRL-depletierten Zellen.

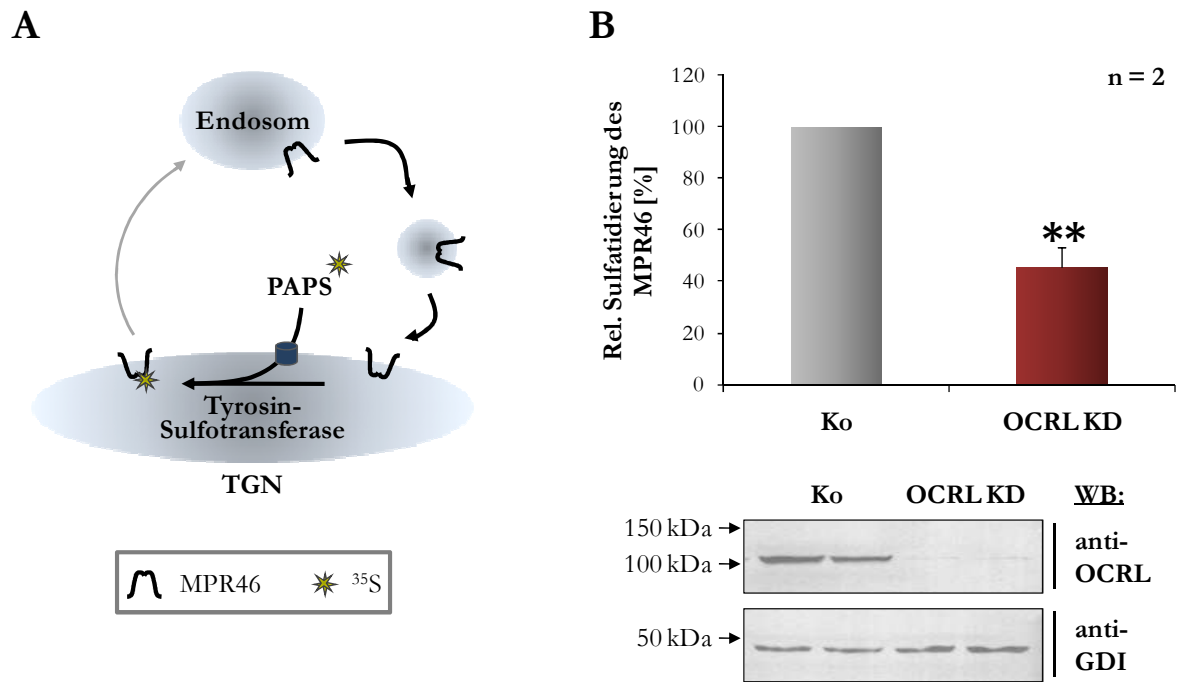


Abb. 5.14: Quantitative Bestimmung des retrograden MPR46-Transports in einer *OCRL*- bzw. *GFP*-siRNA-transfizierten 293HMY-Zelllinie. (A) Schematische Abbildung zum Prinzip des retrograden Transport-Experiments. Die Tyrosin-Sulfatidierungsstelle eines modifizierten MPR46 wird nach Rücktransport vom endosomalen Kompartiment am TGN von der Tyrosin-Sulfotransferase erkannt. Radioaktiver Schwefel (dargestellt als gelber Stern) wird vom Substrat der Tyrosin-Sulfotransferase, PAPS, auf die Sulfatidierungsstelle übertragen. (B) 293HMY-Zellen wurden für 72 h mit einer *OCRL*- (*OCRL* KD) bzw. einer *GFP*-spezifischen siRNA als Kontrolle (*Ko*) transfiziert und in Sulfat-freiem Vollmedium ohne Antibiotikum + Chlorat inkubiert. Vor Versuchsbeginn erfolgte eine Cycloheximid-Zugabe für 2 h. Die Synthese von radioaktiv-markiertem PAPS wurde durch 2-stündige Inkubation bei 37°C mit ^{35}S + Cycloheximid ermöglicht. Nach Lyse der Zellen wurde der modifizierte MPR46 über eine Ni^{2+} -Nitrilotriessigsäure-Präzipitation aus dem Rohlysat isoliert. Durch Vermessung der Proben im Szintillations-Counter wurde die absolute Menge an sulfatidiertem MPR46 bestimmt. Dieser Wert wurde auf die ermittelte Proteinkonzentration normalisiert. Das Balkendiagramm zeigt die relative Sulfatidierung des MPR46 nach *OCRL* KD im Verhältnis zu den Kontrollzellen nach Bildung des Mittelwertes und dazugehöriger Standardabweichung von zwei in Doppelbestimmung unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Im oberen Blot ist eine Immundetektion des *OCRL*-Proteins durch Verwendung eines anti-*OCRL*-Antikörpers dargestellt. Als Ladekontrolle ist die Immundetektion von GDI nach Verwendung eines anti-GDI-Antikörpers im unteren Blot abgebildet. Die Molekulargewichte des verwendeten Massenstandards sind links neben den Blots abgebildet. WB: Western-Blot, **: $p < 0,01$.

5.2.7 Immunzytochemische Analysen zur subzellulären Lokalisation des MPR46 in *OCRL*-depletierten HeLa-Zellen

Die auf immunzytochemische Analysen gestützte Vermutung eines verminderten retrograden Transports des MPR300 konnte für den MPR46 biochemisch verifiziert werden. Die Lokalisation des MPR46 wurde daher ebenfalls in vergrößerten vesikulären Strukturen vermutet.

Für eine entsprechende Untersuchung wurden HeLa-Zellen für die Immunfluoreszenzanalyse mit einer *OCRL*- bzw. einer *GFP*-spezifischen siRNA transfiziert und anschließend fixiert. Die Detektion des MPR46 erfolgte durch Verwendung eines anti-MPR46-Antikörpers, gefolgt von einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper (MPR46, grün). Der Zellkern wurde durch DAPI-Färbung der DNA angefärbt. Die angefertigten Immunfluoreszenzpräparate wurden mit einem cLSM ausgewertet. Repräsentative Aufnahmen sind in Abb. 5.15

dargestellt. Die Kontrollzellen zeigen eine kompakte, perinukleäre Lokalisation des MPR46. In den OCRL-depletierten Zellen liegt dagegen eine weniger kompakte Verteilung des MPR46 mit Akkumulation in vergrößerten vesikulären Strukturen vor (weiße Pfeile), die mit der Fehlverteilung des MPR300 nach OCRL KD vergleichbar ist.

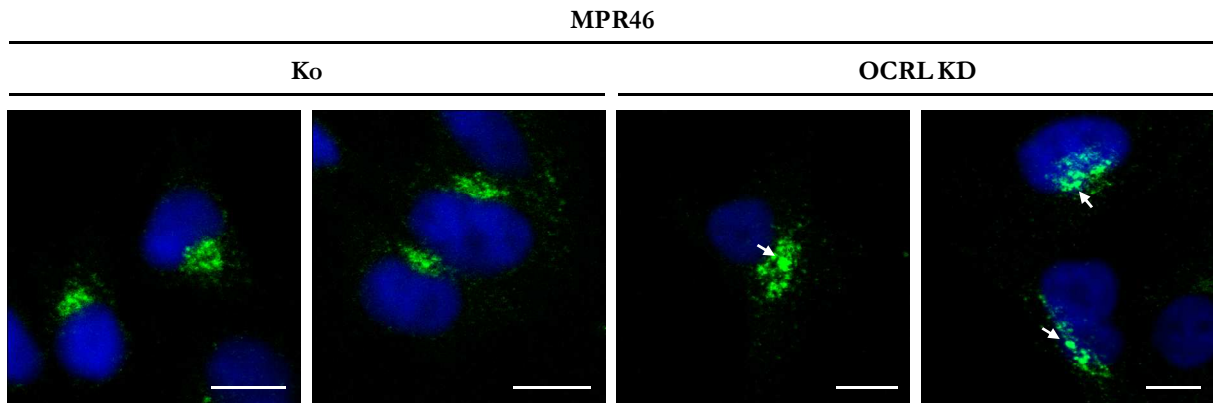


Abb. 5.15: Subzelluläre Lokalisation des MPR46 in HeLa-Zellen nach *OCRL*- bzw. *GFP*-siRNA-Transfektion. HeLa-Zellen wurden für 72 h mit einer *OCRL*- (*OCRL* KD) bzw. *GFP*-spezifischen siRNA als Kontrolle (Ko) transfiziert und anschließend für die Immunfluoreszenzanalyse fixiert. Durch Verwendung eines anti-MPR46-Antikörpers, gefolgt von einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper, konnte die Lokalisation des MPR46 detektiert werden (MPR46, grün). Die weißen Pfeile in den *OCRL*-depletierten Zellen weisen auf vergrößerte, MPR46-positive vesikuläre Strukturen. Die Zellkerne wurden durch Färbung der DNA mittels DAPI dargestellt (blau). Der weiße Balken entspricht einer Größe von 10 µm. Die Immunfluoreszenzexperimente wurden mit einem cLSM ausgewertet.

5.2.8 Untersuchungen zum anterograden Transport lysosomaler Enzyme in *OCRL*-depletierten HeLa-Zellen

Aufgrund des beobachteten, verminderten M6P-Rezeptor-Rücktransports nach *OCRL* KD könnte der anterograde Transportweg vom TGN zum frühen Endosom ebenfalls verändert sein. Für die Analyse des anterograden Transportweges bietet sich die Detektion der verschiedenen Formen saurer Hydrolasen an, da diese auf ihrem Weg zum Lysosom mehrfach prozessiert werden (siehe 2.5). In dieser Arbeit sollten die unterschiedlichen Formen des lysosomalen Enzyms Cathepsin D (Cath D) detektiert werden. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit *OCRL*- bzw. *GFP*-spezifischer siRNA transfiziert und anschließend lysiert. Die Cath D-Formen wurden nach Western-Blot in der Immundetektion durch Verwendung eines anti-Cath D-Antikörpers untersucht. Zusätzlich erfolgte eine Detektion von Tubulin als Ladekontrolle durch Verwendung eines anti-Tubulin-Antikörpers. In Abb. 5.16 A zeigen die dargestellten Blots ein repräsentatives Ergebnis aus vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. Die Menge an Cath D-Intermediat (48 kDa) scheint nach *OCRL* KD erhöht zu sein. Zur Quantifizierung der einzelnen Cath D-Formen wurden die Blots densitometrisch ausgewertet. Die relative Menge der Cath D-Formen wurde prozentual zu den Kontrollzellen bestimmt. Das in Abb. 5.16 B dargestellte Balkendiagramm zeigt eine statistisch signifikant erhöhte Menge an Cath D-Intermediat in *OCRL*-depletierten Zellen ($p < 0,05$). Die Menge an Pro-Cath D (52 kDa) ist nach *OCRL* KD ebenfalls erhöht, jedoch konnte keine statistische Signifikanz ermittelt werden. Die Menge an reifem, lysosomalen Cath D (34 kDa) ist nach *OCRL* KD unverändert, was dafür spricht, dass

Cath D in OCRL-depletierten Zellen über den anterograden Transportweg weiterhin das Lysosom erreicht.

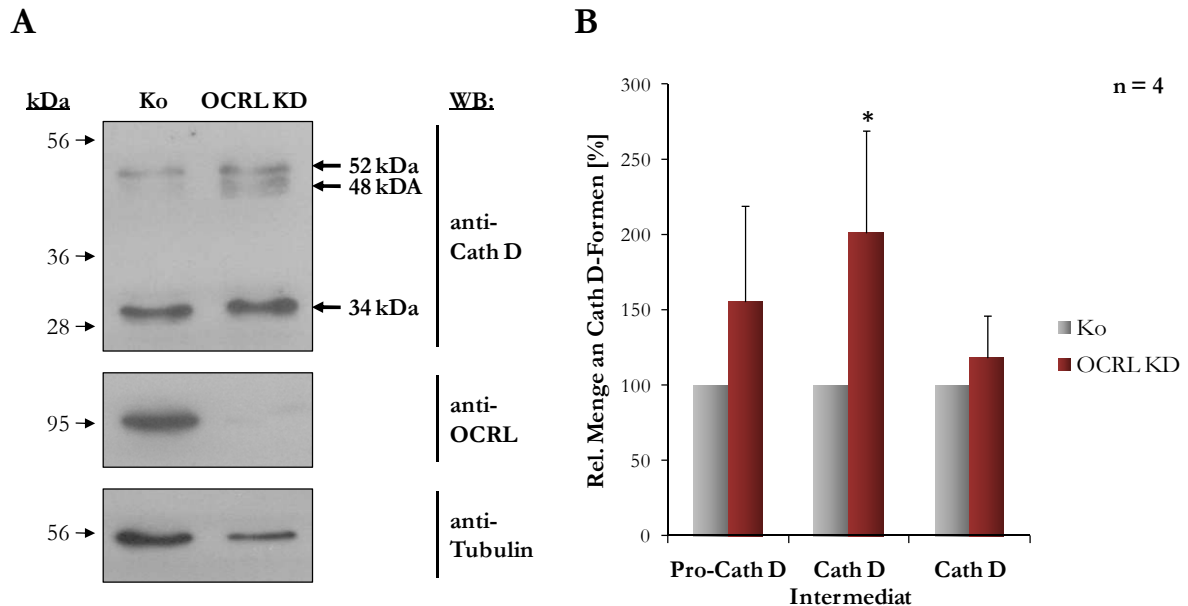


Abb. 5.16: Biochemische Detektion der unterschiedlichen Formen des Cath D-Proteins in OCRL- bzw. GFP-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen. (A) HeLa-Zellen wurden nach 72-stündiger Transfektion mit OCRL- (OCRL KD) bzw. GFP-spezifischer siRNA als Kontrolle (Ko) lysiert. Der obere Blot zeigt die unterschiedlichen, in der Immundetektion durch Verwendung eines anti-Cath D-Antikörpers detektierten Formen des Cath D-Proteins im stationären Zustand (52 kDa = Pro-Cath D; 48 kDa = Cath D-Intermediat; 34 kDa = Cath D). Der mittlere Blot zeigt die Kontrolle der siRNA-Transfektion durch Immundetektion mit einem anti-OCRL-Antikörper. Im unteren Blot wurde die Expression des Haushaltgens Tubulin durch Immundetektion mit einem anti-Tubulin-Antikörper detektiert. Die Blots zeigen repräsentative Ergebnisse von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Molekulargewichte des verwendeten Massenstandards sind links neben den Blots aufgeführt. (B) Quantitative Auswertung der relativen Menge der unterschiedlichen Cath D-Formen. Die densitometrisch ermittelten Werte der einzelnen Cath D-Formen wurden auf die Tubulin-Werte normalisiert und die relative Menge der Cath D-Formen prozentual zu den Kontrollzellen mit dazugehöriger Standardabweichung ermittelt. WB: Western-Blot, *: $p < 0,05$.

Für die Untersuchung des anterograden Transportweges wurde ein zweiter, unabhängiger Versuch durchgeführt. In einem *pulse-chase* Experiment wurde die Menge an neu-synthetisiertem Cathepsin Z (Cath Z), einer Cystein-Protease der Papain-Familie, ermittelt. Cath Z wird als ein aus 303 AS-bestehendes Präpropeptid synthetisiert. Nach Abspaltung der Signalsequenz (23 AS) im ER wird Pro-Cath Z freigesetzt und zum Golgi transportiert. Im Lysosom wird schließlich das Propeptid (38 AS) abgespalten und reifes Cath Z entsteht (Nagler et al., 1999; Sivaraman et al., 2000).

Für den Versuch wurden HeLa-Zellen mit OCRL- bzw. GFP-spezifischer siRNA transfiziert. Zur Synthese radioaktiv-markierter Proteine wurden die Zellen für 1 h mit ^{35}S -Met inkubiert. Für die Detektion von Pro-Cath Z wurde ein Zellaliquot direkt im Anschluss lysiert. Mit den übrigen Ansätzen wurde eine *chase*-Phase von 5 h durchgeführt. Nach Zellyse wurde das Cath Z-Protein durch einen anti-Cath Z-Antikörper präzipitiert. Die Präzipitate wurden auf eine SDS-PAGE aufgetragen und anschließend fluorographisch ausgewertet. Abb. 5.17 A zeigt ein repräsentatives Ergebnis von zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. Die obere Bande nach 0 h *chase* konnte als Pro-Cath Z (ca. 39 kDa) identifiziert werden (siehe Abb.

5.18 A). Bei der unteren Bande (ca. 38 kDa) handelt es sich vermutlich um eine weniger stark glykosylierte Form von Pro-Cath Z (Nagler et al., 1999). Eine vorübergehende Bildung einer Intermediärform innerhalb der *pulse*-Phase ist unwahrscheinlich, da in der Literatur lediglich die Reifung vom Propeptid direkt zum reifen Enzym beschrieben ist. Nach 5 h *chase* konnte schließlich reifes Cath Z (ca. 37 kDa) detektiert werden.

Die Pro-Cath Z- und Cath Z-Banden wurden anschließend densitometrisch ausgewertet. Die relative Menge an reifem Cath Z in OCRL-depletierten Zellen wurde prozentual zu den Kontrollzellen im abgebildeten Balkendiagramm dargestellt. In OCRL KD- und Kontrollzellen wurde eine vergleichbare Menge an reifem Cath Z detektiert (Abb. 5.17 B).

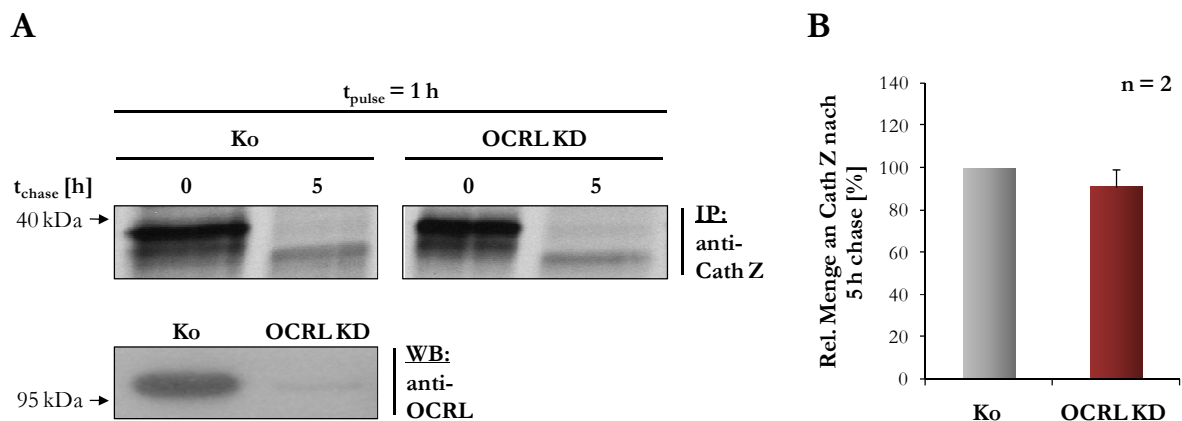


Abb. 5.17: Detektion der Prozessierung des Cath Z-Proteins in OCRL- bzw. GFP-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen durch radioaktive Markierung mit ^{35}S . (A) HeLa-Zellen wurden mit OCRL- (OCRL KD) bzw. GFP-spezifischer siRNA als Kontrolle (Ko) für 72 h transfiziert. In einer *pulse*-Phase von 1 h wurde ^{35}S -Met zu den Zellen gegeben. Zur Detektion von Pro-Cath Z wurden die Zellen direkt lysiert. Zur Ermittlung von reifem Cath Z wurden die Zellen für eine *chase*-Phase von 5 h mit „kaltem“ Met inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurde enthaltenes Cath Z mittels IP mit einem anti-Cath Z-Antikörper präzipitiert. Im Anschluss wurde mit dem Präzipitat eine SDS-PAGE durchgeführt und das Gel fluorographisch ausgewertet. Die beiden oberen Blots zeigen das Ergebnis der IP nach Durchlaufen des Röntgenfilms durch ein Entwicklergerät. Nach 0 h *chase* kann Pro-Cath Z detektiert werden, wogegen nach 5 h *chase* reifes Cath Z sichtbar wird. Der Transfektionsansatz wurde, dargestellt im unteren Blot, durch Immundetektion mit einem anti-OCRL-Antikörper auf OCRL KD-Effizienz überprüft. Die Blots stellen repräsentative Ergebnisse von zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Auf linker Seite der Blots sind die Molekulargewichte des verwendeten Massenstandards abgebildet. (B) Das Balkendiagramm zeigt die relative Menge des nach 5 h *chase* gebildeten, reifen Cath Z. Der densitometrisch ermittelte Cath Z-Wert wurde auf den Pro-Cath Z-Wert (obere Bande) normalisiert. Die relative Menge des in OCRL-depletierten Zellen nach 5 h *chase* gebildeten Cath Z wurde prozentual zu den Kontrollzellen ermittelt. Die Standardabweichung wurde berechnet. WB: Western-Blot.

5.2.9 Analysen zur Sekretion lysosomaler Enzyme in das extrazelluläre Medium nach siRNA-Depletion von OCRL in HeLa-Zellen

Zusätzlich zum Transport ins Lysosom wird ein Teil der lysosomalen Enzyme M6P-Rezeptor-unabhängig ins extrazelluläre Medium abgegeben. Bei einer Beeinträchtigung des M6P-Rezeptor-Transportweges kann es deswegen zu einer erhöhten Sekretion lysosomaler Enzyme kommen.

Zur Messung der Sekretion von Cath Z wurde mit OCRL- bzw. GFP-siRNA transfizierten HeLa-Zellen, wie bereits beschrieben (siehe 5.2.8), ein *pulse-chase* Experiment durchgeführt. Nach einer 5-stündigen *chase*-Phase wurde der Zellüberstand gesammelt und zusammen mit dem 0 h-

Zelllysate einer Cath Z-IP unterzogen. Das Präzipitat wurde auf eine SDS-PAGE aufgetragen und anschließend fluorographisch ausgewertet. Abb. 5.18 A zeigt das repräsentative Ergebnis von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Da keine Prozessierung im endosomalen/lysosomalen Kompartiment stattfindet, wird Pro-Cath Z nach 5 h *chase* im Überstand detektiert (sekretiert). Das nach 0 h *chase* neu-synthetisierte Pro-Cath Z im Zelllysate (intrazellulär) konnte durch Vergleich der Bandengrößen im Lysat und im Überstand identifiziert werden. Die detektierten Pro-Cath Z-Banden wurden densitometrisch ausgewertet und die Pro-Cath Z-Werte des Überstands auf die intrazellulären Werte normalisiert. Die relative Sekretion von Pro-Cath Z in OCRL-depletierten Zellen wurde prozentual zu den Kontrollzellen berechnet und ist im abgebildeten Balkendiagramm wiedergegeben (Abb. 5.18 B). Die Menge an sekretiertem Cath Z in OCRL KD- und Kontrollzellen ist miteinander vergleichbar.

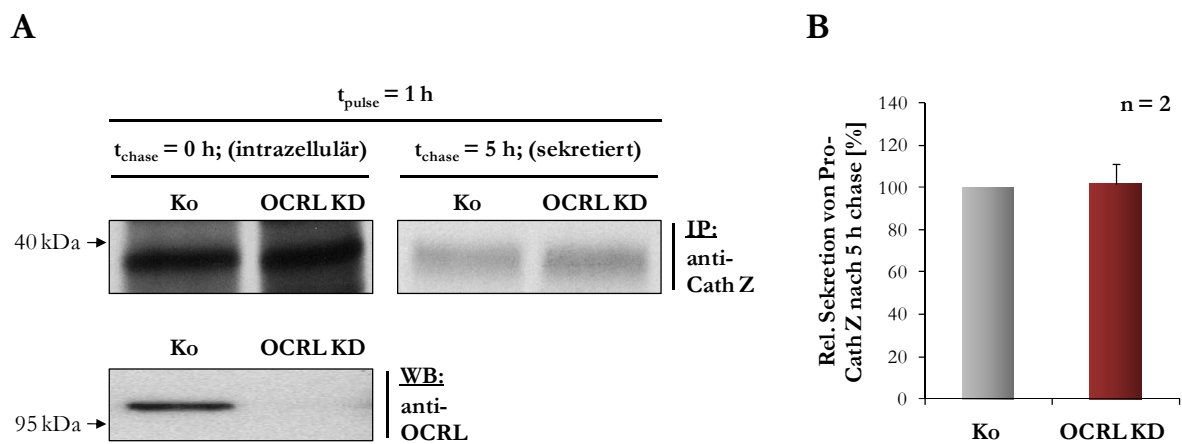


Abb. 5.18: Quantifizierung der Sekretion von radioaktiv-markiertem Pro-Cath Z in HeLa-Zellen nach OCRL- bzw. GFP-siRNA-Transfektion. (A) Nach einer 72-stündigen Transfektion von HeLa-Zellen mit OCRL- (OCRL KD) bzw. GFP-spezifischer siRNA als Kontrolle (Ko) wurden die Zellen für eine *pulse*-Phase von 1 h mit ^{35}S -Met versetzt. Zur Detektion von intrazellulärem Pro-Cath Z wurden die Zellen direkt im Anschluss lysiert. Zur Ermittlung der Sekretion von Pro-Cath Z wurde eine *chase*-Phase von 5 h durchgeführt. Das enthaltene Pro-Cath Z in Zellüberstand und -lysat wurde mittels Cath Z-IP mit einem anti-Cath Z-Antikörper präzipitiert. Im Anschluss wurde mit dem Präzipitat eine SDS-PAGE durchgeführt und das Gel fluorographisch ausgewertet. Die beiden oberen Blots zeigen das Ergebnis der IP nach Durchlaufen des Röntgenfilms durch ein Entwicklergerät. Im linken, oberen Blot ist das intrazelluläre Pro-Cath Z nach 0 h *chase* sichtbar, wogegen im oberen, rechten Blot das nach 5 h *chase* sekretierte Pro-Cath Z zu erkennen ist. Der Transfektionsansatz wurde, dargestellt im unteren Blot, durch Immundetektion mit einem anti-OCRL-Antikörper auf OCRL KD-Effizienz überprüft. Die Blots stellen repräsentative Ergebnisse von zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Links neben den Blots sind die Molekulargewichte des verwendeten Massenstandards abgebildet. **(B)** Das Balkendiagramm zeigt die relative Menge an nach 5 h *chase* sekretiertem Pro-Cath Z. Die Blots der Cath Z-IP wurden densitometrisch ausgewertet und sekretiertes Pro-Cath Z auf das intrazelluläre Pro-Cath Z normalisiert. Die relative Menge des nach OCRL KD sekretierten Pro-Cath Z wurde prozentual zu den Kontrollzellen berechnet und die Standardabweichung gebildet.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Sekretion lysosomaler Enzyme stellt die Messung der Enzymaktivitäten im extrazellulären Medium dar. In dieser Arbeit wurde die Sekretion der lysosomalen Enzyme β -Hexosaminidase und β -Galaktosidase bestimmt. Hierfür wurden HeLa-Zellen nach 60-stündiger Transfektion mit OCRL- bzw. GFP-spezifischer siRNA für weitere 24 h bei 37°C mit frischem Medium inkubiert. Anschließend wurde der Zellüberstand gesammelt und die Zellen lysiert. Die Substrate der Enzyme wurden zu den Zellüberständen und -lysaten gegeben und die Extinktion des daraufhin gebildeten Farbstoffs wurde photometrisch gemessen. Die erhaltenen Werte wurden auf die zuvor ermittelte Proteinkonzentration norma-

liert. Zur Bestimmung der absoluten Sekretion wurde unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren der Anteil an sekretiertem Enzym im Verhältnis zur intrazellulären Gesamtmenge berechnet. Die relative Menge an sekretiertem Enzym in OCRL-depletierten Zellen wurde daraufhin prozentual zu den Kontrollzellen ermittelt. Für die Sekretion der β -Hexosaminidase ($n = 4$) konnte kein Unterschied nach OCRL KD detektiert werden (Abb. 5.19 B). Die relative Sekretion der β -Galaktosidase ($n = 3$) war dagegen in OCRL-depletierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen ca. 1,8-fach erhöht (Abb. 5.19 C). Dieser Anstieg war jedoch nicht statistisch signifikant. Im Vergleich zur β -Hexosaminidase wurden zudem starke Schwankungen in den absoluten Werten registriert (Daten nicht gezeigt), weshalb das Ergebnis der β -Hexosaminidase-Sekretion als aussagekräftiger zu werten ist.

Zusammenfassend konnte nach Anwendung beider Methoden kein Unterschied in der Sekretion der untersuchten, lysosomalen Enzyme nach OCRL KD detektiert werden.

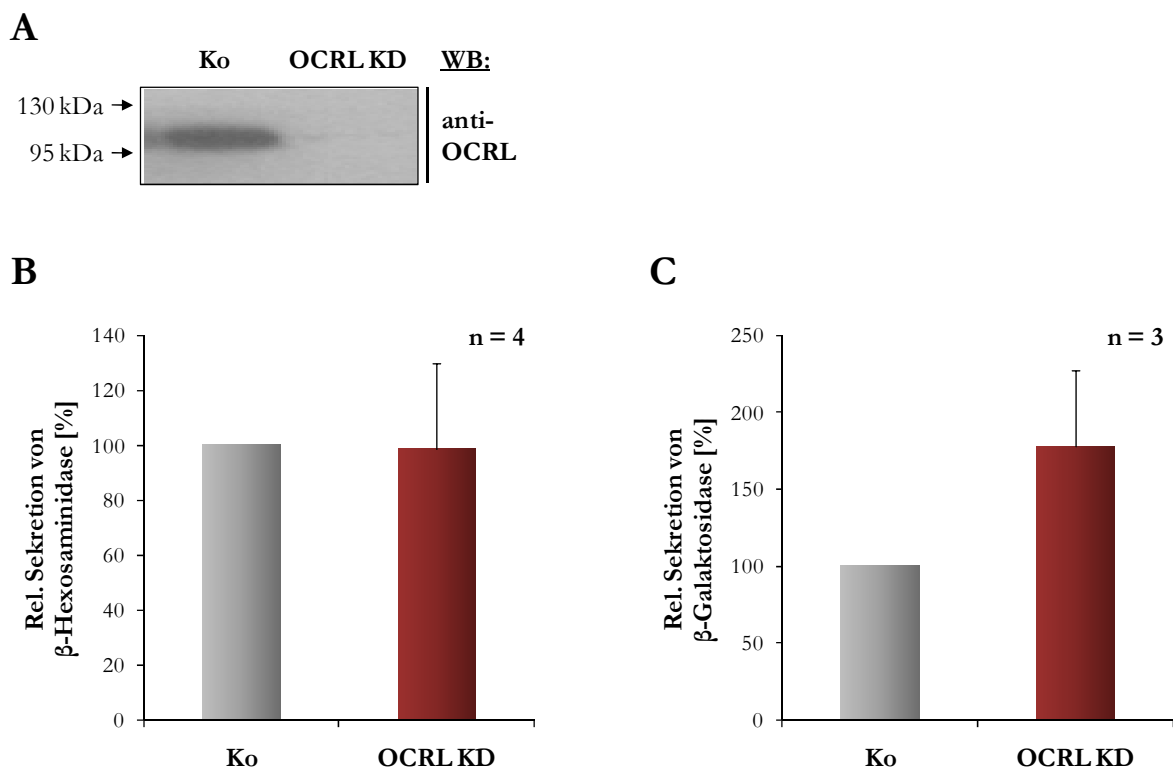


Abb. 5.19: Bestimmung der Enzymaktivitäten der lysosomalen Enzyme β -Hexosaminidase und β -Galaktosidase nach Sekretion ins extrazelluläre Medium aus HeLa-Zellen nach OCRL- bzw. GFP-siRNA-Transfektion. HeLa-Zellen wurden mit OCRL- (OCRL KD) bzw. GFP-spezifischer siRNA als Kontrolle (Ko) für 60 h transfiziert. **(A)** Die Lyse eines Zellaliquots ermöglichte die Überprüfung der OCRL KD-Effizienz nach Western-Blot durch Verwendung eines anti-OCRL-Antikörpers in der Immundetektion. Der abgebildete Blot zeigt ein repräsentatives Ergebnis. Die Molekulargewichte des verwendeten Massenstandards sind links neben dem Blot abgebildet. **(B, C)** Zur Messung der Sekretion lysosomaler Enzyme wurden die übrigen Zellaliquots für weitere 24 h bei 37°C inkubiert. Zellüberstand und hergestelltes Zelllysats wurden mit Substratpuffer versetzt und für 1 h (β -Hexosaminidase) bzw. 3 h (β -Galaktosidase) bei 37°C inkubiert. Gemessen wurde die Substratfreisetzung von p-Nitrophenol bei 405 nm. Die erhaltenen Werte wurden auf die zuvor im Zelllysats gemessene Proteinkonzentration normalisiert und die absolute Sekretion durch Bestimmung des Anteils an sekretiertem Enzym im Verhältnis zum zellulären Enzym ermittelt. Die abgebildeten Balkendiagramme zeigen die relative Sekretion der β -Hexosaminidase (B) und der β -Galaktosidase (C) nach 24 h. Die relative Sekretion von vier (β -Hexosaminidase) bzw. drei (β -Galaktosidase) voneinander unabhängig durchgeführten Sekretionsexperimenten wurde in OCRL-depletierten Zellen prozentual zu den Kontrollzellen errechnet und die Standardabweichung bestimmt. WB: Western-Blot.

5.2.10 Immunzytochemische Betrachtung der Lysosomenmorphologie und biochemische Quantifizierung der lysosomalen Marker Lamp1 und Lamp2 in OCRL-depletierten HeLa-Zellen

Aufgrund der Akkumulation der M6P-Rezeptoren in vergrößerten, endosomalen Strukturen sowie der detektierten Erhöhung von Cath D-Vorstufen in OCRL-depletierten Zellen, war es von Interesse, die Morphologie der Lysosomen als Bestimmungsort der vom M6P-Rezeptor transportierten lysosomalen Enzyme näher zu untersuchen. Als lysosomale Marker wurden die Lysosomen-assoziierten Membranproteine Lamp1 und Lamp2 verwendet (Karlsson und Carlsson, 1998).

Durch Immunfluoreszenzfärbungen von Lamp1 und Lamp2 sollte zunächst die Lysosomenmorphologie analysiert werden. Dafür wurden HeLa-Zellen mit *OCRL*- bzw. *GFP*-spezifischer siRNA transfiziert und anschließend fixiert. Die Detektion von Lamp1 und Lamp2 erfolgte mit einem anti-Lamp1- (Lamp1, grün) bzw. anti-Lamp2-Antikörper (Lamp2, grün), gefolgt von einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper. Die DNA wurde mittels DAPI angefärbt (blau). Am cLSM wurden Immunfluoreszenzbilder der hergestellten Färbungen mit identischer Laserintensität und Vergrößerung gescannt. Repräsentative Aufnahmen sind in Abb. 5.20 A abgebildet. Die Lamp1-Färbung zeigt einen deutlichen Unterschied in der Lysosomenmorphologie zwischen OCRL KD- und Kontrollzellen (links). Nach OCRL-Depletion scheinen deutlich vergrößerte und/oder mehr Lysosomen vorzuliegen. Dieser Effekt konnte jedoch nicht für Lamp2 beobachtet werden; Lysosomenanzahl und -morphologie waren in OCRL KD- und Kontrollzellen gleich (rechts).

Um zu bestimmen, ob die intensivere Färbung der Lamp1-positiven Lysosomen in OCRL-depletierten Zellen auf eine Erhöhung der Proteinmenge von Lamp1 zurückzuführen war, wurden Zelllysate von *OCRL*- und *GFP*-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen hergestellt. Die Gesamtmenge von Lamp1 bzw. Lamp2 als Vergleich wurde in der Immundetektion durch Verwendung von anti-Lamp1- bzw. anti-Lamp2-Antikörpern bestimmt. Als Ladekontrolle wurde Tubulin mit einem anti-Tubulin-Antikörper detektiert. Repräsentative Blots von vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen sind in Abb. 5.20 B dargestellt. Aufgrund der erhöhten Lamp1-Bandenintensität nach OCRL KD verglichen mit den Kontrollzellen (links) scheint eine erhöhte Lamp1-Proteinmenge vorzuliegen. Die Lamp2-Bandenintensitäten in OCRL KD- und Kontrollzellen (rechts) sind dagegen vergleichbar. Für eine quantitative Bestimmung der Lamp1- und Lamp2-Proteinmengen wurden die Banden densitometrisch vermessen. Die ermittelten Lamp1- und Lamp2-Werte wurden auf Tubulin normalisiert und die relative Menge an Lamp1 bzw. Lamp2 nach OCRL KD prozentual zu den Kontrollzellen bestimmt (Abb. 5.20 B). Wie im linken Balkendiagramm zu sehen ist, konnte die anscheinend erhöhte Lamp 1-Proteinmenge nach OCRL KD nicht quantitativ bestätigt werden, was auf die unscharfen Banden im Blot zurückgeführt werden kann. Die im rechten Balkendiagramm wiedergegebene Quantifizierung von Lamp2 zeigt keinen Unterschied zwischen OCRL KD- und Kontrollzellen, was den Bandenintensitäten im Blot entspricht.

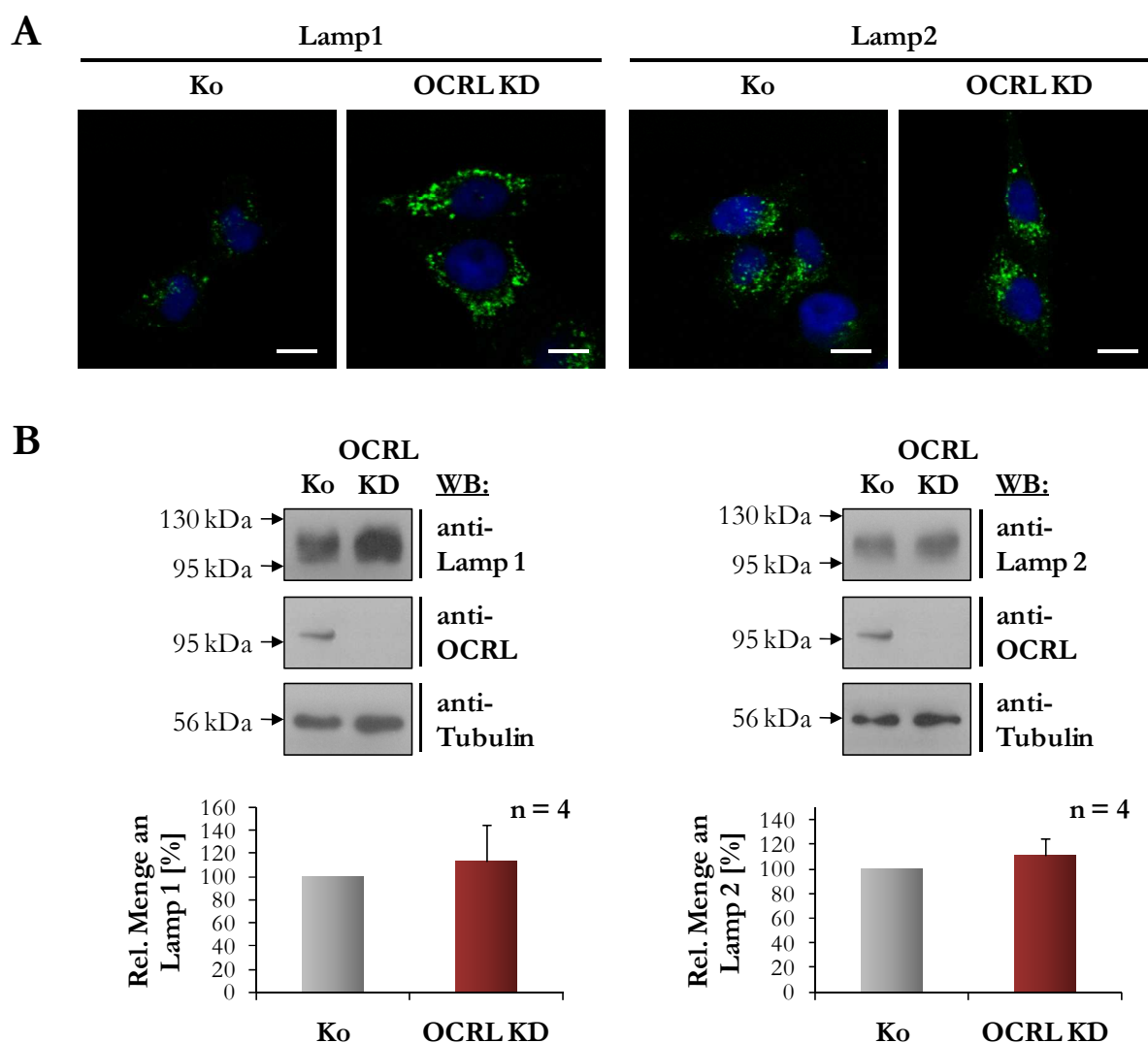


Abb. 5.20: Immunzytochemische und biochemische Analysen zur Lokalisation und Proteinmengenbestimmung von Lamp1 und Lamp2 in OCRL- bzw. GFP-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen. (A) HeLa-Zellen wurden nach 72-stündiger Transfektion mit OCRL- (OCRL KD) bzw. GFP-spezifischer siRNA als Kontrolle (Ko) für eine Immunfluoreszenzanalyse fixiert. Die Lokalisation von Lamp1- (links) und Lamp2- (rechts) wurde mit einem anti-Lamp1- bzw. anti-Lamp2-Antikörper sowie einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert (grün). Die DNA wurde mit DAPI angefärbt (blau). Die Immunfluoreszenzpräparate wurden mit einem cLSM ausgewertet. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 µm. (B) OCRL- bzw. GFP-siRNA-transfizierte HeLa-Zellen wurden lysiert. Die Lamp1- (links) bzw. Lamp2-Gesamtmenge (rechts) wurde durch Verwendung eines anti-Lamp1- bzw. anti-Lamp2-Antikörpers in der Immundetektion detektiert und ist im oberen Blot dargestellt. Der mittlere Blot zeigt die Kontrolle der Transfektion durch Verwendung eines anti-OCRL-Antikörpers in der Immundetektion. Im unteren Blot ist die Immundetektion von Tubulin mit einem anti-Tubulin-Antikörper dargestellt. Die abgebildeten Blots stellen repräsentative Ergebnisse von vier unabhängig voneinander durchgeführten Transfektionsansätzen dar. Die Molekulargewichte der verwendeten Massenstandards sind links neben den Blots abgebildet. Nach densitometrischer Quantifizierung der Bandenintensitäten von Lamp1 und Lamp2 wurden diese auf Tubulin normalisiert und die relative Menge an Lamp1 und Lamp2 nach OCRL KD prozentual zu den Kontrollzellen mit dazugehöriger Standardabweichung im abgebildeten Balkendiagramm dargestellt. WB: Western-Blot.

5.3 Untersuchungen zur Funktion von OCRL und/oder OCRL-Domänen für den retrograden Transport

Der deutlich verminderte, retrograde M6P-Rezeptor-Transport nach OCRL KD ließ auf eine Funktion von OCRL in diesem Transportprozess schließen. Es war jedoch unklar, welche OCRL-Domäne(n) für die Regulation des M6P-Rezeptor-Rücktransports zum TGN benötigt wird/werden. Vermutet wurde eine Beteiligung der OCRL-Phosphatase-Domäne, was im Folgenden näher untersucht werden sollte.

5.3.1 Komplementierung der MPR300-Fehlverteilung nach OCRL-Depletion durch Überexpression verschiedener OCRL-Proteinvarianten in HeLa-Zellen

In dieser Arbeit sollte die Überexpression verschiedener OCRL-Proteinvarianten Aufschluss über deren Komplementierungsfähigkeit bezüglich der MPR300-Fehlverteilung nach OCRL KD geben. In den Komplementationstudien wurde sowohl ein OCRL WT-Protein als auch eine Phosphatase-defiziente OCRL-Proteinvariante (siehe 5.1.1) verwendet. Dafür war es von entscheidender Bedeutung, dass diese nach transienter Transfektion überexprimierten OCRL-Proteinvarianten im Gegensatz zum endogenen OCRL-Protein nicht mehr durch OCRL-spezifische siRNA depletiert werden. Um dies zu realisieren, wurde eine sogenannte Rescue-Sequenz in die OCRL-cDNA eingeführt. Die von der OCRL-siRNA erkannte Basensequenz wurde durch Einführen stiller Mutationen so verändert, dass die siRNA nicht mehr binden konnte, die Aminosäuresequenz aber unverändert blieb (Abb. 5.21 A). Insgesamt wurden vier dieser siRNA-resistenten Proteinvarianten erstellt (Abb. 5.21 B): Zum einen OCRL WT (OCRL^{WT}-18a_rescue; OCRL^{WT+18a}_rescue), zum anderen eine Phosphatase-defiziente OCRL-Proteinvariante (OCRL^{R493A/R500T-18a}_rescue; OCRL^{R493A/R500T+18a}_rescue), jeweils sowohl ohne, als auch mit alternativem Exon 18a. Die abgebildete Domänenstruktur dieser OCRL-Varianten zeigt die Position der Rescue-Sequenz am Ende der Phosphatase-Domäne sowie die durch Einführung von Mutationen in der cDNA-Sequenz erzeugten Aminosäureaustausche in der Phosphatase-defizienten OCRL-Variante. Zusätzlich wurde eine N-terminale HA-Markierung angefügt um eine Detektion der überexprimierten Proteine in der Immunfluoreszenz zu ermöglichen (Abb. 5.21 B).

Um die Funktionalität der Rescue-Sequenz zu testen, wurden HeLa-Zellen nach OCRL KD mit den unterschiedlichen OCRL-cDNA-Konstrukten transfiziert. Nach Zellfixierung konnten erfolgreich überexprimierte OCRL-Proteinvarianten durch Verwendung eines anti-HA Antikörpers, gefolgt von einem Alexa Fluor 546-gekoppelten Sekundärantikörper, detektiert werden (HA, rot). Der Zellkern wurde durch Färbung der DNA mit DAPI dargestellt (blau). Nach Auswertung der Immunfluoreszenzpräparate am cLSM zeigen die hier abgebildeten Aufnahmen nach Überexpression aller OCRL-Proteinvarianten eine typische, perinukleäre Verteilung (Abb. 5.21 C). Besonders nach Überexpression der OCRL-Varianten inklusive alternativem Exon 18a wurde zusätzlich eine Lokalisation in vesikulären Strukturen beobachtet, was bereits veröffentlichten Daten entspricht (Choudhury et al., 2009).

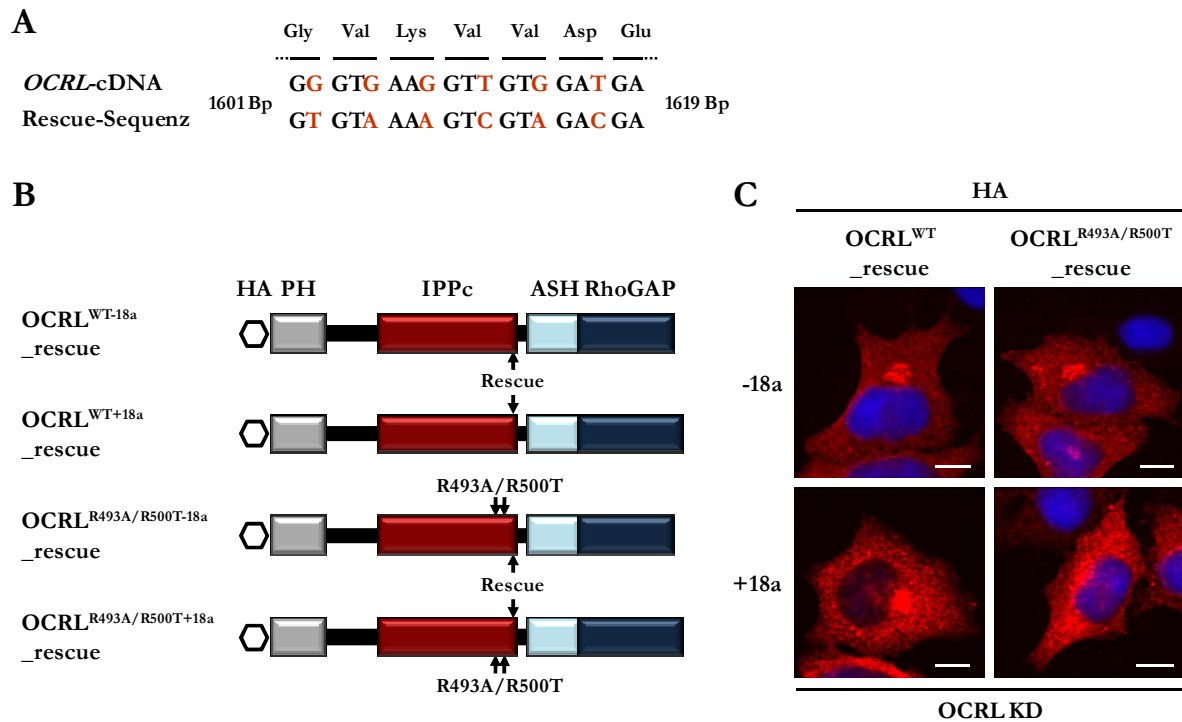


Abb. 5.21: Überexpression von siRNA-resistenten OCRL-Proteinvarianten in *OCRL*-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen. **(A)** Generierung von siRNA-resistenten OCRL-Proteinvarianten durch Einführen von stillen Mutationen (Rescue-Sequenz) in die von der *OCRL*-spezifischen siRNA erkannten *OCRL*-cDNA-Sequenz. **(B)** Schematische Darstellung der Domänenstruktur der siRNA-resistenten OCRL^{WT}- und Phosphatase-defizienten (OCRL^{R493A/R500T}, $\leftrightarrow$) Proteinvarianten ohne (-18a) bzw. mit (+18a) den vom Exon 18a kodierten AS. Die Rescue-Sequenz befindet sich am Ende der Phosphatase-Domäne ($\downarrow$). Zudem wurde eine N-terminale HA-Markierung angefügt. PH: *pleckstrin homology*; IPPc: *inositol polyphosphate phosphatase, catalytic*; ASH: *ASPM, SPD-2, Hydin*; RhoGAP: *Rho GTPase-activating protein*. **(C)** Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden HeLa-Zellen für 72 h mit einer *OCRL*-spezifischen siRNA (OCRL KD) transfiziert und die siRNA-resistenten OCRL-Proteinvarianten über Nacht transient überexprimiert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und die OCRL-Proteinvarianten mit einem anti-HA-Antikörper und einem Alexa Fluor 546-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert (anti-HA, rot). Der Zellkern wurde durch DNA-Färbung mittels DAPI dargestellt (blau). Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden an einem cLSM ausgewertet. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

Da für jedes der OCRL-Konstrukte eine siRNA-Resistenz gezeigt werden konnte, wurden diese daraufhin in einem Komplementierungsassay eingesetzt. OCRL wurde in HeLa-Zellen mit *OCRL*-spezifischer siRNA depletiert und die verschiedenen OCRL-Konstrukte transient transfiziert. Nach Fixierung der Zellen wurde die Überexpression der OCRL-Proteinvarianten mit einem anti-HA-Antikörper sowie einem Alexa Fluor 546-gekoppelten Sekundärantikörper überprüft. Die Verteilung des MPR300 wurde nach Verwendung eines anti-MPR300-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörpers am cLSM untersucht. Der Zellkern wurde mittels DAPI markiert (blau). Repräsentative Aufnahmen sind in Abb. 5.22 A dargestellt. Im Gegensatz zu den nicht-transfizierten, OCRL-depletierten Zellen kann in den OCRL^{WT}-18a _rescue- und OCRL^{WT}+18a _rescue-überexprimierenden Zellen keine Lokalisation des MPR300 in vergrößerten vesikulären Strukturen detektiert werden. Bei Überexpression von OCRL^{R493A/R500T}-18a _rescue- und OCRL^{R493A/R500T}+18a _rescue liegt dagegen weiterhin eine MPR300-Fehlverteilung vor.

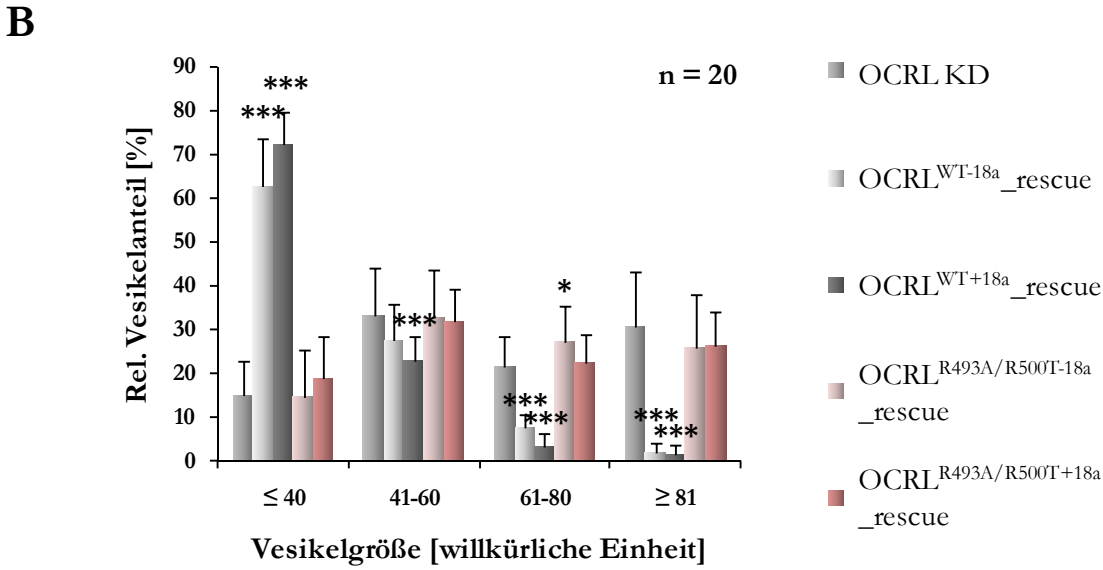
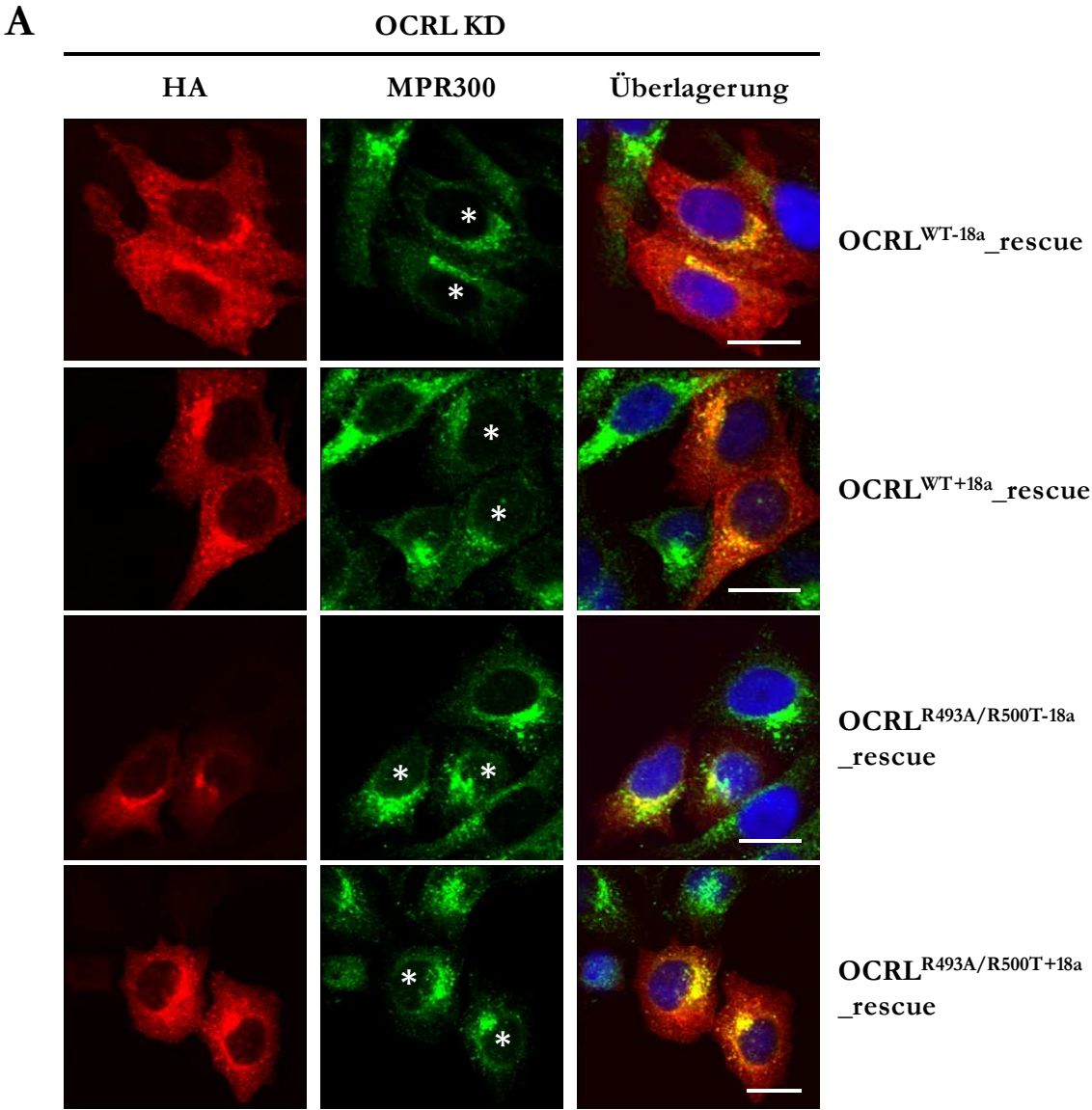


Abb. 5.22: Komplementierung der MPR300-Fehlverteilung in OCRL-depletierten HeLa-Zellen durch Überexpression von siRNA-resistenten OCRL-Proteinvarianten. (A) HeLa-Zellen wurden für 72 h mit einer OCRL-spezifischen siRNA (OCRL KD) transfiziert und siRNA-resistente OCRL-Proteinvarianten über Nacht transient in den Zellen überexprimiert. Anschließend wurden die Zellen für eine Immunfluoreszenzanalyse fixiert. Zur Detektion von Zellen mit transienter Überexpression einer siRNA-resistenten OCRL-Proteinvariante wurde ein anti-HA-Antikörper gefolgt von einem Alexa Fluor 546-gekoppelten Sekundärantikörper verwendet (HA, rot). Der MPR300 wurde durch Verwendung eines anti-MPR300-Antikörpers, gefolgt von einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt (MPR300, grün). Weiße Sterne kennzeichnen Zellen, die eine siRNA-resistente OCRL-Proteinvariante überexprimieren. Der weiße Balken in der Überlagerung entspricht einer Länge von 20 µm. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt (blau). Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit einem cLSM ausgewertet. (B) Auswertung der Komplementierungsfähigkeit der siRNA-resistenten OCRL-Proteinvarianten hinsichtlich der MPR300-Fehlverteilung nach OCRL KD mit dem Metamorph-Programm. Es wurden pro Bedingung 20 Zellen mit identischer Vergrößerung und Laserintensität aufgenommen. Pro Zelle wurde die Fläche von 29 Vesikeln vermessen und der mittlere Anteil der Vesikel innerhalb einer willkürlich gewählten Vesikelgrößenverteilung mit dazugehöriger Standardabweichung bestimmt. *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$.

Diese qualitativen Beobachtungen konnten quantitativ durch Anwendung des Metamorph-Programms bestätigt werden. Pro transfiziertem Rescue-Konstrukt wurden HA-positive Zellen in identischer Vergrößerung und Laserstärke am cLSM gescannt ($n = 20$) und der mittlere Anteil der Vesikel innerhalb einer willkürlich gewählten Vesikelgrößenverteilung bestimmt. Dieser wurde dann mit der Vesikelgrößenverteilung nach OCRL KD (siehe dazu Abb. 5.10 B) verglichen und im abgebildeten Balkendiagramm dargestellt (Abb. 5.22 B). Die Vesikelgrößenverteilung in Zellen nach Überexpression von OCRL^{WT-18a}_rescue und OCRL^{WT+18a}_rescue unterscheidet sich deutlich von der Verteilung in OCRL-depletierten Zellen: der überwiegende Vesikelanteil findet sich in der arbiträren Vesikelgröße ≤ 40 , wogegen nur wenige Vesikel eine Vesikelgröße von 61-80 und ≥ 81 haben. Diese Unterschiede zu den OCRL KD-Zellen sind statisch höchst signifikant ($p < 0,001$). Damit zeigt die Vesikelgrößenverteilung dieser Zellen Ähnlichkeit zu der in den GFP-siRNA-transfizierten Kontrollzellen detektierten Verteilung (siehe dazu Abb. 5.10). Verglichen mit den OCRL KD-Zellen konnte dagegen keine Veränderung in der Vesikelgrößenverteilung bei HeLa-Zellen gefunden werden, die eine Phosphatase-defiziente OCRL-Variante überexprimierten. Einzige Ausnahme bildet dabei die Überexpression von OCRL^{R493A/R500T-18a}_rescue, für die ein signifikant erhöhter Vesikelanteil der Vesikelgröße 61-80 im Vergleich zu den OCRL-depletierten Zellen vorliegt ($p < 0,05$). Diese Ergebnisse zeigen, dass das OCRL WT-Protein die MPR300-Fehlverteilung komplementiert, die Phosphatase-defiziente OCRL-Proteinvariante jedoch nicht.

5.3.2 Immunzytochemische Bestimmung der Verteilung von Phosphoinositiden in OCRL-depletierten HeLa-Zellen

Die Komplementationsstudien haben gezeigt, dass nur durch Überexpression eines OCRL-Proteins mit intakter Phosphatase-Domäne die Fehlverteilung des MPR300 nach OCRL-Depletion behoben wird. Die Dephosphorylierung von PI(4,5)P₂ durch OCRL könnte also für den retrograden M6P-Rezeptor-Transport von Bedeutung sein. Im folgenden Versuch sollte daher die Phosphoinositid-Verteilung nach OCRL KD untersucht werden. Um dies zu ermöglichen, wurde je eine GFP-gekoppelte PH-Domäne von zwei verschiedenen Proteinen in HeLa-Zellen überexprimiert, die zuvor mit OCRL- bzw. *Lamin A*-spezifischer siRNA transfiziert wurden. Zum einen wurde die PH-Domäne des *four-phosphate-adaptor protein 1* (FAPP1) verwendet,

die spezifisch an das Produkt der OCRL-katalysierten Dephosphorylierungsreaktion, PI(4)P, bindet (Godi et al., 2004). Die Detektion von PI(4,5)P₂, dem Substrat von OCRL, erfolgte durch Überexpression der Phospholipase C-delta 1- (δ -PLC-) PH-Domäne (Garcia et al., 1995). Nach Fixierung der Zellen wurden die Präparate am cLSM ausgewertet (Abb. 5.23). Die FAPP1-PH-Domäne zeigt eine perinukleäre Verteilung, die mit der beschriebenen Golgi-Lokalisation von PI(4)P übereinstimmt (Di Paolo und De Camilli, 2006). Zwischen den OCRL KD- und Kontrollzellen sind qualitativ keine Unterschiede ersichtlich. PI(4,5)P₂ ist in der Zelle hauptsächlich an der Plasmamembran zu finden, was durch die Verteilung der δ -PLC-PH-Domäne bestätigt wird. Auch hier sind keine Unterschiede in der PI(4,5)P₂-Verteilung zwischen Kontrollzellen und OCRL-depletierten Zellen erkennbar.

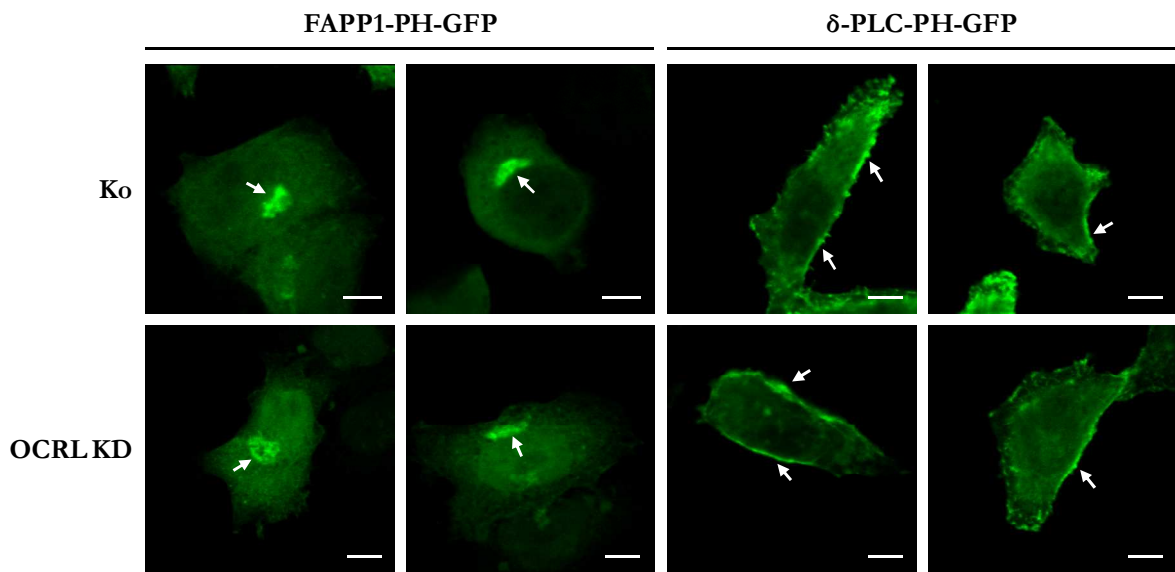


Abb. 5.23: Visualisierung der subzellulären Verteilung von Phosphoinositiden in *OCRL*- und *Lamin A*-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen durch Überexpression von GFP-gekoppelten PH-Domänen. HeLa-Zellen wurden für 72 h mit *OCRL*- (*OCRL* KD) bzw. *Lamin A*-spezifischer siRNA als Kontrolle (Ko) transfiziert und eine GFP-gekoppelte FAPP1-PH-Domäne zur Visualisierung von PI(4)P (links) bzw. δ -PLC-PH-Domäne zur Visualisierung von PI(4,5)P₂ (rechts) über Nacht transient in den Zellen überexprimiert. Anschließend wurden die Zellen für Immunfluoreszenzanalysen fixiert. Die weißen Pfeile weisen auf die primäre Lokalisation der Phosphoinositide hin. Die weißen Balken entsprechen einer Länge von 5 μ m. Ausgewertet wurden die Immunfluoreszenzpräparate mit einem cLSM.

5.3.3 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der Adaptorproteine AP1, AP2 und AP3 in HeLa-Zellen nach *OCRL*-Depletion

Obwohl auf zellulärem Niveau keine veränderte Phosphoinositid-Verteilung erkennbar war, ist dennoch eine lokale Modulierung der Phosphoinositid-Level durch *OCRL* möglich, die sich auf die Rekrutierung von Adaptorproteinen auswirken kann. Diese sind für die Bildung der CCVs essentiell. Für den retrograden Transport des MPR46 konnte bereits eine Beteiligung der Adaptorproteine AP1 und AP3 gezeigt werden (siehe 2.4). Daher sollte die intrazelluläre Verteilung von AP1 und AP3 nach *OCRL* KD untersucht werden. Zusätzlich erfolgte eine Detektion des Adaptorproteins AP2, das für die Bildung endozytotischer CCVs benötigt wird (siehe 2.3).

Für den Versuch wurden HeLa-Zellen mit *OCRL*- bzw. *GFP*-spezifischer siRNA transfiziert und für die Immunfluoreszenzfärbung fixiert. Zur Visualisierung der Adaptorprotein-Verteilung wurden anti-AP1-, anti-AP2- bzw. anti-AP3-Antikörper, gefolgt von einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper, verwendet (grün). Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden am cLSM ausgewertet und repräsentative Aufnahmen in Abb. 5.24 dargestellt. Die Färbungen zeigen eine vesikuläre Verteilung der Adaptorproteine. Die AP1-Färbung von überwiegend perinukleären Vesikeln stimmt mit der beschriebenen Lokalisation von AP1 an hauptsächlich TGN-assoziierten Strukturen überein (Ahle et al., 1988). AP3 zeigt ebenfalls eine perinukleäre Verteilung, jedoch ist diese weniger kompakt als bei AP1. Zusätzlich kann mehr AP3 an Vesikeln detektiert werden, die im Zytoplasma verstreut sind. AP2-positive Vesikel sind über das gesamte Zytoplasma verteilt, mit einer teilweise verstärkten Anhäufung an der Zellperipherie, in Korrelation mit der Funktion im endozytotischen Transportweg. Für keines der drei Adaptorproteine konnte also eine veränderte Lokalisation in *OCRL* KD-Zellen detektiert werden.

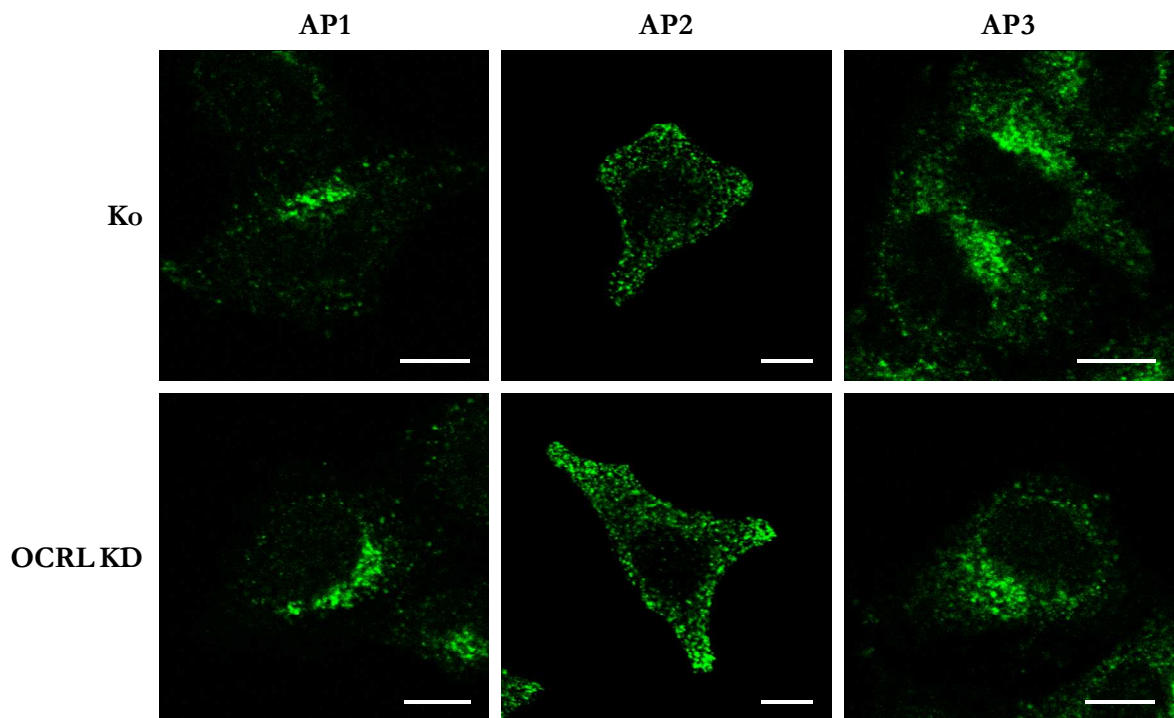


Abb. 5.24: Subzelluläre Lokalisation der Adaptorproteine AP1, AP2 und AP3 in HeLa-Zellen nach *OCRL*- bzw. *GFP*-siRNA-Transfektion. Im Anschluss an eine 72-stündige Transfektion von HeLa-Zellen mit *OCRL*- (*OCRL* KD) bzw. *GFP*-spezifischer siRNA als Kontrolle (Ko) wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzanalyse fixiert. Die Adaptorproteine wurden durch Verwendung eines anti-AP1- (links), eines anti-AP2- (Mitte) sowie eines anti-AP3-Antikörpers, gefolgt von einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper, detektiert. Die weißen Balken entsprechen einer Länge von 10 μm . Ausgewertet wurden die Immunfluoreszenzpräparate mit dem cLSM.

5.4 Untersuchungen zur Rolle des OCRL-Proteins in verschiedenen zellulären Prozessen

5.4.1 Biochemische Quantifizierung des Phosphorylierungszustandes der Serin/Threonin-Kinase Akt in HeLa-Zellen nach OCRL-Depletion

Neben einer Funktion von OCRL in verschiedenen Transportwegen der Zelle ist auch eine Beteiligung an anderen zellulären Prozessen denkbar. Die Interaktion von OCRL mit dem endosomalen Adaptorprotein APPL1 könnte eine Verbindung zu Signaltransduktionskaskaden herstellen. Diese Annahme stützt sich auf die Beobachtung von Mitsuuchi und Mitarbeitern (1999), dass APPL1 mit der Serin/Threonin-Kinase Akt, einem Apoptose-Suppressor, interagiert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von APPL1 eine erhöhte Phosphorylierung und damit erhöhte Aktivität von Akt zur Folge hat, wogegen nach APPL1-Depletion, mit oder ohne Wachstumsfaktor-Stimulierung, eine Aktivierung von Akt ausbleibt (Yang et al., 2003). In dieser Arbeit sollte daher die Aktivierung von Akt nach Stimulation mit EGF in OCRL-depletierten Zellen untersucht werden. HeLa-Zellen wurden zunächst mit OCRL- bzw. GFP-spezifischer siRNA transfiziert und anschließend für 20 min mit EGF stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde die Menge an Gesamt-Akt (Akt) und phosphoryliertem, aktivem Akt (P-Akt) in der Immundetektion durch Verwendung von anti-Akt- und anti-P-Akt-Antikörpern bestimmt.

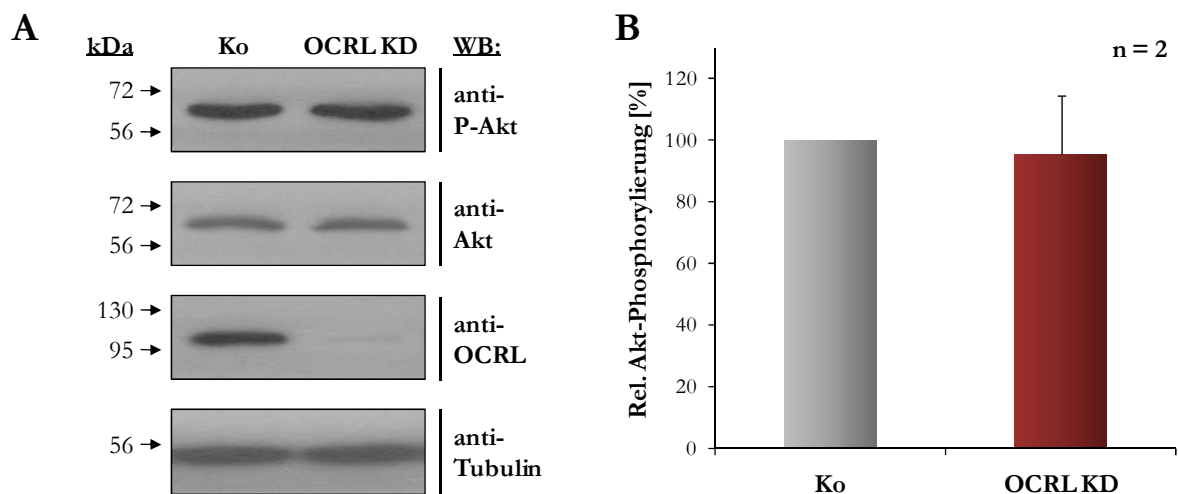


Abb. 5.25: Bestimmung der Menge an phosphoryliertem Akt in OCRL- bzw. GFP-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen nach EGF-Stimulierung. (A) HeLa-Zellen wurden nach 72-stündiger Transfektion mit OCRL- (OCRL KD) bzw. GFP-spezifischer siRNA als Kontrolle (Ko) mit 10 ng/ml EGF für 20 min stimuliert. Nach Zelllyse wurde der Level an phosphoryliertem Akt (P-Akt) in der Immundetektion mit einem anti-P-Akt Antikörper detektiert (oberer Blot). Gesamt-Akt konnte durch Verwendung eines anti-Akt Antikörpers in der Immundetektion dargestellt werden (2. Blot von oben). Die Kontrolle des OCRL KD wurde durch Verwendung eines anti-OCRL-Antikörpers in der Immundetektion erbracht (2. Blot von unten). Der untere Blot zeigt die Immundetektion des Haushaltsproteins Tubulin mit einem anti-Tubulin-Antikörper. Die Blots zeigen repräsentative Ergebnisse von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Molekulargewichte des verwendeten Massenstandards sind links neben den Blots angegeben. (B) Quantitative Auswertung der relativen Phosphorylierung von Akt. Es wurde der Quotient der densitometrisch ermittelten Werte von P-Akt und Akt gebildet und die relative Menge von P-Akt nach OCRL KD prozentual zu den Kontrollzellen mit Standardabweichung ermittelt. WB: Western-Blot.

Die abgebildeten, repräsentativen Blots aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen zeigen qualitativ keine Unterschiede in der Bandenstärke von Akt und P-Akt zwischen OCRL KD- und Kontrollzellen (Abb. 5.25 A, obere Blots). Auch im Vergleich zur Ladekontrolle Tubulin, das mit einem anti-Tubulin-Antikörper detektiert wurde (unterer Blot), ist keine veränderte Menge von Akt und P-Akt nach OCRL KD ersichtlich. Für eine quantitative Aussage wurden die Banden densitometrisch vermessen und der Quotient aus Akt und P-Akt gebildet. Die relative Menge an P-Akt nach OCRL KD wurde prozentual zu den Kontrollzellen bestimmt und im abgebildeten Balkendiagramm dargestellt (Abb. 5.25 B). Auch quantitativ wurde eine vergleichbare Akt-Phosphorylierung in OCRL KD- und Kontrollzellen nach EGF-Stimulierung detektiert.

5.4.2 Untersuchungen zum Einfluss einer OCRL-Depletion auf das Aktin-Zytoskelett in HeLa-Zellen

Das Substrat von OCRL, PI(4,5)P₂, ist ein kritischer Faktor in der N-WASP-vermittelten, Arp2/3-abhängigen Assemblierung von F-Aktin, dem Grundbaustein des Aktin-Zytoskeletts (Rohatgi et al., 1999; Rohatgi et al., 2000). Über Modulierung der PI(4,5)P₂-Menge durch die OCRL-gesteuerte Dephosphorylierung dieses Phosphoinositids könnte OCRL in die Regulation der F-Aktin-Assemblierung eingreifen. In der Literatur gibt es bereits erste Hinweise auf einen Einfluss des OCRL-Proteins auf das Aktin-Zytoskelett und Aktin-Zytoskelett-gesteuerte Prozesse (Suchy und Nussbaum, 2002; Allen, 2003; Faucherre et al., 2005; Coon et al., 2009). In dieser Arbeit sollte daher das Aktin-Zytoskelett in OCRL-depletierten HeLa-Zellen untersucht werden. Dafür wurden HeLa-Zellen zunächst mit OCRL- bzw. GFP-spezifischer siRNA transfiziert und dann für die Immunfluoreszenzanalyse fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde durch Färbung von F-Aktin mit dem Texas Red-gekoppelten Phalloidin Phalloidin detektiert (rot). Die DNA wurde mittels DAPI angefärbt (blau). Die Immunfluoreszenzpräparate wurden am cLSM ausgewertet und repräsentative Aufnahmen in Abb. 5.26 abgebildet. Die Kontrollzellen zeigen nur wenige Aktin-Fasern, die überwiegend entlang der Plasmamembran verlaufen. Auch in OCRL-depletierten Zellen finden sich Aktin-Fasern an der Plasmamembran. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen zeigen die OCRL KD-Zellen jedoch eine verstärkte Bildung von netzartigen Aktin-Strukturen im Zytoplasma, was auf eine vermehrte Bildung von Stressfasern nach OCRL-Depletion hinweist.

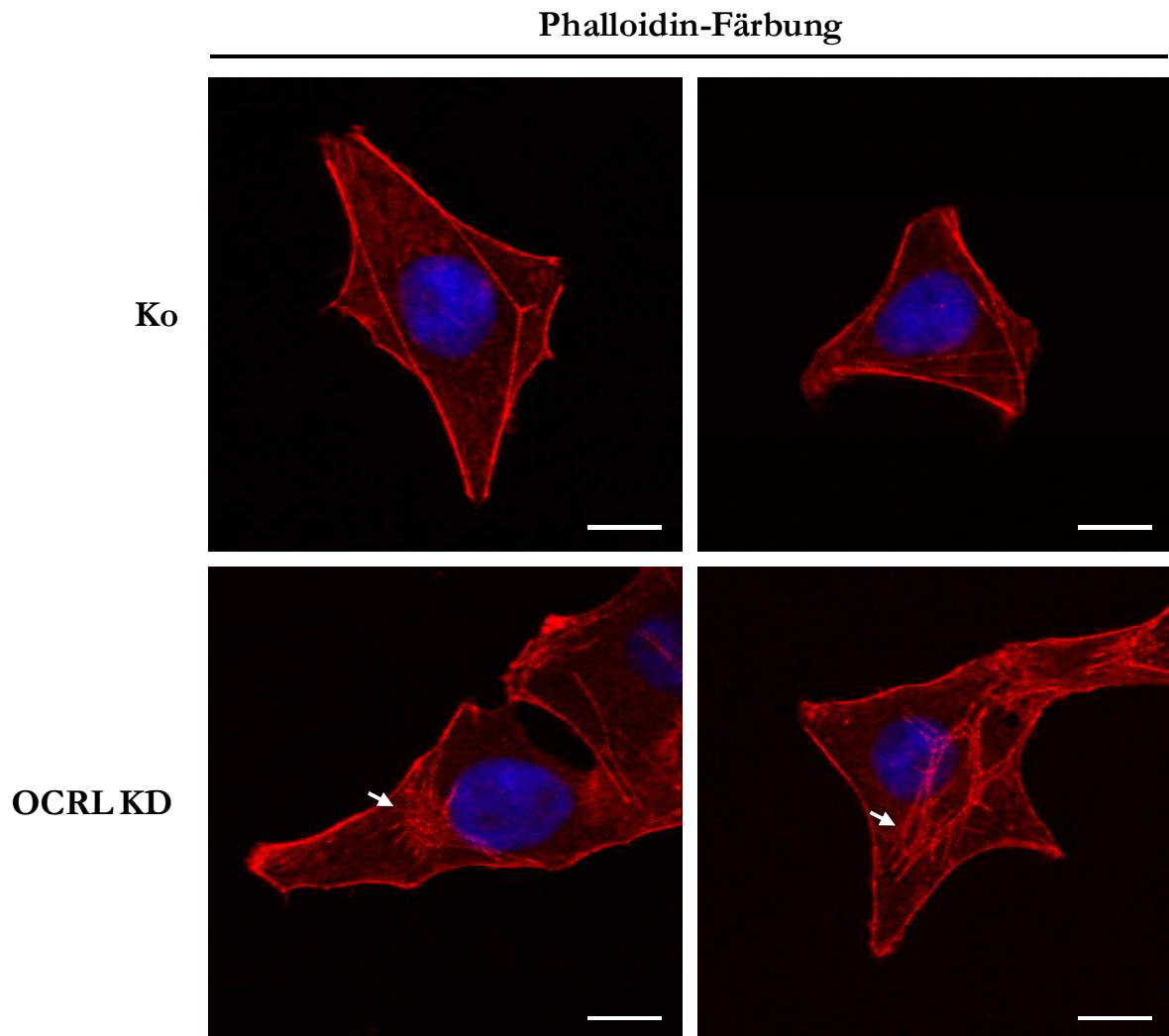


Abb. 5.26: Phalloidin-Färbung zur Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts in HeLa-Zellen nach *OCRL*- bzw. *GFP*-siRNA-Behandlung. HeLa-Zellen wurden für die Immunfluoreszenzanalyse für 72 h mit *OCRL*- (*OCRL* KD) und *GFP*-spezifischer siRNA als Kontrolle (*Ko*) transfiziert und anschließend fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde durch die Anfärbung von F-Aktin mit dem Phallotoxin Phalloidin detektiert (rot). Die weißen Pfeile weisen auf verstärkte Stressfasern nach *OCRL* KD hin. Die DNA wurde durch Verwendung von DAPI angefärbt (blau). Die weißen Balken entsprechen einer Länge von 10 μ m. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit einem cLSM ausgewertet.

6 DISKUSSION

6.1 Der verminderte retrograde M6P-Rezeptor-Transport nach OCRL-Depletion geht mit einer erhöhten MPR300-Endozytose einher

Zu Beginn dieser Arbeit stand die Frage im Vordergrund, ob eine OCRL-Defizienz zu einer gestörten Clathrin-vermittelten Endozytose (CME) führt. Die Lokalisation von OCRL an der Plasmamembran (Faucherre et al., 2005) und an endozytotischen Vesikeln (Erdmann et al., 2007) sowie die OCRL-vermittelte Clathrinhüllen-Bildung *in vitro* (Choudhury et al., 2005; Mao et al., 2009) ließen vermuten, dass OCRL in die Entstehung von CCVs involviert ist. Darüber hinaus kann die OCRL-vermittelte PI(4,5)P₂-Dephosphorylierung eine regulatorische Funktion von OCRL in der Clathrin-Deassemblierung und der Modulierung des Aktin-Zytoskeletts während der CME vermuten lassen. Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zur TfR-Endozytose in OCRL-depletierten HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass die TfR-Endozytose nicht beeinträchtigt ist. Dieses Ergebnis wird durch die Daten von Coon und Mitarbeitern (2009) sowie durch die Ergebnisse aus der Dissertation von Juliane Najm (2009), die beide Hautfibroblasten von Patienten mit LS für ihre Untersuchungen nutzten, gestützt. Obwohl demnach kein Hinweis auf eine Funktion von OCRL in der CME gefunden wurde, konnte nach transienter Überexpression einer OCRL-Variante mit fehlender Phosphatase-Domäne in HeLa-Zellen (Choudhury et al., 2009) sowie eines OCRL WT-Proteins in COS-7-Zellen (Najm, 2009) eine reduzierte Tf-Aufnahme detektiert werden. Die transiente Überexpression von OCRL hat jedoch den Nachteil schwankender Expressionslevel. Um eine konstante OCRL-Expression zu erhalten, wurden daher in dieser Arbeit stabil OCRL-überexprimierende CV1-Zelllinien generiert und die TfR-Endozytose in diesen Zellen getestet. Diese war zwischen der OCRL^{WT}- und der Phosphatase-defizienten OCRL^{R493A/R500T}-CV1-Zelllinie sowie im Vergleich zu der als Kontrolle dienenden CAT-CV1-Zelllinie vergleichbar. Aufgrund dieses Ergebnisses ist die reduzierte Tf-Aufnahme nach transienter Überexpression von OCRL-Varianten vermutlich auf unterschiedliche OCRL-Expressionslevel zurückzuführen. Es kann daher angenommen werden, dass OCRL eher keine generelle Funktion bei der CME hat.

Die Interaktion von OCRL mit Komponenten des endozytotischen Transportweges bedeutet also nicht notwendigerweise, dass OCRL eine Funktion in diesem Prozess ausübt. Die Vermutung, dass OCRL für die Rekrutierung von Adaptorproteinen und Clathrin an die CCPs benötigt wird, wird durch die unveränderte AP2-Lokalisation nach OCRL-Depletion in dieser Arbeit und AP2- und Clathrin-Lokalisation in LS-Fibroblasten in der Arbeit von Coon und Mitarbeitern (2009) entkräftet. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass die AP2- und Clathrin-Bindung für eine Lokalisation von OCRL an der Plasmamembran benötigt wird, um dort eine Funktion in der Aktin-Zytoskelett-vermittelten Zellmigration auszuüben (Coon et al., 2009). In der Literatur wurde zudem die Vermutung aufgestellt, dass die Interaktion von OCRL mit APPL1 eine Verbindung zur CME des Multi-Liganden-Rezeptors Megalin darstellt (Erdmann et al., 2007). Die in der Arbeit von Cui und Mitarbeitern (2010) detektierte, unveränderte Aufnahme

von Liganden über Megalin in OCRL-depletierten proximalen Tubulus-Zellen entkräftet jedoch diese Theorie. Aufgrund der erhöhten Aktivität der Serin-/Threonin-Kinase Akt nach Überexpression des OCRL-Interaktionspartners APPL1 (Yang et al., 2003) wurde für OCRL zudem eine modifizierende Rolle bei der Regulation von Signaltransduktionskaskaden postuliert. Die hier detektierte, unveränderte Akt-Aktivität in EGF-stimulierten, OCRL-depletierten Zellen konnte diese Annahme jedoch nicht bestätigen. Stattdessen könnte die APPL1-OCRL-Interaktion lediglich für einen Rücktransport von OCRL von der Plasmamembran zum Endosom sorgen.

Neben der TfR-Endozytose wurde in dieser Arbeit auch die Internalisierung des MPR300 untersucht. Dabei wurde zum einen eine erhöhte MPR300-Menge an der Plasmamembran nach OCRL-Depletion in HeLa-Zellen detektiert, zum anderen war die MPR300-Internalisierungsrate erhöht, d. h. pro Zeiteinheit wurden mehr MPR300 als in Kontrollzellen internalisiert (Abb. 6.1). Der MPR300 wird wie der TfR Clathrin-abhängig in die Zelle transportiert (Collawn et al., 1991; Trowbridge, 1991). Aufgrund der unveränderten TfR-Internalisierung nach OCRL-Depletion wurde jedoch postuliert, dass OCRL keine Rolle bei der CME spielt. Die erhöhte MPR300-Endozytose kann daher nicht mit einer gestörten CME erklärt werden.

Einen möglichen Erklärungsansatz liefert dagegen ein im weiteren Verlauf der Arbeit erhaltenes Ergebnis: Neben der erhöhten MPR300-Endozytose wurde eine Fehlverteilung von endogenem MPR46 und MPR300 in vergrößerten endosomalen Kompartimenten nach OCRL-Depletion in HeLa-Zellen detektiert (Abb. 6.1). Diese Beobachtung bestätigt die bereits beschriebene Relokalisation eines stabil-überexprimierten, CD8-markierten MPR300 in endosomalen Strukturen nach Überexpression verschiedener OCRL-Proteinvarianten bzw. OCRL-Depletion in HeLa-Zellen (Choudhury et al., 2005). Die Verwendung spezifischer endosomaler Marker ermöglichte erstmals eine genaue Charakterisierung der vergrößerten MPR300-positiven Endosomen. Die Kolo-kalisation des MPR300 mit Markern des frühen Endosoms sowie mit SNX1 als Komponente des Retromer-Komplexes belegt eine Lokalisation des MPR300 in vergrößerten, Retromer-assoziierten Endosomen. Der Retromer-Komplex ist am retrograden Transport des M6P-Rezeptors beteiligt (Seaman, 2004) und assembliert an endosomalen Strukturen, die positiv für Marker des frühen Endosoms sind, intraluminale Vesikel enthalten und eine Clathrin-Hülle aufweisen (Arighi et al., 2004; Carlton et al., 2004). Aufgrund dieser Charakteristika können die hier detektierten MPR300-positiven, vergrößerten Endosomen vermutlich als Intermediärform zwischen frühem und spätem Endosom definiert werden (Raposo et al., 2001).

Die gezeigte Akkumulation des endogenen MPR300 in möglichen Intermediärformen zwischen frühen und späten Endosomen sowie eine vergleichbare Fehlverteilung des MPR46 nach OCRL-Depletion könnte auf eine Störung im Reifungsprozess des endosomalen Kompartiments von frühen zu späten Endosomen zurückzuführen sein. Dieser Reifungsprozess wird in Vertebraten vermutlich durch Mon1 reguliert, indem es die Rab5-Aktivierung unterbindet und stattdessen Rab7 durch Proteininteraktionen an das reifende Endosom rekrutiert (Poteryaev et al., 2010). Die Depletion von Mon1 führt zu stark vergrößerten, frühen Endosomen (Poteryaev et al., 2010), was in Übereinstimmung mit der hier beobachteten Lokalisation des MPR300 nach OCRL-Depletion ist. Über die Interaktion mit Rab5 ist OCRL am frühen Endosom lokalisiert

(Hyvola et al., 2006). Dort könnte OCRL über weitere Interaktionen mit Effektor-Proteinen eine Funktion bei der Rekrutierung von Rab7 spielen. Eine Interaktion mit Rab7 selbst konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Hou et al., 2011). Die durch Mon1-vermittelte Reifung vom frühen zum späten Endosom ist zudem PI(3)P abhängig (Poteryaev et al., 2010). Dieses Phosphoinositid gehört jedoch nicht zu den von OCRL erkannten Substraten. Über die OCRL-Phosphatase-aktivität wäre eine Funktion in diesem Prozess also eher unwahrscheinlich. Darüber hinaus entkräftet der nach Überexpression eines OCRL WT-Proteins und einer OCRL-Variante mit fehlender Phosphatase-Domäne beobachtete Block im Transport des bakteriellen Toxins STxB vom Endosom zum Golgi (Choudhury et al., 2005) die Theorie, dass OCRL in die Reifung vom frühen zum späten Endosom involviert ist. STxB wird vermutlich ausschließlich über den frühen retrograden Transportweg zum TGN transportiert (Mallard et al., 1998). Bei einer Störung im endosomalen Reifungsprozess nach OCRL-Depletion wäre aber sehr wahrscheinlich nur der späte TIP47/Rab9-vermittelte, retrograde Transportweg betroffen, weswegen eine Funktion von OCRL im endosomalen Reifungsprozess eher nicht anzunehmen ist.

Da die MPR300-Akkumulation in endosomalen Intermediärformen demnach nicht mit einer gestörten Endosomen-Reifung nach OCRL-Depletion zu erklären war, bot ein möglicher Defekt im retrograden Transport der M6P-Rezeptoren eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Fehlverteilung der M6P-Rezeptoren (Choudhury et al., 2005). Durch radioaktive Sulfatidierung einer stabil-überexprimierten MPR46-Variante konnte in dieser Arbeit in der Tat ein verminderter, retrograder Transport des MPR46 nachgewiesen werden (Abb. 6.1). Wie bereits angedeutet, liefert diese Beobachtung einen Erklärungsansatz für die erhöhte MPR300-Endozytose: Durch die Aufstauung des M6P-Rezeptors im frühen Endosom aufgrund des verminderten TGN-Rücktransports werden verstärkt MPR300 aus dem TGN-Endosom-Transportweg in den endozytotischen Transportweg zwischen Plasmamembran und Endosom eingeschleust. Die Erhöhung des Plasmamembran-Anteils des MPR300 hat eine ebenfalls erhöhte MPR300-Internalisierung zur Folge. Gestützt wird diese Annahme durch eine erhöhte MPR300-Menge an der Plasmamembran nach Depletion des Retromerproteins Vps26 in HeLa-Zellen, was ebenfalls einen gestörten retrograden Transport hervorruft (Seaman, 2004). Auch in $\mu 1A^{-}$, einer Untereinheit des Adaptorproteins AP1, defizienten Fibroblasten kommt es zu einer Kompensation des retrograden Transportblocks durch Erhöhung der MPR300-Internalisierungsrate (Meyer et al., 2001). Als weiterer Mechanismus zur Kompensation des Defekts im M6P-Rezeptor-Rücktransport zum TGN ist ein verringerter M6P-Rezeptor-Level, bedingt durch eine erhöhte Abbaurate, denkbar (Seaman, 2004). In OCRL-depletierten HeLa-Zellen konnte jedoch keine Veränderung in der MPR300-Gesamt-Proteinmenge, bedingt durch eine verkürzte MPR300-Halbwertszeit, detektiert werden. Ob es letztlich zu einem erhöhten MPR300-Transport an die Plasmamembran oder einer erhöhten MPR300-Abbaurate als Kompensationsreaktion auf einen gestörten retrograden Transports kommt, ist vermutlich Zelltyp-abhängig, da der Anteil von M6P-Rezeptoren im endozytotischen Transportweg von Zelltyp zu Zelltyp variiert. Dieser ist vermutlich von der primären Lokalisation des M6P-Rezeptors am TGN oder am endosomalen/prälysosomalen Kompartiment abhängig (Seaman, 2004).

Eine Akkumulation und Fehlverteilung des M6P-Rezeptors und/oder M6P-Rezeptor-Degradation, bedingt durch einen retrograden Transport-Block, verursacht oftmals eine Erhöhung in der M6P-Rezeptor-unabhängigen Sekretion lysosomaler Enzyme ins extrazelluläre Medium (Seaman, 2004; Ganley et al., 2008; Progida et al., 2010). Bei Patienten mit LS wurden bereits erhöhte Mengen lysosomaler Enzyme in Blutplasma und Urin detektiert (Ungewickell und Majerus, 1999; Norden et al., 2008). Cui und Mitarbeiter (2010) konnten zudem eine erhöhte Sekretion von Cath D in OCRL-depletierten proximalen Tubulus-Zellen detektieren. Die in dieser Arbeit verwendeten HeLa-Zellen zeigten dagegen nach Anwendung zweier unterschiedlicher Methoden keine vermehrte Sekretion lysosomaler Enzyme nach OCRL-Depletion. Da es sich bei der HeLa-Zelllinie nicht um einen Zelltyp aus einem beim LS betroffenen Organ handelt, wäre es denkbar, dass der erhöhte MPR300-Transport an die Plasmamembran bereits ausreicht, um den M6P-Rezeptor-Transportdefekt zwischen Endosom und TGN auszugleichen. In beim LS betroffenen Geweben wäre dagegen zusätzlich eine kompensatorische Erhöhung des sekretorischen Transportweges nötig. Auch möglich ist die von Norden und Mitarbeitern (2008) diskutierte, vermehrte Sekretion saurer Hydrolasen aufgrund einer erhöhten Sekretion Liganden-gebundener MPR300. Durch die stetig ansteigende Menge an MPR300 im endozytotischen Transportweg könnte es schließlich zu einer solch verstärkten MPR300-Sekretion über die Plasmamembran kommen. Zudem könnte die erhöhte MPR300-Internalisierungsrate aufgrund eines damit vermutlich verbundenen, verkürzten Aufenthalts des MPR300 im endosomalen Kompartiment zu einer verminderten Liganden-Dissoziation im Endosom führen. Aufgrund des nach wie vor Liganden-gebundenen MPR300 und/oder Sekretion des MPR300 wäre eine Reinternalisierung von zuvor Rezeptor-unabhängig sekretierten lysosomalen Enzymen dann nicht mehr möglich (Abb. 6.1). Dies hätte die bei Patienten mit LS bereits beschriebene, extrazelluläre Akkumulation lysosomaler Enzyme zur Folge (Ungewickell und Majerus, 1999; Norden et al., 2008). Diese Theorie wird durch eine in der Dissertation von Juliane Najm (2009) beobachtete, reduzierte ASB-Internalisierung über den MPR300 in LS-Fibroblasten bestärkt. Auch die in dieser Arbeit detektierte Zunahme in Größe und Anzahl Lamp1-positiver Lysosomen spricht für einen Defekt im lysosomalen Transport saurer Hydrolysen, da derselbe Phänotyp bei Hautfibroblasten von Patienten mit lysosomalen Speicherkrankheiten beobachtet wurde, die eine Defizienz für bestimmte lysosomale Enzyme aufweisen (Karageorgos et al., 1997). Die verminderte Anzahl saurer Hydrolasen im Lysosom führt zu einer verminderten Proteindegradierung und somit Anschwellung der Lysosomen. Da Lamp2 wie Lamp1 in Lysosomen lokalisiert ist, wäre auch eine Zunahme in Größe und Anzahl der Lamp2-positiven Lysosomen zu erwarten gewesen. Warum dies in dieser Arbeit nach OCRL-Depletion nicht detektiert werden konnte, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt werden; hier sind weitere Experimente notwendig. Die unter Umständen verminderte Anzahl lysosomaler Enzyme im Lysosom könnte durch die hier diskutierte, fehlende Reinternalisierung und Weiterleitung sekretierter Enzyme zum Lysosom erklärt werden. Ein gestörter Transport saurer Hydrolasen über den anterograden Transportweg kommt dagegen als Erklärung für die veränderte Lysosomenmorphologie eher nicht in Frage, da die in dieser Arbeit detektierten, unveränderten Mengen an reifem Cath D und Cath Z zeigen, dass lysosomale Enzyme weiterhin über den anterograden

Transportweg ins Lysosom gelangen. Die erhöhte Menge der Intermediärform von Cath D, die bereits vor Ankunft im Lysosom im späten Endosom gebildet wird, spricht für eine längere Verweildauer der Intermediärform im späten endosomal Kompartiment, vielleicht als Folge des retrograden M6P-Rezeptor-Transportdefekts. Die außerdem erhöhte Gesamtmenge aller drei Cath D-Formen kann möglicherweise durch eine erhöhte Halbwertszeit oder Synthese von Cath D erklärt werden, was oft nach einem Defekt im anterograden Transport saurer Hydrolasen beobachtet wird (Riederer et al., 1994). Aufgrund der unveränderten Menge an neu-synthetisiertem Cath Z ist eine erhöhte Syntheserate lysosomaler Enzyme jedoch unwahrscheinlich. Ob die erhöhte Cath D-Gesamtmenge auf eine verminderte Abbaurate zurückzuführen ist, würde letztlich die Ermittlung der Halbwertszeit klären. Im Gegensatz zu den hier erzielten Ergebnissen zum anterograden Transport nach OCRL-Depletion konnte für die OCRL-Interaktionspartner IPIP27A und IPIP27B kürzlich ein Einfluss auf den Transport saurer Hydrolasen zum Lysosom nachgewiesen werden: Reifes, lysosomales Cath D wurde nach Depletion von IPIP27A bzw. IPIP27B nur noch vermindert gebildet (Noakes et al., 2011). Dies lässt auf unterschiedliche Funktionen von OCRL und IPIP27A und IPIP27B im Transport der M6P-Rezeptoren schließen.

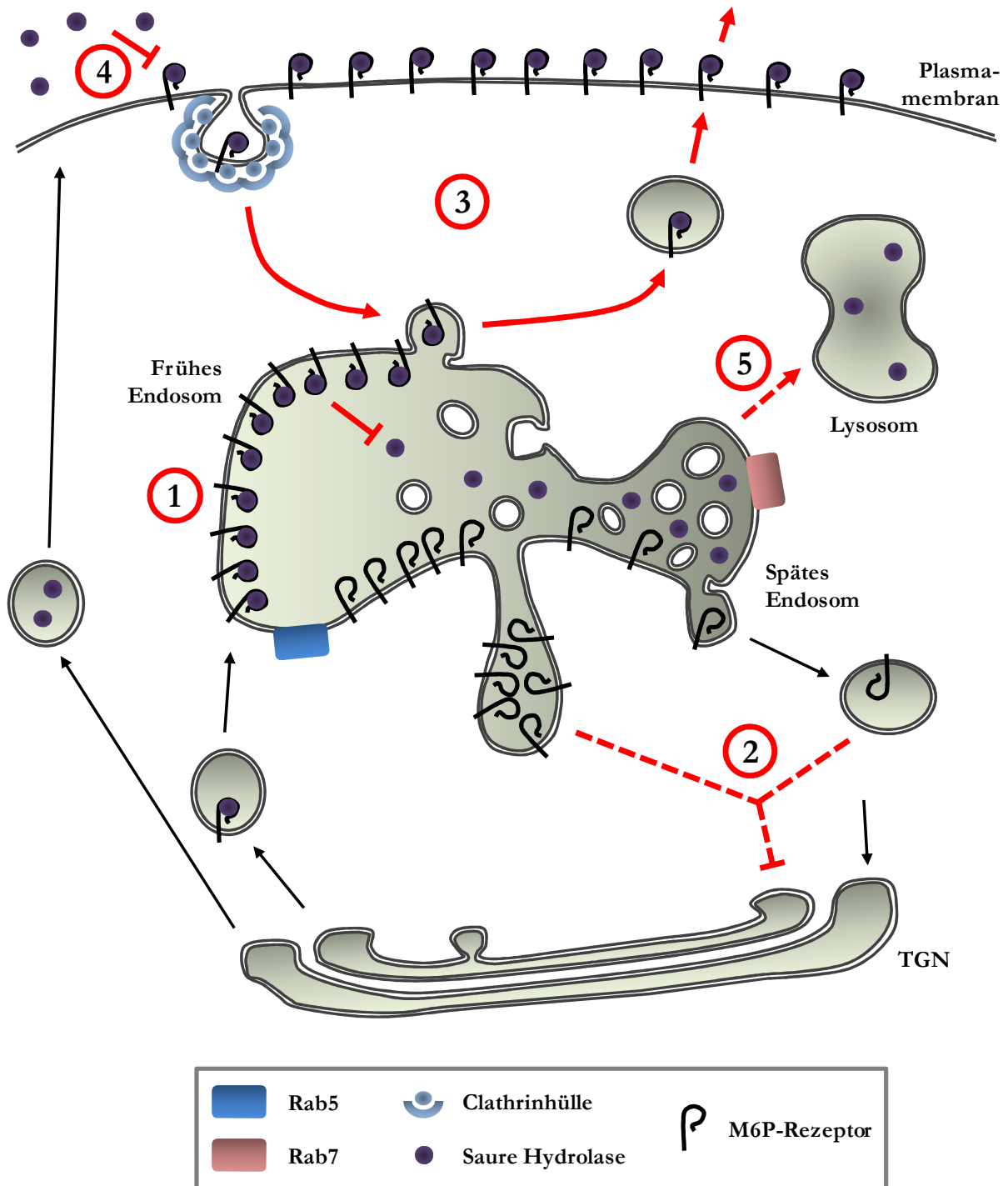


Abb. 6.1: Auswirkungen einer OCRL-Depletion auf den Transportweg des M6P-Rezeptors. Schematische Darstellung des zellulären, M6P-Rezeptor-abhängigen und -unabhängigen Transports saurer Hydrolasen in einer OCRL-depletierten Zelle. Die Akkumulation des M6P-Rezeptors im vergrößerten, reifenden Endosom (1), vermutlich bedingt durch einen verminderten retrograden Transport (2), wird durch eine vermehrte Einschleusung des M6P-Rezeptors in den endozytotischen Transportweg und Sekretion ins extrazelluläre Medium kompensiert (3). Aufgrund der erhöhten Internalisierungsrate könnte die Aufenthaltsdauer des M6P-Rezeptors im Endosom nicht ausreichend für eine effiziente Dissoziation lysosomaler Enzyme sein, woraufhin die nach wie vor Liganden-gebundenen M6P-Rezeptoren zuvor Rezeptor-unabhängig sekretierte saure Hydrolasen nicht mehr reinternalisieren können (4). Über diesen Transportweg werden daher nur noch vermindert saure Hydrolasen zum Lysosom transportiert, was zu einer veränderten Lysosomenmorphologie führen könnte (5).

6.2 Die Phosphatase-Aktivität von OCRL könnte für die Rekrutierung von Adaptorproteinen und/oder Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts im frühen retrograden Transportweg wichtig sein

Im ersten Teil der Diskussion konnte dargelegt werden, dass OCRL vermutlich keine generelle Funktion in der CME hat. In dieser Arbeit wurde allerdings eine erhöhte Menge und auch Internalisierung Plasmamembran-ständiger MPR300 in OCRL-depletierten Zellen beobachtet. Bei dieser erhöhten MPR300-Endozytose handelt es sich vermutlich um einen sekundären Effekt zur Kompensation der nach OCRL-Depletion detektierten MPR300-Akkumulation in vergrößerten, endosomalen Intermediärformen. Diese MPR300-Relokalisation ist vermutlich auf einen verminderten retrograden Transport, der für den MPR46 detektiert wurde, zurückzuführen. Da MPR46 und MPR300 identische Transportwege durchlaufen (Ghosh et al., 2003), kann von einer generellen Störung im retrograden Transport beider M6P-Rezeptoren ausgegangen werden. Der um etwa 54 % reduzierte Rücktransport des MPR46 zum TGN zeigt jedoch, dass die OCRL-Depletion keinen vollständigen Block im retrograden Transport der M6P-Rezeptoren verursacht. Einen möglichen Erklärungsansatz für dieses Ergebnis bieten die vermuteten, unterschiedlichen Rücktransportrouten des M6P-Rezeptors. In der Literatur wird häufig von einem frühen und einem späten Transport gesprochen (Johannes und Popoff, 2008). Ursprünglich wurde angenommen, dass der retrograde Transport des M6P-Rezeptors ausschließlich am späten Endosom eingeleitet wird. Dieser Clathrin-unabhängige Weg wird durch die kleine GTPase Rab9 (Lombardi et al., 1993) und deren Effektor TIP47 vermittelt (Diaz und Pfeffer, 1998). Neuere Daten liefern jedoch Hinweise auf einen zweiten Weg, der den Rücktransport des M6P-Rezeptors bereits am reifenden, frühen Endosom einleitet. Dieser Transportweg ist von verschiedenen Komponenten abhängig. Zum einen konnte der in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckte Retromer-Proteinkomplex (Seaman et al., 1997; Seaman et al., 1998) als essentiell für den retrograden M6P-Rezeptor-Transport identifiziert werden (Seaman, 2004). Als weitere Komponenten des frühen Transports gelten die Clathrin-Adaptorproteine AP1 (Meyer et al., 2000) und EpsinR (Saint-Pol et al., 2004) sowie der AP1-Interaktionspartner PACS-1 (Crump et al., 2001).

Es wäre denkbar, dass OCRL nur für einen der beiden Wege wichtig ist. In solch einem Fall könnte ein Teil der Rezeptoren weiterhin über den nicht betroffenen Weg zum Golgi zurückkehren. Die Akkumulation des MPR300 im frühen endosomalen Kompartiment in OCRL-depletierten Zellen spricht für eine Rolle von OCRL im frühen retrograden Transport, da die Depletion von Komponenten dieses Transportweges ebenfalls zu einer Relokalisation der M6P-Rezeptoren in Strukturen führt, die positiv für Marker des frühen Endosoms sind (Meyer et al., 2000; Carlton et al., 2004). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass eine Interaktion mit Rab-Proteinen für die Regulierung des retrograden Transportweges essentiell ist (Hyvola et al., 2006). Da OCRL zwar mit dem frühen endosomalen Marker Rab5, nicht jedoch mit dem späten endosomalen Marker Rab7 interagiert (Hou et al., 2011), erscheint eine Beteiligung von OCRL am frühen M6P-Rezeptor-Rücktransport wahrscheinlicher (Abb. 6.2 A). Ein Teil der M6P-Rezeptoren könnte also nach wie vor den retrograden Transport vom späten Endosom zum

TGN durchlaufen, was durch die hier beobachtete, partielle Kolokalisation des MPR300 mit Rab7 unterstützt wird. Durch die bereits beschriebene Beobachtung eines vollständigen Blocks im retrograden Transport von STxB nach Überexpression von OCRL-Proteinvarianten (Choudhury et al., 2005) wird diese Vermutung zusätzlich erhärtet (siehe 6.1).

Weiterhin sollte untersucht werden, wie OCRL in den Rücktransportprozess vom frühen Endosom zum TGN eingreift. Erst kürzlich wurde eine Fehlverteilung des CD8-markierten MPR300 in endosomalen Strukturen nach Depletion des OCRL-Interaktionspartners IPIP27A bzw. IPIP27B gezeigt, vermutlich bedingt durch einen gestörten retrograden Transport (Noakes et al., 2011). Diese Beobachtung deutet auf eine Funktion von OCRL in diesem Transportprozess, vermutlich durch Rekrutierung von Proteinen über die Protein-Protein-Interaktionsmotive von OCRL, hin. Eine Funktion im retrograden Transportweg könnte jedoch auch über die IPPc-Domäne durch Modulierung der Phosphoinositid-Level vermittelt werden (Choudhury et al., 2005). In dieser Arbeit gaben Komplementierungsexperimente Aufschluss über die Beteiligung einer OCRL-Domäne. Während die MPR300-Fehlverteilung durch überexprimiertes OCRL^{WT} komplementiert werden konnte, war dies nach Überexpression der Phosphatase-defizienten OCRL^{R493A/R500T}-Proteinvariante nicht möglich. Damit konnte die IPPc-Domäne als essentiell für die Funktion von OCRL im retrograden Transport identifiziert werden. Neben einer möglicherweise OCRL-Interaktionsdomänen-vermittelten Rekrutierung von Interaktionspartnern wie IPIP27A und IPIP27B an das Endosom, wird also auch die Phosphatase-Aktivität von OCRL für den retrograden Transport benötigt. Hinweise auf eine Regulierung der Phosphoinositid-Level durch OCRL lieferten bereits LS-Fibroblasten, in denen eine erhöhte PI(4,5)P₂-Konzentration gemessen wurde (Zhang et al., 1998). Die hier durchgeführte Überexpression von Phosphoinositid-bindenden PH-Domänen zeigte jedoch keine Veränderung in der zellulären Lokalisation von PI(4)P und PI(4,5)P₂ nach OCRL-Depletion. Die Generierung von PI(4,5)P₂ und PI(4)P an ihren Hauptbestimmungsorten, der Plasmamembran und dem Golgi, wird daher sehr wahrscheinlich durch andere Kinasen und Phosphatasen reguliert (De Matteis et al., 2002; Krauss und Haucke, 2007). Am frühen Endosom, an dem der frühe retrograde Transport vermittelt wird, ist dagegen das Phosphoinositid PI(3)P vorherrschend (Gillooly et al., 2000).

Wie ist es nun dennoch vorstellbar, dass OCRL über die Phosphataseaktivität in den frühen retrograden Transportweg eingreift? Als Ansatzpunkt dienen hier vor allem Adaptorproteine, da diese häufig über Phosphoinositid-Bindung an die Membran rekrutiert werden (Edeling et al., 2006). AP1 und EpsinR werden z. B. über PI(4)P an intrazelluläre Membranen rekrutiert (Mills et al., 2003; Wang et al., 2003) und sind zudem am Rücktransport der M6P-Rezeptoren beteiligt (Meyer et al., 2000; Medigeschi und Schu, 2003; Saint-Pol et al., 2004). Durch eine lokale Generierung von PI(4)P am frühen Endosom könnte OCRL also die Rekrutierung dieser Adaptor-Proteine an dieses Kompartiment vermitteln (Abb. 6.2 B). In dieser Arbeit wurde jedoch eine unveränderte, perinukleäre und vesikuläre Verteilung von AP-1 nach OCRL-Depletion detektiert. Da der Großteil von AP1 am TGN lokalisiert ist (Ahle et al., 1988), ist es möglich, dass die durchgeführte Methode nicht sensitiv genug ist, um eine endosomale AP1-Lokalisation im Detail zu studieren. Möglicherweise wären hierfür Kolokalisationsstudien von AP1 mit frühen endosomalen Markerproteinen, gefolgt von einer prozentualen Bestimmung des

AP1-Anteils am frühen Endosom hilfreich. Der von Choudhury und Mitarbeitern (2005) entdeckte STxB-Transportdefekt vom Endosom zum Golgi nach OCRL-Überexpression wäre jedoch nicht mit einer gestörten AP1-Rekrutierung an das Endosom zu erklären, da dieses Adaptorprotein nicht am retrograden Transport von STxB beteiligt ist. EpsinR wird dagegen sowohl für den TGN-Rücktransport der STxB-Untereinheit als auch für den der M6P-Rezeptoren benötigt (Saint-Pol et al., 2004). In der Literatur finden sich immer mehr Hinweise, dass der Clathrin-abhängige und Retromer-vermittelte retrograde Transport nicht getrennt voneinander, sondern gemeinsam agieren, wobei der Clathrin-abhängige Schritt vermutlich vor der Rekrutierung des Retromers abläuft (Saint-Pol et al., 2004; Borner et al., 2006; Popoff et al., 2007). Eine fehlerhafte Rekrutierung von EpsinR und/oder AP1 würde daher nicht nur die Clathrin-Assemblierung betreffen, sondern auch die Rekrutierung des Retromers an das Endosom verhindern. Damit könnte OCRL für die Rekrutierung der für den frühen retrograden Transport benötigten Adaptorproteine AP1 und/oder EpsinR wichtig sein.

Neben einer Rekrutierung von Adaptorproteinen an das frühe Endosom käme aber auch eine Funktion von OCRL für die Vesikel-Bildung und den Vesikel-Transport durch Regulierung des Aktin-Zytoskeletts im frühen retrograden Transportprozess in Betracht. Bisherige Daten lassen auf eine Beteiligung von Mikrotubuli (Bonifacino und Hurley, 2008), vom Dynein/Dynaktin-Proteinkomplex (Hehnl et al., 2006; Hong et al., 2009) sowie vom Retromer-assoziierten NPF WASH am frühen retrograden Transport schließen, wobei WASH die Verbindung der sich bildenden, retrograden Transportvesikel mit Mikrotubuli und eine F-Aktin-Polymerisation in Abhängigkeit von Arp2/3 vermittelt (Gomez und Billadeau, 2009). Die Modulation des Aktin-Zytoskeletts wird generell für die Entstehung neuer Vesikel benötigt (Lanzetti, 2007). Das Substrat von OCRL, PI(4,5)P₂, bindet und aktiviert den Arp2/3-Stimulator N-WASP und ist damit ein wichtiger Faktor für die Arp2/3-vermittelte F-Aktin-Assemblierung (Rohatgi et al., 1999; Rohatgi et al., 2000). In der Literatur wurden bereits Veränderungen in OCRL-defizienten Zellen hinsichtlich des Aktin-Zytoskeletts gezeigt, die mit einer PI(4,5)P₂-abhängigen F-Aktin-Polymerisation in Verbindung gebracht wurden (Suchy und Nussbaum, 2002; Allen, 2003; Faucher et al., 2005; Coon et al., 2009). Auch die hier detektierte, vermehrte Stressfaser-Bildung nach OCRL-Depletion lässt auf eine veränderte Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts schließen. Darüber hinaus bestätigt diese Beobachtung die in der Arbeit von Coon und Mitarbeitern (2009) beschriebene, verminderte Migrationsfähigkeit von LS-Fibroblasten, da Stressfasern in HeLa-Zellen überwiegend in stationären, nicht migrierenden Zellen detektiert werden (Herman et al., 1981). Neueste Daten zeigen nun auch eine Beteiligung der Arp2/3-vermittelten F-Aktin-Polymerisation am Retromer-vermittelten retrograden Transport über den NPF WASH. Die Depletion von WASH führt zu vergrößerten Endosomen (Duleh und Welch, 2010) und Relokalisation des MPR300 in vergrößerte, verstreut im Zytoplasma lokalisierte Endosomen (Gomez und Billadeau, 2009), was mit den hier erzeugten Daten übereinstimmt. Wie könnten nun der WASH-Proteinkomplex, oder genauer gesagt die dadurch vermittelte Aktin-Polymerisation am Endosom, und OCRL für den retrograden Transportweg zusammenspielen? In einem kürzlich erschienenen Übersichtsartikel von Rottner und Mitarbeitern (2010) wird die Hypothese aufgestellt, dass das Protein Annexin A2 in einer Signalkaskade zur Rekrutierung von

WASH an das Endosom beteiligt sein könnte. Annexin A2 lokalisiert am frühen Endosom (Emans et al., 1993) und wurde bereits als essentiell für den Transport vom frühen zum späten Endosom identifiziert (Mayran et al., 2003; Morel et al., 2009). Eine Funktion von Annexin A2 im frühen retrograden Transport ist also durchaus denkbar. Darüber hinaus hat Annexin A2 eine hohe Affinität für PI(4,5)P₂ (Hayes et al., 2004; Rescher et al., 2004). OCRL könnte also durch Modulierung der PI(4,5)P₂-Konzentration die Rekrutierung von Annexin A2 an das Endosom regulieren (Abb. 6.2 C). Für Annexin A2 wurde zudem eine PI(4,5)P₂-abhängige Funktion bei der Bildung von Aktin-Kometen in LS-Fibroblasten nachgewiesen: Die erhöhten PI(4,5)P₂-Level in LS-Fibroblasten führten zu einer vermehrten Bildung von Aktin-Kometen in Abhängigkeit von Annexin A2 (Hayes et al., 2009). Aktin-Kometen werden an entstehenden Vesikeln gebildet, bestehen aus polymerisiertem F-Aktin, vermittelt durch Arp2/3, sowie Aktin-bindenden Proteinen und sind an der zytoplasmatischen Vesikel-Bewegung beteiligt (Rozelle et al., 2000). Nach OCRL-Depletion könnte es, bedingt durch einen erhöhten PI(4,5)P₂-Spiegel, zu einer lokalen Anreicherung von Annexin A2 an PI(4,5)P₂-positiven Bereichen des frühen Endosoms kommen. Dies könnte eine vermehrte Rekrutierung von WASH an das frühe Endosom und eine dadurch gesteigerte Arp2/3-Polymerisation nach sich ziehen. Ob es dadurch zu einer beeinträchtigten Bildung und/oder Abschnürung von Vesikeln am frühen Endosom und/oder einer vermehrten Bildung von Aktin-Kometen an den entstehenden Vesikeln kommt, kann momentan nur spekuliert werden. In dem einen oder anderen Fall könnte aber ein verminderter, früher retrograder Transport, wie er in dieser Arbeit beobachtet wurde, das Resultat sein.

Weitere Experimente müssen zeigen, ob OCRL an der Rekrutierung der Adaptorproteine AP1 und EpsinR und/oder an der durch den WASH-Komplex vermittelten Aktin-Polymerisation am Endosom, beides für den retrograden Transport des M6P-Rezeptors wichtige zelluläre Prozesse, beteiligt ist.

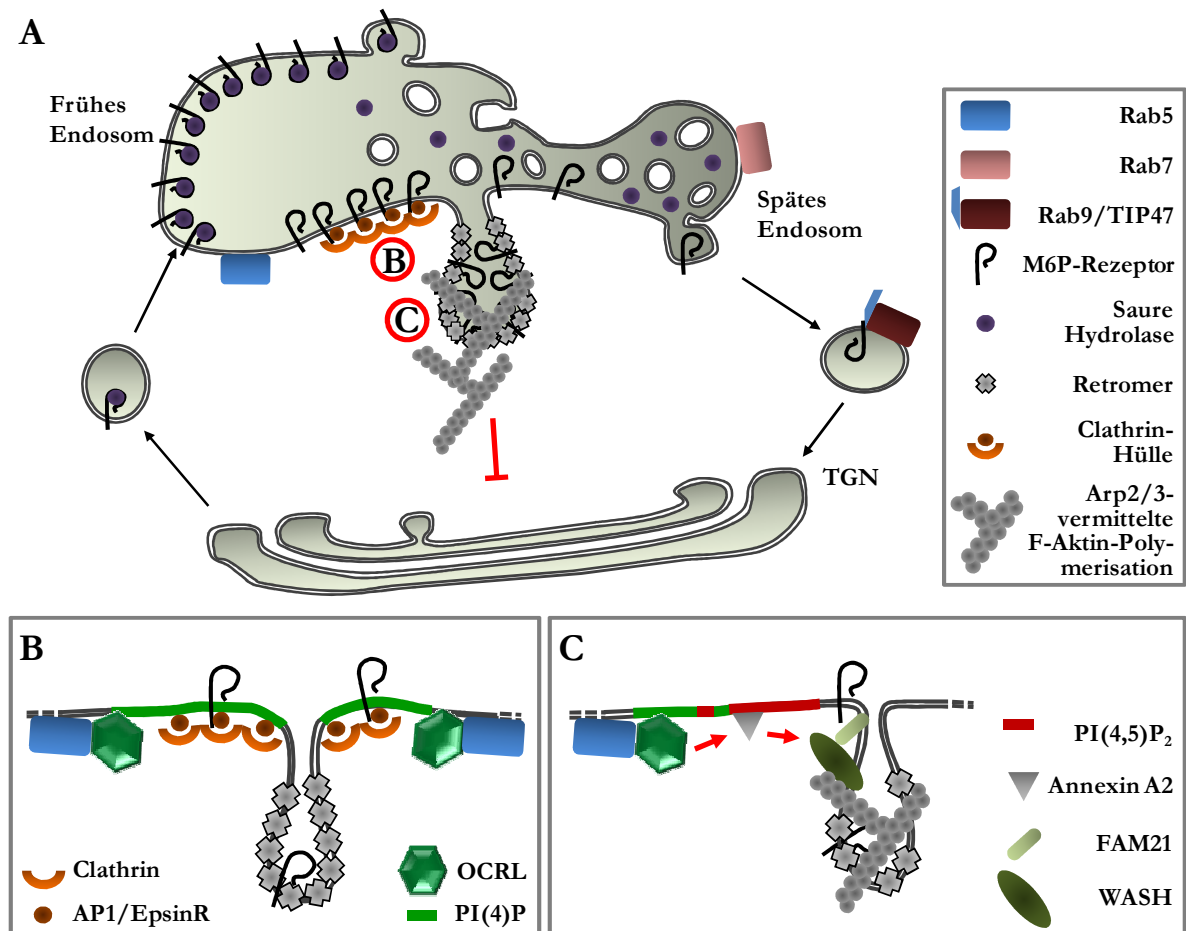


Abb. 6.2: Modelle zur Regulation des frühen retrograden Transports durch OCRL. (A) In der Übersicht ist der Transportweg des M6P-Rezeptors und seines Liganden (saure Hydrolase) zwischen TGN und Endosom in einer OCRL-depletierten Zelle graphisch dargestellt. Bei OCRL-Depletion kommt es zu einer Akkumulation des M6P-Rezeptors in vergrößerten, reifenden Endosomen, vermutlich bedingt durch einen Defekt im frühen retrograden Transport des M6P-Rezeptors (—). (B, C) Die Funktion von OCRL im frühen retrograden Transportweg könnte zum einen in der Rekrutierung der Adaptorproteine AP1 und/oder EpsinR an das frühe Endosom über Generierung von PI(4)P liegen (B). Denkbar ist auch eine OCRL-vermittelte Modulation des PI(4,5)P₂-Levels zur Regulierung der lokalen Annexin A2-Lokalisation am frühen Endosom, die einen Einfluss auf die endosomale Rekrutierung von WASH und somit auf die lokale Arp2/3-vermittelte F-Aktin-Polymerisation haben könnte (C).

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Ahle, S., Mann, A., Eichelsbacher, U. and Ungewickell, E. (1988) 'Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane', *The EMBO journal* 7(4): 919-29.
- Allen, P. G. (2003) 'Actin filament uncapping localizes to ruffling lamellae and rocketing vesicles', *Nature cell biology* 5(11): 972-9.
- Arighi, C. N., Hartnell, L. M., Aguilar, R. C., Haft, C. R. and Bonifacino, J. S. (2004) 'Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor', *The Journal of cell biology* 165(1): 123-33.
- Attree, O., Olivos, I. M., Okabe, I., Bailey, L. C., Nelson, D. L., Lewis, R. A., McInnes, R. R. and Nussbaum, R. L. (1992) 'The Lowe's oculocerebrorenal syndrome gene encodes a protein highly homologous to inositol polyphosphate-5-phosphatase', *Nature* 358(6383): 239-42.
- Baeuerle, P. A. and Huttner, W. B. (1986) 'Chlorate--a potent inhibitor of protein sulfation in intact cells', *Biochemical and biophysical research communications* 141(2): 870-7.
- Bockenbauer, D., Bokenkamp, A., van't Hoff, W., Levchenko, E., Kist-van Holthe, J. E., Tasic, V. and Ludwig, M. (2008) 'Renal phenotype in Lowe Syndrome: a selective proximal tubular dysfunction', *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 3(5): 1430-6.
- Bonifacino, J. S. and Hurley, J. H. (2008) 'Retromer', *Current opinion in cell biology* 20(4): 427-36.
- Borner, G. H., Harbour, M., Hester, S., Lilley, K. S. and Robinson, M. S. (2006) 'Comparative proteomics of clathrin-coated vesicles', *The Journal of cell biology* 175(4): 571-8.
- Braulke, T. and Bonifacino, J. S. (2009) 'Sorting of lysosomal proteins', *Biochimica et biophysica acta* 1793(4): 605-14.
- Campbell, C. H. and Rome, L. H. (1983) 'Coated vesicles from rat liver and calf brain contain lysosomal enzymes bound to mannose 6-phosphate receptors', *The Journal of biological chemistry* 258(21): 13347-52.
- Carlton, J., Bujny, M., Peter, B. J., Oorschot, V. M., Rutherford, A., Mellor, H., Klumperman, J., McMahon, H. T. and Cullen, P. J. (2004) 'Sorting nexin-1 mediates tubular endosome-to-TGN transport through coincidence sensing of high- curvature membranes and 3-phosphoinositides', *Current biology : CB* 14(20): 1791-800.
- Charnas, L., Bernar, J., Pezeshkpour, G. H., Dalakas, M., Harper, G. S. and Gahl, W. A. (1988) 'MRI findings and peripheral neuropathy in Lowe's syndrome', *Neuropediatrics* 19(1): 7-9.
- Choudhury, R., Diao, A., Zhang, F., Eisenberg, E., Saint-Pol, A., Williams, C., Konstantakopoulos, A., Lucocq, J., Johannes, L., Rabouille, C. et al. (2005) 'Lowe syndrome protein OCRL1 interacts with clathrin and regulates protein trafficking between endosomes and the trans-Golgi network', *Molecular biology of the cell* 16(8): 3467-79.
- Choudhury, R., Noakes, C. J., McKenzie, E., Kox, C. and Lowe, M. (2009) 'Differential clathrin binding and subcellular localization of OCRL1 splice isoforms', *The Journal of biological chemistry* 284(15): 9965-73.
- Collawn, J. F., Kuhn, L. A., Liu, L. F., Tainer, J. A. and Trowbridge, I. S. (1991) 'Transplanted LDL and mannose-6-phosphate receptor internalization signals promote high-efficiency endocytosis of the transferrin receptor', *The EMBO journal* 10(11): 3247-53.
- Coon, B. G., Mukherjee, D., Hanna, C. B., Riese, D. J., 2nd, Lowe, M. and Aguilar, R. C. (2009) 'Lowe syndrome patient fibroblasts display Ocr1-specific cell migration defects that

cannot be rescued by the homologous Inpp5b phosphatase', *Human molecular genetics* 18(23): 4478-91.

Cozier, G. E., Carlton, J., McGregor, A. H., Gleeson, P. A., Teasdale, R. D., Mellor, H. and Cullen, P. J. (2002) 'The phox homology (PX) domain-dependent, 3-phosphoinositide-mediated association of sorting nexin-1 with an early sorting endosomal compartment is required for its ability to regulate epidermal growth factor receptor degradation', *The Journal of biological chemistry* 277(50): 48730-6.

Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M. R., Luthi, A., Kim, W. T., Takei, K., Daniell, L., Nemoto, Y., Shears, S. B., Flavell, R. A. et al. (1999) 'Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling', *Cell* 99(2): 179-88.

Crump, C. M., Xiang, Y., Thomas, L., Gu, F., Austin, C., Tooze, S. A. and Thomas, G. (2001) 'PACS-1 binding to adaptors is required for acidic cluster motif-mediated protein traffic', *The EMBO journal* 20(9): 2191-201.

Cui, S., Guerriero, C. J., Szalinski, C. M., Kinlough, C. L., Hughey, R. P. and Weisz, O. A. (2010) 'OCRL1 function in renal epithelial membrane traffic', *American journal of physiology. Renal physiology* 298(2): F335-45.

Dahms, N. M. and Hancock, M. K. (2002) 'P-type lectins', *Biochimica et biophysica acta* 1572(2-3): 317-40.

Dahms, N. M., Olson, L. J. and Kim, J. J. (2008) 'Strategies for carbohydrate recognition by the mannose 6-phosphate receptors', *Glycobiology* 18(9): 664-78.

David, C., McPherson, P. S., Mundigl, O. and de Camilli, P. (1996) 'A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(1): 331-5.

De Matteis, M., Godi, A. and Corda, D. (2002) 'Phosphoinositides and the golgi complex', *Current opinion in cell biology* 14(4): 434-47.

Di Paolo, G. and De Camilli, P. (2006) 'Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics', *Nature* 443(7112): 651-7.

Diaz, E. and Pfeffer, S. R. (1998) 'TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking', *Cell* 93(3): 433-43.

Dressman, M. A., Olivos-Glander, I. M., Nussbaum, R. L. and Suchy, S. F. (2000) 'Ocr1, a PtdIns(4,5)P(2) 5-phosphatase, is localized to the trans-Golgi network of fibroblasts and epithelial cells', *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 48(2): 179-90.

Duleh, S. N. and Welch, M. D. (2010) 'WASH and the Arp2/3 complex regulate endosome shape and trafficking', *Cytoskeleton* 67(3): 193-206.

Edeling, M. A., Smith, C. and Owen, D. (2006) 'Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures', *Nature reviews. Molecular cell biology* 7(1): 32-44.

Emans, N., Gorvel, J. P., Walter, C., Gerke, V., Kellner, R., Griffiths, G. and Gruenberg, J. (1993) 'Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles', *The Journal of cell biology* 120(6): 1357-69.

Erdmann, K. S., Mao, Y., McCrea, H. J., Zoncu, R., Lee, S., Paradise, S., Modregger, J., Biemesderfer, D., Toomre, D. and De Camilli, P. (2007) 'A role of the Lowe syndrome protein OCRL in early steps of the endocytic pathway', *Developmental cell* 13(3): 377-90.

- Faucherre, A., Desbois, P., Nagano, F., Satre, V., Lunardi, J., Gacon, G. and Dorseuil, O.** (2005) 'Lowe syndrome protein Ocr11 is translocated to membrane ruffles upon Rac GTPase activation: a new perspective on Lowe syndrome pathophysiology', *Human molecular genetics* 14(11): 1441-8.
- Faucherre, A., Desbois, P., Satre, V., Lunardi, J., Dorseuil, O. and Gacon, G.** (2003) 'Lowe syndrome protein OCRL1 interacts with Rac GTPase in the trans-Golgi network', *Human molecular genetics* 12(19): 2449-56.
- Fukuda, M., Kanno, E., Ishibashi, K. and Itoh, T.** (2008) 'Large scale screening for novel rab effectors reveals unexpected broad Rab binding specificity', *Molecular & cellular proteomics : MCP* 7(6): 1031-42.
- Gall, W. E., Higginbotham, M. A., Chen, C., Ingram, M. F., Cyr, D. M. and Graham, T. R.** (2000) 'The auxilin-like phosphoprotein Swa2p is required for clathrin function in yeast', *Current biology : CB* 10(21): 1349-58.
- Ganley, I. G., Espinosa, E. and Pfeffer, S. R.** (2008) 'A syntaxin 10-SNARE complex distinguishes two distinct transport routes from endosomes to the trans-Golgi in human cells', *The Journal of cell biology* 180(1): 159-72.
- Garcia, P., Gupta, R., Shah, S., Morris, A. J., Rudge, S. A., Scarlata, S., Petrova, V., McLaughlin, S. and Rebecchi, M. J.** (1995) 'The pleckstrin homology domain of phospholipase C-delta 1 binds with high affinity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in bilayer membranes', *Biochemistry* 34(49): 16228-34.
- Ghosh, P., Dahms, N. M. and Kornfeld, S.** (2003) 'Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale', *Nature reviews. Molecular cell biology* 4(3): 202-12.
- Gillooly, D. J., Morrow, I. C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N. J., Gaullier, J. M., Parton, R. G. and Stenmark, H.** (2000) 'Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells', *The EMBO journal* 19(17): 4577-88.
- Godi, A., Di Campli, A., Konstantakopoulos, A., Di Tullio, G., Alessi, D. R., Kular, G. S., Daniele, T., Marra, P., Lucocq, J. M. and De Matteis, M. A.** (2004) 'FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P', *Nature cell biology* 6(5): 393-404.
- Gomez, T. S. and Billadeau, D. D.** (2009) 'A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting', *Developmental cell* 17(5): 699-711.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. and Nairn, R.** (1977) 'Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5', *The Journal of general virology* 36(1): 59-74.
- Greener, T., Grant, B., Zhang, Y., Wu, X., Greene, L. E., Hirsh, D. and Eisenberg, E.** (2001) 'Caenorhabditis elegans auxilin: a J-domain protein essential for clathrin-mediated endocytosis in vivo', *Nature cell biology* 3(2): 215-9.
- Haft, C. R., de la Luz Sierra, M., Bafford, R., Lesniak, M. A., Barr, V. A. and Taylor, S. I.** (2000) 'Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: assembly into multimeric complexes', *Molecular biology of the cell* 11(12): 4105-16.
- Hancock, M. K., Yammani, R. D. and Dahms, N. M.** (2002) 'Localization of the carbohydrate recognition sites of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor to domains 3 and 9 of the extracytoplasmic region', *The Journal of biological chemistry* 277(49): 47205-12.

- Harris, T. W., Hartweg, E., Horvitz, H. R. and Jorgensen, E. M.** (2000) 'Mutations in synaptojanin disrupt synaptic vesicle recycling', *The Journal of cell biology* 150(3): 589-600.
- Hayes, M. J., Merrifield, C. J., Shao, D., Ayala-Sanmartin, J., Schorey, C. D., Levine, T. P., Proust, J., Curran, J., Bailly, M. and Moss, S. E.** (2004) 'Annexin 2 binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on endocytic vesicles is regulated by the stress response pathway', *The Journal of biological chemistry* 279(14): 14157-64.
- Hayes, M. J., Shao, D. M., Grieve, A., Levine, T., Bailly, M. and Moss, S. E.** (2009) 'Annexin A2 at the interface between F-actin and membranes enriched in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate', *Biochimica et biophysica acta* 1793(6): 1086-95.
- Hehnl, H., Sheff, D. and Starnes, M.** (2006) 'Shiga toxin facilitates its retrograde transport by modifying microtubule dynamics', *Molecular biology of the cell* 17(10): 4379-89.
- Herman, I. M., Crisona, N. J. and Pollard, T. D.** (1981) 'Relation between cell activity and the distribution of cytoplasmic actin and myosin', *The Journal of cell biology* 90(1): 84-91.
- Heuser, J.** (1980) 'Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts', *The Journal of cell biology* 84(3): 560-83.
- Hinrichsen, L., Harborth, J., Andrees, L., Weber, K. and Ungewickell, E. J.** (2003) 'Effect of clathrin heavy chain- and alpha-adaptin-specific small inhibitory RNAs on endocytic accessory proteins and receptor trafficking in HeLa cells', *The Journal of biological chemistry* 278(46): 45160-70.
- Hinrichsen, L., Meyerholz, A., Groos, S. and Ungewickell, E. J.** (2006) 'Bending a membrane: how clathrin affects budding', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(23): 8715-20.
- Hong, Z., Yang, Y., Zhang, C., Niu, Y., Li, K., Zhao, X. and Liu, J. J.** (2009) 'The retromer component SNX6 interacts with dynactin p150(Glued) and mediates endosome-to-TGN transport', *Cell research* 19(12): 1334-49.
- Hou, X., Hagemann, N., Schoebel, S., Blankenfeldt, W., Goody, R. S., Erdmann, K. S. and Itzen, A.** (2011) 'A structural basis for Lowe syndrome caused by mutations in the Rab-binding domain of OCRL1', *The EMBO journal*.
- Hyvola, N., Diao, A., McKenzie, E., Skippen, A., Cockcroft, S. and Lowe, M.** (2006) 'Membrane targeting and activation of the Lowe syndrome protein OCRL1 by rab GTPases', *The EMBO journal* 25(16): 3750-61.
- Itin, C., Rancano, C., Nakajima, Y. and Pfeffer, S. R.** (1997) 'A novel assay reveals a role for soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein in mannose 6-phosphate receptor transport from endosomes to the trans Golgi network', *The Journal of biological chemistry* 272(44): 27737-44.
- Ito, W., Ishiguro, H. and Kurosawa, Y.** (1991) 'A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction', *Gene* 102(1): 67-70.
- Janne, P. A., Suchy, S. F., Bernard, D., MacDonald, M., Crawley, J., Grinberg, A., Wynshaw-Boris, A., Westphal, H. and Nussbaum, R. L.** (1998) 'Functional overlap between murine Inpp5b and Ocr1l may explain why deficiency of the murine ortholog for OCRL1 does not cause Lowe syndrome in mice', *The Journal of clinical investigation* 101(10): 2042-53.
- Jefferson, A. B. and Majerus, P. W.** (1996) 'Mutation of the conserved domains of two inositol polyphosphate 5-phosphatases', *Biochemistry* 35(24): 7890-4.
- Johannes, L. and Popoff, V.** (2008) 'Tracing the retrograde route in protein trafficking', *Cell* 135(7): 1175-87.

- Johnson, J. M., Castle, J., Garrett-Engle, P., Kan, Z., Loerch, P. M., Armour, C. D., Santos, R., Schadt, E. E., Stoughton, R. and Shoemaker, D. D.** (2003) 'Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays', *Science* 302(5653): 2141-4.
- Johnson, K. F. and Kornfeld, S.** (1992) 'The cytoplasmic tail of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor has two signals for lysosomal enzyme sorting in the Golgi', *The Journal of cell biology* 119(2): 249-57.
- Kang, J. X., Bell, J., Beard, R. L. and Chandraratna, R. A.** (1999) 'Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor mediates the growth-inhibitory effects of retinoids', *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 10(8): 591-600.
- Karageorgos, L. E., Isaac, E. L., Brooks, D. A., Ravenscroft, E. M., Davey, R., Hopwood, J. J. and Meikle, P. J.** (1997) 'Lysosomal biogenesis in lysosomal storage disorders', *Experimental cell research* 234(1): 85-97.
- Karlsson, K. and Carlsson, S. R.** (1998) 'Sorting of lysosomal membrane glycoproteins lamp-1 and lamp-2 into vesicles distinct from mannose 6-phosphate receptor/gamma-adaptin vesicles at the trans-Golgi network', *The Journal of biological chemistry* 273(30): 18966-73.
- Kenworthy, L., Park, T. and Charnas, L. R.** (1993) 'Cognitive and behavioral profile of the oculocerebrorenal syndrome of Lowe', *American journal of medical genetics* 46(3): 297-303.
- Keyel, P. A., Mishra, S. K., Roth, R., Heuser, J. E., Watkins, S. C. and Traub, L. M.** (2006) 'A single common portal for clathrin-mediated endocytosis of distinct cargo governed by cargo-selective adaptors', *Molecular biology of the cell* 17(10): 4300-17.
- Kornfeld, R., Bao, M., Brewer, K., Noll, C. and Canfield, W.** (1999) 'Molecular cloning and functional expression of two splice forms of human N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase', *The Journal of biological chemistry* 274(46): 32778-85.
- Krauss, M. and Haucke, V.** (2007) 'Phosphoinositide-metabolizing enzymes at the interface between membrane traffic and cell signalling', *EMBO reports* 8(3): 241-6.
- Laemmli, U. K.** (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature* 227(5259): 680-5.
- Lanzetti, L.** (2007) 'Actin in membrane trafficking', *Current opinion in cell biology* 19(4): 453-8.
- Lauvrak, S. U., Torgersen, M. L. and Sandvig, K.** (2004) 'Efficient endosome-to-Golgi transport of Shiga toxin is dependent on dynamin and clathrin', *Journal of cell science* 117(Pt 11): 2321-31.
- Lazzarino, D. A. and Gabel, C. A.** (1989) 'Mannose processing is an important determinant in the assembly of phosphorylated high mannose-type oligosaccharides', *The Journal of biological chemistry* 264(9): 5015-23.
- Lemmon, M. A.** (2004) 'Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides', *Biochemical Society transactions* 32(Pt 5): 707-11.
- Lemmon, S. K.** (2001) 'Clathrin uncoating: Auxilin comes to life', *Current biology : CB* 11(2): R49-52.
- Lichter-Konecki, U., Farber, L. W., Cronin, J. S., Suchy, S. F. and Nussbaum, R. L.** (2006) 'The effect of missense mutations in the RhoGAP-homology domain on ocr11 function', *Molecular genetics and metabolism* 89(1-2): 121-8.

- Lin, T., Orrison, B. M., Leahey, A. M., Suchy, S. F., Bernard, D. J., Lewis, R. A. and Nussbaum, R. L.** (1997) 'Spectrum of mutations in the OCRL1 gene in the Lowe oculocerebrorenal syndrome', *American journal of human genetics* 60(6): 1384-8.
- Lobel, P., Dahms, N. M. and Kornfeld, S.** (1988) 'Cloning and sequence analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor', *The Journal of biological chemistry* 263(5): 2563-70.
- Loi, M.** (2006) 'Lowe syndrome', *Orphanet journal of rare diseases* 1: 16.
- Lombardi, D., Soldati, T., Riederer, M. A., Goda, Y., Zerial, M. and Pfeffer, S. R.** (1993) 'Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network', *The EMBO journal* 12(2): 677-82.
- Lowe, C. U., Terrey, M. and Mac, L. E.** (1952) 'Organic-aciduria, decreased renal ammonia production, hydrophthalmos, and mental retardation; a clinical entity', *A.M.A. American journal of diseases of children* 83(2): 164-84.
- Ludwig, T., Griffiths, G. and Hoflack, B.** (1991) 'Distribution of newly synthesized lysosomal enzymes in the endocytic pathway of normal rat kidney cells', *The Journal of cell biology* 115(6): 1561-72.
- Lundmark, R. and Carlsson, S. R.** (2003) 'Sorting nexin 9 participates in clathrin-mediated endocytosis through interactions with the core components', *The Journal of biological chemistry* 278(47): 46772-81.
- Lundmark, R. and Carlsson, S. R.** (2004) 'Regulated membrane recruitment of dynamin-2 mediated by sorting nexin 9', *The Journal of biological chemistry* 279(41): 42694-702.
- Majerus, P. W., Kisseleva, M. V. and Norris, F. A.** (1999) 'The role of phosphatases in inositol signaling reactions', *The Journal of biological chemistry* 274(16): 10669-72.
- Mallard, F., Antony, C., Tenza, D., Salamero, J., Goud, B. and Johannes, L.** (1998) 'Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport', *The Journal of cell biology* 143(4): 973-90.
- Mao, Y., Balkin, D. M., Zoncu, R., Erdmann, K. S., Tomasini, L., Hu, F., Jin, M. M., Hodsdon, M. E. and De Camilli, P.** (2009) 'A PH domain within OCRL bridges clathrin-mediated membrane trafficking to phosphoinositide metabolism', *The EMBO journal* 28(13): 1831-42.
- Mayran, N., Parton, R. G. and Gruenberg, J.** (2003) 'Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells', *The EMBO journal* 22(13): 3242-53.
- Medigeschi, G. R. and Schu, P.** (2003) 'Characterization of the in vitro retrograde transport of MPR46', *Traffic* 4(11): 802-11.
- Meresse, S., Ludwig, T., Frank, R. and Hoflack, B.** (1990) 'Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the bovine cation-independent mannose 6-phosphate receptor. Serines 2421 and 2492 are the targets of a casein kinase II associated to the Golgi-derived HAI adaptor complex', *The Journal of biological chemistry* 265(31): 18833-42.
- Merrifield, C. J., Qualmann, B., Kessels, M. M. and Almers, W.** (2004) 'Neural Wiskott Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and the Arp2/3 complex are recruited to sites of clathrin-mediated endocytosis in cultured fibroblasts', *European journal of cell biology* 83(1): 13-8.
- Meyer, C., Eskelinen, E. L., Guruprasad, M. R., von Figura, K. and Schu, P.** (2001) 'Mu 1A deficiency induces a profound increase in MPR300/IGF-II receptor internalization rate', *Journal of cell science* 114(Pt 24): 4469-76.

- Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E. L., Hamann, J., Saftig, P., von Figura, K. and Schu, P.** (2000) 'mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors', *The EMBO journal* 19(10): 2193-203.
- Mills, I. G., Praefcke, G. J., Vallis, Y., Peter, B. J., Olesen, L. E., Gallop, J. L., Butler, P. J., Evans, P. R. and McMahon, H. T.** (2003) 'EpsinR: an AP1/clathrin interacting protein involved in vesicle trafficking', *The Journal of cell biology* 160(2): 213-22.
- Mitsuuchi, Y., Johnson, S. W., Sonoda, G., Tanno, S., Golemis, E. A. and Testa, J. R.** (1999) 'Identification of a chromosome 3p14.3-21.1 gene, APPL, encoding an adaptor molecule that interacts with the oncoprotein-serine/threonine kinase AKT2', *Oncogene* 18(35): 4891-8.
- Monnier, N., Satre, V., Lerouge, E., Berthoin, F. and Lunardi, J.** (2000) 'OCRL1 mutation analysis in French Lowe syndrome patients: implications for molecular diagnosis strategy and genetic counseling', *Human mutation* 16(2): 157-65.
- Morel, E., Parton, R. G. and Gruenberg, J.** (2009) 'Annexin A2-dependent polymerization of actin mediates endosome biogenesis', *Developmental cell* 16(3): 445-57.
- Motley, A., Bright, N. A., Seaman, M. N. and Robinson, M. S.** (2003) 'Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells', *The Journal of cell biology* 162(5): 909-18.
- Nagler, D. K., Zhang, R., Tam, W., Sulea, T., Purisima, E. O. and Menard, R.** (1999) 'Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity', *Biochemistry* 38(39): 12648-54.
- Najm, J.**, (2009) Untersuchungen zum Einfluss des bei Patienten mit Lowe-Syndrom mutierten humanen OCRL-Proteins auf endozytotische Prozesse in eukaryotischen Zellen. *Dissertation am Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg*.
- Noakes, C. J., Lee, G. and Lowe, M.** (2011) 'The PH domain proteins IPIP27A and B link OCRL1 to receptor recycling in the endocytic pathway', *Molecular biology of the cell* 22(5): 606-23.
- Norden, A. G., Gardner, S. C., Van't Hoff, W. and Unwin, R. J.** (2008) 'Lysosomal enzymuria is a feature of hereditary Fanconi syndrome and is related to elevated CI-mannose-6-P-receptor excretion', *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 23(9): 2795-803.
- Nothwehr, S. F., Bruinsma, P. and Strawn, L. A.** (1999) 'Distinct domains within Vps35p mediate the retrieval of two different cargo proteins from the yeast prevacuolar/endosomal compartment', *Molecular biology of the cell* 10(4): 875-90.
- Nothwehr, S. F., Ha, S. A. and Bruinsma, P.** (2000) 'Sorting of yeast membrane proteins into an endosome-to-Golgi pathway involves direct interaction of their cytosolic domains with Vps35p', *The Journal of cell biology* 151(2): 297-310.
- Nussbaum, R. L., Orrison, B. M., Janne, P. A., Charnas, L. and Chinault, A. C.** (1997) 'Physical mapping and genomic structure of the Lowe syndrome gene OCRL1', *Human genetics* 99(2): 145-50.
- Olivos-Glander, I. M., Janne, P. A. and Nussbaum, R. L.** (1995) 'The oculocerebrorenal syndrome gene product is a 105-kD protein localized to the Golgi complex', *American journal of human genetics* 57(4): 817-23.
- Pearse, B. M. and Crowther, R. A.** (1987) 'Structure and assembly of coated vesicles', *Annual review of biophysics and biophysical chemistry* 16: 49-68.

- Peck, J., Douglas, G. t., Wu, C. H. and Burbelo, P. D.** (2002) 'Human RhoGAP domain-containing proteins: structure, function and evolutionary relationships', *FEBS letters* 528(1-3): 27-34.
- Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J., Evans, P. R. and McMahon, H. T.** (2004) 'BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure', *Science* 303(5657): 495-9.
- Pishvaei, B., Costaguta, G., Yeung, B. G., Ryazantsev, S., Greener, T., Greene, L. E., Eisenberg, E., McCaffery, J. M. and Payne, G. S.** (2000) 'A yeast DNA J protein required for uncoating of clathrin-coated vesicles in vivo', *Nature cell biology* 2(12): 958-63.
- Ponting, C. P.** (2006) 'A novel domain suggests a ciliary function for ASPM, a brain size determining gene', *Bioinformatics* 22(9): 1031-5.
- Popoff, V., Mardones, G. A., Tenza, D., Rojas, R., Lamaze, C., Bonifacio, J. S., Raposo, G. and Johannes, L.** (2007) 'The retromer complex and clathrin define an early endosomal retrograde exit site', *Journal of cell science* 120(Pt 12): 2022-31.
- Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M. and Spang, A.** (2010) 'Identification of the switch in early-to-late endosome transition', *Cell* 141(3): 497-508.
- Praefcke, G. J. and McMahon, H. T.** (2004) 'The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules?', *Nature reviews. Molecular cell biology* 5(2): 133-47.
- Press, B., Feng, Y., Hoflack, B. and Wandinger-Ness, A.** (1998) 'Mutant Rab7 causes the accumulation of cathepsin D and cation-independent mannose 6-phosphate receptor in an early endocytic compartment', *The Journal of cell biology* 140(5): 1075-89.
- Progida, C., Cogli, L., Piro, F., De Luca, A., Bakke, O. and Bucci, C.** (2010) 'Rab7b controls trafficking from endosomes to the TGN', *Journal of cell science* 123(Pt 9): 1480-91.
- Qian, Z. M., Li, H., Sun, H. and Ho, K.** (2002) 'Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway', *Pharmacological reviews* 54(4): 561-87.
- Raposo, G., Tenza, D., Murphy, D. M., Berson, J. F. and Marks, M. S.** (2001) 'Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells', *The Journal of cell biology* 152(4): 809-24.
- Rescher, U., Ruhe, D., Ludwig, C., Zobiack, N. and Gerke, V.** (2004) 'Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes', *Journal of cell science* 117(Pt 16): 3473-80.
- Riederer, M. A., Soldati, T., Shapiro, A. D., Lin, J. and Pfeffer, S. R.** (1994) 'Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network', *The Journal of cell biology* 125(3): 573-82.
- Rodriguez-Gabin, A. G., Ortiz, E., Demoliner, K., Si, Q., Almazan, G. and Larocca, J. N.** (2010) 'Interaction of Rab31 and OCRL-1 in oligodendrocytes: its role in transport of mannose 6-phosphate receptors', *Journal of neuroscience research* 88(3): 589-604.
- Rohatgi, R., Ho, H. Y. and Kirschner, M. W.** (2000) 'Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate', *The Journal of cell biology* 150(6): 1299-310.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T. and Kirschner, M. W.** (1999) 'The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly', *Cell* 97(2): 221-31.
- Rohrer, J. and Kornfeld, R.** (2001) 'Lysosomal hydrolase mannose 6-phosphate uncovering enzyme resides in the trans-Golgi network', *Molecular biology of the cell* 12(6): 1623-31.

- Rojas, R., Kametaka, S., Haft, C. R. and Bonifacino, J. S.** (2007) 'Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors', *Molecular and cellular biology* 27(3): 1112-24.
- Rojas, R., van Vlijmen, T., Mardones, G. A., Prabhu, Y., Rojas, A. L., Mohammed, S., Heck, A. J., Raposo, G., van der Sluijs, P. and Bonifacino, J. S.** (2008) 'Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7', *The Journal of cell biology* 183(3): 513-26.
- Rottner, K., Hanisch, J. and Campellone, K. G.** (2010) 'WASH, WHAMM and JMY: regulation of Arp2/3 complex and beyond', *Trends in cell biology* 20(11): 650-61.
- Rozelle, A. L., Machesky, L. M., Yamamoto, M., Driessens, M. H., Insall, R. H., Roth, M. G., Luby-Phelps, K., Marriott, G., Hall, A. and Yin, H. L.** (2000) 'Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3', *Current biology : CB* 10(6): 311-20.
- Saint-Pol, A., Yelamos, B., Amessou, M., Mills, I. G., Dugast, M., Tenza, D., Schu, P., Antony, C., McMahon, H. T., Lamaze, C. et al.** (2004) 'Clathrin adaptor epsinR is required for retrograde sorting on early endosomal membranes', *Developmental cell* 6(4): 525-38.
- Sandvig, K. and van Deurs, B.** (2005) 'Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins', *Gene therapy* 12(11): 865-72.
- Scherer, W. F., Syverton, J. T. and Gey, G. O.** (1953) 'Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix', *The Journal of experimental medicine* 97(5): 695-710.
- Schmid, A. C., Wise, H. M., Mitchell, C. A., Nussbaum, R. and Woscholski, R.** (2004) 'Type II phosphoinositide 5-phosphatases have unique sensitivities towards fatty acid composition and head group phosphorylation', *FEBS letters* 576(1-2): 9-13.
- Schmidt, B., Kiecke-Siensen, C., Waheed, A., Bräulke, T. and von Figura, K.** (1995) 'Localization of the insulin-like growth factor II binding site to amino acids 1508-1566 in repeat 11 of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor', *The Journal of biological chemistry* 270(25): 14975-82.
- Schulze-Lohoff, E., Hasilik, A. and von Figura, K.** (1985) 'Cathepsin D precursors in clathrin-coated organelles from human fibroblasts', *The Journal of cell biology* 101(3): 824-9.
- Schweizer, A., Kornfeld, S. and Rohrer, J.** (1996) 'Cysteine34 of the cytoplasmic tail of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is reversibly palmitoylated and required for normal trafficking and lysosomal enzyme sorting', *The Journal of cell biology* 132(4): 577-84.
- Scott, G. K., Fei, H., Thomas, L., Medigeshi, G. R. and Thomas, G.** (2006) 'A PACS-1, GGA3 and CK2 complex regulates CI-MPR trafficking', *The EMBO journal* 25(19): 4423-35.
- Seaman, M. N.** (2004) 'Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer', *The Journal of cell biology* 165(1): 111-22.
- Seaman, M. N., Marcusson, E. G., Cereghino, J. L. and Emr, S. D.** (1997) 'Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the VPS29, VPS30, and VPS35 gene products', *The Journal of cell biology* 137(1): 79-92.
- Seaman, M. N., McCaffery, J. M. and Emr, S. D.** (1998) 'A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast', *The Journal of cell biology* 142(3): 665-81.

- Shuman, S.** (1991) 'Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(22): 10104-8.
- Sincock, P. M., Ganley, I. G., Krise, J. P., Diederichs, S., Sivars, U., O'Connor, B., Ding, L. and Pfeffer, S. R.** (2003) 'Self-assembly is important for TIP47 function in mannose 6-phosphate receptor transport', *Traffic* 4(1): 18-25.
- Sivaraman, J., Nagler, D. K., Zhang, R., Menard, R. and Cygler, M.** (2000) 'Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine', *Journal of molecular biology* 295(4): 939-51.
- Sorkin, A. and Goh, L. K.** (2009) 'Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs', *Experimental cell research* 315(4): 683-96.
- Storrie, B. and Desjardins, M.** (1996) 'The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process?', *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 18(11): 895-903.
- Suchy, S. F. and Nussbaum, R. L.** (2002) 'The deficiency of PIP2 5-phosphatase in Lowe syndrome affects actin polymerization', *American journal of human genetics* 71(6): 1420-7.
- Swan, L. E., Tomasini, L., Pirruccello, M., Lunardi, J. and De Camilli, P.** (2010) 'Two closely related endocytic proteins that share a common OCRL-binding motif with APPL1', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(8): 3511-6.
- Tong, P. Y. and Kornfeld, S.** (1989) 'Ligand interactions of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Comparison with the cation-independent mannose 6-phosphate receptor', *The Journal of biological chemistry* 264(14): 7970-5.
- Trowbridge, I. S.** (1991) 'Endocytosis and signals for internalization', *Current opinion in cell biology* 3(4): 634-41.
- Ungewickell, A., Ward, M. E., Ungewickell, E. and Majerus, P. W.** (2004) 'The inositol polyphosphate 5-phosphatase Ocr1 associates with endosomes that are partially coated with clathrin', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(37): 13501-6.
- Ungewickell, A. J. and Majerus, P. W.** (1999) 'Increased levels of plasma lysosomal enzymes in patients with Lowe syndrome', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(23): 13342-4.
- Ungewickell, E. and Branton, D.** (1981) 'Assembly units of clathrin coats', *Nature* 289(5796): 420-2.
- Ungewickell, E. J. and Hinrichsen, L.** (2007) 'Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding', *Current opinion in cell biology* 19(4): 417-25.
- Waguri, S., Dewitte, F., Le Borgne, R., Rouille, Y., Uchiyama, Y., Dubremetz, J. F. and Hoflack, B.** (2003) 'Visualization of TGN to endosome trafficking through fluorescently labeled MPR and AP-1 in living cells', *Molecular biology of the cell* 14(1): 142-55.
- Wang, Y. J., Wang, J., Sun, H. Q., Martinez, M., Sun, Y. X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J. P., Roth, M. G. and Yin, H. L.** (2003) 'Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi', *Cell* 114(3): 299-310.
- Yang, L., Lin, H. K., Altuwaijri, S., Xie, S., Wang, L. and Chang, C.** (2003) 'APPL suppresses androgen receptor transactivation via potentiating Akt activity', *The Journal of biological chemistry* 278(19): 16820-7.

- Yarar, D., Waterman-Storer, C. M. and Schmid, S. L.** (2005) 'A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis', *Molecular biology of the cell* 16(2): 964-75.
- Yoshida, Y., Kinuta, M., Abe, T., Liang, S., Araki, K., Cremona, O., Di Paolo, G., Moriyama, Y., Yasuda, T., De Camilli, P. et al.** (2004) 'The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature', *The EMBO journal* 23(17): 3483-91.
- Zaidi, N., Maurer, A., Nieke, S. and Kalbacher, H.** (2008) 'Cathepsin D: a cellular roadmap', *Biochemical and biophysical research communications* 376(1): 5-9.
- Zhang, X., Hartz, P. A., Philip, E., Racusen, L. C. and Majerus, P. W.** (1998) 'Cell lines from kidney proximal tubules of a patient with Lowe syndrome lack OCRL inositol polyphosphate 5-phosphatase and accumulate phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate', *The Journal of biological chemistry* 273(3): 1574-82.
- Zhang, X., Jefferson, A. B., Auethavekiat, V. and Majerus, P. W.** (1995) 'The protein deficient in Lowe syndrome is a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 5-phosphatase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(11): 4853-6.
- Zhong, Q., Lazar, C. S., Tronchere, H., Sato, T., Meerloo, T., Yeo, M., Songyang, Z., Emr, S. D. and Gill, G. N.** (2002) 'Endosomal localization and function of sorting nexin 1', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(10): 6767-72.

POSTERPRÄSENTATIONEN

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

Vanessa van Rahden, Juliane Najm, Jörg Heeren, Andreas Gal, Thomas Braulke und Kerstin Kutsche (2008). Internalization of arylsulfatase B and transferrin is altered in skin fibroblasts of patients with Lowe syndrome. *Forschungstag am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg.*

Vanessa van Rahden, Juliane Najm, Jörg Heeren, Thomas Braulke und Kerstin Kutsche (2009). OCRL1-dependent alterations of receptor-mediated ligand internalization. *1st Joint Congress of the Swiss and the German Societies of Cell Biology (ZMG and DGZ), Konstanz.*

Vanessa van Rahden, Juliane Najm, Jörg Heeren, Suzanne R. Pfeffer, Thomas Braulke und Kerstin Kutsche (2010). The role of the OCRL protein in the mannose-6-phosphate receptor trafficking. *1st International Symposium for PhD students on Protein Trafficking in Health and Disease, Hamburg.*

Vanessa van Rahden, Juliane Najm, Jörg Heeren, Suzanne R. Pfeffer, Thomas Braulke und Kerstin Kutsche (2010). OCRL plays a role in trafficking of the mannose 6-phosphate receptor (MPR). *Horizons in Molecular Biology, Göttingen.*

DANKSAGUNG

Vor allen anderen gilt mein besonderer Dank Professor Dr. Kerstin Kutsche für die Betreuung meiner Doktorarbeit. Die intensiven Diskussionen, kritischen Anmerkungen und Deine Hilfsbereitschaft, nicht nur beim Lesen des Manuskripts, haben wesentlich zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen. Als Deine Doktorandin war es mir möglich, in den vergangenen drei Jahren viel von Dir zu lernen und mich als Wissenschaftler weiterzuentwickeln.

PD Dr. Sabine Lühje danke ich für das bereitwillige Übernehmen des Zweitgutachtens und das Interesse am Fortschritt dieser Arbeit.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Humangenetik danke ich Professor Dr. Andreas Gal.

Dr. Georg Rosenberger und Professor Dr. Thomas Bräulke möchte ich an dieser Stelle für die zahlreiche experimentelle Unterstützung sowie die vielen weiterführenden Ratschläge danken.

Den jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik, vor allem der AG Kutsche und AG Rosenberger, danke ich für das immerzu tolle Arbeitsklima und die motivierenden Gespräche. Besonders Fanny und Kristina danke ich für die hilfreichen Ratschläge und die umfangreiche Unterstützung, die ein Gelingen dieser Arbeit erst möglich gemacht haben.

Professor Dr. Suzanne Pfeffer danke ich für die inspirierende Zeit, die ich in ihrer Arbeitsgruppe verbringen durfte. Auch den Mitarbeitern des Labors, vor allem Dr. Eric Espinosa, gilt mein Dank für die umfangreiche experimentelle Hilfe und motivierenden Gespräche.

Auch PD Dr. Robert Hänsch gilt mein besonderer Dank! Robert, Deine Unterstützung war mir immer sehr wichtig und ich bin sehr dankbar, dass ich mich jederzeit an Dich wenden kann.

Bina, Julia und Tina, auch wenn wir uns mittlerweile in alle vier Himmelsrichtungen verstreut haben, ist es doch schön zu wissen, dass ich euch meine engsten Freunde nennen darf. Danke für eure Freundschaft.

Caro, Dana und Uli, wat hebbt wi lacht! Danke für die vielen Abende mit leckerem Essen und Wein, bei denen ihr immer ein offenes Ohr für mich hattet. Geteiltes Leid ist schließlich halbes Leid! Und ihr wisst ja: Einfach mal die Flasche mit Glas kaufen!

Meinen Braunschweiger Mädels und Bremervörder Jungs möchte ich danken für die vielen Gespräche, Treffen und Feiern der vergangenen drei Jahre und darüber hinaus. Ihr habt mir die Ablenkung ermöglicht, die ich gebraucht habe.

Meiner Familie möchte ich für den unerschütterlichen Glauben an mich und die bedingungslose Unterstützung danken, die mir zuteilwurde und mir das nötige Selbstvertrauen zum Meistern dieser Arbeit verliehen hat.

Henning, Dir gebührt mein größter Dank! Auch wenn es nicht immer einfach war, warst Du doch stets für mich da, hast mich in allem unterstützt und mir die Kraft und den Freiraum gegeben, mich zu dem Menschen zu entwickeln, der ich heute bin.