

**Recycling der Sauren Lysosomalen Phosphatase:
Eingrenzung der Recycling-vermittelnden
Aminosäuresequenz und Untersuchungen möglicher
Sortierungsfaktoren, die zur Umsetzung des
Recyclings benötigt werden.**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

vorgelegt von
Stefanie Obermüller
aus Hannover

Göttingen 2000

D7

Referent:

Prof. Dr. Kurt von Figura

Korreferent:

Prof. Dr. Gerhard Gottschalk

Tag der mündlichen Prüfung:

Lebenslauf

- 22 August 1969 Geboren in Hannover als Tochter von Elisabeth Obermüller geb. Radloff und Udo Obermüller
- 1976-1980 Besuch der Otternhagener Grundschule in Neustadt a. Rbg.
- 1980-1982 Besuch der Orientierungsstufe-Süd in Neustadt a. Rbg.
- 1982-1989 Besuch des Gymnasiums-Süd in Neustadt a. Rbg.
- 11 Mai 1989 Abitur
- 1989-1991 Studium der Chemie an der Freien Universität Berlin
- 1991-1996 Studium der Biochemie an der Freien Universität Berlin
- Sommer 1994 Biochemie-Diplom-Vorprüfungen
- Sommer 1995 Biochemie-Diplom-Hauptprüfungen in den Fächern Biochemie, Genetik und Organische Chemie
8. August 1995-
2. Februar 1996 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Rudolf Tauber am Institut für Klinische Chemie und Biochemie des Universitätsklinikums Rudolf Virchow der Humboldt-Universität zu Berlin
Thema der Diplomarbeit: Charakterisierung der proteolytischen Aktivität, die zur Entstehung des Serum-Transferrinrezeptors führt
- August 1996 Diplom in Biochemie
- September 1996-
März 2000 Promotion am Zentrum für Molekulare Zellbiologie und Biochemie der Georg August Universität Göttingen in der Abteilung Biochemie II von Herrn Prof. Dr. Kurt von Figura, in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Stefan Höning
- Mitglied im Graduiertenkolleg „Signal-vermittelter Transport von Proteinen und Vesikeln“

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Lysosomale Membranproteine	1
1.2 Struktur der zytoplasmatischen Domänen von Lamp1, Limp2 und LAP	2
1.3 Transport lysosomaler Membranproteine	4
1.4 Bedeutung des AP 1- und AP 3-Komplexes für den Transport lysosomaler Membranproteine	6
2 Problemstellung	8
3 Material und Methoden	9
3.1 Material	9
3.1.1 Geräte.....	9
3.1.2 Verbrauchsmaterial	11
3.1.3 Kits zur Präparation und Transfektion von DNA.....	11
3.1.4 Chemikalien.....	12
3.1.5 Detektionssysteme	13
3.1.6 Proteine, Peptide und Proteinstandards.....	14
3.1.7 Enzyme und Nukleotide	14
3.1.8 Radioaktive Substanzen.....	14
3.1.9 Antibiotika.....	14
3.1.10 Antikörper	15
3.1.10.1 Primärantikörper	15
3.1.10.2 Sekundärantikörper	15
3.1.11 Zelllinien.....	16
3.1.11.1 Transfizierte Zelllinien.....	16
3.1.12 Zellkulturmedien und Lösungen zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen.....	17
3.1.13 Bakterienstamm.....	17
3.1.14 Medien zur Aufzucht von Prokaryontischen Zellen.....	17
3.1.15 Häufig verwendete Lösungen und Puffer	18
3.1.16 Standardlösungen zum molekularbiologischen Arbeiten.....	18
3.1.17 Vektoren, DNA-Standarts	19
3.1.18 EDV	19
3.1.18.1 Hardware	19
3.1.18.2 Software	19
3.2 Methoden	20
3.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	20

3.2.1.1 Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit DNA.....	20
3.2.1.1.1 Präzipitation von DNA mit Ethanol	20
3.2.1.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung	20
3.2.1.1.3 Reinigung von DNA-Fragmenten mit QIAquick-Säulen.....	20
3.2.1.1.4 Verdauung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	21
3.2.1.2 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	22
3.2.1.2.1 Herstellung transformationskompetenter Zellen	22
3.2.1.2.2 Transformation kompetenter Zellen	22
3.2.1.2.3 Anlegen einer Glycerinkultur.....	23
3.2.1.3 Isolierung von DNA.....	23
3.2.1.3.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA (Qiagen-Methode).....	23
3.2.1.3.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA (Qiagen-Methode).....	23
3.2.1.3.3 Auftrennung von DNA in Agarosegelen	24
3.2.1.3.4 Ligation	25
3.2.1.3.5 DNA-Amplifizierung über die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	26
3.2.1.4 Einsatz der PCR für die Mutagenese.....	27
3.2.1.5 Subklonierung des PCR-Fragmentes.....	28
3.2.1.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA	28
3.2.2 Zellbiologische Methoden	30
3.2.2.1 Zellkultur	30
3.2.2.1.1 Passagieren von adhärenen Zellen	30
3.2.2.1.2 Cryokonservierung von Zellen.....	30
3.2.2.1.3 Revitalisierung von Zellen.....	31
3.2.2.2 Transfektion von eukaryontischen Zellen.....	31
3.2.2.2.1 Stabile Transfektion	31
3.2.2.2.2 Selektion der stabil transfizierten Zellklone.....	33
3.2.2.3 Metabolische Markierung mit [³⁵ S]–Methionin/Cystein	34
3.2.2.4 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen	35
3.2.2.5 Rekultivierung und GSH/DTT-Behandlung von biotinylierten Zellen	36
3.2.2.6 Desialylierung von Zelloberflächenproteinen mit Neuraminidase	36
3.2.3 Biochemische Methoden.....	39
3.2.3.1 Proteinbestimmung.....	39
3.2.3.1.1 Proteinbestimmung nach Lowry.....	39
3.2.3.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	39
3.2.3.1.3 Mikro-Lowry.....	40
3.2.3.2 Indirekte Immunfluoreszenz nach Methanolfixierung.....	40
3.2.3.3 Messung von Enzymaktivitäten	42
3.2.3.3.1 Enzymaktivität der lysosomalen sauren Phosphatase.....	42
3.2.3.3.2 Enzymaktivität der β-Hexosaminidase	42
3.2.3.3.3 Enzymaktivität der α-Neuraminidase (Sialidase).....	43
3.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
3.2.3.4.1 Herstellung der SDS-Gele und Laufbedingungen	44
3.2.3.4.2 Zusammensetzung der verwendeten Molekulargewichtsstandards	46
3.2.3.4.3 Coomassie-Schnellfärbung von Polyacrylamidgelen	47
3.2.3.4.4 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	48
3.2.3.5 Westernblotanalyse.....	49
3.2.3.5.1 Semi Dry-Blot-Verfahren	49
3.2.3.5.2 Naß-Blot-Verfahren	50
3.2.3.5.3 Immunodetektion	51

3.2.3.6	Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	52
3.2.3.7	Immunpräzipitation der LAP	54
3.2.3.8	Quantifizierung der biotinylierten LAP- oder LAP-chimären-Fraktion	
	für das Rezyklisierungs-Assay	56
3.2.3.8.1	Isolierung biotinylierter Proteine aus TX-100 Zellhomogenaten	56
3.2.3.8.2	Detektion und Quantifizierung der biotinylierten Proteinfraction.....	56
3.2.4	Präparative Proteinbiochemie	57
3.2.4.1	Extraktion von Membranproteinen mit TX-100.....	57
3.2.4.2	Extraktion von Membranproteinen und Phasentrennung mit TX-114	57
3.2.4.3	TCA-Fällung.....	58
3.2.4.4	Wessel-Flügge-Fällung.....	59
3.2.4.5	Präparation von AP-1 und AP-2 aus Schweinehirn	59
3.2.4.5.1	Präparation von clathrinbeschichteten Vesikeln.....	59
3.2.4.5.2	Ablösen von Clathrin und Adaptoren	60
3.2.4.5.3	Aufreinigung von Adaptoren (AP1 und AP2) über Gelfiltrations- chromatographie.....	60
3.2.4.5.4	Hydroxyapatit-Chromatographie.....	61
3.2.5	Messung von Interaktionen zwischen Adaptorproteinen und Peptiden mit dem Biosensor (BIAcore 2000)	62
3.2.5.1	Synthese von Peptiden.....	63
3.2.5.2	Kopplung von Peptiden an einen Sensorchip.....	63
3.2.5.3	Reinigung von Peptiden über eine C 18-Cartridge.....	64
3.2.5.4	Messung der Interaktion.....	65
3.2.5.5	Auswertung der gemessenen Interaktionen.....	65

4 Ergebnisse.....67

4.1 Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne für das Recycling..... der LAP67

4.1.1	Die LAP-Chimären.....	67
4.1.2	Neuraminidase-Assay.....	69
4.1.2.1	Isoelektrische Fokussierung von LAP.....	69
4.1.2.2	Neuraminidasebehandlung von LAP bei 4 °C.....	70
4.1.2.3	Austausch endosomaler LAP-WT mit der Plasmamembran.....	71
4.1.2.4	Austausch endosomaler LAP-Lamp1 mit der Plasmamembran	73
4.1.2.5	Austausch endosomaler LAP-Limp2 mit der Plasmamembran.....	74
4.1.2.6	Einfluß der luminalen LAP-Domäne auf den Austausch endosomaler LAP mit der Plasmamembran	74
4.1.2.7	Austausch endosomaler Limp2-LAP mit der Plasmamembran.....	76
4.1.2.8	Bedeutung der zytoplasmatischen LAP-Domäne für den Austausch endosomaler LAP mit der Plasmamembran.....	77
4.1.3	Recycling-Assay	77
4.1.3.1	Einführung in das experimentelle System.....	78

4.1.3.2	Recycling-Assay mit LAP-WT-Zellen	80
4.1.3.3	Recycling-Assay mit LAP-Chimären	82
4.1.3.4	Kontrollen des Recycling-Assays	83
4.1.3.4.1	Kontrolle 1: Kontrolle der Glutathion/DTT-Behandlung	83
4.1.3.4.2	Kontrolle 2: Recyclingkontrolle.....	84
4.2	Eingrenzung des Recyclingsignals	85
4.2.1	Neuraminidase-Assay der LAP-D7-Mutante	85
4.2.2	Recycling-Assay der LAP D7-Mutante	87
4.2.3	Recycling-Assay von LAP-Lamp1/LAP.....	88
4.2.3.1	Die Tail-Chimäre (LAP-Lamp1/LAP).....	88
4.2.3.2	Recycling der Tail-Chimäre.....	89
4.3	In vitro Untersuchungen zur Interaktion zwischen AP 1 und der zytoplasmatischen Domäne von LAP und Lamp1	90
4.3.1	Präparation von AP1 und AP2	90
4.3.2	<i>In vitro</i> Interaktion zwischen AP 1 und den zytoplasmatischen Domänen von LAP-WT bzw. Lamp1-WT	93
4.3.2.1	Struktur der Tailpeptide.....	93
4.3.2.2	Kopplung der LAP- und Lamp1-Tailpeptide an den Sensorchip	94
4.3.2.3	Bindung von AP 1 und AP 2 an LAP bzw. Lamp1	95
4.3.2.4	Bedeutung des distalen LAP-Tail-Bereiches für die Adaptorinter- aktion.....	96
4.3.2.5	Bedeutung des LAP- und Lamp1-Tyrosinmotives für die Interaktion mit AP 1	98
4.3.3	Analyse des Tyrosinmotivs von Lamp1	99
4.3.4	Analyse des Tyrosinmotivs von LAP	101
4.4	Einfluß des AP 1-Komplexes auf das Recycling der LAP	103
4.4.1	LAP-Recycling in μ 1-defizienten embryonalen Mausfibroblasten	103
5	Diskussion.....	105
5.1	Kritische Anmerkungen zum experimentellen System	105
5.1.1	Auswertung des Neuraminidase-Assays	105
5.1.2	Endozytose von Neuraminidase	106
5.1.3	Sensitivität des Recycling-Assays	106
5.2	Der LAP-Tail ist für die Vermittlung des Recyclings notwendig und ausreichend	109
5.3	<i>In vitro</i> Interaktion der Adaptorkomplexe AP 1 und AP 2 mit den Tyrosinsignalen von LAP und Lamp1	111
5.4	Sortierung lysosomaler Membranproteine.....	115
5.4.1	Sortierungsstationen	115
5.4.1.1	Sortierungsstation TGN.....	116

5.4.2	Endosomale Sortierung.....	116
5.5	Endosomale Sortierungssignale lysosomaler Membranproteine	117
5.6	Ist das LAP-Recycling Folge einer aktiven oder passiven	118
	endosomalen Sortierung?	
5.7	LAP-Recycling im Vergleich zum Recycling des	
	Transferrinrezeptors	120
5.7.1	Recyclingzyklus des Transferrinrezeptors	121
6	Zusammenfassung.....	125
7	Literaturverzeichnis	127

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AP 1	Adaptorkomplex 1
AP 2	Adaptorkomplex 2
AP 3	Adaptorkomplex 3
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ARF-1	ADP-Ribosylierungsfaktor
at	Atmosphären
ATCC	<u>A</u> merican <u>t</u> ype <u>c</u> ulture <u>c</u> ollection
BHK	engl. Baby-Hamster-Niere
bp	Basenpaare
BSA	engl. Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odified <u>E</u> agle <u>m</u> edium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Mischung aus Desoxyribonukleotiden
DOC	Natriumdesoxycholat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDC	N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	foetales Kälberserum
GSH	Gluthation
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IMM	Immunomix
Ig	Immunglobulin
JAA	Jodacetamid
kp	Kilo Basen
kDa	Kilo Dalten
LAP	lysosomal acid phosphatase
Limp	lysosomal integrated membrane protein
Lamp	lysosomal associated membrane protein
LMW	<u>L</u> ow <u>m</u> olecular <u>w</u> eight-Marker
mAk	monoklonaler Antikörper

MEF	Maus-embryonale-Fibroblasten
MES	2-[N-morpholino]ethanschwefelsäure
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
NaPi	Natrium-Phosphatpuffer
NHS	N-hydroxysuccinimid
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysi, zur Analyse
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> eleelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS**	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	engl. Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGN	<i>trans</i> -Golgi Netzwerk
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UDP	Uridindiphosphat
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Lysosomale Membranproteine

Lysosomen sind Organellen eukaryontischer Zellen, die für den Abbau von zelleigenen und zellfremden Makromolekülen zuständig sind. Zu diesem Zweck sind die Lysosomen mit einer Reihe saurer Hydrolasen ausgestattet, die den Abbau der Makromoleküle katalysieren. Protonenpumpen der lysosomalen Membran halten den sauren pH-Wert von 5,0 im Lysosomenlumen aufrecht. Die monomeren Abbauprodukte verlassen die Lysosomen durch spezifische Transportkanäle.

Die lysosomale Membran ist reich an Membranproteinen, die im luminalen Bereich hochglykosyliert sind. Lamp1, Limp2 und LAP bilden drei verschiedene Klassen der lysosomalen Membranproteine, wobei die Klassifizierung auf dem Homologievergleich der Aminosäuresequenzen beruht (Übersichtsartikel: HUNZIKER et al. 1997 und KORNFELD und MELLMAN 1989). Die Struktur dieser drei Proteine ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Die LAP (*lysosomal acid phosphatase*) ist in allen kernhaltigen Zellen in einer löslichen und einer membrangebundenen Form nachweisbar. Die lösliche Form ist ein Dimer aus zwei identischen Untereinheiten. Sie ist katalytisch aktiv und reichert sich in den Lysosomen an, so daß die LAP als lysosomales Markerenzym fungiert. Die membrangebundene, bereits katalytisch aktive Form, kann sowohl in den Lysosomen als auch an der Plasmamembran und in endosomalen Kompartimenten lokalisiert werden (BRAUN et al. 1989, GOTTSCHALK et al. 1989). Obwohl bekannt ist, daß die LAP *in vitro* eine Reihe von Phosphomonoestern spaltet, wurden physiologische Substrate der LAP noch nicht identifiziert. Die membrangebundene LAP-Form weist einen N-terminalen luminalen bzw. extrazytoplasmatischen Bereich auf, der die katalytische Aktivität trägt. In diesem Bereich befinden sich acht potentielle N-Glycosylierungsstellen, die im Zuge der Proteinbiosynthese vollständig mit sialylierten Zuckerketten von komplexen Typ versehen werden (WAHEED et al. 1988).

Lamp1 (*lysosomal associated membrane protein*) ist ein Typ 1-Transmembranprotein, dessen luminaler Abschnitt 16-20 potentielle N-Glycosylierungsstellen birgt, die zum großen Teil sialylierte Zuckerketten vom komplexen Typ tragen. Der luminaler Bereich von Lamp1 wird durch eine prolinreiche Verbindungsdomäne (*hinge*-Region), die O-glykosidisch gebundene Zucker trägt, in zwei Domänen unterteilt. Jede Domäne enthält zwei durch konservative Disulfidbrücken stabilisierte Loops, die sich jeweils über 36-38 Aminosäuren erstrecken (LEWIS et al. 1985, CARLSSON et al. 1993, ARTERBURN et al. 1990).

Limp2 (*lysosomal integrated membrane protein*) ist ein Typ III-Transmembranprotein. Der N-terminale luminaler Bereich dieses Proteines hat 11 N-Glycosylierungsstellen, die zumeist sialylierte Zuckerketten des komplexen Typs tragen (FUJITA et al. 1991, VEGA et al. 1991a, b).

Die Funktion der lysosomalen Membranproteine ist weitgehend ungeklärt. Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung an Transportvorgängen durch die Lysosomenmembran sowie an der Fusion zwischen Lysosomen und anderen Kompartimenten (FUKUDA et al. 1991, COLLOT et al. 1984).

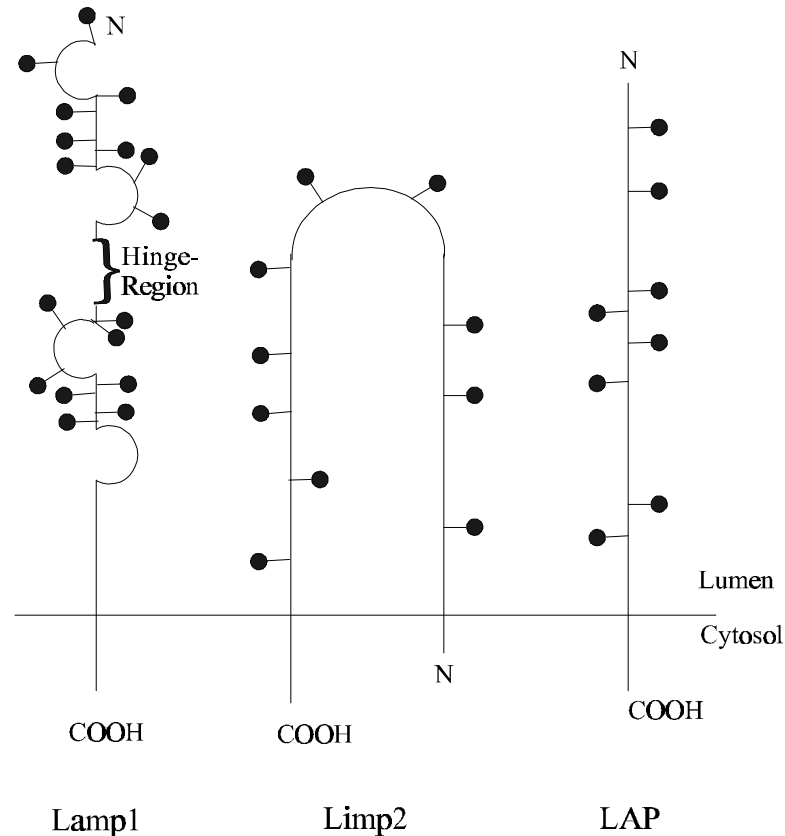


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Struktur von Lamp1, Limp2 und LAP. Die N-Glycosylierungsstellen der drei Proteine sind durch schwarzen Punkte markiert während die Disulfid-Loops von Lamp1 durch Halbkreise dargestellt werden. In der Mitte der Lamp1-Struktur befindet sich die prolinreiche *hinge*-Region.

1.2 Struktur der zytoplasmatischen Domänen von Lamp1, Limp2 und LAP

Die Sortierungssignale von Membranproteinen können in der zytoplasmatischen Domäne (Tail), in der Transmembrandomäne oder auch in der luminalen bzw. extrazytoplasmatischen Region lokalisiert sein. Die Aggregation der luminalen Bereiche mehrerer Moleküle der Endopeptidase Furin führt zur Sortierung der Aggregate in die Lysosomen, wo der Abbau der Proteine stattfindet. Nicht aggregiertes Furin wird von dieser Transportroute ausgeschlossen (WOLIS et al. 1997). Die Aggregation der Transmembrandomäne von TGN38 hat Einfluß auf korrekte zelluläre Sortierung. Es wird postuliert, daß die Aggregation für die endosomale Sortierung in Richtung des TGN (*trans* Golgi Netzwerk) eine Rolle spielt (REAVES et al. 1998). Für eine Reihe golgiresidenter Glykosyltransferasen spielt die

Interaktion zwischen den Transmembrandomänen dieser Enzyme eine wichtige Rolle für die Rückhaltung in den entsprechenden Subkompartimenten des Golgi-Komplexes (Übersichtsartikel: NILSSON et al. 1994). Bisher sind die Sortierungssignale der zytoplasmatischen Domäne am besten charakterisiert. Zytoplasmatische Sortierungsfaktoren interagieren mit den Signalstrukturen der zytoplasmatischen Domäne und führen zur Umsetzung ihrer Sortierungsinformationen. Die Signalstrukturen der zytoplasmatischen Domänen werden durch spezifische Aminosäuresequenzen gebildet. Zu den am besten charakterisierten Sortierungssignalen zytoplasmatischer Domänen zählen die Tyrosinsignale und die leucinabhängigen Signale. Die meisten Tyrosinsignale haben die Konsensussequenz Y-X-X-Ø oder N-P-X-Y, wobei X für eine beliebige Aminosäure und Ø für eine Aminosäure mit einer großen hydrophoben Seitenkette steht (Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Methionin oder Valin) (MARKS et al. 1997). Der Urtyp des leucinabhängigen Signales bestehen aus zwei aufeinanderfolgenden Leucinen. Das erste Leucin ist für eine korrekte Sortierung absolut notwendig. Das zweite Leucin toleriert hingegen eine Substitution gegen eine andere hydrophobe Aminosäure, so daß auch LI- und LM-Motive als Sortierungssequenzen identifiziert wurden (SANDOVAL et al. 1993, DIETRICH et al. 1997). Um als aktives Sortierungssignal funktionieren zu können reicht jedoch die bloße Sequenz nicht aus. Das Signal muß auch im richtigen Kontext präsentiert werden. So können flankierende Aminosäuren sowie der Abstand zur Plasmamembran einen Einfluß auf die Aktivität eines Signales haben (HÖNING et al. 1995, ROHRER et al. 1996).

Die Strukturen der zytoplasmatischen LAP- und Lamp1-Domäne (Tail) weisen Parallelen auf (Abbildung 1.2). Beide enthalten ein Tyrosinmotiv vom Y-X-X-Ø-Typ, das in der LAP sowie in Lamp1 über eine kurze proximale Sequenz von 8 bzw. 7 Aminosäuren mit der Transmembranregion verknüpft ist. Für die korrekte lysosomale Sortierung von Lamp1 ist das im Tail lokalisierte Motiv mit der Sequenz G-Y-Q-T-I notwendig (WILLIAMS et al. 1990, HUNZIKER et al. 1991, GUARNIERI et al. 1993, HARTEK et al. 1992, HÖNING et al. 1995). ROHRER et al. (1996) zeigten, daß die Distanz zwischen diesem lysosomalen Sortierungssignal und der Plasmamembran einen Einfluß auf die Aktivität des Signales hat. Die Deletion des Alanins, das direkt vor dem lysosomalen Transportsignal liegt, sowie das Einfügen von vier zusätzlichen Alaninresten führt zur Fehlsortierung der entsprechenden Lamp1-Mutanten zur Plasmamembran (ROHRER et al. 1996).

Der LAP-Tail enthält ein Tyrosinmotiv mit der Sequenz Y-R-H-V, wobei das Tyrosin dieses Motivs für den lysosomalen Transport der LAP essentiell ist (PETERS et al. 1990). Der Lamp1-Tail endet jedoch direkt hinter dem Tyrosinmotiv, während sich im LAP-Tail noch ein distaler Bereich von 7 Aminosäuren anschließt. Dieser distale Abschnitt hat keinen Einfluß auf die schnelle Internalisierung der LAP an der Zelloberfläche. Eine Substitution einzelner Aminosäuren gegen Alanin als auch eine Deletion kleinerer Bereiche dieses Abschnittes, können jedoch einen inhibierenden Einfluß auf die Endozytose ausüben (LEHMANN et al. 1992).

Membranregionen werden die Membranproteine in clathrinumhüllten Vesikeln abgeschnürt. Nach dem Verlust ihrer Clathrinhülle fusionieren die Vesikel mit den frühen Endosomen. (SCHMID 1997). Der Verlust der Clathrinhülle wird durch die *Uncoating*-ATPase (HSC 70) vermittelt (SCHMID et al. 1985). Durch die Analyse der Internalisierungsraten einer Reihe von Substitutions- und Deletionsmutanten der LAP konnte das Internalisierungssignal genau charakterisiert und auf das Hexapeptid P-G-Y-R-H-V innerhalb des LAP-Tails festgelegt werden (LEHMANN et al. 1992). Nach der Aufnahme in die Endosomen wird die LAP nicht sofort in die weitere lysosomale Transportrichtung dirigiert. Statt dessen rezirkuliert die LAP zur Plasmamembran, wo eine erneute Endozytose stattfindet. Zwischen der endosomalen und der plasmamembranständigen LAP-Fraktion herrscht ein dynamisches Gleichgewicht, d.h. es findet ein permanenter Austausch zwischen der endosomalen und der plasmamembranständigen LAP statt. 80 %-90 % der neusynthetisierten LAP akkumulieren in diesem Recycling-Prozeß, wobei sich der größere Anteil dieses Plasmamembran-Endosomen Pools (ca. 80 %) in den Endosomen befindet (BRAUN et al. 1989). Der LAP-Vorläufer wird schließlich mit einer eher langsamen Geschwindigkeit zu den Lysosomen transportiert. Nach einer 2-stündigen metabolischen Markierung und einem 5-7-stündigen *Chase* sind 50 % der markierten LAP aus dem Recycling-Pool abgezogen und zu den Lysosomen weitertransportiert worden (PETERS et al. 1990, WAHEED et al. 1988). In den Lysosomen akkumuliert die membranständige LAP zunächst als lysosomales Membranprotein. Die proteolytische Spaltung am C-Terminus leitet die Maturierung der LAP ein. Eine Thiolproteinase spaltet in einer langsamen Reaktion und in Abhängigkeit vom sauren pH-Wert der Lysosomen die zytoplasmatische Domäne der LAP ab. Diese neue LAP-Zwischenstufe dient als Substrat einer intralysosomalen Aspartylproteinase., die nahezu den gesamten luminalen LAP-Bereich in Form der reifen LAP in das lysosomale Lumen freisetzt (GOTTSCHALK et al. 1989).

Lamp1 und Limp2 werden auf dem direkten Weg zu den Lysosomen transportiert. Hierbei verläuft der posttranslationale Transfer vom ER zum Golgi sowie die Passage des Golgi-Apparates für Lamp1, Limp2 und LAP mit einer vergleichbaren Geschwindigkeit ab. Die Hälfte des neusynthetisierten Limp2 und Lamp1 gelangt jedoch schon 1 Stunde nach der Synthese in die Lysosomen (BARRIOCANAL et al. 1986, GREEN et al. 1987, CARLSSON et al. 1992). Der lysosomale Transport dieser Proteine führt nicht über die Plasmamembran, was eine Akkumulation der neusynthetisierten Proteine in einem Recycling-Pool zwischen der Plasmamembran und den Endosomen ausschließt. In überexprimierenden Zellen können kleine Mengen an Lamp1 oder Limp2 auf der Plasmamembran detektiert werden. Dennoch wird auch in diesen Zellen der größte Anteil dieser Proteine unter Ausschluß einer Plasmamembranpassage direkt in die Lysosomen transportiert (BARRIOCANAL et al. 1986, HARTER et al. 1992, HÖNING et al. 1995). Die kleine plasmamembranständige Limp2- sowie Lamp1-Fraktion unterliegt in diesen Zellen einer schnellen

Endozytose. Die schnelle Endozytose von Lamp1 wird durch das im Tail befindliche Y-Q-T-I-Signal vermittelt (HÖNING et al. 1995). Es kann außerdem während bestimmter Differenzierungsstadien einiger Zellen zu einer erhöhten Lamp1-Zelloberflächenexpression kommen (SAWADA et al. 1993).

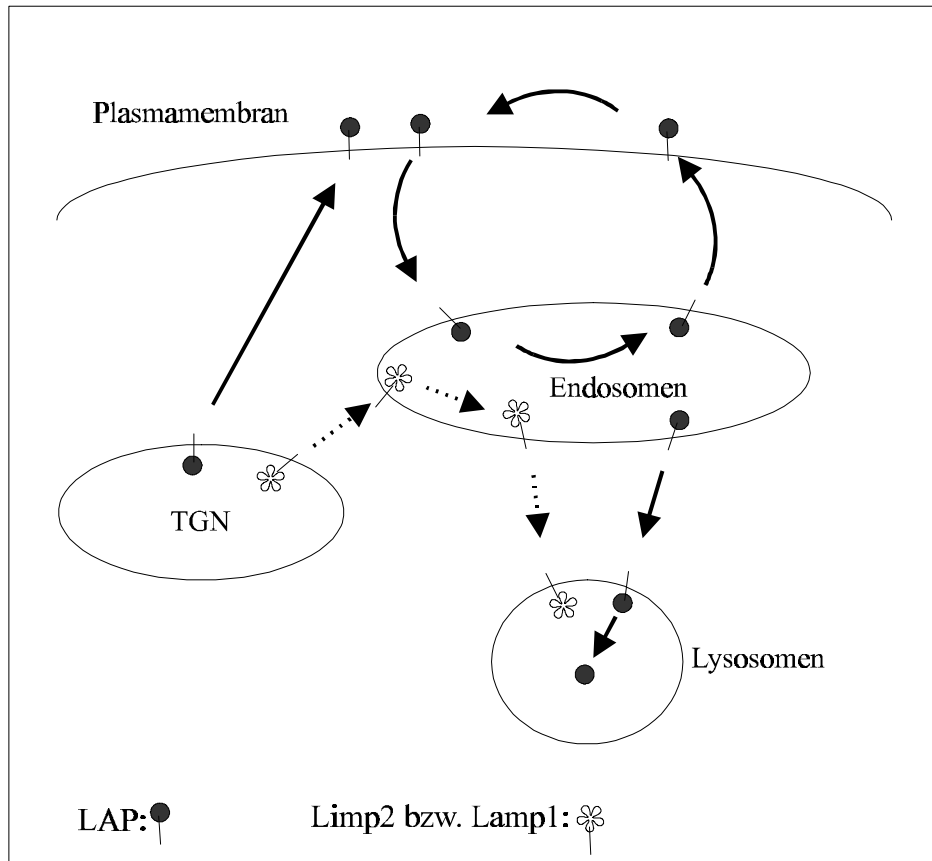


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des direkten und indirekten Transportes lysosomaler Membranproteine. Der direkte lysosomale Transport von Lamp1 und Limp2 wird durch gestrichelte Pfeile dargestellt. Die durchgehenden Pfeile symbolisieren den indirekten LAP-Transport, der über die Plasmamembran führt. Die einzelnen Kompartimente, die auf den Transportwegen passiert werden, erklären sich aus der Zeichnung.

1.4 Bedeutung des AP 1- und AP 3-Komplexes für den Transport lysosomaler Membranproteine

Der AP 3- und der AP 1-Komplex sind wie der AP 2-Komplex zytosolische Sortierungsfaktoren, die mit spezifischen Sortierungssignalen in den zytosolischen Domänen von Membranproteinen interagieren und für die Umsetzung der Sortierungsinformation dieser Motive notwendig sind (Übersichtsartikel: MARKS et al. 1997, SCHMID et al. 1997 und BONIFACINO et al. 1999). Der AP 1- und der AP 3-Komplex vermitteln jedoch keine Transportprozesse an der Plasmamembran. Der AP 1-Komplex spielt eine wichtige Rolle für die Sortierung des MPR (Mannose 6-phosphat Rezeptor) am TGN. Die Sortierung erfolgt über die Interaktion seines MPR-Tails mit dem AP 1-Komplex, der gleichzeitig mit

Clathrin interagiert (Le BORGNE et al. 1996, MAUXION et al. 1996). Für die *hinge*-Region der β 1-Untereinheit des AP 1-Komplexes konnte eine Interaktion mit Clathrin gezeigt werden (GALLUSSER et al. 1993). Es kommt zu einer Abschnürung von clathrinbeschichteten Vesikeln, in denen der MPR angereichert ist (GREEN et al. 1987, GEUZE et al. 1985, LEMANSKY et al. 1987). Die Bildung von clathrinbeschichteten Vesikeln am TGN wird durch die GTPase ARF (ADP-ribosylation factor 1) reguliert (TRAUB et al. 1993). Als Bindestelle für Transportsignale von Membranproteinen wird sowohl die μ -Untereinheit als auch die β -Untereinheit der Adaptoren diskutiert (AGUILAR et al. 1997, KIRCHHAUSEN et al. 1997, RAPOPORT et al. 1998, OHNO et al. 1998). *In vivo* Studien zeigen, daß der AP 3-Komplex einen wesentlichen Einfluß auf den lysosomalen Transport von Limp2- und Lamp1 hat. Bei einer Blockierung der μ 3A-Synthese mittels *anti-sense* RNA findet in HeLa- und NRK-Zellen eine Limp2- sowie Lamp1-Fehlsortierung zur Plasmamembran statt (Le BORGNE et al. 1998). *In vitro* Untersuchungen weisen darauf hin, daß der Limp2-Transport über eine direkte Interaktion zwischen Limp2 und AP 3 vermittelt werden könnte. Für eine starke *in vitro* Interaktion ist das LI-Motiv sowie die zwei sauren Reste (D und E) in Position -4 und -5 proximal zum LI-Motiv des Limp2-Tails notwendig (OHNO et al. 1996, STEPHENS et al. 1998, HÖNING et al. 1998). Der lysosomale Lamp1-Transport wird außerdem als AP 1-vermittelter Prozeß diskutiert. *In vitro* Studien zeigen in MDCK-Zellen eine Kolokalisation von AP 1 und Lamp1 in vesikulären Strukturen, die sich in der Nähe des Golgi-Apparates befinden (HÖNING et al. 1996). *In vitro* Untersuchungen, in denen der Lamp1-Tail eine starke Interaktion mit AP 1 aufweist, zeigen das *in vivo* eine direkte Interaktion zwischen AP 1 und Lamp1 für den Lamp1-Transport notwendig sein könnte. Weder in μ 1-*anti-sense* RNA-haltigen Zellen (NRK, HeLa) noch in μ 1-defizienten embryonalen Mausfibroblasten konnte eine Fehlsortierung von Lamp1 beobachtet werden konnte (Le BORGNE et al. 1998, laborinterne Information von P. Schu). Diesen *in vivo* Studien zur Folge scheint AP 3 im Vergleich zu AP 1 die wichtigere Funktion für die Lamp1-Sortierung zuzukommen. Die zellulären Sortierungsstationen, an denen AP 1 und AP 2 möglicherweise die Lamp1 bzw. Limp2-Transport vermitteln, konnte noch nicht identifiziert werden. *In vitro* Studien zeigten weder für die gesamte LAP noch für ihren Tail eine Interaktion mit AP 1 oder AP 3 (SOSA et al. 1993)

2 *Problemstellung*

Die lysosomalen Membranproteine Limp2 und Lamp1 werden nach ihrer Biosynthese vom TGN über ein endosomales Kompartiment direkt zu den Lysosomen transportiert. Im Gegensatz dazu rezykliert der membranintegrierte LAP-Vorläufer für 5-7 Stunden zwischen der Plasmamembran und den Endosomen, bevor der Weitertransport zu den Lysosomen erfolgt.

Mit Hilfe von Chimären zwischen der LAP und Lamp1 bzw. Limp2, die in BHK 21-Zellen exprimiert wurden, sollte der Recycling-vermittelnde Bereich der LAP eingegrenzt werden. Zu diesem Zweck wurden LAP-Chimäre eingesetzt, in denen die zytoplasmatische Domäne gegen die von Lamp1 oder Limp2 ausgetauscht wurde. Entsprechende Lamp1- und Limp2-Chimäre trugen die zytoplasmatische LAP-Domäne. Nach Identifizierung der Recycling-vermittelnden Domäne sollten durch Deletions- und Substitutionsmutanten die einzelnen Aminosäuren identifiziert werden, die das Recycling vermitteln. Ziel war es die minimale Sequenzinformation zu identifizieren, die auf Lamp1, Limp2 bzw. LAP übertragen werden muß, um ein Recycling bzw. einen direkten Transport in die Lysosomen zu vermitteln.

Sollte sich die Vermutung bestätigen, daß der Recycling-vermittelnde Sequenzbereich im zytoplasmatischen Tail lokalisiert ist, könnte weiterhin versucht werden, die zytoplasmatischen Sortierungsfaktoren zu identifizieren, die das Recycling umsetzen.

Hier bietet die Biosensor-Technologie die Möglichkeit die Interaktion zwischen Sortierungssignalen und bekannten Sortierungsfaktoren zu quantifizieren.

3 *Material und Methoden*

3.1 **Material**

3.1.1 **Geräte**

Analysenwaage Typ M5P und 1602 MP	Sartorius, Göttingen
Autoklav, Typ Tuttnauer 3870 EL	Sytec, Wettenberg
BIAcore	Biacore AB, Uppsala, Schweden
CO ₂ -Brutschrank Typ 2771	Heraeus, Osterode
CSC-Kamera	Raytest, Straubenhardt
DNA-Sequenzierer (373 DNA Sequencing System)	Applied Biosystem Inc., Weiterstadt
Dounce-Homogenisator 10 ml und 50 ml	Wheaton, USA
Drehrad für Eppendorfgefäße	Eigenbau, Werkstatt des Instituts
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophorese-Apparatur für Standard-Polyacrylamidgele	Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Elektrophorese-Apparatur für IEF-Gelelektrophorese	Eigenbau, Werkstatt des Instituts
Elektrophorese-Apparatur Mini V8/10 für Polyacrylamid-Minigele	Gibco, Gaithersburg, USA
Flüssigkeitsszintillationszähler 1900TR	Packard, Frankfurt
FPLC-Anlage	Pharmacia, Freiburg
<u>Säulen</u> für FPLC-Anlage:	
Hydroxyapatit (0,5/10)	Pharmacia, Freiburg
Superose 6® (16/60) 120 ml	Pharmacia, Freiburg
Gefrierschrank (-80 °C) Typ UF 85-300S	Colora Meßtechnik, Lorch
Gefrierschrank (-20 °C) GS 3002-6	Liebherr, Ochsenhausen
Geltrockner (GelAir Dryer)	BioRad, München
Geltrockner Typ G1200	Fröbel, Laborgeräte
Heizblöcke, Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Horizontalschüttler SM	Schütt, Göttingen
Inkubationschüttler, Vibrax IKA-VXR	Janke & Kunkel, Staufen
Lyophilisator Alpha 1-4	Christ, Osterode
Magnetrührer: IKA Maxi M und Combimag Reo	Janke & Kunkel, Staufen
<u>Mikroskope:</u>	
Fluoreszenzmikroskop, Modell Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen
Phasenkontrastmikroskop, Modell ID 03	Zeiss, Oberkochen
Inverses Mikroskop, Modell IM	Zeiss, Oberkochen
<u>Kamerasysteme</u> für die Mikroskope:	
CCD-Kamera	Photometrics, München
Mikrowellenherd	Bosch, Stuttgart
Mixer (Homogenisator)	Waring, USA

Multipette, Combitips	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Brand Gläser, Wertheim
pH-Meter Knick 647	Schütt, Göttingen
Phosphoimager, IPR 1000	Fuji, Tokio, Japan
Schüttelwasserbad	Köttermann, Häningsen
Semi-Dry-Blot-System	cti GmbH, Idstein
Spannungsgeräte	Hölzel, München
	Biometra, Göttingen
	LKB, Bromma
	Kontron, Eching
Spektralphotometer Uvikon 932 und Uvikon 810	
Steri-Kult Inkubator Modell 3194 und 3164	Forma Scientific, Marietta, USA
Sterilbank Modelle A/B3 und SG 400	Baker Company Inc., Stanford, USA
Stickstoff Einfriertank Biosafe Chronos	Messer Griesheim, Frankfurt
Thermocycler Gene Amp PCR 9600 bzw. 24000	Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA
Transilluminator Modell IL-400-M	Bachofer, Reutlingen
Ultraschall Sonifier W-450	Branson Ultrasonic SA, Carouge-Geneve, USA
UV-Handlampe (312 nm und 254 nm	Bachofer, Reutlingen
Vortex-Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich
Waagen Typ 1264MP und 1265 MP	Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbad GFL 1086	Krannich, Göttingen
Wasserbad	Eigenbau, Werkstatt des Instituts
Wipptisch	Eigenbau der Werkstatt und rocky, ltf-Labortechnik, Wasserburg am Bodensee
<u>Zentrifugen:</u>	
Eppendorfzentrifuge Typ 5402	Eppendorf, Hamburg
Biofuge pico	Heraeus, Osterode
Labofuge GL	Heraeus, Osterode
Kühlzentrifuge, Modell J-21 C und J2-MC	Beckmann, München
<u>Rotoren für Kühlzentrifuge:</u>	
JA-10 (bis 17680 xg)	Beckmann, München
JA-20 (bis 48300 xg)	Beckmann, München
Ultrazentrifuge L-80	Beckmann, München
<u>Rotoren für Ultrazentrifuge:</u>	
Ti 45	Beckmann, München
Tisch-Ultrazentrifuge TL-100	Beckmann, München
<u>Rotoren für Tisch-Ultrazentrifuge:</u>	
TLA 100.3	Beckmann, München
TLA 45	Beckmann, München

3.1.2 Verbrauchsmaterial

4- und 24-Loch-Zellkulturplatten	Greiner, Nürtingen
Cellophanfolien	Pütz Folien, Traunusstein Wehen
Deckgläschen (Ø 1,2 cm)	Menzel Gläser, Braunschweig
Dialyseschläuche (cut off .12-14 kD)	Biomol, Hamburg
Einfrierkästen	National Lab, Mölln
Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Einmalkanülen G18, G20 (0,9 mm)	Neoject, Gelnhausen
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
ELISA-Platten	Greiner, Nürtingen
Gewebekulturflaschen 25 und 75 cm ²	Greiner, Nürtingen
Gewebekulturschalen (Ø 3 cm, 6 cm, 10 und 20 cm)	Greiner, Nürtingen
Glasspitzröhrchen	Assistent, bezogen über Schütt Göttingen
Immersionsöl 518 C	Zeiss, Oberkochen
Linsenpapier MN 10B	Machery-Nagel, Düren
Nitrocellulose Blot-Membran 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig
Parafilm®	American National Can™, Neeah, USA
pH-Indikator-Streifen	Merck, Darmstadt
Plastik-Einmalpipetten, 5 ml, 10 ml	Grainer, Nürtingen
Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen für den Rotor TLA 100.3	Beckmann, München
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2,0 ml	Sarstedt, Braunschweig
Sensorchip CM 5	Biacore AB, Uppsala, Schweden
sterile Plastikröhrchen 10 ml	Greiner, Nürtingen
sterile Plastikröhrchen 50 ml	Sarstedt, Braunschweig
<u>Sterilfilter:</u>	
Minisart, 0,2 µm Nitrocellulose	Sartorius, Göttingen
Celluloseacetatfilter 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Durapore® Membran Filter 0,22 µm	Millipore, Eschborn
Whatman GB 003 Papier	Schleicher & Schüll, Dassel

3.1.3 Kits zur Präparation und Transfektion von DNA

ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion (No.402079)	Perkin Elmer Cetus, Norwalk/USA
T4 Cloning Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande
QIAquick Gel Extraction	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification	Qiagen, Hilden
QIA-Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Effectene™ Transfektionsresgenz	Quiagen, Hilden
Lipofektin-Reagenz	Gibco/BRL, Eggenstein

3.1.4 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) und Roth (Karlsruhe) im Reinheitsgrad *pro analysis* bezogen.

2-Mercaptoethanol	Sigma
Ampholine pH 3,5-10, pH 5-8, pH 4-6	Pharmacia, Freiburg
Ampholine pH 2-11	Sigma
30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid, gebrauchsfertige Lösung	Roth
Agarose	GIBCO/BRL, Eggenstein
Ammoniumperoxidsulfat	Merck
Bromphenolblau	BioRad, München
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck
Chloroform	Merck
Coomassie Blau R 250	Serva
2,3 Dehydro-2-deoxy-N-acetyl-Neuraminsäure	Boehringer Mannheim
Dimethylsulfoxid, ultrarein (DMSO)	Merck
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Dithiothreitol, ultrarein (DTT)	Serva
Essigsäure, 99 %	Merck
Ethanol	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA)	Merck
Ficoll® 400	Sigma
Folin-Reagenz	Merck
Formaldehyd, 37 %, stabilisiert	Merck
Gelatine	Serva
Glutathion	Merrck
Glutaraldehyd (8 %, EM-grad (00216))	Polyscience Inc., Warrington, USA
Glycerin, wasserfrei	Merck
Glycin	Roth
Harnstoff	Merk
H ₂ O, HPLC-Reinheitsgrad	Baker, Groß Gerau
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Serva
Kaliumcarbonat (K ₂ CO ₃)	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumpermanganat (KMnO ₄)	Merck
Kupferchlorid (CuCl ₂ • 2H ₂ O)	Merck
Kupfersulfat (CuSO ₄)	Merck
L-Cystein	Biomol, Hamburg
L-Methionin	Serva
Magermilchpulver	Engel, Darmstadt

Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Merck
MES (2-[N-morpholino]ethanschwefelsäure)	Serva
Methanol	Merck
2-(4-MU)- α -D-N-Aactylneuraminic.Acid	Sigma
Natriumazid (NaN_3)	Sigma
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumcitrat	Merk
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS) für Elektrophorese	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS), mind. 99 %	Serva
N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	BIAcore AB, Uppsala, Schweden
N-hydroxysucciniimid (NHS)	BIAcore AB, Uppsala, Schweden
NHS-LC-Biotin	Pierce, Köln
NHS-SS-Biotin	Pierce, Köln
Para-Nitrophenolphosphat	Sigma
Para-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid	Sigma
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma
Oxalacetat (O-0505)	Sigma
Paraformaldehyd	Sigma
Protaminsulfat	Serva
Saccharose	Merck
Silbernitrat (AgNO_3)	Merck
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylen-diamin)	Sigma
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth
Triton X-100	Serva
Triton X-114	Boehringer Mannheim
Trypan-Blau	Sigma
Tween 20	Sigma
Wasserstoffperoxid (H_2O_2), 30 %	Merck

3.1.5 Detektionssysteme

Roti®-Quant, Bradford-Reagenz	Roth
Mikro Lowry Reagenz	BioRad, München
SuperSignal® Substrat für Western Blot	Pierce, Rockford, USA

3.1.6 Proteine, Peptide und Proteinstandards

Jodacetamid (JAA)	Serva, Heidelberg
Pansorbin-Zellen (hitzeinaktivierte Staphylococcus aureus Zellsuspension)	Calbiochem, Frankfurt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Poly-L-Lysin	Sigma
Prestained Protein Molecular Weight Marker, High Range (200-14 kD)	Oncogene, Cambridge, USA
Proteaseinhibitor-Coctail	Sigma
Protein A-Sepharose CL-4B	Sigma
Rainbow TM -colored protein MG-Standard	Amersham, Braunschweig
Rinderserumalbumin für Proteinbestimmungen, Fraktion V	Paesel & Lorei, Frankfurt
Immunopure Immobilized Streptavidin	Pierce, Rockford, USA

3.1.7 Enzyme und Nukleotide

Neuraminidase (Sialidase) aus <i>Vibrio cholerae</i>	Boehringer Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Bad Schwalbach
Rnase A	Boehringer Mannheim
T4-DNA-Ligase	Pharmacia, Freiburg
Ultrapure dNTP-Set	Pharmacia, Freiburg

3.1.8 Radioaktive Substanzen

[³⁵ S]-L-[Methionin/Cystein]	Amersham-Buchler, Braunschweig
--	--------------------------------

3.1.9 Antibiotika

Puromycin p. A.	Sigma, Deisenhofen
Hygromycin B, p. A.	Calbiochem, Frankfurt

3.1.10 Antikörper

3.1.10.1 Primärantikörper

Antigen	immunisierte Spezies, Ig-Klasse, Bezeichnung	Aufbereitung	Referenz
γ -Adaptin aus Rinderhirn	Maus, monoklonal, IgG2a, Klon 100/3	Ascites	Sigma, Deisenhofen (A4200)
α -Adaptin	Maus monoklonal, IgG 2a, Klon 100/1	Ascites	Sigma, Deisenhofen
lösliche LAP-Form, humane LAP-cDNA in High5-Zellen exprimiert	Kaninchen, polyklonal V-2/V-3, 23.10.1995	Serum	C. Schäfer, Abteilung für Biochemie II
Lamp1, Ratte	Kaninchen, polyklonal, LY1C6	Serum	I. Mellman, Yale, USA
Limp2, Ratte	Maus, monoklonal	aufgereinigt	I. Sandoval, Madrid, Spanien
membranständige LAP-Form, humane Placenta	Kaninchen, polyklonal, LM-9, (15.1.89)	Serum	P. Laidler, Abteilung für Biochemie II
lösliche LAP-Form, humane Placenta	Kaninchen, polyklonal, LS-4, 3.-8.1.1989	Serum	P. Laidler, Abteilung für Biochemie II
gesamter humaner LAP-Tail, Peptid	Kaninchen, polyklonal, I-4, 16.10.1990	Serum	A. Hille-Rehfeld, Abteilung für Biochemie II

3.1.10.2 Sekundärantikörper

Ziege anti Kaninchen, HRP-Konjugat

Jackson Inc. Baltimore, USA (Vertrieb: Dianova, Hamburg (111-035-005))

Ziege anti Maus, Cy2/Cy3-gekoppelt

Dianova, Hamburg

Ziege anti Kaninchen, Cy2/Cy3-gekoppelt

Dianova, Hamburg

Ziege anti Maus Ig, FITC-Konjugat

Jackson Inc. Baltimore, USA (Vertrieb: Dianova, Hamburg (115-095-146))

3.1.11 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Medium	Referenz
BHK	(<i>Baby hamster kidney</i>) Fibroblasten aus der Niere des syrischen Hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) ATCC-Nr.: CCL-1632	DMEM mit 5 % FCS und Pen/Strep	MACPERSON und STOKER 1961
$\mu 1$ -MEF	embryonale Mausfibroblasten, „ $\mu 1$ -Knock-out Maus“	DMEM mit 10 % FCS und Pen/Strep	AG P. Schu Abteilung für Biochemie II

3.1.11.1 Transfizierte Zelllinien

BHK 21 LAP-WT

Die humane LAP-WT cDNA (CT 29, POHLMANN et al. 1988) wurde in die *Eco* RI-Schnittstelle des pBEH-Polylinkers inkloniert. Danach erfolgte die stabile Transfektion von BHK 21-Zellen mit diesem Plasmid. Der durch Selektion gegen Puromycin erhaltene Klon B2G8 wurde von der Arbeitsgruppe C. Peters (Biochemie II, Göttingen) zur Verfügung gestellt.

BHK 21 LAP-CP25 und BHK 21 LAP-D7

Die LAP-Deletionsmutanten (LAP-CP25 und LAP-D7) wurden durch *in vitro* Mutagenese (NAKAMAYE et al. 1986) aus der humanen LAP-WT cDNA hergestellt (PETERS et al. 1990, LEHMANN et al. 1992). Die cDNAs, die für die Mutanten kodieren, wurden in die *Eco* RI-Schnittstelle des pBEH-Vektors inkloniert. Die mit diesem Plasmid stabil transfizierten BHK 21 Zellen wurden gegen Puromycin selektiert und ebenfalls von der Arbeitsgruppe C. Peters (Biochemie II, Göttingen) zur Verfügung gestellt.

BHK 21 LAP-Lamp1, BHK 21 Lamp1-LAP, BHK 21 LAP-Limp2, BHK 21 Limp2-LAP

Diese LAP-Chimären wurden in einer Zusammenarbeit zwischen den Arbeitsgruppen C. Peters (Biochemie II, Göttingen,) und I. Sandoval (Madrid, Spanien) aus der humanen LAP-WT cDNA und der Ratten Lamp1 sowie der Ratten Limp2 cDNA (HOWE et al. 1988, VEGA et al. 1991) konstruiert. Hierbei wurde entweder der LAP-Tail oder die Transmembran- im Komplex mit der luminalen LAP-Region gegen den entsprechenden Lamp1 bzw. Limp2-Bereich ausgetauscht. Die Fusion erfolgte mittels einer eingeführten *Xho* I-Schnittstelle, durch die jeweils die letzte Aminosäure der Transmembranregion ausgetauscht werden mußte. Die Chimäre wurden in den pBEH-Vektor inkloniert, in BHK 21-Zellen stabil exprimiert und gegen Puromycin selektiert.

BHK 21 LAP-Lamp1/LAP

Die Konstruktion der Chimäre ist in Abschnitt 3.2.1.4 beschrieben. BHK 21-Zellen wurden stabil mit der in pBEH inklonierten Chimäre transfiziert und gegen Puromycin selektiert.

LAP-WT in μ 1-defizienten Mausfibroblasten (MEF)

μ 1-defiziente MEF-Zellen wurden mit der humaner LAP-WT cDNA (über *EcoRI* in pBEH inkloniert) transfiziert und gegen Hygromycin selektiert.

3.1.12 Zellkulturmedien und Lösungen zur Arbeit mit

PBS (für Zellkultur)	150 mM NaCl 120 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ pH 7,4 0,002% Phenolrot (pH-Indikator)
DMEM (<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)	Gibco/BRL, Eggenstein
Fötale Kälberserum (FCS)	chargenabhängig, z.B. Gibco/BRL, Eggenstein
Glutamin	50-fach konzentrierte Stammlösung (= 220 mM), Serva, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	(10.000 U bzw. 10.000 μ g/ml) 100-fach konzentrierte Stammlösung, Seromed/Biochrom, Berlin
Trypsin-EDTA-Lösung (gebrauchsfertig):	0,05 % (w/v) Trypsin und 0,02% (w/v) EDTA in modifizierter Puck's Salzlösung, Gibco/BRL, Eggenstein

3.1.13 Bakterienstamm

DH5 α

3.1.14 Medien zur Aufzucht von Prokaryontischen Zellen

LB-Medium: 10g Bacto-Trypon
5g Bacto-Hefe Extrakt
wurden in 800 ml dest. H₂O gelöst, auf pH 7,5 eingestellt, anschließend mit dest. H₂O auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.

LB-Ampicillin- Agarplatten:

Zur Bakterienaufzucht wurde dem LB Medium vor dem Autoklavieren Agar in einer Endkonzentration von 5 % zugesetzt. Nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen auf 50 °C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 200 mg/ml zugefügt. Der Agar wurde in 9 cm Petrischalen gegossen, bei Raumtemperatur abgekühlt und anschließend bei 4 °C gelagert.

3.1.15 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

PBS	140 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
		pH 7,4
PBS**	0,9 mM	CaCl ₂
	0,5 mM	MgCl ₂
		in PBS
TBS	150 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCL, 7,4

3.1.16 Standardlösungen zum molekularbiologischen Arbeiten

Verwendeten Lösungen:

TE 10 mM Tris/HCL; PH 7,5
1 mM EDTA

TAE 40mM Tris
2 mM EDTA
mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen

1M Tris/HCl	121 g Tris wurden in 800 ml dest H ₂ O gelöst, der pH-Wert mit konzentrierter HCl auf den gewünschten Wert (7,5; 8,0; 8,5) eingestellt, das Volumen auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.
20 % SDS	20 g Natriumdodecylsulfat wurden in 100 ml dest H ₂ O gelöst und sterilfiltriert
3M NaOAc	408 g Natriumacetat • 3 H ₂ O wurden in 800 ml dest H ₂ O gelöst, der pH-Wert mit Eisessig auf 5,2 eingestellt, das Volumen auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.

0,5 M EDTA	181,1 g Dinatriummethyldiamintetraacetat • 2 H ₂ O wurden in 800 ml dest H ₂ O gelöst, der pH-Wert mit etwa 20 g NaOH oder konzentrierter NaOH auf pH 8,0 eingestellt, das Volumen auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.
PCI	Chloroform und Isoamylalkohol wurden im Verhältnis 24:1 und das Produkt wiederum 1:1 mit Phenol gemischt

3.1.17 Vektoren, DNA-Standarts

pBEH

Der pBEH-Vektor eignet sich zur Expression von Genen in Säugerkellen. Die in den pBEH-Vektor (Artelt et al. 1988) inklonierte cDNA wird vom frühen SV 40-Promotor exprimiert. Das Plasmid enthält außerdem eine Splice-Stelle und ein Polyadenylierungssignal für die Expression in eukaryontischen Zellen. Zur Vermehrung in *E.coli* besitzt der Vektor einen Replikationsursprung und das Beta-Lactamase-Gen für eine Ampicillinresistenz.

pSV2 pac MORTENSEN et al. 1991
pGK hygro VARA et al. 1986
DNA-Ladder GIBCO/BRL Eggenstein

3.1.18 EDV

3.1.18.1 Hardware

Apple Macintosh	Intel
Pentium 100	Apple Macintosh
Laser Writer 16/600 PS	Hewlett Packard, Palo Alto, USA
Scan Jet 4c/T	Lexmark International, Inc. USA
Lexmark Optra SC 1275	

3.1.18.2 Software

Windows 95	Microsoft, USA
Mac TM OS	
Adobe Photoshop 3.0	Adobe Systems Inc.
BIAcore Evaluation Software 2.1	Biacore AB, Uppsala, Schweden
Corel Draw 7.0	Pantone Inc., USA
Corel Photo Paint 7.0	Pantone Inc., USA
Image Gauge V3.0	FujiFilm
WinCam 2.2	Cybertech, Berlin
Word 7.0	Microsoft, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit DNA

3.2.1.1.1 Präzipitation von DNA mit Ethanol

Das Volumen der DNA-Lösung wurde bestimmt und die Konzentration auf 0,3 M Na-Acetat eingestellt. Die DNA-Probe wurde dann mit 2 Volumen Ethanol versetzt und gemischt. Die Präzipitation erfolgte 20 Minuten bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 Minuten auf Trockeneis oder über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Anschließend wurde die DNA durch 10 minütige Zentrifugation bei 12.000 xg sedimentiert, das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut 5 Minuten zentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde dann 3-5 Minuten im Vakuumtrockner getrocknet oder in einem geöffneten Eppendorfgeläß 3-5 Minuten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

3.2.1.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung

Photometrische Analyse

Die photometrische Analyse von DNA erfolgte bei 260 nm in einer Quarzküvette gegen TE-Puffer oder H_2O bidest. Eine OD_{260} von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 mg/ml doppelsträngiger DNA.

Ethidumbromid-Fluoreszenzmessung im Agarosegel

Diese Methode empfiehlt sich zur Konzentrationsbestimmung von kleinen Mengen DNA. In einem 1%igem Agarosegel (mit 0,5 mg Ethidumbromid pro ml Gellösung) wird ein Aliquot der zu quantifizierenden DNA-Probe und in einer benachbarten Spur 400 ng einer λ -Phagen-DNA, die mit der Restriktionsendonuklease *Hind III* verdaut worden war, aufgetrennt. Die Fluoreszenz-Intensitäten der DNA-Probe und des Standards (die 2,3-kb-Bande enthält etwa 20 ng) wurden auf einem UV-Transilluminator verglichen, und die DNA-Konzentration der Probe abgeschätzt.

3.2.1.1.3 Reinigung von DNA-Fragmenten mit QIAquick-Säulen

(QIAquick Handbook, April 1997)

Die DNA-Probe wurde mit 5 Volumina Puffer PB gemischt, auf eine QIAquick-Säule aufgetragen und 60 Sekunden bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde einmal mit 750 μl Puffer PE gewaschen (14.000 rpm, 60 Sekunden), danach trocken zentrifugiert und die DNA anschließend mit 50 μl Tris-Puffer pH 8,5 oder H_2O bidest. eluiert.

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten, mit 3 Volumina Puffer QX1 versetzt und 10 Minuten bei 50 °C solubilisiert.

Nach dem kompletten Auflösen des Agarosegels im oben genannten Puffer wurde 1 Volumen Isopropanol zugegeben. Eine QIAquick-Säule wurde anschließend mit dem Gemisch beladen und wie oben beschrieben, mit der Reinigung fortgefahren.

3.2.1.1.4 Verdauung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

(LEHRACH et al. 1982)

Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in Units (U) angegeben. Ein Unit entspricht der Menge an Enzym, die benötigt wird, um 1 µg λ-DNA in einer Stunde vollständig zu verdauen. Um sicherzustellen, daß die Verdauung quantitativ abläuft, wurden die Enzymmengen und die Inkubationszeit verdoppelt.

Reaktionsansatz für die Spaltung von Plasmid-DNA:

x µg	DNA
2 µl	geeigneter 10x Puffer (nach Angabe des Herstellers)
2x xU	Restriktionsendonuklease
	ad 20 µl H ₂ O bidest.

Der Ansatz wurde 2 Stunden bei 37 °C inkubiert, anschließend ein Aliquot im Agarosegel analysiert. Präparative Verdauungen wurden in größeren Volumina und mit entsprechend größerer Enzymmenge durchgeführt.

Als Reaktionspuffer wurde das New England Biolabs (NEB) Puffer System verwendet. Diese Puffer wurden vom Hersteller als 10x-Konzentrate zusammen mit den Enzymen geliefert. Das NEB System besteht neben enzyspezifischen Puffern aus vier Basispuffern.

NEB 1: 50 mM Tris/HCl (pH 7) + 10 mM MgCl₂ + 1 mM DTT

NEB 2: 50 mM Tris/HCl (pH 8) + 10 mM MgCl₂ + 1 mM DTT + 50 mM NaCl

NEB 3: 50 mM Tris/HCl (pH 8) + 10 mM MgCl₂ + 1 mM DTT + 100 mM NaCl

NEB 4: 50 mM Tris/HCl (pH 8) + 10 mM MgCl₂ + 1 mM DTT + 50 mM KAc

Alle angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen.

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

3.2.1.2.1 Herstellung transformationskompetenter Zellen

E. coli vom Stamm DH5 α wurden nach der Methode von HANAHAN et al. (1985) für die Aufnahme von DNA aus dem umgebenden Medium kompetent gemacht.

Lösungen:

TfbI: 100 mM RbCl
50 mM KCl
30 mM KAc
15 % (v/v) Glycerin
pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt

TfbII: 10 mM MOPS
10 mM RbCl
75 mM CaCl
15 % (v/v) Glycerin
pH 7,0 mit NaOH eingestellt

TfbI und TfbII wurden jeweils frisch angesetzt und sterilfiltriert.

6 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie *E. coli* DH5 α von einer Stammplatte angeimpft und auf dem Drehrad bis zu einer o.D.₅₅₀ von 0,3 inkubiert. Mit 2 ml dieser Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium in einem 1 l-Schüttelkolben angeimpft und 2 bis 3 Stunden unter starkem Schütteln (300 rpm) bis zu einer o.D.₅₅₀ von 0,5 bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in Eiswasser 10 Minuten unter Schwenken abgekühlt und in 50 ml-Röhrchen 5 Minuten bei 2.500 rpm (4 °C) zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 2 ml TfbI aufgenommen, kurz geschüttelt, 90 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend 5 Minuten bei 2.500 rpm (4 °C) in der Eppendorfzentrifuge zentrifugiert. Die Zellen wurde in 2 ml TfbII suspendiert und Aliquots von je 100 μ l in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

3.2.1.2.2 Transformation kompetenter Zellen

100 μ l kompetente Zellen (DH5 α) wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 ng Vektor-DNA bzw. Ligationsansatz gemischt. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock von 2 Minuten bei 37 °C. Nach weiteren 2 Minuten auf Eis wurden 0,5 ml LB-Medium zugegeben und der Ansatz 30-60 Minuten bei 37 °C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden 50-400 μ l des Transformationsansatzes auf einer LB-

Ampicillin-Agarplatte, die 200 µg/ml Ampicillin enthielt, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit den erhaltenen Kolonien wurden entweder 120 ml für einen Midi- oder für einen Mini-Ansatz 5 ml LB-Medium (200 µg/ml Ampicillin) angeimpft. Diese Kultur wurde sowohl zum Anlegen einer Glycerinkultur als auch für die Plasmidpräparation verwendet.

3.2.1.2.3 Anlegen einer Glycerinkultur

Vorkulturen mit einer OD₆₀₀ von größer als 1,0 in LB Medium wurden mit 0,25 Volumen 80 % Glycerin versetzt und bei -70 °C aufbewahrt. Aus der Glycerinkultur kann direkt eine Kultur zur Präparation von Plasmid-DNA angeimpft werden.

3.2.1.3 Isolierung von DNA

3.2.1.3.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA (Qiagen-Methode)

(Qiagen-Handbook, April 1997)

Die Plasmidpräparationen wurden nach Vorschrift des Herstellers und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt. 5 ml LB-Medium mit 200 µg/ml Ampicillin wurden mit einer transformierten *E. coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf dem Drehrad inkubiert. 2 ml der Bakteriensuspension wurden 5 Minuten in der Eppendorff-Zentrifuge bei 1.800 xg (6.000 rpm) zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 250 µl eiskaltem Puffer P1 aufgenommen, mit 250 µl Puffer P2 versetzt und 50 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 350 µl Puffer P3 zugegeben und die Lösung 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 12.000 rpm wurde der Überstand auf eine Minisäule gegeben und diese 1 Minute bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen, 750 µl Puffer PE auf die Säule gegeben und diese erneut 1 Minute zentrifugiert. Dieser Durchfluß wurde ebenfalls verworfen und die Säule 1 Minute trocken zentrifugiert. Die Elution der gebundenen DNA erfolgte mit 100 µl H₂O bidest.

3.2.1.3.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA (Qiagen-Methode)

(Qiagen-Handbook, April 1997)

Die Plasmidpräparationen wurden nach Vorschrift des Herstellers Qiagen und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt.

<u>P1:</u>	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A

<u>P2:</u>	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS
<u>P3:</u>	3 M	Kaliumacetat (KAC) pH 5,5
<u>QBT:</u>	750 mM	NaCl
	50 mM	MOPS pH 7,0
	15 %	Ethanol
	0,15 %	Triton X-100
<u>QC:</u>	1 M	NaCl
	50 mM	MOPS pH 7,0
	15 %	Ethanol
<u>QF:</u>	1,25 M	NaCl
	50 mM	Tris/HCl pH 8,5
	15 %	Ethanol

Ausgangsmaterial für diese Präparation waren 120 ml einer Bakterienkultur mit einer OD_{600} von größer als 1,0. Diese wurde bei 8.500 xg im JA-10-Rotor (8.000 rpm) sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml Puffer P1 resuspendiert, in JA-20 Röhrchen überführt, mit 4 ml Puffer P2 versetzt, vorsichtig durch Invertieren gemischt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 4 ml eiskaltem Puffer P3 und sofortigem Invertieren wurde neutralisiert und anschließend 10-15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz 30 Minuten bei 30000 x g (18.000 rpm) im JA-20-Rotor zentrifugiert (4 °C), der Überstand durch zwei Lagen Mull auf eine mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen-Plasmid Prep Tip100-Säule gegeben. Die Plasmid-DNA bindet an das Silikagel-Anionenaustauscher-Säulenmaterial. Die Säule wurde zweimal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen, die Plasmid-DNA anschließend mit 50 ml QF-Puffer eluiert und in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen. Die DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol (100 %) gefällt und bei 4 °C und 4.400 xg für mindestens 45 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, bei RT oder im Vakuumtrockner getrocknet und in einem geeignetem Volumen H_2O bidest. aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde durch eine Messung der OD_{260} bestimmt.

3.2.1.3.3 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden Agarosegele verwendet. Die für die Gele benutzte Konzentration an Agarose richtete sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente:

Agarose-Konzentration [%]	Trennbereich [kb]
0,6	20-1
0,9	7-0,5
1,2	6-0,4
1,5	4-0,2
2,0	3-0,1

Proben-Puffer (LP IV):	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
	40 % (w/v)	Saccharose in 1 x TAE
Ficoll-Marker:	0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,05 % (w/v)	Xylencyanol
	15 % (w/v)	Ficoll

Die erforderliche Menge an Agarose wurde in 300 ml 1x TAE aufgeköcht (Mikrowelle) und nach Abkühlen auf 55 °C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Die Agarose wurde in eine Gelform gegossen und bei RT abgekühlt. Das erstarrte Gel wurde in die Elektrophoresekammer überführt, die Proben mit 10-20 % Ficoll-Marker versetzt und in die vorgeformten Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 3-4 V/cm durchgeführt. Durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid werden die DNA-Fragmente unter UV-Licht als Banden sichtbar und das Gel konnte auf dem UV-Transilluminator analysiert werden. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel auf dem UV-Transilluminator mit einem Videosystem aufgenommen und ein Ausdruck des Bildes erstellt.

3.2.1.3.4 Ligation

Ligationsmix:	x µl	Vektor-DNA nach Restriktionsspaltung (10-20 ng)
	y µl	DNA-Fragment (10 facher molarer Überschuß)
	1 µl	10x T4-DNA-Ligasepuffer
Endkonzentration:		50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM DTT; 1 mM ATP; 25 µg/ml BSA
	1 µl	T4-DNA-Ligase80 NEB-Einheiten/µl ad 10 µl HO bidest.

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C oder 2 Stunden bei Raumtemperatur.

3.2.1.3.5 DNA-Amplifizierung über die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

(SAIKI et al. 1986 und SAIKI et al. 1988)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode um definierte DNA-Fragmente zu amplifizieren. Die Grundlage für diese Technik bildet die Entdeckung und Isolierung einer thermostabilen DNA-Polymerase (*Taq*) des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus* von SAIKI et al. (1988).

Der der PCR zugrunde liegende Mechanismus beinhaltet drei Schritte, die für jede DNA-Amplifizierung nötig sind:

1. **Denaturierung** der Ausgangs DNA (Template) in Einzelstränge
2. **Annealing**: Die Bindung von Oligonukleotidprimern an beide Einzelstränge.
3. **Extension**: Die Synthese der DNA, ausgehend von den gebundenen Primern.

Als Template wurde DNA verwendet, die mit der Plasmidpräparation nach Quiagen präpariert wurde. Die *Taq*-Polymerase wurde zusammen mit dem 10x konzentrierten Puffersystem und dem Ultrapure dNTP-Set von der Firma Pharmacia bezogen. Das dNTP-Set wurde von 100 μ je Nukleotid auf 12,2 μ M verdünnt (dNTP-Mix).

PCR-dNTP-Mix:	12,5 mM	je Nucleotid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
10x PCR-Puffer:	800 mM	Tris/HCl pH 8,9
	200 mM	(NH ₄)SO ₄
	50 mM	MgCl
Taq-DNA-Polymerase:	2,5 U/ml	

Bei jeder PCR wurden zwei Kontrollen mitgeführt, um die verwendeten Lösungen auf Kontaminationen zu testen. Es wurde jeweils eine Probe ohne Template und eine Probe ohne Primer angesetzt. In beiden Kontrollen kann nur im Fall einer Kontamination ein PCR-Produkt entstehen.

<u>PCR-dNTP-Mix:</u>	je 25 mM	dATP, dCTP, dGTP und dTTP
<u>10x PCR-Puffer:</u>	500 mM	KCl
	15 mM	MgCl ₂
	100 mM	Tris/HCl pH 9,0
<u>Taq-DNA-Polymerase:</u>	5 U/ μ l	

<u>Reaktionsansatz:</u>	10 µl	10x PCR-Puffer
	2 µl	PCR-dNTP-Mix
	40 pmol	Primer 1
	40 pmol	Primer 2
	1 µg	DNA
	1 µl	Polymerase
		ad 100 µl H ₂ O, bidest.

PCR-Programm: Das PCR-Programm ist abhängig von der DNA-Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (Beispiel siehe Abschnitt 3.2.1.4).

Zur Analyse wurden von jedem PCR-Ansatz je 20 µl entnommen, mit Auftragspuffer gemischt und auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt.

3.2.1.4 Einsatz der PCR für die Mutagenese

Mit Hilfe der PCR wurde eine LAP-Lamp1/LAP-Chimäre erstellt, die über die luminale LAP-Domäne und einen chimären zytoplasmatischen Tail verfügt. Die Chimäre trägt das proximale Lamp1-Motiv gefolgt von einem LAP-Tyrosin-Motiv. Für die Konstruktion der Chimäre diente LAP-Lamp1 in pBEH als Template. Für die Mutagenese wurde ein 3'-Primer (SH-68) eingesetzt, der über einen Overlap (nicht primende Endregion) das ausgetauschte Lamp1-Tyrosinmotiv gefolgt von einem Stopcodon und einer *Xba*I-Klonierungsstelle einführte. Der 5'-Primer (SH-31) bindet kurz vor der *Bal*I-Schnittstelle (587 bp) an das Template. Die *Bal*I-Schnittstelle befindet sich in dem Bereich, der für die luminale LAP-Domäne kodiert und diente zur späteren Einklonierung des PCR-Fragmentes in LAP-WT pBEH (siehe 3.2.1.5).

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes:

Template(LAP-Lamp1/LAP)	1 µl
5'-Primer (SH-31)	40 pmol
3'-Primer (SH-68)	40 pmol
10x Taq-Polymerase-Puffer	10 µl
Taq-Polymerase	5 µl
	mit H ₂ O (HPLC-Reinheitsgrad ad. 100 ml)

Bezeichnung	Leserichtung	Sequenz (in Leserichtung)
SH-31 (LAP-Sequenzprimer, ab bp 361)	5' → 3'	AAC CTG GCT GGA CTC TTC
SH-68	3' → 5'	TCT AGA TCC TAA ACG TGC CGA TAG CCG G

PCR-Programm für den Thermocycler

15 Sekunden	96 °C Denaturierung
60 Sekunden	52 °C Annealing
2 Minuten	72 °C Extension
	insgesamt 35 Zyklen

Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt (siehe 3.2.1.1.3), mit *BalI/XbaI* verdaut (siehe 3.2.1.1.4), im Agarosegel aufgetrennt (siehe 3.2.1.3.3), wieder aufgereinigt und schließlich zur Subklonierung eingesetzt.

3.2.1.5 Subklonierung des PCR-Fragmentes

Das PCR-Fragment (siehe 3.2.1.4) wurde in humane LAP-WT cDNA (POHLMAN et al. 1988) einkloniert. Zu diesem Zweck wurde der pBEH-Vektor, der LAP-WT cDNA enthielt, mit *BalI/XbaI* verdaut (siehe 3.2.1.1.4). Die *XbaI*-Schnittstelle (2025 bp) befindet sich in der nicht translatierten LAP-3'-Sequenz und die *BalI*-Schnittstelle (587 bp) befindet sich in der Sequenz, die für die luminale LAP-Domäne kodiert. Auf die Weise entstehen folgende Restriktionsfragmente: Das Vektorfragment und der herausgeschnittene Bereich der LAP cDNA. Nach der Auftrennung im Restriktionsansatzes im Gel wurde das Vektorfragment isoliert und aufgereinigt (siehe 3.2.1.1.3). Das Vektorfragment wurde anschließend mit dem *BalI/XbaI* verdauten PCR-Fragment ligiert (siehe 3.2.1.3.4). Der gesamte Sequenzbereich der LAP-Chimäre, die durch diese Subklonierung entstand, wurde durch Sequenzierung (siehe 3.2.1.6) überprüft.

3.2.1.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Doppelstrang-DNA wurde mit einem DNA-Sequenzierungsgerät (Model 373A, ABI) durchgeführt. Dabei wurde die Taq-Cycle-Sequenzierung Methode des Herstellers Applied Biosystems angewandt, die auf der Methode nach SANGER et al. (1977) aufbaut. Statt radioaktiv-markierter werden jedoch Fluorochrom-gekoppelte Didesoxynukleotide zum Kettenabbruch eingesetzt. Dazu wurde das ABI PISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion-Produkt der Firma Perkin Elmer (No. 402079) verwendet, das

neben dem Puffer für die Sequenzierungsreaktion und der AmpliTaq Polymerase (8 U/ μ l) auch den dNTP-Mix und fluorochromgekoppelte Terminatoren im richtigen Verhältnis enthält. Der entscheidende Vorteil dieses Systems ist, daß aufgrund des Einsatzes von vier unterschiedlichen Fluorochromen nur eine Spur pro Probe auf dem Sequenzgel benötigt wird und daß die Auswertung computerunterstützt abläuft. Die Fluorochrome werden durch einen 40 mW Argon-Laser (488 nm und 514 nm) angeregt, die Fluoreszenzsignale durch das Detektorsystem gelesen und mit den Programmen „Collection“ und „Analysis“ die DNA-Sequenz in Chromatogrammform darstellt. Die Sequenzierungsreaktion wurde wie folgt durchgeführt:

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes:

Premix	8 μ l
DNA-Template	z. B. 1 μ l einer Quiagen Midi-Präp. (50-100 μ g/300 μ l)
Primer	3-10 pmol
H ₂ O bidest.	20 μ l

Zur Sequenzierung wurden folgende Oligonukleotide als Primer eingesetzt:

Bezeichnung	Leserichtung	Sequenz
SH-2 (LAP-Sequenzprimer, ab bp 580)	5' → 3'	ATG GTG GCC AAC GAG ACA GGG
SH-31 (LAP-Sequenzprimer, ab bp 361)	5' → 3'	AAC CTG GCT GGA CTC TTC
SH-32 (LAP-Sequenzprimer, ab bp 767)	5' → 3'	AAG GCC CGG CTT GAG G
SH-33 (LAP-Sequenzprimer, ab bp 1107)	5' → 3'	GAT TGG CAG CAG GAG TGC
CKS 39 (pBEH-Sequenzprimer ab bp 511)	5' → 3'	TCA CTG CAT TCT AGT TGT GG

25 Reaktionszyklen wurden nach folgendem Programm in einem Perkin Elmer Cetus Thermocycler Modell 9600 durchgeführt:

Denaturierung	10 Sekunden, 96 °C
Annealing	5 Sekunden, 50 °C
Extension	4 Minuten, 60 °C

Nach Abschluß der Reaktion wurde die Probe auf 4 °C gekühlt. Die DNA-Lösung wurde mit 2 μ l 3 M Natriumacetat und 50 μ l Ethanol versetzt, gemischt und anschließend die DNA durch 20 minütige Zentrifugation bei 12.000 xg sedimentiert. Das Pellet wurde mit 75 % Ethanol gewaschen und im Vakuumkonzentrator getrocknet. In getrockneter Form

sind die Ansätze bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagerungsfähig. Zur Elektrophorese wurde das Pellet in $4\ \mu\text{l}$ Formamid/EDTA, pH 8,0 (5:1) aufgenommen, 2 Minuten bei $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert, 5 Minuten auf Eis abgekühlt und sofort auf ein 6 % Polyacrylamidgel aufgetragen.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden soweit nicht anders angegeben, bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 und 85 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Medien wurden auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt.

3.2.2.1.1 Passagieren von adhärennten Zellen

Medien und Lösungen: PBS für Zellkultur, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
 Trypsin-EDTA-Lösung, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
 Zellkulturmedium, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

Das Medium wurde von einem konfluenten Zellrasen abgesaugt und die einmal mit 5-10 ml PBS gespült, um inhibierende Einflüsse von Serumbestandteilen auf die Trypsinaktivität zu verhindern. Epitheliale Zelllinien mit sehr hoher Zelldichte wurden zusätzlich für etwa 5 min mit 5-10 ml PBS bei Raumtemperatur inkubiert, um das enzymatische Auflösen der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte mit Trypsin zu erleichtern. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 oder 1 ml (entspricht 10 % des vorher verwendeten Medien volumens) Trypsin-EDTA-Lösung bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf einer Heizplatte inkubiert, bis sich die Zellen abrundeten und vom Untergrund ablösten. Der Ablösungsprozess wurde mit einem inversen Mikroskop kontrolliert. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Verdünnung mit 3-10 ml Medium gestoppt und die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit einer Pipette vereinzelt. Die so entstandene Suspension wurde in der gewünschten Verdünnung mit frischem Medium in neue Zellkulturgefäße ausgesät.

3.2.2.1.2 Cryokonservierung von Zellen

Einfriermedium: 10 % (v/v) DMSO im jeweiligem Zellkulturmedium

Die Zellen wurden suspendiert und 5 min bei 1.000 rpm in der Labofuge sedimentiert. $1-1,5 \times 10^6$ Zellen wurden in 1 ml eisgekühltem Einfriermedium resuspendiert (DMSO wirkt im oxidierten Zustand als Zellgift; um Schädigungen der Zellen durch die toxische Wirkung zu vermeiden, durfte das Einfriermedium nie aufgewärmt werden). Die Suspension wurde dann zu je 1 ml in vorgekühlte Einfriererörchen überführt. Das Einfrieren der

Zellen erfolgte zunächst bei -80 °C und am Folgetag wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in einen mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) gefüllten Einfriertank überführt.

3.2.2.1.3 Revitalisierung von Zellen

Nach der Entnahme des Einfrierröhrchens aus dem Stickstofftank wurde die Ampulle etwa 1 min bei Raumtemperatur aufgewärmt und dann in einem Gefäß mit 70 % Ethanol bei 37 °C unter leichtem Schwenken soweit aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellsuspension wurde (mit einer gestopften Pasteurpipette) in ein Zentrifugenröhrchen mit 4 ml gekühltem (4 °C) Medium überführt und 5 min bei 1.000 rpm in der Labofuge sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment in warmem (37 °C) Medium resuspendiert und die Zellen in Kulturgefäße ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, um tote Zellen und DMSO-Spuren zu entfernen.

3.2.2.2 Transfektion von eukaryontischen Zellen

3.2.2.2.1 Stabile Transfektion

CaCl₂-Phosphat-Methode

Diese Methode wurde zur stabilen Transfektion von BHK-21 Zellen und embryonalen Mausfibroblasten angewendet. Die stabile Transfektion der CaCl₂-Phosphat-Methode wurde nach CHEN et al. (1987) durchgeführt:

Lösungen:

Calciumchlorid-Lösung: 2,0 M CaCl₂

HBS (2fach): 50 mM HEPES
1,5 M Na₂HPO₄
0,28 M NaCl

Glycerinschock: 15 % Glycerin (w/v) in 1fach HBS

Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion in einer Dichte von 2×10^5 Zellen auf einer 10 cm Gewebeschale ausgesät. Vier Stunden vor Zugabe der DNA wurde das Medium gewechselt. Zur Herstellung des Präzipitats wurden 10 µg des zu transfizierenden Plasmids (Quiagen-Präparation), jeweils 1 µg der Selektionsmarker tragenden Plasmide (pSV 2 pac oder pGKhygro) sowie 31,25 µl 2 M CaCl₂ in einem Eppendorfgesäß vorgelegt und mit dest H₂O bidest auf 250 µl aufgefüllt. Diese DNA-Mischung wurde langsam in 250 µl

HBS eigetropft. Während des Eintropfens wurde der HBS ständig gevortext. Das dabei entstandene Präzipitat blieb 45 Minuten erschütterungsfrei bei Raumtemperatur stehen, um anschließend auf die Zellen gegeben zu werden. Nach 6 bis 16 Stunden wurde das Medium abgesaugt, und die Zellen einem Glycerinschock unterworfen. Dabei wurden für 2,5 Minuten 3 ml 15 % Glycerin in 1x HBS auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen 2x vorsichtig mit PBS gewaschen und mit 5 ml Medium weiter inkubiert.

Effektene™-Methode

Die Effektene™-Methode (Quiagen) wurde zur stabilen Transfektion von BHK-21 Zellen und embryonalen Mausfibroblasten verwendet.

Lösungen: EC-Puffer
 Enhancer
 Effektene™-Transfektions-Reagenz

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von 2×10^5 Zellen auf einer 6 cm Zellkulturplatte ausgesät. Am Tag der Transfektion sollten die Zellen 40-80 % konfluent sein. Zunächst wurde 1 µg Plasmid-DNA (Quiagen-Präparation, DNA in Wasser gelöst, die Konzentration sollte 0,1 µg/µl nicht unterschreiten) mit EC-Puffer auf ein Endvolumen von 150 µl aufgefüllt, 8 µl Enhancer zugefügt und 1 Sekunde gevortext. Während einer 2-5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur sollte die DNA kondensieren. Dann wurden 25 µl Effektene™-Transfektions-Reagenz zugegeben und 10 Sekunden gevortext. Um die Komplexbildung (Bildung einer Micelle um die kondensierte DNA) mit der kondensierten DNA zu ermöglichen wurde die Mischung 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde das Medium von den Zellen gesogen, 1x mit PBS gewaschen und 4 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben. Dann wurde 1 ml Medium zum Transfektionskomplex zugefügt und alles vermischt. Diese Mischung aus Transfektions-Komplex und Medium wurde schließlich vorsichtig in eine mit Zellkulturmedium gefüllte Zellkulturplatte getropft und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Da das Effektene™-Transfektions-Reagenz keine toxischen Substanzen enthielt, konnten die Zellen 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert werden. Danach wurden die Zellen auf einer 20 cm Zellkulturplatte ausplattiert. Nachdem die Zellen am Boden festgewachsen waren wurde das Medium gegen Selektionsmedium ausgewechselt.

Lipofektin-Methode

Das Lipofektin-Reagenz der Firma Live-Technologies (GIBCO/BRL) wurde zur stabilen Transfektion von BHK-21 Zellen verwendet. Das Lipofektin-Reagenz bildet mit der DNA Lipid-DNA-Komplexe, die zu einer effizienten DNA-Aufnahme in die Zelle und anschließender Expression führen sollen.

Lipofektin-Reagenz: Eine 1:1 (w/w) Liposomenmischung aus dem kationischen Lipid N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-n,n,n-trimethylammonium chlorid (DOTMA) und Dioleoyl Phosphotidylethanolamin (DOPE)

OPTI-MEM I Medium: Serumfreies Medium der Firma Live-Technologies

Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion in einer Dichte von 2×10^5 Zellen auf einer 6 cm Gewebekulturschale ausgesät. Bei Beginn der Transfektion sollten die Zellen eine Dichte von 30-50 % Konfluenz haben. Zunächst wurden zwei Lösungen vorbereitet:

1. **Lösung A:** Für jede Transfektion wurden $4 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA (Qiagen-Präparation) sowie $0,4 \mu\text{g}$ des Selektionsmarker tragenden Plasmids (pSV 2 pac) in $100 \mu\text{g}$ OPTI-MEM I Medium gelöst.
2. **Lösung B:** Für jede Transfektion wurden $20 \mu\text{l}$ Lipofektin-Reagenz in $100 \mu\text{l}$ OPTI-MEM I Medium gelöst und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
3. **Lösung C:** Lösung A und Lösung B wurden vermischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

4 ml OPTI-MEM I Medium wurden mit Lösung C vermischt und auf die Zellen gegeben, die zuvor $2 \times$ mit PBS gewaschen wurden. Nach 6-stündiger Inkubation bei 37 C wurde das Medium durch 4 ml DMEM/10 % FKS ersetzt. Zwei Tage später wurden die Zellen in Selektionsmedium auf einer 20 cm Zellkulturplatte ausplattiert.

3.2.2.2 Selektion der stabil transfizierten Zellklone

BHK-21 Zellen

Zwei Tage nach der Transfektion wurde mit der Selektion stabil transfizierter Zellen begonnen. Hierzu wurden dem Medium am ersten Tag der Selektion $1 \mu\text{g/ml}$, am zweiten $2 \mu\text{g/ml}$ Puromycin zugesetzt. Unter diesen Bedingungen sterben 80-90 % der nicht resistenten Zellen innerhalb der ersten drei Tage. Anschließend wurde die Puromycin-Konzentration auf $5 \mu\text{g/ml}$ erhöht. Nach zwei Wochen waren resistente Zellklone sichtbar. Sie wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette vorsichtig vom Boden gelöst, aufgenommen und in eine 24-Well-Platte überführt. Nachdem das Well konfluent bewachsen war wurden die Zellen zur weiteren Expansion in eine 60 mm Gewebekulturschale überführt. Zur Expressionskontrolle wurde das transfizierten Protein mit dem entsprechenden Antiserum in der Immunfluoreszenz detektiert (siehe 3.2.3.2).

Embryonale Mausfibroblasten

Zwei Tage nach der Transfektion wurde dem Medium 100 µg/ml Hygromycin zugesetzt. An den folgenden Tagen wurde die Hygromycinkonzentration um jeweils 100 µg/ml bis auf 500 µg/ml erhöht. Bei 300 µg/ml sterben ca. 90% der nichtresistenten Zellen ab. Nach 2 Wochen können Einzelklone auf 24-Well-Platten überführt werden (s. o.). Nachdem das Well konfluent bewachsen war, wurden die Zellen ebenfalls zur weiteren Expansion in eine 60 mm Gewebekulturschale überführt. Zur Expressionskontrolle siehe Transfektion der BHK Zellen.

3.2.2.3 Metabolische Markierung mit [³⁵S]–Methionin/Cystein

(LEMANSKY et al.1985)

Hungermedium:		Methioninfreies DMEM
Markierungsmedium:	x ml	Methioninfreies DMEM
	0,04 % (v/v)	dialysiertes FKS (hitzeinaktiviert)
	x µCi	[³⁵ S]–Methionin/Cystein
<i>Chase</i> medium:	x ml	FKS-freies DMEM
	0,04 % (v/v)	dialysiertes FKS
	25 µl	10 mg/ml Methioninlösung / 1 ml <i>Chase</i> medium

Am Vortag vor der Markierung wurden die Zellen in Zellkulturmedium (DMEM mit 5 % FKS) ausgesät. Eine Stunde vor Markierungsbeginn wurden die konfluenten Zellen mit 3x 2 ml PBS gewaschen, um nicht-radioaktives Methionin/Cystein von den Zellen und den Wänden der Gewebekulturschale zu entfernen. Danach wurden die Zellen 1 Stunde mit Hungermedium im Inkubator (37 °C und 5% CO₂) belassen, bevor das Medium gegen Markierungsmedium ausgetauscht wurde. Folgte der Markierung ein *Chase*, wurde das Markierungsmedium abgesaugt, 3 x mit PBS gewaschen und 1 Stunde mit *Chase*medium im Inkubator weiterkultiviert. Nach dem *Chase* wurden die Zellen weiterbehandelt (Recycling-Assay oder Neuraminidase-Assay) oder 3x mit PBS gewaschen und in 500 µl Homogenisationspuffer aufgenommen und zur Immunpräzipitation eingesetzt. Vor und nach der Markierung der Zellen wurde die Aktivität im Medium durch Flüssigkeits-scintillationszählung und Trichloressigsäurefällung (siehe unten) bestimmt, um die Inkorporation von [³⁵S]–Methionin/Cystein in die Zellen zu überprüfen.

TCA-Fällung zur Bestimmung der proteininkorporierter Radioaktivität

Bei der TCA-Fällung wird nicht-inkorporiertes Methionin nicht gefällt, während die in Proteine inkorporierte Radioaktivität am Filter präzipitiert und bei der Szintillationszählung erfaßt wird.

Aus Whatman 3 mm Filterpapier wurden ca. 1 cm² große Plättchen ausgeschnitten und mit Bleistift numeriert. Auf diese Plättchen wurden jeweils 1-5 µl Probe aufgetragen, die Flüssigkeit getrocknet und die Filterplättchen auf einen Nylonfaden aufgefädelt, um sie dann für 5 Minuten in eiskalte 10 %-ige TCA zu hängen. Anschließend wurden die Filter 5 Minuten in 5 %-iger TCA bei 100 °C gekocht. Zum Schluß wurden die Filter in 5 %-iger eiskalter TCA und in Ether/Ethanol (1:1) gewaschen. Nach gründlichem Trocknen wurden die Filter in je 2 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und die Radioaktivitätsmenge im Flüssigkeitsszintillationszähler ermittelt.

3.2.2.4 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Biotinlösung: 10 mg NHS-SS-Biotin/NHS-LC-Biotin in 5 ml PBS** pH 7.6
(das Biotin wurde aus einer 25 mg/ml DMSO-Stammlösung entnommen, und erst direkt vor seinem Einsatz dem PBS** zugefügt.)

PBS**/Glycin: PBS** + 50 mM Glycin pH 7.4

Zur Derivatisierung von Zelloberflächenproteinen mit Biotin wurden konfluent bewachsene 10 cm Zellkulturschalen 4x mit 5 ml eiskaltem PBS** gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml eiskalter Biotinlösung für 30 min unter leichtem Wippen bei 4 °C inkubiert. Während dieser Inkubation wurden die Biotinreste über eine N-hydroxy-succinimidgruppe-(NHS)-gruppe kovalent an die zugänglichen, primären Aminogruppen der Zelloberflächenproteine gekoppelt. Danach wurden die Zellen 2x mit 10 ml eiskaltem PBS** und 3 x mit 5 ml eiskaltem PBS**/Glycin gewaschen. Die Zellen wurden schließlich einer Reaktivierung unterzogen oder in 1 ml PBS mit einem Gummischaber abgelöst und geerntet. Die geernteten Zellen wurden bei 500 xg sedimentiert und in TX-100 Homogenisierungspuffer aufgenommen (3.2.4.1.1). Die Homogenate wurden anschließend zur Isolierung und Quantifizierung der biotinylierten Proteine in der LAP- und LAP-Chimär-Fraktion eingesetzt (3.2.3.8).

3.2.2.5 Rekultivierung und GSH/DTT-Behandlung von biotinylierten Zellen

Rekultivierungs-Medium:	DMEM mit 5% FKS	
Puffer für GSH/DTT-:	83 mM	NaCl
Lösung	1,1 mM	CaCl ₂
	1 mM	MgCl ₂
GSH/DTT-Lösung:	9 ml	Puffer
	600 mg	GSH
	300µl	10 N NaOH
	100µl	1 M DTT
	1 ml	10 % BSA (w/v)

Die Zelloberflächen wurden wie oben beschrieben (3.2.2.4) mit Biotin markiert und gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml vortemperiertem Medium für 10 min bei 37 °C im Wasserbad rekultiviert. Danach wurden die Zellen sofort auf Eis überführt und 2x mit eiskaltem PBS** gewaschen. Hierauf erfolgte die 40 minütige Inkubation mit 5 ml eiskalter GSH/DTT-Lösung bei 4 °C (unter leichtem Wippen), wobei die Lösung nach 20 min durch eine frisch angesetzte Lösung ausgewechselt wurde. Nach 5 maligem gründlichen Waschen mit jeweils 5 ml eiskaltem PBS** wurden die Zellen noch einer zweiten Rekultivierung (10 min, 37 °C) mit abschließender GSH/DTT-Behandlung unterzogen, oder sofort in 1 ml eiskaltem PBS mit einem Gummischaber geerntet. Die geernteten Zellen wurden bei 500 xg sedimentiert und in TX-100 Homogenisierungspuffer aufgenommen (3.2.4.1.1). Die Homogenate wurden anschließend zur Isolierung und Quantifizierung der biotinylierten LAP eingesetzt (3.2.3.8).

3.2.2.6 Desialylierung von Zelloberflächenproteinen mit Neuraminidase

Lösungen:

Neuraminidase: Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* (Böhringer, Mannheim)

Dialysepuffer:	50 mM	Na-Acetat, pH 5,5
	154 mM	NaCl
	9 mM	CaCl ₂

Neuraminidaselösung bei 0-4 °C	PBS** pH 5,5 mit 80 mU Neuraminidase (<i>Vibrio cholerae</i>)/ml
Neuraminidaselösung bei 37 °C:	Chasemedium (3.2.2.3) mit 80 mU Neuraminidase (<i>Vibrio cholerae</i>)/ml

Eingesetztes Volumen der Neuraminidaselösung:

Zellen und Konstrukte	Kulturschale	Neuraminidaselösung
BHK 21LAP-WT	3 cm Zellkulturschale	1 ml
BHK 21 LAP-D7	3 cm Zellkulturschale	1 ml
BHK 21 LAP-Lamp1	2x 1 cm Well einer 4-Well-Platte	200µl/Well
BHK 21 LAP-Limp2	2x 1 cm Well einer 4-Well-Platte	200µl/Well
BHK 21 Lamp1-LAP	3 cm Zellkulturschale	1 ml
BHK 21 Limp2-LAP	3 cm Zellkulturschale	1 ml
BHK 21 LAP-Lamp1/LAP	2x 1 cm Well einer 4-Well-Platte	200µl/Well

Vorbehandlung der Neuraminidase

Da die von Böhlinger (Mannheim) gelieferte Neuraminidase toxische Stoffe enthält (EDTA, Na-Azid), mußte das Enzym vor seinem Einsatz dialysiert werden. 1 ml Neuraminidaselösung (1 U) wurden für 24 Stunden gegen 1 l Puffer dialysiert (Dialyseschlauch mit 12-16 kD Ausschlußgrenze). In Experimenten mit weniger dialysierter Neuraminidase (z. B. Dialyse gegen 500 ml), konnten Zellschädigungen festgestellt werden. Hierbei wurde der Puffer nach der Hälfte der Zeit erneuert. Nach der Dialyse wurde überprüft, ob die Neuraminidaseaktivität durch den Dialysevorgang beeinträchtigt wurde. Hierzu wurde eine vergleichende Aktivitätsbestimmung (3.2.3.2.3) der dialysierten und der nicht-dialysierten Neuraminidaselösung durchgeführt.

Desialylierung bei 0-4 °C

Nach der metabolischen Markierung (15 Minuten *Pulse*, 1 Stunde *Chase*) wurden die Zellen auf Eis gestellt und 3 x mit eiskaltem PBS**/pH 5,5 gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit der Neuraminidaselösung überschichtet und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Dann wurde die Neuraminidaselösung abgesaugt. Die Zellen wurden einem gründlichen Waschprogramm unterzogen (siehe unten) und in 500 µl Phasentrennungspuffer mit TX-114 aufgenommen. Schließlich wurde eine Phasentrennung durchgeführt (siehe 3.2.4.2) um die Membranproteine zur Immunpräzipitation einsetzen zu können (siehe 3.2.3.7). Zur

Quantifizierung der desialylierten Fraktion wurde die präzipitierte Probe mittels IEF analysiert (siehe 3.2.3.6).

Desialylierung bei 37 °C

Nach der metabolischen Markierung (15 Minuten *Pulse*, 1 Stunde *Chase*) wurde das *Chasemedium* abgenommen, um die Zellen mit der Neuraminidaselösung zu überschichten. Die Zellen wurden mit der vortemperierten Neuraminidaselösung für unterschiedliche Zeiträume (2, 5, 10, 20 und 60 Minuten) bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Zellkulturschale sofort auf Eis gestellt. Nach zügigem Entfernen der Neuraminidaselösung erfolgte ein gründliches Waschen der Zellen (siehe unten). Die Zellen wurden anschließend in 500 µl Phasentrennungspuffer mit TX-114 aufgenommen. Nach der Phasentrennung (siehe 3.2.4.2) wurde wie oben beschrieben fortgefahren.

Waschprogramm

Nach der Neuraminidasebehandlung wurden die Zellen einem gründlichen Waschprogramm unterzogen um Neuraminidase-Kontaminationen im Zellhomogenat zu vermeiden. Alle Waschschrte wurden mit eisgekühlten Puffern in einem Eisbad durchgeführt.

1. 2x Spülen mit PBS**pH7,4
2. 1x 5 Minuten inkubieren mit PBS**pH7,4/0,1mM Neuraminidaseinhibitor
3. 2x Spülen mit PBS**pH7,4/EDTA
4. 1x Spülen mit PBS**pH7,4
5. 1x Spülen mit PBS**pH7,4
6. 2x Spülen mit PBS**pH3,0
7. 1x Spülen mit PBS**pH7,4
8. 1x 5 Minuten inkubieren mit PBS**pH7,4/0,1mM Neuraminidaseinhibitor

3.2.3 Biochemische Methoden

3.2.3.1 Proteinbestimmung

3.2.3.1.1 Proteinbestimmung nach Lowry

(LOWRY et al. 1951)

Lösungen:

Reagenz A:	100 Volumen	3 % Na ₂ CO ₃ in 0,1 M NaOH
	1 Volumen	4 % Na ⁺ /K ⁺ -Tartrat in H ₂ O bidest
	1 Volumen	2 % CuSO ₄ • 5 H ₂ O

Reagenz B:	1 Volumen	Folin-Reagenz
	2 Volumen	H ₂ O bidest.

BSA-Standard:	1 mg/ml	BSA (Paesel & Lorei, Frankfurt) in H ₂ O bidest.
---------------	---------	---

Die beiden Reagenzien A und B wurden kurz vor Gebrauch aus Stammlösungen angesetzt. Der BSA-Standard wurde in Mengen von 5, 10, 15, 20 und 25 µg Gesamtprotein zusammen mit einem Leerwert eingesetzt. Diese, sowie auch die zu bestimmenden Proben wurden mit H₂O bidest. auf 100 µl aufgefüllt, mit 1 ml Reagenz A versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 100 µl Reagenz B zugegeben, alles gut vermischt und nochmals 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Absorption wurde bei $\lambda = 660$ nm gemessen und die Proteinkonzentration der Proben mittels linearer Regression ermittelt.

3.2.3.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford

(BRADFORD 1976)

Lösungen:

RotiQuant®, Bradford-Reagenz

BSA-Standard	1,0 mg/ml	BSA in H ₂ O bidest.
--------------	-----------	---------------------------------

Das Standardprotein wurde zusammen mit einem Leerwert in definierten Proteinmengen von 2, 4, 6, 8 und 10 µg eingesetzt und wie die Proben auf 800 µl Gesamtvolumen mit H₂O bidest. aufgefüllt. Anschließend wurden 200 µl RotiQuant®-Bradford-Reagenz zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption des Farbstoffs wurde bei $\lambda = 595$ nm gemessen und die Proteinkonzentration der Probe mit linearer Regression ermittelt.

3.2.3.1.3 Mikro-Lowry

(LOWRY 1951 und PETERSON 1979)

Reagenz A alkalische Kupfer-Tartrat-Lösung

Reagenz B verdünntes Folin-Reagenz

Reagenz S Herstellergeheimnis

Reagenz A' 1 ml Reagenz A+

20 µl Reagenz S

Diese Proteinbestimmung toleriert Detergenzien (Triton-X-100, SDS, Tween 20, etc.) in einer Konzentration bis 1 %. Der Assay erfolgte mit von der Firma Bio Rad hergestellten Lösungen im Mikromaßstab in unerschichteten 96-Loch-Platten. Für die Eichgerade wurden 0, 5, 10, 15, 20 und 25 µl einer 1 µg/µl BSA-Standardlösung in die Mikrotiterplatte pipettiert (Doppelwerte) und mit TBS auf 20 µl aufgefüllt. Die zu bestimmenden Proben wurden 1:10 verdünnt und je 1 µl für die Proteinbestimmung eingesetzt und ebenfalls auf 20 µl mit TBS aufgefüllt. Anschließend wurde zu jeder Probe 25 µl Reagenz A' und dann 200 µl Reagenz B pipettiert. Nach 15 min Inkubation bei RT konnte die Absorption im Elisa-Reader bei einer Wellenlänge von 630 nm gemessen werden und der Proteingehalt der Proben aus der Eichgeraden bestimmt werden.

3.2.3.2 Indirekte Immunfluoreszenz nach Methanolfixierung

Die Zellen wurden auf runde Deckgläschen (Ø 12 mm, Menzel, Braunschweig) in 24- oder 4-Well-Platten ausgesät, so daß nach einer Wachstumszeit von ein bis zwei Tagen ein semikonfluenter Zellrasen aus gut ausgebreiteten Zellen entstanden war. Diese Zellen wurden fixiert und mit Antikörpern markiert.

Fixierung

Lösungen:

Fixierung: 100 % Methanol p.a.

Zur Fixierung und gleichzeitigen Permeabilisierung der Zellen wurde zweimal mit PBS gespült und 5 Minuten mit 200 µl Methanol (-20 °C) bei Raumtemperatur inkubiert. Das Methanol wurde anschließend durch zweimaliges Spülen mit PBS entfernt. Die Deckgläschen wurden noch 30 Minuten in PBS stehengelassen, um späteren Benetzungsproblemen durch Methanolrückstände vorzubeugen.

Bindung der Antikörper

Die Antikörper wurden in den folgenden Verdünnungen eingesetzt:

Primärantikörper	
Antikörper	Verdünnung
V-2/V-3, humane LAP	1:200
LY1C6 gegen Ratten Lamp1	1:200
mAk gegen Ratten Limp2	1:1.000

Sekundärantikörper	
Antikörper	Verdünnung
anti-Kaninchen und anti-Maus Cy2/Cy3-gekoppelt X	1:100

Zur Bindung des Primärantikörpers wurden 20 µl der Antikörperverdünnung (in PBS) auf die Deckgläschen pipettiert. Hierbei mußte auf eine komplette Benetzung des gesamten Zellrasens geachtet werden. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37 °C im Inkubator wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurde in PBS verdünnt und auf die gleiche Weise wie der Primärantikörper 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation mußte unter Lichtausschluß stattfinden, um das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu verhindern. Vor der Einbettung der Zellen wurde zweimal mit PBS und einmal mit H₂O bidest. gewaschen.

Blockierung

Lösungen:

Blockierungslösung: 10 % Ziegen Serum in PBS

Zur Verhinderung unspezifischer Signale wurde nach der Inkubation des Primärantikörpers mit 200 µl 10 %igem Ziegen Serum in PBS für 20 min bei Raumtemperatur blockiert und hinterher 2 x mit PBS gewaschen.

Einbettung der Deckgläschen

Lösung zum Einbetten nach Markierung mit **Cy2**- und **Cy3**-gekoppelten Sekundärantikörpern wurde das **Fluoreszent Mounting Medium** (DAKO Corporation) verwendet. Es enthält Antibleichmittel, Stabilisatoren (Natriumazid) und Signalverstärker.

Zur Einbettung wurden ca. 30 µl Moviol bzw. Fluorescent Mounting Medium auf einen Objektträger getropft. Die Deckgläschen wurden mit dem Zellrasen in die Einbettungslösung gelegt.

3.2.3.3 Messung von Enzymaktivitäten**3.2.3.3.1 Enzymaktivität der lysosomalen sauren Phosphatase**

Substrat: 10 mM para-Nitrophenylphosphat in
 0,1 M Na-Citrat pH 4,6
 0,04 % NaN₃
 0,2 % BSA

Ansatz: 5-20 µl Homogenat
 50 µl 40 mM Tartrat bzw. 40 mM NaCl
 100µl Substrat
 Inkubation ca. 30 min bei 37 °C im Wasserbad

Durch Zugabe von 500 µl 0,4 M Glycin/NaOH pH 10,4 wurde die Reaktion gestoppt und die Absorption bei 405 nm gemessen (p-Nitrophenolat). Die Aktivität der tartratsensitiven LAP ist proportional zur Differenz der Absorption des NaCl-Ansatzes, der die Aktivität aller Phosphatasen bei pH 4,5 erfaßt, und des Tartrat-Ansatzes, der die Aktivität der tartresistenten Phosphatasen erfaßt.

Berechnungsformel:

$$\text{Aktivität [mU/ml]} = \frac{[E_{\text{Na}} - E_{\text{Ta}}] \cdot \text{Meßvolumen [ml]} \cdot 1000}{\epsilon \text{ mol} \cdot \text{Enzymvolumen [ml]} \cdot \text{Inkubationszeit [min]}}$$

Der molare Extinktionskoeffizient für p-Nitrophenol beträgt 18,5 cm²/mol bei 405 nm. Eine Einheit (U) LAP-Aktivität entspricht der Enzymmenge, die 1 Mol des Substrates (p-Nitrophenolphosphat) in 1 Minute unter Standardbedingungen (1 at, 25 °C, pH-Optimum) umsetzt.

3.2.3.3.2 Enzymaktivität der *b*-Hexosaminidase

Substrat: 10 mM para-Nitro-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosid
 0,1 M Na-Citrat pH 4,6
 0,04 % NaN₃
 0,2 % BSA

Ansatz: 20 µl Homogenat
 100 µl Substrat
 Inkubation ca. 60 min bei 37 °C im Wasserbad

Durch Zugabe von 500 µl 0,4 M Glycin/NaOH pH 10,4 wurde die Reaktion gestoppt und die Absorption bei 405 nm gemessen.

Berechnungsformel:

$$\text{Aktivität [mU/ml]} = \frac{E_{405} \cdot \text{Meßvolumen [ml]} \cdot 1.000}{\epsilon \text{ mol} \cdot \text{Enzymvolumen [ml]} \cdot \text{Inkubationszeit [min]}}$$

Der molare Extinktionskoeffizient beträgt 18,5 cm²/mol bei 405 nm. Eine Einheit (U) β-Hexosaminidase-Aktivität entspricht der Enzymmenge, die 1 Mol des Substrates in 1 Minute unter Standardbedingungen (1 at, 25 °C, pH-Optimum) umsetzt.

3.2.3.3.3 Enzymaktivität der α-Neuraminidase (Sialidase)

Lösungen:

Substrat: 4 mM 2-(4-MU)-α-D-N-Acetylneuraminic-Acid (Sigma)
in H₂O bidest.

Extraktion des Substrats: 1 Volumen Substrat: 1 mg/ml in Wasser)
+1 Volumen Ethylacetat
+ausschütteln und anschließend zentrifugieren
Oberphase abnehmen und verwerfen
Mutterphase
+1 Volumen Ethylacetat
Vorgang wiederholen

Puffer: 1 M Na-Acetat pH 4,3

Ansatz: x µl Neuraminidase ad. 40 µl mit Wasser
10 µl Puffer
25 µl Substrat
30 Minuten bei 37 °C inkubieren

Stopplösung: 2 ml Glycin/NaOH pH 10,8

Die Proben wurden auf Eis mit Substratlösung versetzt, in einem Wasserbad für 30 Minuten inkubiert und die Reaktion mit je 2 ml Stopplösung beendet. Im Flureszenz-

spektrometer wurde nach Exzitation bei 365 nm die Emission bei 420 nm gemessen. Zur Umrechnung in mU/ml wurden die gemessenen Werte mit einem Faktor F multipliziert: $F = \text{Verdünnungsfaktor} / \text{Zeit (Minuten)} \cdot 80$ (1 nmol entspricht 80 Skalenteilen). Für die Auswertung wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Excel verwendet.

3.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(LAEMMLI et al. 1970)

3.2.3.4.1 Herstellung der SDS-Gele und Laufbedingungen

Lösungen:

Trenngelpuffer:	1,5 M	Tris-HCl pH 8,8
	0,4 % (w/v)	SDS
Sammelgelpuffer:	0,5 M	Tris-HCl pH 6,8
	0,4 % (w/v)	SDS
Acrylamidlösung (Roth):	30 % (w/v)	Acrylamid
	0,8 % (w/v)	Bisacrylamid in H ₂ O bidest.
APS:	10 % (w/v)	Ammoniumperoxidsulfat in H ₂ O bidest.
TEMED	99 % (v/v)	gebrauchsfertige Lösung
Agarose-Lösung:	1 % (w/v)	Agarose in H ₂ O bidest.
Anodenpuffer:	50 mM	Tris-HCl, pH 8,6
	192 mM	Glycin
Kathodenpuffer:	50 mM	Tris-HCl, pH 8,6
	192 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
	0,2 mg/ml	Bromphenolblau
Elektrophoresepuffer (Minigele):	25 mM	Tris-HCl, pH 8,6
	19 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
2-fach Probenpuffer, nicht reduzierend	250 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	2 % (w/v)	SDS
	20 % (v/v)	Glycerin
3-fach Probenpuffer, reduzierend	250 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	2 % (w/v)	SDS
	20 % (v/v)	Glycerin
	20 mM	DTT

3-fach Probenpuffer, reduzierend	187,5	mM	Tris-HCl, pH 6,8
	9	% (w/v)	SDS
	30	% (v/v)	Glycerin
	10	% (v/v)	β -Mercaptoethanol
	0,03	%(w/v)	Bromphenolblau
6-fach Probenpuffer, reduzierend	480	mM	Tris HCl, pH 6,8
	12	% (w/v)	SDS
	45	% (v/v)	Glycerin
	12	% (v/v)	β -Mercaptoethanol
	0,06	% (w/v)	Bromphenolblau

Pipettierschema für das Gießen der Gele

1. Standardgele

	Trenngel					Sammelgel
	5 %	6 %	8 %	10 %	12,5 %	
Polyacrylamidanteil	5 %	6 %	8 %	10 %	12,5 %	4 %
Acrylamidlösung [ml]	5,25	6,3	8,4	10,5	13,1	1,3
Trenngelpuffer [ml]	7,5					–
Sammelgelpuffer [ml]	–					2,5
10 % APS [μ l]	250					100
TEMED [μ l]	25					10
H ₂ O bidest. [ml]	ad 30 ml					ad 10 ml

2. Minigele

	Trenngel					Sammelgel
	5 %	6 %	8 %	10 %	12,5 %	
Polyacrylamidanteil	5 %	6 %	8 %	10 %	12,5 %	4 %
Acrylamidlösung [ml]	0,65	0,8	1,07	1,34	1,67	0,23
Trenngelpuffer [ml]	1,0					–
Sammelgelpuffer [ml]	–					0,23
10 % APS [μ l]	40					40
TEMED [μ l]	4					4
H ₂ O bidest [ml]	2,3	2,15	1,89	1,65	1,31	1,0

Gießen der Gele und Elektrophoresebedingungen

Die Elektrophorese wurde in Systemen von Hoefer (Standardgele) und Gibco/BRL (Minigele) mit vertikal ausgerichteten Gelen durchgeführt. Die Größen der Gele betragen 120 • 140 • 1 mm für Standardgele und 56 • 86 • 0,75 mm für Minigele.

Das Gießen der Gele erfolgte zwischen zwei Glasplatten, die durch zwei (Abstandhalter („Spacer“)) in definiertem Abstand voneinander getrennt wurden und mit Agarose-Lösung an der Unterseite abgedichtet waren. Die Trenngel-Lösung wurde zwischen die Glasplatten gefüllt und sofort mit Butanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser entfernt, die Sammelgel-Lösung eingefüllt und der Probenkamm eingefügt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und die entstandenen Geltaschen mit Wasser gespült.

Die Standardgele wurden zuerst mit den Proben beschickt und dann in die Hoefer-Apparatur eingesetzt. Die Minigele wurden beladen, nachdem die Gele in die Gibco-Apparatur eingesetzt und mit Elektrophoresepuffer überschichtet waren.

Die Elektrophorese eines Standardgels erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA und 4 °C oder über Nacht bei einer konstanten Spannung von 50 V und 4 °C.

Die Minigele wurden mit einer konstanten Stromstärke von 50 mA gestartet, die auf 100 mA erhöht wurde nachdem das Bromphenolblau die Mitte des Sammelgels erreicht hatte.

Probenvorbereitung

Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 95 °C gekocht. Vor dem Beladen der Gele wurden die Proben 3 min bei 10.000 xg (RT) zentrifugiert.

3.2.3.4.2 Zusammensetzung der verwendeten Molekulargewichtsstandards

1. LMW (selbsthergestellt)

Protein	Molekulargewicht [kD]	Endkonzentration [µg/ml]
Phosphorylase b (Sigma P 6635)	97,4	83
BSA (Serva 11920)	66,0	63
Ovalbumin (Sigma A 76429)	45,0	125
Carboanhydrase (Sigma C 7500)	29,0	21
Trypsininhibitor (Sigma T9003)	20,1	100
Cytochrom C (Sigma C 2506)	12,4	100

2. Vorgefärbter Proteinstandard (Oncogene, Cambridge, USA, Cat # MW 02 L)

Protein	Molekulargewicht [kD]	Endkonzentration [µg/ml]
Myosin	200,0	500
Phosphorylase b	97,0	
BSA	68,0	
Ovalbumin	43,0	
Carboanhydrase	29,0	
β-Lactoglobulin	18,4	
Lysozym	14,3	

3. Vorgefärbter Rainbow Proteinstandard (RPV 756)

Protein	Molekulargewicht [kD]	Endkonzentration [µg/ml]
Myosin	220,0	500
Phosphorylase b	97,4	
BSA	66,0	
Ovalbumin	46,0	
Carboanhydrase	30,0	
Trypsininhibitor	21	
Lysozym	14	

Dieser vorgefärbte Molekulargewichtstandard wurde als Lyophilisat bezogen und mit 1 ml 1-fach Probenpuffer (reduzierend mit DTT, s.o.) rekonstituiert und gekocht. Beide Molekulargewichtsstandards wurden in gelfertigen Aliquots bei -20 °C gelagert.

3.2.3.4.3 Coomassie-Schnellfärbung von Polyacrylamidgelen

Lösungen:

Coomassie-Färbelösung:	0,5	% (w/v)	Coomassie Blau R
	50	% (v/v)	Methanol, technisch
	10	% (v/v)	Essigsäure, technisch in H ₂ O bidest.
Entfärbelösung:	50	% (v/v)	Methanol, technisch
	10	% (v/v)	Essigsäure, technisch in H ₂ O bidest.
Glycerin-Lösung:	1	% (v/v)	Glycerin in H ₂ O bidest.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder für 30 Minuten bei 37 °C auf einem Horizontalschüttler in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Nachdem das Gel vollständig durchgefärbt war, wurde die Färbelösung abgenommen und das Gel solange auf dem Schüttler in Entfärber inkubiert, bis der Gelhintergrund vollständig entfärbt war. Dazu wurde die Entfärbelösung mehrfach gewechselt. Anschließend wurde das Gel zweimal 30 Minuten gewässert. Um das Zerreißen von hochprozentigen Gelen (mehr als 10 % Acrylamid) während des Trocknens zu verhindern, wurden diese Gele für 15 Minuten in einer 1 %igen Glycerin-Lösung auf dem Schüttler inkubiert. Das Trocknen erfolgte in einem Umlufttrockner, nachdem die Gele luftblasenfrei zwischen zwei nasse Cellophanfolien eingespannt worden waren.

3.2.3.4 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

(ANSORGE 1985)

Lösungen:

Fixierer:	50	% (v/v)	Methanol, technisch
	12	% (w/v)	TCA, p.a.
	2	% (w/v)	CuCl ₂ • 2 H ₂ O
Lösung A:	10	% (v/v)	Ethanol, p.a.
	5	% (v/v)	Essigsäure, technisch
Kaliumpermanganat-Lösung:	0,1	mg/ml	KMnO ₄
Ethanol	10	% (v/v)	in H ₂ O bidest.
Silbernitrat-Lösung:	1	mg/ml	AgNO ₃
Kaliumcarbonat-Lösung:	5	% (w/v)	K ₂ CO ₃
Entwickler:	1	% (w/v)	K ₂ CO ₃
	0,02	% (v/v)	Formaldehyd (37 % stabilisiert)

Alle Lösungen wurden in H₂O bidest. angesetzt.

Die Silberfärbungen erfolgten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler und in Glasschalen mit senkrechten Wandungen, um Anhaften und Zerreißen der Gele während des Färbeprozesses zu verhindern. Die in Klammern angegebenen Inkubationszeiten beziehen sich auf die Färbung von Minigelen, die Zeiten für Standardgele stehen nicht in Klammern.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel mindestens 1 Stunde oder über Nacht in Fixierer inkubiert. Nach kurzem Spülen in Lösung A wurde das Gel 15 (10) Minuten in Lösung A inkubiert. Anschließend erfolgte für 15 (10) Minuten die Inkubation in Kaliumpermanganat-Lösung. Nach dem Spülen des Gels in Wasser (zweimal 1 Minuten für beide

Geltypen) folgten drei Inkubationsschritte von je 15 (10) Minuten Dauer mit Lösung A, 10 % Ethanol und Wasser. Im nächsten Schritt wurde das Gel für 30 (10) Minuten in der Silbernitratlösung inkubiert, deren Reste vor dem nächsten Färbeschritt kurz mit einem großen Volumen Wasser abgespült wurden, um das Entstehen von Silberpräzipitaten zu verhindern. Darauf folgte für 90-120 Sekunden die Inkubation in der Kaliumcarbonat-Lösung, bevor das Gel entwickelt wurde. Die Entwicklung dauerte in der Regel 5 bis 15 Minuten, sie wurde durch eine 10-minütige Inkubation in Lösung A beendet und damit die Färbung gleichzeitig fixiert.

Im Anschluß an die Färbung wurden die Gele zweimal 30 (15) Minuten gewässert, 15 min in 1 % Glycerin (nur Gele mit mehr als 10 % Acrylamid) inkubiert und getrocknet (siehe 3.2.3.3.3).

3.2.3.5 Westernblotanalyse

3.2.3.5.1 *Semi Dry-Blot-Verfahren*

Lösungen:

Kathodenpuffer:	25	mM	Tris-HCl, pH 9,0
	40	mM	ϵ -Aminocapronsäure
	20	% (v/v)	Methanol p.a.
Anodenpuffer:	75	mM	Tris-HCl, pH 7,4
	20	% (v/v)	Methanol p.a.

100 % Methanol p.a.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel 10 bis 15 Minuten auf einem Wipptisch in Kathodenpuffer äquilibriert. Die Nitrozellulose-Membran (NC-Membran) und 6 Filterpapiere (Whatman-Papier, GB 003) wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Die NC-Membran wurde 10 bis 15 min in Kathodenpuffer auf einem Wipptisch äquilibriert. Je drei der 6 Filterpapiere wurden in Kathoden- bzw. Anodenpuffer gelegt. Für den Proteintransfer wurden die einzelnen Bestandteile luftblasenfrei aufeinandergeschichtet (siehe Abbildung 3.1) und mit einem Gewicht von 750 g beschwert. Der Transfer erfolgte 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm².

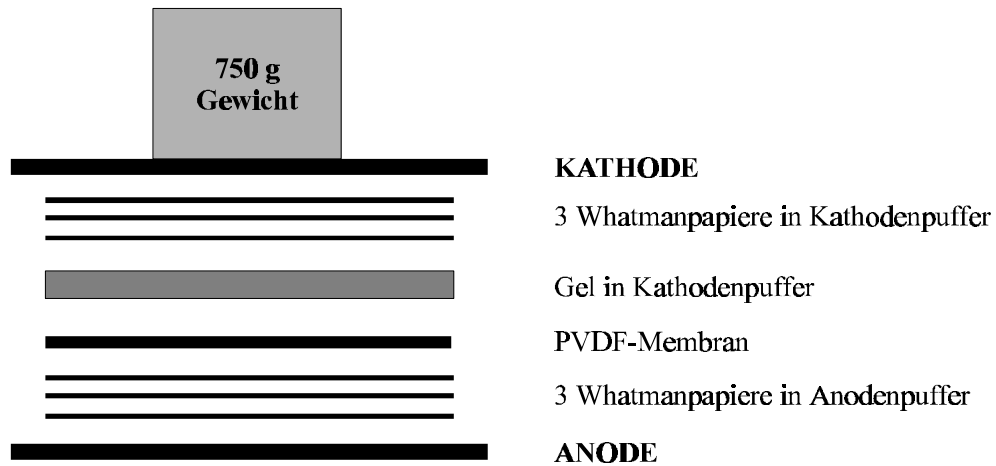


Abbildung 3.1: Aufbau eines "semi dry" Blots.

3.2.3.5.2 Naß-Blot-Verfahren

Lösungen:

Transferpuffer:	15 g	Tris
	71,5 g	Glycine
	1 l	Methanol

Nach der Elektrophorese wurde das Mini-Gel 5-10 Minuten auf einem Wipptisch in Transferpuffer äquilibriert. Für jedes Gel wurde eine Nitrozellulose-Membran sowie zwei Whatman-Filterpapiere auf die Gelgröße zurechtgeschnitten und ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Zum Proteintransfer wurden die einzelnen Bestandteile luftblasenfrei in den Bloteinsatz geschichtet.

Der Bloteinsatz gehörte zum Gibco/BRL Minigel-System. Er wurde anschließend in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Transferpuffer überschichtet. Um ein zu starkes Erwärmen der Elektrophoresekammer zu verhindern, wurde diese in ein Eisbad gestellt. Der Transfer wurde für eine Stunde bei einer konstanten Spannung von 150 V durchgeführt.

3.2.3.6 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Das Auftrennungskriterium dieser elektrophoretischen Methode ist die elektrische Bruttoladung der Proteine. Um eine verlässliche Aussage aus IEF-Daten ziehen zu können, ist ein hoher Grad an Reproduzierbarkeit unerlässlich. Eine optimale Reproduzierbarkeit kann hier nur unter extrem sauberen Arbeitsbedingungen erreicht werden. Durch Kontaminationen können elektrische Ladungsträger eingeschleust werden, die störend wirken. Aus diesem Grund wurde für alle Puffer HPLC-Wasser verwendet, wobei die Elektrodenpuffer hier eine Ausnahme bildeten. Außerdem wurden ausschließlich autoklavierte Pipettenspitzen und absolut saubere Gefäße benutzt.

Die IEF wurde verwendet um den Sialyierungsgrad von neuraminidasebehandelten (siehe 3.2.2.6) Zellen zu detektieren, die zuvor metabolisch markiert worden waren (siehe 3.2.2.3).

Lösungen:

Kathodenpuffer:	20 mM	NaOH
Anodenpuffer:	10 mM	Phosphorsäure
IEF-Gellösung:	9 M	Harnstoff
	4 %	Acrylamid
	2 % (w/v)	NP-40
	3 % (v/v)	Ampholine im kleinen pH-Bereich: pH 5-8 oder pH 4-7
	1 % (v/v)	Ampholine im großen pH-Bereich: pH 3,5-10
Lysispuffer:	9,6 M	Harnstoff
	2 % (w/v)	NP-40
	4 % (v/v)	Ampholine im kleinen pH-Bereich: pH 5-8 oder pH 4-7
	1 % (v/v)	Ampholine im großen pH-Bereich: pH 3,5-10
	7,15 M	2-Mercaptoethanol
Overlaypuffer:	8 M	Harnstoff
	2 % (v/v)	Ampholine im kleinen pH-Bereich: pH 5-8 oder pH 4-7
	0,5 % (v/v)	Ampholine im großen pH-Bereich: pH 3,5-10

IEF-Solubilizer:	0,5 % (w/v)	SDS
	10 mM	DTT

Durchführung der IEF

Für die Herstellung eines 4 %igen IEF-Gels (14 cm x 10 cm x 1 cm) wurden 30 ml IEF-Gellösung unter leichtem Erwärmen (maximal 37 °C) hergestellt. Nach Zugabe von 60 µl 10 %-iger Ammoniumpersulfatlösung (Endkonzentration 0,02 % (w/v)) sowie 42 µl TEMED (Endkonzentration 0,13 % (v/v)) wurde der Ansatz zügig zwischen zwei gründlich mit Methanol gesäuberte Glasplatten gegossen. Nach einer einstündigen Polymerisation wurden der Gelkamm (10 Taschen) sowie die horizontale Abdichtung (1 %iger Agarosesockel) entfernt, und das Gel in eine Elektrophorese-Apparatur eingebaut, deren untere Kammer Anodenpuffer enthielt. In jede Proben tasche wurden 60 µl Lysispuffer gegeben und anschließend vorsichtig mit Kathodenpuffer überschichtet. Der Vorlauf erfolgte 15 Minuten bei 200 V, 30 Minuten bei 300 V und im letzten Schritt 30 Minuten bei 400 V. Nach dem Vorlauf wurde der Kathodenpuffer entfernt und die Proben taschen trockengesaugt. Danach wurden die Proben in die Taschen gefüllt und mit 30 µl Overlaypuffer überschichtet. Nachdem die obere Kammer wieder mit Kathodenpuffer gefüllt worden war, erfolgte die Fokussierung für 12 bis 15 Stunden bei 500 V und Raumtemperatur.

Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung beschreibt die Aufarbeitung eines Proteins, das mit Protein A-Sepharose immunpräzipitiert wurde (siehe 3.2.3.7). Eine Immunpräzipitation mit Pansorbin konnte nicht durchgeführt werden, da das Pansorbin Substanzen enthält, die eine spätere isoelektrische Fokussierung erheblich stören.

Die der IEF vorangehende Immunpräzipitation erfolgte aus der Detergenzphase eines TX-114 Homogenats (siehe 3.2.4.2), da in dieser die membranassoziierte LAP und die LAP-Chimären gelöst waren. Zunächst wurde das Protein A-Sepharose-Sediment mit dem gekoppelten Antigen-Antikörper-Komplex einem gründlichen Waschprogramm unterzogen: 1 x 800 µl Neufeldpuffer; 1 x 800 µl Immunomix; 1 x 800 µl Immunomix/2 M KCL; 2 x 800 µl 1/10 PBS und 3 x 800 µl HPLC-Wasser (3.2.3.7). Nach dem Waschen wurde das Pellet mit einer Hammltonpipette trockengesaugt und in 60 µl IEF-Solubilizer für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Der Überstand wurde ebenfalls mit einer Hammltonpipette abgenommen. Nach dem Lyophilisieren des Überstandes wurde das auf diese Weise erhaltene Pellet sorgfältig in 60 µl Lysispuffer resuspendiert und anschließend auf das Fokussierungsgel aufgetragen (siehe oben).

3.2.3.7 Immunpräzipitation der LAP

Lösungen:

Immunomix (IMM):	1 %	Triton X-100
	0,5 %	Natriumdeoxycholat in PBS

Immunomix/2 M KCl:	2 M	KCl in IMM
--------------------	-----	------------

Präzipitations-IMM:	10 %	BSA
	0,2 %	SDS in IMM

Neufeld-Puffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 8,5
	0,6 M	KCl
	1 %	SDS
	0,05 %	Nonidet P-40

Protein A-Sepharose: Protein A-Sepharose CL-4B (Sigma, Trockensubstanz).
Das getrocknete Gel wurde in PBS gequellt und anschließend 3 x mit PBS gewaschen, da Dextran und Lactose zur Stabilisierung vom Hersteller beigefügt wurden.
Bindekapazität: 20 mg IgG/ml Gelsuspension

Zur Immunpräzipitation wurden 500 µl metabolisch markiertes (3.2.2.3) Zellhomogenat (Triton X-100 Homogenat (3.2.4.1) oder TX-114 Homogenat (3.2.4.2) nach Neuraminidasebehandlung (3.2.2.6) eingesetzt. Dem Homogenat wurden 400 µl Präzipitations-Immunomix, Protaminsulfat in einer Endkonzentration von 0,03 % zugefügt und alles 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 14.000 rpm in der Eppendorffzentrifuge zur Abtrennung präzipitierter DNA-Komplexe wurde der Überstand zur Vorfällung mit 40 µl Pansorbin und 2 µl Präimmunserum versetzt. Pansorbin ist eine Suspension aus *Stadhylococcus aureus*-Zellen, die aufgrund des membranständigen Protein A Immunglobuline der Klasse G mit einer Kapazität von 2 mg/ml binden kann. Somit konnte nach einer 2 stündigen Inkubation bei 4 °C (Drehrad, "head-over-tail") der Protein A-IgG-Komplex mit unspezifisch gebundenem Material durch 20 minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm in der Eppendorffzentrifuge abgetrennt werden. Der Überstand wurde mit dem LAP-Antiserum versetzt und über Nacht auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Um die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe zu adsorbieren, wurde

der Überstand anschließend mit Protein A-Sepharose versetzt und für 2 Stunden bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert, ("head-over-tail"). Die an Protein A-Sepharose gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm sedimentiert und anschließend einem Waschprogramm unterzogen:

1 x	800 µl	Neufeld-Puffer
1 x	800 µl	Immunomix
1 x	800 µl	Immunomix/2 M KCl
2 x	800 µl	1/10 PBS

Wenn im Anschluß eine IEF (3.2.3.6) durchgeführt wurde, kam folgender Schritt hinzu:

3 x	800 µl	HPLC-Wasser
-----	--------	-------------

Das Pellet wurde nach dem letzten Waschschrift mit einer Hamiltonpipette möglichst trockengesaugt und anschließend für den Auftrag auf die SDS-PAGE oder IEF (Probenvorbereitung siehe 3.2.3.6) vorbereitet. Für die SDS-PAGE (3.2.3.4) wurde das gewaschene Sepharosepellet mit 80 µl 1 x Solubilizer+SH versetzt, 10 Minuten bei 95 °C gekocht und der Überstand wurde auf das Gel aufgetragen. Die erhaltenen Signale wurden wie in 3.2.3.8 beschrieben, quantifiziert.

Immunpräzitationsbedingungen

Zelllinien	Antiserum Bezeichnung und immuni- siertes Antigen	Antiserum- Volumen	Volumen der Protein A-Sepharose (1:2 Verdünnung des gequollenen Gels)
BHK21 LAP-WT	I-4, humane LAP-Tail	5 µl	50 µl
BHK21 LAP-D7	I-4, humane LAP-Tail	5 µl	50 µl
BHK21 LAP-Lamp1	LS-4, lösliche humane LAP- Form	10 µl	100 µl
BHK21 Lamp1-LAP	I-4, humane LAP-Tail	5 µl	50 µl
BHK21 LAP-Limp2	LS-4, lösliche humane LAP-Form	10 µl	100 µl
BHK21 Limp2-LAP	I-4, humane LAP-Tail	5 µl	50 µl
BHK21 LAP- Lamp1/LAP	LS-4, lösliche humane LAP-Form	10 µl	100 µl

3.2.3.8 Quantifizierung der biotinylierten LAP- oder LAP-chimären-Fraktion für das Rezyklisierungs-Assay

3.2.3.8.1 Isolierung biotinylierter Proteine aus TX-100 Zellhomogenaten

Lösungen:

Streptavidinagarose: Immunopure, an Agarose immobilisiertes Streptavidin (Pierce), mit einer Bindekapazität von 2 mg biotinyliertes BSA wird an 1 ml Gel Da dem Gel zur Stabilisierung 0,02 % Na-Azid zugefügt wurden, wurde das Gel kurz vor seinem Einsatz 3 x mit TX-100 in Homogenisierungspuffer gewaschen.

Nach der Zelloberflächenbiotinylierung und Reaktivierung bei 37 °C (3.2.2.5) wurden die Membranproteine in TX-100 Homogenisierungspuffer solubilisiert (3.2.4.1) und zur Isolierung der biotinylierten Proteine eingesetzt. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (3.2.3.1) des TX-100 Zellhomogenates wurden alle Proben eines Rezyklisierungs-Assays auf die selbe Proteinkonzentration eingestellt (250 µg-350 µg/500 µl Homogenisierungspuffer). 10/10 des äquilibrierten Homogenats (500 µl) jeder Probe wurde zur Isolierung der biotinylierten Proteine eingesetzt. Hierzu wurden die Proben für 2 Stunden mit 60 µl Streptavidinagarose bei 4 °C inkubiert (Drehrad, "head-over-tail"). Das Biotin bindet mit hoher Affinität über nicht kovalente Wechselwirkungen an das Streptavidin. Die biotinylierten Proteine wurden über ihre Biotinmarkierung an die Agarose gekoppelt und konnten durch Zentrifugation (2 Minuten bei 14.000 rpm; Eppendorf-zentrifuge) sedimentiert werden. Das Pellet wurde 1x mit Neufeldpuffer; 1x mit IMM; 1x mit IMM/2 M KCL und 2x mit 1/10 PBS gewaschen (3.2.3.7).

3.2.3.8.2 Detektion und Quantifizierung der biotinylierten Proteinfraktion

Alle biotinylierten Proteine des Zellhomogenats wurden an die Streptavidinagarosmatrix gebunden. Um selektiv den Pool der biotinylierten LAP oder LAP-Chimären detektieren und quantifizieren zu können, wurden die Proben zunächst mittels SDS-PAGE (10 %, siehe 3.2.3.4) aufgetrennt. Hierzu wurde das trockengesaugte Pellet in 100 µl reduzierenden 2 x SDS-Solubilizer aufgenommen und 10 min bei 95 °C gekocht. Der Überstand wurde möglichst quantitativ mit einer Hamilton-Pipette abgenommen und auf das SDS-Gel aufgetragen. Auf das selbe Gel wurde 1/10 des äquilibrierten Homogenats aufgetragen (50 µl), um ein Maß für den Gesamt-LAP-Pool zu erhalten. Um die biotinylierte LAP-Fraktion mit dem Gesamt-LAP-Pool vergleichen zu können erfolgte nach der Auftrennung im SDS-Gel ein Western-Blot im Semi-Dry-Verfahren (3.2.4.5.1). Die transferierten LAP oder LAP-Chimären wurden schließlich selektiv über eine Immunodetektion (3.2.4.5.3) nachgewiesen und quantifiziert.

3.2.4 Präparative Proteinbiochemie

3.2.4.1 Extraktion von Membranproteinen mit TX-100

Lösungen:

Tritonx-100-Homogenisierungspuffer:	10 mM	Tris/HCl
	150 mM	NaCl
		pH 7,4
	1 mM	EDTA
	5 mM	JAA
5 µl/500 µl Puffer		Proteaseinhibitorcocktail

Das nach der Oberflächenbiotinylierung erhaltene 500 xg Zellpellet (siehe 3.2.2.4) wurde in 500 µl eiskaltem TX-100-Homogenisierungspuffer resuspendiert und anschließend 10 Minuten unter Schütteln bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgten 3 x 10 Sekunden Behandlungen im Ultraschallbad (Stufe 4) zum Aufschließen der Zellen, sowie eine erneute Inkubation für 10 Minuten unter Schütteln bei 4 °C. Dann wurde dieses Rohhomogenat 20 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C in der Eppendorfzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde zur LAP- und LAP-Chimären-Immunpräzipitation oder zur Isolierung der biotinylierten Proteine eingesetzt (siehe 3.2.3.7 und 3.2.3.8), da er die solubilisierten Membranproteine enthielt.

3.2.4.2 Extraktion von Membranproteinen und Phasentrennung mit TX-114

Lösungen:

Phasentrennungspuffer:	10 mM	Tris/HCl, pH 7,4
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	5 mM	JAA
	5 µl/500 µl Puffer	Proteaseinhibitorcocktail

TX-114 Homogenisierungspuffer: 2 % TX-114 in Phasentrennungspuffer

Prekondensation des TritonX-114

Tris-Puffer:	10mM	Tris/HCL, pH 7,4
	150mM	NaCl

Für die Prekondensation wurden 20 g TX-114, 980 ml Tris-Puffer und 16 mg Butylhydroxy-toluen in einem Eisbad gelöst. Diese Suspension wurde über Nacht bei 30 °C in einem 1 l-Schütteltrichter inkubiert. Es bildeten sich zwei Phasen. Die untere wäßrige Phase wurde vorsichtig entfernt und verworfen. Die Detergenzphase wurde erneut im Eisbad mit Tris-Puffer versetzt. Der Phasentrennungsvorgang wurde insgesamt 3 x durchgeführt, wobei beim letzten Durchgang kein Butylhydroxy-toluen zugefügt wurde.

Phasentrennung

Durch die Phasentrennung mit Triton X-114 können die löslichen Polypeptide, die sich in der wäßrigen Phase anreichern, von den membranassozierten Polypeptiden, die sich in der Detergenzphase anreichern, getrennt werden (BORDIER, 1981). Die metabolisch markierten Zellen wurden nach der Neuraminidasebehandlung (3.2.2.6) in 500 µl eiskaltem TX-114 Homogenisierungspuffer auf Eis geerntet und 3 x 10 Sekunden im Ultraschallbad (Stufe 4) beschallt. Dann wurde das Rohhomogenat 10 Minuten bei 4 °C unter Schütteln inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C in der Eppendorfzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert, um eine Micellenbildung durch TX-114 auszulösen. Durch eine 3-minütige Zentrifugation bei 3.000 rpm in der Eppendorfzentrifuge (RT) wurden die Detergenzmicellen von der leichteren wäßrigen Phase getrennt. Die wäßrige Phase wurde für eine Nachextraktion mit frischem TX-114 erneut auf eine Endkonzentration von 2 % TX-114 gebracht und einer wiederholten Phasentrennung unterzogen. Die aus den beiden Phasentrennungen erhaltenen TX-114-Phasen wurden vereinigt, mit Phasentrennungspuffer auf 500 µl aufgefüllt und zur Immunpräzipitation (siehe 3.2.3.7) eingesetzt.

3.2.4.3 TCA - Fällung

Die Proteinlösungen wurden mit einer 100 % TCA-Lösung auf eine TCA-Endkonzentration von 10 % gebracht, durch vortexen gemischt und entweder über Nacht bei 4 °C oder 2 Stunden auf Eis gefällt. Anschließend wurden die gefällten Proteine 15 Minuten bei 13000 rpm pelletiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde mit 2 % NaCH₃COO Lösung in Ethanol gewaschen und anschließend in Probenpuffer aufgenommen.

3.2.4.4 Wessel-Flügge-Fällung

(WESSEL und FLÜGGE, 1984)

In einem 15 ml Röhrchen wurden zu 4 Probenvolumen Methanol die zu fällende Probe gegeben, gevortext und 10 s bei 9000 xg zentrifugiert. Dann wurde 1 Probenvolumen Chloroform zugegeben, durch vortexen gemischt und wie oben zentrifugiert. Nachdem 3 Probenvolumen H₂O bidest zugesetzt worden waren, bildeten sich 2 Phasen, welche mehrmals kräftig ausgeschüttelt wurden. Nach der anschließenden Zentrifugation für 2 Minuten bei 9000 xg wurde die obere Phase vorsichtigst abgenommen. Anschließend wurden 3 Probenvolumen Methanol zugegeben und die gefällten Proteine bei 9000 xg 5 Minuten abzentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen worden war, wurde das Pellet auf Eis luftgetrocknet und in Probenpuffer aufgenommen.

3.2.4.5 Präparation von AP-1 und AP-2 aus Schweinehirn

3.2.4.5.1 Präparation von clathrinbeschichteten Vesikeln

(CAMPBELL et al. 1884 und MANFREDI und BARZARI 1987)

Lösungen (alle eisgekühlt):

Mes-Puffer: 0,1 M Mes, pH 6,5
 1 mM EGTA
 0,5 mM MgCl₂
 0,02% NaN₃

Dichtemedium: 12,5 % (w/w) Saccharose
 12,5 % (w/w) Ficoll® 400 in Mes-Puffer

Um im Blut enthaltene Proteasen zu entfernen, wurden die Hirnhäute mit einer Pinzette entfernt und das Gewebe gründlich mit H₂O bidest. gespült. Die so vorbereiteten Schweinehirne wurden in Portionen von ca. 400 g bei -80 °C gelagert. 400 g über Nacht im Kühlschrank aufgetautes Hirngewebe wurde mit ca. 500 ml Mes-Puffer im Mixer (Waring Blender) 3 x für 10 Sekunden homogenisiert. Anschließend wurde mit Puffer auf ein Endvolumen von 1 l aufgefüllt und noch einmal homogenisiert. Das Homogenat wurde zunächst für 30 Minuten bei 18.000 xg zentrifugiert (JA 10-Rotor) und anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und für eine Stunde bei 100.000 xg zentrifugiert (Ti 45-Rotor). Die Sedimente aus dieser Ultrazentrifugation (Gesamtmembranen) wurden mit jeweils 5 ml Mes-Puffer versetzt und mit Hilfe eines Glasstabes vom Boden der Zentrifugationsröhrchen gelöst (ca. 60 ml Gesamtvolumen). Die gelösten Sedimente

wurden in einem 50 ml Dounce-Glashomogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde mit dem gleichem Volumen Saccharose-Ficoll®-Dichtemedium (300 ml) gemischt und 40 Minuten bei 29.000 xg (JA 20-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde äußerst vorsichtig abgenommen, mit Mes-Puffer verdünnt und bei 100.000 xg für eine Stunde zentrifugiert (Ti 45-Rotor). Anschließend wurden die Sedimente mit jeweils 1 ml Mes-Puffer vom Boden gelöst (ca. 8 ml Gesamtvolumen) und in einem 10 ml Dounce-Glashomogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde 15 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand, welcher die clathrinbeschichteten Vesikel enthielt wurde abgenommen.

3.2.4.5.2 Ablösen von Clathrin und Adaptoren

Lösungen: 2 M Tris/HCl pH 7,0

Der Überstand wurde mit 2 M Tris/HCl auf eine Endkonzentration von 0,5 M Tris/HCl eingestellt. Dieses Gemisch wurde ca. eine Stunde bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde 30 Minuten bei 100.000 xg zentrifugiert (Ti 50-Rotor). Der klare Überstand (Tris-Extrakt) wurde abgenommen und zur weiteren Aufreinigung in eine Gelfiltrationschromatographie eingesetzt.

3.2.4.5.3 Aufreinigung von Adaptoren (AP1 und AP2) über Gelfiltrationschromatographie

Lösungen:

Trennungspuffer:	0,5 M	Tris/HCl, pH 7,0
	1 mM	DTT
	0,02 %	NaN ₃

Der Trennungspuffer wurde vor Gebrauch durch einen 0,2 µm Millipore-Filter sterilfiltriert.

Die Superose 6®-Säule (Gelbettvolumen: 120 ml) wurde in Trennungspuffer äquilibriert. Anschließend wurden 5-6 ml Tris-Extrakt (ca. 10 bis 15 mg Gesamtprotein) aufgeladen. Die Trennung der Proteine erfolgte mit einer FPLC-Anlage bei 4 °C. Die Parameter des Säulenlaufs waren folgende:

Flußrate:	0,3 ml/min
Schreiber:	0,1 cm/min
OD:	0,2
Fraktionssammler:	5 min

Nach Beendigung des Laufs wurde anhand eines coomassiegefärbten SDS-Gels (3.2.3.4.3) die Fraktionen ermittelt, welche AP1 und AP2 enthielten. Diese Fraktionen wurden vereinigt und über eine Hydroxylapatit-Säule weiter aufgereinigt.

3.2.4.5.4 Hydroxyapatit-Chromatographie

(MANFREDI und BAZARI 1987)

Lösungen:

Niedrigsalzpuffer:	10 mM	K ₂ HPO ₄ , pH 8,2
	10 %	Glycerin
	100 mM	NaCl
	1 mM	DTT
	0,02 %	NaN ₃

Hochsalzpuffer:	500 mM	K ₂ HPO ₄ , pH 8,2
	10 %	Glycerin
	100 mM	NaCl
	1 mM	DTT
	0,02 %	NaN ₃

Packen der Säule

Zum Packen der Säule wurde zunächst etwa zwei große Spatelspitzen Hydroxyapatit in 20 ml Hochsalzpuffer resuspendiert und der Überstand nach dem Absetzen der Partikel vorsichtig dekantiert. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt, bevor die Hydroxyapatit-Suspension in eine Leersäule für FPLC (5 mm Durchmesser, 10 cm Länge) gefüllt wurde. Die Säule wurde an die FPLC angeschlossen und solange mit Niedrigsalzpuffer äquilibriert. Da die Proben in einem 0,5 M Tris-Puffer über die Säule gegeben wurden, mußte diese nach etwa 5-6 Säulenläufen neu gepackt werden.

Pro Säulenlauf wurden ca. 10-12 ml AP-Pool aufgeladen. Die Parameter des Säulenlaufs waren folgende:

Flußrate:	0,2 ml/min
Schreiber:	0,1 cm/min
OD:	0,2
Fraktionssammler:	5 min
Gradient:	drei Stunden (36 ml)

Nach Beendigung des Laufs wurden zur Analyse der Aufreinigung pro Fraktion 90 µl Probe entnommen und in eine TCA-Fällung eingesetzt (siehe 3.2.4.3). Die Proben wurde anschließend auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt (3.2.3.4).

3.2.5 Messung von Interaktionen zwischen Adaptorproteinen und Peptiden mit dem Biosensor (BIAcore 2000)

Der Biosensor verwendet das optische Phänomen der „*surface plasmon resonance*“ (SPR) um Interaktionen zwischen Biomolekülen zu untersuchen. Die Detektion beruht auf Veränderungen in der Massenkonzentrationen von Makromolekülen auf der Oberfläche des Sensorchips. Diese Veränderungen der Massenkonzentration bewirken eine Ablenkung des reflektierten Lichts (=„*resonance angle*“). Das Ausmaß dieser Ablenkung hängt von verschiedenen Faktoren ab, unter anderem vom Brechungsindex des Mediums, das sich nahe der unbestrahlten Seite des Metallfilms befindet. Der Brechungsindex korreliert direkt mit der Konzentration von gelösten Molekülen im Medium. Durch das Konstanthalten der anderen Faktoren ist es möglich durch SPR Veränderungen in der Konzentration von Molekülen in der Lösung, die sich im Kontakt mit der Sensoroberfläche befindet zu messen.

Durch die Verwendung eines kontinuierlichen Flusses ist es möglich Interaktionen in „Real-Zeit“ zu beobachten. Eine der beiden interagierenden Komponenten wird auf der Sensoroberfläche immobilisiert und die andere in einem kontinuierlichen Fluß über die Sensoroberfläche geleitet. Aus dem Binden von Molekülen aus der Lösung an die immobilisierte Komponente resultiert eine Ablenkung des Lichtstrahls, das als „*response*“ registriert wird.

Die Auswertung der Messungen erfolgt durch das BIAcore-Evaluierungsprogramm in Form eines Sensogramms, in welchem die Veränderung des Resonanzwinkels (=Resonanzsignal) gegen die Zeit aufgetragen ist. Die Veränderung des Resonanzsignals wird durch Resonanzeinheiten (RU) dargestellt. Eine Veränderung des Resonanzsignals

um 1000 RU korrespondiert mit einer Zunahme der Oberflächenkonzentration auf dem Sensorchip um etwa 1 ng/mm².

3.2.5.1 Synthese von Peptiden

Die für die Synthese verwendeten Aminosäuren waren durch N-(9 fluorenyl) methoxycarbonyl (Fmoc) geschützt und wurden durch Benzotriazol-1-yl oxy-tri-pyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat aktiviert. Als Synthesegerät wurde der Peptid Synthesizer von Millipore verwendet. Nach dem Abspalten des Syntheseprodukts von der Trägermatrix und den Schutzgruppen wurden die Peptide über Reverse Phase HPLC gereinigt (Delta Pac C-18-Säule, Millipore). Der Elutionsgradient erstreckte sich über 0-50 % Acetonitril in 0,1 % Trifluoressigsäure/Wasser in 50 Minuten. Die Reinheit der Peptide wurde durch HPLC, UV-Spektrometrie und Massenspektrometrie überprüft.

3.2.5.2 Kopplung von Peptiden an einen Sensorchip

Der Sensorchip besteht aus einem Glasträger dessen eine Seite mit einem dünnen Goldfilm beschichtet ist. An diesem Goldfilm ist eine Oberflächenmatrix kovalent gebunden.

Lösungen:	N-hydroxysuccinimid (NHS)
	N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDC)
	1 M Ethanolaminhydrochlorid, pH 8,5
	HBS-EP-Puffer
verwendeter Chip	Sensorchip CM 5

1. Aktivierung

Zunächst wurde die Sensorchipoberfläche durch eine Modifikation der Carboxylgruppen mit einer Mischung aus N-hydroxysuccinimid (NHS) und N-ethyl-N'-(dimethyl-amino-propyl)-carbodiimid (EDC) aktiviert. Dadurch wurden diese Carboxylgruppen in reaktive Ester überführt, die spontan mit Aminen und anderen nukleophilen Gruppen reagieren und kovalente Bindungen ausbilden. Um diese Aktivierung durchzuführen wurde bei einer Flußrate von 5 µl/min insgesamt 35 µl 0,05 M NHS/0,2 M EDC injiziert.

Kopplung des Peptids

Da bei einer Kopplungsreaktion die Aminogruppen des Peptids ungeladen sein müssen, wurde die Reaktion bei einem hohen pH durchgeführt. Der optimale pH-Bereich der Ligandenlösungen hängt von der Beschaffenheit des Peptids ab. Die Kopplungsreaktion

wurde ebenfalls bei einer Flußrate von 5 µl/min durchgeführt, wobei insgesamt 35 µl Ligandenlösung (Peptidkonzentration=200 µg/ml) injiziert wurde.

Deaktivierung

Durch die Deaktivierung wurden überschüssige reaktive Ester entfernt, sowie durch die hohe Ionenstärke der Deaktivierungslösung nicht-kovalent gebundenes Material entfernt. Für die Deaktivierung wurden 35 µl 1 M Ethanolaminhydrochloridlösung pH 8,5 für 7 Minuten injiziert.

3.2.5.3 Reinigung von Peptiden über eine C 18-Cartridge

Lösungen: Methanol p.a.
 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser
 30-70 % Acetonitril, 0,1 % TFA in Wasser

Zunächst wurde die Cartridge mit 2 ml Methanol, 5 ml Wasser und anschließend mit 5 ml 0,1 % TFA vorgespült. Die Spülflüssigkeit wurde mit einer 5 ml Plastikspritze durch die Cartridge gepreßt. Für alle folgenden Schritte wurde eine Spritze als Reservoir auf die Cartridge gesetzt, in welche die Probe und anschließend der Elutionspuffer mit einer Pasteurpipette gefüllt wurde. Das Spülen der Cartridge mit diesen Lösungen erfolgte durch Schwerkraft.

Zunächst wurde die Cartridge mit bis zu 10 mg Peptid in 1 ml 0,1 % TFA beladen und anschließend mit 30 ml 0,1 % TFA gewaschen und der Durchfluß in 1,5 ml Fraktionen gesammelt. Danach erfolgte die Elution mit 30-70 % (gewählt nach dem Elutionsprofil der HPLC) in 0,1 % TFA, wobei der Durchfluß in 10x0,5 ml Fraktionen gesammelt wurde. Nach Beendigung der Elution wurden die Eluatfraktionen bei OD_{280nm} gegen 0,1 % TFA gemessen und diejenigen Fraktionen, die das Peptid enthalten wurden auf ca. 0,1 ml in der Speedvac eingengt, um das Acetonitril zu entfernen. Anschließend wurden die Proben auf 1ml mit bidest Wasser aufgefüllt, lyophilisiert, noch einmal in 1 ml bidest Wasser aufgenommen und erneut lyophilisiert. Die Lagerung des getrockneten Peptids erfolgte bei -20°C.

3.2.5.4 Messung der Interaktion

Lösungen:

BIA-Puffer: 20 mM Hepes-NaOH, pH 7,0
 150 mM NaCl
 10 mM KCl
 2 mM MgCl₂
 0,2 mM DTT

Regenerationslösung: 10 mM NaOH
 0,5 % SDS

Die zu untersuchenden Proben wurden gegen BIA-Puffer dialysiert und kurz vor Verwendung für 15 Minuten bei 13000 xg zentrifugiert. Die Injektion der Proben erfolgte bei einer Flußrate von 10-20 µl/min. Nach einer Assoziation von 2 Minuten erfolgte eine zweiminütige Dissoziation, wobei die Probenlösung durch BIA Puffer verdrängt wurde. Anschließend wurden gebundene Proteine durch eine kurze Injektion (15 Sekunden) von Regenerationslösung entfernt, wodurch die Ausgangsbasislinie wieder erreicht wurde. Die Auswertung erfolgte über das BIA - Evaluierungsprogramm 2.1.

3.2.5.5 Auswertung der gemessenen Interaktionen

Die Berechnung der Assoziationskonstante k_a , der Dissoziationskonstante k_d sowie der Gleichgewichtskonstante K_D erfolgte mit der Hilfe des BIA-Evaluierungsprogramms. Für die Berechnung wurden folgende Parameter festgelegt:

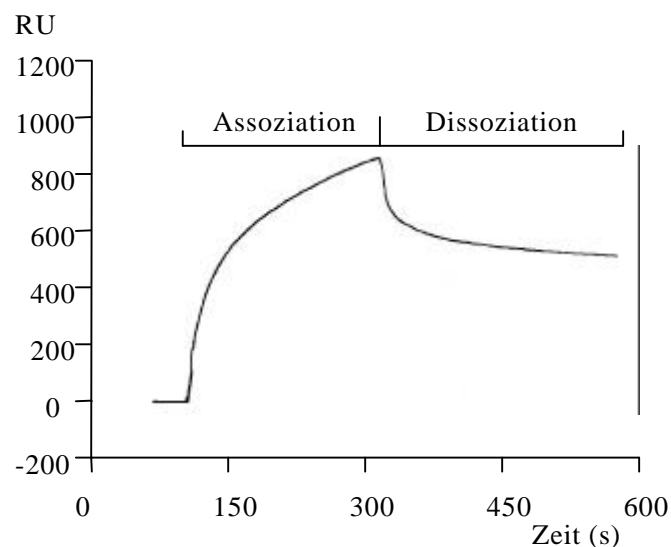


Abbildung 3.2: Sensogramm: Bindung eines Proteins an ein immobilisiertes Peptid.

Assoziation: Der Beginn der Assoziationsphase wurde als der Zeitpunkt 15 bis 20 s nachdem der Wechsel von der Pufferlösung auf die Probenlösung erfolgt ist festgelegt, um Effekte, welche durch den „Puffershift“ verursacht werden auszuschließen. Dissoziation: Als Beginn der Dissoziationsphase wurde der Zeitpunkt nach der Rückkehr zur Pufferlösung festgelegt. Um die Adaptor-Konzentration zu berechnen wurde eine molekulare Masse von jeweils 280 kDa angenommen. Desweiteren wurde eine Kinetik 1. Ordnung für die Berechnung zugrunde gelegt.

Die Assoziationskonstante k_a die Dissoziationskonstante k_d sowie die Gleichgewichtskonstante K_D wurden nach folgenden Formeln berechnet.

Berechnung der Gleichgewichtskonstanten K_D :

$$K_D \Leftrightarrow \frac{k_d}{k_a}$$

Berechnung der Assoziationskonstante k_a :

$$R = R_{eq} (1 - e^{-(kaCn+kd)(t-t_0)})$$

t = Zeit (in Sekunden)

R_{eq} = „steady state response level“

c = molare Konzentration der Adaptoren in der injizierten Lösung N = sterischer Interferenzfaktor (beschreibt die Wertigkeit der Interaktion zwischen den Adaptorproteinen und dem Tail Peptid, gleich 1 gesetzt)

Berechnung der Dissoziationskonstante k_d :

$$R = R_0 e^{-kd(t-t_0)}$$

R_0 = „response level“ zum Zeitpunkt t=0 (=Beginn der Dissoziationsphase)

4 Ergebnisse

4.1 Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne für das Recycling der LAP

Im ersten Teil der Arbeit sollten die recycling-vermittelnden Motive in der LAP-Aminosäuresequenz ermittelt werden. Für eine erste Eingrenzung dieser Sequenzmotive dienten Chimäre aus der LAP und anderen lysosomalen Membranproteinen (Lamp1, Limp2), bei denen der luminal Bereich, die Transmembrandomäne (TM-Domäne) und die zytoplasmatische Domäne (Tail) gegeneinander ausgetauscht wurden. Lamp1 und Limp2 waren für die Identifizierung recycling-vermittelnder Motive geeignet, da sie im Gegensatz zur LAP keinem Recycling zwischen der Plasmamembran und den Endosomen unterliegen. Lamp1 und Limp2 passieren nach dem Verlassen des TGN die Endosomen und werden von dort direkt zu den Lysosomen weitertransportiert.

4.1.1 Die LAP-Chimären

In der Abbildung 4.1 sind Wildtyp-LAP (LAP-WT), Lamp1-WT und Limp2-WT sowie die Chimären schematisch dargestellt.

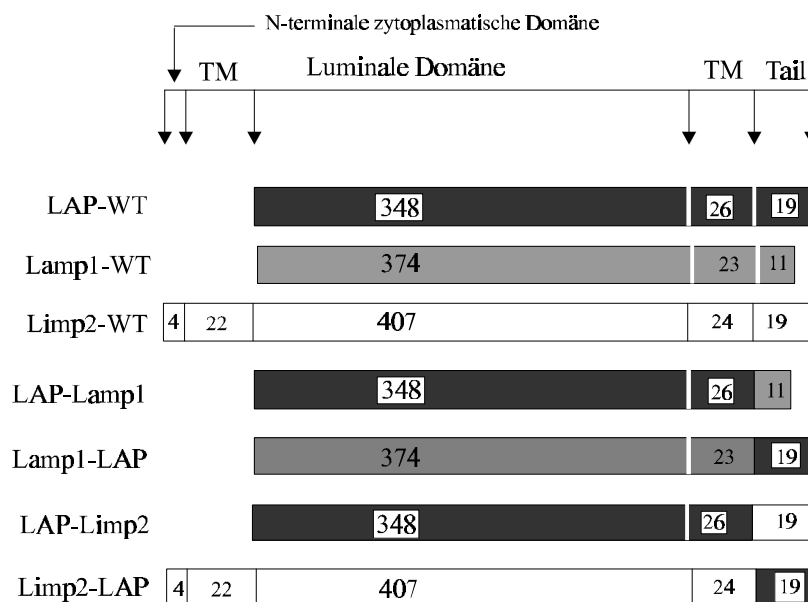


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der LAP-Chimäre. Die Länge der dargestellten Proteinbereiche verhält sich nicht proportional zur Länge ihrer jeweiligen Aminosäurekette. Der N-Terminus liegt auf der linken Seite der Strukturen. Die Kombinationen des luminalen Proteinbereiches, der Transmembrandomäne (TM) und der zytoplasmatischen Domäne (Tail) in den einzelnen Chimären wird durch die farbliche Gestaltung gezeigt. Alle LAP-Bereiche sind schwarz dargestellt. Die Lamp1-Bereiche sind grau unterlegt und die Limp2-Bereiche sind weiß.

Bei der LAP und Lamp1 handelt es sich um Typ I Membranproteine, während Limp2 als Typ III-Membranprotein über zwei Transmembranregionen verfügt. Die drei Proteine besitzen eine kleine C-terminale zytoplasmatische Domäne (Tail, 11-19 Aminosäuren), die durch eine Transmembranregion mit dem N-terminalen Hauptteil der Proteine verbunden wird. Der N-terminale Bereich ragt in den luminalen bzw. extrazytoplasmatischen Raum.

Die LAP-WT und Chimären exprimierenden BHK 21 Zellen wurden von den Arbeitsgruppen C. Peters (München, Deutschland) und I. Sandoval (Madrid, Spanien) zur Verfügung gestellt. Bei der Chimärenkonstruktion ist der LAP-Tail gegen den Lamp1-Tail bzw. gegen den Limp2-Tail ausgetauscht worden (LAP-Lamp1, LAP-Limp2). Die dritte Chimäre setzt sich aus dem luminalen und transmembranären Lamp1-Bereich und dem LAP-Tail zusammen. In der vierten Chimäre wurde der Limp1-Tail gegen den LAP-Tail ausgetauscht (Lamp1-LAP). Die für die Experimente ausgewählten Klone sollten möglichst vergleichbare Expressionslevel besitzen. Die Tabelle 4.1 faßt die Expressionslevel dieser Klone zusammen. Für den Vergleich der Expressionshöhe der einzelnen LAP-exprimierenden BHK 21 Klone wurden TX-100 Zellhomogenate (siehe 3.2.4.1.1) hergestellt. Die Membranen wurden sedimentiert (10 min 14.000 rpm., Eppendorffzentrifuge). Aus dem Überstand entnommene Homogenat-Proben mit gleicher Gesamtproteinmenge wurden mittels 10 %-iger SDS-Gelelektrophorese (10 %, siehe 3.2.3.4) aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Semi-Dry-Blot-Verfahren, siehe 3.2.3.5.1), erfolgte die Detektion der membranintegrierten LAP-Form der verschiedenen LAP-Konstrukte mit den jeweiligen Antikörpern (siehe 3.1.10.1). Nach der Quantifizierung der Signalstärken, konnte die Expressionshöhe der LAP-Klone bestimmt werden.

LAP-Klone	LAP-Expressionslevel
BHK 21 LAP-WT	1,0
BHK 21 LAP-Lamp1	1,08
BHK 21 Lamp1-LAP	1,3
BHK 21 LAP-Limp1	1,0
BHK 21 Limp1-LAP	0,8

Tabelle 4.1: LAP-Expressionslevel der untersuchten BHK 21 Zelllinien. Die Homogenate der aufgeführten LAP-Klone wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend mit dem entsprechenden LAP-Antiserum detektiert. Nach der Quantifizierung der Signale der membranständigen LAP-Form konnten der LAP-Expressionslevel relativ zur LAP-WT Expressionshöhe bestimmt werden. Hierzu wurde die Signalstärke der LAP-Chimäre durch die Signalstärke der LAP-WT dividiert.

4.1.2 Neuraminidase-Assay

4.1.2.1 Isoelektrische Fokussierung von LAP

Die Isoelektrische Fokussierung (IEF) stellt für die Untersuchungen zum Recycling der LAP eine wichtige Methode dar. In einer Voruntersuchung erfolgte zunächst die Analyse des Verteilungsmusters membranständiger LAP in der IEF.

Die folgenden Experimente erfolgten in LAP-WT sowie LAP-Mutanten exprimierenden BHK 21-Zellen. LAP-WT wurde einer 15-minütigen metabolischen Markierung (*Pulse*) unterzogen und anschließend entweder sofort geerntet, oder zuvor für weitere 60 min bei 37 °C kultiviert (*Chase*). Die innerhalb dieses Zeitfensters markierte LAP müßte ausschließlich aus der membranintegrierten LAP (67 kD) bestehen und dürfte keine lösliche LAP (52 kD) enthalten, da die ersten löslichen LAP-Moleküle erst nach einem 3-stündigen *Chase* auftreten, der einer 2-stündigen metabolischen Markierung folgt (GOTTSCHALK et al. 1989). Zur Kontrolle wurde dennoch, die LAP einer Phasentrennung mit dem Detergenz TX-114 unterzogen. Membranständige LAP integriert sich bei der Phasentrennung in Detergenzmicellen und kann von der löslichen LAP, die sich in der wäßrigen Phase anreichert, abgetrennt werden.

Nach der Immunpräzipitation der LAP aus der Detergenzphase erfolgte die Auftrennung des präzipitierte Materials in der IEF sowie im SDS-PAGE. Die SDS-PAGE, von der hier nur ein Ausschnitt abgebildet ist, zeigte das im Immunpräzipitat keine Kontaminationen vorlagen und folglich alle in der IEF auftretenden Banden der membranintegrierten LAP-Form zuzuordnen sind (siehe Abbildung 4.2).

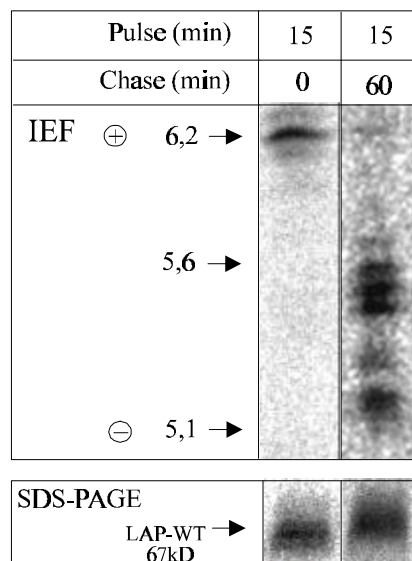


Abbildung 4.2: Darstellung der LAP in der IEF. Wildtyp-LAP exprimierende BHK 21-Zellen wurden nach einem 15-minütigen *Pulse* einem 0- bzw. 60-minütigen *Chase* unterzogen. Nach einer Phasentrennung mittels TX-114 erfolgte die Immunpräzipitation der LAP aus der Detergenzphase. Dann wurde $\frac{1}{4}$ des präzipitierten Materials in der SDS-PAGE und $\frac{3}{4}$ in der IEF aufgetrennt. Die Pfeile der IEF markieren verschiedenen pH-Werte.

Die IEF in der Abbildung 4.2 zeigt, daß die LAP als Glykoprotein mit einem pI von 6,2 synthetisiert wird. Im Verlauf eines 1-stündigen *Chase* passiert sie den *trans*-Golgi. Hier werden Sialinsäuren auf die Zuckerseitenketten der LAP transferiert. Hierdurch erhält die Glykanstruktur pro Sialinsäure eine negative Ladung, was den pI der LAP in einen niedrigeren Bereich verschiebt. Die heterogen sialylierte LAP fokussiert in einem Bereich zwischen pH 5,1 und 5,6 und bildet ein reproduzierbares Muster aus 8 Banden. 3 Banden fokussieren in einem Kluster zwischen pH 5,1 und 5,3, während ein zweites Kluster bei pH 5,4-5,6 entsteht. Zwischen diesen beiden Bereichen fokussiert noch eine zusätzliche Bande bei pH 5,3.

4.1.2.2 Neuraminidasebehandlung von LAP bei 4 °C

Den folgenden Experimente liegt ein Neuraminidase-Assay zugrunde, der bereits 1989 von BRAUN et al. etabliert und für Untersuchungen zum LAP-Recycling verwendet wurde. Durch Inkubation des LAP-Immunpräzipitates mit dem Enzym Neuraminidase werden spezifisch die terminalen Sialinsäuren der LAP-Zuckerseitenketten abgespalten. Da Proteine in der IEF nach ihrer Ladung aufgetrennt werden, und die Desialylierung mit dem Verlust negativer Ladungsträger einhergeht, kann der Desialyierungsgrad der LAP mittels IEF analysiert werden. Durch die Abspaltung der Sialinsäuren entstehen 4 desialylierte LAP-Formen, die zwischen einem pH von 5,8 und 6,2 fokussieren (Abbildung 4.3).

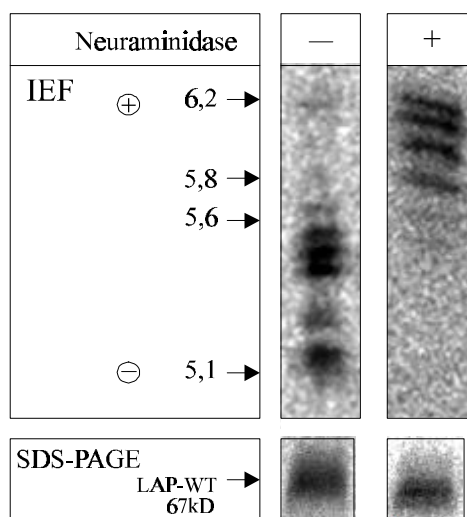


Abbildung 4.3: Desialylierung immunpräzipitierter LAP. LAP-WT wird nach einer 15-minütigen metabolischen Markierung und einem 1-stündigen *Chase* aus der Detergenzphase immunpräzipitiert. Das Immunpräzipitat (Protein A-Sepharose-Antikörper-LAP-Komplex) wurde anschließend in 500 µl PBS** pH 5,5 mit bzw. ohne 80 mU Neuraminidase für 1 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurde ¼ des präzipitierten Materials in der SDS-PAGE und ¾ in der IEF aufgetrennt. Die Pfeile am linken Rand der IEF markieren die isoelektrischen Punkte der verschiedenen LAP-Formen.

Die *in vitro* Desialylierung zeigt, daß die Zuckerseitenketten LAP ein Substrat der Neuraminidase sind. Somit kann die Desialylierung von LAP *in vivo* für den Nachweis plasmamembranständiger LAP genutzt werden. Metabolisch markierte Zellen wurden in PBS mit bzw. ohne Neuraminidase für 1 h bei 0-4 °C inkubiert (Abbildung 4.4). Da bei 0-4 °C kein Membrantransport stattfindet, ist ausschließlich die plasmamembranständige LAP für die Neuraminidase zugänglich und kann desialyliert werden. 22 % der fokussierten

LAP von Zellen, die mit der Neuraminidase behandelt wurden, besaßen in der IEF einen pI zwischen 5,8 und 6,2. Aus dem Vergleich mit den nicht mit Neuraminidase behandelten Kontrollzellen, bei denen dieser Anteil 6 % betrug, wird deutlich, daß 16 % der LAP bei 0-4 °C neuraminidasezugänglich und somit auf der Plasmamembran lokalisiert sind.

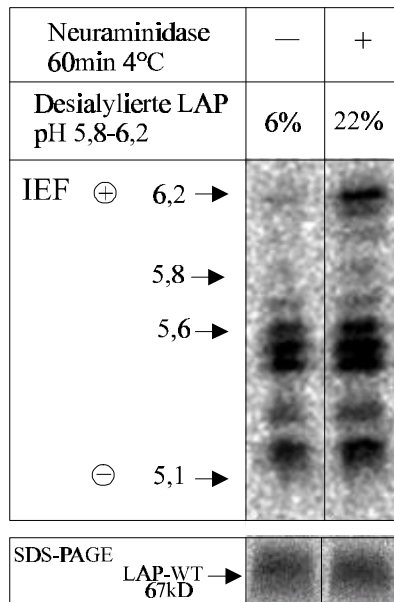


Abbildung 4.4: Nachweis plasmamembranständiger LAP. BHK 21 LAP-WT-Zellen wurden für 15 min metabolisch markiert und anschließend einem 1-stündigen *Chase* unterzogen. Dann wurden die Zellen in PBS** pH 5,5 mit bzw. ohne 80 mU Neuraminidase für 1 h bei 0-4 °C inkubiert. Nach erfolgter Immunpräzipitation der membranständigen LAP aus der Detergenzphase wurde die LAP in der SDS-PAGE sowie in der IEF aufgetrennt. Die Werte im oberen Teil der Abbildung entsprechen dem Anteil desialylierter LAP (pH 5,8-6,2) in Relation zur gesamten fokussierten LAP (pH 5,1-6,2, durch Pfeile markiert).

4.1.2.3 Austausch endosomaler LAP-WT mit der Plasmamembran

Braun et al. zeigte, daß nach einem 2-stündigen *Pulse* gefolgt von einem 2-stündigen *Chase*, eine membranintegrierte LAP-Fraktion von 17-18 % auf der Plasmamembran nachzuweisen ist. Dieser Wert blieb auch nach einer Verlängerung des *Chase* auf 14 h noch konstant. Diese Beobachtung legt nahe, daß es sich bei dem gleichbleibenden Anteil plasmamembranständiger LAP nicht um neusynthetisierte LAP handeln kann, die nach dem Verlassen des TGN einmalig die Plasmamembran passiert, da der LAP-Transport vom TGN zur Plasmamembran eine Halbwertszeit von 10 min hat. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß es sich nicht um eine stationäre, plasmamembranständige LAP-Fraktion handelt. Ein konstanter Pool membranintegrierter LAP verteilt sich zu ca. 20 % auf die Plasmamembran und zu ca. 80 % auf die Endosomen. Hierbei rezykliert die LAP ständig zwischen diesen beiden Kompartimenten, so daß ein dynamisches Gleichgewicht vorliegt (BRAUN et al. 1989).

In dem folgenden Experiment wird der Austausch zwischen der plasmamembranständigen und der endosomalen LAP verfolgt. Zu diesem Zweck wurden metabolisch markierte Zellen für verschiedene Zeiten bei 37 °C mit neuraminidasehaltigem Medium inkubiert. Anschließend erfolgte eine Neuraminidasebehandlung bei 4 °C. Im Verlauf der Neuraminidasebehandlung bei 37 °C gelangt endosomale LAP an die Plasmamembran, wo sie desialyliert werden kann. Nach der 4 °C-Neuraminidasebehandlung lagen 32 % der

gesamten fokussierten LAP in der desialylierten Fraktion zwischen pH 5,8 und 6,2 vor. Während einer 5- bzw. 10-minütigen Inkubation mit Neuraminidase bei 37 °C konnte dieser Wert auf 47 % bzw. 79 % gesteigert werden, da mit längerer Inkubationszeit immer mehr endosomale LAP die Plasmamembran passieren kann und folglich neuraminidase-zugänglich wird (siehe Abbildung 4.5). Wenn man die bei 4 °C desialylierte LAP von der bei 37 °C desialylierten LAP abzieht, muß die Differenz endosomaler LAP entsprechen, die bei der 37 °C-Behandlung die Plasmamembran passiert hat. Somit ist diese Differenz ein Maß für den Austausch intrazellulärer LAP mit der Plasmamembran, und erreicht nach einer 10-minütigen Neuraminidasebehandlung den Wert von 47 %.

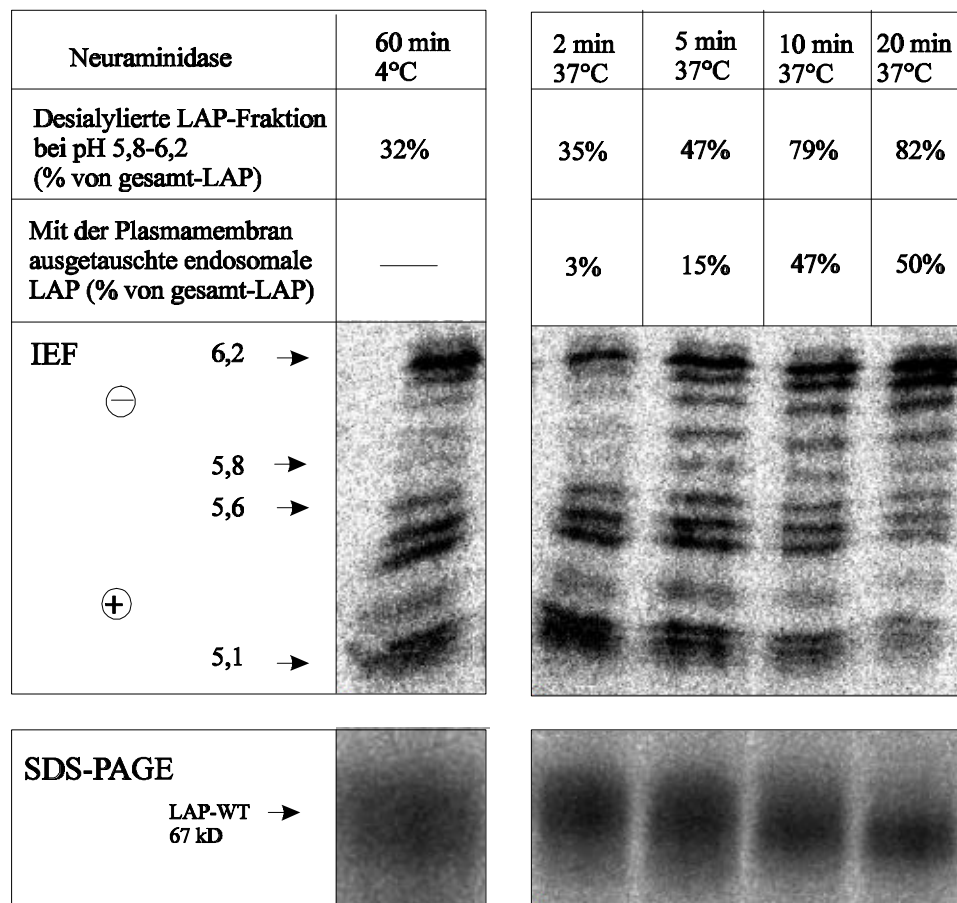


Abbildung 4.5: Austausch endosomaler LAP-WT mit der Plasmamembran. LAP-WT-Zellen wurden für 15 min metabolisch markiert und anschließend 60 min *chased*. Dann erfolgte eine Inkubation mit 80 mU Neuraminidase (Inkubationszeiträume sind über den Fotoausschnitten in der Abbildung angegebenen) bei 37 °C oder bei 4 °C. Nach der LAP-Immunpräzipitation aus der Detergenzphase wurde das präzipitierte Material aufgeteilt um $\frac{3}{4}$ in der IEF sowie $\frac{1}{4}$ in der SDS-PAGE aufzutrennen. In der Abbildung ist die desialylierte LAP Fraktion (pH 5,8-6,2) in Relation zur gesamten fokussierten LAP angegeben. (pH 5,1-6,2). Aus diesen Werten läßt sich die endosomale LAP berechnen, die während der verschiedenen Inkubationszeiten bei 37 °C die Plasmamembran passiert haben muß. Die mit der Plasmamembran ausgetauschte endosomale LAP ergibt sich aus der Differenz zwischen der nach der 4 °C-Neuraminidaseinkubation vorliegenden desialylierten LAP-Fraktion (pH 5,8-6,2) und der nach der jeweiligen 37 °C-Neuraminidasebehandlung vorliegenden desialylierten LAP-Fraktion.

Neuraminidasebehandlung keine detektierbare endosomale LAP-Lamp1-Fraktion mit der Plasmamembran ausgetauscht werden.

4.1.2.5 Austausch endosomaler LAP-Limp2 mit der Plasmamembran

LAP-Limp1 wurde der selben Protokoll wie LAP-WT und LAP-Lamp1 einer Neuraminidasebehandlung unterzogen. Nach der Immunpräzipitation von LAP-Limp2 aus der Detergenzphase erfolgte die Auftrennung in der SDS-PAGE und in der IEF. Die Auftrennung von LAP-WT und LAP-Limp2 in der IEF ist nahezu identisch. Die Auswertung des IEF-Gels wird in einer Tabelle wiedergegeben (siehe Tabelle 4.2). Nach der 1-stündigen Neuraminidasebehandlung bei 4 °C fokussierten 22 % der LAP-Limp2, auf Grund ihrer Desialylierung, zwischen einem pH von 5,8 und 6,1. Weitere 7 Banden verteilten sich auf einen pH-Bereich zwischen 5,6 und 5,1. Der Anteil dieser desialylierten Fraktion (pH 5,8-6,1) betrug nach der 5- bzw. 10-minütigen Neuraminidasebehandlung 17 % bzw. 22 %. Folglich kann während der 10-minütigen Neuraminidasebehandlung bei 37 °C kein Transport von endosomaler LAP-Limp2 an die Plasmamembran detektiert werden.

	Neuraminidasebehandlung				
	1 h 4 °C	2 min 37 °C	5 min 37 °C	10 min 37 °C	20 min 37 °C
Desialylierte LAP-Limp2-Fraktion bei pH 5,8-6,1 (% von gesamt-LAP-Limp2)	24	17	18	23	36
Mit der Plasmamembran ausgetauschte endosomale LAP-Limp2 (% von gesamt-LAP-Limp2)	—	n.d.	n.d.	n.d.	12

Tabelle 4.2: Neuraminidase-Assay mit LAP-Limp2. Die Tabelle 4.2 faßt die Ergebnisse der Neuraminidasebehandlung bei 4 °C und 37 °C mit LAP-Limp2 exprimierenden Zellen zusammen. Zur Durchführung und Auswertung des Experimentes siehe Abbildung 4.5.

4.1.2.6 Einfluß der luminalen LAP-Domäne auf den Austausch endosomaler LAP mit der Plasmamembran

In der Abbildung 4.7 werden die Transportgeschwindigkeiten endosomaler LAP-WT, LAP-Lamp1 und LAP-Limp2 zur Plasmamembran miteinander verglichen. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37 °C konnte keine intrazelluläre LAP-Lamp1 bzw. LAP-Limp2 auf der Plasmamembran detektiert werden. Wenn man die 20-minütige 37 °C-Neuraminidasebehandlung der Chimären betrachtet, fällt jedoch auf, daß ein kleiner Teil der endosomalen LAP-Limp2 (12 %) bzw. LAP-Lamp1 (7 %) durch Verlust der Sialinsäure

in die desialylierte Fraktion verschoben wird (Abbildung 4.7). Es besteht die Möglichkeit, daß während der 37 °C Inkubation extrazelluläre Neuraminidase endozytiert wird, in die Endosomen gelangt und dort LAP desialyliert. Da die Wahrscheinlichkeit einer Neuraminidaseaufnahme in die Zelle mit längeren 37 °C-Inkubationszeiten immer größer wird, könnte der Anstieg der desialylierten LAP-Fraktion nach 20-minütiger Inkubation auch auf eine intrazelluläre Desialylierung zurückzuführen sein (siehe 5.1.2). Folglich ist es unklar, ob endosomale LAP-Lamp1 bzw. LAP-Limp2 sehr langsam zur Plasmamembran transportiert werden, oder ob diese beiden Chimären unter Umständen vom Transport zur Plasmamembran ausgeschlossen sind. Unabhängig von einer möglichen intrazellulären Desialylierung der LAP-Konstrukte, zeigen die Ergebnisse deutlich, daß die luminaire LAP-Domäne für einen schnellen Austausch endosomaler LAP mit der Plasmamembran nicht ausreichend ist. Weiterhin zeigen die Experimente das die zytoplasmatische LAP-Domäne für einen schnellen Transport endosomaler LAP zur Plasmamembran notwendig ist.

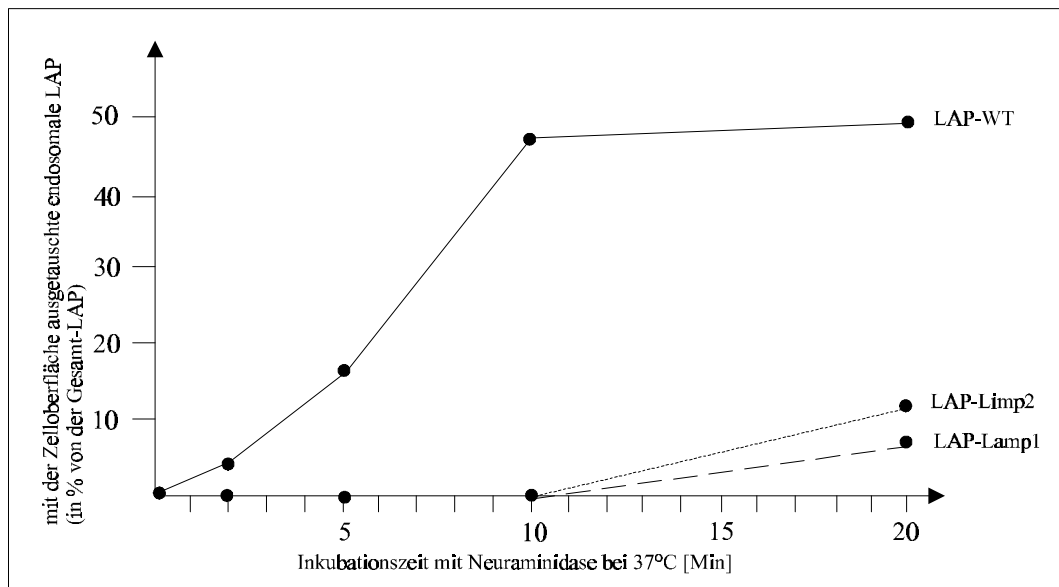


Abbildung 4.7: Plasmamembrantransport von endosomaler LAP. Der Neuraminidase-Assay wurde wie unter Abbildung 4.5 beschrieben mit den verschiedenen LAP-Konstrukten bei 37 °C und 4 °C durchgeführt. Die Grafik vergleicht die Kinetik mit der die endosomalen LAP-Konstrukte zur Plasmamembran transportiert werden. Auf der X-Achse sind die Neuraminidaseinkubationszeiten bei 37 °C angegeben [min]. Die intrazelluläre, membranintegrierte LAP-Fraktion, die während dieser Inkubation die Plasmamembran erreichte, wird auf der Y-Achse angezeigt. Dieser Wert wird in Relation zur gesamten fokussierten LAP angegeben.

4.1.2.7 Austausch endosomaler Limp2-LAP mit der Plasmamembran

Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, daß die zytoplasmatische LAP-Domäne für die Vermittlung des schnellen Austausches endosomaler LAP mit der Plasmamembran notwendig ist. In dem folgenden Experiment sollte geklärt werden, ob die zytoplasmatische Domäne der LAP auch ausreichend ist um diesen Prozeß zu vermitteln. Zu diesem Zweck wurde der Neuraminidase-Assay mit einer Mutante durchgeführt, in der die luminalen LAP-Domäne gegen den luminalen Bereich von Limp2 ausgetauscht wurde. Das Bandenmuster von Limp2-LAP in der IEF unterscheidet sich von der LAP-WT Auftrennung, da der größte Teil des LAP-Moleküles ausgetauscht wurde, was einen wesentlichen Einfluß auf den isoelektrischen Punkt der Chimäre hat. Die nach der Neuraminidaseinkubation bei 4 °C vorliegende desialylierte Limp2-LAP-Fraktion fokussiert zwischen pH 5,4 und 5,2 und hat einen Anteil von 14 % an der gesamten fokussierten Limp2-LAP. Die sialylierten Formen verteilen sich in einem Cluster zwischen pH 4,8 und 5,0. Nach einer 5- bzw. 10-minütigen Neuraminidasebehandlung bei 37 °C kann der Anteil der Fraktion zwischen pH 5,2 und 5,4 auf 29 % bzw. 41 % gesteigert werden (siehe Abbildung 4.8).

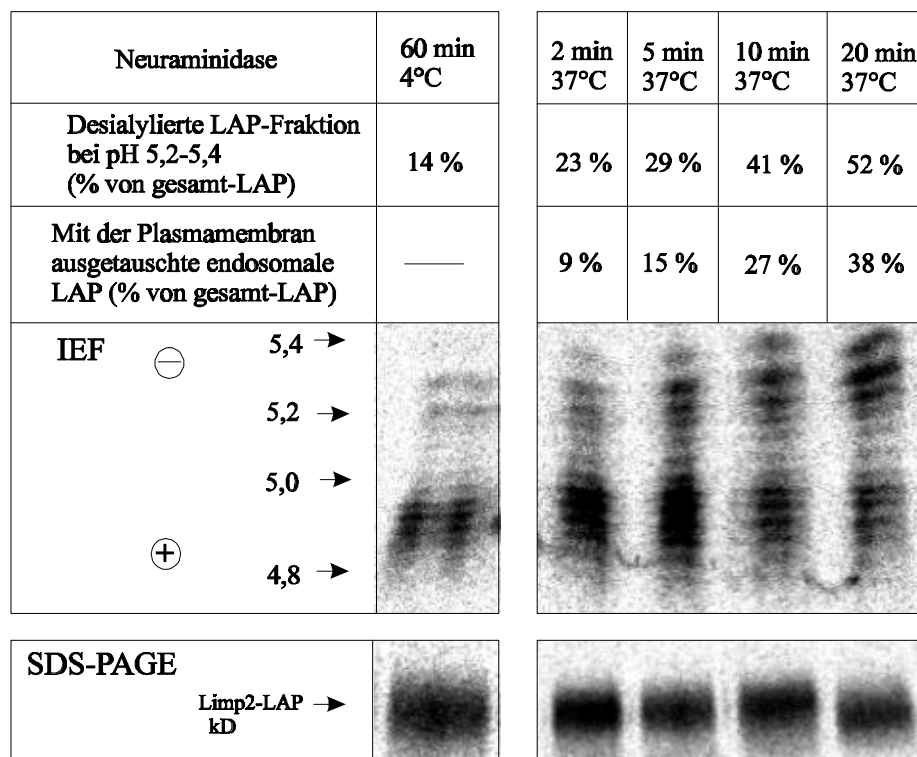


Abbildung 4.8: Austausch endosomaler Limp2-LAP mit der Plasmamembran. Metabolisch markierte, Limp2-LAP exprimierende Zellen wurden bei 4 °C sowie bei 37 °C mit Neuraminidase behandelt. Die isoelektrischen Punkte der verschiedenen Limp2-LAP-Formen sind durch Pfeile markiert. Durch die Neuraminidasebehandlung steigt der Anteil an desialylierter Limp2-LAP (pH 5,2-5,4). Zur genaueren Durchführung sowie zur Auswertung siehe Abbildung 4.5.

4.1.2.8 Bedeutung der zytoplasmatischen LAP-Domäne für den Austausch endosomaler LAP mit der Plasmamembran

In der Abbildung 4.9 werden die Geschwindigkeiten des Transportes verschiedener endosomaler LAP-Konstrukte zur Plasmamembran miteinander verglichen. Der Austausch von Limp2-LAP mit der Plasmamembran verläuft zwar langsamer als der Austausch zwischen von LAP-WT, dennoch werden innerhalb von 5 bzw. 10 min 15 bzw. 27 % der gesamten markierten Limp2-LAP aus den Endosomen zur Plasmamembran transferiert. Dieser Anteil kann im Verlauf einer 20 minütigen Inkubation bei 37 °C auf 37 % gesteigert werden. Vergleicht man diese Werte mit den entsprechenden Daten für LAP-Lamp1 und LAP-Limp2, bei denen im Verlauf einer 10-minütigen Inkubation bei 37 °C keine LAP-Lamp1 bzw. LAP-Limp2 auf der Zelloberfläche detektiert werden konnte, so zeigen diese Daten, daß der LAP-Tail für einen schnellen Transport endosomaler Limp2-LAP zur Plasmamembran ausreichend ist. Zusammenfassend ergaben die Auswertungen des Neuraminidase-Assays, daß die zytoplasmatische Domäne der LAP für den schnellen Austausch endosomaler und plasmamembranständiger LAP nicht nur notwendig sondern auch ausreichend ist.

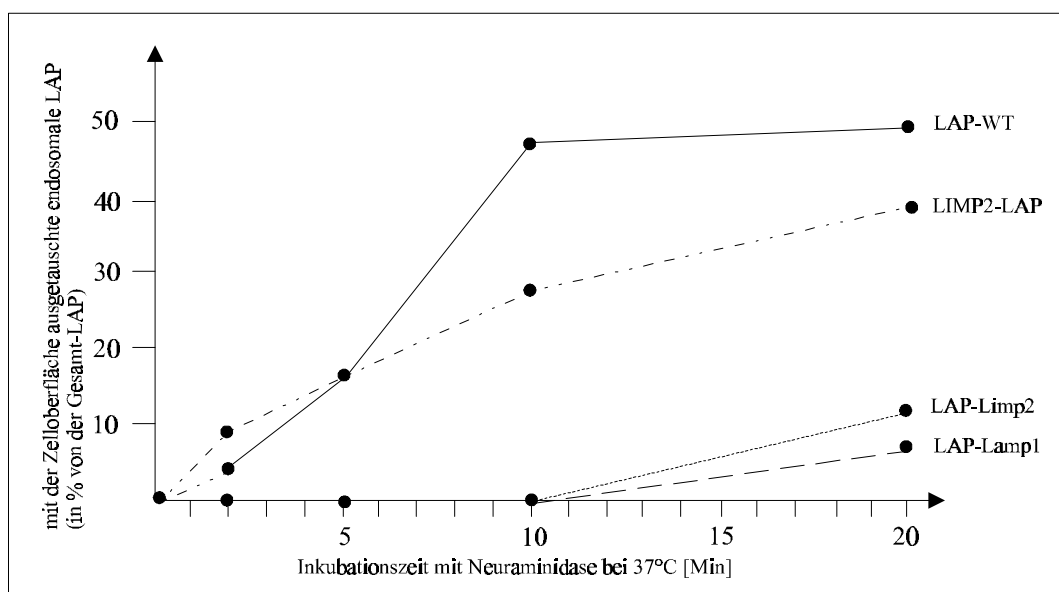


Abbildung 4.9. Plasmamembrantransport von endosomaler LAP. Der Neuraminidase-Assay wurde wie unter Abbildung 4.5 beschrieben mit den LAP-Chimären bei 37 °C und 4 °C durchgeführt. Zur genaueren Erklärung der Grafik siehe Abbildung 4.7.

4.1.3 Recycling-Assay

Mit Hilfe des Neuraminidase-Assays ließ sich der Transfer endosomaler, neusynthetisierter LAP zur Plasmamembran detektieren. Dieser Austausch endosomaler LAP mit der Plasmamembran, der zwar eine für den Recycling-Prozeß notwendige Voraussetzung ist, ermöglicht jedoch nur einen indirekten Recyclingnachweis. In einem direkten Recycling-

nachweis muß gezeigt werden, daß plasmamembranständige LAP nach ihrer Endozytose zur Zelloberfläche rezykliert. Der hier vorgestellte direkte Recycling-Assay bietet die Möglichkeit den Recyclingzyklus der LAP zu verfolgen.

4.1.3.1 Einführung in das experimentelle System

Die Grundlage des direkten Recycling-Assays bildet eine Markierung plasmamembranständiger Proteine, die wieder entfernt werden kann, nachdem ein internalisiertes Protein zur Plasmamembran rezykliert.

Die Markierung plasmamembranständiger Proteine erfolgt durch das wasserlösliche, nicht-membranpermeable Biotinderivat NHS-SS-Biotin (Sulfosuccinimidyl-2-(biotinamido)-ethyl-1,3-dithiopropinat, siehe 3.2.2.4). Die reaktive NHS-Gruppe (2,5 Dioxo-pyrolidin-1-yl-ester) des Biotinderivates greift die NH_2 -Gruppen der Aminosäuresreste (z.B. Lysinreste) von Proteinen an. Es bildet sich eine Peptidbindung zwischen der NH_2 -Gruppe des Aminosäurerestes und der NHS-Gruppe aus. Dadurch wird der Biotinrest kovalent über eine Disulfidbrücke (-SS-) mit dem Protein verknüpft. Die Biotinmarkierung kann durch reduzierende Reagenzien, welche die Disulfidgruppe spalten, wieder entfernt werden. Im Recycling-Assay wurde zu diesem Zweck Glutathion und DTT (Dithiothreitol) eingesetzt.

Das Flußschema des Recycling-Assays ist in der Abbildung 4.10 dargestellt. Die Durchführung erfolgte wie in 3.2.2.4 und 3.2.2.5 beschrieben. Eine konfluente 10 cm Zellkulturschale wurde zunächst mit der vorgekühlten Biotinlösung für 30 min bei 4 °C inkubiert. Da bei einer Temperatur von 4 °C kein Membrantransport abläuft, können nur die extrazelluläre Bereiche der Plasmamembranproteine mit einer Biotinmarkierung versehen werden. Nach dem Auswaschen des freien Biotins wurde ein Drittel des Zellrasens durch vorsichtiges Abschaben geerntet. Die in dieser Probe (Probe 1) vorliegende Fraktion biotinylierter Proteine entsprach den biotinzugänglichen Zelloberflächenproteinen.

Während der anschließenden 10-minütigen Reaktivierung der restlichen Zellen bei 37 °C können Exo- und Endozytose ablaufen, wobei biotinylierte Plasmamembranproteine in die Endosomen gelangten. Diese biotinylierte Proteinfraction ist während der folgenden 4 °C-Behandlung mit Glutathion/DTT vor der reduktiven Abspaltung ihrer Biotinmarkierung geschützt, während die Biotinreste von allen auf der Plasmamembran verbliebenen Proteinen entfernt werden. Nach der Glutathion/DTT-Behandlung wurde das zweite

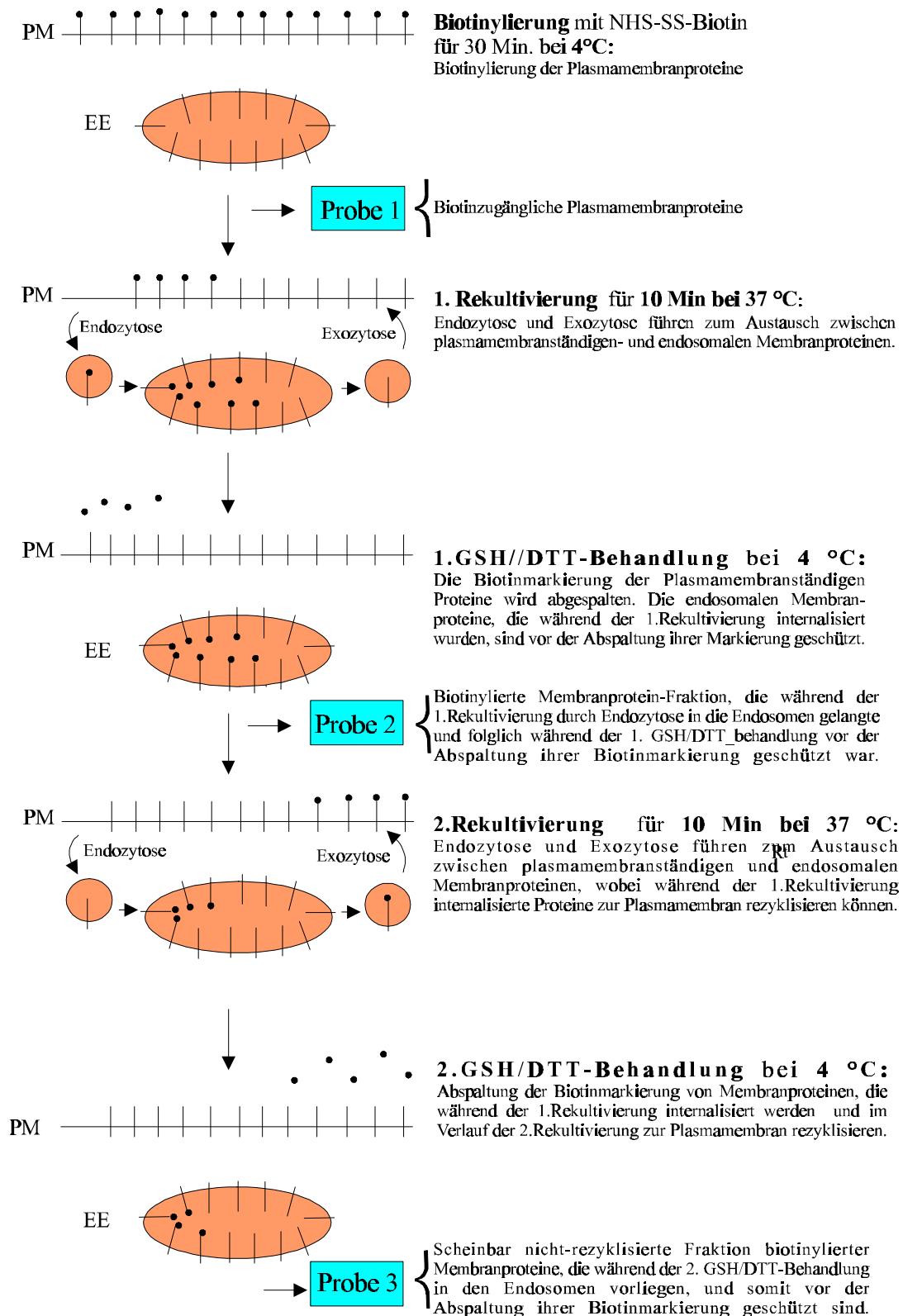


Abbildung 4.10: Flußschema des Recycling-Assays. In dieser Abbildung wird die experimentelle Strategie der einzelnen Schritte des Recycling-Assays erklärt. Die Biotinmarkierung wird durch einen schwarzen Punkt symbolisiert. Die Abkürzungen PM und EE stehen für Plasmamembran bzw. Endosomen.

Drittel der Zellen von der 10 cm Zellkulturplatte geerntet. Diese Probe (Probe 2) enthielt die biotinylierten Plasmamembranproteine, die während der 10-minütigen Reaktivierung internalisiert wurden und deshalb bei der anschließenden Glutathion/DTT-Behandlung vor der Abspaltung ihrer Markierung geschützt waren.

Danach erfolgte eine zweite Reaktivierung für 10 min bei 37 °C, in deren Verlauf erneut Membranproteine aus den Endosomen zur Plasmamembran gelangen konnten. Darunter befanden sich auch biotinylierte Membranproteine, die während der ersten Reaktivierung in die Endosomen aufgenommen wurden und deren Biotinmarkierung folglich während der ersten Glutathion/DTT-Behandlung vor der Abspaltung geschützt war.

Während der nun folgenden zweiten Glutathion/DTT-Behandlung wurde das Biotin der zur Plasmamembran rezyklierten Proteine entfernt. Anschließend wurde das letzte Drittel der Zellen geerntet. Die Proteine in der dritten Probe entsprachen also den biotinylierten, während der 1. Reaktivierung internalisierten Proteinen, die sich nach der 2. Reaktivierung noch in der Zelle befanden, und somit vor reduktiven Abspaltung ihrer Markierung geschützt waren. Die rezyklierte LAP-Fraktion entspricht somit der Differenz des biotinylierten LAP-Pools in Probe 2 und in Probe 3. Wenn die internalisierte, biotinylierte LAP-Fraktion (Probe 2) und die biotinylierte nicht rezyklierte LAP-Fraktion (Probe 3) gleich groß waren, ist davon auszugehen, daß kein Recycling der internalisierten Fraktion zur Plasmamembran stattgefunden hat.

4.1.3.2 Recycling-Assay mit LAP-WT-Zellen

Die im Recycling-Assay geernteten Zellen (BHK 21-LAP-WT, Probe 1, 2, 3) wurden in 500 µl Triton X-100 haltigem Tris-Puffer homogenisiert (siehe 3.2.4.1.1). Dann erfolgte die Proteinbestimmung (siehe 3.2.3.1) der Zell-Lysate. Für die spätere Versuchsauswertung und die weitere Probenaufarbeitung war es entscheidend, daß alle Proben auf die gleiche Gesamtproteinmenge (200-350 µg, je nach Experiment) und das gleiche Probenvolumen (550 µl) eingestellt wurden. 50 µl des äquilibrierten Zell-Lysates wurden direkt in Probenpuffer aufgenommen (Probe 1a, 2a, 3a in Abbildung 4.11). Die verbleibenden 500 µl wurden mit Streptavidinagarose inkubiert, um die biotinylierten Proteine (Probe 1b, 2b, 3b in Abbildung 4.11) zu präzipitieren. Nach der Aufnahme der Streptavidinpräzipitate in Probenpuffer konnten die Proben 1b, 2b, 3b gemeinsam mit den Proben 1a, 2a, 3a in der SDS-PAGE aufgetrennt, und im *semi dry* Verfahren auf Nitrozellulose transferiert werden (siehe 3.2.3.4.1). Die Detektion der LAP erfolgte mit Hilfe der entsprechenden Antikörper und dem Super-Signal-System von Pierce (siehe 3.2.3.5.3). Die anschließende Quantifizierung erfolgte wie unter 3.2.3.8 beschrieben.

Da die Proben 1a, 2a und 3a ein Volumen von 50 µl hatten, enthielten sie 1/10 der LAP, die in den 500 µl Gesamthomogenat vorlag. Damit konnte der Anteil der biotinylierten, membranständigen LAP in Relation zur gesamten membranständigen LAP berechnet werden.

Da alle Proben die gleiche Konzentration und das gleiche Probenvolumen aufwiesen, ist der Anteil biotinylierter LAP auf der Plasmamembran (Probe 1b) mit der internalisierten LAP (Probe 2b) sowie mit der nicht rezyklierten LAP (Probe 3b) vergleichbar. In jedem Fall wurde dennoch die Quantifizierung der LAP-Signale so vorgenommen, daß zunächst der prozentuale Anteil der biotinylierten LAP (z. B. 1b) in Relation zur Gesamt-LAP in den Proben (1a) bestimmt wurde. Dieses Verfahren wurde auch bei der internalisierten LAP (Probe 2a/2b) und der rezyklierten LAP (Probe 3a/3b) angewendet.

Der in der Abbildung 4.11 angegebene Anteil rezyklisierter LAP wurde aus der Beziehung der quantifizierten LAP-Signale zwischen der Probe 2b und 3b ermittelt. Bei diesem Experiment wird die rezyklierte LAP nicht aus einem positiven Signal sondern aus einem Signalverlust ermittelt. Dieser Verlust entsteht wenn die internalisierte, biotinylierte LAP (Probe 2b) während der 2.Rekultivierung aus den Endosomen an die Plasmamembran gelangt und in der anschließenden Glutathion(GSH)/DTT-Behandlung ihre Biotinmarkierung verliert. Der Anteil an rezyklisierter LAP, der diesem Signalverlust entsprach, wird in Relation zur internalisierten LAP angegeben. In den LAP-WT-Zellen rezyklierten 47 % der internalisierten LAP.

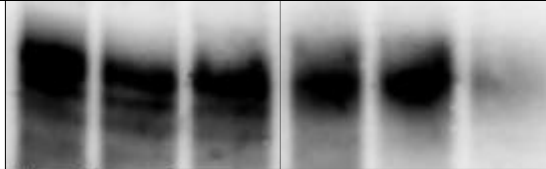
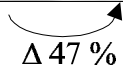
	1a	2a	3a	1b	2b	3b
NHS-SS-Biotin 30 min, 4 °C	+	+	+	+	+	+
1. Rekultivierung 10 min, 37 °C + GSH/DTT-Behandlung	-	+	+	-	+	+
2. Rekultivierung 10 min, 37 °C + GSH/DTT-Behandlung	-	-	+	-	-	+
LAP-WT						
Rezyklisierte LAP	 $\Delta 47 \%$					

Abbildung 4.11: Recycling von LAP-WT. LAP-WT exprimierende Zellen wurden für 30 min bei 4 °C mit NHS-SS-Biotin inkubiert. Danach erfolgte eine 10-minütige Rekultivierung bei 37 °C mit anschließender Glutathion (GSH)/DTT-Behandlung bei 4 °C. Die Rekultivierung mit anschließender Glutathion/DTT-Behandlung wurde wiederholt. Nach der Biotinylierung und den beiden Glutathion/DTT-Behandlungen wurden jeweils Zellen geerntet (Probe 1, 2, 3) und lysiert. Danach erfolgt das Äquilibrieren aller Proben auf die selbe Proteinkonzentration. Aus 500 µl Zell-Lysat konnte die biotinylierte LAP mit Streptavidinagarose präzipitiert werden (Probe 1b, 2b, 3b). Die Präzipitate wurden gemeinsam mit 50 µl Zell-Lysat (Probe 1a, 2a, 2a) in einem 10 %igen, reduzierenden SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Semi-Dry-Blot) konnte die membranintegrierten LAP-Form mit dem entsprechenden Antiserum detektiert werden. Die Probe 2b enthält die in den Endosomen vorliegende, internalisierte LAP. Die Probe 3b enthält die endosomale, nicht rezyklierte LAP. Der angegebene prozentuale Wert ergibt sich aus dem Signalverlust zwischen Probe 2b und 3b. Er entspricht dem prozentualen Anteil internalisierter LAP, die zur Plasmamembran rezykliert.

4.1.3.3 Recycling-Assay mit LAP-Chimären

Der Recycling-Assay wurde mit allen LAP-Chimären durchgeführt. Die Abbildung 4.12 zeigt die auf der Nitrozellulosemembran detektierten biotinylierten LAP-Fractionen aus den Proben 1b, 2b und 3b.

Proben	1b	2b	3b
NHS-SS-Biotin 30 min, 4°C	+	+	+
1. Reaktivierung 10 min, 37 °C + GSH/DTT-Behandlung	-	+	+
2. Reaktivierung 10 min, 37 °C + GSH/DTT-Behandlung	-	-	+
LAP-WT			
Rezyklisierte LAP-Fraktion	 $\Delta 47\%$		
Limp2-LAP			
Rezyklisierte LAP-Fraktion	 $\Delta 45\%$		
Lamp1-LAP			
Rezyklisierte LAP-Fraktion	 $\Delta 50\%$		
LAP-Limp2			
Rezyklisierte LAP-Fraktion	 n.d.		
LAP-Lamp1			
Rezyklisierte LAP-Fraktion	 n.d.		

Abbildung 4.12: Recycling-Assay mit allen LAP-Chimären-Zellen. Die Durchführung des Recycling-Assays sowie die Quantifizierung der rezyklisierten LAP erfolgte wie unter der Abbildung 4.11. beschrieben, wobei ein nicht detektierbares Recycling mit den Buchstaben n.d. abgekürzt wurde. In Abbildung 4.13 sind nur die biotinylierten LAP-Fractionen der Proben 1b, 2b, 3b dargestellt

Die Recyclingwerte (Abbildung 4.12) sind in der Abbildung 4.13 durch ein Balkendiagramm dargestellt. 45 % der internalisierten LIMP2-LAP-Fraktion sowie 50 % der internalisierten LAMP1-LAP-Fraktion rezyklisieren zur Plasmamembran. Da der rezykli-

sierte Anteil dieser beiden Chimären mit der rezyklierten LAP-WT-Fraktion (50 %) vergleichbar ist, muß der LAP-Tail für das Recycling ausreichend sein. Für LAP-Lamp1 und LAP-Limp2 konnte kein Recycling detektiert werden. Folglich ist der LAP-Tail unter den gewählten Bedingungen des Recycling-Assays nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend um Recycling zu vermitteln.

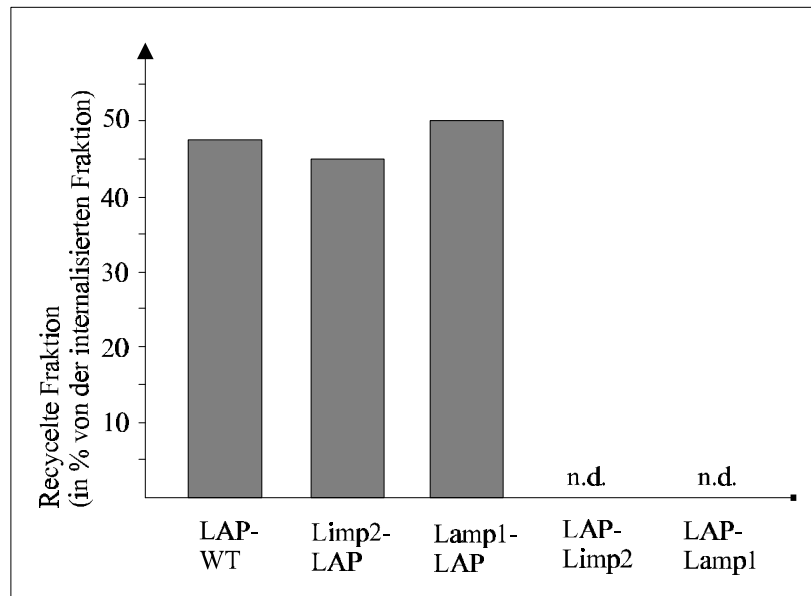


Abbildung 4.13: Vergleich der Recyclingrate verschiedener LAP-Chimäre In dem Balkendiagramm sind die prozentualen Anteile der rezyklierten LAP-Fraktionen in Relation zur internalisierten Fraktion angegeben. Die LAP-Chimären werden hierbei mit LAP-WT verglichen. Für LAP-Limp2 und LAP-Lamp1 konnte kein Recycling detektiert werden (n.d.).

4.1.3.4 Kontrollen des Recycling-Assays

4.1.3.4.1 Kontrolle 1: Kontrolle der Glutathion/DTT-Behandlung

Bei der Kontrolle 1 (Abbildung 4.14) erfolgte nach der Biotinylierung Wildtyp LAP Zellen eine 10-minütige Reaktivierung bei 4 °C. Nach der Biotinylierung (Probe 1) sowie nach der Reaktivierung (Probe 2) wurde ein Drittel einer konfluenten 10 cm Zellkulturschale geerntet. Da in der Probe 2b keine biotinylierte LAP nachzuweisen ist, muß während der Glutathion/DTT-Behandlung die Biotinmarkierung aller plasmamembranständiger LAP-Moleküle entfernt worden sein. Damit ist sichergestellt, daß die Probe 2 ausschließlich biotinylierte LAP enthalten, die durch Endozytose bei 37 °C in die Zellen aufgenommen wurde.

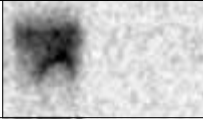
Proben	1b	2b
NHS-SS-Biotin 30 min, 4 °C	+	+
1. Rekultivierung 10 min, 4 °C + GSH/DTT-Behandlung	-	+
LAP-WT		
Während der GSH/DTT-Behandlung geschützte LAP	n.d.	↑

Abbildung 4.14: Kontrolle der Glutathion/DTT-Behandlung (Kontrolle 1). Der Recycling-Assay wurde mit BHK 21-LAP-WT-Zellen unter den in der Abbildung angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die Weiterverarbeitung und Auswertung der Proben erfolgte wie unter der Abbildung 4.6 angegeben. In der Probe 2b konnte keine biotinylierte LAP detektiert werden (n.d.).

4.1.3.4.2 Kontrolle 2: Recyclingkontrolle

In der Kontrolle 3 wurde der Recycling-Assay (Beschreibung siehe 4.1.3.1) mit BHK 21-LAP-WT-Zellen durchgeführt. Die 2. Rekultivierung erfolgte hier jedoch bei 4 °C. Die drei erhaltenen Proben wurden wie schon beschrieben aufgearbeitet und ausgewertet. Auf dem Nitrozelluloseblot in der Abbildung 4.15 wurden die biotinylierten LAP-Fractionen detektiert (Probe 1b, 2b, 3b). In der Kontrolle 2 konnte kein Recycling detektiert werden. Somit zeigt diese Kontrolle, daß der Verlust an biotinyliertem Material zwischen der Probe 2b und der Probe 3b nicht allein auf die zweite Glutathion/DTT-Behandlung bei 4 °C zurückzuführen ist. Für die Detektion eines Verlustes an biotinyliertem Material muß der Glutathion/DTT-Behandlung eine Rekultivierung bei 37 °C vorgeschaltet sein, in deren Verlauf der Recycling-Prozess ablaufen kann.


Proben	1b	2b	3b
NHS-SS-Biotin 30 min, 4 °C	+	+	+
1. Rekultivierung 10 min, 37 °C + GSH/DTT-Behandlung	-	+	+
2. Rekultivierung 10 min, 4 °C + GSH/DTT-Behandlung	-	-	+
LAP-WT			
Rezyklierte LAP		n.d.	

Abbildung 4.15: Recyclingkontrolle LAP-WT exprimierende Zellen wurden unter den in dieser Abbildung angegebenen Bedingungen im Recycling-Assay eingesetzt. Die weitere Aufarbeitung und Quantifizierung der Proben erfolgte wie unter Abbildung 4.11 beschrieben. Ein Recycling der LAP konnte unter den Bedingungen der Kontrolle 2 nicht detektiert werden (n.d.).

4.2 Eingrenzung des Recyclingsignals

Die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche hatten gezeigt, daß der LAP-Tail die Recyclingfähigkeit des Proteines vermittelt. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte eine genauere Eingrenzung der für das Recycling notwendigen Tail-Sequenzbereiche vorgenommen werden. Da der 19 Aminosäuren lange LAP-Tail im Aufbau und der Art seines Tyrosinsignales starke Ähnlichkeit mit dem Lamp1-Tail besitzt, wurden in den folgenden Experimenten die beiden Tailsequenzen genauer analysiert.

4.2.1 Neuraminidase-Assay der LAP-D7-Mutante

Der auffälligste Unterschied zwischen den zytoplasmatischen Domänen von LAP und Lamp1 besteht in der distalen LAP-Tail-Sequenz von 7 Aminosäuren (Abbildung 4.19, AA 13-19), die dem Tyrosinsignal folgt. Diese Sequenz ist im Lamp1-Tail nicht vorhanden, der direkt hinter dem Tyrosinmotiv endet. Da die bisherigen Versuchsergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß der Lamp1-Tail im Gegensatz zum LAP-Tail kein Recycling vermitteln kann, sollte untersucht werden, ob diese distale LAP-Sequenz für das Recycling verantwortlich ist. Deshalb wurde eine LAP-Mutante getestet, der die letzten 7 Aminosäuren des Tails fehlen, so daß der Tail direkt hinter dem Tyrosinmotiv endet (LAP D7, Abbildung 4.19).

Wie das IEF-Gel in der Abbildung 4.16 zeigt, verhält sich LAP D7 im Neuraminidase-Assay wie Wildtyp LAP. Ohne Neuraminidasebehandlung lagen 3 % von LAP D7 in der basischen Fraktion vor (Abbildung 4.16, Probe 2). Dieser Anteil erhöhte sich auf 19 % wenn die Zellen bei 4 °C mit Neuraminidase inkubiert wurden (Abbildung 4.16, Probe 1). Es befanden sich also mindestens 16 % der Mutanten an der Plasmamembran. Nach Inkubation der Mutante mit Neuraminidase bei 37 °C stieg der Anteil basischer LAP-Formen innerhalb von 20 min auf 88 %.

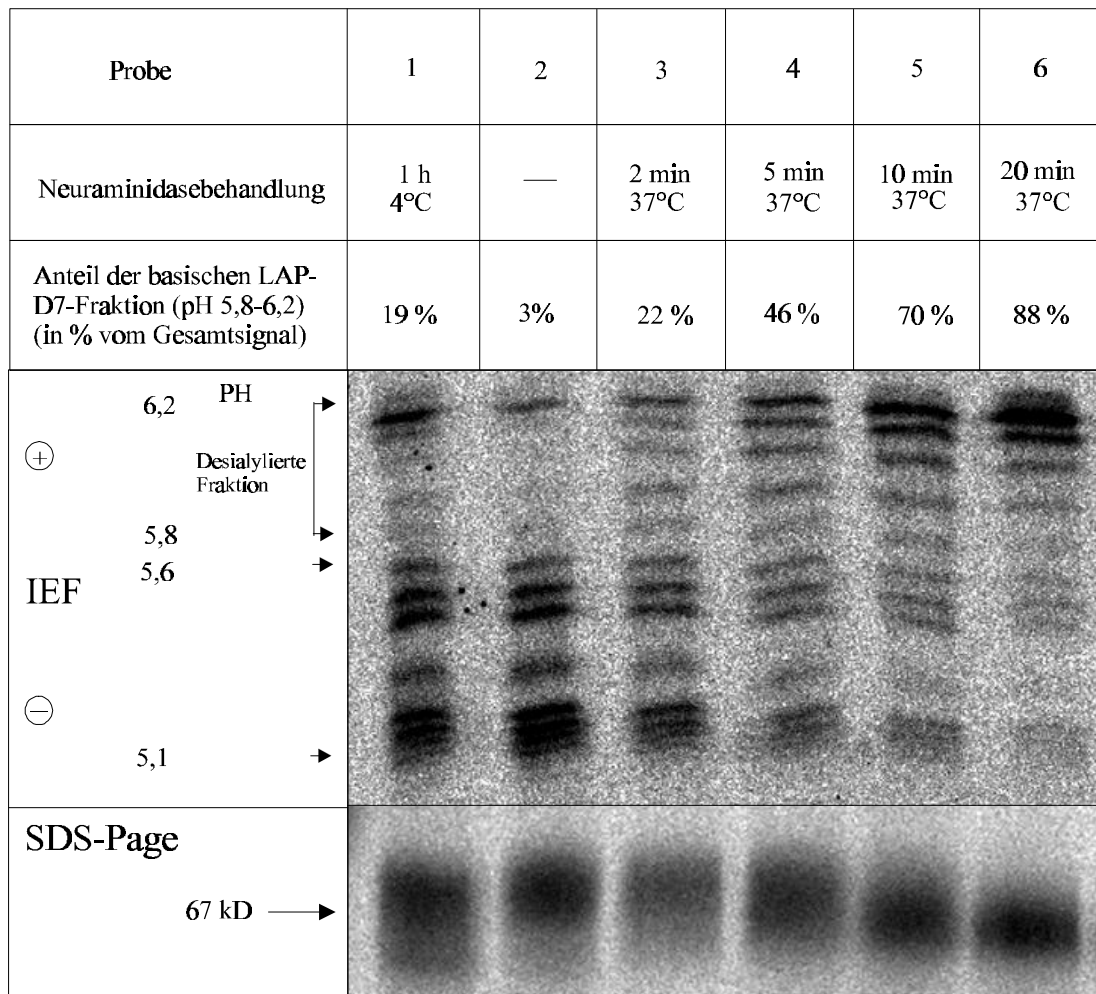


Abbildung 4.16: Neuraminidase-Assay mit BHK 21-LAP D7-Zellen. Der Neuraminidase-Assay erfolgt wie unter Abbildung 4.2 beschrieben. Die immunpräzipitierte, membranintegrierte LAP wurde in einer IEF sowie einer SDS-PAGE aufgetrennt (Aufarbeitung siehe Abbildung 4.2). Die Pfeile am linken Rand zeigen die Position verschiedener isoelektrischer Punkte. Die prozentualen Angaben entsprechen dem Anteil der basischen LAP D7-Fraktion (pH 5,8-6,2) in Relation zum Gesamtsignal aller fokussierter LAP D7-Formen

In der Abbildung 4.17 ist die Kinetik für den Austausch von endosomaler LAP mit der Plasmamembran dargestellt. Wie die Auswertung der IEF-Daten in der Grafik 4.16 zeigt, stimmt die Kinetik für LAP-WT und LAP-D7 überein. Folglich sind die ersten 12 Aminosäuren des LAP-Tails für die Vermittlung eines schnellen Austausches von intrazellulärer, neusynthetisierter LAP mit der Plasmamembran ausreichend. Der komplette distale Tail-Abschnitt (AA 13-19) hat keinen Einfluß auf diese Funktion.

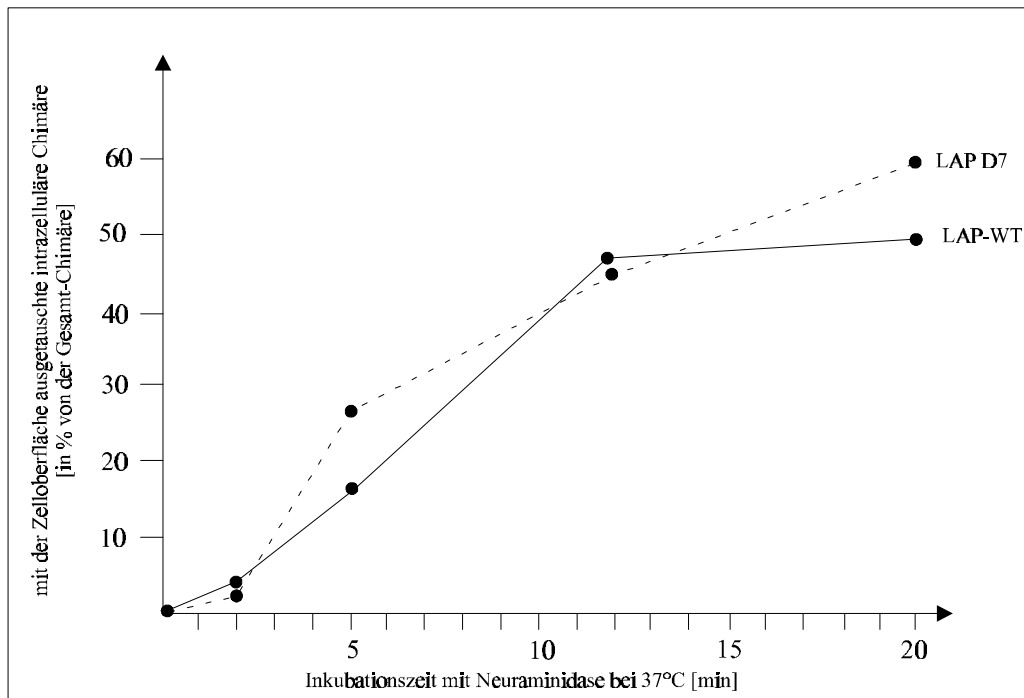


Abbildung 4.17: Gegenüberstellung der Neuraminidase-Kinetik von LAP-WT- und LAP D7. Der Neuraminidase-Assay wie unter Abbildung 4.2 beschrieben durchgeführt. Auf der X-Achse sind die Neuraminidaseinkubationszeiten bei 37 °C angegeben [min]. Die intrazelluläre, membranintegrierte LAP-Fraktion, die während dieser Inkubation die Plasmamembran erreichte, wird auf der Y-Achse angezeigt. Dieser Wert wird in Relation zur gesamten fokussierten LAP angegeben.

4.2.2 Recycling-Assay der LAP D7-Mutante

Der Recycling-Assay wurde wie in Abschnitt 4.1.3 beschrieben mit LAP D7 exprimierenden Zellen durchgeführt. Die Abbildung 4.18 zeigt die auf dem Nitrozelluloseblot detektierte biotinylierte LAP-Fraktion in den Proben 1b, 2b und 3b. Während der 2. Rezyklisierung konnten 45 % der internalisierten, biotinylierten LAP D7 aus den Endosomen zur Plasmamembran rezyklisieren. Da der rezyklierte LAP-WT-Anteil unter identischen Bedingungen einen Wert von 47 % ergibt, rezykliert LAP D7 mit der selben Effizienz wie LAP-WT. Folglich wird der distale Bereich des LAP-Tails (AA 13-19) nicht für die Vermittlung des Recyclingprozesses benötigt.

Proben	1b	2b	3b
NHS-SS-Biotin 30 min, 4°C	+	+	+
1.Rekultivierung 10 min, 37 + GSH/DTT-Behandlung	-	+	+
2.Rekultivierung 10 min, 37 + GSH/DTT-Behandlung	-	-	+
LAP-WT			
Rezyklisierte LAP-Fraktion	 Δ 47 %		
LAP D7			
Rezyklisierte LAP-Fraktion	 Δ 45 %		
LAP-Lamp1/LAP			
Rezyklisierte LAP-Fraktion	 Δ 42 %		

Abbildung 4.18: Recycling von LAP-WT, LAP D7- und LAP-Lamp1/LAP-Zellen. Die Durchführung des Recycling-Assays sowie die Probenaufarbeitung und Quantifizierung der Proben erfolgte wie unter der Abbildung 4.6 beschrieben. Der angegebene prozentuale Wert gibt die Größe der rezyklisierten LAP-Fraktion in Relation zur internalisierten, LAP-Fraktion wieder.

4.2.3 Recycling-Assay von LAP-Lamp1/LAP

4.2.3.1 Die Tail-Chimäre (LAP-Lamp1/LAP)

Die Ergebnisse der Experimente mit der LAP D7-Mutante ergaben, daß der komplette distale Bereich des LAP-Tails (AA 13-19) keinen Einfluß auf das Recycling hat. Um eine weitere Eingrenzung der Recycling-vermittelnden LAP-Tail-Sequenz vornehmen zu können, erfolgte eine Untersuchung des proximalen Tail-Bereiches hinsichtlich seines Einflusses auf das Recycling. Der kurze proximale Abschnitt vor dem Tyrosinmotiv umfaßt im LAP-Tail 8 Aminosäuren und im Lamp1-Tail 7 Aminosäuren. Damit der Einfluß des proximalen LAP-Tail-Abschnitts getrennt vom Einfluß des LAP-Tyrosinmotivs untersucht werden konnte, wurde die Tail-Chimäre (Abbildung 4.19) konstruiert.

Durch PCR-Mutagenese wurde der proximale Lamp1-Tail-Abschnitt (AA 1-7) mit dem LAP-Tyrosinmotiv (AA 9-12) fusioniert. Dieser fusionierte, 11 Aminosäuren lange Tail, ist über die LAP-Transmembrandomäne mit dem luminalen LAP-Bereich verknüpft. Nach

dem Einklonieren des Konstruktes in den pBEH-Vektor wurden BHK 21-Zellen stabil mit dem Plasmid transfiziert. Die Selektion erfolgte gegen Puromycin. Der für den Recycling-Assay ausgewählte Klon hatte einen LAP-Expressionslevel von 0,8 (relativ zur LAP-WT Expressionshöhe in BHK 21-Zellen, Bestimmung des Expressionslevels siehe Abschnitt 4.1.1).

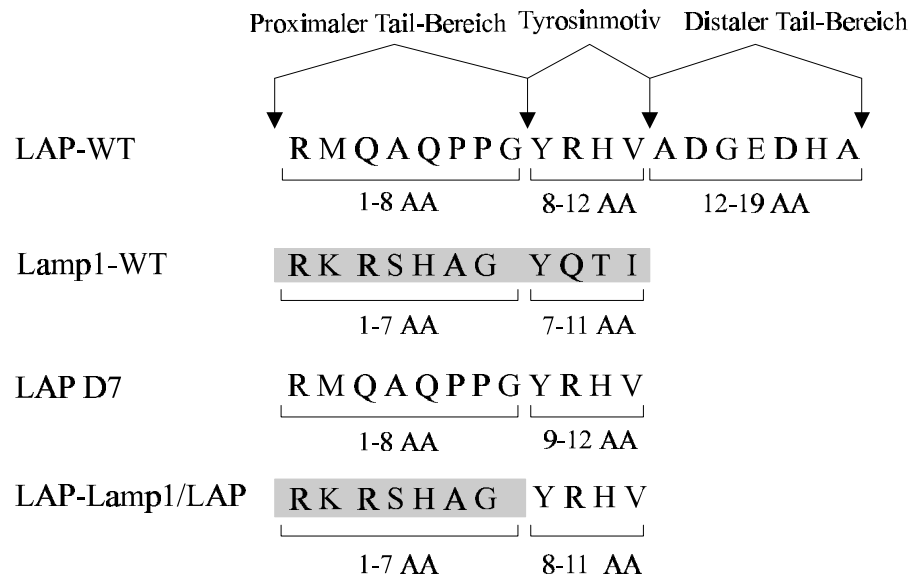


Abbildung 4.19: Aminosäuresequenz der Zytoplasmatischen Domäne von LAP-WT, Lamp1-WT, LAP D7 und LAP-Lamp1/LAP (Tail-Chimäre).

4.2.3.2 Recycling der Tail-Chimäre

Der Recycling-Assay wurde wie in 4.1.3 beschrieben mit der Tail-Chimäre durchgeführt. Die Abbildung 4.18 zeigt die auf dem Nitrozelluloseblot detektierte biotinylierte LAP-Fraktion der Proben 1b, 2b, 3b. Im Verlauf der 1. Reaktivierung wurde biotinylierte, plasmamembranständige Tail-Chimäre in die Zelle aufgenommen (Probe 2b) und konnte somit vor der anschließenden Glutathion/DTT-Behandlung geschützt werden. Während der 2. Reaktivierung rezyklierten 42 % dieser geschützten Fraktion aus den Endosomen zur Plasmamembran. Da der rezyklierte LAP-WT-Anteil im Recycling-Assay einen Wert von 47 % erreicht, rezykliert die Tail-Chimäre mit der selben Effizienz wie LAP-WT. Damit konnte gezeigt werden, daß der komplette proximale Bereich des LAP-Tails (AA 1-8) für die Vermittlung des Recyclingprozesses nicht benötigt wird. Die LAP rezyklierte obwohl der proximale LAP-Bereich durch den proximalen Lamp1-Bereich ersetzt wurde. Dieses Ergebnis zeigt, daß das LAP-Tyrosinmotiv für die Vermittlung des Recyclingprozesses ausreichend ist.

4.3 In vitro Untersuchungen zur Interaktion zwischen AP 1 und der zytoplasmatischen Domäne von LAP und Lamp1

Die *in vivo* Untersuchungen zum LAP-Recycling ergaben eine Eingrenzung der Recycling-vermittelnden Aminosäuresequenz auf das Tyrosinmotiv (Y-R-H-V) in der zytoplasmatischen LAP-Domäne. Das Tyrosinmotiv im Tail von Lamp1, mit der Aminosäuresequenz Y-Q-T-I, kann kein Recycling vermitteln. Die Lokalisierung des Recycling-vermittelnden Motivs deutet darauf hin, daß zytoplasmatische Sortierungsfaktoren an der Umsetzung dieser Sortierungsinformationen beteiligt sind. In den folgenden *in vitro* Experimenten soll der Frage nachgegangen werden, ob die Tyrosinmotive von LAP und Lamp1 ausreichend sein können, um eine Interaktion der zytoplasmatischen Domäne mit einer Sortierungskomponente zu vermitteln. Zu diesem Zweck wurde die *in vitro* Interaktion mit dem zytosolischen Sortierungsfaktor AP 1 untersucht. Die bisher publizierten *in vitro* Daten zeigen eine starke Interaktion des Lamp1-Tails mit AP 1 während AP 1 nicht an den LAP-Tail bindet (HÖNING et al. 1996, HÖNING et al. 1998). Der in den folgenden Interaktionsanalysen verwendete AP 1 wurde gemeinsam mit AP 2 aus Schweinehirn präpariert.

4.3.1 Präparation von AP1 und AP2

Die Durchführung der Adaptorpräparation ist in 3.2.4.3 ausführlich beschrieben. Aus 300 g Schweinehirn wurden durch fraktionierte Zentrifugation clathrinbeschichtete Vesikel isoliert. Durch anschließende Behandlung der Vesikel mit Hochsalzpuffer (0,5 M Tris pH 7,5) konnte ein Tris-Extrakt gewonnen werden, der die extrahierten, membran-assoziierten Vesikelproteine enthielt. Um die Adaptern anzureichern und von anderen extrahierten Vesikel-assoziierten Proteinen zu trennen, erfolgte eine Gelfiltrationschromatographie des Tris-Extraktes. Die Fraktionen der Gelfiltrationschromatographie wurden mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 4.20).

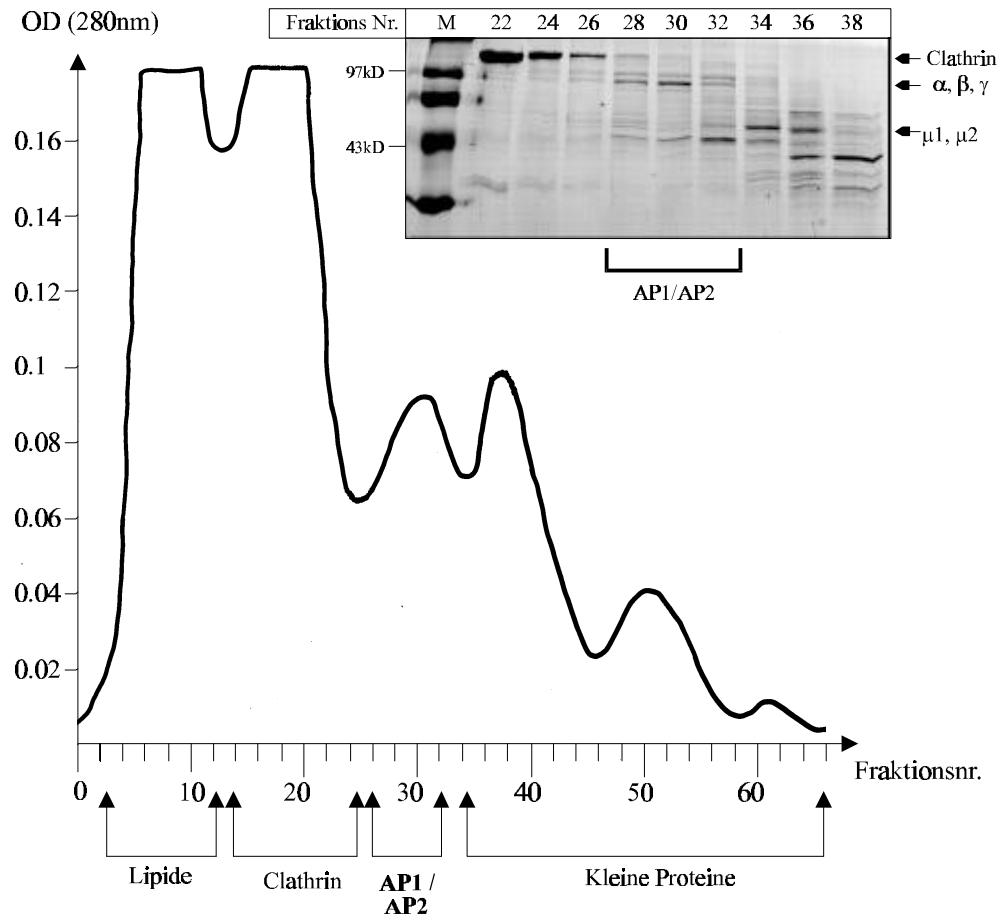


Abbildung 4.20: Gelfiltrationschromatographie zur Präparation von Adaptor-komplexen aus Tris-Extrakt. 5 ml Tris-Extrakt (2-3 mg/ml Gesamtprotein) wurden über eine Superose 6-Säule aufgetrennt. Die gesammelten Fraktionen hatten ein Volumen von 1,5 ml. Das Elutionsprofil zeigt die Änderung der optischen Dichte (o.D.₂₈₀) in Abhängigkeit von der Fraktionsnummer. Die Elution einiger Proteine wird durch Pfeile gekennzeichnet. 20 µl der angegebenen Fraktionen wurden in einem 10 %-igen, reduzierenden SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Die Pfeile am Gelrand markieren die schweren Clathrin-Ketten und die Untereinheiten der Adaptor-komplexe.

Der erste Peak des Elutionsprofils enthält Lipide und andere Verunreinigungen. Im zweiten Peak (Fraktion 22-26) eluierte Clathrin, dessen schwere Ketten (180 kD) im SDS-Gel angefärbt wurden. Der folgende Peak umfaßt die Fraktionen 27-30. In diesen Fraktionen konnten die α -, β -, und γ -Untereinheiten (100 kD) sowie die μ 1- und μ 2-Untereinheiten (47 kD und 50 kD) der AP1- und AP2-Komplexe angefärbt werden. Der letzte Peak und die darauf folgenden Fraktionen enthielten ein Gemisch niedermolekularer, nicht näher charakterisierter Proteine (kleine Proteine).

Da AP1 und AP2 ein nahezu identisches Molekulargewicht haben, war eine weitere Auftrennung erforderlich, um die beiden Komplexe voneinander zu trennen. Hierzu wurden die Fraktionen 27-32 vereinigt (AP-Pool) und auf eine Hydroxyapatitsäule aufgetragen. Anschließend wurde mit einem K_2HPO_4 -Gradienten zuerst AP 1 und dann AP 2 eluiert.

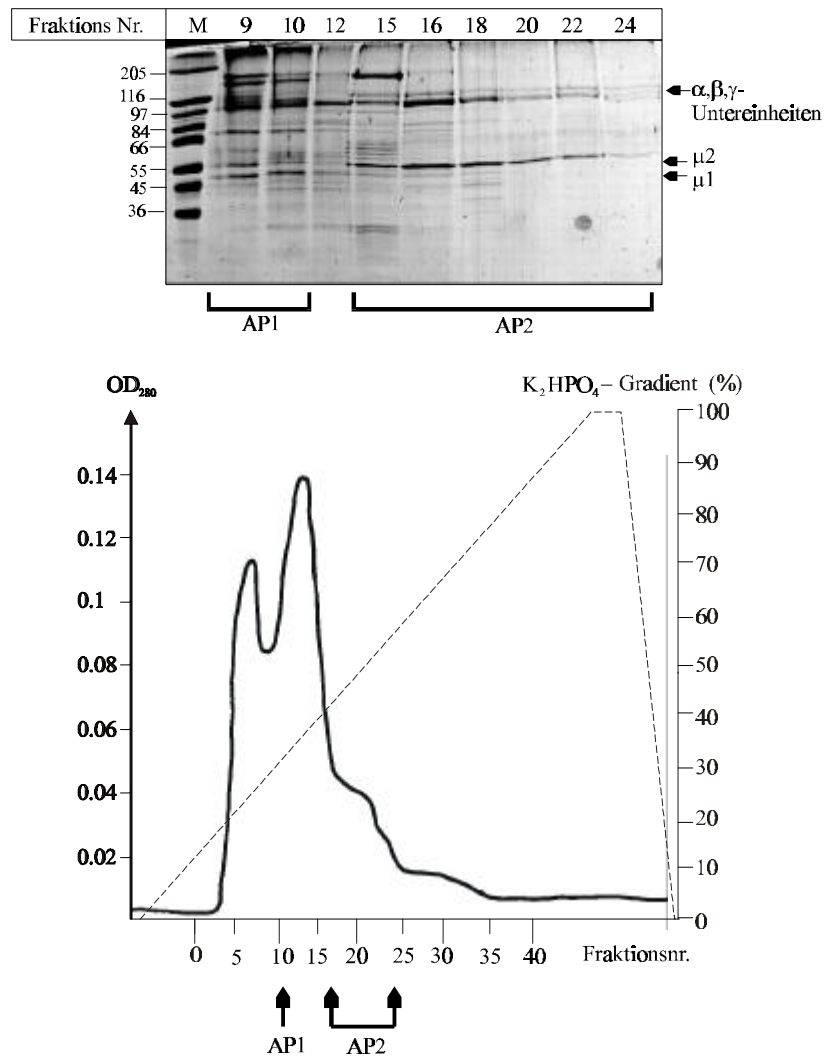


Abbildung 4.21: Hydroxyapatit-Chromatographie zur Adaptorpräparation. 10-12 ml AP-Pool (Proteinkonz. 0,2mg/ml) wurden auf eine HA-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 10 mM bis 500 mM K₂HPO₄. Während der Elution wurden Fraktionen mit einem Volumen von 1 ml gesammelt. Im unteren Teil der Abbildung ist das Elutionsprofil dargestellt, wobei der Salzgradient durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet ist. Auf der X-Achse sind die Fraktionsnummern aufgetragen. Auf der linken Y-Achse ist die Änderung der optischen Dichte (OD₂₈₀) dargestellt und auf der rechten Y-Achse der Salzgradient. Die Pfeile markieren die AP 1 bzw. AP 2 enthaltenden Fraktionen. Über dem Elutionsprofil befindet sich das analytische SDS-Gel. Von den angegebenen Fraktionen wurden 90 μ l mit 10 %-iger TCA gefällt, in einem 10 %-igen, reduzierenden SDS-Gel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Die Pfeile am rechten Gelrand markieren die Untereinheiten des AP 1-sowie AP 2-Komplexes.

Die μ 2-Untereinheit wird im SDS-Gel entsprechend seinem apparenten Molekulargewicht von ca. 50 kD aufgetrennt, während μ 1 ein apparentes Molekulargewicht von 47 kD besitzt (siehe Abbildung 4.21). Um eine Kontamination von AP 1-haltigen Fraktionen mit AP 2, bzw. eine Kontamination von AP 2-haltigen Fraktionen mit AP 1 auszuschließen, wurde eine Westernblotanalyse durchgeführt. Die AP 1- und AP2-haltigen Proben wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert. Anschließend erfolgte die Immunodetektion mit einem monoklonalen Antikörper gegen die γ - und die α -Untereinheit.

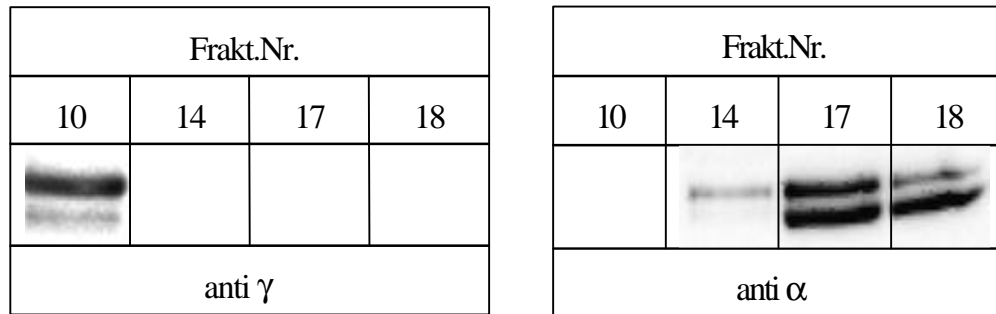


Abbildung 4.22: Westernblotanalyse von Fraktionen der HA-Chromatographie. Von den Fraktionen 10, 14, 17 und 18 wurden 2 x 100 μ l Probenvolumen nach der Methode von Wessel und Flügge gefällt, in einer SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Für die Immunodetektion wurden monoklonale Antikörper (Sigma) gegen die γ - und die α -Untereinheit in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt.

Die Westernblotanalyse mit dem Antikörper gegen die γ -Untereinheit zeigt, daß lediglich in Fraktion 10 ein AP 1-Signal detektierbar ist. Die Immunodetektion mit dem Antikörper gegen die α -Untereinheit zeigt ermittelt ein schwaches AP 2-Signal in Fraktion 14 sowie ein starkes AP 2-Signal in den Fraktionen 17 und 18. Diese Analyse zeigt, daß in AP 1-haltigen Fraktionen 9 und 10 kein AP 2 nachzuweisen ist, und daß in AP 2-haltigen Fraktionen kein AP 1 detektiert werden kann. Damit kann ausgeschlossen werden, daß die folgenden Interaktionsmessungen durch eine Kompetition der AP-Komplexe beeinflusst werden.

4.3.2 *In vitro* Interaktion zwischen AP 1 und den zytoplasmatischen Domänen von LAP-WT bzw. Lamp1-WT

Zunächst wurde die *in vitro* Interaktion zwischen dem Adaptorkomplexen und synthetisierten zytoplasmatischen Tailpeptiden von LAP-WT und Lamp1-WT (siehe Abbildung 4.23) untersucht. Für diese Interaktionsanalysen eignet sich der Biosensor (Typ BIAcore 2000), da er die Möglichkeit bietet, die Affinität zwischen den Adaptorkomplexen und den Tailpeptiden schnell und unter Verwendung geringer Probenmengen zu bestimmen.

4.3.2.1 Struktur der Tailpeptide

Der zytoplasmatischen Domänen von LAP und Lamp1 haben eine ähnliche Struktur. Beide enthalten ein Tyrosinmotiv vom Y-X-X- \emptyset -Typ, wobei X für eine beliebige Aminosäure und \emptyset für eine Aminosäure mit einer großen hydrophoben Seitenkette steht (Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Methionin oder Valin). Das Tyrosinmotiv beider Proteine wird durch eine kurze proximale Sequenz von der Transmembranregion getrennt. Der Lamp1-Tail endet direkt hinter dem Tyrosinmotiv, während sich dem LAP-Tyrosinmotiv ein distaler Bereich von 7 Aminosäuren anschließt.

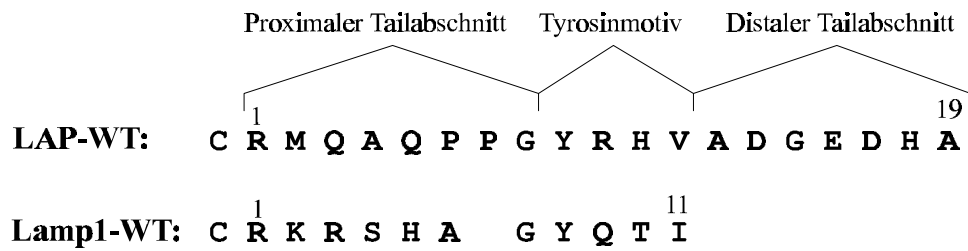


Abbildung 4.23: Sequenz der synthetisierten LAP-WT und Lamp1-WT Tailpeptide. Die Sequenz der beiden Tailpeptide ist im Einbuchstabencode angegeben. Die Numerierung beginnt mit der ersten zytosolischen Aminosäure und endet mit der C-terminalen Aminosäure des Tails. An den Aminoterminus schließt sich ein zusätzlich eingefügtes Cystein an, das für die Kopplung an den Sensorchip benötigt wird (siehe 4.3.2.2).

4.3.2.2 Kopplung der LAP- und Lamp1-Tailpeptide an den Sensorchip

Die Interaktionsanalyse mit dem Biosensor erfordert eine kovalente Kopplung der Peptide an einen Sensorchip. Der gesamte Kopplungsvorgang wird als Sensorgramm verfolgt (siehe Abbildung 4.24).

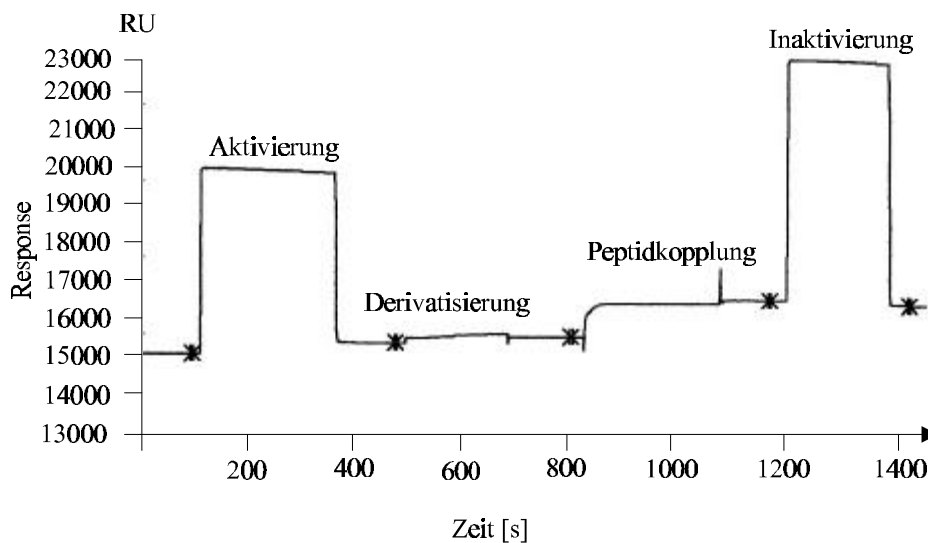


Abbildung 4.24: Kopplung des LAP-WT und Lamp1-WT Tailpeptides an den Sensorchip CM5. Für die Kopplung des Peptids mußten zunächst die Carboxylgruppen der Sensorchipoberfläche durch die Injektion von NHS/EDC aktiviert werden. Nach der Derivatisierung der aktivierten Carboxylgruppen mit PDEA erfolgte die Injektion der Peptidlösung. Die Kopplung erfolgte über einen zusätzlich eingefügten, N-terminalen Cysteinrest. Die abschließende Deaktivierung freier Bindungsstellen der Chipoberfläche erfolgte durch die Injektion von L-Cysteinlösung. Die X-Achse des abgebildeten Sensorgrammes zeigt den zeitlichen Verlauf der Kopplungsreaktion und die Y-Achse gibt die Änderung des SPR-Signales an.

Die Kopplung aller Peptide, die in den folgenden Interaktionsanalysen eingesetzt wurden, erfolgte analog. Es wurde darauf geachtet, von allen Peptiden ähnliche Mengen zu immobilisieren.

4.3.2.3 Bindung von AP 1 und AP 2 an LAP bzw. Lamp1

Zunächst wurde die Bindung zwischen den Adaptorkomplexen und dem LAP-WT bzw. Lamp1-WT Tailpeptiden mit Hilfe des BIAcore 2000 gemessen. Die Assoziationsphase entspricht dem Zeitraum, in dem der adaptorhaltige Puffer über die Sensorchipoberfläche injiziert wird. Anschließend wird die Adaptorlösung durch Laufpuffer ersetzt. Diese Phase, in deren Verlauf sich die Adaptoren von dem Peptid lösen können, entspricht der Dissoziationsphase. Anschließend werden alle assoziierten Adaptoren mit SDS/NaOH entfernt, um die Sensorchipoberfläche für einen erneuten Versuch zu regenerieren.

Die Auswertung der Messung erfolgte durch das BIAcore-Evaluierungsprogramm 2.1 anhand eines Sensorgramms. In diesem Sensorgramm wird die Änderung des SRP-Signals in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen (siehe Abbildung 4.25). Durch die Bindung injizierter Adaptorkomplexe an das gekoppelte Tailpeptid verändert sich die Massenkonzentration auf der Chipoberfläche. Diese Änderung ist im Sensorgramm als Funktion der Zeit dargestellt. Somit läßt sich mit dem Sensorgramm die Interaktion zwischen den Adaptorkomplexen und den Tailpeptiden in „Echtzeit“ verfolgen.

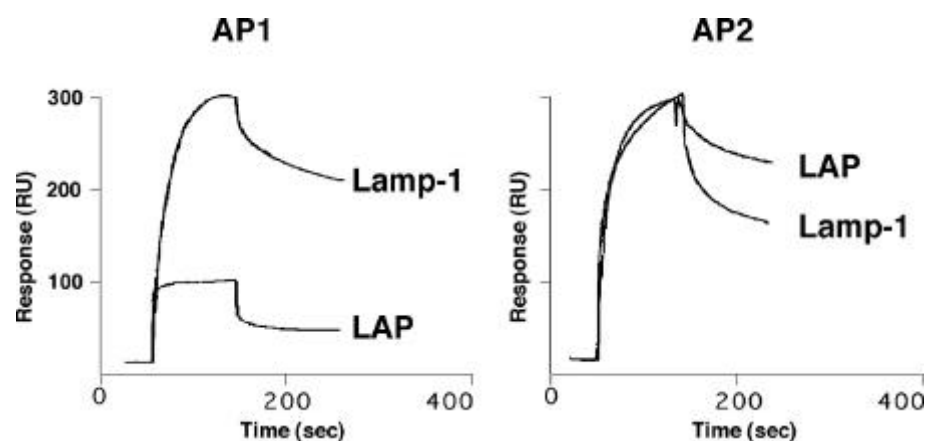


Abbildung 4.25: Sensorgramm der Interaktion zwischen den Adaptorkomplexen (AP 1, AP 2) und LAP oder Lamp1. Um die Bindung von AP 1 und AP 2 an verschiedene Tailpeptide zu messen, wurden AP 1- bzw. AP 2-Lösung injiziert. Nach einer 2-minütigen Assoziationsphase erfolgte eine 2-minütige Dissoziationsphase. Auf der X-Achse des abgebildeten Sensorgrammes ist der zeitliche Verlauf der Messung aufgetragen, während die Y-Achse die Änderung des SRP-Signals darstellt.

Um die Stärke einer der Bindungen vergleichen zu können, wurden mit Hilfe des BIAcore-Evaluierungsprogrammes die jeweiligen Gleichgewichtskonstanten (K_D) aus der Assoziationskonstante (k_a) und der Dissoziationskonstante (k_d) berechnet.

Die Biosensoranalysen ergeben, daß der AP2-Komplex an das LAP- und das Lamp1 Peptid bindet (siehe Tabelle 4.3).

Tailpeptid	Aminosäuresequenz	AP 1			AP 2		
		k_a [1/M x s]	k_d [1/s]	$K_D =$ k_a/k_d [nM]	k_a [1/M x s]	k_d [1/s]	$K_D =$ k_a/k_d [nM]
LAP-WT	CRMQAQPPG YR HVADGEDHA	n.d.	n.d.	n.d.	$1,0 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^{-3}$	27
Lamp1-WT	CRKRSHA GYQTI	$1,1 \cdot 10^5$	$4,2 \cdot 10^{-3}$	38	$5,7 \cdot 10^4$	$3,1 \cdot 10^{-3}$	54

Tabelle 4.3: Reaktionskonstanten für die Interaktion zwischen AP 1 und AP 2 mit LAP-WT bzw. Lamp1-WT. Das Tyrosinmotiv der Tailsequenzen wird durch dicke Buchstaben hervorgehoben. Die Gleichgewichtskonstanten ergeben sich aus den Auswertungen des Sensorgrammes in Abbildung 4.24.

Dieses Ergebnis war zu erwarten, da LAP und Lamp1 an der Plasmamembran einer schnellen Endozytose unterliegen, die durch die Interaktion ihrer zytoplasmatischen Domänen mit dem AP 2-Komplex vermittelt wird (SOSA et al. 1993 und HÖNING et al. 1996). Durch diese Kontrolle wurde sichergestellt, daß die Versuchsbedingungen eine Interaktion zwischen den gekoppelten Tailpeptiden und einem zytoplasmatischen Sortierungsfaktor erlauben.

Die BIAcore Daten zeigen, daß AP 1 nur an den Lamp1-Tail bindet. Eine Bindung des AP 1-Komplexes an den LAP-Tail konnte nicht detektiert werden.

4.3.2.4 Bedeutung des distalen LAP-Tail-Bereiches für die Adaptorinteraktion

Durch die 7 Aminosäuren lange Sequenz distal vom Tyrosinmotiv, befindet sich das Tyrosinmotiv der LAP nicht am Ende (wie bei Lamp1), sondern in der Mitte der zytoplasmatischen Domäne.

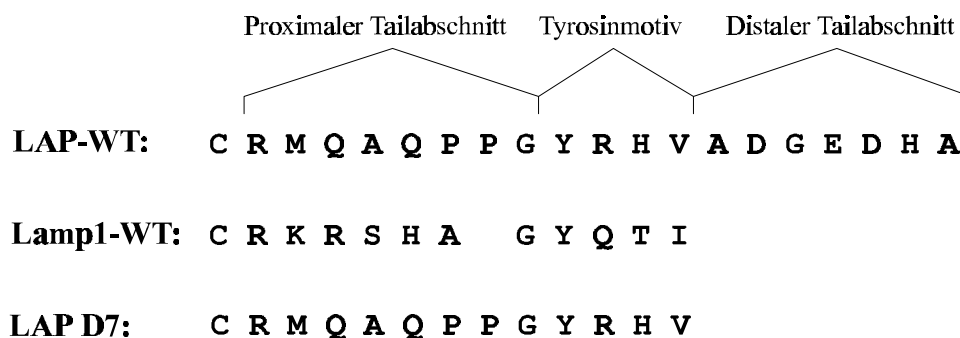


Abbildung 4.26: Sequenz der LAP-WT, Lamp1-WT und LAP D7 Tailpeptide. Die Sequenz der Tailpeptide ist im Einbuchstabencode angegeben. Dem LAP D7 Tailpeptid fehlt der distale Tailbereich, wodurch die Länge des Tails auf 12 Aminosäuren reduziert wird.

Um zu überprüfen, ob der distale Tailbereich der LAP einen Einfluß auf die Interaktion mit den Adaptoren hat, wurde die Interaktion der Adaptorkomplexe mit dem Tailpeptid LAP D7 gemessen.

Tailpeptid	Aminosäuresequenz	AP 1			AP 2		
		k_a [1/M x s]	k_d [1/s]	$K_D =$ k_a/k_d [nM]	k_a [1/M x s]	k_d [1/s]	$K_D =$ k_a/k_d [nM]
LAP-WT	CRMQAQPPG YR HVADGEDHA	n.d.	n.d.	n.d.	$1,0 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^{-3}$	27
LAP D7	CRMQAQPPG YR HV	n.d.	n.d.	n.d.	$1,4 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^{-3}$	22

Tabelle 4.4: Reaktionskonstanten für die Interaktion zwischen AP 1 und LAP-WT bzw. LAP D7. Die Sequenzen der Peptide sind im Einbuchstabencode angegeben. Das Tyrosinmotiv wird durch dicker Buchstaben hervorgehoben und der distale Tailbereich, der im LAP D7 Peptid deletiert wurde, ist unterstrichen.

Die Deletion des distalen LAP-Tailbereiches hat keine Abschwächung der AP 2-Bindung zur Folge (siehe Tabelle 4.4). Außerdem kann auch nach der Deletion des distalen LAP-Tailbereiches keine Bindung mit dem AP 1-Komplex detektiert werden. Folglich hat der distale LAP-Tailbereich keinen Einfluß auf die Interaktion des LAP-Tails mit den Adaptorkomplexen.

4.3.2.5 Bedeutung des LAP- und Lamp1-Tyrosinmotives für die Interaktion mit AP 1

Da der distale Bereich des LAP-Tails keinen Einfluß auf die Interaktion mit den Adaptor-komplexen hat, kann das LAP D7 Tailpeptid für die folgenden Interaktionsanalysen eingesetzt werden. Offensichtlich verfügt die zytoplasmatische Domäne von Lamp1 im Gegensatz zur zytoplasmatischen LAP-Domäne über ein Sequenzmotiv, das für eine *in vitro* Interaktion mit AP 1 notwendig ist. Um zu überprüfen, ob dieser Sequenzbereich auf den proximalen Tailabschnitt oder das Tyrosinmotiv eingegrenzt werden kann, wurden zwei chimäre Tailpeptide synthetisiert (siehe Abbildung 4.27) und hinsichtlich ihrer Bindung an AP 1 überprüft (siehe Tabelle 4.5).

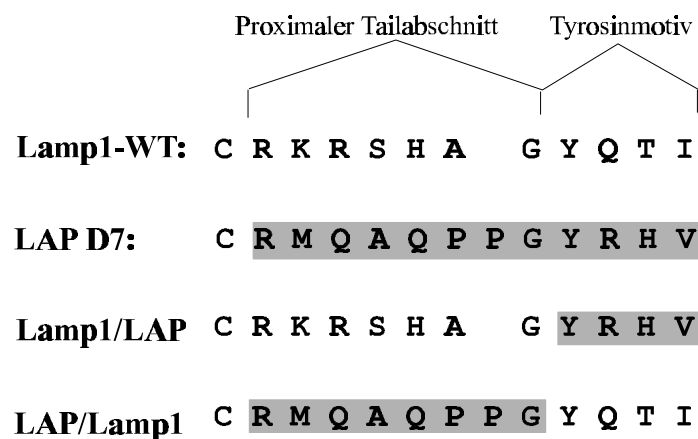


Abbildung 4.27: Sequenz der chimären Tailpeptide. Die Aminosäuresequenz der Tailpeptide ist im Einbuchstabencode angegeben, wobei die LAP-Sequenzen grau unterlegt sind. In der Nomenklatur der Peptide stammt der proximale Bereich aus dem Protein vor dem Querstrich, während das Tyrosinmotiv aus dem Protein hinter dem Querstrich stammt. Die beiden chimären Tailpeptide setzen sich aus dem proximalen Lamp1-Bereich und dem LAP-Tyrosinmotiv (Lamp1/LAP) oder dem proximalen LAP-Tailbereich und dem Lamp1-Tyrosinmotiv (LAP/Lamp1) zusammen.

Peptid	Aminosäuresequenz	AP 1		
		k_a 1/M x s]	k_d [1/s]	$K_D =$ k_a/k_d [nM]
LAP D7	CRMQAQPPGYRHV	n.d.	n.d.	n.d.
Lamp1-WT	CRKRSHA GYQTI	$1,1 \cdot 10^5$	$4,2 \cdot 10^{-3}$	38
LAP/Lamp1	CRMQAQPPG GYQTI	$5,4 \cdot 10^4$	$6,7 \cdot 10^{-3}$	124
Lamp1/LAP	CRKRSHA GYRHV	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 4.5: Reaktionskonstanten für die Interaktion zwischen AP 1 und den chimären Tailpeptiden. Die Sequenzen der Peptide sind im Einbuchstabencode angegeben, wobei die LAP-Tailbereiche grau unterlegt und die Tyrosinsignale durch fette Buchstaben hervorgehoben sind.

Wenn das Tyrosinmotiv des Lamp1-Tails gegen das des LAP-Tails ausgetauscht wird, verliert der Lamp1/LAP-Tail die Fähigkeit mit AP 1 zu interagieren. Die Gleichgewichtskonstanten in Tabelle 4.5 zeigen, daß das Lamp1/LAP Tailpeptid ebenso wenig AP 1 bindet, wie das LAP-WT Tailpeptid. Folglich ist das Lamp1-Tyrosinmotiv für eine *in vitro* Interaktion mit AP 1 notwendig. Wird hingegen das LAP-Tyrosinmotiv gegen das Lamp1-Tyrosinmotiv ausgetauscht, so zeigt das chimäre Tailpeptid (LAP/Lamp1) eine starke Affinität zu AP 1, die ca. einem Drittel der Lamp1-WT Affinität zu AP 1 entspricht. Trotz dieser Differenz zeigt dieses Ergebnis, daß das Tyrosinmotiv von Lamp1 nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend für die AP 1-Bindung ist.

4.3.3 Analyse des Tyrosinmotivs von Lamp1

Die bisherigen Interaktionsanalysen dieser Arbeit ergaben, daß das Tyrosinmotiv von Lamp1 die Bindung an den AP 1-Komplex vermittelt. Das LAP-Tyrosinmotiv kann keine *in vitro* Interaktion mit AP 1 vermitteln. In den folgenden Experimenten sollen die einzelnen Aminosäuren des Lamp1-Tyrosinmotives identifiziert werden, die für die AP 1-Bindung verantwortlich sind.

Durch Permutation des Lamp1-Tyrosinmotives zu einem LAP-Tyrosinmotiv, soll die minimale Sequenzinformation des Lamp1-Tyrosinmotives ermittelt werden, die nötig ist, um eine *in vitro* Interaktion mit dem AP 1-Komplex zu vermitteln. Das heißt, daß im Lamp1-Tyrosinmotiv die einzelnen Aminosäuren gegen die entsprechenden Aminosäuren des LAP-Tyrosinmotives ausgetauscht werden (siehe Abbildung 4.28).

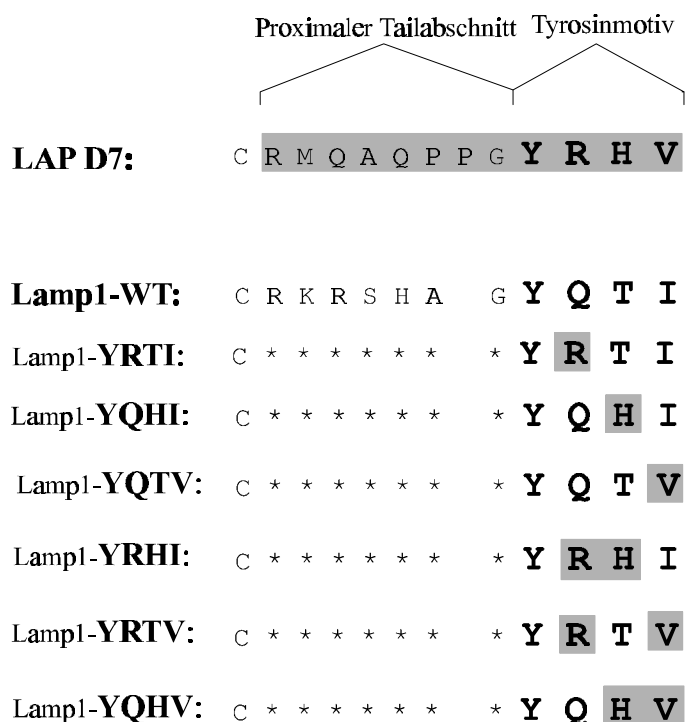


Abbildung 4.28: Sequenz der Lamp1 Tailpeptide mit permutiertem Tyrosinmotiv. Die Aminosäuresequenz der Tailpeptide ist im Einbuchstabencode angegeben, wobei die Aminosäuren von LAP grau unterlegt sind. Der proximale Tailbereich der Tailpeptide mit permutiertem Tyrosinmotiv stammt aus Lamp1, was in der Nomenklatur durch das Protein (Lamp1) vor dem Querstrich gekennzeichnet wird. Die Aminosäuren der Tyrosinmotive sind sowohl in der Nomenklatur (hinter dem Querstrich), wie auch in der Peptidsequenz durch große, fette Buchstaben hervorgehoben. Die Sternchen in den Sequenzen der permutierten Peptide symbolisieren die Aminosäuren des proximalen Lamp1-Tailbereiches.

Peptid	k_a [1/M x s]	AP 1		
		k_d [1/s]	$K_D = k_a/k_d$ [nM]	Reihenfolge der Affinitäten
LAP D7	n.d.	n.d.	n.d.	8
Lamp1 WT	$1,1 \cdot 10^5$	$4,2 \cdot 10^{-3}$	38	1
Lamp1- YRTI	$4,7 \cdot 10^4$	$3,7 \cdot 10^{-3}$	78	2
Lamp1- YQHI	$9,4 \cdot 10^3$	$3,9 \cdot 10^{-3}$	414	5
Lamp1- YQTV	$3,3 \cdot 10^4$	$3,4 \cdot 10^{-3}$	101	4
Lamp1- YRHI	$4,9 \cdot 10^3$	$3,7 \cdot 10^{-3}$	756	6
Lamp1- YRTV	$4,2 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^{-3}$	93	3
Lamp1- YQHV	$5,6 \cdot 10^2$	$4,7 \cdot 10^{-3}$	8400	7

Tabelle 4.6: Reaktionskonstanten der Interaktion von AP 1 mit Lamp1 Tailpeptiden, die ein permutiertes Tyrosinmotiv enthalten. Die Aminosäuren der permutierten Tyrosinmotive werden durch große, fette Buchstaben hervorgehoben. Alle Aminosäuren der LAP sind grau unterlegt. Der proximale Bereich der permutierten Peptide stammt aus

Lamp1 (in der Nomenklatur vor dem Querstrich), während die Tyrosinmotive durch Substitution einzelner Aminosäuren des Lamp1-Tyrosinmotives durch die entsprechenden Aminosäuren des LAP-Tyrosinmotives konstruiert wurden.

In der Tabelle 4.6 sind die Gleichgewichtskonstanten zusammengefaßt, die sich aus den Interaktionsanalysen zwischen AP 1 und den permutierten Lamp1 Tailpeptiden ergeben. Die Gleichgewichtskonstanten zeigen, daß jeder Austausch einer Aminosäure des Lamp1-Tyrosinmotives gegen die entsprechende Aminosäure des LAP-Tyrosinmotives, die Bindung zum AP 1-Komplex abschwächt. Folglich ist jede Aminosäure des Lamp1 Tyrosinmotivs an der starken *in vitro* Bindung zum AP 1-Komplex beteiligt.

Dennoch unterscheidet sich der Einfluß auf die Bindungsstärke je nach ausgetauschter Aminosäure. Aus dem Vergleich der Gleichgewichtskonstanten geht hervor, daß nach dem Austausch des Glutamins (YQTI→YRTI) bzw. Isoleucins (YQTI→YQTV) noch eine Bindung mittlerer Stärke zwischen dem AP 1 und den mutierten Peptiden stattfinden kann ($K_D=78$ bzw. 101 nM). Dahingegen führt der Austausch des Threonins gegen Histidin (YQTI→YQHI) zu einer starken Abschwächung der Bindung ($K_D=414$ nM). Folglich hat das Threonin, bei Austausch einer einzelnen Aminosäure, einen größeren Einfluß auf die AP 1-Bindung als Glutamin und Isoleucin.

Dieses Ergebnis wird zusätzlich noch durch die Tatsache bestätigt, daß trotz des gemeinsamen Austausches von Glutamin und Isoleucin (YQTI→YRTV) noch eine AP 1-Bindung mittlerer Stärke vorliegt ($K_D=93$ nM). Ein fast vollständiger Affinitätsverlust zum AP 1-Komplex kann nur erreicht werden, wenn das Threonin gemeinsam mit einer zweiten Aminosäure des Tyrosinmotivs ausgetauscht wird. Wobei der Austausch von Threonin und Isoleucin (YQTI→YQHV) zu noch einem drastischeren Affinitätsverlust ($K_D=8400$) führt, als der Austausch von Threonin und Glutamin (YQTI→YRHI) ($K_D=756$).

4.3.4 Analyse des Tyrosinmotivs von LAP

Die bisherigen Interaktionsanalysen ergaben, daß das Threonin des Lamp1-Tyrosinmotives, im Vergleich zu Glutamin und Isoleucin, den größeren Einfluß auf die AP 1-Bindung hat. In den weiteren Untersuchungen sollen diese Ergebnisse kontrolliert werden, indem die minimale Sequenzinformation des Lamp1-Tyrosinmotives ermittelt wird, die auf den LAP-Tail übertragen werden muß, um eine *in vitro* Interaktion mit dem AP 1-Komplex zu vermitteln. Zu diesem Zweck erfolgte die Permutation des LAP-Tyrosinmotives zu einem Lamp1-Tyrosinmotiv, in dem die einzelnen Aminosäuren des LAP-Tyrosinmotives gegen die entsprechenden Aminosäuren des Lamp1-Tyrosinmotives ausgetauscht werden (siehe Abbildung 4.29).

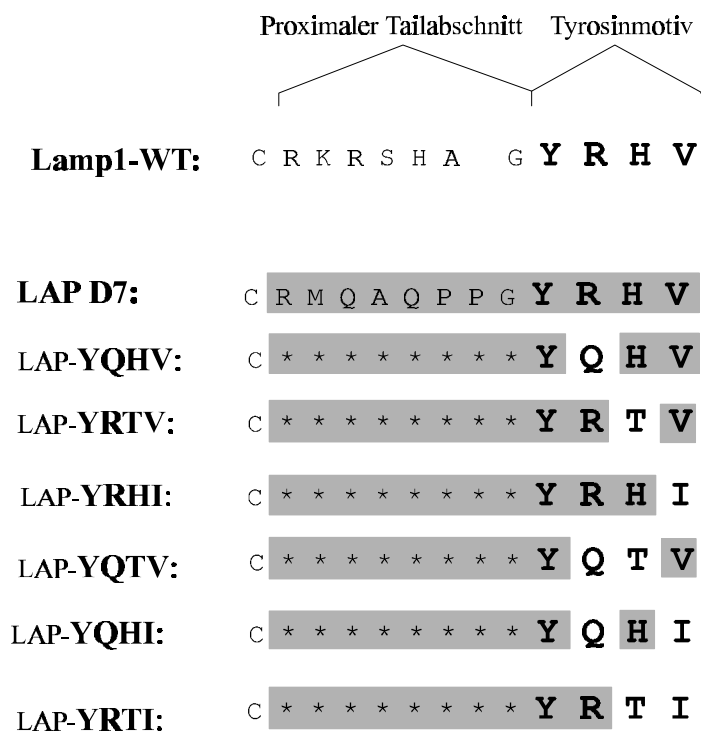


Abbildung 4.29: Sequenz der LAP Tailpeptide mit permutiertem Tyrosinmotiv. Die Aminosäuresequenz der Tailpeptide ist im Einbuchstabencode angegeben, wobei die Aminosäuren von LAP grau unterlegt sind. Der proximale Tailbereich der Tailpeptide mit permutiertem Tyrosinmotiv stammt aus LAP, was in der Nomenklatur durch das Protein (LAP) vor dem Querstrich gekennzeichnet wird. Die Aminosäuren der Tyrosinmotive sind sowohl in der Nomenklatur (hinter dem Querstrich) wie auch in der Peptidsequenz durch große, fette Buchstaben hervorgehoben. Die Sternchen in den Sequenzen der permutierten Peptide symbolisieren die Aminosäuren des proximalen LAP-Tailbereiches

Peptid	k_a [1/M x s]	AP 1		
		k_d [1/s]	$K_D = k_a/k_d$ [nM]	Reihenfolge der Affinitäten
Lamp1 WT	$1,1 \cdot 10^5$	$4,2 \cdot 10^{-3}$	38	1
LAP D7	n.d.	n.d.	n.d.	7
LAP-YQHV	n.d.	n.d.	n.d.	7
LAP-YRTV	$5,8 \cdot 10^4$	$4,7 \cdot 10^{-3}$	81	2
LAP-YRHI	$8,3 \cdot 10^3$	$5,2 \cdot 10^{-3}$	624	6
LAP-YQTV	$2,9 \cdot 10^4$	$3,7 \cdot 10^{-3}$	124	4
LAP-YQHI	$1,3 \cdot 10^4$	$4,1 \cdot 10^{-3}$	321	5
LAP-YRTI	$2,9 \cdot 10^4$	$2,9 \cdot 10^{-3}$	99	3

Abbildung 4.7: Reaktionskonstanten der Interaktion von AP 1 und LAP Tailpeptiden mit permutiertem Tyrosinmotiv. Alle Aminosäuren der LAP sind grau unterlegt. Die Aminosäuren der Tyrosinmotive werden durch große, fette (in der Nomenklatur vor dem Querstrich), während die Tyrosinmotive durch Substitution einzelner Aminosäuren des LAP-Tyrosinmotives durch die entsprechenden Aminosäuren des Lamp1-Tyrosinmotives konstruiert wurden.

In der Tabelle 4.7 sind die Gleichgewichtskonstanten zusammengefaßt, die sich aus den Interaktionsanalysen zwischen AP 1 und den permutierten LAP Tailpeptiden ergeben. Der Austausch von Arginin gegen Glutamin (YRHV→YQH^V) hat keinen Einfluß auf die Interaktion mit AP , und der Austausch von Valin gegen Isoleucin (YRHV→YRHI) führt nur zu einer schwachen AP 1-Bindung ($K_D=624$). Dagegen resultiert der Austausch von Histidin gegen Threonin (YRHV→YRT^V) in einer AP 1-Bindung, die halb so stark wie die AP 1-Bindung von Lamp1-WT ist ($K_D =81$). Diese Interaktionsanalysen bestätigen, daß das Threonin des Lamp1-Tyrosinsignales für eine starke AP 1-Bindung notwendig und ausreichend ist und einen größeren Einfluß als Glutamin und Isoleucin auf diese Bindung hat.

4.4 Einfluß des AP 1-Komplexes auf das Recycling der LAP

In der bisherigen Arbeit wurde das recycling-vermittelnde Signal der LAP auf das im Tail lokalisierte Tyrosinmotiv eingegrenzt. Für eine weitere Charakterisierung des Recyclings ergab sich die Frage nach den zytoplasmatischen Sortierungsfaktoren, die für die Umsetzung dieser Sortierungsinformation verantwortlich sind.

4.4.1 LAP-Recycling in μ 1-defizienten embryonalen Mausfibroblasten

Zu diesem Zweck sollte untersucht werden, ob der AP 1-Komplex als ein Bestandteil der zellulären Transportmaschinerie, in das LAP-Recycling involviert ist. Die Basis für den folgenden Teil der Arbeit bildeten mit humaner Wildtyp LAP cDNA stabil transfizierte, μ 1-defiziente embryonale Mausfibroblasten. In den μ 1-defizienten embryonalen Mausfibroblasten (μ 1-MEF) liegt ein trimere AP 1-Komplex vor, der sich aus der β 1-, γ - und σ 1-Untereinheit zusammensetzt (laborinterne Information, P. Schu/Biochemie II, Göttingen). Dieser trimere Komplex kann folglich nicht über seine μ 1-Untereinheit mit dem recycling-vermittelnden Tyrosinmotiv des LAP-Tails interagieren. Um den Einfluß der μ 1-Defizienz auf den LAP-Recycling-Prozeß zu überprüfen, wurde der in 4.1.3 beschriebene Recycling-Assay mit den transfizierten Zellen durchgeführt. Die Abbildung 4.30 zeigt, daß während der 2. Rekultivierung 42 % der internalisierten LAP zur Plasmamembran rezyklisieren konnten. Ein Vergleich mit LAP-WT exprimierenden Zellen, in denen der rezyklierte LAP-Anteil einen Wert von 47 % erreicht zeigt, daß der Recycling-Prozeß in den MEF-Zellen trotz der μ 1-Defizienz abläuft. Folglich hat die μ 1-Defizienz unter den Bedingungen des Recycling-Assays keinen detektierbaren Einfluß auf das LAP-Recycling.

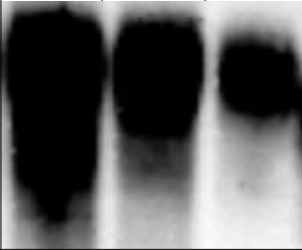
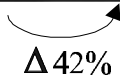
Proben	1b	2b	3b
NHS-SS-Biotin 30 min, 4 °C	+	+	+
1. Rekultivierung 10 min, 37 °C + GSH/DTT-Behandlung	—	+	+
2. Rekultivierung 10 min, 37 °C + GSH/DTT-Behandlung	—	—	+
LAP-WT			
Rezyklierte LAP	 Δ 42%		

Abbildung 4.30: Recycling-Assay mit $\mu 1$ -defizienten Mausfibroblasten. Durchführung des Recycling-Assays sowie die Probenaufarbeitung und Quantifizierung der Proben erfolgte wie unter der **Abbildung 4.6** beschrieben. Der angegebene prozentuale Wert gibt die Größe der rezyklierten LAP-Fraktion in Relation zur internalisierten LAP-Fraktion wieder.

5 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum Recycling der LAP durchgeführt. Diese *in vivo* Experimente beruhen auf der Anwendung des Neuraminidase- und Recycling-Assays. Deshalb werden diese beiden experimentellen Systeme zunächst einer kritischen Betrachtung unterzogen.

5.1 Kritische Anmerkungen zum experimentellen System

5.1.1 Auswertung des Neuraminidase-Assays

Mit Hilfe des Neuraminidase-Assays wurde in der vorliegenden Arbeit der Austausch zwischen endosomaler und plasmamembranständiger LAP untersucht. Im Verlauf des Assays erfolgte die Inkubation von Zellen mit neuraminidasehaltigem Medium bei 37 °C. Endosomale LAP rezykliert während der Inkubation zur Plasmamembran. Die Zuckerseitenketten der plasmamembranständigen LAP werden durch das Enzym Neuraminidase desialyliert. Endosomale LAP, die nicht zur Plasmamembran transportiert wird, ist vor der Prozessierung durch die Neuraminidase im Medium geschützt. Da die Desialylierung mit dem Verlust negativer Ladungen verbunden ist, kann der desialylierte LAP-Anteil mit Hilfe der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) detektiert werden.

Die LAP ist ein heterogen sialyliertes Protein. Die komplett sialylierte LAP besitzt einen Isoelektrischen Punkt (IEP) von 5,1. Die weiteren LAP-Formen sind nur partiell sialyliert und fokussieren folglich in einem basischeren pH-Bereich zwischen 5,2 und 5,6 (siehe Abbildung 4.2). Im Rahmen eines Vorversuches zum Neuraminidase-Assay wurde immunpräzipitierte LAP einer *in vitro* Behandlung mit Neuraminidase unterzogen. Durch Desialylierung konnte der IEP der LAP in den pH-Bereich zwischen 5,8 und 6,2 verschoben werden (siehe Abbildung 4.2). Im Verlauf der *in vivo* Neuraminidasebehandlung von Wildtyp LAP bei 37 °C wird der IEP der LAP ebenfalls in den pH-Bereich zwischen 5,8 und 6,2 verschoben (siehe Abbildung 4.4). Unter diesen *in vivo* Bedingungen erfolgt die Desialylierung jedoch schrittweise. Hierbei werden zunächst die partiell sialylierten LAP-Formen zwischen pH 5,2 und 5,6 durchlaufen, bevor ein IEP zwischen 5,8 und 6,2 erreicht wird. Folglich ist die Verweildauer der LAP auf der Plasmamembran nicht ausreichend, um den IEP jedes plasmamembranständigen LAP-Moleküles in den pH-Bereich zwischen 5,8 und 6,2 zu verschieben. Da die mit der Plasmamembran ausgetauschte LAP-Fraktion jedoch aus den LAP-Formen mit einem IEP zwischen pH 5,8 und 6,2 berechnet wird, ergibt sich folgendes Auswertungsproblem: Plasmamembranständige LAP-Moleküle, deren IEP lediglich im pH-Bereich zwischen 5,1 und 5,6 verschoben wird, werden nicht bei der Berechnung des mit der Plasmamembran ausgetauschten LAP-Pools berücksichtigt. Das führt zu einer Unterbewertung der Menge an

endosomaler LAP, die im Verlauf eines definierten Zeitabschnittes mit der Plasmamembran ausgetauscht wird. Folglich wird im Neuraminidase-Assay die Transportgeschwindigkeit endosomaler LAP zur Plasmamembran unterbewertet.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, daß einige Sialinsäurereste plasmamembranständiger LAP-Moleküle neuraminidaseunzugänglich sind. In diesem Fall, könnte nur der neuraminidasezugängliche Anteil plasmamembranständiger LAP erfaßt werden. Endosomaler LAP, die zur Plasmamembran transportiert wird und dort nicht desialyliert werden kann, entgeht dem Neuraminidase-Assay. Daraus würde sich ebenfalls eine Unterbewertung der Transportgeschwindigkeit endosomaler LAP zur Plasmamembran ergeben.

5.1.2 Endozytose von Neuraminidase

Extrazelluläre Proteine können auch ohne Bindung an spezifische Zelloberflächenrezeptoren über Flüssigphase-Endozytose in die Zelle gelangen. MARSH et al. 1983 inkubierten BHK 21-Zellen für 15 Minuten bei 37°C in einer Lösung mit dem Enzym Peroxidase. Nach etwa einer Minute konnte das Enzym in den frühen Endosomen direkt unterhalb der Plasmamembran nachgewiesen werden. Nach 5-15 Minuten tauchte die Peroxidase in den späten Endosomen in der Nähe des Golgi-Komplexes auf (MARSH et al. 1986). Es kann also nicht ausgeschlossen werden, daß die Neuraminidase ebenfalls im Verlauf der Inkubation bei 37 °C endozytiert wird, in die Endosomen gelangt und dort LAP desialyliert.

Um einer möglichen Endozytose der Neuraminidase nachzugehen, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine Kontrolle: LAP-WT exprimierende BHK 21-Zellen wurden für 1 h bei 37°C mit Medium inkubiert, das iodidierte Neuraminidase enthielt. Die Auswertung dieser Kontrolle ergab, daß ca. 2,2 % der iodidierten Neuraminidase zellassoziiert und damit potentiell intrazellulär lokalisiert war. Es ist nicht klar ob diese geringe Enzymmenge ausreicht um detektierbare Mengen endosomaler LAP zu desialylieren. Sollte das der Fall sein, wäre nur ein Teil der mit Hilfe des Neuraminidase-Assays erfaßten LAP tatsächlich an der Plasmamembran exponiert.

5.1.3 Sensitivität des Recycling-Assays

Die Problematik der Neuraminidase-Endozytose zeigt, daß es notwendig ist, die Ergebnisse des Neuraminidase-Assays durch weitere Experimente zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurde der Recycling-Assay entwickelt, der den Vorteil eines direkten Recyclingnachweises bietet (siehe Flußschema in Abbildung 5.1).

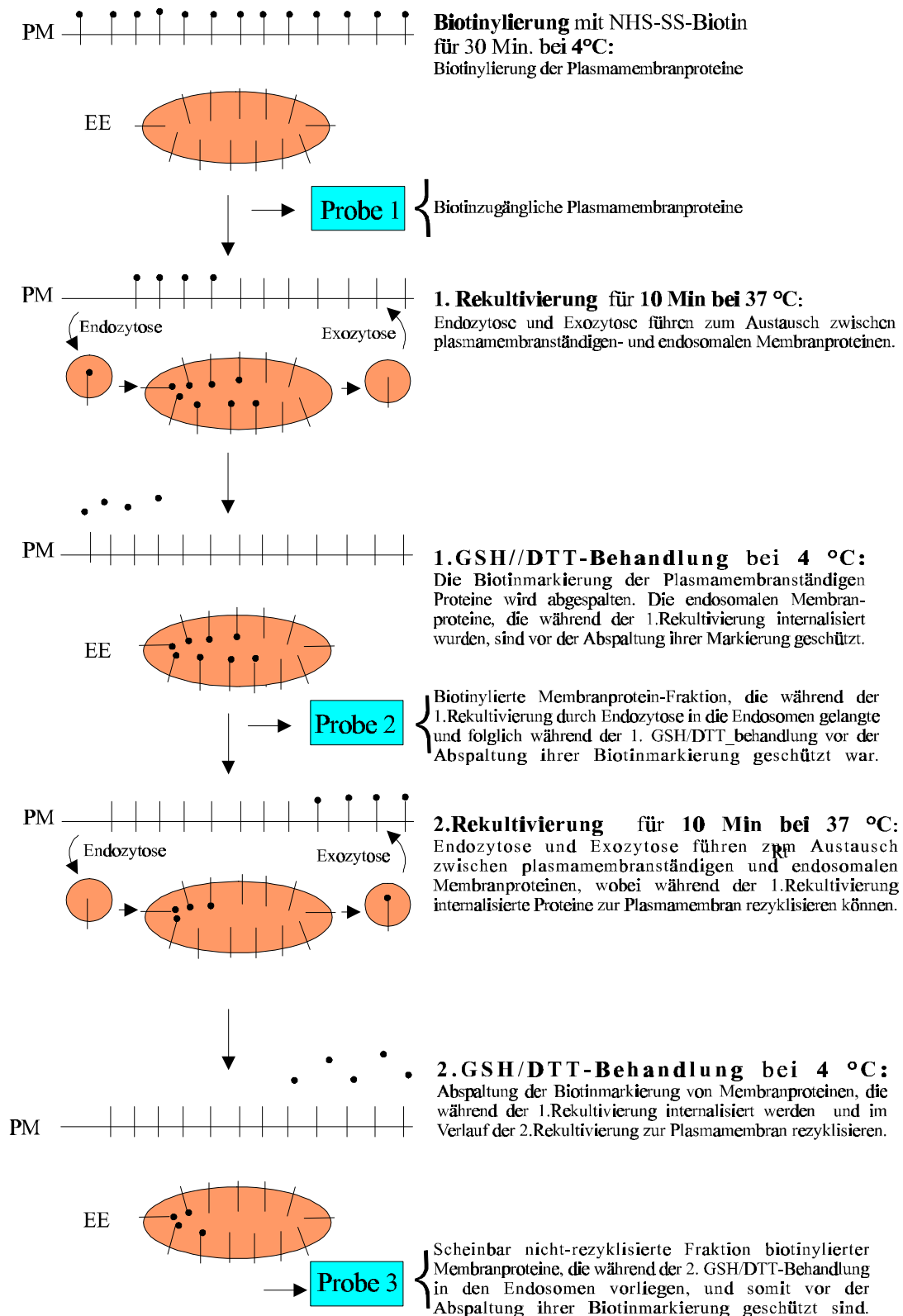


Abbildung 5.1: Flußschema des Recycling-Assays. In dieser Abbildung wird die experimentelle Strategie der einzelnen Schritte des Recycling-Assays erklärt. Die Biotinmarkierung wird durch einen schwarzen Punkt symbolisiert. Die Abkürzungen PM und EE stehen für Plasmamembran bzw. Endosomen.

Die Grundlage des direkten Recycling-Assays bildet die Biotinmarkierung plasmamembranständiger LAP, die wieder entfernt werden kann, nachdem internalisierte LAP zur Plasmamembran rezykliert.

Im Recycling-Assay werden die Zellen bei 4°C mit NHS-SS-Biotin inkubiert. Der Biotinrest wird kovalent über eine Disulfidbrücke (-SS-) mit den plasmamembranständigen Proteinen verknüpft. Nach der Biotinylierung wird die erste Probe geerntet. Die in dieser Probe (Probe 1) vorliegende Fraktion biotinylierter LAP entspricht der biotinzugänglichen, plasmamembranständigen LAP. Während der anschließenden 10-minütigen Reaktivierung der Zellen bei 37 °C kann die biotinylierte, plasmamembranständige LAP durch Endozytose in die Endosomen gelangte. Diese biotinylierte LAP-Fraktion ist während der folgenden 4 °C-Behandlung mit Glutathion/DTT vor der reduktiven Abspaltung ihrer Biotinmarkierung geschützt, während die Biotinreste von allen auf der Plasmamembran verbliebenen LAP-Molekülen entfernt werden. Nach der Glutathion/DTT-Behandlung wird die Probe 2 geerntet. Diese Probe enthält die biotinylierte, plasmamembranständige LAP-Fraktion, die während der 10-minütigen Reaktivierung internalisiert wurde und deshalb bei der anschließenden Glutathion/DTT-Behandlung vor der Abspaltung ihrer Markierung geschützt waren. Danach erfolgte eine zweite Reaktivierung bei 37 °C, in deren Verlauf LAP aus den Endosomen zur Plasmamembran gelangen konnte. Darunter befindet sich auch die biotinylierte LAP, die während der ersten Reaktivierung in die Endosomen aufgenommen wurden und deren Biotinmarkierung folglich während der ersten Glutathion/DTT-Behandlung vor der Abspaltung geschützt war. Während der nun folgenden zweiten Glutathion/DTT-Behandlung wurde das Biotin der zur Plasmamembran rezyklierten Proteine entfernt. Anschließend wird die Probe 3 geerntet. Die dritte Probe enthält die während der 1. Reaktivierung internalisierte biotinylierte LAP-Fraktion, die sich nach der 2. Reaktivierung noch in der Zelle befand, und somit vor reduktiven Abspaltung ihrer Markierung geschützt war. Die rezyklierte LAP-Fraktion entspricht somit der Differenz des biotinylierten LAP-Pools in Probe 2 und in Probe 3. Wenn die internalisierte, biotinylierte LAP-Fraktion (Probe 2) und die biotinylierte, nicht rezyklierte LAP-Fraktion (Probe 3) gleich groß ist, wird kein Recycling der internalisierten Fraktion zur Plasmamembran detektiert.

Die biotinylierte LAP, die sich während der zweiten Glutathion/DTT-Behandlung in der Zelle befindet, muß nicht nur aus nicht-rezyklisierter LAP bestehen. Sie kann auch LAP-Moleküle enthalten, die im Verlauf der zweiten Reaktivierung bei 37°C zur Plasmamembran rezyklierten und bereits wieder endozytiert wurden. Es ist daher möglich, daß der Anteil rezyklisierter LAP bei der Auswertung des Recycling-Assays unterschätzt wird. Das Ziel der Experimente bestand jedoch nicht in der exakten Bestimmung der Recyclingkinetik, sondern vielmehr in einem qualitativen Vergleich des Recyclingverhaltens verschiedener LAP-Konstrukte.

5.2 Der LAP-Tail ist für die Vermittlung des Recyclings notwendig und ausreichend

Die Ergebnisse des Neuraminidase-Assays zeigen, daß der LAP-Tail für einen schnellen Austausch endosomaler LAP mit der Plasmamembran notwendig und ausreichend ist. Dieser Austausch ist eine notwendige Voraussetzung für das Recycling und liefert folglich einen Hinweis auf den Recycling-vermittelnden Einfluß des LAP-Tails. Mit Hilfe des Recycling-Assays konnte bestätigt werden, daß der LAP-Tail für die Vermittlung des Recyclings notwendig sowie ausreichend ist. Durch die Analyse der LAP D7 Mutante im Neuraminidase- und Recycling-Assay wurde der Recycling-vermittelnde Bereich auf die ersten 12 Aminosäuren des LAP-Tails eingegrenzt werden (siehe LAP D7 Abbildung 5.2).

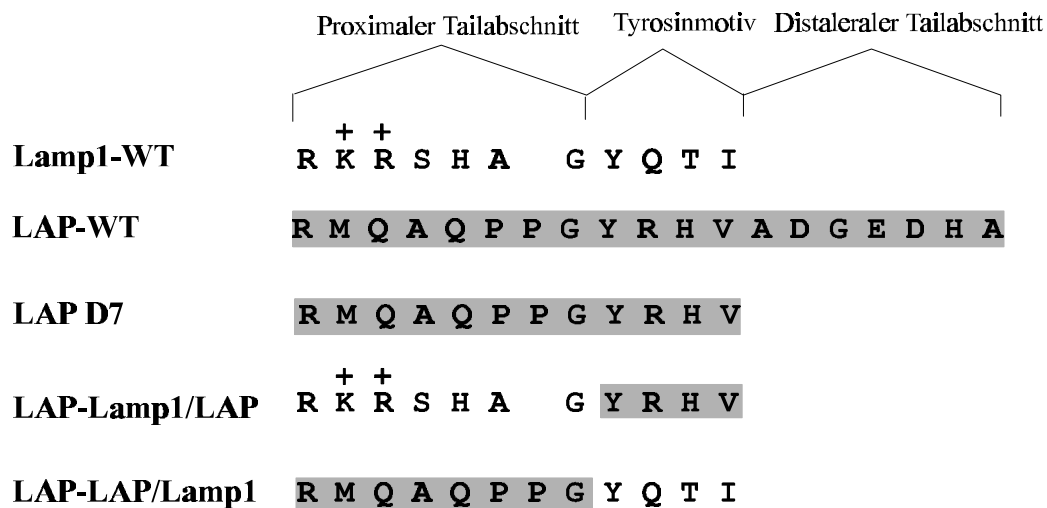


Abbildung 5.2: Struktur der zytoplasmatischen Domäne. In der Abbildung wird die Aminosäuresequenz (Einbuchstabencode) der zytoplasmatischen Domänen verschiedener LAP- bzw. Lamp1-Konstrukte angegeben, wobei die Aminosäuren der LAP grau unterlegt sind. Die C-terminale Aminosäure der zytoplasmatischen Domänen befindet sich am Ende der dargestellten Sequenzen. Die basischen Aminosäuren des proximalen Lamp1-Tailbereiches sind durch ein Pluszeichen (+) markiert.

Nun stellte sich die Frage nach dem Einfluß des Tyrosinmotivs und des proximalen Tail-Bereiches auf das Recycling der LAP. Im proximalen Bereich des Lamp1-Tails befinden sich zwei basische Aminosäuren (K und R in den Positionen -5 und -6 proximal zum Tyrosin), während der proximale LAP-Tailbereich keine geladenen Aminosäuren enthält. Direkt vor dem Tyrosinmotiv des LAP-Tails befinden sich zwei Prolinreste, die die Tailstruktur maßgeblich beeinflussen könnten. Untersuchungen mit Hilfe der zweidimensionalen-Kernresonanz-Spektroskopie an einem synthetischen LAP-Tailpeptid ergaben, daß die vier Aminosäuren mit der Sequenz PPGY einen β -Turn bilden (EBERLE et al. 1991). Der Recycling-Assay mit dem LAP-Lamp1/LAP-Konstrukt, in dem der proximale

LAP-Bereich gegen den entsprechenden Bereich des Lamp1-Tails ausgetauscht wurde, zeigt jedoch, daß der unterschiedliche Charakter der proximalen Tailbereiche keinen Einfluß auf das Recycling der LAP hat. Das Tyrosinmotiv der LAP, mit der Sequenz YRHV, ist ausreichend um das Recycling zu vermitteln.

Zur Kontrolle müßte das Recycling des LAP-LAP/Lamp1-Konstruktes untersucht werden. In dieser Mutante ist das LAP-Tyrosinmotiv gegen das Tyrosinmotiv von Lamp1, mit der Sequenz YQTI, ausgetauscht (siehe Abbildung 5.2). Der zeitliche Rahmen dieser Arbeit reichte nicht für die vollständige Recyclinganalyse dieser Mutante aus. Erste Experimente weisen jedoch darauf hin, daß diese Mutante nach der Endozytose nicht zur Plasmamembran rezykliert. Das LAP-Tyrosinmotiv ist also für die Vermittlung des Recyclings nicht nur ausreichend sondern auch notwendig. Das Tyrosinmotiv von Lamp1 vermittelt folglich kein Recycling. eine andere zelluläre Sortierung als das Tyrosinmotiv der LAP.

Die Sequenz des Tyrosinsignales von LAP (YRHV) vermittelt eine andere zelluläre Sortierung als das Tyrosinmotiv von Lamp1 (YQTI). Zwischen diesen beiden Tyrosinmotiven bestehen einige Unterschiede, die für ihre unterschiedlichen Funktionen verantwortlich sein könnten. Das LAP-Tyrosinmotiv hat einen basischen Charakter, der durch das Arginin und das Histidin, in den Positionen 1 und 2 distal zum Tyrosin entsteht. Das Tyrosinmotiv von Lamp1 enthält weder basische noch saure Aminosäuren. Darüber hinaus verfügen die beiden Tyrosinmotive über verschiedene hydrophobe Aminosäuren in der Position 3 distal zum Tyrosin. Das LAP-Tyrosinmotiv trägt in dieser Position ein Valin, während das Lamp1-Tyrosinmotiv an dieser Position ein Isoleucin enthält. Experimente mit Hilfe des *2 Hybrid-Systems* zeigen, daß die Aminosäuren in dieser Position einen wesentlichen Einfluß auf die Wechselwirkung zwischen Tyrosinmotiven und den μ -Untereinheiten von Adaptorkomplexen (AP 1, AP 2, AP 3) ausüben (OHNO et al. 1996, OHNO et al. 1998). Möglicherweise sind das Valin und das Isoleucin für die Interaktion mit unterschiedlichen zellulären Sortierungskomponenten verantwortlich, was in einer unterschiedlichen Sortierung resultieren würde.

Um diese Fragen zu beantworten, muß die minimale Sequenzinformation identifiziert werden, die für die Vermittlung des Recyclings notwendig ist. Zu diesem Zweck müßten LAP-Mutanten konstruiert werden, in denen die Aminosäuren des Tyrosinmotivs gegen die entsprechenden Aminosäuren des Lamp1-Tyrosinmotivs ausgetauscht werden.

5.3 *In vitro* Interaktion der Adaptor Komplexe AP 1 und AP 2 mit den Tyrosinsignalen von LAP und Lamp1

Die *in vivo* Daten dieser Arbeit zeigen, daß die Tyrosinmotive der zytoplasmatischen LAP- und Lamp1-Domänen für die Vermittlung der endosomalen Sortierung notwendig und ausreichend sind, was darauf hindeutet, daß zytosolische Sortierungsfaktoren an der Vermittlung dieser endosomalen Sortierung beteiligt sind. Es stellt sich die Frage, ob die Tyrosinmotive von Lamp1 und LAP ausreichend sind, um die Bindung des zytoplasmatischen Tails an einen Sortierungsfaktor zu bestimmen. Mit Hilfe des BIAcore 2000 sollte der Einfluß der Tyrosinmotive synthetisierter LAP- und Lamp1-Tailpeptide auf die AP 1-Bindung überprüft werden.

Die BIAcore-Analysen zeigten, daß zwischen dem LAP-WT Tailpeptid und AP 1 keine meßbare Bindung erfolgt, während es zwischen dem Lamp1-WT Tail und dem AP 1-Komplex zu einer starken Bindung kommt. Der Lamp1-Tail endet direkt hinter dem Tyrosinmotiv, während sich dem LAP-Tyrosinmotiv ein distaler Bereich von 7 Aminosäuren anschließt (siehe Abbildung 5.3). Das LAP-Tailpeptid mit deletiertem distalen Bereich (LAP D7) zeigt wie der LAP-WT Tail keine Interaktion mit dem AP 1-Komplex. Die BIAcore-Daten zeigten, daß der distale Bereich des LAP-Tails keinen Einfluß auf die Interaktion mit AP 1 hat.

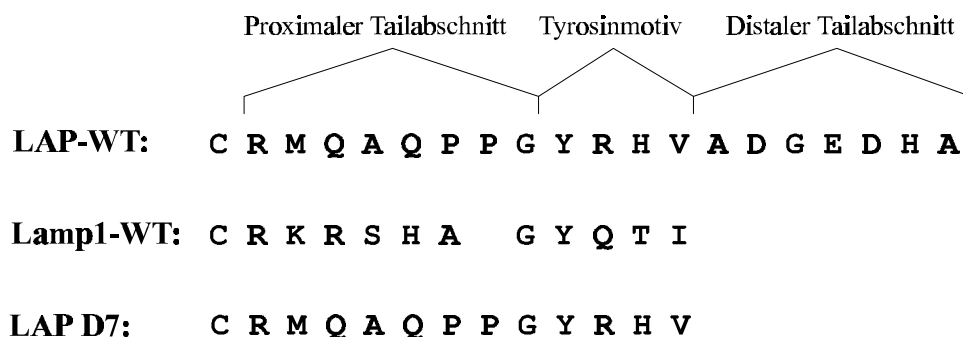


Abbildung 5.3: Synthetisierte LAP-WT und Lamp1-WT Tailpeptide. Die Sequenz der beiden Tailpeptide ist im Einbuchstabencode angegeben. Die Numerierung beginnt mit der ersten zytosolischen Aminosäure und endet mit der C-terminalen Aminosäure des Tails. Für die BIAcore-Messungen werden die Peptide kovalent, über einen zusätzlich am Aminoterminus eingefügten Cysteinrest, an einen Sensorchip gekoppelt. Adaptorhaltige Lösung wird in das BIAcore-System injiziert und über die Sensorchipoberfläche mit den gekoppelten Tailpeptiden geleitet. Die injizierten Adaptoren (AP 1 und AP 2) wurden aus Schweinehirn präpariert. Um die Stärke der Bindungen zwischen den Tailpeptiden und den injizierten Adaptor Komplexen bestimmen zu können, wurden mit Hilfe des BIAcore-Evaluierungsprogrammes die Gleichgewichtskonstanten (K_D) für die jeweiligen Bindung berechnet.

Durch Konstruktion des chimären Tailpeptides LAP/Lamp1 konnte festgestellt werden, daß das Lamp1-Tyrosinmotiv (YQTI) für die starke Interaktion mit dem AP 1-Komplex notwendig und ausreichend ist (siehe Abbildung 5.4). Da das chimäre Tailpeptid

Lamp1/LAP keine Interaktion mit AP1 zeigt, kann das LAP-Tyrosinmotiv (YRHV) keine Bindung an den AP 1-Komplex vermitteln (siehe Abbildung 5.4).

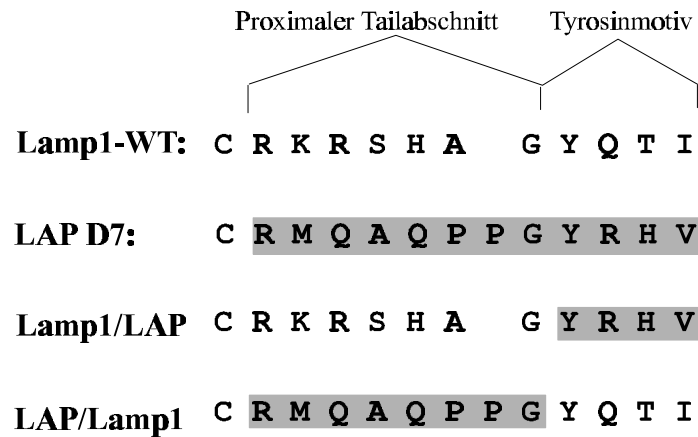


Abbildung 5.4: Chimäre Tailpeptide. Die Aminosäuresequenz der Tailpeptide ist im Einbuchstabencode angegeben, wobei die LAP-Sequenzen grau unterlegt sind. In der Nomenklatur der Peptide stammt der proximale Bereich aus dem Protein vor dem Querstrich, während das Tyrosinmotiv aus dem Protein hinter dem Querstrich stammt. Die beiden chimären Tailpeptide setzen sich aus dem proximalen Lamp1-Bereich und dem LAP-Tyrosinmotiv (Lamp1/LAP) oder dem proximalen LAP-Tailbereich und dem Lamp1-Tyrosinmotiv (LAP/Lamp1) zusammen.

Das Tyrosinmotiv von Lamp1 ist also notwendig und ausreichend um eine Interaktion mit AP 1 zu vermitteln. Dieses Ergebnis ist erstaunlich, da sich Hinweise auf einen maßgeblichen Einfluß mehren, den die flankierenden Sequenzen von Tyrosinsignalen auf die Interaktion mit Adaptorkomplexen ausüben. Man stellt sich vor, daß diese flankierenden Sequenzen die Bindungsspezifität der Tyrosinsignale zu verschiedenen Adaptorkomplexen ermöglichen (OHNO et al. 1996, OHNO et al. 1998, BONIFACINO et al. 1999). Um so interessanter ist die Identifizierung der einzelnen Aminosäuren des Lamp1-Tyrosinmotives, die für die Interaktion mit AP 1 verantwortlich sind. Zu diesem Zweck wurde das Lamp1-Tyrosinmotiv durch Permutation in ein LAP-Tyrosinmotiv überführt. Das heißt, daß im Lamp1-Tyrosinmotiv die einzelnen Aminosäuren gegen die entsprechenden Aminosäuren des LAP-Tyrosinmotives ausgetauscht werden (siehe Abbildung 5.5).

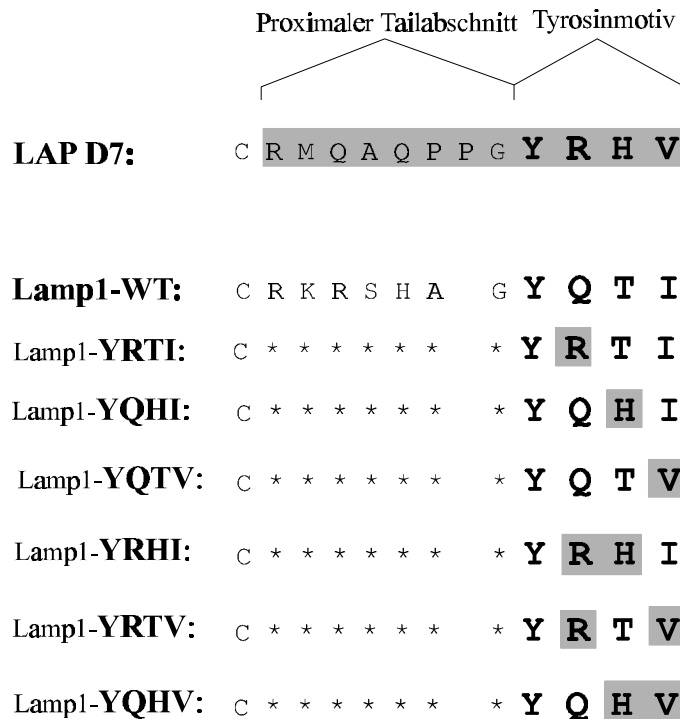


Abbildung 5.5: Lamp1 Tailpeptide mit permutiertem Tyrosinmotiv. Die Aminosäuresequenz der Tailpeptide ist im Einbuchstabencode angegeben, wobei die Aminosäuren von LAP grau unterlegt sind. Der proximale Tailbereich der Tailpeptide mit permutiertem Tyrosinmotiv stammt aus Lamp1, was in der Nomenklatur durch das Protein (Lamp1) vor dem Querstrich gekennzeichnet wird. Die Aminosäuren der Tyrosinmotive sind sowohl in der Nomenklatur (hinter dem Querstrich), wie auch in der Peptidsequenz durch große, fette Buchstaben hervorgehoben. Die Sternchen in den Sequenzen der permutierten Peptide symbolisieren die Aminosäuren des proximalen Lamp1-Tailbereiches.

Die BIAcore-Analysen zeigen, daß jede Aminosäure des Lamp1 Tyrosinmotivs an der starken *in vitro* Bindung zum AP 1-Komplex beteiligt ist. Dennoch unterscheidet sich der Einfluß auf die Bindungsstärke je nach ausgetauschter Aminosäure. Das Threonin (in der Position 2 distal zum Tyrosin) hat bei Austausch einer einzelnen Aminosäure einen größeren Einfluß auf die AP 1-Bindung als Glutamin und Isoleucin. Das Threonin ist für eine starke AP 1-Bindung notwendig. Ein fast vollständiger Affinitätsverlust zum AP 1-Komplex kann nur erreicht werden, wenn das Threonin gemeinsam mit einer zweiten Aminosäure des Tyrosinmotivs ausgetauscht wird. Wobei der Austausch von Threonin und Isoleucin (YQTI→YQH**V**) zu noch einem drastischeren Affinitätsverlust führt, als der Austausch von Threonin und Glutamin (YQTI→YR**H**I).

Zur Kontrolle dieser Ergebnisse wurde das Tyrosinmotiv des LAP-Tails durch Permutation in ein Lamp1-Tyrosinmotiv überführt. Das heißt, daß im LAP-Tyrosinmotiv die einzelnen Aminosäuren gegen die entsprechenden Aminosäuren des Lamp1-Tyrosinmotivs ausgetauscht wurden (siehe Abbildung 5.6). Die Ergebnisse dieser Interaktionsanalysen bestätigen, daß das Threonin des Lamp1-Tyrosinsignales für eine

starke AP 1-Bindung ausreichend ist und einen größeren Einfluß als Glutamin und Isoleucin auf diese Bindung ausübt.

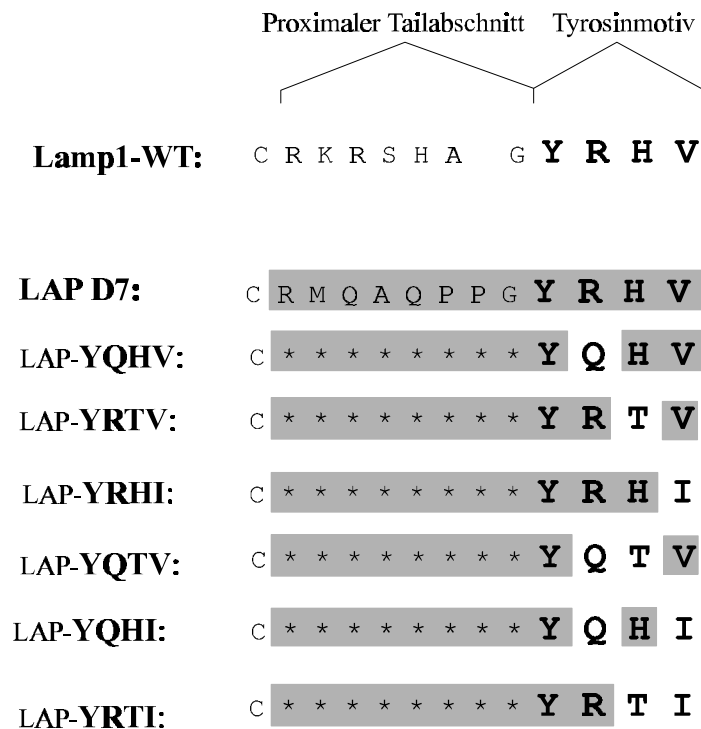


Abbildung 5.6: LAP Tailpeptide mit permutiertem Tyrosinmotiv. Die Aminosäuresequenz der Tailpeptide ist im Einbuchstabencode angegeben, wobei die Aminosäuren von LAP grau unterlegt sind. Der proximale Tailbereich der Tailpeptide mit permutiertem Tyrosinmotiv stammt aus LAP, was in der Nomenklatur durch das Protein (LAP) vor dem Querstrich gekennzeichnet wird. Die Aminosäuren der Tyrosinmotive sind sowohl in der Nomenklatur (hinter dem Querstrich) wie auch in der Peptidsequenz durch große, fette Buchstaben hervorgehoben. Die Sternchen in den Sequenzen der permutierten Peptide symbolisieren die Aminosäuren des proximalen LAP-Tailbereiches

Mit Hilfe der BIAcore Experimente dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß jede Aminosäure des Lamp1-Tyrosinmotives (YQTI) einen Einfluß auf die AP 1-Bindung ausübt. Dennoch nehmen die Aminosäuren des Lamp1-Tyrosinmotives einen unterschiedlich starken Einfluß auf die AP 1-Bindung. Das Threonin (Position 2 distal zum Tyrosin) ist für die starke AP-Bindung des Lamp1-Tyrosinmotives notwendig sowie ausreichend. Die BIAcore Daten zeigen also, daß minimale Sequenzinformationen innerhalb eines Tyrosinmotivs ausreichen können, um die spezifische Bindung an einen Adaptorkomplex zu bestimmen. Folglich ist es vorstellbar, daß die Tyrosinmotive von Lamp1 und LAP ausreichend sind um unterschiedliche zelluläre Sortierungsprozesse zu vermitteln, indem sie mit unterschiedlichen zellulären Sortierungskomponenten (z.B. AP 1) interagieren. Darüber hinaus bieten die BIAcore Ergebnisse eine Erklärungsmöglichkeit für die Vielfältigkeit von Tyrosinmotiven.

Mit dieser Arbeit stehen erstmals quantitative Daten über die Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Interaktion mit einem Adaptorkomplex zur Verfügung. Für weiterführende Studien wäre interessant, ob die hier ermittelten Affinitätsunterschiede mit einer entsprechenden Fehlsortierung *in vivo* korrelieren. So könnte überprüft werden, ob ein vermehrtes Erscheinen von Lamp1 an der Plasmamembran mit der entsprechenden Mutation im Tyrosinsignal korreliert. Die Studien könnten auch auf die Endozytose und das Recyclingverhalten ausgedehnt werden, so daß nach Ablauf dieser Studien ein besseres Verständnis über die Affinitätsunterschiede entsteht, die *in vivo* notwendig sind, um bestimmte Sortierungsprozesse einzuleiten oder zu vermeiden.

5.4 Sortierung lysosomaler Membranproteine

5.4.1 Sortierungsstationen

Wie in der Einleitung ausführlich dargestellt (siehe 1.3), unterliegt die LAP einem indirekten lysosomalen Transport, während Lamp1 und Limp2 auf einem direkten Weg, d.h. ohne Umweg über die Plasmamembran, in die Lysosomen transportiert werden (siehe Abbildung 5.7). Es ist unklar an welcher zellulären Sortierungsstation die Trennung dieser beiden Wege stattfindet.

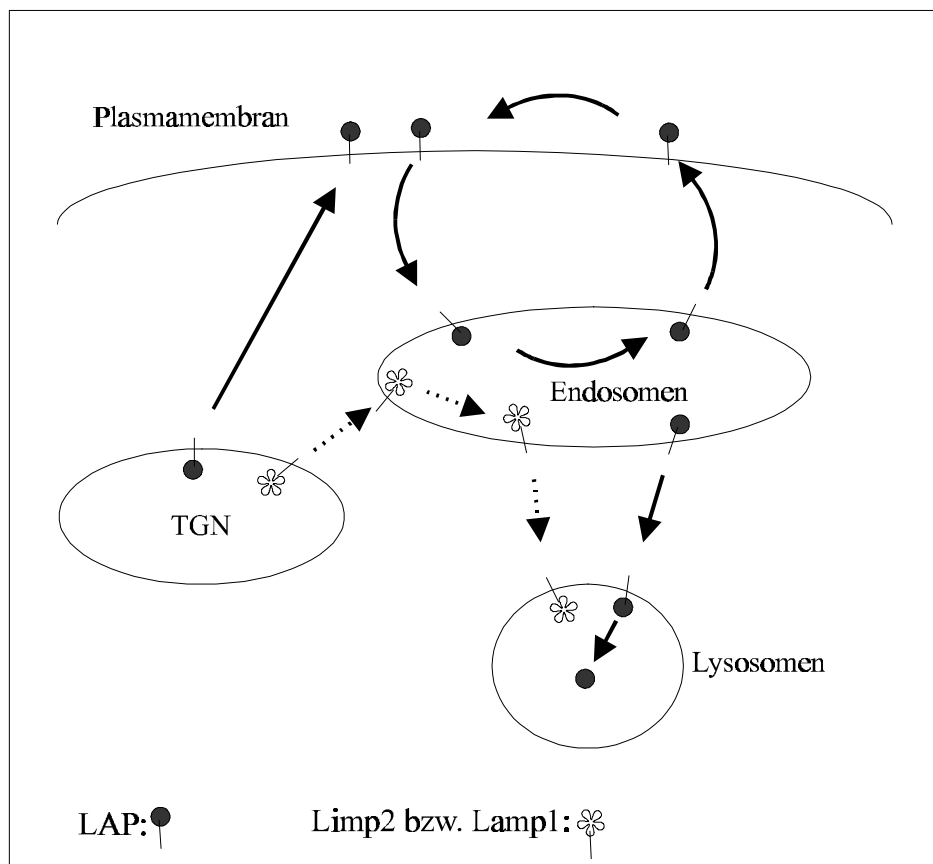


Abbildung 5.7: Schematische Darstellung des direkten und indirekten Transportes lysosomaler Membranproteine. Der direkte lysosomale Transport von Lamp1 und Limp2 wird durch gestrichelte Pfeile dargestellt. Die durchgehenden Pfeile symbolisieren den indirekten LAP-Transport, der über die Plasmamembran führt. Die einzelnen Kompartimente, die auf den Transportwegen passiert werden, erklären sich aus der Zeichnung.

5.4.1.1 Sortierungsstation TGN

Das *trans* Golgi-Netzwerk (TGN) wird als Sortierungsstation lysosomaler Membranproteine diskutiert. Nach diesem Modell vermitteln die zytosolischen Sortierungsfaktoren AP 1 und AP 3 am TGN die direkte Sortierung von Lamp1 und Limp2 zu den Endosomen (HÖNING et al. 1996, LE BORGNE et al. 1998). *In vitro* Untersuchungen zeigen eine starke Bindung zwischen dem Lamp1-Tail und AP 1 bzw. AP 3 (HÖNING et al. 1996, LE BORGNE et al. 1998). Mit Hilfe des BIAcore-Systems konnte eine starke Interaktion des Limp2-Tails mit dem AP 3-Komplex nachgewiesen werden, während der LAP-Tail *in vitro* weder mit AP 1 noch mit AP 3 interagiert (Kapitel 4.3, SOSA et al 1993, HÖNING et al. 1998). Diese Daten werden dahingehend interpretiert, daß eine Interaktion der zytoplasmatischen Domänen von Lamp1 und Limp2 mit AP 3 bzw. AP 1 den direkten Transport vom TGN zu den Endosomen einleitet. Die Affinität des LAP-Tails zu AP 1 und AP 3 ist so schwach, daß die LAP dem direkten Transport zu den Endosomen entgeht. Allerdings ist es denkbar, daß der direkte Transport von Lamp1 und Limp2 zu den Endosomen durch bisher noch nicht identifizierte Sortierungsfaktoren vermittelt wird.

Es konnte in den bisherigen Untersuchungen noch nicht geklärt werden, ob ein spezifisches Sortierungssignal für den LAP-Transport vom TGN zur Plasmamembran benötigt wird. Bisher stellt man sich den Transport von Membranproteinen vom TGN zur Plasmamembran als signalunabhängigen Prozeß vor. Danach werden alle Membranproteine, die nicht aktiv am TGN in eine andere Richtung sortiert werden, konstitutiv zur Plasmamembran transportiert.

5.4.2 Endosomale Sortierung

Neben dem TGN werden die Endosomen als weitere zelluläre Sortierungsstation lysosomaler Membranproteine diskutiert (ROHRER et al. 1996). Plasmamembranständige LAP wird im Verlauf des Recyclings endozytiert und in die frühen Endosomen transportiert. Es stellt sich die Frage, ob die endozytierte LAP in die selben endosomalen Subkompartimente gelangt, in die Lamp1 und Limp2 nach dem Verlassen des TGN transportiert werden. Um dieser Frage nachzugehen, soll der Transport fluoreszenzmarkierter (Green Fluorescence Protein, Yellow Fluorescence Protein e.t.c.) lysosomaler Membranproteine in BHK-Zellen untersucht werden. Unter der Voraussetzung, daß Lamp1 bzw. Limp2 und LAP durch die selben endosomalen Kompartimente transportiert werden, müßten die Endosomen über eine Sortierungsmaschinerie verfügen, die rezyklisierende LAP und nicht rezyklisierendes Limp2 bzw. Lamp1 in verschiedene Transportrichtungen sortiert. Durch Verfolgen des Transportes fluoreszenzmarkierter lysosomaler Membranproteine könnte unter Umständen eine endosomale Sortierungsstationen identifiziert werden, an der sich der direkte lysosomale Transportweg von der Transportroute der rezyklisierenden LAP trennt.

5.5 Endosomale Sortierungssignale lysosomaler Membranproteine

Transportstudien mit Deletions- und Substitutionsmutanten führten zur Identifizierung lysosomaler Sortierungssignale in den zytoplasmatischen Domänen lysosomaler Membranproteine. Die Deletion des Alanins in der Position -2 proximal zum Tyrosin, sowie das Einfügen von vier zusätzlicher Alaninreste resultieren in einer Fehlsortierung zur Plasmamembran (ROHRER et al. 1996). Für eine Lamp1-Mutante, deren Glycinrest (Position -1 proximal zum Tyrosin) gegen Alanin ausgetauscht wurde, konnte ebenfalls eine Fehlsortierung zur Plasmamembran beobachtet werden (HÖNING et al. 1996). Es stellt sich nun die Frage, ob in diesen Lamp1-Konstrukten ein TGN-Sortierungsmotiv oder ein endosomales Sortierungsmotiv mutiert wurde. Da sowohl für gestörte Sortierung am TGN wie auch eine gestörte endosomale Sortierung eine Fehlsortierung zur Plasmamembran bedingen, bestand bisher keine Möglichkeit zwischen einem endosomalen und einem TGN Sortierungsmotiv zu differenzieren.

Mit Hilfe des Recycling-Assays dieser Arbeit konnten zum ersten mal endosomale Sortierungsmotive (mit der Sequenz YQTI und YRHV) lysosomaler Membranproteine charakterisiert werden.

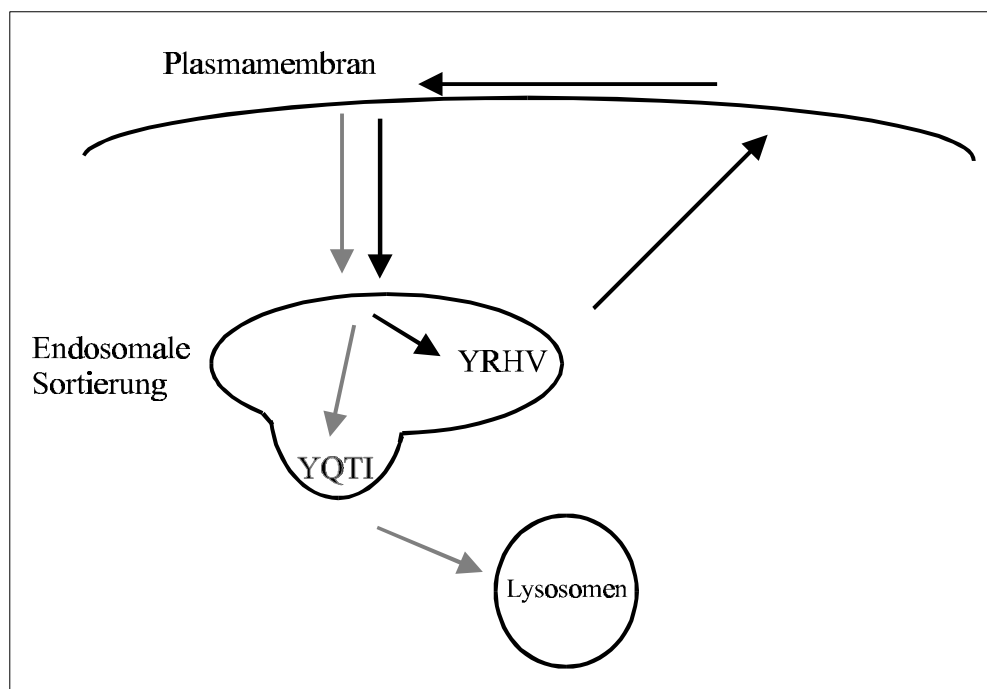


Abbildung 5.8: Modell der endosomalen Sortierung von Lamp1 und LAP. Die Transportroute von LAP wird durch schwarze Pfeile dargestellt, während der Lamp1Transport durch graue Pfeile gekennzeichnet ist. Im Verlauf des Recycling-Assays werden die plasmamembranständigen lysosomalen Membranproteine bei 4 °C biotinyliert. Während der anschließenden 10-minütigen Reaktivierung bei 37°C werden sie internalisiert gelangen in das selbe endosomale Kompartiment. In den Endosomen vermittelt das Tyrosinmotiv der LAP (YRHV) das Recycling zur Plasmamembran. Das Tyrosinmotiv des Lamp1-Tails (YQTI) ist für die Zurückhaltung in der Zelle verantwortlich. Die Endosomen müssen über einen Sortierungsmechanismus verfügen, der mittels Tyrosinmotiv zwischen der rezyklisierenden LAP und dem nicht rezyklisierenden Lamp1 unterscheidet.

Im Verlauf des Recycling-Assays werden die plasmamembranständigen lysosomalen Membranproteine biotinyliert um anschließend das Recyclingverhalten der biotinylierten lysosomalen Membranproteine zu untersuchen. Durch Endozytose gelangen die biotinylierten lysosomalen Membranproteine zunächst in das selbe endosomalen Subkompartiment. Hier wird eine unterschiedliche endosomale Sortierung der endozytierten, biotinylierten lysosomalen Membranproteine verfolgt. Die endozytierten Konstrukte mit einem LAP-Tyrosinmotiv (YRHV) rezyklisieren zur Plasmamembran, während endozytierte Konstrukte mit einem Lamp1-Tyrosinmotiv (YQTI) von diesem Transportweg ausgeschlossen werden. Folglich sind die Tyrosinmotive von LAP- und Lamp1 endosomale Sortierungssignale, die in den Endosomen einen Transport in unterschiedliche Richtungen vermitteln (siehe Abbildung 5.8). Das Endosomale Subkompartiment, in dem dieser Sortierungsprozeß abläuft, konnte noch nicht charakterisiert werden.

5.6 Ist das LAP-Recycling Folge einer aktiven oder passiven endosomalen Sortierung?

Plasmamembranständige LAP und Lamp1 gelangen nach der Endozytose zwangsläufig in das selbe endosomales Kompartiment. Hier werden sie in unterschiedliche Richtungen sortiert. Mit Hilfe des Recycling-Assays konnte der Recycling-vermittelnde Bereich des LAP-Tails auf das Tyrosinmotiv mit der Sequenz YRHV eingegrenzt werden. Das Tyrosinmotiv des Lamp1-Tails mit der Sequenz YQTI kann kein Recycling vermitteln, so daß endozytiertes Lamp1 nicht zur Plasmamembran zurückkehrt. Es stellt sich nun die Frage nach den Sortierungsmechanismen, die in den Endosomen die unterschiedlichen Sortierungsinformationen dieser beiden Tyrosinmotive umsetzen.

Modelle zur zellulären Sortierung von Proteinen unterscheiden zwischen aktiven und passiven Sortierungsprozessen. Eine aktive Sortierung wird durch einen Sortierungsfaktor vermittelt, der mit einem spezifischen Sortierungssignal in der zytoplasmatischen Domäne eines Proteines interagiert. Man stellt sich vor, daß passiv sortierte Proteine in Subdomänen zellulärer Kompartimente konzentriert werden, aus denen sich ein Transport ergibt, der nicht durch die spezifische Interaktion zwischen einem Sortierungssignal und einem Sortierungsfaktor vermittelt wird.

Es ist unklar, ob das LAP-Recycling durch einen aktiven oder passiven Sortierungsprozeß vermittelt wird. Die Identifizierung eines Sortierungsfaktors, der mit dem recycling-vermittelnden Tyrosinmotiv der LAP (YRHV) interagiert und dadurch das Recycling einleitet, bietet eine Möglichkeit diese Frage eindeutig zu beantworten. Um den Einfluß bekannter Sortierungsfaktoren auf das LAP-Recycling zu überprüfen, kann daß LAP-Recycling in Sortierungsfaktor-defizienten Zellen untersucht werden. Die Analyse des LAP-Recyclings in den μ 1-defizienten embryonalen Mausfibroblasten ergab, daß der AP 1-Komplex keinen Einfluß auf das Recycling der LAP hat. Außerdem ist die Analyse

des LAP-Recyclings in AP 3-defizienten Mausfibroblasten geplant. Ein weiteres Versuchssystem bieten Zellen, in denen die Expression eines Sortierungsfaktors durch Injektion von anti-sense-RNA inhibiert wird.

Schwieriger gestaltet sich Identifizierung unbekannter Sortierungsfaktoren, die das LAP-Recycling vermitteln. Zu diesem Zweck könnte man das LAP-Tailpeptid an einen Sensorchip koppeln und mittels Biosensor die Interaktion zwischen dem Peptid und Komponenten injizierter Zytosolproben verfolgen. Die anschließende Isolierung und Charakterisierung des an die Chipoberfläche gebundenen Materials könnte zur Identifizierung neuer Sortierungsfaktoren führen.

Es wäre aber auch denkbar, daß das Recycling der LAP signalunabhängig abläuft. In diesem Modell rezyklisieren Limp2 und Lamp1 nicht zur Plasmamembran, weil sie durch einen aktiven endosomalen Sortierungsprozeß in der Zelle zurückgehalten werden. Möglicherweise interagiert das Tyrosinmotiv des Lamp1-Tails an den Endosomen mit einer zytoplasmatischen Sortierungskomponente, die den schnellen Weitertransport zu den Lysosomen vermittelt. Weiterhin wäre denkbar, daß der größte Teil der LAP dieser schnellen lysosomalen Sortierung entgeht, da ihr Tyrosinmotiv eine viel geringere Affinität zu dieser Sortierungskomponente hat. Die LAP würde im Recyclingprozeß wie in einer Art Warteschleife akkumulieren. Dieses Modell bietet eine Erklärung für den langsamen lysosomalen Transport der LAP. Sollte die LAP passiv in den Endosomen sortiert werden, müßten sich endosomale Sortierungsfaktoren mit Hilfe der oben beschriebenen Verfahren isolieren lassen, die mit dem Tyrosinmotiv von Lamp1 interagieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, daß die Endosomen als Sortierungsstation endosomaler Membranproteine fungieren. Außerdem ermöglichte der Recycling-Assay dieser Arbeit zum ersten Mal die Charakterisierung von endosomalen Sortierungssignalen lysosomaler Membranproteine. Offen mußte bleiben, ob das YRHV-Motiv (LAP) oder das YQTI-Motiv (Lamp1) als aktives Sortierungssignal fungiert. Denkbar ist auch, daß es sich bei beiden Signalen um aktive endosomale Sortierungssignalen handelt. Das Modell in der Abbildung 5.9 faßt die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen und verdeutlicht den Fortschritt für das Verständnis der endosomalen Sortierung lysosomaler Membranproteine, der mit Hilfe dieser Arbeit erzielt werden konnte.

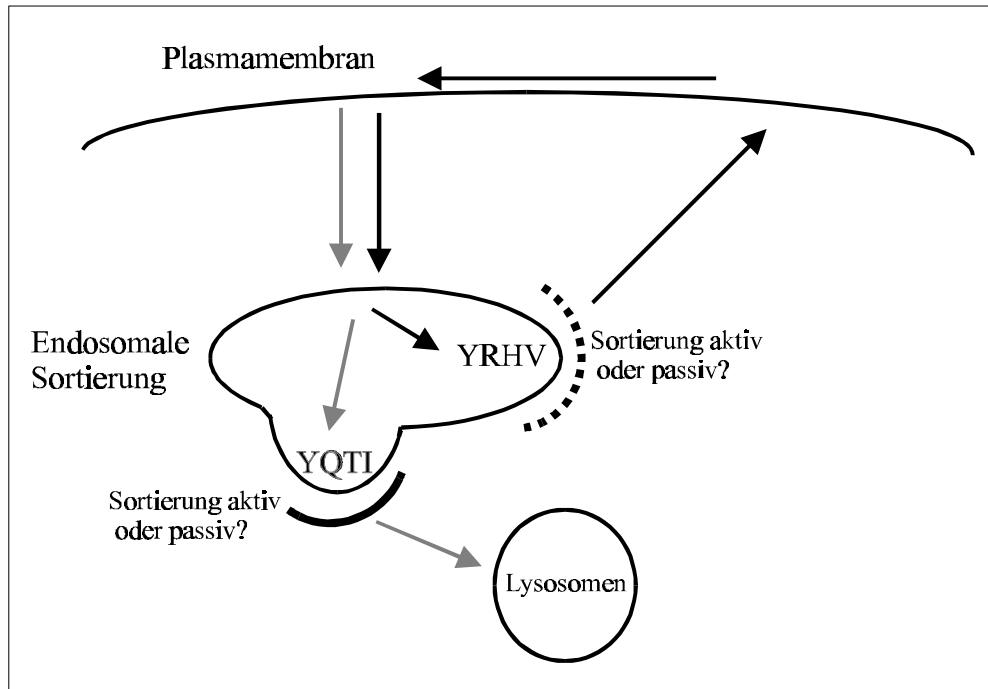


Abbildung 5.9: Wie werden Lamp1 und LAP in den Endosomen sortiert? Zur genauen Beschreibung siehe Abbildung 5.8. Die Endosomen müssen über einen Sortierungsmechanismus verfügen, der zwischen der rezyklisierenden LAP und dem nicht rezyklisierenden Lamp1 unterscheidet. Bisher konnten weder für den lysosomalen Transport von Lamp1 noch für das LAP-Recycling endosomale Sortierungsfaktoren identifiziert werden. Somit ist unklar, welcher der beiden Sortierungsprozesse aktiv und welcher passiv ist. Denkbar wäre auch, daß es sich bei beiden Prozessen um eine aktive Sortierung handelt.

5.7 LAP-Recycling im Vergleich zum Recycling des Transferrinrezeptors

Es ist unklar welche endosomalen Kompartimente die rezyklisierende LAP passiert. Um Strategien zur Charakterisierung dieser Kompartimente zu entwickeln, werden die Daten zum LAP-Recycling im Kontext des eingehend untersuchten Transferrinrezeptor-Recyclingzyklus diskutiert.

5.7.1 Recyclingzyklus des Transferrinrezeptors

Der Transferrinrezeptor (TFR) ist ein Typ II Transmembranprotein und bindet hochaffin ein eisenbeladenes Transferrinmolekül (Holo-Transferrin). Die zytoplasmatische Domäne des Transferrinrezeptors (62 AA) birgt ein Tyrosinsignal mit der Sequenz YTRF (AA 20-23), das für die schnelle, AP 2-vermittelte Internalisierung an der Plasmamembran verantwortlich ist (COLLAWN et al. 1990). Nach der Aufnahme in die Endosomen führt der leicht saure pH des Endosomenlumens zu einer Destabilisierung des Holo-transferrins, so daß das Eisen in das Endosomenlumen dissoziiert. Dadurch entsteht ein Transferrinrezeptor-Apotransferrin-Komplex, der zur Plasmamembran rezykliert. Das Apotransferrin dissoziiert bei pH 7,4 im Extrazellulärraum vom Rezeptor, so daß dieser erneut Holo-Transferrin binden kann. Der Transferrinrezeptor rezykliert permanent zwischen der Plasmamembran und den Endosomen und stellt auf diese Weise die Eisenversorgung der Zelle sicher. Ein kompletter Recyclingzyklus des TFR läuft in 10-15 min ab (siehe Abbildung 5.9).

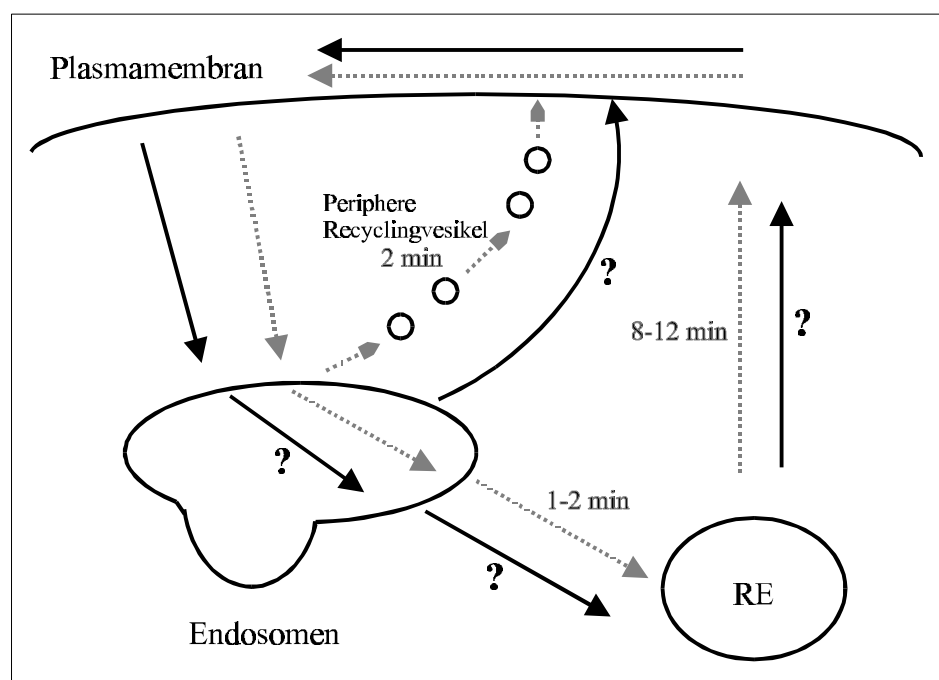


Abbildung 5.10: Schematische Darstellung des Recyclingzyklus von TFR und LAP. Der Recyclingzyklus des TFR wird durch graue, gepunktete Pfeile dargestellt, während die durchgehenden Pfeile das LAP-Recycling darstellen. Die Zeit, die für die einzelnen Transportschritte des TFR-Recyclingzyklus benötigt wird, ist neben den jeweiligen Pfeilen angegeben. Das hier vorgeschlagene Transportmodell der rezyklisierenden LAP orientiert sich am Recyclingzyklus des TFR. Die Fragezeichen verdeutlichen, daß noch nicht geklärt werden konnte, ob das LAP-Recycling über die Recycling Endosomen (RE) und/oder über periphere Recyclingvesikel abläuft.

Wahrscheinlich wird der TFR in großen tubulären Strukturen sowie in Vesikeln aus den frühen Endosomen abgeschnürt. Die Hauptfraktion akkumuliert in der perinukleären Region zu tubovesikulären Strukturen, die als Recycling Endosomen bezeichnet werden.

(HOPKINS et al. 1983a, 1983b). Nach 1-2 min sind 50 % des endozytierten Transferrinrezeptors von den frühen Endosomen in die Recyclingendosomen transportiert worden (MAYOR et al. 1993). Der Transport aus den Recyclingendosomen zur Plasmamembran dauert 8-13 min. Er ist der langsamste und folglich geschwindigkeitsbestimmende Transportprozeß des Recyclingzyklus, was zu einer Akkumulation des Transferrinrezeptors in den Recyclingendosomen führt (SCHMID et al. 1988). Bis zu 75 % des gesamten zellulären Transferrinrezeptors können in den Recyclingendosomen angestaut werden (VAN DER SLUIJS et al. 1992). Eine kleine Fraktion der Recyclingvesikel, die sich aus den Endosomen abschnüren, gelangen nicht zu den Recyclingendosomen, sondern fusionieren direkt mit der Plasmamembran (periphere Recyclingvesikel). Dadurch erscheint ein geringer Anteil des endozytierten TFR schon nach 2 min wieder auf der Plasmamembran.

Recyclingendosomen und frühe Endosomen sind endosomale Subkompartimente, zwischen denen morphologische und funktionelle Unterschiede bestehen. In den Recyclingendosomen können keine löslichen Proteine detektiert werden, die für den Weitertransport in die Lysosomen bestimmt sind, wohl aber deren rezyklisierende Rezeptoren. Außerdem haben Recyclingendosomen einen weniger sauren pH als frühe Endosomen (YAMASHIRO et al. 1984). Der TFR ist nicht gleichmäßig über die Recyclingendosomen verteilt, vielmehr konzentriert er sich in cellubrevinarmen Regionen, während er in cellubrevinreichen Region nur in geringer Dichte oder gar nicht lokalisiert werden konnte. Diese Daten weisen darauf hin, daß es sich bei den Recyclingendosomen um ein heterogenes Kompartiment handelt (TETER et al. 1998).

Durch Kolokalisationsexperimente zwischen der LAP und dem TFR, könnte geklärt werden, ob die rezyklisierende LAP die selben endosomalen Kompartimente passiert wie der TFR. Zur Identifizierung dieser Kompartimente könnten Kolokalisationen mit rab-Proteinen beitragen, die mit der Membran spezifischer endosomaler Subkompartimente und Transportvesikeln assoziieren. Für rab11 sowie rab4 wird eine heterogene Verteilung an den perinuklearen Recyclingendosomen beschrieben (DARO et al. 1996, ULLRICH et al. 1996, TETER et al. 1998). Neuere Untersuchungen mit rab-Proteinen deuten darauf hin, daß während der Genese von Recyclingendosomen rab4 assoziiert ist. Reife Recyclingendosomen weisen Rab11 als Marker auf (persönliche Mitteilung B.Sönnichsen, M Zerial). Rab4 und Rab5 wurden sowohl an frühen Endosomen sowie an peripheren Recyclingvesikeln lokalisiert (DARO et al. 1996, MELLMAN et al. 1996).

Kolokalisationsexperimente mit dem TFR sowie Rab-Proteinen könnten die endosomalen Subkompartimente charakterisieren, die die LAP im Recyclingzyklus passiert. Die Frage nach den endosomalen Sortierungsmechanismen, die die Sortierung der LAP vermitteln, kann durch diese Experimente jedoch nicht beantwortet werden. Auch für das Recycling des TFR konnte bisher noch kein Recycling-vermittelnder Sortierungsmechanismus

identifiziert werden. nicht geklärt werden. Die Tatsache, daß fluoreszenzmarkierte Phospholipide mit einer Kinetik rezirkulieren, die der TFR-WT-Kinetik entspricht, wurde bisher dahingehend interpretiert, daß das TFR-Recycling ein signalunabhängiger Prozeß ist. Hierbei stellt man sich folgendes Modell vor: Zur Zelloberfläche rezyklisierender TFR wird in den Endosomen durch einem passiven Prozeß (signalunabhängig) in langen tubulären Ausstülpungen mit großer Oberfläche und kleinem Volumen konzentriert. Diese Rezeptor-segregation geht mit der Trennung von löslichen Komponenten des Endosomenlumens einher. Diese Daten werden derzeit so interpretiert, daß Membranproteine, die nicht in die Recyclingendosomen gelangen sollen, durch aktive Retentionsmechanismen an der Diffusion in die tubulären Strukturen gehindert werden (DUNN et al. 1989, MAYOR et al. 1993). Den einzigen Hinweis auf eine Sortierungskomponente, die am Transferrinrezeptorrecycling beteiligt sein könnte, lieferten elektronenmikroskopische Daten, in denen der TFR in endosomalen, clathrinbeschichteten Abschnürungen lokalisiert werden konnte (STOORVOGEL et al. 1996). Diese beschichteten Abschnürungen unterscheiden sich in ihrer Größe (60 nm) von den clathrinbeschichteten Abschnürungen des TGN und der Plasmamembran (100 nm) und enthalten weder AP 1 noch AP 2. Epitope des Tails von TFR-Molekülen, die in diesen Strukturen lokalisiert wurden, sind jedoch für die entsprechenden Antikörper unzugänglich. Das läßt auf eine Assoziation des Tails mit einem Sortierungsfaktor schließen, der diese Epitope maskiert.

Einige Arbeiten zeigen, daß das Tyrosinmotiv der zytoplasmatischen TFR-Domäne einen Einfluß auf das TFR-Recycling hat. CHO Zellen wurden mit Bafilomycin A1 behandelt. Bafilomycin A1 inhibiert die endosomale H^+ -ATPase, was zu einem Anstieg des pH-Wertes im endosomalen Lumen führt. Die Kinetik der TFR-Endozytose sowie der Transfer von den frühen Endosomen zu den Recyclingendosomen bleibt von dieser Behandlung unbeeinflusst. Durch die Bafilomycin A1-Behandlung wird jedoch die Geschwindigkeit, mit der TFR und Lipide aus den Recycling Endosomen zur Plasmamembran rezyklisieren, verlangsamt. Hierbei wird das TFR-Recycling doppelt so stark verlangsamt, wie die Recyclinggeschwindigkeit der Lipide. Dieser Effekt kann jedoch durch die Deletion des Internalisierungsmotives im TFR-Tail oder auch nur durch die Substitution der beiden aromatischen Aminosäuren dieses Motivs aufgehoben werden (JOHNSON et al. 1993, PRESLEY et al. 1997). Somit kann das Tyrosinmotiv zu einer intrazellulären Akkumulation des TFR führen. Es stellt sich also die Frage, welchen Einfluß das Tyrosinmotiv auf die endosomale Sortierung des rezyklisierenden Transferrinrezeptors ausübt.

Unter Umständen steigert der höhere pH-Wert die Affinität des TFR-Tyrosinmotives zu einem endosomalen Sortierungsfaktor. Dadurch könnte es zu einer Interaktion zwischen dem TFR und einem endosomalen Sortierungsfaktoren kommen, die unter normalen Bedingungen nicht stattfinden kann. Es wäre denkbar, daß diese Interaktion das Recycling

unterbindet. *In vivo* Daten dieser Arbeit zeigen, daß ein spezifisches Tyrosinmotiv für die Vermittlung des Recyclings von LAP notwendig ist. BIAcore Experimente dieser Arbeit belegen, daß die spezifische Sequenz eines Tyrosinmotivs ausreichend sein kann, um die Affinität des Tails zu einem zytosolischen Sortierungsfaktoren festzulegen.

Die Ergebnisse dieser Arbeiten führen nicht nur zu einem besseren Verständnis der endosomalen Sortierung lysosomaler Membranproteine. Sie zeigen auch neue Erkenntnisse über die bisher wenig verstandene endosomale Sortierung rezyklisierender Membranproteine.

6. Zusammenfassung

Die Lysosomale Saure Phosphatase (LAP) wird in Form eines transmembranären Vorläufers synthetisiert und zu den Lysosomen transportiert. Die vorliegende Arbeit baut auf den bisherigen Untersuchungen zum LAP-Transport in BHK 21-Zellen auf, die stabil mit humaner LAP cDNA transfiziert wurden. Braun et al. zeigten, daß neusynthetisierte, membranintegrierte Vorläufer-LAP nach dem Austritt aus dem TGN zunächst zur Plasmamembran transportiert wird. Dort vermittelt das im Tail lokalisierte Tyrosinmotiv der LAP die Interaktion mit AP 2, so daß die LAP schnell internalisiert wird und in die Endosomen gelangt. Aus den frühen Endosomen wird die LAP nicht sofort in die weitere lysosomale Transportrichtung dirigiert, sondern rezirkuliert zur Plasmamembran. Zwischen der endosomalen und der plasmamembranständigen LAP-Fraktion herrscht ein dynamisches Gleichgewicht, d.h. es findet ein permanenter Austausch zwischen endosomaler und plasmamembranständiger LAP statt. 15-20% der LAP, die sich im Recycling-Pool befindet, sind auf der Plasmamembran lokalisiert während ca. 80 % in den Endosomen akkumulieren. 80 %-90 % des gesamten LAP-Vorläufers, der während eines 2-stündigen Pulse synthetisiert wurde, akkumulieren nach einem 2-stündigen in diesem Recycling-Prozeß. Der weitere Transport der LAP in die Lysosomen verläuft eher langsam. Nach 5-7 – stündigen Chase sind nur 50 % der markierten LAP aus dem Recycling-Pool abgezogen und zu den Lysosomen weitertransportiert worden. Da die LAP in einem Recycling-Prozeß akkumuliert, bevor sie zu den Lysosomen transportiert wird, unterliegt sie einem indirekten lysosomalen Transport. In den Lysosomen kann der LAP-Vorläufer für weitere 7 Stunden als lysosomales Membranprotein nachgewiesen werden. Aus diesen Vorarbeiten ergab sich die Frage nach dem Mechanismus, der das LAP-Recycling vermittelt.

Im Gegensatz zur LAP werden die lysosomalen Membranproteine Lamp1 und Limp2 auf einem direkten Weg in die Lysosomen transportiert. Sie gelangen nach dem Verlassen des TGN in die Endosomen ohne vorher die Plasmamembran zu passieren. Lamp1 und Limp2 akkumulieren nicht in einem Recycling Prozeß. Sie werden aus den Endosomen direkt zu den Lysosomen transportiert.

Um die Frage nach dem Recyclingmechanismus zu beantworten wurde im ersten Teil dieser Arbeit der Recycling-vermittelnde Sequenzbereich der LAP charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden LAP-Chimäre eingesetzt, deren zytoplasmatische Domäne gegen die zytoplasmatische Domäne von Lamp1 oder Limp2 ausgetauscht wurde. Entsprechende Lamp1- und Limp2-Chimäre trugen die zytoplasmatische LAP-Domäne. Die Untersuchungen zum Transport dieser Chimären wurden in stabil transfizierten BHK 21-Zellen durchgeführt. Die Recycling-vermittelnde LAP-Domäne konnte auf den zytoplasmatischen LAP-Tail eingegrenzt werden. Der Lamp1-Tail kann kein Recycling vermitteln. Für eine Eingrenzung des Recycling-vermittelnden Sequenzbereiches der LAP wurde das Recyclingverhalten weiterer Chimäre analysiert. Durch den

Austausch des Tyrosinmotivs im LAP-Tail (YRHV) gegen das Lamp1-Tyrosinmotiv (YQTI) konnte gezeigt werden, daß das LAP-Tyrosinmotiv des LAP-Tails für die Vermittlung des Recyclings notwendig ist. Die Analyse des Recyclingverhaltens einer Lamp1-Mutante, in der das Lamp1-Tyrosinmotiv durch das Tyrosinmotiv von LAP ausgetauscht wurde ergab, daß das LAP-Tyrosinmotiv nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend für die Vermittlung des Recyclings ist.

Die Ergebnisse des Recycling-Assays dieser Arbeit zeigen, daß die Endosomen über einen Sortierungsmechanismus verfügen, der zwischen dem Tyrosinmotiven von LAP und Lamp1 unterscheidet. Während das LAP-Tyrosinmotiv das Recycling vermittelt, ist das Tyrosinmotiv von Lamp1 für die Zurückhaltung in der Zelle verantwortlich. Folglich wurden im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal endosomale Sortierungsmotive (YRHV und YQTI) lysosomaler Membranproteine identifiziert. Es konnte noch nicht geklärt werden, welche zellulären Sortierungskomponenten an der Umsetzung dieser endosomalen Sortierungen beteiligt sind. Untersuchungen zum LAP-Recycling in μ 1-defizienten Zellen, die mit LAP mit LAP-WT cDNA stabil transfiziert wurden zeigten, daß der AP 1-Komplex keinen Einfluß auf das LAP-Recycling hat.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde überprüft, ob das Tyrosinmotiv des LAP- bzw. Lamp1-Tails ausreichend sein kann, um die Interaktion mit einer zellulären Sortierungskomponente zu bestimmen. Mit Hilfe der BIAcore-Technologie erfolgte in dieser Arbeit die Analyse der in vitro Interaktion zwischen dem synthetisierten LAP- und Lamp1-Tailpeptid mit dem AP 1 Komplex. Der verwendete AP 1-Komplex wurde aus Schweinehirn aufgereinigt. Während das Lamp1-Tailpeptid eine starke Bindung an den AP1-Komplex zeigt, interagiert das LAP Tailpeptid nicht mit dem AP 1-Komplex. Die Ergebnisse dieser Bindungsanalysen mit chimären Tailpeptiden zeigen, daß das Tyrosinmotiv von Lamp1 notwendig und ausreichend für eine starke Bindung an den AP 1-Komplex ist. Das Tyrosinmotiv der LAP kann keine Bindung mit dem AP 1-Komplex vermitteln. Die Analyse weiterer chimärer Tailpeptide zeigte, daß das Threonin (Position 2 distal zum Tyrosin) des Lamp1-Tyrosinmotives für die in vitro Interaktion mit AP 1 notwendig und ausreichend ist. Folglich können minimale Sequenzbereiche innerhalb eines Tyrosinmotivs ausreichen, um über die Interaktion mit einem Sortierungsfaktor (in diesem Fall AP 1) zu bestimmen.

7. Literaturverzeichnis

- Aguilar, R. C., Ohno, H., Roche, K. W. and Bonifacino, J. S. (1997): Functional domain mapping of the clathrin-associated adaptor medium chains μ 1 and μ 2. *J. Biol. Chem.* **272**, 27160-27166
- Ahle, S. and Ungewickell, E. (1989): Identification of a binding subunit in the HA 2 Adaptor Protein Complex. *J. Biol. Chem.* **264**, 20089-20093
- Ansorge, W. (1985): Fast and sensitive detection of protein bands by treatment with potassium permanganate. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **11**, 13-25.
- Arterburn, L. M., Earles, B. J. and August, J. T. (1990): The disulfide structure of mouse lysosomal-associated membrane protein 1. *J. Biol. Chem.* **263**, 7419-7423
- Barriocanal, J., Bonifacino, J., Yuan, L. und Sandoval, I. (1986): Biosynthesis, Glycosylation, Movement through the Golgi System, and Transport to lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins. *J. Cell Biol.* **261**, 16755-16763
- Bonofacino, J. S. and Dell'Angelica, E. C. (1999): Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J. Cell Biol.* **145**, 923-926
- Bordier, C. (1981): Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114. *J. Biol. Chem.* **256**, 1604-1607
- Bradford, M. (1976): A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**, 248-254.
- Braun, M., Waheed, A. and von Figura, K. (1989): Lysosomal acid phosphatase is transported to lysosomes via the cell surface. *EMBO J.* **8**, 3633-3640
- Campbell, C., Squicciarini, J., Shia, M., Pilch, P.F. and Fine, R. E. (1984): Identification of a protein kinase as an intrinsic component of rat liver coated vesicles. *Biochemistry* **23**, 4420-4426.
- Carlsson, S. R., and Fukuda, M. (1992): The lysosomal membrane glycoprotein Lamp1 is transported to lysosomes by two alternative pathways. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**, 630-639
- Carlsson, S. R., Lycksell, P. O. and Fukuda, M. (1993): Assignment of O-glycan attachment sites to the hinge-like regions of human lysosomal membrane glycoproteins lamp1 and lamp2. *Arch. Biochem. Biophys.* **304**, 65-73
- Chen, J. W., Pan, W., D'Souza, M. P. and August, J. T. (1985): Lysosome-associated membrane proteins: characterisation of LAMP1 of macrophage P388 and mouse embryo 3T3 culture cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **239**, 574-586

- Collawn, J. F., Stangel, M., Kuhn, L. A., Esekogwu, V., Jing, S. Q., Trowbridge, I. S. and Tainer, J.A. (1990): Transferrinreceptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell* **63**, 1061-72
- Daro, E., van der Sluijs, P., Galli, T. and Mellman, I. (1996): Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrinreceptor recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 9559-9564
- Dell'Angelica, E. C., Klumperman, J., Stoorvogel, W. and Bonifacino, J. S. (1998): Association of AP-3 adaptorcomplex with clathrin. *Science* **280**, 431-434
- Dietrich, J., Kastrup, J., Nielsen, B. L., Odum, N. and Geisler, C. (1997): Regulation and function of the CD3 γ DXLL Motif: A binding site for adaptor Protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J. Cell. Biol.* **138**, 271-281
- Fujita, H., Ezaki, J., Noguchi, Y., Kono, A., Himene, M. and Kato, K. (1991): Isolation and Sequencing of a cDNA clone encoding 85 kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 444-452
- Fukuda, M. (1991): Lysosomal membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **266**, 21327-21330
- Gallusser, A. and Kirchhausen, T. (1993): The β 1 and β 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components. *EMBO J.* **12**, 5237-5244
- Geuze, H., Slot, J. W., Strous, G. J., Hasilik, A. und von Figura, K. (1985): Possible pathways for lysosomal enzyme delivery. *J. Cell Biol.* **101**, 2253-2262
- Gottschalk, S, Waheed, A, Schmidt, B, Laidler, P. and von Figura K. (1989): Sequential processing of lysosomal acid phosphatase by a cytoplasmatic thiol proteinase and a lysosomal aspartyl proteinase. *EMBO J.* **8**, 3215-3219
- Green, S. A., Zimmer, K-P., Griffiths, G. and Ira Mellmann (1987): Kinetics of intracellular transport and sorting of lysosomal membrane and plasma membrane proteins. *J. Cell Biol.* **105**, 1227-1240
- Griffis, G., Hoflack, B., Simons, K., Mellmann, I. und Kornfeld, S. (1988): The mannose-6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* **52**, 329-341
- Guanieri, F. G., Arterburn, L. M., Penno, M. B., Cha, Y. and August, J. T. (1993): The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. *J. Biol. Chem.* **268**, 1941-1946
- Harter, C. and Mellman, I. (1992): Transport of the lysosomal membrane glycoprotein lgp 120 (lgp-A) to lysosomes does not require appearance on the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **117**, 311-325
- Hirst, J. und Robinson, M.S. (1998): Clathrin and adaptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1404**, 173-193.

- Hoflack, B. und Kornfeld, S. (1985): Lysosomal enzyme binding to mouse: P 388 D1 macrophage membranes lacking the 215 kD mannose-6-phosphat-receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 4428-4432
- Höning, S. and Hunziker, W. (1995): Cytoplasmic determinants involved in direkt lysosomal sorting, endocytosis and basolateral targeting of rat lgp 120 (lamp1) in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **128**, 321-332
- Höning, S., Griffith, J., Geuze, H. J. and Hunziker, W (1996): The tyrosine-based lysosomal targeting signal in lamp 1 mediates sorting into Golgi-derived clathrin-coated vesicles. *Embo J.* **15**, 5230-5239
- Höning, S., Sandoval, I. V. and von Figura, K. (1998): A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of Limp II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO J.* **17**, 1304-1314
- Howe, C. L (1988): Derived protein sequence , oligosaccharides, and membrane insertion of the 120 kD lysosomal membrane glycoprotein lgp 120: identification of a highly conserved family of lysosomal membrane glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7577-7581
- Hunziker, W., Harter, C., Matter, K and Mellman, I. (1991): Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell.* **66**, 907-920
- Hunziker, W. and Geuze, H. J. (1997): Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *BioEssays* **18**, 379-389
- Johnson, A. O., Gosh, R. N., Dunn, K. W., Garippa, R., Park, J., Maxfield, F. R. and Mc Graw, T. E. (1996): Transferrin receptor containing the SDYQRL motif of TGN 38 causes a reorganization of the recycling compartment but is not targeted to the TGN. *J. Cell Biol.* **135**, 1749-1762
- Kirchhausen, T, Bonifacino, J. S. and Riezmann, H. (1997): Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 488-495
- Kornfeld, S. and Mellman, I. (1989): The biogenesis of lysosomes. *Ann. Rev. Cell Biol.* **5**, 483-525.
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Le Borgne, R., Alconada, A., Bauer, U. and Hoflack, B. (1998): The mammalian AP3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 29451-29461

- Le Borgne, R., Griffith, G. and Hoflack, B. (1996): Mannose 6-phosphate receptors and ADP-ribosylation factors cooperate for high affinity interaction of the AP-1 Golgi assembly proteins with membranes. *J. Biol. Chem.* **271**, 2162-2170.
- Lehmann, L. E., Eberle, W., Krull, S., Prill, V., Schmidt, B., Sander, C., von Figura, K. and Peters, C. (1992): The internalization signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase consists of the hexapeptide PGYRHV. *EMBO J.* **11**, 4391-4399
- Lehrach, H., Frischauf, A. M. (1982): EMBL-Laboratory Manual, Heidelberg
- Lemansky, P., Hasilik, A., von Figura, K., Helmy, S. and Fishman, J. (1987): Lysosomal enzyme precursors in coated vesicles derived from the exocytic and endocytic pathways. *J. Cell Biol.* **104**, 1743-1748
- Lemansky, P., Gieselmann, V., Hasilik, A. and von Figura, K. (1985): Synthesis and transport of lysosomal acid phosphatase in normal and I-cell fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **260**, 9032-9030
- Lewis, V., Green, S., March, M., Vihko, P., Helenius, A. and Mellman, I. (1985): Glycoproteins of the lysosomal membrane. *J. Cell Biol.* **100**, 1839-1847
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the folin reagents. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- MacPerson, I.A. and Stoker, M.G.P. (1962): *Virology*, **16**, 147
- Manfredi, J. J. and Bazari, W. L. (1987): Purification and characterization of two distinct complexes of assembly polypeptides from calf brain coated vesicles that differ in their polypeptide composition and kinase activities. *J. Biol. Chem.* **262**, 12182-12188.
- Marks, M. S., Ohno, H., Kirchhausen, T. and Bonifacino, J. S. (1997): Protein sorting by tyrosine-based signals: adapting to the Ys and wherefores. *Trends in Cell Biol.* **7**, 124-127
- Marsh, M., Griffith, G., Dean, G., Mellman, I., and Helenius, A. (1983): A quantitative analysis of the endocytic pathway in baby hamster kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2899-2903.
- Marsh, E. W., Leopold, P., Jones, N. L. and Maxfield F. R. (1995): Oligomerized transferrin receptors are selectively retained by a luminal sorting signal in a long-lived endocytic recycling compartment. *J. Cell Biol.* **129**, 1509-1522
- Mauxion, F., Le Borgne, R., Munier-Lehmann, H. and Hoflack, B. (1996): A casein kinase II phosphorylation site in the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor determines the high affinity interaction of the AP-1 Golgi assembly proteins with the membrane. *J. Biol. Chem.* **271**, 2171-2178
- Mayor, S., Presley, J. F. and Maxfield, F. R. (1993): Sorting of membrane components and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *J. Cell Biol.* **121**, 1257-1269

- Mellman, I. (1996): Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 575-625
- Nilsson, T., Hoe, M. H., Sulsarewicz, P., Rabouille, C., Watson, R., Hunte, F., Watzel, G., Berger, E. and Warren, G. (1994): Kin recognition between medial Golgi enzymes in HeLa cells. *EMBO* **13**, 562-574
- Ohno, H., Fournier, M., Poy, G., and Bonifacino, J.S. (1996): Structural determinants of interaction of tyrosine-based sorting signals with the adaptor medium chains. *J. Biol. Chem.* **271**, 29009-29015
- Ohno, H., Aguilar, R. C., Yeh, D., Taura, D., Saito, T and Bonifacino, J. S (1998): The medium subunits of adaptor complexes recognize distinct but overlapping sets of tyrosine-based signals. *J. Biol. Chem.* **273**, 25915-25921
- Peters, C., Braun, M., Weber, B., Wendland, M., Schmidt, B., Pohlmann, R., Waheed, A. and von Figura, K. (1990): Targeting of a lysosomal membrane protein: a tyrosine-containing endocytosis signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase is necessary and sufficient for targeting to lysosomes. *EMBO J.* **9**, 3497-3506
- Peterson, G. L. (1977): A simplification of the protein assay method of Lowry et al. (1951) which is more generally applicable. *Analyt. Biochem.* **82**, 346-356
- Pohlmann, R., Krentler, C., Schmidt, B., Schröder, W., Lorkowski, G., Culley, J., Mersmann, G., Geier, C., Wahhed, a., Gottschalk, S., Grzeschik, K.-H., Hasilik, A. and von Figura K (1988): Human lysosomal acid phosphatase: Cloning, expression and chromosomal assignment. *EMBO J.* **7**, 2343-2350
- Presley, J. F., Mayor, S., McGraw, T. E., Dunn, K. W. and Maxfield, F. R. (1997): Bafilomycin A1 treatment retards transferrin receptor recycling more than bulk membrane recycling. *J. Biol. Chem.* **272**, 13929-13936
- Rapoport, I., Chen, Y.C., Cupers, P., Shoelson, S. E. and Kirchhausen, T. (1998): Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP 1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *EMBO J.* **17**, 2148-2155
- Reaves, B. J., Banting, G. and Luzio, P (1998): Luminal and transmembrane domains play a role in sorting type I membrane proteins on endocytic pathways. *J. Cell Biol.* **8**, 1107-1122
- Reitmann, S. and Kornfeld, S. (1981): Lysosomal enzyme targeting. *J. Biol. Chem.* **256**, 11977-11980
- Rohrer, J., Schweitzer, A., Russel, D. and Kornfeld, S. (1996): The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosin motif relative to the membrane. *J. Cell Biol.* **132**, 565-76

- Sahaagian, G., Diestler, J. and Jourdian, G. (1981): Characterisation of a membrane dissociated receptor from bovine liver that binds phosphomannosyl-residues of bovine testicular β -galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 4289-4293
- Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1986): Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allelespecific oligonucleotide probes. *Nature* **324**, 163-166
- Saiki, R. K., Gelfand, H. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Ehrlich, H. A. (1988): Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DANN polymerase. *Science* **239**, 487-491
- Sandoval, I. V., Arredondo, J. J., Alcalde, J., Noriega, G. A., Vandekerckhove, J., Jimenez, M. and Rico, M. (1994): The residues Leu (Ile)475-Ile(Leu, Val, Ala)476, contained in the extended carboxyl cytoplasmic tail, are critical for targeting of the resident lysosomal membrane protein Limp2 to lysosomes. *J. Biol. Chem.* **269**, 6622-6631
- Sanger, S., Nickeln, S. and Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **74**, 5463-5467
- Sawada, R., Lowe, J. B. and Fukuda, M. (1993): E-selektin-dependent adhesion efficiency of carcinoma cells is increased by genetic manipulation of their cell surface lysosomal membrane glycoprotein 1 expression levels. *J. Biol. Chem.* **268**, 12675-12681
- Schmid, S. L. and Rothman, J. E. (1997): Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting. *Ann. Rev. Biochem.* **66**, 511-548.
- Sheff, D. R., Daro, A., Hull, M. and Mellman, I. (1999): The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *J. Cell Biol.* **145**, 123-139
- Simpson, F., Bright, N. A., West, M. A., Newman, L. S., Darnell, R. B. and Robinson, M. S. (1996): A novel adaptor-related protein complex AP-3. *J Cell Biol.* **133**, 749-760
- Sosa, M. A., Schmidt, B., von Figura, K. and Hille-Rehfeld, A. (1993): In vitro binding of plasmamembrane -coated vesicle adaptors to the cytoplasmic domain of lysosomal acid phosphatase. *J. Biol. Chem.* **268**, 12537-12543
- Stephens, J. and Banting, G. (1998): Specific interaction between adaptor-complex medium chains and the tyrosin-based sorting motifs of TGN38 and lgp120. *J. Biochem* **335**, 567-572
- Stoorvogel, W., Oorschot, V. and Geuze, H. J. (1996): A novel class of clathrin-coated vesicles budding from endosomes. *J. Cell Biol.* **132**, 21-33

- Teter, K., Chandy, G., Quinones, B., Pereyra, K. Machen, T. and Moors, H-P. H. (1998): cellubrevin-targeted fluorescence uncovers heterogeneity in the recycling endosomes. *J. Biol. Chem.* **273**, 19625-19633
- Traub, L. M., Ostrom, J. A. and Kornfeld, S. (1993): Biochemical dissection of AP-1 recruitment onto Golgi membranes. *J. Cell Biol.* **123**, 561-573.
- Van der Sluijjs, P., Hull, M., Webster, P., Male, P., Goud, B. and Melman, I (1992): The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* **70**, 729-40
- Van der Sluijjs, P., Hull, M., Zahraoui, A., Tavitian, A., Gould, B. and Melman, I (1992): The small GTP-binding protein rab4 is associated with early endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 6313-6317
- Vega, M. A. (1991a): Cloning, sequencing and expression of a cDNA encoding rat limpII, a novel 74 kD lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. *J. Biol. Chem.* **266**, 16818-16824
- Vega, M. A., Rodriguez, F., Segui, B., Cales, C., Alcalde, J. and Sandoval, I. V. (1991b): Targeting of lysosomal integral membrane protein LimpII. *J. Cell Biol.* **266**, 16269-16272
- Waheed, A., Gottschalk, S., Hille, A., Krentler, C., Pohlmann, R., Bräulke T., Hauser, H., Geuze, H and von Figura, K. (1988): Human lysosomal acid phosphatase is transported as a transmembrane protein to lysosomes in transfected baby hamster kidney cells. *EMBO J.* **7**, 2351-2358
- Williams, M. A. and Fukuda, M. (1990): Accumulation of membrane glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail. *J. Cell Biol.* **111**, 955-966
- Wolins, N., Bosshart, H., Küster, H. and Bonifacino, J. S. (1997): Aggregation as a determinant of protein fate in post-Golgi compartments: Role of the luminal Domain of Furin in lysosomal targeting. *J. Cell Biol.* **274**, 1735-1745
- Yamashiro, D. J. and Maxfield, F. R. (1984): Acidification of endocytic compartments and the intracellular pathway of ligands and receptors. *J. Cell Biochem.* **26**, 231-46

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Kurt von Figura möchte ich für seine Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft danken. Seine Anregungen und Kritik haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Stefan Höning danke ich für die Betreuung dieser Arbeit sowie die vielen guten Ideen an der richtigen Stelle.

Bei Herrn Prof. Dr. Gottschalk bedanke ich mich für die Übernahme des Korefferates.

Frau Christina Kiecke danke ich für die Einführung in die molekularbiologischen Techniken und für die besonders hilfreiche Unterstützung während der letzten Phase dieser Arbeit.

Ein herzlicher Dank gilt Anja Fingerhut, Chris Mühlhausen, Christian Körner, Torben Lübcke, Bengt Hanske, Leopoldine Sander, Christian Thiel, Jutta Moschner und Nadine Nolte für die Hilfsbereitschaft und außerordentlich nette Atmosphäre. Hier möchte ich noch darauf hinweisen, daß mir der eigenwillige Humor von Christian Körner in schweren Stunden immer eine besonders große Hilfe war. Außerdem danke ich Anja Fingerhut ganz besonders für ihre Unterstützung und Zuverlässigkeit. Es hat sehr viel Spaß gemacht mit Dir zusammenzuarbeiten.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Figura für ihre Hilfsbereitschaft. Herrn Klaus Neifer danke ich für die zahlreichen Peptidsynthesen.

Dem Graduiertenkolleg „Signal-vermittelter Transport von Proteinen und Vesikeln“ danke ich für die interessanten Praktika und Vorträge.

Ein besonders großer Dank gebührt Jutta für die das engagierte Korrekturlesen dieser Arbeit und die nahezu selbstlose Hilfsbereitschaft bei allen Computerfragen. Deine Unterstützung war mir in der letzten Phase dieser Arbeit eine besonders wertvolle und unverzichtbare Hilfe.

Meinen Eltern und meinem Bruder Christian möchte ich für die vielen großen und kleinen Hilfen danken. Eure liebevolle Unterstützung hat mir sehr viel Kraft gegeben.