Aus der Abteilung Biochemie II (Komm. Leiter: Prof. Dr. rer. nat. M. Thumm) im Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# Analyse der putativen AP-3-Funktion für die Vesikelbildung am Trans-Golgi-Netzwerk

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

> vorgelegt von **Björn Chapuy** aus Kassel

Göttingen 2005

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

I. Berichterstatter: Höning, S.; PD Dr. rer. nat.

II. Berichterstatter/-in: Brose, N.; Prof. Dr. rer. nat

III. Berichterstatter/-in:

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Januar 2006

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ad	bis
AP	Adaptor Proteinkomplex
AP-1	Adaptor Proteinkomplex-1
AP-2	Adaptor Proteinkomplex-2
AP-3	Adaptor Proteinkomplex-3
AP-4	Adaptor Proteinkomplex-4
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
CCP	Clathrin-beschichtete Einstülpung (engl. "clathrin
	coated pit")
CCV	Clathrin-beschichtetes Vesikel (engl. "clathrin coated
	vesicle")
СНС	große Clathrinkette (engl. "Clathrin heavy chain")
СР	beschichtete Einstülpung (engl. "coated pit")
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
CV	beschichtetes Vesikel (engl. "coated vesicle")
DMEM	Dulbecco's modified Eagle-medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	frühe Endosomen (engl. " early endosomes")
FKS	fetales Kälberserum
GGA	"Golgi-localized, gamma-ear-containing, ARF-binding
	proteins"
lif	Indirekte Immunfluoreszenz
kDa	Kilodalton
L	Lysosom

Lamp	"lysosomal-associated membrane protein"
LAP	"lysosomal-acid phosphatase"
LDL	"low-density lipoprotein"
LDL-R	"Low-density lipoprotein-receptor"
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
LE	späte Endosomen (engl. "late endosomes")
LIMP	engl. "lysosomal-integral-membrane-protein"
LROs	Lysosomen-verwandte Orgalnellen (engl. lysosomal-
	related organells)
MEF	Maus-embryonale Fibroblasten
MHCII	Haupthistokompatibilitäts Antigen II (engl. "major-
	histocompatibility complex")
M6P	Mannose-6-phosphat
MPR(s)	Mannose-6-phosphat-Rezeptor(en)
OA	Okulärer Albinismus
OCA	Okulokutaner Albinismus
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PM	Plasmamembran
PNS	postnukleärer Überstand (engl. "post-nuclear
	supernatant")
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. "rounds per minute")
RE	"recycling endosomes"
RER	Raues Endoplasmatisches Retikulum
RT	Raumtemperatur
SEK V	Sekretorische Vesikel
SER	Glattes endoplasmatisches Retikulum
SV	Synaptische Vesikel
Tab.	Tabelle
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TRP	"tyrosinase-related peptid"
v/v	engl. für Volumen (ml) pro Volumen (100 ml)
w/v	engl. für Gewicht (g) pro Volumen (100 ml)

# Inhaltsverzeichnis

## 1 Einleitung

1.2 Lysosomen-verwandte Organellen (LROs)3
1.3 Vorkommen und Funktion der Melanosomen5
1.4 Lysosomale Transportwege7
1.5 Sortierungssignale in Membranproteinen11
1.6 Erkennen der Sortierungssignale durch zytosolische Faktoren         13
1.7 Fragestellung 20

## 2 Material und Methoden

2.1 Mate	2.1 Material		
2.1.1	Geräte	21	
2.1.2	EDV	23	
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	23	
2.1.4	Chemikalien	24	
2.1.5	Enzyme	26	
2.1.6	Kits zur Bearbeitung von DNS und Proteinen	26	
2.1.7	Vektoren und DNS-Standards	26	
2.1.8	Proteine, Proteinaseinhibitoren und Proteinstandards	26	
2.1.9	Antikörper		
	2.1.9.1 Primärantikörper	27	
	2.1.9.2 Sekundärantikörper	29	
2.1.10	Radioaktive Substanzen	29	
2.1.11	Bakterien, Mausstamm und Zelllinien	29	
2.1.12	Gebräuchliche Puffer	30	
2.1.13	Lösungen für die Arbeit in der eukaryontischen Zellkultur	30	
2.1.14	Komplettierung von RPMI-Kulturmedium für melan-a-Zellen	31	
2.1.15	Medien für die Bakterienkultur	32	
2.2 Zellb	viologische Methoden	32	
2.2.1	Kultivierung von Zellen	32	
2.2.2	Passagieren von Zellen	32	
2.2.3	Kryokonservierung von Zellen	33	
2.2.4	Revitalisierung von Zellen	33	

2.2.5	Präparation primärer, embryonaler Mausfibroblasten nach terminierter	
	Verpaarung	34
2.2.6	Transfektion eukaryonter Zellen mittels CaCl <sub>2</sub>	35
2.2.7	Stabile Transfektion eukaryonter Zellen mittels Effecten <sup>TM</sup>	36
2.2.8	Selektion stabil transfizierter melan-a-Zellen	36
8 Mole	kularbiologische Methoden	37
2.3.1	Konzentrationsbestimmung von DNS	37
2.3.2	Präparation transformationskompetenter E.coli	37
2.3.3	Transformation kompetenter E.coli mit Plasmid-DNS	38
2.3.4	Anlegen einer <i>E.coli</i> -Glycerinkultur	38
2.3.5	Klonale Plasmidamplifikation nach Qiagen	
	2.3.5.1 Mini Präp	39
	2.3.5.2 Midi Präp	39
2.3.6	Spaltanalyse von DNS mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen	40
2.3.7	Auftrennen der DNS in Agarosegelen	41
Prote	inbiochemische Methoden	42
2.4.1	Proteinbestimmung nach Bradford	42
2.4.2	Proteinbestimmung nach BioRad-DC-Protein-Assay	42
2.4.3	Wessel-Flügge-Fällung	43
2.4.4	TCA-Fällung	44
2.4.5	Enzymaktivitätsmessungen	
	2.4.5.1 β-Hexosaminidase	44
	2.4.5.2 Galactosyltransferase	45
2.4.6	SDS-PAGE (Minigele)	46
2.4.7	Färbung von Polyacrylamidgelen mit kolloidaler Coomassie-Lösung	48
2.4.8	Westernblot	
	2.4.8.1 Nassblot auf Nitrozellulosemembranen	48
	2.4.8.2 Immundetektion	49
2.4.9	Metabolische Markierung mittels [ <sup>35</sup> S]-Met/Cys	50
2.4.10	Immunpräzipitation	51
2.4.11	Endoglykosidase-H-Verdau	54
2.4.12	Isoelektrische Fokussierung (IEF) der Tyrosinase	55
2.4.13	Herstellung eines Polyklonalen Immunserums aus Kaninchen	
	gegen Tyrosinase und TRP-1	57
5 Mikro	oskopische Techniken	59
2.5.1	Trypanblaufärbung	59
2.5.2	Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)	
	2.5.2.1 Steady state	60
	2.5.2.2 Dynamische Endozytose	61
2.5.3	Immunogoldmarkierung von TRP-1 und dessen Nachweis in der	
	Elektronenmikroskopie an Kryo-Ultradünnschnitten	62
	2.2.5 2.2.6 2.2.7 2.2.8 <b>Mole</b> 2.3.1 2.3.2 2.3.3 2.3.4 2.3.5 2.3.6 2.3.7 <b>Prote</b> 2.4.1 2.4.2 2.4.3 2.4.4 2.4.5 2.4.4 2.4.5 2.4.4 2.4.5 2.4.4 2.4.5 2.4.4 2.4.5 2.4.4 2.4.5 2.4.10 2.4.11 2.4.12 2.4.13 <b>Mikro</b> 2.5.1 2.5.2 2.5.3	<ul> <li>2.2.5 Präparation primärer, embryonaler Mausfibroblasten nach terminierter Verpaarung</li> <li>2.2.6 Transfektion eukaryonter Zellen mittels CaCl₂</li> <li>2.7 Stabile Transfektion eukaryonter Zellen mittels Effecten™</li> <li>2.2.8 Selektion stabil transfizierter <i>melan-a</i>-Zellen</li> <li>3.1 Konzentrationsbestimmung von DNS</li> <li>2.3.2 Präparation transformationskompetenter <i>E.coli</i></li> <li>3.3 Transformation kompetenter <i>E.coli</i> mit Plasmid-DNS</li> <li>2.3.4 Anlegen einer <i>E.coli</i>-Glycerinkultur</li> <li>2.3.5 Klonale Plasmidampilfikation nach Qiagen 2.3.5.1 <i>Mini Präp</i> 2.3.5.2 <i>Midi Präp</i></li> <li>2.3.6 Spattanalyse von DNS mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen</li> <li>2.3.7 Auftrennen der DNS in Agarosegelen</li> <li>Proteinbochemische Methoden</li> <li>2.4.1 Proteinbestimmung nach BioRad-DC-Protein-Assay</li> <li>2.4.3 Wessel-Flügge-Fällung</li> <li>2.4.4 TCA-Fällung</li> <li>2.4.5 <i>Lacktosyltransferase</i></li> <li>2.4.6 SDS-PAGE (Minigele)</li> <li>2.4.8.1 Nassblot auf Nitrozellulosemembranen 2.4.8.2 <i>Immundetektion</i></li> <li>2.4.8.1 Nassblot auf Nitrozellulosemembranen 2.4.8.2 <i>Immundetektion</i></li> <li>2.4.9 Metabolische Markierung mittels [<sup>35</sup>S]-Met/Cys</li> <li>2.4.10 Immunpräzipitation</li> <li>2.4.11 Endoglykosidase-H-Verdau</li> <li>2.4.12 Isoelektrische Fokussierung (IEF) der Tyrosinase</li> <li>2.4.13 Herstellung eines Polyklonalen Immunserums aus Kaninchen gegen Tyrosinase und TRP-1</li> <li>5.1 Trypanblaufärbung</li> <li>2.5.2 Isteady state 2.5.2.2 Dynamische Endozytose</li> <li>2.5.3 Immungoldmarkierung von TRP-1 und dessen Nachweis in der Elektronenmikroskopie an Kryo-Ultradünnschnitten</li> </ul>

	2.5.3.1 Primärfixierung der Proben	62
	2.5.3.2 Nachfixierung	63
	2.5.3.3 Ultramikrotomie	63
	2.5.3.4 Markierung	63
2.5.4	Darstellung von Donor und Vesikeln durch Negativkontrastierung in der	
	Elektronenmikroskopie	64
	2.5.4.1 Vorbereitung der Probe	65
	2.5.4.2 Fixierung und Nachkontrastierung	66
2.6 In-vi	tro-Golgi/TGN-Budding-Assay	67
2.6.1	Membranpräparation	68
	2.6.1.1 Ausplattieren von Zellen	68
	2.6.1.2 Metabolische Markierung	68
	2.6.1.3 Temperaturblock	68
	2.6.1.4 Zellaufschluss und PNS-Präparation	68
	2.6.1.5 Subzelluläre Fraktionierung mittels	
	Dichtegradientenzentrifugation	71
2.6.2	Zytosolpräparation	75
	2.6.2.1 Zytosol aus Zellkulturzellen	75
	2.6.2.2 Zytosol aus Schweinehirn	76
2.6.3	Buddingbedingungen	76
2.6.4	Separation von Vesikeln und Donormembranen	80
Frach	nicco	

# 3 Ergebnisse

3.1 Ge	winnung von Tyrosinase- und TRP-1-spezifischen	
An	tikörpern	82
3.2 Eta	ablierung einer embryonalen, δ-adaptin-defizienten	
Fib	problastenzelllinie ( <i>mocha</i> )	85
3.3 Ze	llsystem	87
3.3.	1 Humane MPR46 exprimierende melan-a-Zellen	87
3.3.	2 Subzellluläre Lokalisation von Membranproteinen und Adaptoren in	
	<i>melan-a-</i> Zellen	89
3.4 Eta	blierung und Charakterisierung der Basiskomponenten des	
Go	lgi/TGN-Budding-Assays	91
3.4.	2 Zellaufschlussoptimierung und Gewinnung des PNS	92
3.4.	2 Charakterisierung des linearen Saccharosegradienten mittels subzellulärer	
	Fraktionierung	94
3.4.	3 Schnelle Donormembranpräparation mittels eines Step-Gradienten	96
3.4.	Analyse des Glykosylierungsmusters der neu-synthetisierten Proteine	
	mittels pulse chase IEF und Endoglykosidase-H-Digestion zum Nachweis	

	der Signifikanz des Temperaturblocks	99	
3.4.5	Nachweis des Temperaturblocks mittels Elektronenmikroskopie	103	
3.4.6	Charakterisierung der Zytosolpräparation	105	
3.5 Analy	3.5 Analysen mit dem Golgi/TGN-Budding-Assay		
3.5.1	Funktionalität der Donormembranen und Separation von Vesikeln		
	und Donor	106	
3.5.2	Dokumentation der Morphologie des Donors und der Vesikel in		
	der Elektronenmikroskopie	108	
3.5.3	Nachweis der Golgi/TGN-Herkunft der Cargo-Proteine im Vesikelpool	111	
	in der Elektronenmikroskopie		
3.5.4	Das Budding ist abhängig von der Temperatur, von ATP/GTP und		
	der Zytosolkonzentration	112	
3.5.5	ARF1-Abhängiggkeit des Buddings	116	
3.5.6	Verteilung der Adaptoren während eines Budding-Assays	117	
3.5.7	Das Budding ist adaptorabhängig	120	

### 4 Diskussion

4.1 E	Budd	ling-Assay	123
4	.1.1	Aufbau eines Golgi/TGN-Budding-Assays	123
4	.1.2	Gewinnung von Donormembranen aus melan-a-Zellen	123
4	.1.3	Charakterisierung der Donormembranen	124
4	.1.4	Befunde aus dem Golgi/TGN-Budding-Assay	126
4	.1.5	Kritische Anmerkungen	127
4	.1.6	Weitere Bedeutung des Assays und Ausblick	128
4.2 E	Einze	elheiten bei der Bildung von Clathrin-	
	besc	hichteten Vesikeln (CCVs)	130
4	.2.1	Die Interaktion von Tyrosin-haltigen Motiven mit AP-2	131
4	.2.2	Die Rolle von GGAs und AP-1A	131
4	.2.3	Die Bildung eines MPR-beladenen CCVs am TGN	134
4	.2.4	Die Rolle von AP-3 am TGN	137
4.3 Z	Zur S	ortierung melanosomaler Proteine	140
4	.3.1	Die Biogenese von Melanosomen nach dem klassischen Modell	140
4	.3.2	Implikationen der gezeigten Adaptorfunktionen für den Wandel der Modelle	141
4.4 M	Mem	bransortierung und Transport-assoziierte Erkrankungen	142

5	Zusai	nmen	fassi	ung
---	-------	------	-------	-----

## 6 Anhang

	6.1 Einbuchstabencode der Aminosäuren	146
	6.2 Überblick über alle zur Zeit bekannten LROs: Vorkommen, Inhalt	
	und Funktion	147
	6.3 Übersicht über Transport-assoziierte Erkrankungen	148
7	Literaturverzeichnis	149

## 1 Einleitung

Die eukaryonte Zelle enthält verschiedene, membranumschlossene Organellen mit jeweils spezifischen Funktionen. Diese Kompartimentierung der Zelle setzt bei jedem Organell eine andersartige, dauerhafte Membrankomposition voraus. Für Lipidhomöostase in die nötige Proteinund den einzelnen Organellmembranen werden Proteine nach ihrer Biosynthese erkannt, von anderen separiert und zu ihrem letztendlichen Ziel transportiert. Dieser Transport wird in der Zelle für die meisten Organellen durch kleine, membranumschlossene Bläschen, sogenannte Vesikel, gewährleistet und daher vesikulärer Transport genannt. Dabei knospen die Vesikel von einer Ursprungsmembran (Donormembran) ab und fusionieren mit einer Zielmembran (Akzeptormembran). Neben membranständigen Proteinen können hierdurch auch lösliche Moleküle vom Donorkompartiment zum Akzeptorkompartiment transportiert werden.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Analyse von Mechanismen, die bei der Vesikelknospung am Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) lysosomale und melanosomale Membranproteine von anderen Proteinen separieren.

#### 1.1 Lysosomen

(Kornfeld & Mellman 1989; Pollard & Earnshaw 2002, S. 370f)

Während im zytosolischen Proteasom der überwiegende Teil intrazellulären Materials degradiert wird, stellen die über 100 Lysosomen einer tierischen Zelle den Hauptort der Degradation von extrazellulärem Material dar. Ein kleinerer Teil intrazellulären Materials wird in Form von "gealterten" Organellen durch den Prozess der Autophagozytose ebenfalls lysosomal degradiert (Shintani & Klionsky 2004). Zudem können Lysosomen auch Ca<sup>++</sup>-abhängig mit der Plasmamembran verschmelzen und dadurch einen Membranschaden reparieren (Reddy et al. 2001).

Ein charakteristisches Merkmal von Lysosomen ist der saure pH-Wert von ca. 4,8, der durch eine direkte, ATP-abhängige Protonenpumpe vom sog. V-Typ aufrechterhalten wird (Cuppoletti et al. 1987). Der dadurch aufgebaute azide pH-Wert ermöglicht ein optimales Milieu für die degradierenden Enzyme des Lysosoms. Lysosomale Enzyme werden deshalb in ihrer Gesamtheit auch als saure Hydrolasen bezeichnet, zu denen u.a. Proteasen, Nukleasen wie auch Glykosidasen, Sulfatasen und Phosphatasen gehören. Nach Abbau der Makromoleküle in einzelne Monomere verlassen diese das Lysosomenlumen durch spezifische Transportkanäle (siehe auch von Figura & Hasilik 1986) und stehen der Zelle zur erneuten Synthese von Makromolekülen bereit. Neben den sauren Hydrolasen zeichnen sich Lysosomen auch durch ihre besondere Membrankomposition aus (Howe et al. 1988). Dazu gehört außer spezifischen Transportproteinen und Ionenkanälen vor allem eine dichte Verteilung an hoch glykosylierten Membranproteinen (siehe Abb. 1):



**Abbildung 1: Topologie von lysosomalen Membranproteinen:** Alle hier gezeigten Glykoproteine weisen im luminalen Anteil einen hohen Grad an Glykosylierung auf, während in dem kurzen zytoplasmatischen Anteil für die Sortierung wichtige Signale lokalisiert sind. Nach der Art der Verankerung in der Lipiddoppelschicht lassen sich Proteine mit einem Membrananker, wie Lamp-1, Lamp-2 und LAP, von denen mit zwei oder mehr Membranankern unterscheiden: Limp-1 und Limp-2. Die "Kugeln" symbolisieren Glykosylierungsstellen. Weitere Informationen bei Hunziker & Geuze (1996); Lamp = lysosomal-associated membrane-protein; Limp = lysosomal-integral membrane-protein; LAP = lysosomal-acid phosphatase.

Die genaue Aufgabe dieser Membranglykoproteine ist derzeit noch umstritten, jedoch scheint eine wesentliche Aufgabe im Erhalt der Membranintegrität in

Anwesenheit von der hohen katalytischen Aktivität der maturen, sauren Hydrolasen zu liegen (Hunziker & Geuze 1996). Außerdem gibt es Evidenz für die Beteiligung lysosomaler Membranproteine beim Molekültransport aus dem Zytoplasma in das Lumen von Lysosomen (Cuervo & Dice 1996). Zudem konnte in zwei Arbeiten gezeigt werden, dass ein lysosomales Membranprotein (Lamp-2) als essentielle Komponente an der Autophagozytose beteiligt ist und ein Fehlen von Lamp-2 zur humanen Danon-Erkrankung führt (Nishino et al. 2000; Tanaka et al. 2000).

Abgrenzend zu anderen Organellen des endozytotischen und sekretorischen Weges werden die Lysosomen wegen ihrer morphologischen Heterogenität im Allgemeinen als membranumgrenzte Organellen mit azidem pH-Wert bezeichnet, die reife saure Hydrolasen und lysosomale Membranproteine enthalten und für Endozytosemarker zugänglich sind. Von den endosomalen Subpopulationen grenzen sie sich dadurch ab, dass sie keine Rezeptoren für den Transport saurer Hydrolasen (sog. Mannose-6-phosphat-Rezeptoren = MPRs) oder andere zur Plasmamembran rezyklisierende Rezeptoren, wie z.B. den Transferrin-Rezeptor, besitzen (Kornfeld & Mellman 1989).

#### 1.2 Lysosomen – verwandte Organellen (LROs)

(Dell'Angelica et al. 2000a; Marks & Seabra 2001; Raposo & Marks 2002; Blott & Griffiths 2002)

Neben Lysosomen besitzen viele spezialisierte Zellen andere Organellen, die trotz morphologischer und funktioneller Heterogenität Ähnlichkeiten zu klassischen Lysosomen besitzen. Dazu gehört außer der Ausstattung mit den für Lysosomen typischen Membranproteinen und sauren Hydrolasen die Erreichbarkeit für Endozytosemarker und der azide pH-Wert. Organellen, die diese Eigenschaften mit ubiquitären Lysosomen teilen, werden als "lysosomalreleated-organells" bezeichnet (LROs). Daneben zeichnen sich LROs durch die Fähigkeit aus, ihren Inhalt zu speichern und diesen oder das Organell selbst per regulierter Exozytose an die Umgebung abzugeben. Aufgrund dieser Eigenschaft, die LROs mit "Speichergranula" ("secretory granules") teilen, werden LROs auch "secretory lysosomes" genannt. LROs sind gewebs-spezifisch und typisch für enddifferenzierte Zellen mit hochspezialisierten Funktionen. Zu den LROs zählen so unterschiedliche Organellen wie die Melanosomen der Melanozyten, die MHCII-Kompartimente in den Antigenpräsentierenden Zellen oder die "dense granules" in Thrombozyten (Abb. 2):



Abbildung 2: Lysosomal-related organells (LROs): Die Abbildung zeigt die mittels EM detektierte Morphologie verschiedener LROs. A: Melanosomen (Pfeilspitze) in Pigmentepithelzelle der Mausretina; B: lytisches Granular eines Zytotoxischen T-Lymphozyten mit einer Immunogoldmarkierung von Lamp-1 und Granzym-B; C: MIIC eines B-Lymphozyten mit MHCII- und Lamp-1-Immunogoldmarkierung; D: schwarz angefärbtes "dense granular" (Pfeilspitze) in einem Thrombozyten; modifiziert nach Dell'Angelica et al. (2000a), S. 1266.

Typisch für LROs ist das Vorhandensein zusätzlicher Komponenten, die für die spezifische Funktion des jeweiligen LRO verantwortlich sind. Ein Beispiel für LROs sind Melanosomen der Melanozyten. Da in der vorliegenden Arbeit Melanozyten als Zellsystem benutzt werden, sollen sie in der Folge näher beleuchtet werden. Für eine Auflistung aller z.Z. zu den LROs gezählten Organellen, deren Vorkommen, Inhalt und zur postulierten Funktion sei auf Abschnitt 6.2 verwiesen.

#### 1.3 Vorkommen und Funktion der Melanosomen

(Dell'Angelica et al. 2000a; Marks & Seabra 2001; Blott & Griffiths 2002)

Melanosomen finden sich u.a. in den dendritischen Melanozyten der Haut und sind dort morphologisches Korrelat der Hautfarbe (siehe Abb. 3). Sie dienen als Ort der Synthese und Speicherung einer verwandten Gruppe von Pigmenten,



den sogenannten Melaninen. Da die melanosomalen Melanine einfallendes Licht absorbieren, gewährleisten sie somit den UV-Schutz der Haut. Von den zwei Klassen der Melanine, den Phäorotbraunen melaninen und den Euschwarzbraunen melaninen, beziehen sich Überalle weiteren die legungen auf Eumelanine.

**Abbildung 3: Melanozyten:** Innerhalb der Ontogenese siedeln sich Melanozytenvorläufer aus der Neuralleiste im Stratum basale der Epidermis an. Ihrem Ursprung entsprechend nehmen sie keinen direkten Kontakt zu Nachbarzellen auf, reichen aber mit ihren Ausläufern bis ins Stratum spinosum. Nach erfolgter Biosynthese wandern die reifen Melanosomen entlang von Mikrotubuli in die Dendriten, wo sie an Aktin gebunden arretiert werden, bevor sie letztendlich an die umliegenden Keratinozyten durch einen noch nicht abschließend geklärten Mechanismus abgegeben werden. Innerhalb der Epidermis siedeln sich Melanozyten einem festen Verteilungsmuster entsprechend an; meist finden sich ca. 36 Keratinozyten auf einen Melanozyten. Unterschiede zwischen den einzelnen Hauttypen kommen nicht durch unterschiedliche Melanozytenzahl, sondern durch differentes Verteilungsmuster und Größe der Melanosomen zustande. Modifiziert nach Nordlund et al. (1998), S. 108.

Die Eumelaninbildung in den Melanosomen beginnt mit einer Hydroxylierung der Aminosäure (AS) L-Tyrosin durch das membranständige Enzym Tyrosinase. Neben diesem Schlüsselenzym sind zwei weitere, ebenfalls membranständige Enzyme, TRP-1 und TRP-2, für die Bildung von Eumelaninen zuständig (siehe Abb. 4).



Diese drei membranständigen Enzyme finden sich nur in den Membranen der hochspezialisierten Melanosomen. Eine Funktionsstörung bzw. der Funktionsverlust einer der drei genannten Enzyme führt zur Hypopigmentierung oder sogar zur völligen Abwesenheit von Pigmentierung des betroffenden Individuums (Albinismus). Prinzipiell wird dabei ein rein auf die Augen beschränkter okulärer Albinismus (OA) von einem zusätzlich die Haut betreffenden Albinismus (Okulokutanem Albinismus=OCA) abgegrenzt.

Abbildung 4: Funktion von Tyrosinase, TRP-1 und TRP-2 in der Melaninbiosynthese: Ausgangsprodukt der Melaninsynthese ist die Aminosäure L-Tyrosin, die mittels eines Transporters in das Melanosom gelangt. Dort wird durch das kupferhaltige, ebenfalls membranständige Enzym Tyrosinase die aromatische Aminosäure L-Tyrosin in L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) und weiter in Dopachinon überführt. Durch den Ringschluss der Seitenketten des Dopachinons entsteht Dopachrom. Dieses polymerisiert nach Umwandlung in Indol-5,6-chinon und lagert sich an eine Proteinmatrix an, die höchstwahrscheinlich durch das Protein Pmel17 gebildet wird. Die für die letzten beiden Schritte nötigen Enzyme TRP-1 und TRP-2 sind ebenfalls membranständige und spezifische Komponenten des Melanosoms. Sie werden aufgrund ihrer Tyrosinase-ähnlichen Struktur als Tyrosinase-verwandte Proteine (TRPs = tyrosinase-related peptids) bezeichnet. Modifiziert nach del Marmol & Beermann (1996), S. 166.

#### 1.4 Lysosomale Transportwege

(nach Hunziker & Geuze 1996 und Alberts et al. 2002, S. 726-766)

Im Mittelpunkt des Interesses unserer Arbeitsgruppe steht die Analyse intrazellulärer Transportvorgänge, insbesondere die Mechanismen der Sortierung und des Transportes von Membranproteinen. Ein Schwerpunkt liegt auf der Analyse der Sortierungsmechanismen von lysosomalen Membranproteinen. Deshalb sollen in der Folge wichtige lysosomale Transportwege und die zugrunde liegenden Sortierungsmechanismen kurz erläutert werden:

Neben der hier nicht weiter erwähnten Autophagozytose (Shintani & Klionsky 2004), existieren zwei weitere bedeutende Transportwege in die Lysosomen. Zum einen sind Lysosomen die Endpunkte des Endozytoseweges (Abb. 5 blaue Pfeile), zum anderen müssen auch die zuvor erwähnten lysosomalen Membranproteine und die löslichen. Hydrolasen über die sauren biosynthetische Route (Abb. 5 rote Pfeile) in das Lysosom gelangen. Der Biosyntheseweg beinhaltet den Transport der am rauen endoplasmatischen Retikulum (RER) gebildeten Proteine zur Cis-Golgi-Seite, den Transport vom Cis-Golgi durch die weiteren Golgi-Zisternen zur Trans-Golgi-Seite, dem Trans-Golgi-Netz (TGN). Das TGN stellt eine erste, zentrale Sortierstation für den weiteren Weg der neu-synthetisierten Proteine dar. Vom TGN werden die Proteine mittels konsekutiver oder regulierter Exozytose sezerniert (Abb. 5 schwarze Pfeile) oder gelangen vom TGN in das endosomale System der Zelle, welches außerordentlich komplex ist und aus Subkompartimenten besteht, die aufgrund bestimmter Eigenschaften eigenständige Namen besitzen (frühe Endosomen = EE; späte Endosomen = LE; Recycling-Endosomen = RE). Im Falle von lysosomalen Membranproteinen bzw. saurer Hydrolasen erfolgt der Transport vom TGN über die frühen und späten Endosomen zum Lysosom, wobei strittig ist, ob die genannten Proteine den "langen" Weg zum Lysosom nehmen (TGN-EE-LE-L; Abb. 5 durchgezogene rote Pfeile), oder aber ob der Transportweg auch unter der Umgehung der EE stattfinden kann (TGN-LE-L; Abb. 5 gestrichelte rote Pfeile).

In der folgenden Abb. 5 sind die genannten Transportwege nach Verlassen des Golgiapparates sowie die an diesem Transport beteiligten Kompartimente dargestellt:



Abbildung 5: Übersicht über Sortierungswege von Membranproteinen und die involvierten Organellen:

Die Stoffaufnahme aus dem Extrazellulärraum wird als Endozytose bezeichnet. Dafür wird die Plasmamembran (PM) nach innen eingestülpt und formt eine von innen mit Clathrin beschichtete Einbuchtung (CCP=clathrin-coated pit). Diese wird als Clathrin-beschichtetes Vesikel (CCV=clathrin-coated vesicle) abgeschnürt und fusioniert mit dem frühen Endosom (EE). Zu degradierendes Material wird über späte Endosomen (LE) entlang der Endozytoseroute (blaue Pfeile) zu Lysosomen transportiert. Neu-synthetisierte Proteine können zur PM gelangen oder die Zelle per konsekutiver oder regulierter Exozytose verlassen (schwarzer Pfeil). Außerdem können sie entlang der biosynthetischen Route (rote Pfeile) entweder über EE und LE (rot, durchgezogen) oder direkt zu LE (rot, gestrichelt) zu den Lysosomen gelangen. Dabei können Rezeptoren, die den Transport von löslichen Proteinen vermitteln, einerseits zwischen Endosom und Golgi (oranger Pfeil). CCP/CCV modifiziert nach Alberts et al. (2002), S. 748; EE/LE modifiziert nach Gruenberg (2001); RE modifiziert nach van Dam & Stoorvogel (2002); TGN modifiziert nach Alberts et al. (2002), S. 740.

Der zweite, oben genannte Weg in die Lysosomen ist die Endozytoseroute. Endozytose, und hier speziell die Rezeptor-vermittelte Endozytose, stellt die "selektive" Aufnahme von Stoffen (Liganden) in die Zelle dar (Conner & Schmid 2003). Dafür werden Rezeptoren in der Plasmamembran benötigt, zu denen beispielsweise der LDL-Rezeptor und der Transferrin-Rezeptor gehören, welche die Versorgung der Zelle mit Cholesterin bzw. Eisenionen gewährleisten.

Die Rezeptor-vermittelte Endozytose beginnt mit der Bilduna einer hochdifferenzierten Membraneinstülpung, die als "coated pit" (CP) bezeichnet wird und im weiteren Verlauf ein so genanntes "coated vesicle" (CV) bildet. Die Namen CP/CV gründen sich auf die dunkle, elektronendichte Erscheinung in der Elektronenmikroskopie, die durch ein für die Endozytose zentrales Protein gebildet werden, das Clathrin. Deshalb werden die genannten Strukturen auch als "clathrin-coated pit" (CCP) respektive "clathrin-coated vesicle" (CCV) bezeichnet. Beim Beispiel des LDL-Rezeptors gelangen die über CCV endozytierten LDL-Partikel/LDL-Rezeptor-Komplexe in die frühen Endosomen, wo es aufgrund des bestehenden schwach sauren pH-Wertes (ca. 6,5) zur Dissoziation des Ligand/Rezeptorkomplexes kommt. Während der LDL-Rezeptor über RE wieder zur PM gelangt, um erneut für die Endozytose von LDL zur Verfügung zu stehen, gelangt das LDL-Partikel aus den EE weiter zu den LE und schließlich zu den Lysosomen. Dort werden die LDL-Partikel u.a. zu Cholesterin degradiert (siehe Abb. 6). In ähnlicher Weise können auch andere Stoffe in die Lysosomen gelangen, wie z.B. Antigen/Antikörper-Komplexe.



Sowohl der Transport vom TGN zu den Endosomen als auch die Endozytose von der PM beginnen mit der Bildung von Vesikeln, die in ihrer Zusammensetzung hoch spezifisch sind. Da die Bildung von CCVs bei der Endozytose von der PM am besten charakterisiert ist, sollen die zugrunde liegenden Mechanismen kurz vorgestellt werden: Ein wichtiges Detail in der Frühphase der Endozytose ist die Ankonzentrierung der zu endozytierenden Rezeptoren in den CCP (siehe Abb. 6 Ausschnitt), die auf einer Interaktion Membranprotein zwischen und Faktoren der intrazellulären Sortierungsmaschinerie beruht (siehe Abb. 7). Dabei bindet eine spezifische Abfolge von Aminosäuren (Sortierungssignal) im zytoplasmatischen Anteil der Membranproteine ("tail") an eine zytoplasmatische Proteinkomponente, die als Adaptorprotein (Adaptorkomplex, AP) bezeichnet wird. Ein Vergleich



Abbildung 7: Adaptorkomplexe binden an Clathrin und die zytoplasmatische Domäne von Membranproteinen; näheres siehe Text.

verschiedener Sortierungssignale unterschiedlicher Membranproteine konnte die AP-Bindung dass es für zeigen, unerheblich ist, ob ein Sortierungsmotiv (s.u.) am terminalen Ende oder in der Mitte der zytoplasmatischen Domäne anzutreffen ist. Die APs bewerkstelligen wiederum nicht nur die Ankonzentrierung der Membranproteine in CCP, sondern spielen auch bei der Rekrutierung von Komponenten der Vesikelhülle eine entscheidende Rolle (Owen et al. 2004).

Die initale CCP-Bildung, wie auch das weitere Einstülpen und Abschnüren eines CCV bis hin zum anschließenden Abstreifen ("Uncoating") der Hülle erfordert neben Energie auch die Hilfe anderer Faktoren (vgl. Abb 6). Mittlerweile konnte eine zweistellige Zahl derartiger Faktoren für die Rezeptorvermittelte Endozytose beschrieben werden, die an der geordneten Vesikelbildung beteiligt sind. Nach dem "Uncoating" wandert das "nackte" Vesikel entlang von Zytoskelettstrukturen zu frühen Endosomen (EE), wo die weitere Sortierung der endozytierten Stoffe vermittelt wird. Die oben beschriebene Bindung der zytoplasmatischen Adaptoren an Sortierungssignale von Membranproteinen ist Voraussetzung für die korrekte Sortierung des betreffenden Proteins. Wird diese Bindung verhindert z.B. durch Mutation eines Sortierungssignales oder durch Mutation in einem AP-Komplex, so wird das betreffende Protein fehlsortiert, was unter Umständen für die Zelle, ein Gewebe oder den gesamten Organismus fatale Folgen haben kann.

#### 1.5 Sortierungssignale in Membranproteinen

(Marsh 2001, Kapitel 7; Sandoval & Bakke 1994; Boehm & Bonifacino 2001)

Die Analyse von Sortierungssignalen in Membranproteinen begann mit der Beobachtung, dass Veränderungen einer bestimmten AS-Sequenz in der zytoplasmatischen Domäne des LDL-Rezeptors für die Endozytose von LDL-Partikeln essentiell ist. Diese Untersuchungen stützten sich auf Fibroblasten eines Patienten mit einer familiären Hyperlipidämie Typ IIa (Davis et. al. 1986; Chen et al. 1990). Der homozygote Träger dieser Erkrankung leidet an einer rasch progredienten Atherosklerose mit frühem letalen Ausgang, bedingt durch die hohen LDL-Spiegel im Blut. Die blockierte Endozytose konnte auf eine Punktmutation mit dem Austausch eines Tyrosins durch ein Cystein in der zytoplasmatischen Domäne des LDL-R zurückgeführt werden (Davis et. al. 1986). Durch Mutationsanalyse der umliegenden AS und Vergleich mit ähnlichen Sequenzen anderer Membranproteine konnten die sog. Tyrosinhaltigen Sortierungssingale charakterisiert werden (vgl. Abb. 8, nächste Seite). Das typische Motiv (Konsensusmotiv) dieser Signale setzt sich aus einer kurzen Aminosäure-Sequenz zusammen, die im Einbuchstabencode der AS (siehe Abschnitt 6.1 im Anhang) mit Yxx beschrieben wird. Dabei stellt "Y" ein Tyrosin dar, gefolgt von zwei beliebigen AS ("XX"). Den Abschluss des Konsensusmotivs bildet eine der hydrophoben AS Valin, Leucin oder Isoleucin  $(,\Phi^{\prime})$ . Interessanterweise stellt gerade das Motiv des LDL-R eine relativ seltene

Sonderform der Tyrosin-haltigen Motive dar, mit der abweichenden Sequenz NPXY (Chen et al. 1990; siehe Abb.8). Obwohl Tyrosin-haltige Motive zuerst als

Protein	Y X X 🕈 - Motiv	7
Lamp wt	RKRSHAG Y Q T I	1
LAP wt		
MPR46	38PRNVPAA Y R G V GDDQLGEESEERDDHLLPM	
TGN38	19RRPKASD Y Q R L NLKL	
Protein	N P X Y - Motiv	7
LDL-R	<sub>10</sub> F D N P V Y <sub>32</sub>	Ī
IGF-1-R	16 S V N P E Y 387	

Abbildung 8: Tyrosin-haltige Sortierungssignale in der zytosolischen Domäne von einigen Transmembranproteinen. Die Sequenz ist im Einbuchstabencode dargestellt. Proteine können auch mehr als ein Sortierungssignal besitzen (vgl. Abb. 9). Blau unterlegt sind die für die Sortierung essentiellen AS, Erklärung siehe Text.

Sortierungssignale für die Rezeptor-vermittelte Endozytose beschrieben wurden, hat sich im Laufe der Zeit gezeigt, dass ein und dasselbe Signal Sortierungsschritte für verschiedene Transportvorgänge vermitteln kann. Das Tyrosin-haltige Motiv (-YQTI) im zytoplasmatischen Anteil des lysosomalen Membran-

roteins Lamp-1 vermittelt z.B. die Sortierung am TGN, es fungiert als Endozytosesignal und dient zudem in polarisierten Zellen als Signal für die basolaterale Sortierung.

Einige membranständige Proteine, wie die erwähnte Tyrosinase und Limp-2, weisen jedoch keine Tyrosin-haltigen Motive auf. Bei ihnen konnten andere Motive, sog. Dileucin-haltige Motive gefunden werden (Haft et al. 1994; Letourneur & Klausner 1992; Sandoval et al. 1994). Abweichend von der Bezeichnung müssen in diesen Motiven nicht immer zwei Leucinreste vorhanden sein (siehe Abb. 9). So sind auch Motive identifiziert worden, die

/ Protein	/	ΖZ	ххх	LL	-Motiv
MPR46	57SE	ER	DDH	LL	РМ
Inv. chain	м	DD	QRD	LI	SNNEQLPMLGRRPGAPESKCSR
Glut-4	<sub>16</sub> TF	RR	TPS	L L	EQEVKPSTELEYLGPDEND
CD3 y	8RA	S D	KQT	LL	PNDQLYQPLKDREDDQYSHL
Limp-II wt	10 <b>TA</b>	DE	RAP	LI	RT
Tyrosinase	<sub>9</sub> PQ	EE	RQP	LL	MDKDDYHSLLYQSHL

anstatt des zweiten Leucins kleine eine hydrophobe AS besitzen (Dietrich et al. 1997). Häufig finden sich zusätzlich hydrophobe oder saure Reste in der

Abbildung 9: Leucin-haltige Sortierungssignale in der zytosolischen Domäne von einigen Transmembranproteinen. Darstellung wie Abb. 5. Die "invariant chain" besitzt noch ein zweites Leucinsignal (grün).

unmittelbaren Umgebung (meist 4 und/oder 5 AS proximal) des Leucins, deren Identität für die Funktionalität des Motives essentiell ist (Höning et al. 1998). Daher sollten die Motive eher als Leucin-haltige Signale deklariert werden. Sie sind unabhängig von den Tyrosin-haltigen Signalen in der Endozytose von Membranproteinen sowie in der lysosomalen Sortierung beteiligt (Letourneur & Klausner 1992; Marks et al. 1996).

Eine dritte große Gruppe wird durch Motive gebildet, deren Erkennung durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung benachbarter Serin- oder Tyrosinreste moduliert wird (z.B. vom MPR46 oder CD4 Molekül). Außerdem gibt es daneben noch weitere, "atypische" Sortierungssignale, die in keine dieser Gruppen eingeordnet werden können (näheres siehe Marsh 2001, Kapitel 7).

### 1.6 Erkennung von Sortierungssignalen durch zytosolische Faktoren

(Lewin & Mellman 1998; Kichhausen 1999; Boehm & Bonifacino 2001; Robinson MS & Bonifacino 2001)

Wie schon anhand Abb. 7 erläutert, wird die Sortierung von Membranproteinen durch die Adaptorkomplexe vermittelt. Die Struktur und Funktion von APs ist am besten bei dem an der Rezeptor-vermittelten Endozytose beteiligten Adaptorkomplex AP-2 untersucht. Der AP-2-Komplex ist ein Heterotetramer, bestehend aus zwei großen Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta$ 2), einer mittleren ( $\mu$ 2) und einer kleinen Untereinheit ( $\sigma$ 2, siehe Abb. 10 auf der nächsten Seite). Jeder Untereinheit kommen spezifische Teilfunktionen zu, die augenblicklich Gegenstand intensiver Forschung darstellen: Ausgehend von der Beobachtung, dass eine *in-vitro*-Synthese des AP-2-Komplexes nicht ohne die  $\sigma$ 2-Untereinheit möglich ist (Collins et al. 2002), wird der  $\sigma$ 2-Untereinheit eine essentielle Funktion für die Komplexintegrität zugesprochen.

Die Erkennung Tyrosin-haltiger-Motive durch die  $\mu$ 2-Untereinheit konnte in den letzten Jahren bis auf kristallstruktur-Ebene aufgeklärt werden (Owen & Evans 1998; Collins et al. 2002; Conner & Schmid 2002; Ricotta et al. 2002).

Im Unterschied dazu gibt es widersprüchliche Daten zur Bindungsstelle von Leucin-haltigen Motiven. Einerseits gibt es Befunde, die eine Dileucin-Signal-Bindung an die  $\beta$ 2-Untereinheit zeigen (Rapoport et al. 1998), dem gegenüber stehen Daten, die eine Bindung an ein Sequenzmotiv der  $\mu$ 2-Untereinheit belegen (Bremnes et al. 1998; Rodionov & Bakke 1998). Für AP-2 konnte neben der Bindung von Proteinen auch Lipidbindung (Phosphoinositole) nachgewiesen werden. Diese Bindung findet sowohl am N-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit (Gaidarov et al. 1996) sowie durch einen definierten Abschnitt in der  $\mu$ 2-Untereinheit statt (Rohde et al. 2002). Die derzeit zur Verfügung stehenden Daten favorisieren eine Clathrinbindung an die  $\beta$ 2-Untereinheit in Bereichen der "hinge"-Region. Zusätzlich konnte für AP-2 die Bindung von mehreren akzessorischen Proteinen an den "Ohren" der beiden großen Untereinheiten nachgewiesen werden (vgl. Abb. 10).



Abbildung 10: Struktur und Bindungseigenschaften des AP-2 Komplexes; Erklärung siehe Text. In der Folge konnten drei zu AP-2 strukturverwandte, heterotetramere Adaptorkomplexe beschrieben werden, deren subzelluläre Lokalisation sich von dem an der PM befindlichen AP-2-Komplex unterscheidet. Neben den als AP-1, AP-2, AP-3 und AP-4 durchnummerierten Adaptorproteinkomplexen existieren von einzelnen Untereinheiten noch Varianten, so dass Adaptorsubtypen gebildet werden können. Wie in Abb. 11 dargestellt, werden die kleinen Untereinheiten jeweils als  $\sigma$ 1-4, die mittleren Untereinheiten als  $\mu$ 1-4 und die höher konservierten, großen Untereinheiten als  $\beta$ 1-4 bezeichnet. Jeder AP enthält außerdem eine wenig homologe (variable) große Untereinheit, die entsprechend mit  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  bezeichnet wird.

<b>"Χ"</b> μ <sup>β</sup>		AP- 1A	AP-1B	AP- 2	AP-3A/B*	AP- 4
Untereinheit						
klein	σ	σ1a	σ1b	σ2	σ3	σ4
mittel	μ	µ1a	µ1b	μ2	µ3A/B*	μ4
groß konserviert	β	β1	β1	β2	β3A/B*	β4
groß variabel	"Х"	γ1	γ1	α	δ	3
Lokalisation		TGN / E	E	РМ	TGN / E	TGN / E
Postulierte Funktion		TGN > EE	basolaterale	Endozytose	TGN > LE	basolaterale
		EE > TGN	Sortierung		EE > LE	Sortierung
				TGN/E>LRO		

**Abbildung 11: Adaptorproteinkomplexe:** Übersicht über die Zusammensetzung der verschiedenen Adaptorproteinkomplexe und deren Varianten. Es ist jeweils auch die subzelluläre Lokalisation sowie die postulierte Funktion aufgeführt. Näheres siehe Text.

\* Die neuronal exprimierte Form des AP-3 wird als AP-3B bezeichnet und differiert von der ubiquitär exprimierten Form AP-3A durch die Untereinheiten  $\mu$ 3B und  $\beta$ 3B. Funktionsuntersuchungen beziehen sich bisher nur auf die Neuronale Form. Für sie ist eine Beteiligung bei der Vesikelbildung an Endosomen durch Faundez et al. (1998) gelungen.

Ausgehend von den funktionellen Zuordnungen zu den einzelnen AP-2 Untereinheiten wurde nach ähnlichen Funktionen der jeweiligen Untereinheiten anderer AP gesucht. Während allen  $\sigma$ -Untereinheiten eine Aufgabe bei der Komplexintegrität zugesprochen wird, gilt heute als wahrscheinlich, dass die anderen Adaptorkomplexe (AP-1, AP-3 und AP-4) unterschiedliche Eigenschaften in Bezug auf ihre Lipidbindungsfähigkeit besitzen, was wesentlich sein könnte für die Rekrutierung der Adaptorkomplexe an verschiedene Membranareale. Ebenso konnte für die Clathrinbindung ein differentes Verhalten der jeweiligen  $\beta$ -Untereinheiten beschrieben werden. Während die Bindung von  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 experimentell sehr gut gesichert ist, liegen für die Clathrin-Bindung von  $\beta$ 3 umstrittene Daten vor (Dell'Angelica et al. 1998; Peden et al. 2002). Für  $\beta$ 4 existiert das entsprechende Bindungsmotiv nicht, so dass eine Clathrinbindung als unwahrscheinlich gilt (Lafer 2002). Allerdings wurde abweichend von dem Clathringen CHC17 eine neues Gen für Clathrin, CHC22 durch Liu et al. (2001) beschrieben, das *in vitro* an AP-1 und AP-3 am TGN binden kann.

Während die Funktion von AP-2 an der PM bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose eindeutig belegt ist, stellt die funktionale Lokalisation der anderen bekannten Adaptorkomplexe den Gegenstand aktueller Forschung dar. Gerade die Entdeckung weiterer, adaptorähnlicher, monomerer Proteine führte in den letzten Jahren zu häufigen Revisionen der funktionalen Lokalisationen (vgl.



Abbildung 12: mögliche AP-1A-Funktionen im Transport zwischen Endosomen und TGN; Erklärung siehe Text.

GGAs in der Diskussion). Da die für den Transport der sauren Hydrolasen zuständigen Mannose-6-phosphat-Rezeptoren (MPRs) in AP-1Apositive Vesikel verpackt werden (Geuze et al. 1985), wurde der AP-1A-Komplex für die Vesikelbildung am TGN via CCV zu Endosomen verantwortlich gemacht (vgl. Abb. 12 blaue Pfeile; Lewin & Mellman 1998). Neuere Arbeiten deuten allerdings darauf hin, dass AP-1A ebenfalls

eine wichtige Funktion im Rücktransport der MPRs von Endosomen zum TGN besitzt (vgl. Abb. 12 rote Pfeile; Mallard et al. 1998; Meyer et al. 2000; Falguieres et al. 2001).

Durch die richtungsweisende Arbeit von Doray et al. (2002) konnte gezeigt werden, dass bei der molekularen Sortierung der MPRs am TGN ein Zusammenspiel von monomeren, adaptorähnlichen Proteinen, den GGAs, mit AP-1A essentiell ist (siehe Disskusion Abschnitt 4.2).

In epithelialen Zellen wird zusätzlich zum AP-1A ein AP-1B-Komplex exprimiert, bei dem die  $\mu$ 1A- und  $\sigma$ 1A-Untereinheit durch epithelspezifische Varianten ( $\mu$ 1B

und  $\sigma$ 1B) ersetzt sind (Fölsch et al. 1999). Gan et al. (2002) konnten AP-1B eine Bedeutung im basolateralen Transport in epithelialen Zellen ausgehend von Endosomen zuweisen.

Die Funktion des ubiquitär exprimierten AP-4-Komplexes (Dell'Angelica 1999a; Hirst et al. 1999) ist derzeit noch strittig. Während in einer Arbeit eine Funktion von AP-4 in der lysosomalen Sortierung postuliert wird (Aguilar et al. 2001), favorisiert unsere Arbeitsgruppe eine Funktion bei der polarisierten Sortierung in Epithelzellen (Simmen et al. 2002).

Ebenfalls am TGN und Endosomen ist der Adaptorkomplex AP-3 zu finden. AP-3 wird in allen Zellen exprimiert, wobei eine Gehirn-spezifische Subform existiert. (Dell'Angelica et al. 1997 und 1998; Simpson et al. 1996 und 1997). Der bis dato einzige direkte Funktionsnachweis für AP-3 stammt aus neuroendokrinen PC-12 Zellen. Mittels eines in-vitro-Budding-Systems konnte gezeigt werden, dass AP-3 in Gegenwart von Energie und einem Hilfsprotein (ARF1) ohne weitere Faktoren die Genese synaptischer Vesikel (SV) von Endosomen initiiert (Faundez et al. 1998). Eine spätere Arbeit von Blumstein et al. (2001) konnte diese Genese der SV der Gehirn-spezifischen Subform von AP-3 zuweisen. Die weitere Analyse des AP-3-Komplexes wurde dadurch beschleunigt, dass natürliche Mutanten in Fliege, Maus und Mensch identifiziert werden konnten (siehe Abschnitt 6.3). Im Gegensatz zum Verlust von AP-1A ist der funktionale Verlust von AP-3 für den Organismus nicht letal. Bei der weiteren Analyse dieser AP-3-Mutationen konnten Veränderungen in den einzelnen Untereinheiten von AP-3 identifiziert werden. Während für die Fruchtfliege Drosophila melanogaster für jede Untereinheit eine Mutation existiert (Ooi et al. 1997; Sevrioukov et al. 1999; Mullins et al. 1999; Kretzschmar et al. 2000), sind derzeit zwei murine AP-3-Mutanten bekannt (Kantheti et al. 1998; Feng et al. 1999). Bei der Maus-Mutante mocha handelt es sich um eine Null-Mutante des Gens für die  $\delta$ -Untereinheit (Kantheti et al. 1998). Die restlichen Untereinheiten bilden im Fall von mocha-Zellen das Heterodimer  $\beta$ 3µ3 und das Monomer  $\sigma$ 3. Diese Teilkomplexe werden allerdings beschleunigt degradiert, was die Halbwertszeit der Teilkomplexe drastisch

verringert und dazu führt, dass kein funktionelles AP-3 in *mocha*-Zellen existiert (Peden et al. 2002). In der Maus-Mutante *pearl*, die eine Mutation in der  $\beta$ 3A-Untereinheit aufweist, finden sich zwar noch m-RNA Reste der mutierten Untereinheit, doch lässt sich ebenfalls kein funktionelles AP-3 nachweisen (Peden et al. 2002).

Mehrere Arbeiten mit *mocha*-Zellen konnten eine Änderung der Transportrouten von lysosomalen Membranproteinen zeigen (Dell'Angelica et al. 1999b; Yang et al. 2000; Rous et al. 2002). Obwohl die "steady state"-Verteilung immer noch hauptsächlich lysosomal ist, werden die Proteine in erhöhtem Maße indirekt, also über die PM, zu den Lysosomen transportiert. Die Injektion von μ3-antisense Oligonukleotiden führt ebenfalls zum funktionellen Verlust von AP-3 und zur zuvor beschriebene Fehlsortierung lysosomaler Membranproteine (Lamp-1 und Limp-2) über die PM (Le Borgne et al. 1998). Diese Daten, gestützt aus parallelen Beobachtungen an Transportmutanten in der Hefe (Cowles et al. 1997; Stepp et al. 1997), wurden dahingehend interpretiert, dass AP-3 eine direkte Sortierung zu Lysosomen vermitteln könnte (Odorizzi et al. 1998).



Abbildung 13: mögliche AP-3 Funktionen; SEK V=Sekretorische Vesikel; SV=Synaptische Vesikel; Erklärung siehe Text.

Es muss an dieser Stelle festgehalten werden. dass derzeit zahlreiche Vermutungen über die funktionelle Lokalisation von AP-3 existieren, die aber mit Ausnahme der SV-Bildung durch Faundez et al. (1998) für die Gehirn-spezifische Form jeglichen direkten, experimentellen Nachweis missen lassen (Abb. 13 grüne Pfeile). So wird AP-3 häufig neben einer Beteiligung im direkten Transport lysosomaler Proteine vom TGN zu den

Lysosomen (Abb. 13 dunkelblaue Pfeile) eine Sortierfunktion innerhalb der endosomalen Kompartimente zugesprochen (Abb. 13 rote Pfeile). Ebenso

wurde AP-3 eine Funktion in der Biogenese von sekretorischen Vesikeln zugesprochen (Abb. 13 hellblaue Pfeile; Daugherty et al. 2001). Der genaue intrazelluläre Funktionsort für AP-3 ist aber weiter unklar (vgl. Abb. 13).

Vor dem Hintergrund der Vermutungen über den Funktionsort von AP-3 ist interessant, dass in Individuen mit einer Mutation in einer der AP-3-Untereinheiten, die Biogenese der oben erwähnten LROs gestört ist. So stellt *pearl* ein Mausmodell für das hereditäre, autosomal-rezessive Hermansky-Pudlak-Syndrom Typ 2 (HPS-2) dar (Zhen et al. 1999). Zu den typischen Symptomen der mutigenen Erkrankung gehört das gleichzeitige Auftreten von okulokutanem Albinismus, hämorrhagischer Diathese und Lungenfibrose, letztere bedingt durch vermehrte Ablagerung des Ceroids Lipofuzin (Zeroidlipofuszinose). Jedes der Symptome korreliert mit einer Fehlfunktion von LROs, wie Melanosomen, "dense granules" bzw. den Lysosomen selbst (vgl. Abschnitt 4.4). In diese Gruppe von Erkrankungen gehören neben dem HPS, das Chediak-Higashi-Syndrom (CHS) und das Griselli-Syndrom (GS), für deren Abhandlung auf entsprechende Literatur verwiesen sei (Huizing et al. 2000).

Es ist wichtig zu erwähnen, dass es sich bei der Hypopigmentierung im Rahmen der soeben genannten Erkrankungen um keinen Defekt in einem der oben genannten Schlüsselenzyme der Melaningenese handelt. Stattdessen ist in den Melanozyten von HPS-2 Patienten der Tyrosinase-Transport über die PM fehlgeleitet (Huizing et al. 2001). Bedenkt man, dass AP-3 ein wichtiger Faktor im lysosomalen Transport ist und *in vitro* das Sortierungssignal der Tyrosinase binden kann (Höning et al. 1998), ist eine Fehlsortierung der Tyrosinase innerhalb der Melanosomen Biogenese aufgrund des fehlenden AP-3 im HPS-2 als Ursache der Hypopigmentierung sehr wahrscheinlich. Eine weitere AP-3 Funktion ist also im korrekten Transport von spezifischen Membrankomponenten, z.B. der Tyrosinase, in der Biogenese von LROs zu sehen (vgl. Abb 13, hellblaue Pfeile). Der direkte Nachweis, dass AP-3 an Tyrosinase und andere lysosomale Membranproteine bindet und ihre Sortierung vermittelt, sowie die exakte intrazelluläre Lokalisation dieser postulierten Interaktion sind Anlass der vorliegenden Arbeit.

#### 1.7 Fragestellung

Diese Arbeit befasst sich mit der Analyse der Funktion des Adaptorkomplexes AP-3 für die Sortierung membranständiger melanosomaler und lysosomaler Proteine. Bisherige Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass AP-3 eine Rolle bei der Sortierung der genannten Proteine hat, allerdings blieb letztendlich unbeantwortet, ob AP-3 die Sortierung am TGN oder an Endosomen vermittelt.

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit war die Beobachtung unserer Arbeitsgruppe, dass AP-3 in vitro an Tyrosinase bindet (Höning et al. 1998) und somit Tyrosinase als mögliches durch den AP-3-Komplex sortiertes melanosomales Membranprotein wahrscheinlich war. Weiterhin konnte anhand von Immunogoldmarkierungen in der Elektonenmikroskopie nachgewiesen werden, dass AP-3 am TGN und an endosomalen Subpopulationen in enger Nachbarschaft zur Tyrosinase nachweisbar ist (Tikkanen 1999). Trotz dieser Befunde stand der direkte Funktionsnachweis einer Sortierung von Tyrosinase durch AP-3 noch aus. Da es in einem Zellsystem sehr schwierig ist, zwischen der Sortierung am TGN und an Endosomen experimentell zu differenzieren, war es meine Aufgabe, ein in-vitro-Budding-System zu etablieren. Mit diesem sollte Vesikelknospung an einem genau definierten Donorkompartiment, dem TGN, untersucht werden. Da Faundez et al. (1998) schon eine funktionelle Charakterisierung der Gehirn-spezifischen Subform an Endosomen gelang, konzentrierte ich mich auf die Analyse einer möglichen (putativen) Funktion am TGN. Unter Verwendung von AP-3-defizienten Zytosol im zu etablierenden Golgi/TGN-Budding-System sollte die AP-3-abhängige Sortierung von melanosomalen und lysosomalen Transportmolekülen am TGN verifiziert oder falsifiziert werden.

## 2 Material und Methoden

#### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Analysewaage Typ BP 3100P & 1602MP Autoklav, Typ Tuttnauer 3870bEL CO<sub>2</sub>-Brutschrank Typ 2771 CSC-Kamera, Intelligent Dark Box II Cellcracker Drehrad für Eppendorfgefäße Eismaschine Elektrophorese-Apparaturen - Mini V8/10 für Polyacrylamid-Minigele - für Agarosegele Flüssigkeitszintillationszähler 1900TR -LS 6500 Gefrierschrank (-80 °C) Typ UF 85-300S Gefrierschrank (-80 °C) GS 3002-6 Geltrockner (GelAirDryer) Gradientenmischer SG 15 Heizblöcke, Thermostat 5320 Horizontalschüttler SM Magnetrührer: IKA Maxi M und Combimage Reo Mikroskop, Fluoreszenz-; Modell Axiovert 100 Mikroskop, Phasenkontrast-; Modell ID 03 Mikrowellenherd Multipette, Combitips Neubauer-Zählkammer Peristaltikpumpe LKB-PumpP-1 PH-Meter inoLab pH Level1

Sartorius, Göttingen Sytec, Wettenberg Heraeus, Osterode Fuji Film EMBL, Heidelberg Eigenbau, Werkstatt des Instituts Ziegra, Isernhagen Whatman/Biometra Eigenbau, Werkstatt des Instituts Packard, Frankfurt Beckmann, München Colora Messtechnik, Lorch Liebherr, Ochsenhausen BoRad, München Amersham Pharmacia Biotech Eppendorf, Hamburg Schütt, Göttingen Janke & Kunkel, Staufen Zeiss, Oberkochen Zeiss, Oberkochen Bosch, Stuttgart Eppendorf, Hamburg Brand Gläser, Wertheim Pharmacia WTW, Weilheim

Refraktometer Schmidt, Haensch Rotoren: - JA-10 (Kühlzentrifuge) - JA-20 (Kühlzentrifuge) - SW 41 (Kühlzentrifuge) - SW 60 (Kühlzentrifuge) - TLA-100.3 (Tisch Ultrazentrifuge) - TLA-45 (Tisch Ultrazentrifuge) Schüttelkühlinkubator, innova 4230 New Brunswick Scientific Schüttelwasserbad Spannungsgeräte Hölzel, München Speed Vac Spektralphotometer Uvikon 931 Kontron, Echting Steri-Kult Inkubator Modell 3194 und 3164 Sterilbank Modell A/B3 und SG40 Stickstoff Einfriertank Biosafe Chronos Thermometer Schütt, Göttingen Transilluminator Modell IL-400-M Ultraschall Sonifier W-450 USA Vortex-Genie 2<sup>™</sup> Wärmeschrank Wasserbad GFL 1086

Wipptisch

- Zentrifugen:
- Eppendorfzentrifuge Typ 5402
- Laborfuge GL
- Kühlzentrifuge, Modell J-21 C & J2- MC
- Kühlzentrifuge, Modell RC-5B
- Kühltischzentrifuge 5417R
- Sigmafuge 3K12
- Ultrazentrifuge L-80
- Tisch-Ultrazentrifuge TL-100

Beckmann, München

Köttermann, Hänningse Bachhofer, Reutlingen Forma Scientific, Marietta, USA Baker Company Inc., Stanford, USA Messer Griesheim, Frankfurt Bachofer, Reutlingen Branson Ultrasonic SA, Carouge-Geneve, Bender & Hobein AG, Zürich Memmert, Schwabach Krannich, Göttingen Eigenbau, Werkstatt des Instituts

Eppendorf, Hamburg Heraeus, Osterode Beckmann, München Sorval Eppendorf, Hamburg Sigma, Deisenhofen Beckmann, München Beckmann, München

#### 2.1.2 EDV

Adobe Photoshop AIDA Image Analyser V 3.10 Apple Macintosh mit MacOs Image Reader/Gauge V 3.0 Image Reader LAS 1000 Pro V2.1 Laser Writer 4050N &2100 Office XP Scan Jet 4c/T Windows XP

#### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

4-, 6- und 24- Well-Zellkulturplatten Deckgläschen Einfrierkästen Einfrierröhrchen Einmalkanülen G22 **ELISA-Platten** Gewebekulturflaschen Gewebekulturschalen Immersionsöl 518 C Linsenpapier MN 10B Nitrocellulose Blot-Membran 0,2 µm Objektträger und Deckgläser Parafilm® Pasteurpipetten pH-Indikator-Streifen Pipettenspitzen Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen Reaktionsgefäße 0.5, 1.0 und 2.0 Schlauch/Kapillare Skapelle, steril Spritze, steril, 2 ml, Schraubverschluss Sterilfilter Sterile Plastikröhrchen 10 ml

Adobe Systems Inc. Raytest, Staubenhardt Apple Macintosh, USA FujiFilm FujiFilm Hewlett Packard, Palo Alto, USA Microsoft, Redmond, USA Hewlett Packard, Palo Alto, USA Microsoft, Redmond, USA

Greiner, Nürtingen Menzel Gläser, Braunschweig National Lab, Mölln Nunc, Wiesbaden Neoinject, Gelnhausen Greiner, Nürtingen Greiner, Nürtingen Greiner, Nürtingen Zeiss, Oberkochen Machery-Naagel, Düren Sartorius, Göttingen Menzel Gläser, Braunschweig American National Can<sup>™</sup>, Neeah, USA Schütt, Göttingen Merck, Darmstadt Sarstedt, Braunschweig Beckmann, München Sarstedt, Braunschweig Werkstatt Braun, Melsungen Braun, Melsungen Sarstedt, Nümbrecht Sarstedt, Braunschweig

Sterile Plastikröhrchen 50 ml Zentrifugierröhrchen Sarstedt, Braunschweig Beckmann, München

#### 2.1.4 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben im Reinheitsgrad *pro analysi* von folgenden Firmen bezogen:

2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
30 % Acrylamid / 0,8 %Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Gibco/BRL, Eggenstein
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma, Deisenhofen
Ampholine pH 3,5-10, pH 5-8, pH 4-6	Pharmacia, Freiburg
Ampholine pH 2-11	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Bacto-Hefe-Extrakt	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Bromphenolblau	BioRad, München
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Coomassie Blau R 250	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
EDTA Na <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck; Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Fluorescent Mounting Medium	DAKO Corporation, USA
Folin-Reagenz	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glucose	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd (reinst für Emi)	Sigma, Deisenhofen
Guanosintriphosphat (GTP)	Sigma, Deisenhofen
Guanosin 5'-O-(3-Thiotriphosphat (GTP $\gamma$ S)	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Merck, Darmstadt

HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Serva, Heidelberg ethansulfonsäure) Imidazol Merck, Darmstadt Isopropanol Merck, Darmstadt Kaliumchlorid (KCI) Merck, Darmstadt Kaliumacetat (KAc) Merck, Darmstadt KLH ("Keyhole limpet hemocyanin") Calbiochem Magermilchpulver Engel, Darmstadt Magnesiumacetat (MgAc) Merck, Darmstadt Manganchlorid Sigma, Deisenhofen MBS (m-Maleimidobenzoesäure N-Sigma, Deisenhofen Hydroxysuccinimidester) 2-Mercaptoethanol Sigma, Deisenhofen Methanol Roth, Karlsruhe Morpholinoethansulfonsäure (MES) Serva, Heidelberg Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) Merck, Darmstadt Natriumcarbonat Merck, Darmstadt Natriumcitrat Merck, Darmstadt Natriumchlorid (NaCl) Merck, Darmstadt Natriumdihydrogenphosphat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) Merck, Darmstadt Natriumdesoxycholat Merck, Darmstadt Natriumdodecylsulfat (SDS) Merck, Darmstadt Natriumhydroxid (NaOH) Merck, Darmstadt NHS-LC-Biotin Pierce, Köln Sigma, Deisenhofen Nonidet P-40 (NP-40) Paraformaldehyd Sigma, Deisenhofen para-Nitrophenolphosphat Sigma, Deisenhofen Sigma, Deisenhofen para-Nitrophenyl-2-acetoamido-2-desoxy-β-Dglucopyranosid Rubidiumchlorid (RbCl) Merck, Darmstadt Saccharose Merck, Darmstadt Specol Cedi-Diagnostics BV., Lelysted, NL TEMED (NNN'N'Tetramethylethylendiamin) Sigma, Deisenhofen TCA (Tetrachloressigsäure) Merck, Darmstadt TPA (Phorbol 12-myristat 13-acetat) Sigma, Deisenhofen Merck, Darmstadt Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) Triton X-100 Serva, Heidelberg

Trypan-Blau	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

#### 2.1.5 Enzyme

Apyrase	Sigma, Deisenhofen
Kreatinkinase (CK)	Roche, Mannheim
Endoglycosidase H	Roche, Mannheim
Hexokinase	Boehringer, Ingelheim am Rhein
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Bad Schwalbach

#### 2.1.6 Kits zur Bearbeitung von DNS und Proteinen

Effectene™ Transfectionsreagenz	Qiagen, Hilden		
Mikro Lowry	BioRad, München		
QIA-Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden		
QIA-Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden		
Roti <sup>®</sup> -Quant, Bradfort-Reagenz	Roth, Karlsruhe		
SuperSignal <sup>®</sup> für Westernblot	Pierce, Köln		

#### 2.1.7 Vektoren und DNS-Standards

GIBCO/BRL, Eggerstein
Dr. S. Höning
Dr. S. Höning

#### 2.1.8 Proteine, Proteinaseinhibitoren und Proteinstandards

Albumin aus Rinderserum (BSA)	ICN Biomedicals Inc., Ohio			
BioRad Proteinstandard, prestained	BioRad, München			
Ovalbumin	Sigma, Deisenhofen			
Kreatinphosphat (CP)	Roche, Mannheim			
Pansorbin	Calbiochem, Frankfurt			
Proteaseinhibitorcocktail	Sigma, Deisenhofen			
Protein A Sepharose	Sigma, Deisenhofen			
Protein G Sepharose	Sigma, Deisenhofen			

PMSFSigma, DeisenhofenRinderserumalbumin für ProteinbestimmungPaesel & Lorei, FrankfurtImmunopure® Immobilized StreptavidinPierce, Rockford, USA

#### 2.1.9 Antikörper

#### 2.1.9.1 Primärantikörper

Antigen,	Spezies,	Verdünnung			Referenz
Bezeichnung des AK	Bezeichnun	Blot	Blot IIF IP [11]		
	g			[µ.]	
AP-1, γ-Adaptin					
Anti - γ-Adaptin	mAb, Maus	1:1000	1:100	-	Transduction Lab.
AP-1; μ1A-Adaptin					
Anti-µ1A-Adaptin	pAb	1:1000	-	-	Meyer et al. 2000
AP-2, α-Adaptin					
Anti – α-Adaptin	mAb, Maus	1:1000	-	-	Transduction Lab.
AP-3, δ-Adaptin					
(1)S48 (Peptid P784 human)	pAb	1:250	1:400	-	Dr. S. Höning
(2) <i>S40</i> (GST- δ –Hinge)	pAb	1:250	1:400	-	Dr. S. Höning
AP-4, ε-Adaptin					
Anti-ɛ-Adaptin	mAb, Maus	1:1000	1:100	-	Transduction Lab.
Cathepsin D, murin					
S9	pAb	1:100	1:100	5	Pohlmann et al. 1995
Clathrin					
Anti Clathrin	mAb; Maus	1:1000	1:100	-	Transduction Lab.
GM 130					
Anti-GM 130	mAb, Maus	1:1000	1:100	-	Transduction Lab.
GGA, human					
Anti-GGA1(GST-VHSDomain)	pAb	1:250	-	-	Dr. S. Höning
Lamp-1, murin					
1D4B	mAb, Ratte,	1:250	1:100	siehe	Hybridoma Bank,
	ΗÜ			S. 53.	Iowa, USA;
LDH					
Anti-LDH	pAb	1:10000	-	-	I. Brand, Göttingen
MPR46					
---------------------	------------	---------	---------	-----	----------------------
(1) <i>MSC1</i>	pAb	5µg/ml	-	3-5	Dr. A. Hille-Rehfeld
(2) <i>KII-5</i>	pAb	-	1:50	5	Dr. A. Hille-Rehfeld
(3) 10C6	mAb	-	50µg/ml	-	Dr. A. Hille-Rehfeld
Na/K-ATPase					
6Fa	mAb, Maus;	1:250	-	-	Hybridoma Bank,
	ΗÜ		1		Iowa, USA
PEX1					
Anti-PEX1	mAb, Maus	1:250	-	-	Transduction Lab.
Pmel17		[µg/ml]	[µg/ml]		
$\alpha$ PEP13h-MSM	pAb	1-2	1-2	-	Dr. M.Marks
PDI					
Anti-PDI	mAb, Maus	1:500	1:200	-	Stress Gene
Rab 5					
CL621.3	mAb, Maus	1:500	-	-	Dr. R. Jahn
Rab 7					
Anti rab7	pAb	1:500	-	-	Santa Cruz
Rab 11					
Anti rab11	mAb, Maus	1:500	-	-	Transduction
TfR					
Anti TfR	mAb, Maus	1:1000	-	-	Zymed
TRP-1					
PEP1	pAb	1:500	1:200	51	Dr. V. Hearing
TRP-2					
PEP8	pAb	1:500	1:250	5	Dr. V. Hearing
α-Tubulin					
Anti- α-Tubulin	mAb, Maus	1:4001	-	-	Molecular Probes
Tyrosinase					
Anti Tyr	pAb	1:250	1:100	5	Dr. S. Höning
Sec 61α-C-terminal					
K233	pAb	1:1000	-	-	Gorlich et al. 1992

**Tabelle 1: Primärantikörper;** mAb = monoklonaler Antikörper; pAb = polyklonaler Antikörper = Kaninchenserum; HÜ = Hybridom-Überstand.

## 2.1.9.2 Sekundärantikörper

Ziege anti Kaninchen, Cy2/Cy3-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Ziege anti Maus, Cy2/Cy3-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Ziege anti Ratte, Cy2/Cy3-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Ziege anti Kaninchen, HRP-Konjugat	Dianova, Hamburg
Ziege anti Maus, HRP-Konjugat	Dianova, Hamburg
Ziege anti Ratte, HRP-Konjugat	Dianova, Hamburg

## 2.1.10 Radioaktive Substanzen

[ <sup>35</sup> S]-L-Methionin/Cystein	Hartmann Analytik
Uridin-diphospho-D-[6- <sup>3</sup> H]-Galactose	Amersham-Buchler, Braunschweig

## 2.1.11 Bakterien, Mausstamm und Zelllinien

Als Bakterienstamm wurde der *E. coli*-Stamm *DH*5 $\alpha$  kultiviert.

Zur terminierten Verpaarung und Gewinnung von Primärfibroblasten wurden heterozygote *mocha*-Mäuse verwendet; die aus der Zucht der Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) stammten.

Zur Gewinnung des polyklonalen Immunserums wurde ein Kaninchen aus dem zentralen Tierstall verwendet. Tabelle 2 stellt die verwendeten Zelllinien dar:

Zelllinie	Beschreibung	Medium	Referenz
melan-a	Mausmelanozyten	Siehe Abschnitt 2.1.14	Bennett et. al. 1987
MEF	embryonale Mausfibroblasten	DMEM, 10 % FKS und 1 x Pen/Strep	Pohlmann et al. 1995
Mocha	δ3-defiziente adulte Mausfibroblasten	DMEM, 10 % FKS und 1 x Pen/Strep	AG P. Schu Abteilung Biochemie II
EFA-47	μ1A-defiziente embryonale Mausfibroblasten	DMEM, 10 % FKS und 1 x Pen/Strep	AG P. Schu Abteilung Biochemie II

Tabelle 2: verwendete Zelllinien.

## 2.1.12 Gebräuchliche Puffer

PBS	140 mM	NaCl	
	2,7 mM	KCI	
	8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	рН 7,4
10x PBS	400 g	NaCl	
	10 g	KCI	
	72 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •2 H <sub>2</sub> C	)
oder	144,95 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •12 H <sub>2</sub>	0
	10 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
		In 5 I bidest $H_2O$	aufnehmen und pH auf 7,4
		justieren	
PBS <sup>++</sup>	0,9 mM	CaCl <sub>2</sub>	
	0,5 mM	MgCl <sub>2</sub>	in PBS
		In PBS	
TAE	40 mM	Tris	
	2 mM	EDTA	in $H_2O$

# 2.1.13 Lösungen für die Arbeit in der eukaryontischen Zellkultur

PBS	150 mM	NaCl
	120 mM	KCI
	10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
	0,002 %	Phenolrot
DMEM		Gibco / BRL, Eggenstein
FKS		Gibco / BRL, Eggenstein

Glutamin	100 mM	(= 50 x konzentrierte Stammlösung)
Pen/Strep		Seromed / Biochrom, Berlin
Trypsin-EDTA-Lö	sung	Gibco / BRL, Eggenstein

# Hitzeinaktiviertes- und Dialysiertes-FKS

Zur Herstellung von hitzeinaktiviertem FKS wurde das FKS für 30 Minuten bei 56°C inkubiert und über Nacht gegen 5 I PBS im Kühlraum in einem Dialyseschlauch mit einem Cut off von 12 – 14 kDa dialysiert.

## Selektionsmedien

Medien für stabil transfizierte Zellen enthielten zusätzlich 100  $\mu$ g/ml G418.

# 2.1.14 Komplettierung von RPMI-Kulturmedium für melan-a-Zellen

RPMI-Medium	1x	RPMI 1640 (powder), Gibco / BRL, Eggenstein
	20 g	Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub>
	10 ml	HCI
		pH-Wert unter 5% CO2 mit auf pH 7,1 einstellen
		ad 51 H <sub>2</sub> O

Nach dem Sterilfiltrieren wurde dem Medium 10% FKS und 1x Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Vor jedem Gebrauch wurde dem benötigten Medium 200 nmol/I des Phorbolesters TPA zugesetzt. Dieser fungiert als Aktivator der Proteinkinase C und ist für die *melan-a-*Zellen ein obligater Wachstums- und Differenzierungsstimulus. Aufgrund der Instabilität von TPA muss der Phorbolester nach spätestens 4 Tagen erneuert werden.

# 2.1.15 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium	10 g	Bacto-Trypton (Difco)
	5 g	Bacto-Hefe-Extract (Difco)

5 g NaCl

Die obigen Substanzen wurden in 800 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst, auf pH 7,5 eingestellt, anschließend ebenfalls mit dest. H<sub>2</sub>O auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.

# LB-Ampicillin-Agarplatten

Zur Bakterienanzucht 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 μg/ml zugeführt. Der Agar wurde in 10 cm Petrischalen gegossen, bei RT abgekühlt und anschließend bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

# 2.2 Zellbiologische Methoden

## 2.2.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre unter 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C kultiviert. Medien und Lösungen wurden, mit Ausnahme der Trypsinlösung, auf 37°C vorgewärmt. Die in Tabelle 2 (siehe Abschnitt 2.1.11) aufgeführten Zelllinien wurden als Ausgangsmaterial für Transfectionen mit den dort aufgeführten Medien verwendet.

## 2.2.2 Passagieren von Zellen

Trypsin-EDTA-Lösung	0,05% (w/v)	Trypsin
	0,02% (w/v)	EDTA in PBS

Um Zellen in einer für die Versuche geeigneten Dichte auszuplattieren, oder zur Passagierung der Zellen, wurde nach Erreichen der Konfluenz des Zellrasens das Medium abgesaugt und die Zellen kurz mit PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen bis zur vollständigen Ablösung vom Untergrund mit Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Der Waschschritt entfernt zum großen Teil die dem Medium zugesetzten Proteinaseinhibitoren, welche zu einer Inaktivierung des Trypsins führen würden.

Nach Kontrolle der vollständigen Ablösung im Mikroskop wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe serumhaltigen Mediums gestoppt und die Zellen durch mehrmaliges resuspendieren vereinzelt. Anschließend wurde entweder die Zellzahl bestimmt und die Zellen in gewünschter Dichte ausplattiert oder die Zellen standen nach Zentrifugation (1000 rpm, 5 min in der Laborfuge) zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung. *Melan-a*-Zellen und *MEF-mocha-3*-Zellen wurden in der Regel 1:3 geteilt, alle anderen Zellen mindestens 1:5.

# 2.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Einfriermedium

10% (v/v) DMSO im jeweiligen

gebrauchsfertigen Zellkulturmedium

Die Zellen wurden trypsiniert und nach Aufnahme in Medium in der Laborfuge für 5 min bei 1000 rpm und 4°C pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 1,5 ml Einfriermedium vorsichtig resuspendiert und dann in beschriftete, vorgekühlte Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden sofort für eine Nacht bei –80°C und ab dem nächsten Tag in flüssigem Stickstoff gelagert.

## 2.2.4 Revitalisierung von Zellen

Nach der Entnahme des Kryoröhrchens aus dem Stickstofftank wurde es etwa 1 min bei RT erwärmt und anschließend in 70% Ethanol bei 37°C aufgetaut bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellsuspension wurde vorsichtig entnommen, in 8,5 ml kaltes Medium (4°C) überführt und 5 Minuten bei 1000 rpm in der Laborfuge sedimentiert. Mit diesem Waschschritt soll das DMSO entfernt werden, da es bei Inkubationstemperaturen zytotoxisch wirkt.

Das Zellpellet wurde in Kultivierungsmedium aufgenommen und ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen um restliches DMSO und Zelldetritus zu entfernen.

# 2.2.5 Präparation primärer, embryonaler Mausfibroblasten nach terminierter Verpaarung

(Hogan et al. 1994)

Da die Präparation unter sterilen Bedingungen erfolgen sollte, wurde zunächst das OP-Besteck, PBS und ein Erlenmeyerkolben mit Glasperlen sterilisiert.

Am 13½. Tag nach einem positivem Befund (Vaginalpropf) im "terminal plaque Check" wurde aus dem schwangeren Muttertier nach Tötung durch Genickbruch der paarige Uterus frei präpariert und dreimal in 4°C kaltem, sterilem PBS gewaschen. Die Embryonen wurden frei präpariert und von jeglichem maternalen Gewebe befreit. Nach Dekapitation der Embryonen kann das Kopfmaterial für Protein- oder DNS-Bestimmungen verwendet werden.

Dann wurden die Organe aus dem Rumpf soweit sichtbar mit einer Spitzenpinzette herausgekratzt und der Rest in einem vorbereiteten Erlenmeyerkolben mit Glasperlen bei 37 °C unter leichtem Schütteln nicht länger als 10 min trypsiniert. Um eine bessere Vereinzelung der Zellen zu ermöglichen wird der Embryorumpf zuvor mechanisch zerkleinert. Es finden pro Embryo in einem Kolben ca. 5 ml Gibco BNC Trypsin 0,25% Verwendung. Die Trypsinierung wird durch gebrauchsfertiges DMEM-Medium gestoppt (ca. 10 ml). Nach Pelletierung der Zellen für 5 min bei 1000 g und Resuspendieren in Medium werden die Zellen ausplattiert und eventuell grobe Gewebereste entfernt. Nach erreichen der Konfluenz wurden die Zellen 1:3 geteilt und so lange weiterkultiviert, bis eine Immortalisierung eingetreten war (erkennbar an einem typischen Wachstumsmuster, siehe unten). Die angelegte Zelllinie wurde im Westernblot auf Expression von  $\delta$ -Adaptin getestet.

Die Passagen 1-8 zeigen ein schnelles Wachstum, die Passagen 8-15 ein langsames Wachstum, ab 15-20 wieder ein schnelleres Wachstum, das dann beibehalten wurde.

#### 2.2.6 Transfektion eukaryonter Zellen mittels CaCl<sub>2</sub>

Die stabile Transfektion eukaryontischer Zellen mit CaCl<sub>2</sub>-Phosphat-Methode wurden nach Chen et al. (1987) durchgeführt. Sie sollte ursprünglich dazu dienen, den hMPR46 in die *melan-a*-Zellen zu transfizieren. Dazu wurden folgende Lösungen benötigt:

CaCl <sub>2</sub> -Lösung	2,0 M	CaCl <sub>2</sub>
HBS (2X)	0,05 M	HEPES
	0,0015 M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,28 M	NaCl

Glycerin

15% Glycerin (w/v) in 1x-HBS

Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion in einer Dichte von  $2x10^5$  Zellen auf einer 10 cm Gewebeschale ausgesät. Vier Stunden vor Zugabe der DNS wurde das Medium gewechselt. Zur Herstellung des Präzipitates wurden 10 µg des zu transfizierenden Plasmids (Qiagen-Präparation), jeweils 1 µg des Selektionsmarker-tragenden Plasmids (pSV neo) sowie 31,25 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> in einem Eppendorfgefäß vorgelegt und mit dest. H<sub>2</sub>O bidest auf 250 µl aufgefüllt. Diese DNS–Mischung wurde langsam in 250 µl HBS (2x) eingetropft. 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. Dafür wurden für 2,5 min 3 ml 15 % Glycerin in 1x HBS auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und mit 5 ml Medium weiter inkubiert.

Die oben beschriebene Methode konnte nicht verwendet werden, da nach Zugabe von CaCl<sub>2</sub> zum RPMI-Medium Präzipitate entstanden, die die Zellen in der Folge absterben ließen. Die Transfektion von *melan-a*-Zellen erfolgte deshalb mit der nachfolgend beschriebenen Effecten<sup>™</sup>-Methode.

#### 2.2.7 Stabile Transfektion eukaryonter Zellen mittels Effecten™

Die stabile Transfektion eukarvontischer Zellen mit der Effecten™-Methode wurde nach Vorschrift des Herstellers (Qiagen Effecten Transfection Reagent Handbook 01/99) und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt. Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von 2 x 10<sup>5</sup> Zellen auf einer 6 cm Zellkulturplatte ausgesät, so dass die Zellkulturplatte am Tag der Transfektion zwischen 40 und 80 % konfluent waren. Zunächst wurde 1 µg Plasmid und zusätzlich Selektionsvektor (dieser im Verhältnis 1:10 zum Plasmid), mit einer minimalen DNS-Konzentration von 0,1 µg/µl mit EC-Puffer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf ein Endvolumen von 150 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 8 µl Enhancer wurde für eine Sekunde gevortext. Die folgende 2-5 min-Inkubation bei RT diente zum Kondensieren der DNS. Um Tropfen aus dem Deckel des Reaktionsgefäßes zu entfernen, wurde dann das Gemisch kurz anzentrifugiert und anschließend 25 µl Effecten<sup>™</sup>-Transfektions-Reagenz zugegeben, bevor es für 10 s gevortext wurde. Um die Komplexbildung von Effecten<sup>™</sup> und dem DNS-Kondensat zu ermöglichen, wurde die Mischung 10 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und 4 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben. Der gebildete Transfektionskomplex wurde mit 1 ml Medium vermischt und auf die Zellkulturplatte unter Schwenken tropfenweise gleichmäßig verteilt. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen noch ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und mit Selektionsmedium versorgt.

#### 2.2.8 Selektion stabil transfizierter melan-a-Zellen

Zur Selektion stabil transfizierter *melan-a*-Zellen wurde dem Medium zwei Tage nach der Transfektion 500 µg/ml Neomycin zugesetzt. Nach zwei Wochen konnten Einzellklone auf 24-Well-Platten überführt werden. Nachdem das "well" konfluent bewachsen war, wurden die Zellen zur weiteren Expansion in eine 6 cm Gewebekulturschale überführt. Zur Expressionskontrolle wurde das transfizierte Protein mit dem entsprechenden Antiserum in der Immunfluoreszenz detektiert. Ein Nachweis im Westernblot und in der Immunpräzipitation wurde zur Verifizierung ebenfalls angefertigt.

# 2.3 Molekularbiologische Methoden

# 2.3.1 Konzentrationsbestimmung von DNS

Die Konzentration von DNS-Lösungen wurde durch photometrische Messung der Absorption bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Eine OD von 1,0 entspricht ca. 50  $\mu$ g/ml doppelsträngiger und 40  $\mu$ g/ml einzelsträngiger DNS. Des Weiteren wurde die Reinheit der DNS-Präparationen anhand des Verhältnisses von OD<sub>260</sub> (Absorption der Nukleinsäurebasen) zu OD<sub>280</sub>(Absorption der Dipeptidbindung) überprüft, wobei dieser Wert zwischen 1,8 und 2 liegen sollte. Es wurde immer eine 1:100 Verdünnung gewählt und gegen H<sub>2</sub>O gemessen.

# 2.3.2 Präparation transformationskompetenter E.coli

*E.coli* vom Stamm *DH5* $\alpha$  wurden für die Aufnahme von DNS aus dem umgebenen Medium kompetent gemacht. Tfbl und Tfbll werden jeweils frisch angesetzt und sterilfiltriert (Hanahan 1983):

TfbI 100 mM RbCI 50 mM KCI 30 mM KAc 15 %(v/v) Glycerin pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt Tfbll

10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM Ca<sub>2</sub>Cl 15 %(v/v) Glycerin pH 7,0 mit NaOH einstellt

Von einer Stammplatte *E.coli DH5* $\alpha$  aus wurden 6 ml LB-Medium angeimpft und auf einem Drehrad bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,3 inkubiert. Mit 2 ml dieser Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium in einem 1 l Schüttelkolben angeimpft und 2 bis 3 h unter starkem Schütteln (300 rpm) bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,5 bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Kultur in einem Eiswasserbad unter Schwenken abgekühlt und in einem 50ml-Falcon-Röhrchen für 5 min bei 2500 rpm in der Laborfuge bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml Tfbl aufgenommen, kurz geschüttelt, 90 min bei 4°C inkubiert und im Folgenden in einer Eppendorfzentrifuge für 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Nachdem das Pellet in 2 ml Tfbll resuspendiert wurde und in Aliquots von je 100 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde, erfolgte die Lagerung bei –70°C.

#### 2.3.3 Transformation kompetenter E.coli mit Plasmid-DNS

100  $\mu$ l kompetenter *E.coli* des Stammes *DH5* $\alpha$  wurden auf Eis aufgetaut und mit 0,2  $\mu$ g Plasmid-DNS für 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurde dieses Gemisch für 2 min einem Hitzeschock bei 37°C ausgesetzt, bevor eine weitere 2 min Inkubation auf Eis folgte.

#### 2.3.4 Anlegen einer *E.coli*-Glycerinkultur

Vorkulturen mit einer  $OD_{600}$  von größer als 1,0 in LB-Medium wurden mit 0,25 Volumen 80% igen Glycerins versetzt und bei –70° C aufbewahrt. Aus der Glycerinkultur kann direkt eine Kultur zur Präparation von Plasmid-DNS angeimpft werden.

## 2.3.5 Klonale Plasmidamplifikation nach Qiagen

(Qiagen Handbook, 8/2003)

Die Plasmidamplifikation wurde nach Vorschrift des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Puffer P1, P2, P3, N3, PE, PB, QBT, QC und QT durchgeführt.

#### 2.3.5.1 Mini-Präp

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. Am nächsten Tag wurden 2 ml Bakteriensuspension bei 1800 x g (6000 rpm in Eppendorfzentrifuge) pelletiert und das Pellet in 250 µl eiskalten P1 Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 wurde das Gemisch fünfmal invertiert, dann 350 µl Puffer N3 dazu pipettiert und erneut fünfmal invertiert. Der Überstand einer sich anschließenden 10 min 12000 rpm-Zentrifugation wurde auf eine QIAprep-Minisäule gegeben. Diese wurde erneut für eine Minute bei 12000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen, da die DNS jetzt an der Säule adhäriert vorliegt. Eine weitere Zentrifugation der Säule mit 0,5 ml PB- Puffer für eine Minute optimierte die Ausbeute.

Zum Waschen der DNS wurde die Säule mit 0,75 ml Puffer PE für eine Minute zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde restlicher Waschpuffer durch einen erneuten Zentrifugationsschritt von einer Minute entfernt. Anschließend wurde die DNS mit 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bidest. in ein neues Eppendorfcup eluiert.

#### 2.3.5.2 Midi-Präp

Als Ausgangsmaterial für diese Präparation wurden 100 ml einer Bakterienkultur mit einer  $OD_{600}$  von größer als 1,0 im JA-10 Rotor bei 8000 rpm (8500 x g) pelletiert. 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 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 4 ml eiskaltem Puffer P3 und sofortigem Invertieren wurde der Ansatz neutralisiert und auf Eis 15 min inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 30 min bei 12800 rpm (20000 x g) im JA-20 Rotor bei 4°C zentrifugiert. Der entsprechende Überstand wurde dann durch zwei Lagen Mull auf eine mit 4 ml Puffer QBT voräquilibrierte Qiagen-Plasmid Prep-Tip-100-Säule gegeben. Die Säule wurde im Folgenden zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen und anschließend an das Silikagel-Anionenaustauscher-Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNS mit 5 ml Puffer QF eluiert. Das Eluat wurde in einem 10ml-Plastikröhrchen aufgefangen. Die DNS wurde durch Zugabe von 3,5 ml (0,7 Volumen) 100 % Isopropanol gefällt und bei 4 °C und 6000 rpm (4400 x g) in der Laborfuge für 1 h zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen.

#### 2.3.6 Spaltanalyse von DNS mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Für die Spaltanalyse von DNS mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurde das von New England Biolabs vertriebene System, bestehend aus Enzymen und einem 10-fach konzentrierten Puffer, benutzt. Die Aktivität der Restriktionsendonukleasen wird in Units (U) angegeben. Dabei entspricht eine Unit der Menge an Enzym, die für die vollständige Verdauung von 1  $\mu$ g  $\lambda$ -DNS in einer Stunde benötigt wird. Um sicherzustellen, dass der Verdau quantitativ abläuft, wurden die Enzymmengen und die Inkubationszeit verdoppelt. Der Ansatz für die Spaltanalyse bestand aus folgenden Komponenten:

0,5 μg DNS
2 μl zu dem Enzym passender 10-fach Puffer
1x U Restriktionsendonuklease
ad 20 μl H<sub>2</sub>O bidest

Der Ansatz wurde 2 h bei 37°C inkubiert, anschließend ein Aliquot zur Analyse in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt.

#### 2.3.7 Auftrennen der DNS in Agarosegelen

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden Agarosegele verwendet. Die für die Gele benutzte Konzentration an Agarose richtete sich nach der Größe der zu trennenden DNS-Fragmente und ist in Tabelle 3 aufgeführt:

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

Tabelle 3: Trennbereiche von Agarosegelen

Probenpuffer (LP IV) 0,25% (w/v) Bromphenolblau 40% (w/v) Saccharose in 1 X TAE

Die erforderliche Agarose-Menge wurde in 300 ml 1x TAE aufgekocht (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 wurden mit 6x Probenpuffer auf 1x-konzentrierten Probenpuffer eingestellt und in die vorgeformten Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 3-4 V/cm durchgeführt (ca. 50V Gesamtspannung bei unseren Spannungsgeräten). Durch das in die DNS interkalierende Ethidiumbromid werden die DNS-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.

# 2.4 Proteinbiochemische Methoden

# 2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

(Bradford 1976)

Verwendete Lösungen:

- Bradford-Reagenz
- BSA-Standard (1,0 mg/ml BSA in H<sub>2</sub>O bidest.)

Das Standardprotein wurde zusammen mit einem Leerwert in definierten Proteinmengen von 2, 4, 8, 12 und 16  $\mu$ g eingesetzt und wie die Proben auf 800  $\mu$ l Gesamtvolumen mit H<sub>2</sub>O bidest. aufgefüllt. Anschließend wurden 200  $\mu$ l RotiQuant<sup>®</sup>-Bradford-Reagenz zugegeben und mindestens 15 min jedoch nicht länger als eine Stunde bei RT inkubiert. Die Absorption des Farbstoffs wurde bei  $\lambda$ =595 nm gemessen und die Proteinkonzentration der Probe mittels linearer Regression ermittelt.

# 2.4.2 Proteinbestimmung mittels BioRad-DC-Protein-Assay

(Lowry et al. 1951; Peterson 1979)

Verwendete Lösungen:

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, Tween20, etc.) in einer Konzentration von bis zu 1%. Der Assay erfolgte mit von der Firma BioRad hergestellten Lösungen im Mikromaßstab in unbeschichteten 96-Well-Platten. Für die Eichgerade wurden 0, 2, 4, 8, 12 und 16  $\mu$ g BSA-Standard in die Mikrotiterplatte als Doppelwerte pipettert. Die zu bestimmenden Proben wurden zu je 5  $\mu$ l in die Mikrotiterplatte pipettiert und mit PBS auf 20  $\mu$ l

aufgefüllt. Anschließend wurde zu allen Proben 25  $\mu$ l Reagenz A' und dann 200  $\mu$ l 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 Eichgerade bestimmt werden.

# 2.4.3 Wessel-Flügge-Fällung

Zur quantitativen Fällung von Proteinen in stark verdünnten Lösungen, insbesondere aus dem Überstand nach dem Waschen der Donormembranen, wurde die Methode nach Wessel & Flugge<sup>\*</sup> (1984) angewendet. Hierzu wurden in einem 15ml-Greiner-Röhrchen zur Probe 4 Probenvolumen Methanol gegeben, gevortext und kurz anzentrifugiert. Dann wurde ein Probenvolumen Chloroform zugegeben und wiederum nach kurzem vortexen anzentrifugiert. Nachdem dann 3 Probenvolumina H<sub>2</sub>O hinzugegeben wurden und zweimal 10 s kräftig ausgeschüttelt wurde, waren nach der sich anschließenden 10 min-Zentrifugation bei 5500 rpm in der Laborfuge gefällte Proteinaggregate in der sich ausbildenden Interphase sichtbar. Die Oberphase wurden vorsichtig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen, dann erneut drei Probenvolumen Methanol zugesetzt und wiederum 10 min bei 5500 rpm zentrifugiert.

Da die Proteinaggregate sich nun im Pellet befinden, konnte der Überstand wiederum mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen werden. Vor der Aufarbeitung für ein SDS Gel, wie in Abs 2.4.6 beschrieben, wurde das Pellet so lange auf Eis stehen gelassen bis verbleibende Methanolreste abgedampft worden waren.

<sup>&</sup>lt;sup>\*</sup> Flügge wird in der englischsprachigen Literatur als Flugge zitiert.

#### 2.4.4 TCA-Fällung

Bei Proteinlösungen mit höheren Konzentrationen kam die TCA-Fällung zur Anwendung, z.B. beim Galactosyltransferasetest. Mit einer 100% TCA-Lösung wurde die entsprechende Probe auf eine TCA-Endkonzentration von 10 % gebracht, durch vortexen gemischt und entweder über Nacht bei 4°C oder 2 h auf Eis gefällt. Anschließend wurden die gefällten Proteine 15 min bei 14000 rpm in einer Eppendorfzentrifuge pelletiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde mit 2 %iger NaCH<sub>3</sub>COO-Lösung in Ethanol gewaschen und anschließend in Probenpuffer aufgenommen.

#### 2.4.5 Enzymaktivitätsbestimmungen

#### 2.4.5.1 β-Hexosaminidase

Reaktionspuffer	0,1 M	Na-Citrat pH 4,6
	0,5%	Triton X-100
Substrat	10 mM	Para-nitro-2-acetamido-2-deoxy-ß-D-
		giucopyranosiu
	0,1 M	Na-Citrat pH 4,6
	0,1%	Triton X-100

Die  $\beta$ -Hexosaminidaseaktivität wurde als möglichst zügig bestimmbarer Marker für das lysosomale Kompartiment und Marker für die Aufschlussgüte bei der PNS-Präparation verwendet (siehe Abb 2.6.1.4). Dazu wurden immer 10 µl aus Fraktionen oder 5 µl aus pelletierten Membranen verwendet. In jedem Fall wurde mit PBS + 0,1% Triton X-100 auf 20 µl aufgefüllt, 5 µl Reaktionspuffer zugegeben und 10 s sonifiziert. Nach Zugabe von 100 µl Substrat wurde die Probe 15 min bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert, bevor die Enzymaktivität dann mit 500 µl 0,4 M Glycin/NaOH pH 10,4 gestoppt wurde. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 405 nm im ELISA-Reader. Aktivität [mU/ml]= $\frac{E_{405} \bullet \text{Messvolumen} [\text{ml}] \bullet 1000}{\varepsilon \text{ mol} \bullet \text{Enzymvolumen} [\text{ml}] \bullet \text{Inkubationszeit} [\text{min}]}$ 

Der molare Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  für Hexosaminidase beträgt 18,5 cm<sup>2</sup>/mol bei 405 nm.

#### 2.4.5.2 Galactosyltransferase

(nach Brandli et al. 1988)

Substratmix	382 μl	H <sub>2</sub> O
(für 20 Ansätze)	104 μl	0,5 M Tris/HCI + 5 % Triton X-100
	88 µl	MnCl <sub>2</sub>
	8,8 μl	0,2 M ATP
	17 μl	UDP-[ <sup>3</sup> H]-Galactose
	12 mg/ml	Ovalbumin

Um die Anreicherung von Golgirespektive TGN-Membranen aus Zellhomogenaten oder die Golgiverteilung in einzelnen Gradientenfraktionen zu ermitteln, wurde die Aktivität der als TGN-Marker fungierenden Galactosyl-Transferase bestimmt. Dazu wurden 5-10 µl der entsprechenden Fraktion oder des entsprechenden Anreicherungsschrittes mit 10 μl PBS + 0,1% Triton X-100 verdünnt und für 10 s sonifiziert. Dann wurden die Proben mit 30 µl Substratmix versetzt und für eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml einer frisch angesetzten 10% igen TCA-Lösung gestoppt und über Nacht bei 4°C gefällt.

Durch Zentrifugation der Proben mit 14000 rpm in einer Eppendorfzentrifuge bei 4°C wurde das TCA-fällbare Präzipitat pelletiert. Das Pellet wurde mit 0,5 ml eiskalter 5% igen, frisch angesetzter TCA dreimal gewaschen, bevor es in 0,2 ml NaOH aufgenommen und für 10 min bei 95°C resuspendiert wurde. Anschließend wurde 0,6 ml H<sub>2</sub>O zugegeben und mit 0,2 ml Eisessig neutralisiert, bevor die Probe in 3 ml Szintilationsflüssigkeit überführt wurde, um die auf das Ovalbumin tranferierte [<sup>3</sup>H]-UDP-Galactose zu bestimmen.

Die Galactosyl-Transferase-Aktivität wurde durch die spezifische Radioaktivität der [<sup>3</sup>H]-UDP-Galactose und die eingesetzte Proteinmenge der Probe normalisiert, um die spezifische Aktivität in pmol transferierte [<sup>3</sup>H]-UDP-Galactose/mg Protein/min zu berechnen.

## 2.4.6 SDS-PAGE(Minigele)

(Laemmli 1970)		
Acrylamidlösung	30 % (w/v)	Acrylamid
	0,8 % (w/v)	Bisacrylamid
		in H <sub>2</sub> O bidest
Agarose-Lösung	1 % (w/v)	Agarose in H <sub>2</sub> O bidest.
Elektrophoreselaufpuffer	25 mM	Tris-HCI pH 6.8
	19 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
6 x Probenpuffer,	480 mM	Tris-HCI pH 6.8
reduzierend		
	12 % (w/v)	SDS
	45 % (v/v)	Glycerin
	12 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	0,06% (w/v)	Bromphenolblau

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurden Polyacrylamidgele mit einem vertikal ausgerichteten Glasplattensystem verwendet. Die Gele wurden zwischen zwei mit Ethanol gereinigte Glasplatten gegossen, die durch zwei Abstandshalter (Spacer) in definiertem Abstand von 1 mm getrennt und an der Unterseite mit einer 1%igen Agarose-Lösung abgedichtet waren. Der Trenngelpuffer wurde zwischen die Glasplatten gefüllt und sofort mit einer mit Wasser gesättigten Butanollösung überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser entfernt, der Sammelgelpuffer eingefüllt und der Probenkamm eingefügt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und die entstandenen Geltaschen mit bidest. H<sub>2</sub>O gespült. Die Minigele wurden in die dazu passende Apparatur der Firma Whatman/Biometra eingesetzt, nachdem ausreichend Elektrophoreselaufpuffer in die Kammer gefüllt wurde. Die für die Gele benutzte Konzentration an Acrylamid/Bisacrylamid richtete sich nach der Größe der zu trennenden Proteine und ist in der nachfolgenden Tabelle 4 zusammengefasst:

	Trenngel			Sammelgel		
Polyacrylamidanteil [%]	5	7,5	10	12,5	15	4
30% (w/v) Acrylamid / 0,8% (w/v)	1,33	2	2,67	3,33	4	0,45
Bisacrylamid [ml]						
Trenngelpuffer:			2		,	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8 / 0,4%						
(w/v) SDS [ml]						
Sammelgelpuffer:			-			0,45
0,5 M Tris-HCl pH 6,8 / 0,4%						
(w/v) SDS [ml]						
H <sub>2</sub> O [ml]	4,67	3,9	3,3	2,62	1,95	2
TEMED [μl]			8	•		4
10% APS [μl]			80			40

#### Tabelle 4: Pipetierschema für die Herstellung von 2 Minigelen

#### **Probenvorbereitung:**

Die Proben wurden zunächst mit 6 x konzentriertem Probenpuffer auf einfach Konzentriert verdünnt und dann für 3 x 10 s sonifiziert. Anschließend wurden sie für 5 min bei 95°C denaturiert. Vor dem Beladen der Gele wurden die Proben für 2 min bei 14000 rpm in der Eppendorfzentrifuge zentrifugiert. Die Elektrophorese der Minigele wurde mit einer konstanten Stromstärke von 50 mA gestartet, die auf 100 mA erhöht wurde nachdem das Bromphenolblau eingelaufen war. Neben den Proben wurde immer ein Molekulargewichtsstandard der Firma BioRad laufen gelassen. Falls die Proben in Probenpuffer weggefroren wurden, mussten sie vor Auftragen auf das Gel erneut gekocht werden.

## 2.4.7 Färbung von Polyacrylamidgelen mit kolloidaler Coomassie-Lösung

Coomassie-Lösung	0,5% (w/v)	Coomassie Blau R
	50% (v/v)	Methanol
	10% (v/v)	Essigsäure in H <sub>2</sub> O bidest.
Entfärber-Lösung	50%	Methanol
	10%	Essigsäure in H <sub>2</sub> O bidest.

Das Gel wurde über Nacht bei RT (oder 1-2 h bei 37°C) auf einer Wippe in Coomassie-Färbe-Lösung gefärbt und anschließend in der Entfärber-Lösung über Nacht entfärbt, wobei die Entfärber-Lösung mehrmals gewechselt werden musste. Das Gel wurde anschließend zweimal für 15 min gewässert und zwischen Zellophan<sup>®</sup> in einem Geltrockner (BioRad) getrocknet.

## 2.4.8 Westernblot

## 2.4.8.1 Nassblot auf Nitrozellulosemembranen

Transferpuffer	15 g	Tris
	71,5 g	Glycine
	11	Methano

Für jedes Gel wurden eine Nitrozellulose-Membran sowie zwei Whatman-Filterpapiere auf die Gelgröße zurechtgeschnitten und ca. eine halbe Stunde vor Transferbeginn in Transferpuffer äquilibriert. Nach der Elektrophorese wurde das Mini-Gel 5 min auf einem Wipptisch in Transferpuffer ebenfalls äquilibriert. Zum Proteintransfer wurden die einzelnen Bestandteile luftblasenfrei in den Bloteinsatz wie vom Hersteller angegeben geschichtet. Er wurde anschließend in die Elektrophoresekammer eingesetzt, welche zuvor mit kaltem Transferpuffer gefüllt wurde. 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. Für sehr große Proteine, wie der MPR300 wurde ein 5% Gel für 2 Stunden bei 100 mA geblottet.

#### 2.4.8.2 Immundetektion

Blotto	5% (w/v)	Magermilchpulver
	0,05 % (v/v)	Tween 20 in PBS
PBS-Tween	0,05 % (v/v)	Tween 20 in PBS

Alle Inkubationen und Waschschritte erfolgten auf einem Wipptisch. Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrozellulose-Membran einmal mit PBS gespült, um Reste von Methanol zu entfernen. Anschließend wurden die freien Proteinbindungsstellen auf der Membran in der Regel über Nacht bei 4°C mit Blotto abgesättigt (alternativ 1 h / 37°C oder 2 h / RT). Das Blotto wurde dann entfernt und 3x kurz mit PBS-Tween gespült. Der Primärantikörper wurde in PBS-Tween verdünnt (Verdünnung siehe Tab.1, Abschnitt 2.1.9.1) und 2 h bei RT auf der Membran inkubiert. Um eine Austrocknung durch Transpiration vorzubeugen wurde das Gefäß abgedeckt. Nach dieser Inkubation wurde die Membran dreimal 10 min mit PBS-Tween gewaschen und der HRP-konjugierte Sekundärantikörper 1:2000 in PBS-Tween verdünnt und 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde fünfmal 5 min mit PBS-Tween gewaschen. Vor der Detektion mit dem Chemilumineszenzsystem wurde die Membran einmal in PBS geschwenkt, um störende Effekte durch das Detergenz zu vermeiden.

Das Chemilumineszenzkit besteht aus 2 verschiedenen Lösungen, von denen gleiche Volumina miteinander vermischt werden. Nach Erzeugung des Chemilumineszenz-Signals durch 1 min Inkubation bei RT unter leichtem

Schwenken, wurde das Signal mit einer CSC-Kamera detektiert und als elektronisches Bild gespeichert. Die Expositionszeiten (5 s bis 10 min) richteten sich nach der Stärke der Signale. Das Elektronische Bild des Westernblots wurde dann mittels des AIDA-Programms quantfiziert.

# 2.4.9 Metabolische Markierung mittels [<sup>35</sup>S]-Met/Cys

"X" ml	Methionin-/Cysteinfreies DMEM
5 % (v/v)	dialysiertes, hitzeinaktiviertes FKS
"x" μCi	[ <sup>35</sup> S]–Methionin/Cystein in Hunger-
	medium
"X" ml	DMEM
10%	FKS
1x	Penicillin/Streptomycin
25 mM	HEPES
	pH 7,1
	"X" ml 5 % (v/v) "x" μCi "X" ml 10% 1x 25 mM

"X"=Volumen an Hungermedium und Chasemedium richtet sich nach der für den Versuch benötigten Plattengröße, entsprechend wurde die benötigte [<sup>35</sup>S]– Methionin/Cystein-Menge "x" zugegeben.

Mindestens drei Tage vor der Markierung wurden die Zellen in Zellkulturmedium ausgesät. Eine Stunde vor Markierungsbeginn wurden die konfluenten Zellen 3x mit PBS gewaschen, um nicht radioaktives Methionin/Cystein von den Zellen und den Wänden der Gewebekulturschale zu entfernen. Danach wurden die Zellen 1 h mit Hungermedium im Inkubator belassen, bevor das Medium gegen Markierungsmedium ausgetauscht wurde (*pulse*). Am Ende der Markierung wurde in jedem Fall 3 x mit 4°C PBS gewaschen. Dann wurde der Zellrasen entweder abgeschabt, oder es folgte ein *chase* bei unterschiedlichen

Temperaturen mit Chasemedium. Vor dem Abschaben für eine IP oder einen Budding-Assay wurden die Zellen erneut 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen. Der Transport und alle Waschschritte wurden auf einer 4°C vorgekühlten Metallplatte vorgenommen. Vor und nach der Markierung der Zellen wurde die Aktivität im Medium durch Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt, um die Inkorporation von [<sup>35</sup>S]–Methionin/Cystein in die Zellen zu überprüfen.

#### 2.4.10 Immunpräzipitation (IP)

10 mM	Tris-HCI, pH 8,5
0,6 M	KCI
0,1 %	SDS
0,05 %	Nonidet P-40
1 %	Triton X-100
0,5 %	Natriumdeoxycholat
	in PBS
2 M	KCI in IMM
10 %	BSA
0,2 %	SDS in IMM
	10 mM 0,6 M 0,1 % 0,05 % 1 % 0,5 % 2 M 10 % 0,2 %

#### Pansorbin:

Pansorbin ist eine Suspension aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus*, das aufgrund des membranständigen Protein A eine hohe Bindungskapazität für die Fc-Region verschiedener Klasse-G-Immunglobuline besitzt. Aus Kostengründen wurde Pansorbin zur Vorfällung anstatt des wesentlich teureren, gereinigten Protein A verwendet. Es wurde immer gewaschenes Pansorbin verwendet, welches wie folgt hergestellt wurde: 2 ml Pansorbin wird 1 min bei 14000 rpm in einer Eppendorfzentrifuge zentrifugieren, der entsprechende Überstand wirde verworfen und das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert. Dies wird fünf Mal wiederholt.

#### Gewaschenes Protein A oder G:

Der in der Protein A/G Stammlösung vorhandene Formaldehyd wurde durch dreimaliges Waschen mit 750 µl PBS entfernt. Dafür wurde das Protein A/G immer 2 min bei 5500 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Üblicherweise wurden 50 µl Protein A/G pro IP-Probe eingesetzt. Das Pipettieren wurde mit einer abgeschnittenen 200 µl-Spitze vorgenommen.

#### Standardprotokoll der IP

Zur Immunpräzipitation wurde ein metabolisch mit [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein markiertes Zellpellet verwendet, welches in 500 µl PBS+0,5% Triton X-100 aufgenommen wurde, zuzüglich von 2 µl Proteinaseinhibitorcoktail. Die vollständige Solubilisierung erfolgte durch Ultraschall für 3 x 10 s und einer 30min-nkubation bei 4°C auf dem Schüttler. Dann wurde in einer Eppendorfzentrifuge zur Abtrennung von Detritus/Membranen der Überstand 20 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die Proteinkonzentration mit dem DC-Kit gemessen. Im Anschluss daran wurde nach Einstellung auf gleiche Proteinkonzentrationen (nicht bei Buddinganalysen) der Überstand zur Vorfällung mit 40 µl gewaschenem Pansorbin und 2 µl Präimmunserum versetzt. Nach einer 2h-Inkubation bei 4°C (Drehrad, "head-over-tail") wurde der Pansorbin-IgG-Komplex mit unspezifisch gebundenem Material durch 20 min Zentrifugation bei 14.000 rpm in der Eppendorfzentrifuge abgetrennt. Der Überstand wurde mit "X" µl (für "X" siehe Tabelle 1. Abschnitt 2.2.9.1) Primärantikörper versetzt und über Nacht auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden in einer 2h-Inkubation mit Protein A vorinkubiert, bevor die Komplexe durch eine 10min-Zentrifugation bei 5500 rpm aus dem Überstand sedimentiert und anschließend einem Standard-Waschprogramm unterzogen wurden (siehe unten).

Um mehrfach Antigene aus einer Probe zu präzipitieren wurde der Überstand der ersten IP erneut für 2 h mit 40 µl Pansorbin auf einem Drehrad im Kühlraum inkubiert, um eventuell vorhandene Reste von Antikörper zu entfernen. Nach erfolgter 20min-Zentrifugation wurde dann erneut über Nacht mit einem zweiten Primärantikörper inkubiert, gefolgt von einer zweiten Protein-A/G-Inkubation. Auf diese Weise konnten sequentiell bis zu sechs Antigene präzipitiert werden. Die IP-Präzipitate wurden dann wie folgt gewaschen:

1 x750 μl	Neufeld-Puffer
1 x750 μl	Immunomix
1 x750 μl	Immunomix/2 M KCI
1 x750 μl	PBS
1 x750 μl	1/10 PBS

Das IP-Pellet wurde dann nach dem letzten Waschschritt mit einer Hamiltonpipette möglichst trockengesaugt und anschließend für den Auftrag auf die SDS-PAGE vorbereitet (siehe Abschnitt 2.5.6). Nach dem SDS Lauf wurde das Gel zuerst für mindestens 15 min in Entfärber-Lösung (vgl. S.48), dann für die gleiche Zeit in H<sub>2</sub>O geschwenkt (siehe Abschnitt 2.5.7). Nach Trocknen des Gels zwischen zwei Zellophan<sup>®</sup>-Folien wurden die Markerbanden mit 0,5  $\mu$ l Labelmedium markiert, das getrocknete Gel mittels Autoradiographie über Nacht exponiert und am nächsten Tag eingelesen. Soweit nötig (schwaches Signal) erfolgte eine längere Exponierung bis zu 10 Tagen.

# Vorkopplung von Antikörper aus Hybridomkulturüberständen an Protein G:

Für eine IP oder IEF von Lamp-1 wurde der Hybridomkulturüberstand des monoklonalen Rattenantikörpers (1D4B) zunächst über Nacht an Protein G gekoppelt. Dazu wurde für 12 Proben 1 ml Hybridomüberstand über Nacht im Kühlraum auf einem Drehrad mit 600 µl gewaschen inkubiert. Am nächsten Tag wurde der vorgekoppelte Antiköper durch dreimaliges Waschen mit 4°C kaltem PBS von freien, nicht gekoppelten Antikörpern befreit, dann in PBS resuspendiert, aliquotiert und über Nacht mit der Probe inkubiert. Die

Immunpräzipitate wurden dann wie im Standardprotokoll beschrieben gewaschen.

## 2.4.11 Endoglykosidase-H-Verdau

Die Zuckerseitenkette von Glykoproteinen wird im Golgiapparat modifiziert ("Trimming"). Durch das Anheften eines N-Acetylglucosaminrestes im medialen-Golgi-Bereich werden Glykoproteine vom komplexen Typ (wie sie z.B. MPR46, Tyrosinase besitzen) resistent gegenüber der Spaltung durch die bakterielle Endoglykosidase H. Durch diesen einfachen Verdau ist es möglich zu analysieren, ob unter unseren Versuchsbedingungen (4 h Temperaturblock zum Akkumulieren von neu-synthetisierten Proteinen im TGN) überhaupt Proteine den medial-Golgi passieren haben.

Endo-H-Solubilizer 0,1 M β-Mercaptoethanol 0,1 % (w/v) SDS

Nach erfolgter Immunpräzipitation wurde das Pellet in 50 µl Endo-H- Solubilizer resupendiert, 15 s sonifiziert und für 5 min bei 95°C denaturiert, um die Spaltungsstellen für die Endoglykosidase H freizulegen. Nach kurzer Anzentrifugation wurde die Hälfte der Probe als positive Kontrolle mit Probenpuffer versetzt und weggefroren, die andere Hälfte über Nacht bei 37°C wie folgt inkubiert:

25 μl Probe
75 μl H<sub>2</sub>O
15 μl NaCitrat pH 5,5
1 μl Endoglykosidase H 5U/ml
2,87 μl 17% PMSF in DMSO

Die Inkubation wurde am nächsten Tag durch Kochen (5 min / 95°C) gestoppt. Aufgrund des großen Probenvolumens erfolgte im Anschluss daran eine Lyophilisierung, bevor die Proben in Probenpuffer resuspendiert wurden. Die so behandelte Probe und die Positivkontrolle wurden nochmals für 5 min bei 95°C gekocht, kurz zentrifugiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt, getrocknet und dann mittels Autoradiographie detektiert.

# 2.4.12 Isoelektrische Fokussierung (IEF) der Tyrosinase

Trennkriterium dieser elektrophoretischen Methode ist die elektrische Nettoladung der Proteine. Da im letzten Schritt des Trimmings der Kohlenhydratseitenketten von Glykoproteinen im TGN negative Sialylsäurereste kovalent angeheftet werden, sind Glykoproteine, die den Golgiapparat noch nicht verlassen haben, von solchen, die sich bereits im Endosomalen System befinden, aufgrund ihrer erhöhten negativen Ladung mittels IEF differenzierbar. Um die Effizienz des Temperaturblocks zu testen wurden daher isoelektrische Fokussierungen von Tyrosinase und MPR46 durchgeführt. Eine optimale Reproduzierbarkeit kann bei der IEF nur unter extrem sauberen Arbeitsbedingungen erreicht werden, da durch Kontaminationen störende elektrische Ladungsträger eingeschleust werden können. Aus diesem Grund wurde für alle Puffer HPLC-Wasser verwendet, wobei die Elektrodenpuffer hier eine Ausnahme bildeten.

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:
		рН 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:
		рН 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:
		рН 3,5-10
IEF-Solubilizer	0,5 %(w/v)	SDS
	10 mM	DTT

## Probenvorbereitung:

Eine Immunpräzipitation mit Pansorbin war nicht durchführbar, da Pansorbin Substanzen enthält, die eine spätere isoelektrische Fokussierung erheblich stören (Obermüller 2002). Insofern wurde die IP der Proben obligat mit Protein A durchgeführt. Nach der oben beschriebenen Waschprozedur schloss sich noch ein dreimaliges Waschen mit 750  $\mu$ l HPLC-Wasser an. Nach dem Waschen wurde das Pellet mit einer Hamiltonpipette trockengesaugt und in 60  $\mu$ l IEF-Solubilizer für 10 min/95 °C gekocht. Der Überstand wurde lyophilisiert und das auf diese Weise erhaltene Pellet sorgfältig in 60  $\mu$ l Lysispuffer resuspendiert. Anschließend wurde die Probe auf das IEF-Gel aufgetragen (siehe unten).

## 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  $\mu$ l 10 %-iges APS (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 Probentasche wurden 60 μl Lysispuffer gegeben und anschließend vorsichtig mit Kathodenpuffer überschichtet. Die Präfokusierung erfolgte für 15 min bei 200 V, 30 min bei 300 V und im letzten Schritt 30 min bei 400 V. Im Anschluss wurde der Kathodenpuffer entfernt, die Probentaschen trockengesaugt, danach die Proben in die Taschen gefüllt und mit 30 μl Overlaypuffer überschichtet. Nachdem die obere Kammer erneut mit Kathodenpuffer gefüllt wurde, erfolgte die Fokussierung bei Raumtemperatur für 12-15 h bei 500 V. Die Vorbereitung zur Autoradiographie entspricht der von kleinen Gelen, wie sie in Abschnitt 2.5.10 angegeben ist, nur das die Zeit zum Fixieren und Wässern jeweils 30 min betrug.

# 2.4.13 Herstellung eines Polyklonalen Immunserums aus Kaninchen gegen Tyrosinase und TRP-1

Die in diesem Projekt anstehenden Versuche erfordern den Verbrauch relativ großer Antikörpermengen (Milliliter) gegen Tyrosinase, TRP-1, Lamp-1 und hMPR46. Für Tyrosinase und TRP-1 konnten diese Mengen nicht von anderen Arbeitsgruppen (PEP7 bzw. PEP1 von Dr. V Hearing) zur Verfügung gestellt werden. Deshalb war die Herstellung eines Serums gegen Tyrosinase und TRP-1 erforderlich. Dazu wurden als Antigene synthetische Peptide, die der jeweiligen zytoplasmatischen Domäne von Tyrosinase und TRP-1 entsprechen, an lösliches Hämocyanin (KLH="Keyhole limpet hemocyanin") aus der Nacktschnecke *Megathura crenulata* gekoppelt. Mit diesem wurde dann ein Kaninchen immunisiert und aus den regelmäßigen Blutabnahmen Serum gewonnen. Haltung, Injektion und Blutentnahme erfolgte durch den dem Tierstall beaufsichtigenden Veterinärmediziner.

#### Peptid-Crosslinking an KLH

Nach Synthese der zytoplasmatischen Domäne der Tyrosinase (Sequenz im Einbuchstabencode:-CLQKKKKKQPQEERQPLLMDKDDYHSLLYQSHL) und von TRP-1 (Sequenz im Einbuchstabencode: -RSRSTKNEANQPLLTDH YQRYAEDYEELPNPNHSMV) wurden die Peptide, welche allein nur die Eigenschaften eines Haptens besitzen, an KLH kovalent gebunden. Dazu wurde pro Peptid zunächst 10 mg KLH (=325 µl einer 30,8 mg/ml Lösung) in 1 ml PBS pH 6,0 gelöst. Anschließend wurde 1,5 mg des "Crosslinkers" MBS in 50 µl DMSO gelöst und zu der KLH-Suspension hinzugefügt. Nach 30 min Schütteln bei RT wurde die Lösung zum Entfernen von freiem MBS, DMSO und Glycerol über eine Sephadex G-25 Säule gereinigt, welche mit PBS pH 7,4 voräquilibriert wurde. Der Durchfluss wurde in 2 ml Fraktionen gesammelt und einer Proteinbestimmung unterzogen. Die an Protein angereicherten, milchigtrüben Fraktionen wurden vereinigt und stellten die KLH-MBS-Suspension dar.

Im zweiten Schritt wurde 5 mg von jedem Peptid in 500 µl PBS gelöst, mit der KLH-MBS-Suspension vereinigt und für eine Stunde bei RT geschüttelt. Anschließend konnten die Suspensionen zur Immunisierung verschiedener Kaninchen verwendet werden oder Aliquots der Suspensionen für weitere Immunisierungen bei -70°C eingefroren werden.

#### Immunisieren von Kaninchen

Zur Gewinnung von Präimmunserum vom Kaninchen erfolgte vor der initialen Immunisierung eine Blutabnahme. Für die erste Immunisierung wurde pro Kaninchen 300 µg Antigen in 500 µl PBS verdünnt in einer Spritze aufgezogen. 500 µl des als Adjuvans fungierenden Specols<sup>®</sup> wurde in einer zweiten Spritze aufgezogen. Die beiden Spritzen wurden durch einen Schlauch luftblasenfrei verbunden. Die Lösungen wurden mehrmals hin- und hergeschoben, bis eine zähe, weiße Emulsion entstand. Es folgte eine subkutane Injektion von nicht mehr als 0,5 ml Antigen in der Nähe der Extremitäten. Im 4-Wochen-Intervall wurde dann alternierend 5 ml Blut abgenommen oder mit 100  $\mu$ g Antigen "geboostert".

# Aufbearbeitung von Blut zur Serumgewinnung

Die abgenommenen Blutproben wurden eine Stunde bei RT stehen gelassen und der Blutthrombus mit einem Glasspatel entfernt. Dann werden die Proben über Nacht bis zur weiteren Aufbearbeitung bei 4°C gelagert. Der Überstand wurde dann in ein JA-20 Zentrifugierglas (cave Glasröhrchen, sonst Hämolyse!) dekantiert. Falls sich in der anschließenden 30min-Zentrifugation mit 11000 rpm im JA-20 Rotor bei 4°C am Meniskus eine Fettschicht gebildet hat, wird dieser mit einem Filterpapier abgehoben, der Überstand in 1-2 ml Portionen eingefroren und bei -70°C gelagert.

# 2.5 Mikroskopische Techniken

## 2.5.1 Trypanblaufärbung

Bei der Herstellung von Zellhomogenaten, insbesondere zur Herstellung vom PNS und Zytosol musste ein optimaler Zellaufschluss sichergestellt werden. Die Effizienz wurde aus diesem Grund mit einer Trypanblau-Färbung kontrolliert. Da Trypanblau nur die Membran toter oder stark geschädigter Zellen durchdringen kann, vitale Zellen aber ungefärbt bleiben, lässt sich so anhand der Blaufärbung im Mikroskop der Zellaufschluss beurteilen. Bei den *melan-a-*Zellen wurde ein Aufschluss von ca. 80% angestrebt.

5 μl Zellhomogenat wurden mit einem äquivanlenten Volumen Trypanblau-Lösung auf einem Objektträger zusammenpipettiert, mit einer gelben Spitze gemischt und dann bei 10-20x Vergrößerung mit einem inversen Mikroskop ausgewertet. Nebenstehende Abbildung 14 zeigt einen als optimalen gewerteten Zellaufschluss:



Abbildung 14: Optimaler Zellaufschluss durch Homogensieren im Cell Cracker (3 Passagen mit dem 8,002-Ball), 400x Vergößerung.

# 2.5.2 Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)

Lösungen:

Methanol (-20°C)3% (w/v)Paraformaldehyd in PBS50 mMNH₄CL in PBS0,05 % (v/v)Triton X-100 in PBS

Flouromount<sup>®</sup> Einbettmittel

## 2.5.2.1 Steady state

Zur indirekten Immunfluoreszenz wurden Zellen ein bis zwei Tage vorher auf Deckgläschen (Ø 12 mm) ausgesät. Nach zweimaligem Waschen mit PBS<sup>++</sup> wurden die Zellen fixiert. Sollte die IIF gegen Tyrosinase oder Lamp-1 erfolgen, so wurden die Zellen 5 min mit Methanol fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Um das Methanol ganz zu entfernen, ist es beim zweiten Waschschritt wichtig, das PBS für 15 min auf den Zellen zu lassen. Da Methanol (vorgekühlt, -20°C) nicht nur die Zellen fixiert, sondern auch permeabilisiert war eine Detektion intrazellulärer Antigene ohne weitere Permeabilisierung möglich.

Bei der IIF gegen MPR 46 oder anderen Antigenen wurde statt der 5min-Methanol-Inkubation eine 20min-Fixierung mit PFA bei RT vorgenommen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden dann freie Aldehydgruppen für 10 min mit NH<sub>4</sub>CL abgesättigt und nach einem weiteren Waschschritt mit PBS für 10 min durch Behandlung mit 0,05% Triton X-100 permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Methanol- oder PFA-fixierten Zellen für 1 h bei 37°C mit dem oder den Primärantikörper(n) inkubiert (siehe Tabelle 1, S.26/27). Dem anschließenden PBS-Waschschritt folgte dann eine 20min-Inkubation bei RT mit 10%igem Ziegenserum zum Absättigen möglicher unspezifischer Bindungsstellen der Zweitantikörper. Nach Waschen mit PBS erfolgte dann 30min-Inkubation mit dem oder den Sekundärantikörper(n) Ziegeanti-Kaninchen-Cy2/3 1:200 bei 37°C. Bevor die Zellen dann in Fluoromount<sup>®</sup> eingebettet wurden, erfolgte ein Waschen mit PBS und einmalig mit H<sub>2</sub>O. Nach Trocknen über Nacht standen die Zellen schließlich zur mikroskopischen Auswertung durch ein konfokales Laser-Scan-Mikroskop zur Verfügung.

#### 2.5.2.2 Dynamische Endozytose

Die AP-3-defizienten *mocha*-Zellen zeichen sich durch eine vermehrte Fehlsortierung lysosomaler Membranproteine zur PM aus, die von dort endozytiert und zu Lysosomen transportiert werden. Zum Test der in Abschnitt 2.2.5 präparierten *mocha*-Zellen wurde neben einer immunologisch Detektion der AP-3-Defizienz im Westernblot die Lamp-1-Fehlsortierung in den *MEF-mocha*-Zellen durch eine Endozytose von anti-Lamp-1-Antikörpern anhand lebender Zellen nachgewiesen.

Dafür werden die Zellen wie unter 2.5.2.1 beschrieben ausplattiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wird dem FKS-freien-Medium unter Zusatz von 0,5% BSA für 1 h 50  $\mu$ g/ml anti-Lamp-1-Antikörper (1D4B) zugesetzt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine 5 min-Fixation mit kaltem MeOH und die 20min-Inkubation mit Ziegenserum. Für die weitere Behandlung mit Zweitantikörpern (Ziege anti Ratte) bis zum Eindeckeln siehe Abschnitt 2.5.2.1.

# 2.5.3 Immunogoldmarkierung von TRP-1 und dessen Nachweis in der Elektronenmikroskopie an Kryo-Ultradünnschnitten

Die subzelluläre Verteilung der Membranproteine in den Zellen unter Versuchsbedingungen wurde beispielhaft für TRP-1 anhand von Immunogoldmarkierungen an Kryo-Ultradünnschnitten nachgewiesen. Dabei erfolgte die Fixierung der Zellen und die Herstellung der Kryoschnitte gemäß Tokuyasu (1980), die Aufnahme der Schnittbänder erfolgte nach Liou et al. (1996) durch Dr. rer. nat. D. Wenzel am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen.

Für den Versuch wurden drei zu 80% konfluente 10 cm Schalen mit *melan-a* + hMPR46-Zellen verwendet. Während eine Schale zum Nachweis der nativen Distribution der Membranproteine in der Zelle fungierte und aus dem Inkubator heraus fixiert und abgeschabt wurde, erfolgte bei einer zweiten 10 cm Schale zunächst eine 4h-Inkubation bei 19,5°C bevor diese ebenfalls fixiert und abgeschabt wurde. Die dritte Schale wurde ebenfalls für 4 h bei 19,5°C inkubiert, jedoch vor der Fixation zunächst einer 30min-Inkubation bei 37°C unterzogen ("Releaseperiode").

## 2.5.3.1 Primärfixierung der Proben

Herstellung der 4% PFA-Stammlösung:

16% (w/v) Paraformaldehyd (Sigma P-6148) wurde bei 60°C unter Rühren für 30 min in H<sub>2</sub>O bidest. gelöst. Durch Zugabe von zwei Tropfen 10 M NaOH wurde der Lösungsvorgang beschleunigt. Nach dem Abkühlen wurde ein Volumenanteil der Lösung mit einem Volumenanteilen 0,2 M Natriumphophat-Puffer (NaPi) versetzt (Endokonzentration: 0,1 M), der pH-Wert mit pH-Indikatorstäbchen geprüft und gegebenfalls auf pH 7,4 eingestellt.

Das Inkubationsmedium wurde bis auf 5 ml von den Platten abgenommen und mit 5 ml 8% (w/v) PFA-Stammlösung für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Fixativ entfernt und die Zellen in 8% (w/v) PFA abgeschabt. Der Transport zum MPI erfolgte in einem Eppendorf-Reagiergefäß auf Eis.

#### 2.5.3.2 Nachfixation

Die Zellen wurden für 2 h auf Eis mit 4% (w/v) PFA und 0,2 % Glutaraldehyd in 0,1 M NaPi nachfixiert und bei 1000 rpm (StatSpin microPrep2, Swing out Zentrifuge) pelletiert. Die Zellpellets wurden dreimal mit 0,02 M Glyzin in 0,1 M NaPi -Puffer in Eppendorf-Reagiergefäßen gewaschen, anschließend in 37° C warmer, 10%iger Gelatine (in NaPi) resuspendiert und dann für 5 min bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen bei 10000 rpm für 15 sec pelletiert (Zentrifuge siehe oben) und auf Eis gestellt. Die Reagiergefäße wurden mit einer Rasierklinge aufgeschnitten, so dass die erkaltete Gelatine mit den darin eingebetteten Zellen in kleine Blöckchen geschnitten werden konnte. Zum Gefrierschutz wurden die kleinen Blöckchen über Nacht in 2,3 M Sucrose (in NaPi) inkubiert, auf kleine Metallstifte (pins) aufgebracht und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

# 2.5.3.3 Ultramikrotomie

Das Trimmen und Schneiden erfolgte bei –110 °C mit einem Kryo-Ultramikrotom (Leica EM FCS). Die Proben wurden mittels einer Diamanttrimmklinge (Diatome, cryotrimm 90) zunächst getrimmt bevor dann mit einer Diamantschneideklinge (Diatome, cryoimmuno 35°) 80 nm dicke Schnittbänder hergestellt werden konnten. Die Schnittbänder wurden mit einer Lösung aus jeweils gleichen Teilen 2,3 M Saccharose (siehe oben) und 2% (w/v) Methylcellulose in bidest. H<sub>2</sub>O mittels eines Metallloops aufgenommen und auf mit Formvar beschichteten und mit Kohle bedampften "Nickelgrids" (75 mesh, Plano) aufgebracht.

## 2.5.3.4 Markierung

- Puffer A: 9 Teile 2 %ige Methylzellulose
  - 1 Teil 4 %iges Uranylacetat in bidest. H<sub>2</sub>O

Alle Schritte erfolgen durch Inkubation der "grids" auf Tröpfchen. Sofern nicht anders angegeben erfolgte die Inkubation bei RT.
Die "grids" wurden auf 2%ige Gelatine (in NaPi) gelegt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Dabei befindet sich die 2%ige Gelatine in kleinen Petrischalen, welche bei 4° C gelagert werden. Die "grids" werden dann auf die noch feste Gelatine gelegt. Durch die 37°C-Inkubation wird die Gelatine dann flüssig, so dass die "grids" im Folgenden auf der Oberfläche schwammen. Dieser Schritt ist notwendig, um die Saccharose und Methylcellulose zu entfernen.

Es folgten drei Waschschritte á 2 min in 0,02 M Glyzin/TBS (50 mM Tris, 0,9 % NaCl, pH 7,4) gefolgt von einer einminütigen Inkubation in 1% BSA/TBS. Die Inkubation mit dem Primärantikörper, der 1:30 in 1 % BSA/TBS verdünnt war, erfolgte für 30 min. Dann wurden die "grids" vier Mal für 2 min in 0,5% BSA/TBS gewaschen, bevor die Inkubation mit Protein A-Gold (PAG), in einer Verdünnung von 1:70 in 1% BSA/TBS, für 30 min erfolgen konnte. Anschließend wurden die "grids" zunächst sechs Mal für je 2 min in 0,5 % BSA/TBS und dann sechs Mal für 2 min nur in TBS gewaschen, bevor die Fixation für 5 min durch 1% Glutaraldehyd in NaPi erfolgte. Das Fixativ wurde durch 2 malige Inkubation für 3 min mit TBS und dann fünfmalige Inkubation à 2 min mit bidest. H<sub>2</sub>O von den "grids" gewaschen. Im Folgenden wurden die "grids" durch dreimalige 2 s-Inkubation in Puffer A auf Eis eingebettet. Nach 10 Minuten konnten die "grids" mittels eines Metallloops aufgenommen und überschüssige Flüssigkeit mit einem feuchten Filterpapier abgesaugt werden. Die Auswertung und Untersuchung erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop Philips CM120.

## 2.5.4 Darstellung von Donor und Vesikeln durch Negativkontrastierung in der Elektronenmikroskopie

#### (aus Robinson DG et al. 1985)

Zur Darstellung des Donorkompartimentes und der Vesikel wurde die Negativkontrastierung in der Elektronenmikroskopie gewählt. Das Prinzip des Verfahrens beruht darauf, dass in Wasser lösliche Schwermetallsalze in amorpher Form um das abzubildene Objekt auf der Trägerfolie eintrocknen. Dadurch bleibt das Objekt gut durchstrahlbar, während seine Umgebung im Elektronenmikroskop dunkel erscheint. Je nach chemischer Zusammensetzung des Objekts ist nicht immer ausgeschlossen, dass das Kontrastierungssalz nicht auch an Objektkomponenten gebunden wird und somit in Form einer Positivkontrastierung wirkt. Das gelöste Salz kann in innere Hohlräume des Objekts eindringen oder feine Details durch zu große Schichtdicke verdecken. Um starke Verformungen oder den Zerfall des Objekts während des Trocknens zu vermeiden, kann es nötig sein, die Objektpartikel vor oder während des Präparationsgangs zu fixieren. Da keine aufwendige Einbettung oder Schnitte durchgeführt werden mussten, überzeugt das Verfahren neben der einfachen Durchführung durch Betrachtung von intakten, ungeschnittenen Gesamtstrukturen.

Nach Fixierung der "Kupfergrids" (Plano 300 bzw. 400 mesh) wurde die Kontrastierung und Betrachtung von Dr. rer. nat. D. Wenzel am MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen durchgeführt.

#### 2.5.4.1 Vorbereitung der Proben

Zunächst wurden Donormembranen und ein Vesikelpool aus 6 konfluenten 15 cm Schalen *melan-a* + hMPR46 nach dem Standardprotokoll gewonnen und mit ATP/GTP und 2,7 mg Schweinehirnzytosol für 1h bei 37°C inkubiert. Zur Schonung der Membranen und damit besseren Darstellung der Morphologie wurde auf eine Ankonzentrierung in der Ultrazentrifuge verzichtet. Jeweils 100  $\mu$ l des Vesikelpools und der Donormembranen wurden auf ein mit Formvarfilm beschichtetes und mit Kohle bedampftes "Kupfergrid" (Plano 300 bzw. 400 mesh) aufgetragen. Dabei wurden die 100  $\mu$ l jeweils in 10  $\mu$ l Aliqouts für 10 min auf dem "grid" belassen, so dass sich die in der Probe enthaltenen Partikel auf die Oberfläche des "grids" ablagern konnten. Nach 10 min wurde der flüssige Anteil mit einem Filterpapier abgesaugt bevor die nächsten 10  $\mu$ l auf das "grid" gelegt werden konnten.

#### 2.5.4.2 Fixierung und Nachkontrastierung

Im Anschluss wurden die "Kupfergrids" für 5 min auf ein Tröpfchen 1%iges Glutaraldehyd in PBS fixiert und im Anschluss auf 5 Tröpfchen dH<sub>2</sub>O für je eine Minute gewaschen. Dann erfolge die Nachkontrastierung auf einem Tröpfchen 1%igem Uranylacetat in dH<sub>2</sub>O für 5 min. Überschüssiges Uraylacetat wurde dann mittels Filterpapier abgesaugt, bevor die "Kupfergrids" getrocknet wurden. Letztendlich erfolgte die Betrachtung der Proben am Transmissionselektronenmikroskop Philips CM120.

## 2.6 In-vitro-Golgi/TGN-Budding-Assay

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Protokoll unterlag während der Ausarbeitung zahlreichen Änderungen. Daher sollen hier die Module beschrieben werden, die sukzessiv zu einem Protokoll zusammengesetzt wurden. Die für das Endprotokoll verwendeten Inkubationszeiten und Konzentrationen der beteiligten Komponenten sind aufgeführt. Andere getestete Bedingungen werden zumindest erwähnt.

Prinzipiell muss eine Donormembran(Golgi/TGN)-Präparation von der Zytosolpräparation getrennt werden. Zur besseren Übersicht soll zunächst in einem Schema der Ablauf erläutert werden (siehe Abb 14), bevor die Einzelschritte nacheinander abgehandelt werden:



Abbildung 15: Übersicht über den in-vitro-Golgi/TGN-Budding-Assay. Erklärung siehe entsprechende Abschnitte.

#### 2.6.1 Membranpräparation

#### 2.6.1.1 Ausplattieren von Zellen

Die mit dem humanen MPR46 transfizierten *melan-a*-Zellen (clone B2) wurden 4 Tage vor Versuchsbeginn auf 15 cm Schalen aus konfluenten großen Flaschen, wie unter Abschnitt 2.2.2 beschrieben, ausplattiert. Aus jeder großen Flasche wurde je eine 15 cm Platte angelegt. Insgesamt wurden pro Ansatz im Budding zwei 15 cm Platten benötigt. Obwohl in der Literatur ein schonenderer Aufschluss durch kürzeres Wachstum beschrieben wurde, konnten unsere Versuche dies für eine Golgiapparat-Präparation aus *melan-a*-Zellen nicht bestätigen.

#### 2.6.1.2 Metabolische Markierung

Die Zellen wurden markiert, wie in Abschnitt 2.4.9 beschrieben. Pro 15 cm Platte wurden 8 ml Markierungsmedium verwendet mit einer Konzentration von 0,2 mCi/ml und einer Markierungzeit von 20 min. Um eine gleichmäßige Benetzung zu gewährleisten wurden die Schalen während der Inkubation einmal kurz geschwenkt.

#### 2.6.1.3 Temperaturblock

Um die mit [<sup>35</sup>S]-Met/Cys markierten, neu-synthetisierten Proteine im Golgi/TGN zu akkumulieren, wurden die Zellen nach dem Markieren und dreimaligen Waschen mit 4°C kaltem PBS in einem kühlbaren Inkubator mit gesättigter Wasseratmosphäre für verschiedene Zeiträume bei 19,5°C inkubiert (Matlin & Simons 1983, Saraste et al. 1986). Für die im Ergebnisteil dargestellten Versuche fand ein vierstündiger Temperaturblock Verwendung.

#### 2.6.1.4 Zellaufschluss und PNS-Präparation

Ziel dieses essentiellen Schrittes war es einerseits möglichst viele Zellen durch Zerstörung der Plasmamembran aufzuschließen, andererseits aber die Organellenmembranen, insbesondere die TGN-Membranen, intakt zu belassen. Für den Zellaufschluss wurden daher verschiedene Verfahren verglichen. Einerseits wurde der Zellaufschluss durch mehrmaliges Aufziehen und Ausdrücken der Zellen durch eine Spritze mit verschiedenen Kanülenweiten (G20 – G26) ausgetestet. Im Vergleich dazu wurde der EMBL-Cellcracker verwendet, ebenfalls mit verschiedenen Spaltgrößen (5  $\mu$ m – 9  $\mu$ m Spalt). Prinzipiell basieren beide Verfahren auf dem Bersten der Zellen bei hohen Scherkräften, die entweder beim Ausdrücken aus der Kanüle am Spitzenrand oder beim Quetschen der Zellen durch den Spalt entstehen. Wie dem Ergebnisteil zu entnehmen ist, ergab der Zellaufschluss mittels Cellcracker (3 Passagen, 9  $\mu$ m Spalt) die reproduzierbar besten Aufschlussergebnisse in Bezug auf die Aufschlusseffizienz und Membranintaktheit (siehe Abschnitt 3.4.1).

Wie unter 2.6.1.5 beschrieben fanden während der Etablierungsphase prinzipiell zwei Gradienten Verwendung. Der Aufschluss für diese verläuft aber ähnlich und soll deshalb hier zusammen besprochen werden. Für den linearen Saccharosegradienten wurde als Homogenisationspuffer (HB) HB1 verwendet, für den diskontinuierlichen Step-Gradienten HB2. Diese sind folgender Tabelle 5 zu entnehmen:

	HB1 = für kont. Gradienten	HB2 = für Step-Gradienten
Saccharose [M]	0,25	0,25
EDTA [mM]	1	1
Imidazol [mM]	3	-
HEPES [mM]	-	25
Proteinaseinhibitorcocktail	50 μl/500 ml	50 μl/500 ml
рН	7,0	7,2

Tabelle 5: Gradientenpuffer-Systeme

Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen:

Die Zellen wurden dreimal mit 4°C kaltem HB gewaschen, im Anschluss daran in 1 ml kaltem HB/Platte abgeschabt und durch Zentrifugation (5 min/ 500g in der Eppendorf Kühlzentrifuge) sedimentiert. Das Zellpellet wurde in mindestens 2 ml HB resuspendiert und im vorgekühlten Cellcracker (3 Passagen durch 9  $\mu$ m Spalt) aufgeschlossen. Ein 50  $\mu$ l Aliquot dieses Zellextraktes (ZE) wurde für spätere Analysen abgenommen und durch eine 5 min-Zentrifugation bei 1000g in der Eppendorf-Kühlzentrifuge der PNS (Post-Nuclear-Supernatant) gewonnen. Nachdem das Pellet im gleichen Volumen HB wie der PNS resuspendiert wurde, konnte aus beiden jeweils eine 100  $\mu$ l große Probe für die unten beschriebene Aufschlusskontrolle entnommen werden. Als weitere Proben für die Aufschlusskontrolle wurde ein 30  $\mu$ l Aliquot des PNS für 10 min bei 100000g zentrifugiert. Der Überstand dieser Ultrazentrifugation des PNS wurde als S<sub>PNS</sub> deklariert, das entsprechende, im gleichen Volumen resuspendierte Pellet, als P<sub>PNS</sub>. Beide werden ebenfalls für spätere Analysen aufbewahrt.

Der präparierte PNS wurde für einen kontinuierlichen Sucrosegradienten im Anschluss direkt auf den Gradienten geladen, siehe Abbildung 16.



Abbildung 16: PNS Präparation, Erklärung siehe Text resuspendiert und mit 63%(w/w)

Die PNS-Präparation für den auf dem Flotationsprinzip basierenden Step-Gradienten Saccharose verläuft bis hierher genauso, mit Unterschied, dem dass das Zellpellet zum Zellaufschluss in 4 ml HB-Puffer aufgenommen wird. Nebenstehender Abb. 16 ist auch zu entnehmen, dass im Anschluss daran eine Zentrifugation des PNS für 15 min bei 19000 rpm (TLA 45) erfolgte, wodurch "leichtere" Organellen und Zytosol abgetrennt werden konnten.

Der Überstand stand für weitere Analysen zur Verfügung, während das Pellet in 1,5 ml HB Saccharose in Gradientenpuffer refraktometrisch auf 40,5%(w/w) Saccharose eingestellt wurde. Dies erfolgte duch isovolumetrische Mischung beider Lösungen. Das so resuspendierte  $P_{20}$  wird in Abschnitt 2.7.1.5 weiterverwendet.

#### Aufschlusskontrolle

Zur Aufschlusskontrolle diente die lichtmikroskopische Analyse einer Trypanblaufärbung (vgl. Abschnitt 2.5.1). Wie oben beschrieben wurde von allen Zentrifugationsschritten Aliguots aufbewahrt. In diesen wurde die Aktivität der lysosomalen β-Hexosaminidase, als auch der Galactosyltransferase (Markerenzym für das TGN) gemessen. Anhand der Verteilung der spezifischen Aktivitäten eines Überstands im Vergleich zum korrespondierenden Pellet bei den verschiedenen Zentrifugationsschritten (siehe Abb. 16) konnte zunächst einmal die Anreicherung von TGN-Membranen bei Abreicherung von Lysosomen bestimmt werden (siehe Ergebnisteil Abschnitt 3.4.1, S. 92). Ebenso konnte durch die unten beschriebene 100000g-Zentrifugation die Güte des Aufschlusses gemessen werden, da bei zerstörten Organellen deren Inhalt (bei Lysosomen z.B. die lösliche  $\beta$ -Hexosaminidase) freigesetzt wird. Diese erhöhte Aktivität lässt sich nach der 100000g-Zentrifugation des PNS vermehrt im Überstand (S<sub>PNS</sub>) messen und ist damit direkter Parameter für die Intaktheit der jeweiligen Organellen. Aus diesem Grund dienten die Enzymtests als maßgebliches Auswahlkriterium für den von uns unten favorisierten Ausschluss (siehe Ergebnisteil Abschnitt 3.4.1). Angestrebt wurde ein Verhältnis der Galactosysltransferaseaktiviät zwischen PNS und Pellet von 3:2 und im S<sub>PNS</sub>:P<sub>PNS</sub> von 1:9.

#### 2.6.1.5 Subzelluläre Fraktionierung mittels Dichtegradientenzentrifugation

Nach einem schonenden Zellaufschluss war der nächste Schritt die Anreicherung von Golgi/TGN-Membranen. Dazu wurden zunächst verschiedene Gradientenverfahren getestet. Begonnen wurde mit einem 27%igen-Percollgradienten. Nachteilig waren bei diesem eine nicht saubere Trennung der Golgi/TGN-Membranen von anderen Kompartimenten und das Hinzufügen des Percolls. Da percollfreie Membranen nur durch mehrmalige Ultrazentrifugation gewonnen werden konnten, wurde dieses System zugunsten von Saccharosegradienten verlassen.

Ausgehend von einem linearen Saccharosegradienten mit 2 h Laufzeit sollte zunächst eine möglichst saubere Separation einzelner Organellen erreicht werden. Leider ließ sich die Kontamination von Golgi/TGN-Membranen durch Lysosomen auch nicht durch eine Äquilibriumzentrifugation (=isopyknischer Dichtegradient) wesentlich verbessern. Daher wurde ausgehend von diesem linearen Gradienten ein Flotations-Step-Gradient aufgestellt, mit dem eine rasche und reproduzierbare Methode vorlag. Der Vorteil der Flotationsmethode liegt darin, dass die Verunreinigung der Membranen durch "schwerere" Kompartimente (v.a. Lysosomen) entfällt, da diese sich bereits im Sediment befinden und somit nicht mehr durch die leichtere Zieldichte zu sedimentieren brauchen. Im Folgenden sind die Protokolle für die im Ergebnissteil verwendeten Gradienten dargestellt:

#### Kontinuierlicher Saccharosegradient

Alle Lösungen und Zentrifugationsschritte bei 4°C! Gradientenpuffer-1 (=GP1): 1 mM EDTA 3 mM Imidazol pH 7,0

Saccharose-Stammlösung60% (w/w) in Gradientenpuffer-1Dichte mit Refraktometer kontrollieren!

Ausgehend von der Saccharose-Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe von 20% bis 50% (w/v) mit GP1 hergestellt. Der kontinuierliche Saccharosegradient konnte dann, wie Abb. 17 zu entnehmen, durch sehr vorsichtiges Übereinanderschichten der verschiedenen Saccharoselösungen vorgeformt werden und mit dem in Abschnitt 2.7.1.4 gewonnenem PNS überschichtet werden. Der Gradient wurde zwei Stunden bei 24000 rpm mit langsamer Beschleunigung ohne Bremsen in einem SW41 Rotor zentrifugiert. Im Anschluss wurde unter Verwendung einer Gilson-Pipette (P1000) der Gradient von oben nach unten in 23 Fraktionen á 0,5 ml fraktioniert. Die Fraktionen wurden wie im Ergebnisteil angegeben gepoolt und mit GP1 auf



Abbildung 17: Kontinuierlicher Saccharosegradient 3,5 ml aufgefüllt um die Membranen durch Ultrazentrifugation (TLA100.3, Polycoatamer Röhrchen, 1h/45000 rpm) zu pelletieren.

Beim Pelletieren einzelner Fraktionen wurde so vorgegangen, dass die ersten 17 Fraktionen mit je einem Milliliter GP1-Puffer aufgefüllt wurden und in dickwandigen Eppendorfcups in einem TLA 45 Rotor bei 10000g (45000 rpm) pelletiert wurden. Die letzten 6 Fraktionen wurden wegen ihrer höheren Dichte mit 2,5 ml GP1-Puffer aufgefüllt, im TLA 100.3 bei 100000g pelletiert, in einem geeigneten Volumen (zwischen 50 und 100  $\mu$ l) PBS mit 0.5% Triton X-100 resuspendiert und der weiteren biochemischen Analyse zugeführt

(IP, Westernblot, Enzymtests, Radioaktivitäts- und Proteinbestimmung, siehe Abschnitt 2.5).

#### Step-Gradienten zur raschen TGN-Präparation

Alle Lösungen und Zentrifugationsschritte bei 4°C!

Gradientenpuffer-2 (=GP2):	1 mM	EDTA
	25 mM	HEPES pH 7,2

Saccharose-Stammlösung 63% (w/w) in Gradientenpuffer-2 Dichte mit Refraktometer kontrollieren! Ausgehend von der 63%(w/w) Saccharose-Stammlösung wurde einerseits in Verdünnungsreihe GP2-Puffer 15%. einer mit 28%. 38% (w/w)hergestellt. Saccharoselösungen Weiteren wurde mit Des der Saccharosestammlösung der in Abschnitt 2.7.1.4 präparierte P<sub>20</sub> auf 40,5% (w/w) eingestellt. Diese Lösungen wurden dann gemäß Abb. 18 durch vorsichtiges Übereinanderpipettieren geschichtet und im Anschluss für 1 h im SW 60 mit langsamer Beschleunigung und langsamen Bremsen mit 35000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 8 Fraktionen á 0,5 ml von oben mit einer blauen Gilson-Pipette abgenommen. Dabei wurden die ersten 4 x 0,5 ml zu einem "Prädonorpool" vereinigt. Die Fraktion 5, 6 und 7 wurden jeweils separat und die Fraktion 8 wurde als "Postdonorpool" weiterbehandelt. Das Pellet wurde ebenfalls resuspendiert. Alle Proben wurden dann mit 1 ml GP2-Puffer versetzt und für 1 h bei 100000g im TLA 100.3 zentrifugiert. Die pelletierten Membranen wurden für die in Abschnitt 2.5 beschriebene weitere Analyse mit PBS + 0,5% Triton X-100 aufgenommen.

Nach Abschluss der Etablierungsphase wurde die Präparation für Budding-Assays dahingehend beschleunigt, dass sowohl der "Prädonorpool" als auch der "Postdonorpool" verworfen wurde. Lediglich die vereinigten Fraktionen 5-7 wurden als "Donorpool" weiterverarbeitet. Zunächst wurden sie refraktometrisch auf 10% Saccharose mit GP2 verdünnt. Der Donorpool wurde dann i.d.R nicht nativ verwendet, sondern zunächst einer 15min-Waschinkubation unter langsamem Drehen bei 4°C mit 0,1 M Tris/HCl pH 7,2 (Endokonzentration) unterzogen. Dieser Waschschritt diente dem Entfernen von bereits *in vivo* oder während der Präparation an die Donormembranen rekrutierten zytosolischen Komponenten, die für den Buddingprozess relevant sein könnten. Der Waschinkubation folgte ein 30 min dauernder Zentrifugationsschritt (TLA 100.3, 20000 rpm), in dem die Donormembranen pelletiert wurden. Nach Resuspendierung dieser in 150 µl Budding Puffer/Ansatz und weiteren 50 µl BP standen diese als Donormembranen zur Verfügung (vgl. Abschnitt 2.6.3, S. 76).

#### 2.6.2 Zytosolpräparation

Ziel des *in-vitro*-Golgi/TGN-Budding-Assays ist es, den möglichlichen Einfluss von zytosolischen Komponenten auf die Vesikelknospung am TGN zu testen. Daher ist neben der Donormembranpräparation (s.o.) auch eine Zytosolpräparation notwendig. Dem präparierten Zytosol wurde später entweder weitere Faktoren zugesetzt, oder es wurden zytosolische Faktoren mittels Immundepletion entzogen (siehe 2.6.2.3).

Als Zytosolquelle dienten *melan-a* + hMPR46-Zellen, aus denen auch die Membranen gewonnen wurden. Des Weiteren wurde Schweinehirnzytosol und Zytosole aus folgenden Maus-Fibroblastenlinien (*MEF's*) gewonnen: Wildtyp  $(39^{+/+})$ ,  $\delta^{-/-}$  (*mocha*) und  $\mu 1A^{-/-}$  (*EFA*).

#### 2.6.2.1 Zytosol aus Zellkulturzellen

Alle Schritte fanden mit vorgekühlten Lösungen und auf Eis statt!

Um ausreichend hohe Proteinkonzentrationen und Zytosolmengen zu erzielen, wurden immer mindestens zehn 100% konfluente 15 cm Schalen einer Zelllinie verwendet. Diese wurden dreimal mit vorgekühltem PBS gewaschen und dann in 1 ml desselben abgeschabt. Nach Pelletierung der Zellen (5 min/500g) wurden die Überstände dekantiert, die Zellpellets mit einer blauen Spitze vorsichtig vereinigt und sehr behutsam durch zehnmaliges Aufziehen und Ausdrücken der Spritze mit einer G22-Kanüle ohne weiteren Pufferzusatz homogenisiert. Für je fünf 15 cm Platten wurde bei dieser Prozedur 50 µl Proteinaseinhibitorcocktail zugesetzt. Im Anschluss daran wurde das Zellhomogenat für 30 min bei 100000 rpm und der Überstand nochmals für 15 min bei gleicher Drehzahl im TLA 100.3 zentrifugiert. Das so gewonnene Zytosol (Überstand) wurden für 4 h gegen Budding-Puffer mit einem cut-off von 12-14 kDa dialysiert. Damit konnten niedermolekulare Substanzen, die laut Balch & Rothman (1985) inhibitorisch auf das TGN-Budding wirken ebenso entfernt werden wie endogenes ATP. Innerhalb der Dialyse wurde der Puffer dreimal gewechselt. Dem Dialysierpuffer von 500 ml wurden jeweils 50 µl Proteinaseinhibitorcocktail hinzugegeben. Nach der Dialyse konnte das Zytosol aliquotiert und bis zum Einsatz im Budding-Assay nach Schockfrieren bei -80°C gelagert werden.

#### 2.6.2.2 Zytosol aus Schweinehirn

Alle Präparationsschritte erfolgten auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen.

Mes-Puffer	0,1 M	Mes, pH 6,5
	1 mM	EDTA
	0,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,02%	NaN <sub>3</sub>

Das von Mennigen befreite und gründlich in 0,9% NaCl gewaschene Schweinehirn wurde in Portionen von 500 g eingefroren und bis zur Verwendung bei –80°C gelagert.

Für eine Präparation wurde eine Portion über Nacht im Kühlschrank aufgetaut und am nächsten Tag in ca. 500 ml Mes-Puffer im Mixer dreimal für 10 s homogenisiert, anschließend mit Mes-Puffer auf ein Endvolumen von 1 I aufgefüllt und noch einmal homogenisiert. Um Proteasen zu inaktivieren wurde das Homogenat auf eine Endkonzentratrion von 1 mM PMSF und 5 mM Jodazetamid eingestellt. Das Homogenat wurde für 30 min bei 9000 rpm im JA 10-Rotor zentrifugiert, der Überstand für eine weitere Stunde im TI 45 Rotor bei 100000g zentrifugiert und dann gegen 5 I Budding Puffer über Nacht dialysiert. Auch hier wurde 3 x der Puffer gewechselt und beim ersten und letzten Puffer 50  $\mu$ l Proteinaseinhibitorcocktail auf 500 ml Puffer zugegeben. Danach wurde das Zytosol in 1 ml Portionen aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C bis zur Benutzung gelagert.

#### 2.6.3 Buddingbedingungen

Buddingpuffer	0,25 M	Saccharose
	20 mM	KCI
	25 mM	HEPES/KOH pH 7,2

Ein Budding-Ansatz hat ein Volumen von 500  $\mu$ l und besteht immer aus den drei Komponenten Donormembranen, Goodies und Zytosol (siehe Abb. 18a, links).



Abbildung 18 a) Pipettierschema; b) Buddingplan, Erklärung siehe Text

Die gewaschenen und sedimentierten Donormembranen von zwölf 15 cm Platten (siehe näheres im Abschnitt 2.6.1.5, Step Gradient) wurden vorsichtig in 950  $\mu$ l (= 6 x 150  $\mu$ l + 50  $\mu$ l) Buddingpuffer mit einer gelben Pipettenspitze resuspendiert und in Aliquots á 150  $\mu$ l für 6 parallele Budding-Ansätze verwendet. 50  $\mu$ l standen für biochemische Analysen zur Verfügung (GalT-Aktivitäts-, [<sup>35</sup>S]-Radiativitäts-, Proteinbestimmungen, etc). Als Richtwert für die Proteinkonzentration der Donormembranen wurde bei nativen Membranen 150  $\mu$ g/ml, bei gewaschenen 80  $\mu$ g/ml angestrebt (vgl. Abb 18a).

Bevor im Golgi/TGN-Budding-Assay der Einfluss zytosolischer Komponenten getesten werden konnte, standen zahlreiche Versuche zur Funktionsanalyse des Assays an, wie beipsielsweise Temperatur-, ATP- und Zytosolabhängigkeit (vgl. Ergebnisteil, Abschnit 3.5.3). Neben der Verwendung von autologem

*melan-a*-Zytosol wurde auch die Funktionalität von heterologen Zytosolquellen getestet, da diese in größeren Mengen leicht präpariert werden konnten. Außerdem boten die Maus-embryonalen-Fibroblasten den Vorteil, dass für sie natürliche genetische Mutanten für die Untersuchten zytosolischen Faktoren AP-1A und AP-3 existierten. Somit stand neben der Immundepletion von Zytosolen eine zweite depletierte Zytosolquelle in Form von *mocha*- und *EFA-47*-Zytosol zur Verfügung.

#### Goodies:

#### ATP-Regenerierendes System:

Vesikelknospung ist ein ATP-abhängiger Prozess. Daher wird bei dem *in-vitro*-Budding-Assay ein System benötigt, welches zu ADP und anorganischem Phosphat hydrolysiertes ATP wieder regeneriert und als Energiequelle bereitstellt. Dazu wird eine physiologisch im Muskel vorhandene Enzymreaktion durch Zugeben des Substrates Kreatinphosphat und des katalysierenden Enzyms Kreatinkinase verwendet (vgl. folgende Abb. 19):



Abbildung 19: Regeneration von ATP aus Kreatinphosphat, modifiziert nach Löffler & Petrides, S. 960 Abb 32 14

Die Kreatinkinase überträgt (CK) bei Erwärmung die Phoshatgruppe von Kreatinphosphat (CP) auf ADP und ATP. regeneriert so Neben den drei Komponenten ATP, CP, CK wurde zusätzlich das Nukleotid GTP zugegeben, da für Knospungsprozesse am Golgi, wie in der Einleitung schon erwähnt, kleine G-Proteine benötigt Aktivität GTP werden. deren abhängig ist. Als zusätzliche Komponente

wurde zudem in einzelnen Fällen GTPγS zugegeben, um eine Dauerstimulation der kleinen G-Proteine zu erreichen. In der Regel fand der folgende 20x ATP-Mix Verwendung, der für den Assay gemäß Tabelle 6 auf 1x Konzentration verdünnt wurde:

Substanz	20 x ATP Mix in BP	Endkonzentration 1x
ATP	0,1 M	5 mM
СК	1,6 mg/ml	80µg/ml
CP	0,16 M	8 mM
GTP	4 mM	0,2 mM
Optional:	GTPγS	0,1 mM

#### Tabelle 6: ATP-Regenerierendes System

#### **ATP-Entziehendes System:**

Entgegen der oben beschriebenen Bereitstellung von ATP muss bei Negativkontrollen möglichst effektiv u.U. noch vorhandenes ATP entfernt werden. Hierzu wurde das bakterielle Enzym Apyrase sowie die ubiqutäre Hexokinase verwendet. Während die Apyrase (= Adenosin-Pyrophosphatase) ATP zerstört, überträgt letztere als erstes Enzym der Glykolyse die



Phosphatgruppe des ATP auf Glucose. Für letztere Reaktion wird Glucose als Substrat im Überschuss hinzugegeben wurde (vgl. Abb 20). Die verwendeten Konzentrationen für das ATPentziehende System sind anschließend in Tabelle 7 subsumiert:

**Abbildung 20:** Die Hexokinase überträgt als erstes Enzym in der Glykolyse einen Phosphatrest vom ATP auf Glukose und überführt diese zu Glukose-6-Phosphat. Dadurch wird ATP dem System entzogen. Modifiziert aus Löffler & Petrides (1998), S. 380 Abb. 15 2

Substanz	Konzentration der	Endkonzentration
	Stammlösung	
Apyrase	500 U/ml	25U/ml
Glc	1 M	20 mM
НК	(1,5 U/μl)	3 U



#### 2.6.4 Separation von Vesikeln und Donormembranen

Nach erfolgter Knospungsreaktion mussten die gebildeten Vesikel vom Donorkompartiment separtiert werden. Dazu wurde der in Abb. 23 dargestellte, kontinuierliche Saccharosegradient von 10% (w/w) bis 20% (w/w) Saccharose mittels eines Gradientenmischers gemäß Abb. 22 hergestellt. Jeder Buddingansatz wurde für 5 min in einem Eisbad abgekühlt, mit einer EDTA-Lösung (0,2 M, pH 8,0) auf eine Endkonzentration von 6 mM eingestellt und dann auf den vorgeformten 3,5 ml Gradienten pipettiert. Mittels einer Geschwindigkeitszentrifugation von 45 min Dauer bei langsamen Start- und Bremsprogramm im SW 60 Rotor bei 27000 rpm wurden der Golgi pelletiert, während die Vesikel im Gradienten verbleiben.



Probe 5 min kühlen

6mM EDTA

SW 60

10 %(w/w) Saccharose

20 %(w/w) Saccharos

45' 27 000 rpm, slow acceleration, no brake

#### Abbildung 21: Gradientenmischer:

Der Gradientenmischer wird auf einen Magnetrührer platziert. Während im Auslauf-nahen neben der 20%(w/w) Röhrchen Saccharoselösung ein Magnetfisch platziert wird, befindet sich im Auslauf-fernen Röhrchen 10%(w/w) Saccharose-lösung. Nach Öffnen der Verbindung zwischen den Röhrchen und zur Pumpe wird das Gemisch 20 % (w/w) mittels ausgezogener Pasteurpipette über einandergeschichtet.

> Abbildung 22 : Separationsgradient: Nach dem 45 min Budding werden die Proben für 5 min einem Eisbad abgekühlt, auf 6 mM EDTA eingestellt und dann auf einen zwischen 10%(w/w) und 20%(w/w) vorgeformter Saccharosegradient pipetiert.

Es folgte eine Fraktionierung in 10 Fraktionen à 400 µl. Nach Dichtebestimmung wurden die Fraktionen 1 bis 8 als Vesikelpool vereinigt. Die Fraktion 9, 10 und der Bodensatz wurden als Donorpool vereinigt. Donor- und Vesikelpool wurden durch Ultrazentrifugation (1h/ 100000g) in einem TLA 100.3 Rotor pelletiert und jeweils in 300 µl PBS + 0,5% Triton X-100 resuspendiert. Nach 30 min Schütteln im Kühlraum wurde die Radioaktiviät und GalT-Aktivität jeweils aus Donor- und Vesikelpool getrennt bestimmt. Im Anschluss wurden die Proben für 15 min bei 14000rpm in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfcup überführt, und nach Standardprotokoll (siehe Abschnitt 2.4.10) die relevanten Membranproteine (Tyrosinase, hMPR46, Lamp-1, TRP-1 und TRP-2) immunpräzipitiert.

## 3 Ergebnisse

## 3.1 Gewinnung von Tyrosinase- und TRP-1-spezifischen Antikörpern

Die melanosomalen Membranproteine Tyrosinase und TRP-1 stehen neben Lamp-1 und dem humanen MPR-46 im Mittelpunkt unseres Interesses. Im Falle von Tyrosinase und TRP-1 war bereits zu Beginn der Arbeit klar, dass für die biochemischen Arbeiten große Antikörpermengen benötigt wurden. Diese konnten nicht durch bereits vorhandene Antikörper anderer Arbeitsgruppen (αPEP1 bzw. αPEP7, V. Hering) gedeckt werden. Daher wurde versucht, die entsprechenden Antikörper von immunisierten Kaninchen zu gewinnen. Zur Erstimmunisierung und anschließenden Auffrischung ("Boosterung") wurden synthetische Peptide verwendet, die den zytoplasmatischen Domänen entweder von Tyrosinase oder von TRP-1 entsprachen (Sequenzen siehe Abschnitt 2.4.13). Drei Wochen nach erfolgter "Boosterung" wurden die gewonnenen Seren wie folgt auf ihre Spezifität hin getestet.

#### Nachweis der Spezifität im Westernblot:

Da Tyrosinase und TRP-1 nur in pigmentierten Zellen vorhanden sind (vgl. Einleitung, Abschnitt 1.3, S. 5), liefert eine Westernblot-Analyse in nichtpigmentierten Zellen einen schnellen Nachweis über die Spezifität der Kaninchenseren. Wie Abb. 23 zu entnehmen, ist ausschließlich in dem Zellextrakt der murinen Melanozyten (*melan-a-*Zellen) Tyrosinase und TRP-1 nachweisbar. Darüber hinaus lassen sich die Proteine in anderen, nichtpigmentierten Zelllinien nicht nachweisen. Die nachgewiesenen Proteine besitzen zudem exakt das zu erwartende MW von 75 kDa., wobei die unter der der reifen Form entspricht:



Abb. 23: Spezifitätsnachweis des polyklonalen Antiserums gegen Tvrosinase und TRP-1 im Westernblot an verschiedenen Zellextrakten. Als Postivkontrolle wurden 50 µg Zellextrakt der murinen, pigmentierten Zelllinie melan-a, als Negativkontrolle ebenfalls jeweils 50 µg der murinen MEFs, der Rattenzelle NRK, sowie der humanen Hela-Zelle verwendet.

Während sich im Westernblot mit dem Serum gegen TRP-1 nur eine Bande erwartungsgemäß bei 75 kDa darstellt, findet sich in der Immundetektion gegen Tyrosinase neben der zu erwartenden Bande bei 75 kDa auch eine unspezifische Reaktion im Bereich von 40 kDa, deren Herkunft nicht weiter analysiert wurde. Näheres siehe Text.

75 kDa Marke laufende Bande einer Vorläuferform, die darüber laufende Bande



#### Funktionalität in der IP:

Viele Aspekte des Proteinstransportes lassen sich biochemisch anhand von Immunpräzipitationen analysieren, weshalb zu testen war, ob die anti-Tyrosinase- und anti-TRP-1-Seren in der Immunpräzipitation der entsprechenden Proteine nutzbar waren. Kreuzreaktionen Mögliche zu anderen Tyrosinase-verwandten Peptiden (z.B. TRP-2) abweichendes konnten durch Bandenmuster in der IP differenziert werden. Wie Abb. 24 zu entnehmen ist, entspricht das

Abb. 24: Referenz-IP des TRP-1-Serums (Spur 1) und des Tyrosinaseserums (Spur 2). Verwendung fand jeweils der Inhalt einer konfluenten 3 cm Schale, die 12 h mit 50  $\mu$ Ci [<sup>35</sup>S]-Met/Cys gemäß Abschnitt 2.4.9 markiert und mit jeweils 5  $\mu$ l Antiserum gemäß Abschnitt 2.4.10 immunpräzipitiert wurde. Autoradiographie des 10% er Gels für 12 h, näheres siehe Text.

Bandenmuster dem in der Literatur beschriebenen mit einer voll-glykosylierten reifen Form knapp über, und einer noch-nicht voll-glykosylierten Form kurz unter der 75 kDa Bande (Jimenez et al. 1988; Xu et al. 1997).

#### Nachweis der Spezifität in der IIF

Eine mögliche Verwendung des Antikörpers für zellbiologische Anwendungen wurde mittels Immunfluoreszenz getestet. Dazu wurden mit Methanol fixierte Melanozyten mit den anti-Tyrosinase- bzw. anti-TRP-1-Seren inkubiert und diese im Anschluss mit Fluorochrommarkierten Sekundärantikörpern nachgewiesen. Wie die nachfolgende Abb. 25 für das anti-Tyrosinase-Serum zeigt, werden intrazelluläre Vesikel angefärbt, die den im Phasenkontrast schwarz erscheinenden Melanosomen entsprechen. Auf die Darstellung einer IIF mit dem TRP-1-Serum wurde verzichtet, da die Färbung exakt der IIF mit dem Tyrosinaseserum entspricht. Zudem gleicht die Anfärbung beider Seren bereits publizierten Darstellungen von Tyrosinase und TRP-1 (u.a. Huizing et. al. 2001). Somit sind beide Seren sowohl für biochemische Verfahren als auch für die IIF hervorragend geeignet.



**Abb. 25: Test des polyklonalen Kaninchenserums gegen Tyrosinase:** Dargestellt ist ein Transmissionsbild und das korrespondierende IIF-Bild der 4. Blutung. Die Verdünnung des Serums betrug 1:500. Die in der Transmission schwarz erscheinenden Melanosomen überlappen mit den in der IIF detektierten Signalen.

# 3.2 Etablierung einer embryonalen, $\delta$ -Adaptin-defizienten Fibroblastenzelllinie (*mocha*)

Um gegebenenfalls  $\delta$ -Adaptin defiziente Fibroblasten zu transfizieren, und um eine geeignete Quelle für AP-3-defizientes Zytosol zu besitzen, sollte eine embryonale *mocha*–Zelllinie etabliert werden. Die erforderlichen Mäuse wurden vom Jackson-Laboratory (Bar Harbor, USA) gekauft und waren für den  $\delta$ -Genlokus heterozygot. Daher musste zunächst eine terminierte Verpaarung durch eine Tierpflegerin vorgenommen werden, bevor die Präparation der Zellen aus den Embryonen und die sich anschließende Westernblot Immundetektion vorgenommen werden konnte.

Es wurden vier schwangere Mäuse mit insgesamt 30 Embryonen präpariert, wovon bei zwei Klonen im Westernblot bei gleichen Proteinkonzentrationen kein  $\delta$ -Adaptin mehr nachweisbar war. Daher wurden diese Klone anhand der Expressionsstärke im Westernblot als homozygot negativ charakterisiert (siehe Abb. 26): Auf einen Nothernblot zur Analyse auf DNS-Ebene wurde verzichtet, da für diese Arbeit die Abwesenheit des Proteins entscheidend war.



Abb. 26:  $\delta$ -Aadaptin (160 kDa) im Westernblot von Zellextrakten aus präparierten embryonalen MEFs. Da die Zellextrakte proteinnormiert aufgetragen wurden, sind Intensitätsunterschiede in der Expression der Proteine bedingt. Somit sind Klone 1 und Klone 3 für die  $\delta$ -Adaptin Deletion homozygot, Klon 2 ist heterozygot und Klon 5 stellte den Wildtyp dar. Als Positivkontrolle wurden MEF. als Negativkontrolle adulte mocha-Zellen verwendet.

*Mocha*-Zellen weisen im Gegensatz zu *MEF*-Zellen zudem eine Fehlsortierung lysosomaler Membranproteine auf. Das lysosomale Membranprotein Lamp-1 wird in *mocha*-Zellen nicht intrazellulär zu Lysosomen, sondern indirekt, mit einem Umweg über die PM zu den Lysosomen transportiert (vgl. Einleitung

S. 17). Diese Eigenschaft wurde als weiterer Nachweis der AP-3 Defizienz in den präparierten Klonen verwendet. Dazu wurden Zellen des MEF-mocha-3 Klons mit anti-Lamp-1-Antikörpern inkubiert. Nach 60 min wurden die Zellen fixiert und mit Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Abb. 27 zeigt, dass sich lediglich in MEF-mocha-3-Zellen Lamp-1-Antikörper intrazellulär nachweisen lassen, nicht aber in den als Negativkontrolle fungierenden MEF-Zellen. Da der anti-Lamp-1-Antikörper nur während der in-vivo-Inkubation Lamp-1 an der PM binden konnte, die nachgewiesene Fluoreszenz jedoch intrazelluläre Vesikel darstellt, muss der Lamp-1-Antikörperkomplex in den 60 min mittels Endozytose aufgenommen worden sein. Das völlige Fehlen einer Fluoreszenz in den Kontrollzellen schließt eine unspezifische Aufnahme des Antikörpers aus. Folglich lässt sich durch diese dynamische Endozytose nachweisen, dass Lamp-1 in den MEF-mocha-3-Zellen zur PM fehlsortiert und im Folgenden wieder endozytiert wurde. Dies entsprach der zu erwartenden und bereits publizierten Sortierung von Lamp-1 in mocha-Zellen (vgl. Einleitung, Abschnitt 1.6, S. 17).



**Abb. 27: Endozytose von Antikörpern gegen Lamp-1.** Die nicht permeabilisierten Zellen wurden für eine Stunde mit 50 μl/ml 1D4B im Kulturmedium bei 37°C inkubiert. Nach Methanol Fixierung wurden die Lamp-1-Antikörper durch den rot fluoreszierenden Zweitantikörper (Ziege anti-Ratte-Cy-3) dargestellt. Ein signifikanter Nachweis von Lamp-1-, findet sich nur in den *MEF-mocha*-3-Zellen.

Die *MEF-mocha*-Klone 1 und 3 wurden durch weitere Kultivierung und konsequente Teilraten von eins zu drei über einen Zeitraum von einem Jahr immortalisiert und letztendlich zur Zytosolgewinnung herangezogen.

#### 3.3 Zellsystem

Als Zellsystem fungierte die am besten charakterisierte, permanente Melanozyten-Zelllinie melan-a (Bennett et. al. 1987). Melan-a-Zellen weisen alle physiologischen Merkmale primärer Melanozyten auf, benötigen in der Zellkultur allerdings als Zusatz den Phorbolester TPA (vgl. Abschnitt 2.1.14, S. 31). Für diese Untersuchungen boten sich melan-a-Zellen in zweifacher Hinsicht an. Zum einen besitzen Melanozyten LROs in Form von Melanosomen, für deren Biogenese dem zu untersuchenden Protein AP-3 eine entscheidende Bedeutung zukommt (vgl. Einleitung). Andere Zellen mit LROs lassen sich im Gegensatz zu melan-a-Zellen allerdings nur sehr schwer kultivieren. Zum anderen zeigten melan-a-Zellen neben einem hohen Expressionslevel von AP-3 auch sehr hohe native Expressionslevel des vermutlich durch AP-3-sortierten Membranproteins Tyrosinase. Da über die Sortierung von melanosomalen Membranproteinen bisher kein direkter Nachweis gelang, stellten also melan-a-Zellen ein ideales Zellmodell für den Aufbau eines Assays dar, der die putative Sortierfunktion des AP-3 Komplexes am TGN/Golgi für lysosomale und melanosomale Proteine, v.a. der Tyrosinase, untersuchen sollte.

#### 3.3.1 Humane MPR46 exprimierende melan-a-Zellen

Als Positivkontrolle für den Assay wurde ein Membranprotein benötigt, dessen Sortierung am TGN gut dokumentiert ist und von AP-3 unabhängig ist. Entsprechend wurde aufgrund der Verfügbarkeit die cDNA des humanen Mannose-6-phosphat-Rezeptor hMPR46 in *melan-a*-Zellen transfiziert.

Da bei RPMI-Medium die Ca<sup>++</sup>-Phosphatmethode nicht möglich war (vgl. Abschnitt 2.2.6, S. 35), wurde der humane MPR46 mit der Effectenmethode transfiziert. Zusammen mit dem hMPR46-Expressionsvektor wurde der pSVneo-Selektionsvektor, der eine Neomycinresistenz codiert, als weiteres Plasmid kotransfiziert. Nach einem Zeitraum von ca. 2-3 Wochen unter der Inkubation mit Selektionsmedium (Neomycin) waren von einigen Zellen Klone gewachsen. 20 dieser Klone wurden einzeln passagiert und getrennt

weiterkultiviert. Der Erfolg der Transfektion wurde durch IIF, Westernblot und IP überprüft. Hier dargestellt ist nur der Nachweis des humanen MPR46 mittels IP (vgl. Abb. 28) und in der IIF (vgl. Abb. 29).



## Abb. 28: IP des hMPR46 in transfizierten und nativen melan-a-Zellen.

Nach metabolischer Markierung für 12 h gemäß Abschnitt 2.4.9 wurde der hMPR46 gemäß Abschnitt 2.4.10 immunpräzipitiert. Erwähnenswert ist, dass das KII-5 Serum gegen die spezies-spezifische, luminale Domäne des humanen MPR46 gerichtet ist und somit keinen murinen MPR46 erkennt. Der hMPR46 ließ sich nur aus den transfizierten Zellen präzipitieren, die Bande in Spur 1 deutet auf eine geringe unspezifische Bindung des Antikörpers an den murinen MPR46 hin.



**Abb. 29: Detektion des humanen MPR46 mittels IIF** *melan-a-***Zelle.** In Kontrollzellen und mit hMPR46 transfizierten *melan-a-*Zellen wurden nach Fixierung die Expression des humanen MPR46 nachgewiesen. Dazu wurde ein Kaninchenserum (KII-5) verwendet, welches ausschließlich den humanen Rezeptor erkennt. Während in den Kontrollzellen keinerlei Färbung erkennbar ist, weisen die transfizierten Zellen, die für den MPR46 typische Lokalisation in Kernnähe (perinukleär) auf. Die Analyse ergab, dass mindestens 90% aller Zellen transfiziert waren.

# 3.3.2 Subzelluläre Lokalisation von Membranproteinen und Adaptoren in *melan-a*-Zellen

Vor der Etablierung des Golgi-budding-Assays wurde zunächst die Gleichgewichtsverteilung sowohl der zu untersuchenden Membranproteine Tyrosinase, TRP-1, Lamp-1 und MPR46 als auch der Adaptorkomplexe AP-1 und AP-3 anhand von Doppel-Immunfluoreszenzen in den mit humanen MPR46 transfizierten *melan-a*-Zellen nachgewiesen und mit dem Verteilungsmuster in der Literatur verglichen.

In Abbildungen 30A/B auf der folgenden Seite sind die melanosomalen Membranproteine Tyrosinase und TRP-1 jeweils in grün dargestellt. Erwartungsgemäß sind vesikuläre Strukturen in Kernnähe wie auch in der Zellperipherie angefärbt. Neben der Anfärbung von Tyrosinase in 30A und TRP-1 in 30B sind in beiden Teilabbildungen das lysosomale Membranprotein Lamp-1 rot angefärbt, welches in ähnlicher Weise in der Zelle verteilt ist. Auffällig ist ein durch Überlagerung der beiden Farben entstehendes gelbes Signal, welches eine partielle Kolokalisation der beiden untersuchten Proteine darstellt und den zu erwartenden lysosomalen Charakter der Melanosomen verdeutlicht. In Abbildung 30D ist die Tyrosinase in rot dargestellt, in grün das cis-Golgi-Markerprotein GM130. Die geringe Kolokalisation beider Proteine dürfte Ausdruck der hohen Biosyntheserate der Tyrosinase sein. Entsprechend lässt sich die rot dargestellte Tyrosinase in Abb. 30E auch partiell mit dem grün angefärbten MPR46 im perinukläeren Bereich kolokalisieren.

In Abb. 30C sind die Adaptorproteine AP-1 (grün) und AP-3 (rot) in einer Doppel-IIF dargestellt. Während AP-1 vorwiegend perinukleär lokalisiert ist, lässt sich der AP-3-Komplex eher diffus im gesamten Zytoplasma verteilt nachweisen. Es soll an dieser Stelle daran erinnert werden, dass die IIF lediglich eine Gleichgewichtsverteilung der Proteine in der Zelle darstellt und diese keinerlei prima vista Rückschlüsse auf einen funktionellen Aspekt des untersuchten Proteins erlauben. Gerade der langsamste Schritt eines dynamischen Prozesses wird in einer Gleichgewichtsverteilung dargestellt.





Abbildung 30: Verteilung relevanter Membranproteine und Adaptoren in der Doppel-IIF:

Die partielle Kolokalisation (gelbe Farbe) der melanosomalen Proteine (grün) Tyrosinase und TRP-1 mit dem Membranprotein Lamp-1 lysosomalen (rot) in A und B verdeutlichen den Charakter lysosomalen der Melanosomen. Die ebenfalls partielle Kolokalisation des cis-Golgimarkers GM130 (grün) in D mit der diffus ver-

teilten Tyrosinase (hier jetzt rot) ist Ausdruck der hohen Biosyntheserate des pigmentbildenden Enzyms Tyrosinase. Entsprechend lässt sich in F die Tyrosinase (rot) zum Teil auch mit dem MPR46 (grün) im Golgi/TGN kolokalisieren (gelbe Farbe). Interessanterweise findet sich in C lediglich AP1 perinukleär, während AP-3 diffus über die Zelle verteilt erscheint.

## 3.4 Etablierung und Charakterisierung der Basiskomponenten des Golgi/TGN-Budding-Assays

In der Etablierungsphase stand die Gewinnung von stark angereicherten, aber immer noch funktionalen Golgi-Donormembranen im Vordergrund. Daher wurde zunächst die Optimierung des Zellaufschlusses hinsichtlich Integrität der einzelnen subzellulären Organellen bei der Präparation des "post-nuclearsupernatant" (PNS) durchgeführt. Von den im Anschluss daran ausgetesteten, verschiedenen Gradienten zur subzellulären Fraktionierung des PNS findet hier nur ein linearer Saccharose-Gradient und der davon abgeleitete Step-Saccharose-Gradient Erwähnung, welcher letztendlich auch Eingang in das Protokoll des Budding-Assays fand.

Bei genauer Analyse der subzellulären Fraktionierungen wurde jedoch zunehmend klar, dass endosomale Kompartimente vom Golgiapparat/TGN überhaupt. nur unter sehr langwierigen differentiellen wenn Zentrifugationsschritten trennbar sind. Da jeder Zentrifugationsschritt aber die Integrität und damit die Funktionalität der Membranen reduziert, musste eine Verunreinigung des Donorkompartimentes mit anderen Organellen, v.a. endosomalen Kompartimenten und dem ER, als verfahrens-inhärend akzeptiert spezifischen werden. Um dennoch nur den Golgi/TGN-Export als Sortierungsschritt zu untersuchen, durften bei der post-Budding-Analyse nur neu-synthetisierte und im Golgiapparat/TGN akkumulierte Proteine betrachtet werden. Dazu wurden die neu-synthetisierten Proteine zunächst metabolisch markiert und dann durch einen Temperaturblock im TGN/Golgi akkumuliert. Anhand von pulse-chase-Experimenten mit anschließender Endoglykosidase-H-Digestion und isoelektrischer Fokussierung konnte letztendlich eine subtile Charakterisierung des Donorkompartimentes bis zum Subkompartiment vorgenommen werden.

Der erste essentielle Schritt war die Gewinnung eines "post-nuclearsupernatant" (PNS), der möglichst viele intakte und damit noch funktionelle Golgi/TGN-Membranen enthielt. Hierzu war es nötig die melan-a-Zellen höchst effizient aufzuschließen, so dass viele Golgi/TGN-Strukturen das Zellinnere verlassen konnten (lösen von Zytoskelettverankerungen, effektive Zerstörung der PM, da diese nach Aufschluss sich sonst wieder verschließt), andererseits durfte die dafür aufgewendete kinetische Energie nicht so groß sein, dass intrazelluläre Organellen mit darin akkumulierten Proteinen, wie die Golgi-Membranen bersten. Die Effizienz des Aufschlusses für ein Organell wurden, wie Abschnitt 2.6.1.4 zu entnehmen ist, anhand eines Quotienten von Marker-Enzymaktivitäten zwischen Überstand und korrespondierendem Pellet nach Zentrifugation gemessen, also beispielsweise PNS zu korrespondierendem Pellet P. Es sollten bei intakten Membranen die entsprechenden Markerenzyme im Pellet einer Ultrazentrifugation (10 min/100.000 g) nachzuweisen sein, während Ultrazentrifugats-Überstand hohe Enzymaktivitäten im auf Membranzerstörung hinweisen (näheres vgl. Abschnitt 2.6.1.4). Als ein solcher Marker wurde für Lysosomen die lösliche β-Hexosaminidaseaktivität, für den TGN die membranständige Galactosyltransferaseaktivität gemessen.

Prinzipiell fand bei den gezeigten Aufschlüssen die von uns letztendlich durchgeführte PNS-Präparation mit 1000 g in einer Eppendorfkühlzentrifuge Verwendung, da niedrigere Drehzahlen (getestet wurden auch 500 g und 700 g) zu einer höheren Kontamination mit dichteren Kompartimenten, z.B. Lysosomen, führte (Daten hier nicht gezeigt).

Aufgrund der signifikant höheren Reproduzierbarkeit gegenüber dem Aufschluss mittels einer Spritze wurde der Cellcracker als Aufschlussinstrument gewählt. Entscheidend für den Aufschluss ist neben dem Instrument auch die Anzahl an Passagen und die Breite des entsprechenden Spaltes, an dem die Scherkräfte auf die Zellen wirken. Beispielhaft für zahlreiche Untersuchungen ist hier nur die letztendlich favorisierte Aufschlussmethode (3 Passagen im Cellcracker mit dem kleinsten Ball = 8,002 µm  $\rightarrow$  9 µm Spalt) in Abb. 31A einer

längeren Passage mit dem größten Ball in Abb. 31B gegenübergestellt (10 Passagen, 8,008 μm→ 6 μm Spalt).



**Abbildung 31: Aufschlusstest:** Dargestellt ist jeweils die prozentuale Verteilung der Enzymaktivitäten der Markerenzyme Galactosyltransferase (TGN/Golgi) und der β-Hexosaminidase (Lysosom) im direkten Vergleich zwischen Überstand und korrespondierendem Pellet aus 10 Versuchen. Während das erste Verhältnis zwischen PNS und Pellet nach einer 5 min/1000g Zentrifugation des ZE eine Aussage über die Effizienz des Aufschlusses erlaubt, kann über die Verteilung des Überstandes S<sub>PNS</sub> zum Pellet P<sub>PNS</sub> nach der Ultrazentrifugation (100.000 g) des PNS eine Aussage über die Integrität der Membranen gemacht werden. Dargestellt sind die Daten aus 10 Aufschlussexperimenten.

A) Schonender Aufschluss von TGN/Golgi-Strukturen durch 3 Passagen im Cellcracker mit kleinstem Ball (=größter Spalt = 9  $\mu$ m): Aufgrund der kurzen Passagezeit und der relativen Breite des Spaltes werden lediglich 56% GalT aus den Zellen präpariert. Diese sind dann aber zu 90% intakt und durch Ultrazentrifugation pelletierbar, entsprechend sind bei diesem Aufschluss nur bis zu ca. 10,5% der Membranen zerstört.

B) Aufschluss mit hoher Effizienz für TGN/Golgi-Strukturen durch 10 Passagen im Cellcracker, mit größtem Ball (=kleinster Spalt = 6  $\mu$ m): Zwar werden bis zu 80% GalT-aktive Membranen aus den Zellen präpariert, allerdings werden dadurch bis zu 25% nicht durch die Ultrazentrifugation pelletierbar. Diese 25% stellen einen nicht mehr an Membranen gebundenen, fraktionierten TGN/Golgi dar, der für weitere funktionelle Untersuchungen nicht mehr zur Verfügung steht.

Abbildung 31B ist zu entnehmen, dass sich nach dem Zellaufschluss nahezu 80% der GalT-Aktivität. aber beispielsweise erst 50% der β-Hexosaminidaseaktivität im PNS befinden. Dieser effiziente Aufschluss von Golgi/TGN-Strukturen durch 10 Passagen zwischen dem engsten Spalt (größter Ball) führt allerdings zu einem Bersten von bis zu 24% der freigesetzten Golgi/TGN-Membranen, welche dadurch ihre Funktionalität für spätere Buddingversuche verlieren. Daher wurde die weitere Präparation zu Lasten einer geringeren Ausbeute verbunden mit einer höheren Integrität verlassen. Dies ist beispielhaft in Abb. 31A dargestellt, wo 3 Passagen durch einen großen Spalt (kleiner Ball) zu einem wesentlich schonenderen Aufschluss führen. Dies ist an der Pelletierbarkeit und somit Membrangebundenheit von 89,5% der GalT-Aktivität erkennbar, oder anders herum sind nur 10,5% der GalT-Aktivität im S<sub>PNS</sub> nachweisbar und stellen fragmentierten Golgi/TGN dar. Leider reduzierte sich dadurch die Aufschlusseffizienz auf 56%, was aber zugunsten der Integrität der Golgi/TGN-Membranen als Standardaufschlussmethode toleriert wurde.

## 3.4.2 Charakterisierung des linearen Saccharosegradienten mittels subzellulärer Fraktionierung

Ursprüngliches Ziel der Charakterisierung des linearen Saccharosegradienten war es, einen möglichst reinen Golgi/TGN-Pool als Donormaterial zu gewinnen. Zunächst wurden nach Fraktionierung des Gradienten die relevanten Membranund Adaptorproteine mittels Westernblot detektiert. Damit eine subzelluläre Zuordnung der entsprechenden Fraktionen möglich wurde, war es nötig, die zur Verfügung stehenden subzellulären Marker ebenfalls im Westernblot oder mittels Enzym-Assays nachzuweisen. Abb. 32 stellt neben diesen Proteinen in den entsprechenden Fraktionen auch die refraktometrisch gemessenen Dichtewerte der Pools dar.

Wie Abb. 32 zu entnehmen ist, stellen die Pools 5 und 6 mit 75% der Gesamt-GalT-Aktivität die Golgi-TGN angereicherten Fraktionen dar. Leider wurden in diesen auch fast alle anderen Organellen in großen Mengen angereichert. Lediglich Zytosol mit dem Marker LDH ließ sich erwartungsgemäß sehr leicht davon trennen. Auch große Teile der Lysosomen lassen sich abtrennen, wie die gezeigten Marker β-Hexosaminidase und Lamp-1 anzeigen. Ebenso sedimentieren Anteile von Peroxisomen und Plasmamembran überwiegend in Pools mit dichteren Saccharosekonzentrationen.



## Abbildung 32: Charakterisierung des linearen Saccharosegradienten:

Dargestellt ist eine subzelluläre Fraktionierung auf einem linearen Saccharosegradienten 8,55%(w/w) 60%(w/w). Die Verteilung der subzellulären Markerproteine im Westernblot im oberen Teil der Abbildung und in den Enyzm-Assays im unteren Teil der Abbildung machen deutlich, dass es zu keiner signifikanten Trennung von Golgi/TGN-Strukturen sowohl von endosomalen Subkompartimenten oder vom ER kommt. Lediglich Zytosol (Marker LDH) lässt sich sauber abtrennen. Anteile von Peroxisomen (PEX1) und Plasmamembran (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase) sowie ein Großteil der Lysosomen (β-Hex und Lamp-1) lassen sich separieren.

Alle Adaptoren und Membranproteine finden sich ebenfalls im Pool 4 und 5 mit Dichtewerten zwischen 26% und 38% Saccharose.

cisG=cis-Golgi, EE=frühes Endosom, LE=spätes Endosom, RE=Recycling Endosom, ER= Endoplasmatisches Retikulum, PM=Plasmamembran, PER=Peroxisom, Cyt=Zytosol. Es wurden aus jedem Pool gleiche Mengen eingesetzt.

Zusammenfassend finden sich also in den Pools 4 und 5 mit Dichtewerten zwischen 26-34,5% Saccharose hohe Mengen an relevanten Membranproteinen und an Membranen gebundene Adaptoren. Allerdings sedimentieren dort neben Golgi/TGN- auch ER- und Endosomale-Membranen.

Da auch die Aufschlüsselung in Subfraktionen keinen signifikanten Vorteil bezüglich besserer Trennschärfe zumindest zwischen Endosomen und TGN/Golgiapparat brachte, wurde die initiale Absicht, ein reines TGN/Golgi-Donorkompartiment zu gewinnen, verlassen. Stattdessen wurde ausgehend von diesen Daten ein Stepgradient entwickelt, welcher eine wesentlich raschere Gewinnung möglichst vieler TGN/Golgimembranen mit darin akkumulierten metabolisch markierten Membranproteinen ermöglichte.

#### 3.4.3 Schnelle Donormembranpräparation mittels eines Step-Gradienten

Wie dem vorherigen Abschnitt 3.4.3 zu entnehmen ist, wurde zunehmend klar, dass die Spezifität des Transportschrittes nicht über die Reinheit des Donorkompartimentes gewährleitstet werden kann. Daher wurde ausgehend von den Daten des linearen Saccharosegradienten ein möglichst schnelles Präparationsschema für Membranen mit der Dichte zwischen 27% (w/w) und 37,5% (w/w) Saccharose mit hoher Reproduktionsmöglichkeit entwickelt.

Um trotzdem eine Verbesserung der Reinheit zu erhalten erfolgte nach der PNS-Präparation eine 20000g Zentrifugation. Durch Verwendung der resuspendierten P20-Pellets sollten bei der PNS-Präparation leichtere Organellen und Zytosol abgetrennt werden. Zum anderen wurde das subzellulären Zentrifugationsprinzip während der Fraktionierung von Sedimentation auf Flotation geändert. Dies brachte den Vorteil, dass schwere bzw. dichtere Organellen jenseits der Zielsedimentationsdichte von 40,5%, wie Lysosomen und Peroxisomen gar nicht erst flotieren und somit die Kontamination durch diese minimiert wurde.

Anstatt der kompletten Daten der subzellulären Fraktionierung mittels Step Gradienten findet sich hier in Abb. 33 aus Übersichtsgründen nur die Darstellung der wesentlichen Marker im Homogenat und in den Donormembranen sowie deren prozentuale Anreicherung.

Wie Abbildung 33B zu entnehmen ist, findet durch das angewendete Protokoll eine Anreicherung des TGN/Golgimarkers von 4,17 fmol transferierte [<sup>3</sup>H]-UDP-Galactose/mg Protein/min im Homogenat (ZE) auf 73,06 fmol transferierte



[<sup>3</sup>H]-UDP-Galactose/mg in den verwendeten Donormembranen statt. Dies entspricht einer Anreicherung um den Faktor 17,5.

Abbildung 33: Charakterisierung des Donorkompartiments, gewonnen durch einen Saccharose-Step-Gradienten.

- A) Es sind verschiedene subzelluläre Markerproteine sowohl im Zellextrakt (ZE) als auch in den Donormembranen geblottet, wobei gleiche Proteinmengen in beiden Präparationsstufen aufgetragen sind. Die Zahlenwerte in der letzten Spalte entsprechen dem Verhältnis der quantifizierten Signalintensitäten von Donormembranen (Dm) zu Zellextrakt (ZE), sind also ein Maß für Anreicherung (>1) respektive Abreicherung (<1). Während sich der zytosolische Marker LDH gar nicht mehr nachweisen lässt, sind sowohl Recycling-Endosomen (rab 11), frühe Endosomen (rab 5) und insbesondere späte Endosomen (rab 7) vorhanden. Neben einer Abreicherung des cis-Golgi Makerproteins GM130 sind interessanterweise eine relative Anreicherung des Plasmamembran (PM) Markers Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase zu beobachten. Daneben finden sich sehr geringe Mengen an Peroxisomen (Catalase) und endoplasmatisches Retikulum (PDI). Obwohl es absolut gesehen zu einer Abnahme der Radioaktivität kommt (vgl. Text), findet eine Anreicherung der proteingebundenen Radioaktivität statt.
- B) Dargestellt sind die relativen Anreicherungen bezogen auf die spezifischen Aktivitäten in den dargestelten Präparationsstufen Zellextrakt (ZE), "post nucelar supernatant" (PNS) und der Donormembranen (Dm) der zwei Markerenzyme Galactosyl-Transferase und β-Hexosaminidase. Es wird aus den Daten ersichtlich, dass es zu einer erheblichen Anreicherung von TGN/Golgimembranen kommt, und zwar um den Faktor 17,5. Absolut entspricht dies einer spezifischen Aktivität von 4,17 fmol transferierte [<sup>3</sup>H]UDP-Galactose/min/mg Protein im ZE zu 73,06 fmol transferierte [<sup>3</sup>H]UDP-Galactose/min/mg Protein in den Donormembranen. Die marginale Reduktion der spezifischen Aktivität von β-Hexosaminidase von 49,78 mU/mg im ZE auf 34,47 mU/mg in den Dm, stellt lediglich nicht in Lysosomen befindliche β-Hexosaminidase dar, also neu synthetisiertes Protein auf dem Weg zum Lysosom im TGN oder Endosomen.

Gleichzeitig findet sich eine Abreicherung des lysosomalen Makerenzyms  $\beta$ -Hexosaminidase von 49,78 mU/mg im ZE auf 34,47 mU/mg in den Donormembranen, welches einer Abreicherung um den Faktor 0,69 entspricht. Die relativ hohe absolute spezifische Aktivität der  $\beta$ -Hexosaminidase in den Donormembranen lässt sich auf nicht in Lysosomen befindliche, also neusynthetisierte Hexosaminidase auf dem Weg ins Lysosom im TGN oder den Endosomen zurückführen, zumal große Mengen der Lysosomen schon in der Präparation des PNS bei der 1000 g Zentrifugation abgetrennt wurden (vgl. Abb. 31b).

Die weitere Charakterisierung der Donormembranen erfolate mittels Westernblotanalyse und der Quantifizierung der Signale im ZE und in den Donormembranen. Der Quotient der quantifizierten Signale aus Dm zu ZE entspricht dann jeweils einer Anreicherung (Werte >1) oder einer Abreicherung (Werte <1). Abb 33A zeigt die völlige Abwesenheit des zytosolischen Markers LDH und nur geringe Kontamination durch Peroxisomen und (vgl. Catalse) Endoplasmatisches Retikulum (vgl. PDI). Dem gegenüber lassen sich endosomale Subkompartimente (vgl. rab 5,7,11) und der auch Plasmamembranmarker Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase in den Donormembranen nachweisen.

Das nahezu gänzliche Fehlen von GM130 in den Dm ist verwunderlich, aber sehr wahrscheinlich dadurch bedingt, dass GM130 ein Golgi-Matrix-Protein ist, also von außen den Golgiapparat umringt (Nakamura et al. 1995). Durch den Zellaufschluss und die Pufferbedingungen wird es offenbar stringent entfernt. Bedauerlicherweise stand zum Zeitpunkt der subzellulären Fraktionierung kein Antikörper für ein anderes Golgi-residentes Protein zur Verfügung. Somit stützt sich die Charakterisierung des Donorkompartimentes zu diesem Zeitpunkt vor allem auf den enzymatischen Nachweis der Galactosyltransferaseaktivität und machte zum einen weitere biochemische und zellbiologische Analysen notwendig (vgl. Abschnitt 3.4.4 und 3.4.5).

Ebenfalls lassen sich mit dem dargestellten Verfahren nur ein Bruchteil (14%) der gesamten proteingebundenen Radioaktvität vom PNS in den Donormembranen nachweisen, die restlichen 86% der proteingebundenen

Radioaktivität gehen also durch den Präparationsprozess verloren. Dies lässt sich im Wesentlichen durch die Anwendung eines besonders schonenden Zellaufschlsses erklären (vgl. Abschnitt 3.4.1, S. 92). Diese geringe Ausbeute ist bei vergleichbaren subzellulären Fraktionierungen nicht unüblich (Karlsson & Carlsson 1998).

Es bleibt also festzuhalten, dass im vorliegenden Protokoll eine Golgi/TGN-Anreicherung mit radioaktiv markierten Membranproteinen stattfindet, die gerade mit einer signifikanten Kontamination durch endosomale Kompartimente verbunden ist. Inwieweit die Kontamination durch endosomale Membranen die Spezifität des Transportschrittes Golgi-Export im aufgebauten Assay beeinflusst, sollte durch andere biochemische Analysen gezeigt werden (siehe unten).

## 3.4.4 Analyse des Glykosylierungsmusters der neu-synthetisierten Proteine mittels *pulse-chase*-IEF und Endoglykosidase-H-Digestion zum Nachweis der Signifikanz des Temperaturblocks

Wie Spezifität des zuvor dargestellt, kann die zu analysierenden Transportschrittes Golgi-Export nicht durch die Aufreinigung eines homogenen Donorkompartiments gewährleistet werden. Dabei ist allen voran die post-Golgi-Kompartimenten, Verunreinigung mit wie den endosomalen Subkompartimenten von Bedeutung, denn gerade diese stellen neben dem Golgi/TGN einen möglichen intrazellulären Wirkort von AP-3 dar.

Folglich war es für einen Golgi/TGN-Budding-Assay notwendig nachzuweisen, dass Vesikel mit den in ihnen enthaltenen Proteinen, die im Budding-Assay gebildet werden auch tatsächlich vom Donorkompartiment stammen und nicht etwa von einer TGN/Golgi-fremden Membranfraktion. In diesem Zusammenhang galt es ebenso zu zeigen, dass die verfolgten Marker Membranproteine zu Beginn des Assays, also nach Aufreinigung der Golgi/TGN-Membranen sich tatsächlich im Golgi befinden, und nicht in einem anderen Membrankompartiment, wie beispielsweise Endosomen.
Daher wurde mit der Akkumulation von metabolisch markierten, neusynthetisierten Proteinen ein Ansatz gewählt, der eine Diskriminierung zwischen Golgi/TGN und Post-Golgi dadurch ermöglichte, dass alle radioaktiven, also neu-synthetisierten Proteine durch einen Temperaturblock im Golgi akkumuliert wurden. Durch selektive Analyse der radioaktiven Proteine würden also nur die neu-synthetisierten und im Golgi akkumulierten Proteine in ihrem Sortierverhalten detektiert, so dass der untersuchte Transportschritt dem Budding von Vesikeln aus dem TGN/Golgiapparat entspräche. Es war also zu zeigen, dass unter den gewählten Temperaturbedinungen (20°C) die relevanten Membranproteine im Golgi akkumulieren. Nachweisbar ist dies durch Analyse des Glykosylierungszustandes der Proteine, welcher abhängig ist vom jeweiligen Aufenthaltsort (ER > cis-Golgi > medial-Golgi > trans-Golgi > TGN). Aus der Synopse über die posttranslationale Oligosaccharidreifung in Abbildung 34 sind im Wesentlichen zwei Dinge für diese Arbeit essentiell.



= N-Acetyl-Glucosamin(GlcN
 = Mannose (Man)
 = Glucose (Glc)

 = Galactose (Gal)
 = N-Acetyl-Neuraminsäure (=Sialylsäure = NANA)

**Abb. 34: Oligosaccharidprozessierung im ER und Golgiapparat**. Jeder Schritt des Reifungsprozesses basiert auf dem Vorherigen. Wichtig an dieser Stelle ist die funktionelle Kompartimentierung dieser Schritte. So ist jedem Schritt der entsprechende Ort der Zisterne in dem grauen Balken unter der Abbildung zugeordnet. Erst jenseits der medial-Zisterne werden die Glykoproteine resistent gegen eine hydrolytische Spaltung durch die bakterielle Endoglykosidase H. Wichtig ist ebenso, dass der letzte Schritt im Golgi die Anheftung der negativen N-acetyl-Sialylsäure (NANA) darstellt und dadurch der isoelektrische Punkt der Proteine zum Negativen hin verschoben wird. Dies ermöglicht eine Differenzierung und Identifizierung der cis/medial-Formen von den sialylierten TGN/post-TGN Formen durch isoelektrische Fokusierung. Modifiziert nach Alberts et al. (2002), S. 734.

Zum einen, dass Glykoproteine von Eukaryonten nach der Abspaltung von Mannoseresten durch die Mannosidase II resistent gegenüber der hydrolytischen Spaltung durch die bakterielle Endoglykosidase H werden. Mannosidase II findet sich aufgrund der funktionellen Kompartimentierung jedoch erst im medialen Bereich des Golgiapparates, d.h. Endo-H-resistente Proteine müssen sich jenseits des medialen-Golgikompartimentes befinden.

Zum anderen unterscheiden sich Proteine im Golgi von Proteinen, die den Golgi bereits verlassen haben durch den terminalen Schritt der Glykosylierung im TGN: die Anheftung von N-Acetyl-Sialylsäure (NANA). Die komplexen Oligosaccharide der Glykoproteine im und jenseits des TGN sind durch Anheftung negativer NANA-Reste (Sialylierung) komplettiert, was mit einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes der Glykoproteine zu niedrigeren pH-Werten einhergeht. Diese Reifung der Membranproteine lässt sich durch isoelektrische Fokussierung nachweisen und ermöglicht so neben der Identifizierung auch eine Differenzierung zwischen Proteinen im cis/medial-Golgi und Proteinen im TGN/post-Golgi.

Die für diese Arbeit relevanten Membranproteine Tyrosinase, TRP-1 und MPR46 wurden im Folgenden hinsichtlich ihrer Glykosylsierungsmuster mittels IEF und Endo-H-Verdau analysiert (Abb. 35, nächste Seite):

Um die Biosynthesewege der Proteine hMPR46 (Abb. 35A), Tyrosinase (Abb. 35B) und TRP-1 (Abb. 35C) zu verfolgen, wurden die Proteine für die angegebenen Zeiten metabolisch markiert (*pulse*) und nach unterschiedlichen *Chasezeiten* immunpräzipitiert. Ein Drittel des Präzipitates wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, während das zweite Drittel vor der elektrophoretischen Auftrennung durch die Endoglykosidase H verdaut wurde. Das verbliebene Drittel konnte zur IEF eingesetzt werden.

Nach 12 h Markierung (**Spur 1**) sind alle drei Proteine vollständig glykosyliert, wie der Vergleich zwischen normaler SDS-PAGE mit zuvor Endo-H-verdauten Proben und IEF zeigt. Die Proteine haben ihren Weg über raues ER, cis-Golgi, medial-Golgi, trans-Golgi bis zum TGN hinter sich gebracht und befinden sich jenseits des trans-Golgis. Werden die Proteine demgegenüber bereits nach

einem 20 minütigen *pulse* präzipitiert (**Spur 2**), so finden sich fast ausschließlich nicht-sialylierte und Endo-H-sensitive Formen der drei Proteine, die sich demzufolge zwischen ER und medial-Golgi befinden dürften.



#### Abb. 35: Analyse des Glykosylierungsmusters von Tyrosinase, TRP-1 und des hMPR46:

Die Proteine hMPR46 (A), Tyrosinase (B) und TRP-1(C) wurden aus metabolisch markierten *melan-a*-Zellen präzipitiert, um den Glykosylierungsstatus zu analysieren. Die gewonnenen Proben wurden geteilt:

Ein Drittel des Präzipitates wurde direkt mittels SDS-PAGE aufgetrennt (**nativ**), das zweite Drittel wurde vor SDS-PAGE einem **Endo-H-Verdau** unterzogen, dass verbleibende Drittel wurde zur isoelektrischen Fokussierung (**IEF**) genutzt.

Die in Spur 1 aufgetragenen Proteine wurden 12-stündigen nach einer Markierung gewonnen, die in Spur 2 nach einem sehr kurzen pulse von 20 min. Die Proben aus Spur 3 wurden nach 20 min pulse und 4 h Chase bei 37°C gewonnen, wähend die Proben in Spur 4 nach 20 min pulse und einem 4 h-chase bei 19,5°C gewonnen wurden. Die weiteren Spuren 5-9 entstammen Proben, die wie Spur 4 inkubiert wurden, zuzüglich eines anschließenden chase bei 37°C für die angegebenen Zeiten. Erklärung siehe Text.

In **Spur 3** wurden die Proteine präzipitiert, die einen 20 min kuzen *pulse* und einen 4h-*chase* bei 37°C durchlaufen hatten. Auch hier zeigt der Vergleich, dass die Proteine vollständig glykosyliert sind, also den trans-Golgi verlassen haben. Die in **Spur 4** aufgetragenen Proteine wurden ebenfalls nach 20 min *pulse* und 4h-*chase* präzipitiert, allerdings mit dem entscheidenden

Unterschied, dass der *chase* bei 19,5°C stattfindet. Wie der Vergleich zeigt sind unter diesen Bedingungen alle Proteine nicht vollständig glykosyliert, weitestgehend Endo-H-sensitiv aber im Wesentlichen teilsialyliert. Dies bedeutet, dass die Proteine unter den genannten Temperaturbedingungen von 19,5°C nicht bis zum trans-Golgi oder darüber hinaus gelangen.

Wird nun, wie in den Spuren 5-9 zuzüglich nach einer Inkubation für 4h bei 19,5°C ein *release* bei 37°C angefügt, so findet eine sukzessive Glykosylierung statt, die Proteine werden Endo-H-resistent und vollsialyliert, gleichbedeutend mit dem vollständigen Durchlaufen des Golgiapparates.

Das Ergebniss dieses Versuchs definiert die Inkubationsbedingungen für den Golgi/TGN-Budding-Assay dahingehend, dass die Zellen kurz für 20 min metabolisch markiert werden, anschließend erfolgt eine 4h-Inkubation bei 19,5°C, um die Proteine im Golgi zu akkumulieren. Anschließend wurden die Donormembranen präpariert, gefolgt vom eigentlichen Budding-Assay, der für 1h bei 37°C durchgeführt wird, um ein vollständiges Durchlaufen der Proteine durch den Golgi und ein Abknospen der Vesikel vom TGN zu ermöglichen.

#### 3.4.5 Nachweis des Temperaturblocks mittels Elektronenmikroskopie

(Die Fixierung und Aufarbeitung der pelletierten Zellen wurde von Dr. rer. nat.D. Wenzel am MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen durchgeführt)

Um die biochemischen Experimente zu bestätigen, die zeigen konnten, dass bei einem Temperaturblock von 4h/19,5°C effektiv Proteine im Golgi von *melan-a-*Zellen akkumulieren, wurde die Elektronenmikroskopie gewählt. Dazu wurden Zellen unter versuchsäquivalenten Bedingungen (4h/19,5°C) inkubiert und dann gemäß Abschnitt 2.5.3 für die Elektronenmikroskopie fixiert. Parallel wurden Zellen fixiert, die nach dem Temperaturblock für 30 min wieder bei 37°C weiterinkubiert wurden (*"release"*). Anhand von Gefrierschnitten wurde eine Immunogoldmarkierung der Proteine Tyrosinase und TRP-1 vorgenommen, welche in Abb. 36 exemplarisch für TRP-1 dargestellt ist.

Es wird deutlich, dass der Temperaturblock zu einer starken Akkumulation von TRP-1 im Golgi/TGN führt. Die Akkumulation lässt sich durch eine Inkubation von 30 min bei 37°C nahezu vollständig aufheben. Eine Negativkontolle von melan-a-Zellen, die direkt aus dem Inkubator fixiert wurden, sah identisch zu dem release-Experiment aus. Ebenso konnte das Experiment identisches Verhalten für Tyrosinase nachweisen (Daten nicht gezeigt). Insbesondere finden sich keine größeren Akkumulationen im ER oder endosomalen Kompartimenten, wobei allerdings auffällig war. dass es unter Blockbedingungen bei einigen Golgi-Apparaten zu Aufblähungen (Ballonierung) der Membranen kommt (Abb. 37A Stern).

Damit ist sowohl biochemisch wie zellbiologisch eindeutig gezeigt, dass die Proteine unter Versuchsbedingungen im Golgiapparat durch den Temperaturblock nicht nur akkumuliert werden, sondern diesen in der Folge auch durch eine ca. 30-60 min Aufwärmphase wieder komplett verlassen.





**A:** Temperaturblockbedingungen (4h/19,5°C); **B:** Temperaturblockbedingungen (4h/19,5°C) mit anschließendem *"release"* (30 min/37°C). Eine Negativkontrolle mit *melan-a-*Zellen unter *steady-state* Bedingungen fixiert entsprach Teilabbildung B.

#### 3.4.6 Charakterisierung der Zytosolpräparation

Es war sicherzustellen, dass die im Budding-Assay verwendeten Mauszytosole alle eine äquivalente Proteinkonzentration besaßen. Dies wurde anhand von Westernblots an drei verschiedenen konstitutiv exprimierten Proteinen, sog. "house keeping proteins" (AP2, Clathrin, Tubulin) verifiziert (siehe Abb. 37). Zudem wurde überprüft, ob die Zytosole, welche für  $\delta$ - bzw. µ1A-Adaptin defizient sein sollten, dies auch tatsächlich waren.



Abb. 37: Charakterisierung der verwendeten murinen Zytosole: Jeweils 100  $\mu$ g der nach Abschnitt 2.6.2.1 präparierten Zytosole wurden auf die einzelnen Spuren aufgetragen. Während *mocha*-Zytosol erwartungsgemäß kein  $\delta$ -Adaptin enthält, lässt sich im *EFA*-Zytosol ein Restkomplex von AP-1 nachweisen. Dieser enthält zwar  $\gamma$ -Adaptin, jedoch nicht das für die Bindung an Tyrosin-haltige Sortierungsmotive essentielle  $\mu$ 1A-Adaptin. In *MEF*-Zytosol finden sich sowohl AP-1A als auch AP-3. Als Kontrolle wurde neben AP-2, auch Clathrin sowie  $\alpha$ -Tubulin nachgewiesen.

Erwartungsgemäß ließ sich in *mocha*-Zytosol kein  $\delta$ -Adaptin und entsprechend in EFA-Zytosol kein µ1A-Adaptin detektieren. Im MEF-Zytosol waren beide Untereinheiten detektierbar. Es findet sich zwar in allen drei murinen Zytosolen  $\gamma$ -Adaptin, jedoch wird daraus verständlich, dass zwar AP-1 Komplexe gebildet ohne die für die Erkennung werden. iedoch von Tyrosin-haltigen Sortierungsmotiven essentielle µ1A-Untereinheit. Zudem ist bekannt, dass in diesen Zellen der AP-1-Restkomplex eine verminderte Halbwertszeit besitzt (vgl. Einleitung). Entsprechend wird im Folgenden MEF-Zytosol als wt <sup>+/+</sup>, *mocha*-Zytosol als  $\delta^{-/-}$  und *EFA47*-Zytosol als  $\mu$ 1A<sup>-/-</sup> deklariert.

# 3.5 Analysen mit dem Golgi/TGN-Budding-Assay

# 3.5.1 Funktionalität der Donormembranen und Separation von Vesikeln und Donor

Nach Charakterisierung der Donormembranen und der verwendeten Zytosole wurde die Funktionalität der Membranen überprüft. Außerdem wurde analysiert, ob die Trennung der gebildeten Vesikel von den Donormembranen überhaupt möglich war. Anhand des im Folgenden dargestellten, einfachen Experiments soll auch die im Folgenden verwendete Darstellung der Budding-Assays und die durchgeführte post-Budding-Analyse im Detail erläutert werden:

Die gemäß Abschnitt 2.6.1 präparierten Donormembranen wurden für 60 min mit einem ATP-regenerierenden System und Schweinehirnzytosol (Endkonzentration 2,7 mg/ml) inkubiert. Die Verwendung des heterologen Schweinehirnzytosol hatte wegen der schnelleren und einfacheren Gewinnung praktikable Vorteile und führte zu äquivalenten Buddingresultaten (vgl. dazu Abschnitt 3.5.4).

Wie im Methodenteil erläutert, erfolgte nach dem Stoppen der Buddingreaktion eine Geschwindigkeitszentrifugation zum Separieren von Donor und gebildeten Vesikeln. Das dabei geformte Gradientenprofil ist Abb. 38A zu entnehmen. Die Fraktionen 1-8 wurden zum Vesikelpool und die Fraktionen 9/10 und das Pellet zum Donorpool vereinigt und zentrifugiert.

Abbildung 38B belegt die Signifikanz der Trennung zwischen Vesikeln und Donormembranen. Es ist jeweils die Galactosyltransferaseaktivität, ein für das TGN charakteristisches Markerenzym (Taguchii et al. 2003), aus einem Aliquot des Vesikel- und Donorpools bestimmt worden. Es finden sich nach der Geschwindigkeitszentrifugation des Buddingansatzes über 92% der GalT-Aktivität im Donorpool, während nur bis maximal 8% der GalT-Aktivität im Vesikelpool nachweisbar waren. Die GalT-Aktivität wurde auch in den Überständen der Ultrazentrifugate der einzelnen Pools gemessen und war unter der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, dass die GalT- Aktivität in diesen Überständen nicht über dem Leerwert liegt, macht eine Fragmentation des Golgis/TGNs zusätzlich zu den bereits gezeigten Daten sehr unwahrscheinlich. (vgl. auch Abschnitt 3.5.2 und 3.5.3).



#### Abbildung 38: Trennung von Vesikeln und Donor

#### A) Dichteprofil des linearen Gradienten:

Dargestellt ist der refraktometrisch bestimmte Dichtemittelwert in % (w/w) Saccharose in den einzelnen Fraktionen. Die Standardabweichung aus 20 Experimenten ist durch die senkrechten Fehlerindikatoren dargestellt. Fraktionen 1-8 werden zum Vesikelpool Fraktion 9/10 und das Pellet P zum Donorpool zusammengefasst.

#### B) Galactosyltransferaseaktivität im Vesikel- und Donorpool:

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der prozentualen Gesamtaktivität des Golgi/TGN Markerenzyms Galactosyltransferase (GaIT). Es finden sich lediglich bis zu 8% der GaIT-Aktivität im Vesikelpool, in Negativkontrollen bei 4°C unter 2 %. Die dargestellte Trennung zwischen GaIT ist Ausdruck der Separation von GaIT-positiven Donormembranen einerseits und GaIT-negativen Vesikeln anderseits. Die Standardabweichung bei 20 Experimenten betrug ca. 5,54%.

Im Anschluss daran wurden die pelletierten Vesikel und der Donor eines jeden Teilexperimentes resuspendiert und sukzessive einer IP gegen die relevanten Membranproteine unterzogen. Abb. 39 auf der nächsten Seite zeigt die Autoradiographie aus dem oben beschriebenen Experiment:

In der Abbildung 39 findet sich nur mature, vollglykosylierte Tyrosinase, also die Form, die auch schon vor Zellaufschluss Endo-H-resistent ist (vgl. Abschnitt 3.4.4). Selbst wenn ER-Budding stattfindet, kann die Spezifität für den Golgi-Export über die Analyse nur der reifen, vollglykosylierten Form gewährleistet werden. Die Detektion von 41 % der vollglykosylierten From der Tyrosinase im Vesikelpool bei gleichzeitiger signifikanter Abwesenheit von größeren Mengen GalT-Aktivität beweist also einerseits die Funktionalität der eingesetzten Donormembranen und andererseits nochmals die Signifikanz der Geschwindigkeitszentrifugation bezüglich Separation von Vesikeln und Donor.



Abbildung 39: Funktionalitätstest des Budding-Assays: Dargestellt ist die Detektion von Tyrosinase mittels IP nach einem Standard-Budding für 60 min bei 37°C mit Schweinehirnzytosol (Endkonzentration 2,7 mg/ml) und ATPregenerierendem System. Spur 1 stellt dabei die IP aus dem resuspendierten Ultrazentrifugat des mittels Geschwindigkeitszentrifugation gewonnenen Vesikelpools dar, Spur 2 die entsprechende IP aus dem Donorpool. Das quantifizierte Vesikelsignal der Tyrosinase wurde als prozentuale Menge des Gesamtsignals in Vesikel- und Donorpool angegeben. Beachtenswert ist, dass zwar 41% der Gesamt-Tyrosinase im Vesikelpool zu finden ist, aber nur 5% der GalT-Aktivität, was neben der Funktionalität der Donormembranen nochmals die Signifikanz der Separation von Vesikeln und Donormaterial unterstreicht.

# 3.5.2 Dokumentation der Morphologie des Donors und der Vesikel in der Elektronenmikroskopie

Zur Darstellung des Donors und der gebildeten Vesikel wurde die Elektronenmikroskopie nach Negativkontrastierung der Proben gewählt. Wie schon unter Abschnitt 2.5.4 beschrieben eignet sich dieses Verfahren besonders gut zur raschen Darstellung von intakten, ungeschnittenen Strukturen. Daher war es möglich schnell einen Überblick über die Morphologie zu bekommen, ohne dabei aufwendige Einbettverfahren zur detailierten Strukturanalyse vornehmen zu müssen.

Jeweils vier charakteristische Aufnahmen des Donors und der Vesikel sind in der folgenden Abbildung 40A/B dargestellt: Zunächst fällt auf, dass die Donormembranen in ihrer diffus retikulären Struktur (Abb. 40A) präformierte kontrastreiche Ausstülpungen ("buds") von ca. 80-100 nm aufweisen (besonders gut sichtbar rechts unten).



Abbildung 40: Negativkontrastierung von Donormembranen und Vesikelpool in der Elektronenmikroskopie

#### A:Darstellung der Donormembranen

Auffällig sind die retikulären Strukturen an denen kontrastreiche Ausstülpungen ("buds") präformiert sind. Diese haben einen Durchmesser von ca. 80-100 nm und entsprechen den erwarteten Durchmessern von präformierten Transportvesikeln. Es wurden zur Schonung der Membranen ungewaschene Donormembranen eingesetzt.

In den entsprechenden Vesikelpoolen (Abb. 40B) finden sich neben dem überkontrastiertem Hintergrund einzelne vesikuläre Strukturen von ebenfalls 80-100 nm Durchmesser, die sich in der für dieses Verfahren typischen "Doppelmembran" darstellen. Die geringe Dichte von vesikluären Strukturen ergibt sich daraus, dass auf eine Ankonzentrierung des Vesikelpools mittels Ultrazentrifuge zur Schonung der Integrität der Vesikel verzichtet wurde, sondern lediglich eine Adhärenz durch Sedimentation stattfand.



# Abbildung 40: Negativkontrastierung von Donormembranen und Vesikelpool in der Elektronenmikroskopie

#### **B: Darstellung des Vesikelpools**

Neben überkontrastiertem Hintergrund finden sich in diesem Verfahren doppelschichtig erscheinende vesikuläre Srukturen von 80-100 nm Durchmesser, was dem für Transportvesikel typischen Durchmesser entspricht. Die geringe Dichte an Vesikeln im Vesikelpool ist durch die Gewinnung der Probe bedingt. Es wurde zur Schonung der Membranen auf eine Ultrazentrifugation verzichtet und lediglich mit Sedimetation und Adhäsion gearbeitet.

Dadurch ist neben dem biochemischen auch der zellbiologische Nachweis gelungen, dass der Assay funktionell ist, da davon auszugehen ist, dass die präformierten "buds" nach Erwärmung und Zugabe von ATP/GTP sowie Zytosol vom Donor abknospen. Dies wird dadurch unterlegt, dass die nachgewiesenen Vesikel mit ihrem Durchmesser von 80-100 nm gerade der in der Literatur beschrieben Größe von Transportvesikeln entsprechen. Wie schon biochemisch ausgeschlossen, findet sich auch in der mikroskopischen Analyse des Vesikelpools kein Anhalt auf eine thermische Fragmentierung des Donors.

# 3.5.3 Nachweis der Golgi/TGN-Herkunft der Cargo-Proteine im Vesikelpool

Es wurde schon in Abschnitt 3.4.4 darauf hingewiesen, dass eine wesentliche Voraussetzung für die Spezifität des Budding-Assays darin besteht, dass die mittels IP in den Vesikel detektierten maturen, vollglykosylierten Formen der Membranproteine, aus dem Golgiapparat/TGN und nicht endosomalen Obwohl Kompartimenten entstammen. zur Charakterisierung der Donormembranen schon eine Analyse des Glykosylierungsmusters in vivo vor Aufschluss der Zellen in Abschnitt 3.4.4 durchgeführt wurde, sollte auch noch die des Glykosylierungsmusters im in-vitro-Budding-Assav Analyse vorgenommen werden. Dazu wurden gemäß des Standardprotokolles Donormembranen für einen Budding-Assay präpariert und von diesem, also sowie Vesikelpool dem Ausgangsmaterial, vom nach erfolgter Knospungsreaktion eine Isolektrische Fokussierung (IEF) von hMPR46 und Tyrosinase angefertigt:



Abbildung 41: Analyse des Sialylierungsgrades im *in-vitro*-Budding-Assay: Dargestellt ist eine IEF der Tyrosinase (in a) und des hMPR46 (in b) aus den Donormembranen (Dm) und den Vesikeln. Die Zunahme des Sialylierungsgrades vom Ausgangsmaterial (Donormembranen) zu den Proteinen im Vesikelpool zeigt die Spezifität der nachgewiesenen Buddingreaktion für den Golgiexport und schließt eine thermische Fragmentierung de facto aus. Näheres siehe Text.

Abbildung 41 zeigt eindrucksvoll, dass sich in den Donormembranen hauptsächlich teilsialylierte Formen der Proteine finden (vgl. auch Abb. 35, S.

102), während im entsprechenden Vesikelpool ausschließlich vollsialylierte Formen der Proteine detektierbar sind. Folglich sind die Proteine vor dem Budding-Assay noch im Golgi/TGN akkumuliert, verlassen diesen dann als vollsialylierte Proteine während des Buddingprozesses in den Vesikelpool. Neben dem Spezifitätsnachweis des Buddings für den Golgi/TGN-Export gelingt durch diesen Versuch der abschließende Beweis, dass die Donormembranen tatsächlich fähig zur Sialylierung, damit funktionell sind, und nicht unspezifisch thermisch fragmentieren. Noch einmal soll darauf hingewiesen werden, dass eine signifikante Buddingreaktion anderer Kompartimente, also beispielsweise vom ER aus, nicht detektiert wird, da in einem solchen Fall auch teilsialylierte Formen der Proteine im Vesikelpool nachweisbar sein müssten. Auch endosomales Budding ist höchst unwahrscheinlich, da die radioaktiv-markierten Proteine mittels signifikantem Temperaturblock am Eintritt in das endosomale System gehindert wurden.

# 3.5.4 Das Budding ist abhängig von der Temperatur, von ATP/GTP und der Zytosolkonzentration

Nach der Dokumentation Assayspezifität, wurden der verschiedene Basisabhängigkeiten getestet, die ein funktionelles *in-vitro*-System charakterisieren. Essentiell war dabei der Nachweis, dass die Effizienz des Buddings neben der Temperatur auch von ATP/GTP und Zytosol abhängig sein sollte. Dazu waren Reihenuntersuchungen mit einem entsprechend hohen Bedarf an Zytosol nötig. Daher wurde aus Praktikabilitätsgründen zunächst die Verwendung von heterologem Zytosol getestet, da beispielsweise Schweinehirnzytosol im Gegensatz zum autologen melan-a-Zytosol (langsames Wachstum, geringe Dichte in der Zellkultur) sehr schnell in großen Mengen verfügbar ist. Außerdem basierte die Konzeption des Budding-Assays auf der Verwendung von adaptordefizienten Zytosolen von den Fibroblastenzelllinien mocha ( $\delta^{-}$ ) und EFA ( $\mu 1A^{-}$ ). Da für diese murinen Fibroblasten-Zelllinien als Positivkontrolle ebenfalls eine nicht-defiziente, murine Fibroblastenzelllinie benötigt wurde, musste nachgewiesen werden, dass heterologes *MEF*-Zytosol (wt<sup>+/+</sup>) ebenso gut funktioniert wie autologes *melan-a-*Zytosol. Ein entsprechendes Budding unter Verwendung verschiedener Zytosole ist in Abbildung 42 dargestellt:

Es wurden drei äquivalente Buddingansätze in einem ATP-regenerierenden System bei 37°C analysiert, die sich lediglich in der Art der verwendeten Zytosole unterschieden.



Abbildung 42: Vergleich heterologer und autologer Zytosole im Budding-Assay. Verwendung fand jeweils 2,7 mg Zytosol respektive Buddingpuffer mit 2,7 mg BSA in der Negativkontrolle (Spur 1). Die entsprechenden IPs gegen Tyrosinase aus den Vesikeln sind dargestellt. Eine Quantifizierung des Vesikelsignals ist dem unten angefügten Balkendiagramm zu entnehmen. Die blauen Balken stellen dabei die relativen (Leerwertbereinigt) Rohdaten dar, die lila Balken sind um

den Wert der Negativkontrolle in Spur 2 korrigiert.

Während die Proteinkonzentrationen der verwendeten *melan-a-*, *MEF-* und Schweinehirnnzytosol äquivalent waren, wurde diese Proteinkonzentration in einer mitlaufenden Negativkontrolle (37°C, ATP-entziehendes System) mit Buddingpuffer durch BSA supplementiert. Während alle drei Zytosole ein signifikantes Budding ermöglichen, lässt sich in der Negativkontrolle bei 37°C kein relevantes Membranprotein im Vesikelpool detektieren, was erneut gegen eine thermische Fragmentierung und für einen geordnet ablaufenden Prozess spricht. Interessanterweise kommt es bei der Verwendung von heterologen Zytosolen unter gleichen Versuchsbedingungen im Vergleich zum autologen *melan-a-*Zytosol zu einem stärkeren Signal im Vesikelpool. Dies ließe sich durch eine höhere, freie Konzentration an zytosolischen Buddingfaktoren im Schweinehirnzytosol respektive embryonalen Mausfibroblastenzytosol erklären.

möglicherweise potentere Form als Erklärung zu denken. Es bleibt festzuhalten, dass damit die Verwendung von heterologen Zytosolen, allen voran Schweinehirnzytosol, möglich ist.

Entsprechend wurde im Folgenden die Effizienz der Buddingreaktion sowohl in Abhängigkeit von verwendeter Temperatur, als auch von Goodies wie ATP/GTP, als auch von der Zytosolkonzentration analysiert. Die für diese Arbeit relevanten Basisabhängigkeiten sind dabei Abbildung 43 zu entnehmen:



Abbildung 43: Einfluss von Temperatur, ATP/GTP und Cytosol auf die Buddingeffizienz:

Das Balkendiagramm stellt in blau das relative Vesikelsignal in % des Gesamtsignals aus Donor- und Vesikelpool dar. Aus den leerwertbereinigten lila Balken wird deutlich, dass die Anwesenheit von ATP/GTP für ein signifikantes Budding essentiell ist (**Spur 4 und 5**). Eine alleinige Anwesenheit von dialysiertem Zytosol (**Spur 3**) führt zu keinem signifikanten Budding. Jedoch führt die gleichzeitige Verwendung von dialysiertem Zytosol und ATP/GTP zu einer drastisch gesteigerten Buddingeffizienz (**Spur 5**). **Spur 1 und 2** stellen Negativkontrollen dar.

Von den fünf verwendeten Ansätzen fungieren die ersten beiden als Negativkontrollen. Erwartungsgemäß ist bei einer Temperatur von 4°C ohne ATP/GTP und ohne Zytosol kein Budding in Form von relevanten Membranproteinen (hier Tyrosinase) detektierbar (**Spur 1**). Ebenso führt eine Erwärmung auf 37°C ohne ATP/GTP und ohne Zytosol zu keinem signifikanten Budding (**Spur 2**). Das dort detektierte Signal wurde als Leerwert von allen weiteren Ansätzen abgezogen. Wie schon zuvor erwähnt, ist also die thermische Fragmentation des Donors minimal. Durch die alleinige Zufuhr von ATP/GTP konnte ein signifikantes Budding gemessen werden, wenn auch nur bis zu 2% Tyrosinase im Vesikelpool nachweisbar ist (**Spur 4**). Dem gegenüber

führt die alleinige Zufuhr von dialysiertem Zytosol zu keinem über dem Leerwert liegenden Signal im Vesikelpool (**Spur 3**). Erst die Anwesenheit von Temperatur, ATP/GTP und Zytosol führt zu einem signifikanten Budding von über 15% (**Spur 5**). Exakt dieses Ergebniss spricht für einen ATP/GTP-, Zytosol- und Temperaturabhängigen Prozess.

Auf die Darstellung der Zeitabhängigkeit wurde hier verzichtet, zumal gute *invivo*-Daten vorliegen, die die Buddingzeit determinieren (vgl. Abb. 35, S. 102).

Als weitere zu untersuchende Basischarakteristik des Assays interessierte die Abhängigkeit der Buddingeffizienz von der Zytosolkonzentration. Dazu wurden bei sonst gleichen Inkubationsbedingungen Zytosolendmengen von 0 bis 5,4 mg Schweinehirnzytosol verwendet und die relevanten Membranproteine aus dem Vesikelpool immunpräzipitiert. Abb. 44 stellt die entsprechenden Ergebnisse für Tyrosinase mittels IP und quantifiziertem Signal, für Lamp-1 nur als quantifiziertes Signal dar.



Abbildung 44: Abhängigkeit der Buddingeffizienz von der Zytosolmenge. Dargestellt ist ein Budding mit einer Negativkontrolle (Spur 1) drei und verschiedenen Gesamtproteinmengen Zytosol. Es findet 0,9 mg (Spur 2), 2,7 mg (Spur 3) und 5,4 mg (Spur 4) Verwendung. Für Tyrosinase ist sowohl das in den Vesikeln detektierte IP Signal sowie die Quantifizierung des Signals dargestellt. Für Lamp-1 ist nur die Quantifizierung gezeigt. Es findet in beiden Fällen eine direkte, positive Korrelation zwischen Zytosolkonzentration und Buddingeffizienz statt.

Die vorliegende lineare, positive Korrelation zwischen Zytosolmenge und Buddingeffektivität zeigt, dass bei 5,4 mg Zytosol der Prozess noch in einem nicht gesättigten Bereich liegt. Dies entspricht im Übrigen einer Proteinkonzentration von 10,8 mg/ml, da ein Buddingansatz 0,5 ml Volumen enthält. Höhere Proteinkonzentrationen waren allerdings technisch nicht ohne größeren Aufwand zu gewinnen, so dass für weitere Versuche eine mittlere Zytosolmengen von 2,7 bis 5,4 mg verwendet wurde.

#### 3.5.5 ARF1-Abhängigkeit des Buddings

In mehreren Publikationen wurde bereits berichtet, dass die Membranassoziation von AP-3 durch Aktivität des kleinen G-Proteins ARF1 vermittelt wird (Hosaka et al. 1996; Ooi et al. 1998; Austin et al. 2002; Lefrancois et al. 2004). Demzufolge sollte es möglich sein, bei zusätzlicher Gabe von rekombinant hergestelltem, gereinigtem ARF1 die Buddingeffizienz zu erhöhen.

ARF1 wurde uns in seiner wildtyp-Form (= wt; 80% GTP beladen) und als dominant-negative Mutante (T71N) von der Arbeitsgruppe Gallwitz (MPI für Biophysikalsiche Chemie, Göttingen) dankenswerterweise zur Verfügung gestellt (Rein et al. 2002).

Das konzipierte Budding enthielt drei Ansätze mit gleicher Zytosolkonzentration und ATP-regenerierendem System. Während einer dieser Ansätze als Kontrolle fungierte wurde den jeweils anderen entweder ARF1-wt oder ARF1-DN (T31N) zugesetzt. Das entsprechende Resultat mit einer Negativkontrolle bei 37°C und ATP-entziehendem System ist der folgenden Abbildung 45 zu entnehmen:

	1	/ 2	3	4	/
Temperatur [°C]	37	37	37	37	
ATP/GTP	-	+	+	+	
Schweinehirnzytosol (1,35 mg)	-	+	+	+	
ARF1 T31N (DN)	-	-	+	-	
ARF1 wt (GTP beladen)	-	-	-	+	
Vesikel		al a	Jane 9	NOTE	
Vesikelsignal vom Gesamtsignal (in %)					-

Abbildung 45: Einfluss von ARF1 auf die Buddingeffizienz: Die Ansätze in Spur 2-4 besitzen gleiche Zytosolkonzentration und jeweils ein ATP-regenerierendes-System. Während Spur 2 als Kontrolle fungiert, ist in Spur 3 zusätzlich die wt-Form (80% GTPbeladen) des kleinen G-Proteins ARF1, in α TyrosinaseSpur 4 die dominant-negative Form ARF1-

T31N zugesetzt. Spur 1 diente dabei als Negativkontrolle. Beachtenswert ist, dass unter Suplementierung von ARF1-wt die Buddingeffizienz in Vergleich zu den Kontrollen in Spur 2 und 3 von 25% auf über 35% angehoben wird. Es zeigte sich, dass die Zugabe von ARF1-wt die Buddingeffizienz der Tyrosinase von 25% auf 35% gegenüber einem vergleichbaren Ansatz ohne ARF1 oder dessen dominat-negative Form anhebt. Neben der Tatsache, dass die Stimulierbarkeit durch ARF1 ein weiteres Indiz für die Funktionalität des Assays ist.

Ausgehend von diesen Daten wäre nun ein systematisches Austesten weiterer gereinigter Komponenten sinnvoll und naheliegend, z.B. mit gereinigten Adaptoren. Leider fehlen beispielsweise Adaptoren zur Zeit noch in nötiger Reinheit, so dass deren Funktion für die Vesikelbildung anhand defizienter Zytosole ausgetestet werden musste (vgl. Diskussion S. 116, Abschnitt 4.1.5).

#### 3.5.6 Verteilung der Adaptoren während eines Budding-Assays

Nachdem einerseits die Spezifität des Assays für den Golgi/TGN-Export gezeigt wurde und anderseits der Assay hinsichtlich Basisabhängigkeiten charakterisiert war, konnte die Analyse einer Adaptorabhängigkeit bei diesem spezifischen Sortierungsschritt beginnen.

Zunächst war interessant, inwieweit durch die Aufreinigung und dem anschließenden Waschschritt endogene Adaptoren von den Donormembranen entfernt werden können. Dies war insofern von Bedeutung, als das Adaptoren wie auch Clathrin, die nach Donoranreicherung rasch an TGN-Membranen assoziiert sind, potentielle Orte von Vesikelbildung sind. Um aber die Abhängigkeit der Vesikelbildung von verschiedenen Adaptoren durch zugesetztes Zytosol kontrollieren zu können, sollten die für das Budding verwendeten Membranen möglichst frei von endogenen Adaptoren sein. Um die Membranassoziation der Adaptoren zu bestimmen, wurde wie folgt vorgegangen: Es wurden Donormembranen gewonnen, ohne zuvor die Zellen metabolisch zu markieren und ohne sie einem Temperaturblock zu unterziehen. Im Anschluss wurde ein Budding-Assay mit "kalten", also nicht radioaktiv markierten Membranen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Eine Negativkontrolle wurde bei 4°C in einem ATP-regenerierenden System und Budding Puffer inkubiert. Es fanden die beiden adaptordefizienten Zytosole der Zelllinien *mocha* ( $\delta^{-}$ ) und *EFA47* ( $\mu$ 1*A*<sup>-/-</sup>) Verwendung sowie ein Ansatz mit *MEF*-Zytosol (wt<sup>+/+</sup>) als Positivkontrolle. Alle Proben wurden bei gleicher Zytosolkonzentration in einem ATP-regenerierenden System für 1h bei 37°C inkubiert. Die anschließende Detektion der Adaptoren AP-1 und AP-3 in Vesikeln und Donor sowie von den gewonnen "kalten" Donormembranen im Westernblot ist in Abbildung 46 dargestellt:



Abbildung 46: Verhalten der Adaptoren im Budding-Assay. Dargestellt ist ein nicht radioaktiver Budding-Assay. Die verwendeten Donormembranen (Spur 1) und die jeweiligen pelletierten Donor- und Vesikelpools wurden proteinnormiert aufgetragen (Spur 2-9). Dabei ist Spur 1 zu entnehmen, dass AP-1 (dargestellt durch  $\gamma$ - und  $\mu$ 1A Adaptin) schlechter von den Donormembranen zu entfernen ist als AP-3 (dargestellt durch δ-Adaptin und p47A/B). Auch durch Weiterinkubation bei 4°C kommt es zu keiner Dissoziation der membranadhärenten, endogenen Adaptoren (Spur 2) und auch zu keiner Vesikelbildung (Spur 6). Wird AP-1 und AP-3 durch hinzugefügen von wt<sup>+/+</sup>-Zytosol verfügbar, assoziieren sowohl AP-1 als auch AP-3 an die Membranen im Donorpool (Spur 3) und sind erstaunlicherweise auch noch an den gebildeten Vesikeln nachweisbar (Spur 7). Bei der Verwendung von  $\delta^{-/-}$  (mocha)-Zytosol assoziiert kein  $\delta$ -Adaptin an den Donormembranen, während AP-1 nachweisbar bleibt (**Spur 4**). Der marginale Nachweis von  $\delta$ -Adaptin im korrespondierenden Vesikelpool scheint von Vesikeln zu stammen, die durch endogene Adaptoren gebildet wurden (Spur 8). Beim Einsatz von µ1A<sup>-/-</sup> Zytosol findet sich zwar mehr endogenes  $\mu$ 1A an den Donormembranen (**Spur 1/2**), jedoch kommt es erwartungsgemäß zu keiner weiteren Assoziation von AP-1, während die anderen Adaptoren stark an Signalintesitiät zunehmen. Im korrespondierenden Vesikelsignal finden sich praktisch keine µ1A-Signale (Spur 9). Abschließend sei erwähnt, dass sich beim Einsatz von defizienten Zytosolen (Spur 4/5 und 8/9) die jeweils nicht depletierte Untereinheit des defizienten Adaptoren nachweisen lässt, also bei  $\mu$ 1A<sup>-/-</sup>-Zytosol  $\gamma$ -Adaptin und bem  $\delta^{-/-}$ -Zytosol p47A/B. Ob dies endogene, vom Donor stammende Adaptoren sind, oder Restkomplexe im defizienten Zytosol darstellen, wurde nicht untersucht.

Für die folgenden Experimente von Bedeutung war die Beobachtung, dass sich an den verwendeten Donormembranen sowohl geringe Mengen AP-3 als auch AP-1 nachweisen lassen (**Spur 1**), die auch durch Inkubation bei 4°C an den Donormembranen adhärend bleiben (**Spur 2**) und zu keiner Vesikelbildung führen (**Spur 6**). Es handelt sich hierbei um durch unser Waschverfahren nicht ablösbare, endogene Adaptoren. Es wurde zwar versucht durch Intensivierung des Waschprogrammes die verbleibenden endogenen Adaptoren zu entfernen, jedoch führte dies zu einem Funktionsverlust der Membranen und wurde daher nicht weiter verfolgt (Daten nicht gezeigt).

Bei Verwendung von wt<sup>+/+</sup>-Zytosol (*MEF*) im Budding assoziiert sowohl AP-1 als auch AP-3 an die Donormembranen (**Spur 3**) und ist erstaunlicherweise auch noch im Vesikelpool nachweisbar (**Spur 7**). Unter den verwendeten Pufferbedingungen wird offenbar ein "Uncoating" (vgl. Einleitung) verhindert. Damit ermöglicht diese Beobachtung durch Einsatz von Antikörpern gegen die Untereinheiten von Adaptoren eine Immunisolation von Vesikeln nach erfolgtem Budding und damit zukünfige Untersuchungen an homogenen Vesikelpopulationen (vgl. Abschnitt 4.1.6, S. 128).

Bei der Verwendung von  $\delta^{-/-}$ -Zytosol (*mocha*) kommt es erwartungsgemäß nur zur Assoziation von AP-1 (dargestellt durch µ1A-Adaptin und γ-Adaptin), AP-3 (dargestellt duch δ-Adaptin) kann nicht rekrutiert werden (**Spur 4**). Die endogenen AP-3 Moleküle auf den Donormembranen führen allerdings zu einem marginalen Budding, so dass im Vesikelpool in **Spur 8** ein im Vergleich zum wt<sup>+/+</sup>- oder µ1A<sup>-/-</sup>-Zytosol (**Spur 7 resp. 9**) stark abgeschwächtes Signal detekierbar bleibt. Für AP-1 findet sich ein dem wt<sup>+/+</sup>-Zytosol vergleichbares Signal (**vgl Spur. 7**) Entsprechendes findet sich bei Verwendung von µ1A<sup>-/-</sup>-Zytosol. Dort findet keine zusätzliche Rekrutierung von AP-1 (dargestellt durch µ1A) an die Membranen im Donorpool statt, jedoch von AP-3 (**Spur 7**). In den Vesikeln findet sich kein µ1A-Signal, während AP-3 in gleicher Signalintensität wie bei wt <sup>+/+</sup>-Zytosol detektiert werden kann (**Spur 9**).

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass unter Waschbedingungen, welche die Funktionalität der Golgi/TGN-Membranen nur gering beeinträchtigen, ein geringer aber signifikanter Anteil der endogenen Adaptoren an den Donormembranen verbleibt. Durch hinzufügen von Zytosol können aber Adaptoren aus dem Zytosol an die Donormembranen rekrutiert werden. Beim Einsatz von Zytosolen, die für einen Adaptor defizient sind, findet nur eine Rekrutierung des jeweiligen anderen statt.

Um das durch endogene Adaptoren vermittelte Hintergrundbudding als putative Störgröße in der folgenden Analyse mit adaptordefizienten Zytosolen zu quantifizieren wurden Donormembranen ohne Zytosol in einem ATPregenerierenden System bei 37°C mit den anderen Proben inkubiert und ebenso analysiert. Mittels Immunpräzipitation gemessene Signale (=Hintergrundbudding) in dieser Probe müssen von den gemessenen Signalen bei den anderen Proben abgezogen werden, da sie entweder unspezifisch oder von endogenen Adaptoren stammen.

#### 3.5.7 Das Budding ist adaptorabhängig

Zentrale Aufgabe dieser Arbeit war der Aufbau und die Charakterisierung des bis hierher vorgestellten Budding-Assays zur Analyse einer möglichen Adaptorabhängigkeit des Golgi-Exports von Membranproteinen, v.a. in Abhängigkeit vom AP-3-Komplex. Daher sind abschließend in Abb. 47 auf der nächsten Seite die Ergebnisse eines "kompletten" Budding-Assays dargestellt, bei dem nicht nur die  $\mu$ 1A<sup>-/-</sup>- und  $\delta^{-/-}$ -Zytosole verwendet wurden, sondern auch durch fünf aufeinanderfolgende Immunpräzipitationen (IPs) die Verteilung von fünf Membranproteinen analysiert wurden. Einfachheitshalber sind nur die IPs der Vesikelfraktionen für einen repräsantativen Versuch in Abbildung 47A und die quantifizierten Signale in Abb. 47B gezeigt:

Erwartungsgemäß ist in der **Negativkontrolle** (kein Zytosol bei 37°, **Spur 1**) kein oder nur beim hMPR46 geringste Mengen Membranprotein (<5% Buddingeffizienz) nachweisbar, während unter Verwendung von MEF-Zytosol (wt<sup>+/+</sup>) alle gestesteten Membranproteine (Lamp-1; Tyrosinase; TRP-1; TRP-2; hMPR46) im Vesikelpool nachweisbar waren (**Positivkontrolle, Spur 2**). Die Quantifizierung der Signale (Abb.37B) erbrachte eine Buddingeffizienz zwischen 28% (TRP-1) und 38% (Tyrosinase).

Besondere Beachtung verdient nun die Verwendung der defizienten Zytosole: Wird parallel zu den genannten Kontrollen ein Assay mit  $\mu$ 1A<sup>-/-</sup>-Zytosol inkubiert (**Spur 3**), so führt dies zu einer beträchtlichen Reduktion der Buddingeffizienz (vgl. Abb. 37B): Im Falle vom hMPR46 von 36% auf 5% und TRP-1 von 28% auf 4% und im geringen Maße von TRP-2, während die Signale von Lamp-1 und Tyrosinase unverändert bleiben.



**Abbildung 47 A) Analyse der Adaptorabhängigkeit:** Der Budding-Assay wurde mit Standardbedingungen durchgeführt. Unter Verwendung von wt<sup>+/+</sup>-Mauszytosol (MEF) ist eine effiziente Sortierung der Membranproteine Tyrosinase, Lamp-1, hMPR46, TRP-1 und TRP-2 in Vesikel nachweisbar (**Spur 2**). Wird demgegenüber  $\mu$ 1A<sup>-/-</sup>-Zytosol (*EFA*) verwendet, so ist eine auffällige Schwächung der Signale von hMPR46 und TRP-1 zu beobachten, während die Signale von Tyrosinase und Lamp-1 unverändert stark sind (**Spur 3**). Die Verwendung von  $\delta^{-/-}$ -Cytosol (*mocha*, **Spur 4**) führt dagegen zu einer Abschwächung der Signale von Tyrosinase und Lamp-1, während die Signale von TRP-1 und MPR46 stabil bleiben. In **Spur 1** ist die übliche Negativkontrolle bei 37°C mit ATP-entziehendem System und ohne Zytosol dargestellt (Hintergrundbudding). Als unabhängige Positivkontrolle für Budding, fungiert das Hinzufügen von gereinigten-AP1/AP2-Fraktionen (**Spur 5**, nur für TRP-1), die freundlicherweise von Ricotta et al. (2002) zur Verfügung gestellt wurden.

**B)** Effizienz des TGN-Budding in Abhängigkeit von Adaptor-defizientem Zytosol. Das Budding wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Dargestellt ist die quantifizierte Fraktion der Proteine, die aus dem Vesikelpool präzipitiert wurde im Vergleich zum Gesamtprotein (präzipitiert aus Donor u. Vesikeln). Alle Proteine sind bei der Verwendung von wt<sup>+/+</sup>-Zytosol mit einer Buddingeffizienz von 28% (TRP-1) bis zu 38% (Tyrosinase) im Vesikelpool detektierbar. Durch Verwendung von  $\mu 1A^{-/-}$ -Zytotsol reduziert sich signifikant die Buddingeffizienz von MPR46 und TRP-1 auf unter 6%, während Tyrosinase und Lamp-1 mit uneingeschränkter Buddingeffizienz detektierbar bleiben. Dagegen findet bei  $\delta^{-/-}$ -Zytosol ein Abfall der Buddingeffizienz von Tyrosinase und Lamp-1 auf unter 13%, während die Buddingeffizienz von MPR46 und TRP-1 nicht betroffen ist. Das Hintergrundbudding aus der Negativkontrolle (37°C ohne Zytosol in ATP-regenerierendem System) beträgt 5% und wurde noch nicht abgezogen. Für TRP-2 stand bedauerlicherweise nicht genügend Antikörper für 5 sequentielle Untersuchungen zur Verfügung, so dass es nicht quantifiziert wurde. Die Fehlerbalken repräsentieren die Varianz aus mindestens 5 Versuchen unter gleichen Bedingungen.

Eine Erklärung für diese Reduktion der Buddingeffizienz auf Hintergrundbuddingniveau von 5% ist, dass AP1A für die Inkorporation von MPR46 und TRP-1 in post-TGN Vesikel erforderlich ist. Dies umso mehr, da der beobachtete Effekt auf die genannten Proteine beschränkt und somit spezifisch ist. Das Budding von Lamp-1 und Tyrosinase bleibt dabei völlig unbeeinträchtigt.

Wird nun in einem anderen parallel durchgeführten Ansatz (**Spur 4**) das  $\delta^{-/-}$ Zytosol verwendet, ändert sich das Bild dahingehend, dass nun die Signalstärken von Lamp-1 und Tyrosinase deutlich reduziert sind (von 33% auf 13% für Lamp-1 und von 38% auf 9% für Tyrosinase), während die Signalstärke von TRP-1, MPR46 und TRP-2 der Kontrolle mit MEF-Zytosol entsprechen. Dies zeigt nun erneut die Spezifität des Effektes, den die Verwendung eines definierten Zytosols nach sich zieht. Zudem verdeutlicht es, dass die getesteten Adaptoren AP-1A und AP-3 für die TGN-Sortierung unterschiedlicher Proteine von Bedeutung sind.

Meine Ergebnisse zeigen, dass Lamp-1 und Tyrosinase am TGN in Abhängigkeit von AP-3 in post-TGN-Vesikel sortiert werden, während für eine entsprechende Sortierung von TRP-1 und MPR46 der AP-1A-Komplex von Bedeutung ist. Der Effekt auf TRP-2 hingegen war in allen Experimenten marginal, was nahe legt, dass andere Faktoren eine AP-1A/AP-3-



entsprechende Funktion besitzen können. Letztendlich sind die hier gezeigten Ergebnisse ein starkes Indiz dafür, dass AP-1A und AP-3 unabhängig voneinander an der Inkorporation von Membranproteinen in distinkte Typen von post-TGN-Vesikeln beteiligt sind (vgl. Abb. 48).

**Abbildung 48: Schematische Verdeutlichung:** Prinzipiell werden verschiedene Vesikelpopulationen am Golgi/TGN gebildet, hier rote und gelbe. Im Assay werden nur die Vesikel mit den in ihnen enthaltenen Membranproteinen nicht gebildet, welche einen spezifischen Faktor benötigen. Fehlt also beispielsweise der gelbe Adaptorkomplex, können die durch diesen AP sortierten Membranproteine nicht in entsprechende Vesikel verpackt werden. Damit sind diese nicht im Vesikelpool detektierbar. Oder anders herum: der Faktor ist essentiell für die Sortierung des Membranproteins.

# 4 Diskussion

### 4.1 Budding-Assay

#### 4.1.1 Aufbau eines Golgi/TGN-Budding-Assays

Eine direkte Analyse von Sortierungsvorgängen am TGN ist experimentell schwierig. Entsprechende Ansätze beziehen sich entweder auf Vorgänge der Exozytose, wo der Transport viraler Proteine zur PM beleuchtet wird (Storrie & Kreis 1996; Simon et al. 1996; Mayer et al. 1996), oder gerade in letzter Zeit auf die Analyse der Sortierung am TGN mittels "life-cell-imaging", bei der GFP-markierte ("getaggte") Proteine in lebenden Zellen videomikroskopisch verfolgt werden (Girotti & Banting 1996; Hirschberg et al. 1998; Waguri et al. 2003). Damit sind zwar qualitative Aussagen zum generellen Sortierungsgeschehen möglich, auf der anderen Seite bleiben quantitative Aussagen oder eine subtile molekulare Aufschlüsselung der Protein- und Lipidzusammensetzung von am TGN gebildeten Transportvesikeln unmöglich.

Um **direkte** Funktionsnachweise von möglichen Sortierungsfaktoren am TGN analysieren zu können, sollte ein *in-vitro*-Assay für die Transportvesikelbildung vom TGN etabliert werden.

#### 4.1.2 Gewinnung von Donormembranen aus melan-a-Zellen

Für einen TGN-Budding-Assay ist es erforderlich, die entsprechenden Donormembranen zu gewinnen, was üblicherweise aus Rattenleber erfolgt (Hino et al. 1978; Andersson et al. 1978; Hofmeister et al. 1998), während nur wenige Verfahren zur Gewinnung von TGN-Membranen aus Gewebekulturzellen publiziert sind (Karlsson & Carlsson 1998). Letzteres war aber Ziel dieser Arbeit, da nur so die Analyse von Sortierungsvorgängen in spezialisierten Zelllinien möglich wird. Außerdem besteht nur im Zellkultursystem die Möglichkeit besonders interessierende Proteine in die entsprechende Zelllinie zu transfizieren, um im Anschluss deren Sortierung in einem *in-vitro*-Budding-Assay zu analysieren. Entsprechend diesen Vorgaben wurde ein Verfahren zur Gewinnung von Donormembranen aus *melan-a*-Zellen etabliert.

Diese Zellen wurden gewählt, da sie unter physiologischen Bedingungen neben dem im Mittelpunkt unserer Arbeit stehenden Adaptorkomplex AP-3 auch Tyrosinase als Schlüsselenzym der Melaninsynthese in hohen Mengen konstitutiv exprimieren. Tyrosinase bindet in vitro über ein Dileucin-Motiv an AP-3 und bot sich somit als potentiell über AP-3 sortiertes Membranprotein neben anderen lysosomalen Membranproteinen an (Höning et al. 1998, Mühlhausen 2000). Diese Annahme wurde einerseits dadurch gestützt, dass die Zelllinien mocha und pearl mit "loss-of-function" Mutationen in jeweils einer der beiden großen Untereinheiten des AP-3-Komplexes eine deutlich gestörte Melaninsynthese aufweisen (vgl. Einleitung). Zum anderen konnte in der eigenen Arbeitsgruppe mittels Immunogoldmarkierung eine Kolokalisation von Tyrosinase und AP-3 an Endosomen und am TGN nachgewiesen werden. Da bereits Faundez et al. (1998) für AP-3 eine Beteiligung an der Sortierung an Endosomen zuweisen konnten, sollte nun in einem *in-vitro*-Golgi/TGN-Budding Assay die bisherige Hypothese einer putativen Sortierung von Tyrosinase am TGN durch AP-3 direkt überprüft werden.

#### 4.1.3 Charakterisierung der Donormembranen

Die für den Golgi/TGN-Budding-Assay aufgereinigten Membranen aus *melan-a-*Zellen sind nicht hoch rein. Sie enthalten Kontaminanten des endoplasmatischen Retikulums, der Plasmamembran sowie endosomale Membranen (vgl. Abschnitt 3.4.3, S. 97). Dennoch konnte durch Analyse des Glykosylierungsmusters verschiedener Markerproteine durch *pulse-chase-* Experimente mit anschließendem Endo-H-Verdau und IEF die Suffizienz des verwendeten Temperaturblocks in vitro und in vivo gezeigt werden (vgl. Abschnitt 3.4.4, S. 99). Der Nachweis der Akkumulation von Membranproteinen gelang am Beispiel von TRP-1 auch mittels Immundetektion in der Elektronenmikroskopie (vgl. Abschnitt 3.4.5, S. 103). Folglich akkumulieren den Versuchsbedingungen die mittels pulse/chase unter metabolisch markierten Membranproteine im Golgi, werden in der einstündigen Budding-Phase in Vesikel verpackt, die sich anschließend von den Donormembranen trennen lassen (vgl. Abschnitt 3.5.1, S. 106). Durch Analyse der radioaktiven Proteine im Vesikelpool kann der TGN-Export analysiert werden. Andere mögliche Vesikelbildungen, wie Budding von Endosomen oder vom ER können den Assay kaum beeinflussen, da durch die gewählten Bedingungen eine selektive Analyse nur der metabolisch markierten, radioaktiven Proteine erfolgt. Aus diesem Grund mag zwar eine Vesikelbildung an anderen Kompartimenten stattfinden, wird jedoch in diesem Assay nicht detektiert. Weitere Evidenz für die TGN-Spezifität ist die vollständige Sialylierung der im Vesikelpool befindlichen Membranproteine (vgl. Abschnitt 3.5.3, S. 111). Die Sialylierung ist die terminale posttranslationale Modifikation, welche im TGN erfolgt. Somit ist es extrem unwahrscheinlich, dass die im Vesikelpool befindlichen Proteine aus einem ER-Budding oder aber früheren Golgibereichen stammen. Demzufolge wird durch die im Vesikelpool detektierten Proteine die TGN-Vesikelbildung nachgewiesen.

Nach biochemischer Charakterisierung der Donormembranen erfolgte die Dokumentation der Morphologie mittels Negativkontrastierung in der Elektronenmikroskopie. Die in Abschnitt 3.5.2 (S. 108) dargestellten Donormembranen ähneln den in der Literatur gezeigten Bildern von Präparationen für einen Budding-Assay (Taguchi et al. 2003; Simon et al. 1996) und zeigen an den leicht ballonierten, retikulären Strukturen 80-100 nm messende Ausbuchtungen ("buds"), die präformierte Vesikel darstellen.

#### 4.1.4 Befunde aus dem Golgi/TGN-Budding-Assay

Die Ergebnisse zum TGN-Budding belegen, dass es sich um einen Temperatur-, Energie- und Zytosol-abhängigen Prozess handelt (vgl. Abschnitt 3.5.4 u. 3.5.5, S. 112 - 117). Diese entscheidenden Eigenschaften finden sich als Bestandteile in allen beschriebenen *in-vitro*-Systemen. Die essentielle Anwesenheit von GTP neben ATP und die Stimulierbarkeit durch ARF1 legen den Schluss nahe, dass bei dem Prozess kleine G-Proteine beteiligt sind und ist damit in Konsenz zum aktuell diskutierten Modell der Vesikelbildung am TGN (vgl. Abschnitt 4.2, S. 130).

Wichtig war die Beobachtung, etablierten dass sich unter den Versuchsbedingungen über 90% der Aktivität des TGN-Markers Galactosyltransferase in den Donormembranen finden. Neben der vollständigen Sialylierung der Membranproteine im Vesikelpool ist dies der Nachweis eines Proteintransportes intakten durch den TGN unter den gewählten Versuchsbedingungen, so dass eine theoretisch mögliche thermische Fragmentierung der Donormembranen keine entscheidende Rolle spielt (vgl. Abschnitt 3.5.1 u. 3.5.2, S. 106-110). Um diese Möglichkeit in jedem Experiment auszuschließen, wurde jeweils ein Budding-Ansatz ohne Zytosol und ATP/GTP bei 37°C als entsprechende Negativkontrolle analysiert.

Da verschiedene heterologe Zytosole im Budding ebenso potent wie das homologe *melan-a*-Zytosol sind, lassen sich also spezifische Unterschiede in der Buddingeffizienz auf die im Zytosol enthaltenen oder depletierten Faktoren zurückführen, sind aber unabhängig von der Herkunft der Zytosole.

Anhand des etablierten Assays konnte somit in der Tat direkt gezeigt werden, dass die Adaptorkomplexe AP-1A und AP-3 an der Vesikelbildung am TGN partizipieren: Die Membranproteine hMPR46 und TRP-1 benötigen für die Sortierung AP-1A, während Lamp-1 und Tyrosinase AP-3 erfordern. Die Abwesenheit eines Adaptors führt zu einer spezifischen Reduzierung der jeweiligen detektierten Proteine im Vesikelpool. Dabei lassen sich nur die durch den Adaptor sortierten Proteine nicht mehr im Vesikelpool nachweisen, während die Buddingeffizienz anderer, nicht durch den Adaptor sortierter Proteine unbeeinflusst bleibt, was noch einmal die Spezifität des Prozesses unterstreicht (vgl. Abschnitt 3.5.7, S. 120).

Die interessante Beobachtung, dass die Sortierung von TRP-2 weder in Abhängigkeit von AP-1A noch von AP-3 erfolgt, deuten auf einen von AP-1A und AP-3 unabhängigen Sortierungsfaktor hin. Die theoretische Überlegung, dass TRP-2 als melanosomales Membranprotein nicht aktiv am TGN sortiert und statt dessen mittels bulk flow ("Massenfluss") zu späteren Stationen der intrazellulären Sortierung weitersortiert würde, ist zwar nicht auszuschließen, aber eher unwahrscheinlich.

Daneben konnte die zuvor beschriebene essentielle Präsenz von ARF1 für die AP-3 abhängige Vesikelformation verifiziert werden (Hosaka et al. 1996; Ooi et al. 1998; Austin et al. 2002; Lefrancois et al. 2004).

Neben dieser umfassenden biochemischen Analyse des Assays konnte auch die elektronenmikroskopische Darstellung der Vesikel erbracht werden. Im Vesikelpool ließen sich passend zu dem im Donor befindelichen 80-100 nm messenden "buds" auch 80-100 nm messende Vesikel darstellen. Diese entsprechen mit ihrem Diameter somit den in der Literatur beschriebenen Durchmessern von Transportvesikeln (Alberts et al. 2002, S. 716). Außerdem findet sich im Vesikelpool kein fragmentierter Donor, so dass auch morphologisch eine Fragmentation des Donors ausgeschlossen wurde.

#### 4.1.5 Kritische Anmerkungen

Während die Versuchsbedingungen im Hinblick auf die Akkumulation der Membranproteine in den Donormembranen gut dokumentiert sind, ebenso wie die Reifung der Proteine, die sich im Vesikelpool befinden, steht eine elektronenmikroskopische Detailanalyse der Vesikelpopulationen noch aus. Neben den umfassenden biochemischen Charakterisierungen des Assays bleibt es ein wichtiges Ziel, neben der Morphologie der Donormembranen auch die Homo- oder Heterogenität der am TGN gebildeten Vesikel mittels Elektronenmikroskopie direkt zu zeigen. Mit der durchgeführten Technik (Negativkontrastierung) konnte lediglich der Nachweis von Vesikeln, jedoch verfahrensinhärent keine Detailanalyse der Vesikelpopulationen vorgenommen werden. Dazu wird es nötig werden, die Vesikel schonend anzukonzentrieren und mittels anderer Einbettverfahren und anschließenden Immunmarkierungen vorzunehmen, um z.B. Cargoproteine wie Lamp-1 oder MPR46 nachzuweisen. Dies war leider im Zeitraum dieser Arbeit nicht mehr möglich. Die notwendigen Versuche dazu werden derzeit in der AG vorgenommen.

Der Budding-Assay wurde unter Verwendung von Zytosol durchgeführt, welches für die Vesikelbildung zwingend notwendig ist. Nun wäre es naheliegend gewesen, die bedeutsamsten Ergebnisse, also die Abhängigkeit von AP-1A, AP-3 oder ARF1 anhand der isolierten Einzelkomponenten zu untersuchen. So sollte bei einer Inkubation von Donormembranen mit isoliertem AP-3 und ARF1 neben Lamp-1 auch Tyrosinase im Vesikelpool nachzuweisen sein, nicht aber TRP-1 oder MPR46. Diese Versuche sind deshalb nicht durchgeführt worden, weil anders als ARF1 weder AP-1A noch AP-3 in nötiger Reinheit derzeit zur Verfügung stehen. Erst unsere derzeitige Kooperation mit D. Owen in Cambridge wird es uns in absehbarer Zeit erlauben, rekombinate Adaptorkomplexe für Budding-Assays einzusetzen. Erste Versuche mit angereichertem AP-1/AP-2 Pool, was uns freundlicherweise von Ricotta et al. (2002) zur Verfügung gestellt wurde, sind sehr vielversprechend: So ließ sich beispielsweise TRP-1-Budding lediglich hinzufügen durch von AP-1/AP-2 Pool ohne die Präsenz von Zytosol nachweisen (vgl. Abb 47, S. 121).

#### 4.1.6 Weitere Bedeutung des Assays und Ausblick

Allen voran wird in naher Zukunft die biochemische und elektronenmikroskopische Analyse der Membrankomposition von am TGN gebildeten Vesikeln stehen. Durch Antikörper gegen die zytoplasmatischen Domänen von Membranproteinen, wie beispielsweise dem hier hergestellten anti-Tyrosinase-Serum oder sogar den adhärend bleibenden Adaptoren (vgl. Abschnitt 3.5.6, S. 117), lassen sich mittels Immunisolation homogene Vesikelpopulationen isolieren, die für Proteomics und Lipidanalyse zur Verfügung stehen. Unter Verwendung verschiedener Antikörper wird eine vergleichende Analyse differenter, heterogener Vesikelpopulationen möglich. Damit sind nicht nur neue regulierende Proteine identifizierbar (so ist z.B. eine Uncoating-ATPase für aus Golgi gebildete CCV unbekannt), sondern es könnte in einem anzuschließenden Projekt auch die "raft"-Hypothese überprüft werden. Letztere postuliert, dass in Membranen, für diese spezifische Membranlipid-Mikrodomänen existieren, die u.a. als Andockplattform für einzelne Komponenten der Sortierungsmaschinerie dienen könnten (Füllekrug & Simons 2004; Simons & Ikonen 1997). Voraussetzung ist allerdings, dass genügend Vesikelmembranen in entsprechender Reinheit vorliegen.

Daneben lässt sich mit dem existierenden Budding-Assay der Einfluss prinzipiell jedes zytosolischen Proteins auf die Sortierung am TGN untersuchen. Gerade durch Verwendung von Zelllinien, die für die einzelnen GGAs-defizient wären, könnte eine direkte Analyse von GGAs am TGN untersucht werden. Durch den Einsatz von Doppelmutanten, die für die einzelnen GGAs und Adaptoren defizient wären, könnte der Anteil eines jeden Sortierfaktors allein und in Kombination für ein konkretes Transportgeschehen direkt quantifiziert werden. Neben der Funktionsanalyse anderer TGN-assoziierter Adaptoren, wie AP-4 stellt auch der Einfluss regulierender Proteine, wie weiterer kleiner G-Proteine, eine spannende und wichtige Fragestellung dar.

Selbstverständlich ist der in *melan-a*-Zellen aufgebaute Assay übertragbar auf andere Zelllinien. Die denkbaren Einsatzmöglichkeiten sind recht weit fassbar und umfassen neben der Adaptation des Assays auf Sphingolipid-defiziente-Zellen, die eine alterierte Tyrosinasereifung aufweisen (Sprong et al. 2001), auch die Adaptation auf völlig anders gelagerte Fragestellungen, wie beispielsweise den polarisierten Transport in Epithelien, die Analyse von Antigenprozessing in dendritischen Zellen oder die Analyse von viralem Export in CD<sub>4</sub>-Helferlymphozyten.

# 4.2 Einzelheiten bei der Bildung von Clathrin-beschichteten Vesikeln (CCV)

Von der Vielzahl an Vesikeln, die am TGN gebildet werden, konzentriert sich dieser Abschnitt auf die Bildung von Clathrin-beschichteten Vesikeln (CCV). Die Bildung von CCV bedarf einer großen Anzahl von Einzelvorgängen, die zeitlich und örtlich exakt abgestimmt ablaufen müssen. Die wesentlichen Komponenten, die an dieser geordneten Vesikelbildung teilhaben, werden in Tabelle 8 subsumiert, bevor die Aufgaben der einzelnen Komponenten sukzessive diskutiert werden sollen:

Klasse	Protein	Funktion		
Lipide/lipids rafts	Ptd Ins 4,5P <sub>2</sub> ;	Spezifische Mikrodomänen als Andockplattformen		
	Ptd Ins 4P			
ARF-GEPs /GAPs	BIG2	Start des Andockens von ARF, Membranspezifität		
ARF	ARF1	Initialer Faktor der Vesikelbildung		
Signale in	MPRs, Lamp-1,	Cargo		
Membranproteinen	Limp II, TRP-1,			
	Tyrosinase, etc			
Adaptorproteine	GGA1-3	Cargoakkumulation		
	AP1A/B; AP3; AP-4	Ausbildung von coated buds und coated vesicles		
Hüllproteine	Clathrin, COP1	Ausbildung der Hülle		
Akzessorische	Enthoprotin/Ent5	Ausbildung der Krümmung der Membran		
Proteine	Dynamin	Abknospen des Vesikels		
	Uncoating ATPasen	Abstreifen des Coats		
	Rabs/Rabeffectoren	Teathering ("Andocken") und Zielspezifität		
	SNARES	Fusion mit Zielmembran		
	u.v.a.m.			

**Tabelle 8: Essentielle Komponenten für die Vesikelbildung.** Neben spezifischen Membrankomponenten (ARF-GEPs/GAPs und Lipiden) werden als zytoplasmatische Faktoren v.a. ARF1, GGAs, Adaptorproteine und Hüllproteine benötigt um die Membranproteine in Vesikel zu verpacken. Einige akzessorische Proteine finden sich in der Membran, wie die zur Vesikelfusion benötigten SNARES, andere werden aus dem Zytosol rekrutiert, wie die für das "Andocken" nötigen rabs, die für das Abstreifen der Hülle nötige Uncoating-ATPase oder das zur Ausbildung des CCP nötige Enthoprotin/Ent5.

#### 4.2.1 Die Interaktion von Tyrosin-haltigen Motiven mit AP-2

In den letzten Jahren konnte die Interaktion von Adaptorproteinen und Membranproteinen mit tyrosinhaltigen Sortierungsmotiven bis auf Kristallstrukturebene für AP-2 aufgeklärt werden: Initial konnte bei der Aufklärung der Kristallstruktur der µ2-Untereinheit durch die Arbeitsgruppe Owen et al. (1998) gezeigt werden, dass die Bindung des Tyrosinsignals durch eine Tasche in der µ2-Untereinheit erfolgt. In einer neueren Arbeit der gleichen Gruppe, die den gesamten "Kern" von AP-2 mit allen Untereinheiten auf Kristallstrukturebene aufklärt, ist der Zugang zu dieser Tasche jedoch durch Teile der 
<sup>β2-Untereinheit</sup> blockiert (Collins et al. 2002). In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass zwei Kinasen gefunden wurden, die Adaptorproteine phosphorylieren können, die Adaptor-assoziierte-Kinase (AAK, Conner & Schmid 2002) und G-Protein-assoziierte-Kinase (GAK, Umeda et al. 2000). Weitere Arbeiten konnten zeigen, dass durch die AAK-vermittelte Phosphorylierung der μ2-Untereinheit die Affinität von AP-2 zu Endozytosesignalen erhöht wird und für die "clathrin-coated pit"-Formation essentiell ist (Fingerhut et al. 2001; Ricotta et al. 2002; Conner & Schmid 2002; Olusanya et al. 2001). Aufbauend auf die Arbeit beruht ein Modell, dass die "blockierte" Tasche der µ2-Untereinheit durch eine Konformationsänderung der µ2-Untereinheit aufgehoben wird, welche wiederum durch Phosphorylierung der µ-Untereinheit ausgelöst wird (Collins et al. 2002). Neben der µ2- Untereinheit ist auch µ1A phosphorylierbar, so dass auch für AP-1A ein ähnlicher Mechanismus vorstellbar ist (Manuskript aus eigener Arbeitsgruppe in Vorbereitung).

### 4.2.2 Die Rolle der GGAs und von AP-1A

Lange wurden die heterotetrameren Adaptorproteine AP-1, AP-3 und AP-4 am TGN als die alleinigen Hauptakteure ("key player") für die geordnete Vesikelformation gesehen. Die Beteiligung der nicht strukturverwandten, monomeren Proteine an der Selektion von Membranproteinen und der Ausbildung von der Vesikelhülle ("Coat") wurde durch die Entdeckung der GGA-Proteine eingeleitet. (Golgi-localized,  $\gamma$ -ear-containing, Arf-binding family of proteins, vgl. Abb. 48; Boman et al. 2000; Dell'Angelica et al. 2000b; Hirst et al. 2000 und Possu et al. 2000) Sukzessive wurden weiterere monomere, adaptorähnliche Proteine entdeckt, wie z.B. Enthoprotin/EpsinR am TGN (Wasiak et al. 2002; Hirst et al. 2003; Mills et al. 2002; Kalthoff et al. 2002), so dass heute davon ausgegangen werden muss, dass neben den heterotetrameren Adaptoren AP-1, AP-3 und AP-4 die monomeren Adaptoren zumindest eine Beteiligung an der Sortierung am TGN besitzen, wenn nicht sogar ebenfalls entscheidende Komponenten darstellen.



#### Abb. 49: Strukturbeziehung von GGA1 und y1-Adaptin

Die Struktur von GGA1 ist repräsentativ für die anderer GGAs,  $\gamma$ 1-Adaptin stellt eine Untereinheit des heterotetrameren AP-1 ( $\sigma$ 1-  $\mu$ 1-  $\gamma$ 1- $\beta$ 1) dar. Jeweils rechts findet sich die Anzahl der AS. Die Sequenzen (dargestellt im Einbuchstabencode) oder Proteine, die an jeder Domäne binden, sind durch Pfeile dargestellt. Die VHS-Domäne bindet die DXXLL Sequenz, ähnlich der Sequenz in der GGA1-"hinge" Region, die im phosphorylierten Zustand für die Autoinhibition zuständig ist. An die GAT-Domäne können neben ARF1 ein noch nicht näher charakterisiertes Protein binden. Die Clathrin-Box-Motive in der "hinge" Region beider Proteine vermittelt die Bindung an Clathrin. Die GAE( $\gamma$ -adaptin ear)-Domäne bindet DFGX $\Phi$ -Sequenzen. Über die "tunk" Domäne von  $\gamma$ -Adaptin binden die anderen Untereinheiten von AP-1. Modifiziert nach Bonifacino 2004.

Während die Bedeutung des AP-1A-Komplexes zunächst allein in der molekularen Sortierung von MPRs und in der Ausbildung des Clathrincoats bei Vesikelbildung am TGN gesehen wurde (Le Borgne et al. 1993; Le Borgne et al. 1996; Glickman et al. 1995), konnten mit den GGAs weitere MPR46- und Clathrin-bindende Adaptoren identifiziert werden. Bis heute wird kontrovers diskutiert, ob GGAs allein für eine Sortierung von MPR46 in CCV ausreichen,

oder ob dazu zusätzlich AP-1A benötigt wird (Bonifacino 2004). Richtungsweisend für ein Zusammenwirken von GGAs und AP-1A bei der Sortierung von MPRs am TGN ist die Arbeit von Doray et al. (2002). Dort wird postuliert, dass GGAs am trans-Golgi MPRs binden, diese zu AP-1A präformierten Buds am TGN transportieren und sie dort an AP-1A übertragen werden. Diese Überlegungen basieren darauf, dass sich mutierte MPRs, die an AP-1A binden können, jedoch nicht an GGAs, nur sehr spärlich in AP-1Acoated-buds nachweisen lassen. Neuere Daten gehen sogar davon aus, dass nicht nur GGA1, sondern sehr wahrscheinlich alle GGAs gemeinsam an der MPR-Sortierung beteiligt sind (Ghosh & Kornfeld 2003). Daneben konnte die gleiche Arbeit auch zeigen, dass GGAs die TGN-Morphologie stabilisieren. Während das bisher gesagte eine Interaktion von GGAs mit DXXLL-Motiven in den zytoplasmatischen Domänen ("tails") von MPRs beschreibt, legen neueste Daten nahe, dass auch mono-ubigutinierte Proteine am TGN und Endosomen von GGAs gebunden werden und dann in Richtung Endosom sortiert werden (Puertollano & Bonifacino 2004; Scott et al. 2004; Bache et al. 2004). Somit könnten GGA auch als Sortierfaktor für mono-ubiquitinierte Proteine am TGN fungieren. Zur Erinnerung sei erwähnt, dass im Weiteren Verlauf monoubiquitinierte Proteine, die vom Golgi oder von der PM stammen in das Lumen von Endosomen invaginiert werden, die dann als Mulit-Vesicular-Bodys (MVB) bezeichnet werden. Die Aufgabe der Invagination übernehmen dabei die ESCRT I-III-Komplexe. (Katzmann et al. 2001; Babst et al. 2002; Teo et al. 2004). Interessanterweise sind auch gerade diese ESCRT-Komplexe am

Verlassen von Viren (z.B. HIV) aus der Zelle beteiligt.

Unabhängig davon konnten wir in dieser Arbeit jedoch zweifelsfrei zeigen, dass AP-1A eine Schlüsselfunktion in der Sortierung des MPR46 am TGN besitzt. Da es in unseren Experimenten zu keinem Nachweis von MPR46 im Vesikelpool bei Verwendung von µ1A-defizientem Zytosol kommt, ist von einem obligaten sequentiellen Synergismus von GGA1 und AP-1A auszugehen. Die Abhängigkeit von AP-1A für den Vorwärtstransport des MPR46 vom TGN ist somit von verschiedenen Gruppen mit unterschiedlichen Methoden belegt und

ist beste Evidenz für Funktionalität und Signifikanz der mit unserem Assay untersuchten Abhängigkeiten.

Daneben finden sich in der Literatur immer wieder Evidenzen, dass AP-1A nicht nur den Vorwärtstransport von MPRs vermittelt, sondern auch eine Beteiligung am Rückwärtstransport hat (vgl. Einleitung; Meyer et al. 2000). Da auch für den Rücktransport der MPRs neben AP-1A mittlerweile anderere monomere Adaptoren Teilfunktionen zugeschrieben werden, soll an dieser Stelle lediglich auf die entsprechende Literatur verwiesen werden (Diaz & Pfeffer 1998; Arighi et al. 2004; Seaman 2004).

In unserer AG wurde gezeigt, das TRP-1 *in vitro* an TRP-1 bindet (Mühlhausen 2000), so dass eine Sortierung von TRP-1 durch AP-1A vermutet werden konnte. Unabhängig davon gibt es indirekte Studien mittels indirekter Immunfluoreszenz von Huizing et al. (2001), die nahelegen, dass die Sortierung von TRP-1 AP-1A-abhängig ist. Neben dem direkten Nachweis konnten wir in dieser Arbeit den Ort der Fehlsortierung auf den TGN lokalisieren. Eine Beteiligung der GGAs für den Transport von TRP-1 ist aufgrund seines zytoplasmatichen Sortierungssignals (EANQPLL - 5) nicht einfach zu postulieren und bedarf daher der experimentellen Überprüfung. Im zytoplasmatischen Anteil von TRP-1 finden sich zudem noch Tyrosinreste, deren Funktion als Sortierungsignal nicht ausgeschlossen werden kann.

#### 4.2.3 Die Bildung eines MPR-beladenen CCV am TGN

Die molekularen Vorstellungen der Vesikelbildung am TGN sind bisher für MPR-beladene und AP-1/GGA1 vermittelte CCV am besten untersucht und sollen deshalb hier abschließend zur Veranschaulichung dargestellt werden (vgl. dazu auch Bonifacino 2004):

Initialer Faktor der Vesikelbildung ist der Austausch von GDP zu GTP im kleinen G-Protein ARF1 durch das in der Zielmembran befindliche GEF (Guanine nucleotid exchange factor). Die Spezifität aller Sortierungsschritte ist durch die große Diversität von GEFs und GAPs (GTPase-activating proteins) und verschiedenen ARFs bedingt (Donaldson & Jackson 2000). Durch den GDP/GTP-Austausch kommt es einerseits zu einer Freilegung der myristorylierten N-terminalen α-Helix von ARF1, welche GTP-ARF1 an die nahe gelegene trans-Golgi/TGN-Membran integrieren lässt. Andererseits werden die switch-1- und switch-2-Regionen von ARF1 als Bindungsstellen für ARF Effektoren freigelegt (Donaldson & Jackson 2000), über welche die GAT-Domäne von GGA1 bindet. Die Spezifität für den trans-Golgi/TGN wird dabei wahrscheinlich durch spezifische Phosphoinositide (v.a. PIP 4) oder durch spezifische ARF-GEFs oder ARF-GAPs reguliert, was wichtig ist, da ARF1 auch am cis-Golgi zu finden ist. Dabei mehren sich die Hinweise, dass Lipidmikrodomänen als Regulatorstrukturen dienen, was Gegenstand der sog. "raft"-Hypothese ist (Füllekrug & Simons 2004; Simons & Ikonen 1997).

Die Bindung der GAT-Domäne von GGA1 an ARF1 bringt die VHS-Domäne von GGA1 in nächste Nachbarschaft zur trans-Golgi/TGN-Membran, so dass diese dann mit den acidic-cluster Dileucin-Motiven (DXXLL) im zytoplasmatischen Tail von Mannose-6-phosphat-Rezeptoren interagiert. Durch diese Interaktion kommt es zunächst zu einer Dephosphorylierung in der VHS-Domäne von GGA1 und damit Aufhebung des zytosolischen, autoinhibierten Zustandes von GGA1, sehr wahrscheinlich durch ein Protein-Phosphatase PP2A-ähnliches Enzym. Zeitgleich findet eine Phosphorylierung eines kritischen Serinrestes des zytosolischen "tails" der Membranproteine statt, was die Bindungsaffinität dieser zur VHS-Domäne der GGAs erhöht. Bevor es aber zu einer festen Bindung kommt, muss noch die Bindung der GAT-Domäne an ARF1 aufgehoben werden.

Nach diesem Modell (Dorray et al. 2002; Gosh & Kornfeld 2003) bindet GGA1 also die zu transportierenden Membranproteine am trans-Golgi und überträgt sie durch eine Interaktion zwischen hinge-Region der GGAs und der ear-Domain des AP1A Komplexes an Letzteren (Bai et al. 2004). Die mit dem AP-1A Komplex assoziierte Casein Kinase II phosphoryliert dann GGA1 und GGA3 und überführt damit die GGAs in ihren zytosolischen, autoinhibierten Zustand (Doray et al. 2002).


Abbildung 50: Modell der molekularen Sortierung am TGN am Beispiel von MPRs. Nach initialer Integration des kleinen G-Proteins ARF1 in die Zielmembran, wird zunächst GGA1 über die GAT-Domäne an ARF1 und damit an die Membran adhäriert. Über die VHS-Domäne erfolgt eine Bindung der MPRs an GGA1. Die folgende Übertragung der MPRs auf AP-1A (hier als ein akzessorisches Protein dargestellt) fehlt in dieser Darstellung. GGAs, AP-1A und weitere akzessorische Proteine initieren die Ausbildung des Clathrin-Coats und vermitteln letztendlich die Abschnürung eines CCV. Näheres siehe Text. CHC:clathrin heavy chain; CLC:clathrin light chain. Modifiziert nach Robinson & Bonifacino (2001).

Im Folgenden werden einerseits weitere akzessorischer Proteine (siehe dazu Tab. 7) an die ear-Domäne von AP-1A rekrutiert, andererseits findet die Bindung von Clathrin über das Clathrin-Box Motiv von AP-1A statt. Die sukzessive Rekrutierung von Clathrin und akzessorischen Proteinen an den Randbezirken des "coated pit" führt letztendlich zur Abknospung eines CCV. Die akzessorischen Proteine helfen bei der Ausbildung der Kurvatur (z.B. Enthoprotin/Ent5), der Abschnürung von CCV (z.B. Dynamin) oder vermitteln die Abstreifung der Hüllproteine nach dem Abknospen (z.B. mittels einer putativen uncoating ATPase). Der anschließende Transport erfolgt entlang von Zytoskelettstrukturen zum Ziel, welches über spezifische Proteine der Vesikelmembran definiert ist (z.B. rabs). Auch die zur Annäherung ("teathering") und zur letztendlichen Fusion des Vesikels mit der Zielmembran benötigte Proteine (z.B. SNARES) werden schon bei der Vesikelformation in das Vesikel verpackt und ermöglichen so einen zielgerichteten Transport.

### 4.2.4 Die Rolle von AP-3 am TGN

Kern der Arbeit war die Analyse einer möglichen Funktion von AP-3 bei der Sortierung von lysosomalen und melanosomalen Membranproteinen am Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Ausgangspunkt dafür waren einerseits in-vitro-Studien der eigenen Arbeitsgruppe, die eine Bindung der Dileucin-Motive des lysosomalen Membranproteins Limp-2 und des melanosomalen Memranproteins Tyrosinase an AP-3 nachgewiesen haben (Höning et al. 1998; Mühlhausen 2000). Diese Beobachtungen wurden in der Folge von anderen Arbeitsgruppen unterstützt, die zeigen konnten, dass es in Zellen mit fehlerhafter AP-3-Expression zu einer Fehlsortierung der lysosomalen Membranproteine Lamp-1 und Limp-2 kommt. Zwar findet in Zellen, in denen mit µ3A-antisense Oligonukleotiden die AP-3-Expression suprimiert wurde, ein Transport der Proteine in die Lysosomen statt, jedoch ist dieser normalerweise nur über intrazelluläre Kompartimente laufende Transport in der Weise gestört, dass eine Fehlsortierung zur PM erfolgt (Le Borgne et al. 1998). Auch durch Untersuchungen an Hefen, die für verschiedene Untereinheiten von AP-3 defizient waren, konnten ähnliche Fehlsortierungen nachgewiesen werden. In den entsprechenden Kolonien konnte weder die alkalische Phoshatase, noch das t-SNARE Vamp3 zur Vakuole transportiert werden, welche das übliche Ziel für diese Proteine darstellt und dem Lysosom in Mamalia entspricht (Cowles et al. 1997, Stepp et al. 1997).

In diesem Zusammenhang war auch von besonderer Bedeutung, dass für zwei Mausstämme (*mocha* und *pearl*) "loss-of-function"-Mutationen in den Genen der AP-3 Untereinheiten  $\delta$  (*mocha*) bzw.  $\beta$ 3A (*pearl*) nachgewiesen worden waren. Beide stellen Mausmodelle für das humane Hermansky-Pudlak-Syndrom (HPS) dar, dessen molekularen Defekt und der daraus resultierende klinische Symptomenkomplex in Abschnitt 4.4, S. 142 aufgeführt ist. Sowohl in Zellen aus *pearl*- und *mocha*-Mäusen, als auch in humanen Fibroblasten aus

Patienten mit HPS konnte ein über die Plasmamembran fehlgeleiteter Transport von Lamp-1, Lamp-2 und auch Limp-2 (CD63) nachgewiesen werden (Kantheti et al. 1998; Dell'Angelica et al. 1999b; Zhen et al. 1999). Wichtig ist an dieser Stelle, dass in Zellen mit "loss of function"-Mutationen einzelner AP-3-Untereinheiten Restkomplexe exprimiert werden, die jedoch instabil sind und daher rasch degradiert werden, so dass kein funktionelles AP-3 gebildet wird (Peden et al. 2002). Die daraus resultierende AP-3-Defizienz führt dazu, dass Sortierungssignale von verschiedenen lysosomalen und melanosomalen Membranproteinen nicht mehr gebunden werden können, was zu einer Fehlsortierung der betroffenen Proteine zur Plasmamembran führt. Dabei blieb bisher unklar, in welchem Kompartiment die Erkennung der Sortierungssignale durch AP-3 unterbleibt, oder anders herum, wo der exakte intrazelluläre Wirkort von AP-3 ist.

Bisher gelang lediglich Faudez et al. (1998) ein direkter Funktionsnachweis von AP3 an Endosomen. In einem *in-vitro*-Assay gelang es der Arbeitsgruppe an gereinigten endosomalen Membranen aus einem neuronalem Zellsystem die Bildung von synaptischen Vesikeln lediglich in Anwesenheit von AP-3, ATP und dem kleinen G-Protein ARF1 zu stimulieren. Ein subzellulärer Funktionsort in nicht-neuronalen Zellen konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Dagegen zahlreiche Untersuchungen zur Lokalisation von AP-3 existieren in verschiedenen Zellen. Beispielsweise finden Simpson et al. (1997) AP-3 sowohl an Golgi/TGN, als auch an endosomalen Strukturen. Tikkanen (1999) aus unserer Arbeitsgruppe konnte anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen in *melan-a*-Zellen AP-3 in Kolokalisation mit Tyrosinase an Endosomen und Golgimembranen finden. Eine neuere Publikation konnte eine deskriptive Assoziation von AP-3 mit RE zeigen und postuliert daraus eine Route von RE zu Lysosomen (Peden et al. 2004).

Klarheit konnte unser *in-vitro*-Budding-Assay liefern, der zweifelsfrei eine funktionelle Beteiligung von AP-3 an der Sortierung von Tyrosinase am Trans-Golgi-Netzwerk nachweist (vgl. Abschnitt 3.5.7, S. 118). In *mocha*-Zellen werden also alle Membranproteine, die normalerweise in direkter Weise durch

AP-3 zum Lysosom transportiert werden, zur Plasmamembran fehlgeleitet. Dort kann Tyrosinase, wie im Übrigen auch Lamp-1, über Endozytosesignale von AP-2 erkannt und endozytiert werden. Nach Eintritt in das endosomale System über die RE werden dann Tyrosinase und Lamp-1 ihrer lysosomalen Destination zugeführt. Die geringere Reduktion des Buddingsignals im Vergleich zu MPR46 (9% vs. 5% bei 5% Hintergrundbudding) in unserem Assay könnte dahingehend interpretiert werden, dass AP-3 eine geringere Bindungsstärke zu Tyrosinase besitzt, wie beispielsweise GGA1/AP-1A zu MPR46. Es scheint nahe liegend, dass Tyrosinase zusätzlich auch von EE und von RE AP-3-vermittelt Richtung frühen Melanosomen (oder LE) sortiert wird. Diese These wird durch eine aktuelle Arbeit der Gruppe um Peden et al. (2004) gestützt, die AP-3 an "tubulären Transferin-Rezeptor-positiven sorting Endosomen" in Assoziation zu Lamp-1 nachweisen können. Eine Beteiligung von GGAs an der Sortierung von Tyrosinase erscheint vor dem oben beleuchteten Hintergrund der Sortierung von MPRs als sehr wahrscheinlich und daher als abklärungsbedürftig. Genauso bleibt fraglich, ob AP-1A und AP-3 nur differente Wege für unterschiedliche Membranproteine zum gleichen Organell darstellen, z.B. zu den EE, oder ob AP-1 zu EE, AP-3 aber zu LE sortiert. Letzteres angenommen, könnte AP-3 als Adaptor für den Weg zum LE respektive entlang einer intrazellulären Route, egal von welchem intrazellulären Organell postuliert werden (EE, RE, TGN). Genau dies lässt sich aufgrund der subzellulären Verteilung und der in-vitro-Untersuchungen von Faundez et al. (1998) und uns als wahrscheinlich annehmen.

## 4.3 Zur Sortierung melanosomaler Proteine

#### 4.3.1 Biogenese von Melanosomen nach dem klassischen Modell

Nach dem "klassischen" und derzeit noch verbreiteten Modell haben Melanosomen ihren Ursprung in der Abknospung vom glatten endoplasmatischen Retikulum (ER). Diese Abknospung wird als "stage I" Melanosom bezeichnet. In der Folge durchlaufen diese Melanosomenvorstufen



Melanosomen-biogenese, Erklärung s. Text, http://www.med.nyu.edu/research/orlows01.html

einen Reifungsprozess ("stage II-III"), bei dem sie für die spätere Funktion wichtige Faktoren durch Vesikel aufnehmen, die vom Golgiapparat stammen. Die Melaninsynthese beginnt in den "stage III" Melanosomen, die sich von den "stage IV" Melanosomen durch den Grad der Melanisierung unterscheiden (s. Abb. 2).



Abbildung 52: Melanosomenstadien im Vergleich: Ganz links finden sich die entsprechenden Charakteristika der einzelnen Melanosomenstadien. Rechts daneben sind in einer plastikeingebeteten EM-Aufnahme dieselben Stadien einer MNT-1-Melanomzellline dargestellt. In der dritten Spalte ist eine schematische Darstellung der vier Melanosomenstadien anhand ihrer charakteristischen Strukturen den rechts ebenfalls schematisch dargestellten Organellen des ubiquitären endosomalen Systems gegenübergestellt. EE = frühe Endosomen; LE = späte Endosomen; Plys = Prälysosom; Lys = Lysosom; Modifiziert nach Raposo et al. (2002).

## 4.3.2 Implikationen der gezeigten Adaptorfunktionen für den Wandel der Modelle

das Da vorgestellte Model im Wesentlichen aufgrund zuvor von elektronenmikroskopischen Untersuchungen aufgestellt wurde (Seiji et al. 1961; Novikoff et al. 1968) hat es allerdings erhebliche Schwächen. So sind zum einen keine funktionellen Aspekte berücksichtigt. Außerdem kann das Modell nicht erklären, warum Melanosomen für Lysosomen typische saure Hydrolasen besitzen, sowie auch die für Lysosomen typischen Membranproteine (vgl. Einleitung). Des Weiteren konnten zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass extrazellulär applizierte Endozytosemarker sich nicht nur in Lysosomen anreichern können, sondern auch in Melanosomen. Aus diesem Grund bedarf das oben genannte Modell einer Revidierung. Unter Berücksichtigung der Beziehung Unklarheiten wird heute eine enge genannten zwischen Melanosomen und Endosomen favorisiert (Raposo et al. 2001). Demzufolge kann die Genese von Melanosomen als eine Abwandlung des lysosomalen Transportweges gesehen werden (vgl. Abb. 13):



Abbildung 53: Aktuelles Modell der Biogenese von Melanosomen: Die Melanosomen scheinen eher von frühen endosomalen Strukturen aus zu reifen. Dabei lässt sich jedem Melanosomenstadium ein auch ubiquitär zu findendes Organell des Endozytoseweges zuordnen. Ob nun die Melanosomen und ihre Stadien als distinkte Population in der Zelle vorliegen, oder ob sie die ubiquitären Strukturen ersetzen, ist zur Zeit noch unklar.

Im derzeit diskutierten Modell wird davon ausgegangen, dass sowohl melanosomale Proteine, wie die Tyrosinase, und Iysosomale Proteine, wie z.B. Lamp-1, vom Golgi/TGN in ein endosomales Kompartiment gelangen. Dies könnte z.B. ein frühes Endosom sein. Einige Autoren sprechen an dieser Stelle auch von einem spezialisierten EE und nennen es dann "coated endosom" (Raposo et al. 2001). Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass der dafür am TGN nötige Sortierfaktor AP-3 ist. Wie schon mehrfach angedeutet könnte gerade AP-3 seine Funktion entlang des endosomalen Systems haben und an jedem Kompartiment die Proteine mit dem Ziel Melanosom selektiv heraussortieren und in Vesikel verpacken.

Auch die Beobachtung, dass verschiedene melanosomale Proteine, die alle integrale Bestandteile der Melaninsynthese darstellen am TGN unterschiedlich sortiert werden, nämlich Tyrosinase z.T. AP-3 vermittelt, TRP-1 durch AP-1 und TRP-2 von keinen der beiden Adaptoren (zumindest nicht am TGN). Daher muss vermutet werden, dass verschiedene Routen zu melanosomalen Kompartimenten existieren und gerade diese Diversität in den Routen zu einer funktionellen Kompartimentierung der Melaninsynthese führt. Wenn nun das endosomale System als Bestandteil des melanosomalen Transportweges beansprucht wird, ist auch die Anwesenheit von Endoyzytosemarkern in Melanosomen einfach zu verstehen. Über den Endozytoseweg könnten diese Marker nicht nur zu den Lysosomen gelangen, sondern in einer spezialisierten Zelllinie, wie einem Melanozyten, auch in die Melanosomen. Des Weiteren bietet das aktuelle Modell auch eine Erklärung für die Beobachtung, dass AP-3 defiziente Individuen eine Fehlpigmentierung und Störungen in lysosomalen Transportwegen aufweisen (vgl. auch nächster Abschnitt).

# 4.4 Membransortierung und transport-assoziierte Erkrankungen

Der Transport von Proteinen in Zellen ist ein ubiquitärer und essentieller Stoffwechselprozess in allen Zellen. Als Ausdruck von Fehlfunktionen verschiedener enddifferenzierter Zellen präsentiert sich beim singulären Ausfall eines einzelnen Gens in einem Faktor der Transportmaschinerie ein klinisch sehr heterogener Symptomenkomplex (vgl. Anhang 6.3).

Als Beispiel soll hier das sehr seltene, hereditäre Hermanyk-Pudlak-Syndrom (HPS) kurz dargestellt werden. Interessanterweise ist es auf Puerto Rico die häufigste Erbkrankheit mit einer Frequenz von 1:1500, während sie in der restlichen Normalbevölkerung lediglich in einer Frequenz von 1:50000 vorkommt (Witkop et al. 1990). Insgesamt sind bisher 7 HPS Gene beschrieben (vgl. Anhang 6.3). Während HPS 3 die  $\beta$ -Untereinheit von AP-3 darstellt, wurden die anderen HPS Mutationen in den letzten Jahren intensivst erforscht. Anhand Patientenzellen und der mittlerweile 15 verschiedenen Mausmutanten, die als Modelle für das humane HPS dienen, wird ersichtlich, dass es sich um ein genetisch multigenes Syndrom handelt. Für die bisher identifizierten Proteine aus Maus und Mensch wird eine Funktion in der Sortierung zu Lysosomen/LROs bzw. in der Biogenese der Organellen selbst zugeschrieben, allerdings steht der notwendige experimentelle Nachweis noch aus (Li et al. 2003; Martina et al. 2003; Di Pietro et al. 2004; Dell'Angelica 2004).

Trotz der genetischen Heterogenität präsentieren sich HPS Patienten mit dem Kardinalsymptom verlängerte Blutungszeit, weshalb es klinisch oft in die sog. Storage-Pool-Deficiencies der hämorragischen Diathesen eingeordet wird. Daneben weisen die Patienten schon früh einen okulären Albinismus sowie eine unterschiedlich schwer ausgeprägte Speicherung des Ceroids Lipofusin, eines Protein-Lipid-Komplexes unklarer Ätiologie, auf. Gelegentlich entwickeln die Patienten auch eine granulomatöse Kolitis und eine spätestens in der fünften Lebensdekate tödlich endende Lungenfibrose (Huizing et al. 2001). Diese verschiedenen klinischen Symptome konnten trotz der multigenen Ursache bisher alle auf Störung in der Biogenese von LROs zurückgeführt werden. So ist die defekte "dense-granular"-Bildung in den Thrombozyten die Ursache für die verlängerte Blutungsneigung, die Pigmentierungsdefekte sind Störungen der Melanosomen-Biogenese zurückzuführen und die auf Ablagerung von Cerebroiden in der defekten Biogense von Lysosomen.

# 5 Zusammenfassung

Die zytosolischen Adaptorproteinkomplexe AP-1, AP-2, AP-3 und AP-4 sind an der Sortierung von Transmembranproteinen in der Zelle beteiligt. Während AP-2 diese Funktion an der PM bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose besitzt, ist der intrazelluläre Wirkort von AP-3 umstritten und lediglich Faundez et al. (1998) direkt experimentell an Endosomen gelungen.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein Nachweis für eine Funktion von AP-3 am TGN geliefert werden. Dazu wurde ein in-vitro-System etabliert, das die Sortierung von Transmembranproteinen am TGN untersucht. Die entsprechenden Donormembranen wurden mittels subzellulärer Fraktionierung angereinigt und in vitro unter Verwendung adaptordefizienter Zytosole zur Vesikulation stimuliert. Die in-vitro-Rekonstruktion des TGN-Buddings und die Spezifität Transportschrittes des wurden durch Analyse des Glykosylierungmusters der zuvor metabolisch markierten und im Golgi akkumulierten Proteine nachgewiesen. mögliche Eine thermische Fragmentation der Donormembranen konnte ausgeschlossen werden, da u.a. das TGN-Markerenzym Galactosyltransferase nach Trennung der am TGN gebildeten Vesikel von den Donormembranen noch zu 90% im Donor nachweisbar war. Ebenso waren nur die im Vesikelpool vorhandenen Proteine Erwartungsgemäß konnten im voll sialyliert. Vesikelpool mittels Elektronenmikroskopie keine Donorfragmente, sondern 80-100 nm durchmessende Vesikel nachgewiesen werden. Der Assay ist abhängig von Temperatur und ATP/GTP sowie von der Zytosolkonzentration. Daneben konnte die Beteiligung von ARF1 an der Vesikelbildung am TGN verifiziert werden. Die Analyse verschiedener Membranproteine im Assay konnte erstmals direkt zeigen, dass die Sortierung von Tyrosinase und Lamp-1 in Abhängigkeit von AP-3 erfolgt. Im Gegensatz dazu erfolgt die Sortierung von MPR46 und TRP-1 in Abhängigkeit von AP-1A. Zudem deuten die Ergebnisse zu TRP-2 auf eine von AP-1A und AP-3 unabhängige Sortierung hin.

Abschließend lässt sich festhalten, dass in dieser Arbeit ein Instrument zur differenzierten Analyse der Sortierung von Transmembranproteinen und der gebildeten Transportvesikel am Golgi/TGN aufgebaut wurde.

# 6 Anhang

## 6.1 Einbuchstabencode der Aminosäuren

Einbuchstabencode	AS
Α	Alanin
С	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Phenylalanin
G	Glycin
Н	Histidin
l	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
Μ	Methionin
Ν	Asparagin
Р	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
Т	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Х	irgendeine AS
Y	Tyrosin
Φ	Große hydrophobe AS

# 6.2 Überblick über alle zur Zeit bekannten LROs: Vorkommen, Inhalt und Funktion

Organell	in folgenden	Inhalt	Physiologische Funktion	
	Zellen:			
Melanosom	Melanozyten,	Melanin	UV- u. Streulichtschutz, Hautfarbe	
	REP			
Dichte Granula	Thrombozyten,	ADP, Ca <sup>++</sup> ,	Thrombozytenadhäsion und	
(Platlet dense	Megakaryozyten	Serotonin,	Hämostase	
granules)				
Lamellar bodies	Pneumozyten	Surfactant	Reduktion der Oberflächenspannung	
	Тур II			
Lytische Granula	CTLs, NK-Zellen	Porine,	Zerstörung von virusinfizierten Zellen	
		Granzym,	oder Tumorzellen	
MIIC (MHC class	Antigen-	Prozessierte	Prozessierung und Präsentation von	
II compartiments)	Präsentierende	Antigene,	Antigenen für CD4+ Zellen	
	Zellen	Hydrolasen,		
Basophile	Basophile u.	Histamin &	regulierte Exozytose von Mediatoren	
Granula	Mastzellen	Heparin	der Immunabwehr	
Azurophile	Neutrophile u.	Immun-	Freisetzung von antiinfektiösen	
Granula	Eosinophile	mediatoren	Substanzen und Mediatoren der	
			Immunabwehr	
Osteoklastische	Osteoklasten	Lysosomale	Knochenresorption und	
Granula		Dydrolasen	Remodellierung	
Weibel-Palade	Endothelien	vWF	Reifung u. regulierte Exozytose vom	
Körperchen			vWF ins Blut	
$\alpha$ -Granula	Thrombozyten,	Fibrinogen	Thrombozytenadhäsion und	
	Megakaryozyten	und vWF	Hämostase	

Beteiligter	Erkrankung (Gen)				
Vesikelprozess	Human	Maus	Drosophila		
	HPS-1 (HPS1)	Pale ear (HPS1)	-		
	HPS-2 (ADTB3A)	<i>Pearl</i> (AP-3β)	Ruby (AP-3β)		
	-	<i>Mocha</i> (AP-3δ)	Garnet (AΡ-3δ)		
	-	-	Orange (AP-3σ)		
	-	-	Carmine (AP-3µ)		
Bildung	-	-	Light (VPS41)		
	HPS-3 (HPS3)	Cocoa	-		
		Subtle gray (sut)	-		
	HPS-4 (HPS4)	<i>Light ear</i> (HPS4)			
	HPS-5 (HPS5)	Ruby-eye-2			
	HPS-6 (HPS6)	Ruby-eye			
	HPS-7 (dysbindin)	Sandy			
	GPS (?)				
Transport	CHS (LSYST)	Beige (lyst)	-		
	GS1 (myoVa)	<i>Dilute</i> (myoVa)	-		
	GS2 (rab27a)	Ashen (rab27a)	-		
	"GS?" (melanophillin)	Leaden	-		
	PAID (?), Elejalde (?),	-	-		
	Cross (?)				
	Choroidermia (REP1)	-	-		
Thethering,		Gunmetal (RGGTA)	-		
Docking,		Pallid (pallidin)	-		
Fusion			Deep oragne (VPS18)		
			Carnation (VPS33)		

## 6.3 Übersicht über Transport-assoziierte Erkrankungen

Aufgelistet sind unter dem entsprechenden gestörten Transportschritt die bekannten Transport-assoziierten Erkrankungen mit ihrem zugrunde liegenden Gendefekt in Mensch, Maus und Fruchtfliege. Einzelne dieser Gene bilden zusammen sog. BLOCs (biogenesis of lysosome-related organelles complexes). Näheres zu diesen neuen Komplexen, die allesamt in der Organellogenese von LROs eine zentrale Rolle spielen in Dell'Angelica (2004).

# 7 Literaturverzeichnis

Aguilar RC, Boehm M, Gorshkova I, Crouch RJ, Tomita K, Saito T, Ohno H & Bonifacino JS (2001): Signal-binding specificity of the mu4 subunit of the adaptor protein complex AP-4. *J Biol Chem* <u>276</u>: 13145-52.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Mol Biol Cell*. 4. Auflage; Garland Science, New York 2002.

Andersson GN, Torndal UB & Eriksson LC (1978): Sequential preparation of rat liver microsomal and Golgi membranes. *Biochim Biophys Acta* <u>512</u>: 539-49.

Arighi CN, Hartnell LM, Aguilar RC, Haft CR & Bonifacino JS (2004): Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Cell Biol* <u>165(1)</u>: 123-133.

Austin C, Boehm M & Tooze S (2002): Site-specific cross-linking reveals a differential direct interaction of class 1, 2, and 3 ADP-ribosylation factors with adaptor protein complexes 1 and 3. *Biochemistry* <u>41(14)</u>: 4669-77.

Babst M, Katzmann D, Snyder W, Wendland B & Emr S (2002): Endosomeassociated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell* <u>3(2)</u>: 283-9.

Bache KG, Slagsvold T & Stenmark H (2004): Defective downregulation of receptor tyrosine kinases in cancer. *EMBO J* <u>23</u>(14): 2707-2712.

Bai H, Doray B & Kornfeld S (2004): GGA1 Interacts with the Adaptor Protein AP-1 through a WNSF Sequence in Its Hinge Region. *J Biol Chem* <u>279(17)</u>: 17411-17417.

Balch W & Rothman J (1985): Characterization of protein transport between successive compartments of the Golgi apparatus: asymmetric properties of donor and acceptor activities in a cell-free system. *Arch Biochem Biophys* <u>240(1)</u>: 413-25.

Bennett DC, Cooper PJ & Hart IR (1987): A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int J Cancer* <u>39</u>: 414-8.

Blott EJ & Griffiths GM (2002): Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* <u>3(</u>2): 122-31.

Blumstein J, Faundez V, Nakatsu F, Saito T, Ohno H & Kelly RB (2001): The neuronal form of adaptor protein-3 is required for synaptic vesicle formation from endosomes. *J Neurosci* <u>21</u>: 8034-42.

Boehm M & Bonifacino JS (2001): Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell* <u>12</u>: 2907-20.

Boman AL (2001): GGA proteins: new players in the sorting game. *J Cell Sci* <u>114</u>: 3413-8.

Bonifacino JS (2004): The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* <u>5(1)</u>: 23-32.

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* <u>72</u>: 248-254.

Brandli AW, Hansson GC, Rodriguez-Boulan E & Simons K (1988): A polarized epithelial cell mutant deficient in translocation of UDP-galactose into the Golgi complex. *J Biol Chem* <u>263</u>: 16283-90.

Bremnes T, Lauvrak V, Lindqvist B & Bakke O (1998): A region from the medium chain adaptor subunit (mu) recognizes leucine- and tyrosine- based sorting signals. *J Biol Chem* <u>273</u>: 8638-8645.

Chen W, Goldstein J & Brown M (1990): NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* <u>265(6)</u>: 3116-3123.

Collins BM, McCoy AJ, Kent HM, Evans PR & Owen DJ (2002): Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* <u>109</u>: 523-35

Conner SD & Schmid SL (2002): Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* <u>156</u>: 921-9.

Conner S & Schmid S (2003): Regulated portals of entry into the cell. *Nature* <u>422(6927)</u>: 37-44.

Cowles CR, Odorizzi G, Payne GS & Emr SD (1997): The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole. *Cell* <u>91</u>: 109-118.

Cuervo AM & Dice JF (1996): A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* <u>273</u>: 501-503.

Cuppoletti J, Aures Fischer D & Sachs G (1987): The lysosomal H+ pump: 8azido-ATP inhibition and the role of chloride in H+ transport. *Biochim Biophys Acta* <u>899</u>: 276-84.

Daugherty BL, Straley KS, Sanders JM, Phillips JW, Disdier M, McEver RP & Green SA (2001): AP-3 adaptor functions in targeting P-selectin to secretory granules in endothelial cells. *Traffic* <u>2</u>(12): 406-13.

Davis C, Lehrman M, Russell D, Anderson R, Brown M & Goldstein J (1986): The J.D. mutation in familial hypercholesterolemia: amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. *Cell* <u>45(1)</u>: 15-24.

Dell'Angelica, E (2004): The building BLOC(k)s of lysosomes and related organelles. *Curr Opin Cell Biol* <u>16(4)</u>: 458-64.

Dell'Angelica EC, Ohno H, Ooi CE, Rabinovich E, Roche KW & Bonifacino JS (1997): AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *EMBO J* <u>16</u>: 917-928.

Dell'Angelica E, Klumperman J, Stoorvogel W & Bonifacino J (1998): Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science* <u>280</u>: 431-434.

Dell'Angelica E, Mullins C & Bonifacino E (1999a): AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J Biol Chem* <u>274</u>: 7278-7285.

Dell'Angelica E, Shotelersuk V, Aguilar R, Gahl W & Bonifacino J (1999b): Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak Syndrome due to mutations in the ß3A subunit of the AP3 complex. *Mol Cell* <u>3</u>: 11-21.

Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S & Bonifacino JS (2000a): Lysosomerelated organelles. *FASEB J* <u>14</u>: 1265-78. Dell'Angelica EC, Puertollano R, Mullins C, Aguilar RC, Vargas JD, Hartnell LM & Bonifacino JS (2000b): GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J Cell Biol* <u>149</u>: 81-94.

Del Marmol V & Beermann F (1996): Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett* <u>381</u>: 165-168.

Diaz E & Pfeffer S (1998): TIP47: A cargo selection device for mannose 6phosphate receptor trafficking. *Cell* <u>93</u>: 433-443.

Dietrich J, Kastrup J, Nielsen BL, Odum N & Geisler C (1997): Regulation and function of the CD3 gamma DxxxLL motif: a binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J Cell Biol* <u>138</u>: 271-281.

Di Pietro S, Falcon-Perez J & Dell'Angelica E (2004): Characterization of BLOC-2, a complex containing the Hermansky-Pudlak syndrome proteins HPS3, HPS5 and HPS6. *Traffic* <u>5</u>(4): 276-83.

Donaldson JG & Jackson CL (2000): Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol* <u>12</u>: 475-82.

Doray B, Ghosh P, Griffith J, Gueze HJ & Kornfeld S (2002): Cooperation of GGAs and AP-1 in Packaging MPRs at the Trans-Golgi Network. *Science* <u>297</u>: 1700-1703.

Falguieres T, Mallard F, Baron C, Hanau D, Lingwood C, Goud B, Salamero J & Johannes L (2001): Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol Biol Cell* <u>12</u>: 2453-68.

Faundez V, Horng J & Kelly R (1998): A function for the AP3 coat complex in synaptic vesicle formation from endosomes. *Cell* <u>93</u>: 423-432.

Feng L, Seymour A, Jiang S, To A, Peden A, Novak E, Zhen L, Rusiniak M, Eicher E, Robinson M, et al. (1999): The ß3A subunit gene (Ap3b1) of the AP-3 adaptor complex is altered in the mouse hypopigmentation mutant pearl, a model for Hermansky-Pudlak syndrome and night blindness. *Hum Mol Gen* <u>8</u>: 323-330.

Fingerhut A, von Figura K & Honing S (2001): Binding of AP2 to sorting signals is modulated by AP2 phosphorylation. *J Biol Chem* <u>276</u>: 5476-82.

Fölsch H, Ohno H, Bonifacino J & Mellman I (1999): A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targetting in polarized epithelial cells. *Cell* <u>99</u>: 189-198.

Füllekrug J & Simons K (2004): Lipid Rafts and Apical Membrane Traffic. *Ann N Y Acad Sci* <u>1014(1)</u>: 164-169.

Gaidarov I, Chen Q, Falck JR, Reddy KK & Keen JH (1996): A functional phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate/phosphoinositide binding domain in the clathrin adaptor AP-2 alpha subunit (vol 271, pg 20922, 1996). *J Biol Chem* <u>271</u>: 27188.

Gan Y, McGraw TE & Rodriguez\_Boulan E (2002): The epithelial-specific adaptor AP1B mediates post-endocytic recycling to the basolateral membrane. *Nat Cell Biol* <u>4</u>: 605-9.

Geuze HJ, J.W. Slot, G.J.A.M. Strous, A. Hasilik and K. von Figura (1985): Possible pathways for lysosomal enzyme delivery. *J Cell Biol* <u>101</u>: 2253-2262.

Ghosh P & Kornfeld S (2003): Phosphorylation-induced conformational changes regulate GGAs 1 and 3 function at the trans-Golgi network. *J Biol Chem* <u>278</u>: 14543-9.

Girotti M & Banting G (1996): TGN38-green fluorescent protein hybrid proteins expressed in stably transfected eukaryotic cells provide a tool for the real-time, in vivo study of membrane traffic pathways and suggest a possible role for ratTGN38. *J Cell Sci* <u>109</u>: 2915-2926.

Gorlich D, Prehn S, Hartmann E, Kalies KU & Rapoport TA (1992): A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* <u>71</u>: 489-503.

Gruenberg J (2001): The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* <u>2</u>(10): 721-30.

Ha SA, Torabinejad J, DeWald DB, Wenk MR, Lucast L, De\_Camilli P, Newitt RA, Aebersold R & Nothwehr SF (2003): The synaptojanin-like protein Inp53/Sjl3 functions with clathrin in a yeast TGN-to-endosome pathway distinct from the GGA protein-dependent pathway. *Mol Biol Cell* <u>14</u>: 1319-33.

Haft C, Klausner R & Taylor S (1994): Involvment of dileucine motifs in the internalization and degradation of the insulin receptor. *J Biol Chem* <u>269</u>: 26286-26294.

Hanahan D (1983): Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* <u>166</u>: 557-80.

Hino Y, Asano A & Sato R (1978): Biochemical studies on rat liver Golgi apparatus. II. Further characterization of isolated Golgi fraction. *J Biochem (Tokyo)* <u>83(4)</u>: 925-34.

Hirschberg K, Miller C, Ellenberg J, Presley J, Siggia E, Phair R & Lippincott-Schwartz J (1998): Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of Golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *J Cell Biol* <u>143</u>: 1485-1503.

Hirst J, Bright N, Rous B & Robinson MS (1999): Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell* <u>10</u>: 2787-2802.

Hirst J, Lui WW, Bright NA, Totty N, Seaman MN & Robinson MS (2000): A family of proteins with gamma-adaptin and VHS domains that facilitate trafficking between the trans-Golgi network and the vacuole/lysosome. *J Cell Biol* <u>149</u>: 67-80.

Hirst J, Motley A, Harasaki K, Peak\_Chew SY & Robinson MS (2003): EpsinR: an ENTH domain-containing protein that interacts with AP-1. *Mol Biol Cell* <u>14</u>: 625-41.

Höning S, Sandoval I & von Figura K (1998): A di-leucine based motif in the cytoplasmic tail of limp-II and tyrosinase mediates selective binding of AP3. *EMBO J* <u>17</u>: 1304-1314.

Hofmeister R, Bottcher A & Schmitz G (1998): Preparation of Golgi subfractions with free-solution isotachophoresis: analysis of sphingomyelin synthesis in Golgi subfractions from rat liver. *Electrophoresis* <u>19</u>: 1185-94.

Hogan B, Beddington R, Costantinit F, Lacy E: Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> Edition; Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1994.

Hosaka M, Toda K, Takatsu H, Torii S, Murakami K & Nakayama K (1996): Structure and intracellular localization of mouse ADP-ribosylation factors type 1 to type 6 (ARF1-ARF6). *J Biochem (Tokyo)* <u>120</u>: 813-819.

Howe CL, Granger BL, Hull M, Green SA, Gabel CA, Helenius A & Mellman I (1988): Derived protein sequence, oligosaccharides, and membrane insertion of the 120 kD lysosomal membrane glycoprotein lgp120: Identification of a highly conserved family of lysosomal membrane glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci* (USA) <u>85</u>: 7577-7581.

Huizing M, Anikster Y & Gahl WA (2000): Hermansky-Pudlak syndrome and related disorders of organelle formation. *Traffic* <u>1(12)</u>: 823-35.

Huizing M, Sarangarajan R, Strovel E, Zhao Y, Gahl WA & Boissy RE (2001): Ap-3 mediates tyrosinase but not trp-1 trafficking in human melanocytes. *Mol Biol Cell* <u>12</u>: 2075-85.

Hunziker W & Geuze H (1996): Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays* <u>18</u>: 379-389.

Jimenez, M, K Kameyama, W Maloy, Y Tomita & V Hearing (1988): Mammalian tyrosinase: Biosynthesis, processing, and modulation by melanocyte-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci (USA)* <u>85</u>: 3830-3834.

Kalthoff C, Groos S, Kohl R, Mahrhold S & Ungewickell EJ (2002): Clint: a novel clathrin-binding ENTH-domain protein at the Golgi. *Mol Biol Cell* <u>13</u>: 4060-73.

Kantheti P, Qiao X, Diaz ME, Peden AA, Meyer GE, Carskadon SL, Kapfhamer D, Sufalko D, Robinson MS, Noebels JL, et al. (1998): Mutation in AP-3 delta in the mocha mouse links endosomal transport to storage deficiency in platelets, melanosomes, and synaptic vesicles. *Neuron* <u>21</u>: 111-22.

Karlsson K & Carlsson S (1998): Sorting of Iysosomal membrane glycoproteins Lamp-1 and lamp-2 into vesicles distinct from MPR/g-adaptin vesicles at the trans-Golgi network. *J Biol Chem* <u>273</u>: 18966-18973.

Katzmann DJ, Babst M & Emr SD (2001): Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* <u>106</u>(2): 145-55.

Keen JH, Willingham MC & Pastan IH (1979): Clathrin-coated vesicles: isolation, dissociation and factor-dependent reassociation of clathrin baskets. *Cell* <u>16</u>: 303-12.

Kirchhausen T (1999): Adaptors for Clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* <u>15</u>: 705-732.

Kornfeld S & Mellman I (1989): The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* <u>5</u>: 483-525.

Kretzschmar D, Poeck B, Roth H, Ernst R, Keller A, Porsch M, Strauss R & Pflugfelder GO (2000): Defective pigment granule biogenesis and aberrant behavior caused by mutations in the Drosophila AP-3beta adaptin gene ruby. *Genetics* <u>155</u>: 213-23.

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* <u>227</u>: 680-685.

Lafer EM (2002): Clathrin-protein interactions. *Traffic* <u>3</u>: 513-20.

Le Borgne R, Schmidt A, Mauxion F, Griffiths G & Hoflack B (1993): Binding of AP1 Golgi adaptors to membranes requires phosphorylated cytoplasmic domain

of the mannose-6-phosphate/insulin like growth factor II receptor. *J Biol Chem* <u>268</u>: 22552-22556.

Le Borgne R, Griffiths G & 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* <u>271</u>: 2162-2170.

Le Borgne R, Alconada A, Bauer U & Hoflack B (1998): The mammalian AP3 adaptor like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins. *J Biol Chem* <u>273</u>: 29451-29461.

Lefrancois S, Janvier K, Boehm M, Ooi C & Bonifacino J (2004): An ear-core interaction regulates the recruitment of the AP-3 complex to membranes. *Dev Cell*  $\underline{7}(4)$ : 619-25.

Lemansky P, Gieselmann V, Hasilik A & von Figura K (1985): Synthesis and transport of lysosomal acid phosphatase in normal and I- cell fibroblasts. *J Biol Chem* <u>260</u>: 9023-30.

Letourneur F & Klausner RD (1992): A novel di-leucine motif and a tyrosinebased motif independently mediate lysoosmal targeting and endoscytosis of CD3 chains. *Cell* <u>69</u>: 1143-1157.

Lewin D & Mellman I (1998): Sorting out adaptors. *Biochem Biophys Acta* <u>1401</u>: 129-145.

Li W, Zhang Q, Oiso N, Novak E, Gautam R, O'Brien E, Tinsley C, Blake D, Spritz R, Copeland N, Jenkins N, Amato D, Roe B, Starcevic M, Dell'Angelica E, Elliott R, Mishra V, Kingsmore S, Paylor R & Swank R (2003): Hermansky-Pudlak syndrome type 7 (HPS-7) results from mutant dysbindin, a member of the biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 (BLOC-1). *Nat Genet* <u>35(1)</u>: 84-9.

Liou W, Geuze H & Slot J (1996): Improving structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochem Cell Biol* <u>106</u>(1): 41-58.

Liu SH, Towler MC, Chen E, Chen CY, Song W, Apodaca G & Brodsky FM (2001): A novel clathrin homolog that co-distributes with cytoskeletal components functions in the trans-Golgi network. *EMBO J* <u>20</u>: 272-84.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE: Molecular Cell Biology.4. Auflage; W.H. Freeman Company; New York 2001.

Löffler G, Petrides PE: Biochemie und Pathobiochemie. 6. Auflage; Springer-Verlag, Berlin 1998.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Fart AJ, Randall RJ (1951): Protein measurement with the folin reagents. *J Biol Chem* <u>193</u>: 265-275.

Mallard F, Antony C, Tenza C, Salamero J, Goud B & Johannes L (1998): Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport. *J Cell Biol* <u>143</u>: 973-990.

Marks MS & Seabra MC (2001): The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nat Rev Mol Cell Biol* <u>2(10)</u>: 738-48.

Marks MS, Woodruff L, Ohno H & Bonifacino JS (1996): Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J Cell Biol* <u>135</u>: 341-354.

Marsh M: Frontiers in molecular biology: Endocytosis. Oxford University Press, New York 2001.

Martina, JA, K Moriyama & JS Bonifacino (2003): BLOC-3, a Protein Complex Containing the Hermansky-Pudlak Syndrome Gene Products HPS1 and HPS4. *J Biol Chem* <u>278</u>(31): 29376-29384.

Matlin KS & Simons K (1983): Reduced temperature prevents transfer of a membrane glycoprotein to the cell surface but does not prevent terminal glycosylation. *Cell* <u>34</u>: 233-43.

Mayer A, Ivanov IE, Gravotta D, Adesnik M & Sabatini DD (1996): Cell-free reconstitution of the transport of viral glycoproteins from the TGN to the basolateral plasma membrane of MDCK cells. *J Cell Sci* <u>109</u>: 1667-1676.

Meyer C, Zizioli D, Lausmann S, Eskelinen EL, Hamann J, Saftig P, von Figura K & Schu P (2000): μ1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *EMBO J* <u>19</u>: 2193-2203.

Mills IG, Praefcke GJ, Vallis Y, Peter BJ, Olesen LE, Gallop JL, Butler PJ, Evans PR & McMahon HT (2003): EpsinR: an AP1/clathrin interacting protein involved in vesicle trafficking. *J Cell Biol* <u>160</u>: 213-22.

Mühlhausen, C: Untersuchungen zu Interaktionen von Adaptorkomplexen mit Leucin-haltigen Sortierungssignalen in lysosomalen und melanosomalen Membranproteinen. *Med. Diss.* Göttingen 2000.

Mullins C, Hartnell LM, Wassarman DA & Bonifacino JS (1999): Defective expression of the mu3 subunit of the AP-3 adaptor complex in the Drosophila pigmentation mutant carmine. *Mol Gen Genet* <u>262</u>: 401-12.

Nakamura N, Rabouille C, Watson R, Nilsson T, Hui N, Slusarewicz P, Kreis TE & Warren G (1995): Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol* <u>131</u>(6 Part 2): 1715-1726.

Nishino I, Fu J, Tanji K, Yamada T, Shimojo S, Koori T, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Koga Y, et al. (2000): Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* <u>406</u>: 906-10.

Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne JP: The Pigmentary System – Physiology and Pathophysiology. Oxford university press. New York 1998

Novikoff A, Albala A & Biempica L (1968): Ultrastructural and cytochemical observations on B-16 and Harding- Passey mouse melanomas. The origin of premelanosomes and compound melanosomes. *J Histochem Cytochem*. <u>16</u>(5): 299-319.

Obermüller S: Recycling der Sauren Lysosomalen Phosphatase: Eingrenzung der Recycling-vermittelnden Aminosäuresequenz und Untersuchung möglicher Sortierungsfaktoren, die zur Umsetzung des Recycling benötigt werden. *Rer. nat. Diss. Göttingen* 2002.

Odorizzi G, Cowles CR & Emr SD (1998): The AP-3 complex: a coat of many colours. *Trends Cell Biol* <u>8</u>: 282-8.

Olusanya O, Andrews PD, Swedlow JR & Smythe E (2001): Phosphorylation of threonine 156 of the & mgr;2 subunit of the AP2 complex is essential for endocytosis in vitro and in vivo. *Curr Biol* <u>11</u>: 896-900.

Ooi CE, Moreira JE, Dellangelica EC, Poy G, Wassarman DA & Bonifacino JS (1997): Altered expression of a novel adaptin leads to defective pigment granule biogenesis in the drosophila eye color mutant garnet. *EMBO J* <u>16</u>: 4508-4518. Ooi C, Dell'Angelica E & Bonifacino J (1998): ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) regulates recruitment of the AP3 adaptor complex to membranes. *J Cell Biol* <u>142</u>: 391-402.

Owen D & Evans P (1998): A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. *Science* <u>282</u>: 1327-1332.

Owen, D, Collins B & Evans P (2004): Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev* Biol <u>20</u>: 153-91.

Peden AA, Rudge RE, Lui WW & Robinson MS (2002): Assembly and function of AP-3 complexes in cells expressing mutant subunits. *J Cell Biol* <u>156</u>: 327-36.

Peterson GL (1979): Review of the Folin phenol protein quantitation methods of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem* <u>100</u>: 210-202.

Pohlmann R, Wendland M, Boeker C & von Figura K (1995): The two mannose-6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins. *J Biol Chem* <u>270</u>: 27311-27318.

Pollard TD & Earnshaw WC: Cell Biology.1. Auflage; Elsevier Science, New York 2002.

Poussu A, Lohi O & Lehto VP (2000): Vear, a novel Golgi-associated protein with VHS and gamma-adaptin "ear" domains. *J Biol Chem* <u>275</u>: 7176-83.

Puertollano R & Bonifacino JS (2004): Interactions of GGA3 with the ubiquitin sorting machinery. *Nat Cell Biol* <u>6</u>: 244-51.

Qiagen<sup>®</sup> Effecten Transfection Reagent Handbook. 1. Auflage, Qiagen, Hilden 1999.

Qiagen<sup>®</sup> Plasmid Purification Handbook. 2. Auflage, Qiagen, Hilden 2003.

Rapoport I, Chen YC, Cupers P, Shoelson SE & 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* <u>17</u>: 2148-55.

Raposo G & Marks MS (2002): The dark side of lysosome-related organelles: specialization of the endocytic pathway for melanosome biogenesis. *Traffic* <u>3(4)</u>: 237-48.

Raposo G, Tenza D, Murphy DM, Berson JF & Marks MS (2001): Distinct Protein Sorting and Localization to Premelanosomes, Melanosomes, and Lysosomes in Pigmented Melanocytic Cells. *J Cell Biol* <u>152</u>(4): 809-824.

Reddy A, Caler EV & Andrews NW (2001): Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* <u>106</u>: 157-69.

Rein U, Andag U, Duden R, Schmitt HD & Spang A (2002): ARF-GAP-mediated interaction between the ER-Golgi v-SNAREs and the COPI coat. *J Cell Biol* <u>157(3)</u>: 395-404.

Ricotta D, Conner SD, Schmid SL, von\_Figura K & Honing S (2002): Phosphorylation of the AP2 mu subunit by AAK1 mediates high affinity binding to membrane protein sorting signals. *J Cell Biol* <u>156</u>: 791-5.

Robinson DG, Ehlers U, Herken R, Herrmann B, Mayer F, Schürrmann FW: Präparationsmethodik in der Elektronenmikroskopie. Springer Verlag, Berlin 1985.

Robinson MS & Bonifacino JS (2001): Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* <u>13</u>: 444-53.

Rodionov D & Bakke O (1998): Medium chains of adaptor complexes AP1 and AP2 recognize leucine based sorting signals from the invariant chain. *J Biol Chem* <u>273</u>: 6005-6008.

Rohde G, Wenzel D & Haucke V (2002): A phosphatidylinositol (4,5)bisphosphate binding site within mu2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* <u>158</u>: 209-14.

Rous BA, Reaves BJ, Ihrke G, Briggs JA, Gray SR, Stephens DJ, Banting G & Luzio JP (2002): Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol Biol Cell* <u>13</u>: 1071-82.

Sandoval IV & Bakke O (1994): Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends Cell Biol* <u>4</u>: 292-297.

Sandoval IV, Arredondo JJ, Alcalde J, Noriega AG, Vandekerckhove J, Jimenez MA & Rico M (1994): The residues Leu(IIe)(475)-IIe(Leu,Val,ALA)(476), contained in the extended carboxyl cytoplasmic tail, are critical for targeting of the resident lysosomal membrane protein limp II to lysosomes. *J Biol Chem* <u>269</u>: 6622-6631.

Saraste J, Palade GE & Farquhar MG (1986): Temperature-sensitive steps in the transport of secretory proteins through the Golgi complex in exocrine pancreatic cells. *Proc Natl Acad Sci* <u>83</u>(17): 6425-9.

Scott PM, Bilodeau PS, Zhdankina O, Winistorfer SC, Hauglund MJ, Allaman MM, Kearney WR, Robertson AD, Boman AL & Piper RC (2004): GGA proteins bind ubiquitin to facilitate sorting at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol* <u>6</u>: 252-9.

Seaman MNJ (2004): Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J Cell Biol* <u>165(1)</u>: 111-122.

Seiji M, Fitzpatrick T & Birbeck M (1961): The melanosome: a distinctive subcellular particle of mammalian melanocytes and the site of melanogenesis. *J Invest Dermatol* <u>36</u>: 243-52.

Sevrioukov E, He J, Moghrabi N, Sunio A & Krämer H (1999): A role for the deep orange and carnation eye colour genes in lysosomal delivery in drosophila. *Mol Cell* <u>4</u>: 479-486.

Shintani T & Klionsky DJ (2004): Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword. *Science* <u>306</u>(5698): 990-995.

Simmen T, Honing S, Icking A, Tikkanen R & Hunziker W (2002): AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat Cell Biol* <u>4</u>: 154-9.

Simon JP, Ivanov IE, Bo SS, Hersh D, Adesnik M & Sabatini DD (1996): The in vitro generation of post-Golgi vesicles carrying viral envelope glycoproteins requires an ARF-like GTP-binding protein and a protein kinase c associated with the golgi apparatus. *J Biol Chem* <u>271</u>: 16952-16961.

Simons K & Ikonen E (1997): Functional rafts in cell membranes. *Nature* <u>387</u>: 569-572.

Simpson F, Bright NA, West MA, Newman LS, Darnell RB & Robinson MS (1996): A novel adaptor-related protein complex. *J Cell Biol* <u>133</u>: 749-60.
Simpson F, Peden AA, Christopoulou L & Robinson MS (1997): Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J Cell Biol* <u>137</u>: 835-845

Sprong H, Degroote S, Claessens T, van Drunen J, Oorschot V, Westerink BHC, Hirabayashi Y, Klumperman J, van der Sluijs P & van Meer G (2001): Glycosphingolipids are required for sorting melanosomal proteins in the Golgi complex. *J Cell Biol* <u>155</u>(3): 369-380.

Stepp J, Huang K & Lemmon S (1997): The yeast adaptor protein complex, AP3, is essential for efficient delivery of alkaline phosphatase by the alternative pathway to the vacuole. *J Cell Biol* <u>139</u>: 1761-1774.

Storrie B & Kreis TE (1996): Probing the mobility of membrane proteins inside the cell. *Trends Cell Biol* <u>6(8)</u>: 321-324.

Taguchi T, Pypaert M & Warren G (2003): Biochemical Sub-Fractionation of the Mammalian Golgi Apparatus. *Traffic* <u>4</u>(5): 344-352.

Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lullmann-Rauch R, Janssen PM, Blanz J, von Figura K & Saftig P (2000): Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2- deficient mice. *Nature* <u>406</u>: 902-6.

Teo H, Veprintsev DB & Williams RL (2004): Structural Insights into Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT-I) Recognition of Ubiquitinated Proteins. *J Biol Chem* <u>279</u>(27): 28689-28696.

Tikkanen R, Göttingen: schriftliche Mitteilung, 1999.

Tokuyasu K (1980): Immunochemistry on ultrathin frozen sections. *Histochem J* <u>12(4)</u>: 381-403.

Umeda A, Meyerholz A & Ungewickell E (2000): Identification of the universal cofactor (auxilin 2) in clathrin coat dissociation. *Eur J Cell Biol* <u>79</u>: 336-42.

Van Dam EM & Stoorvogel W (2002): Dynamin-dependent transferrin receptor recycling by endosome-derived clathrin-coated vesicles. *Mol Biol Cell* <u>13</u>: 169-82.

Von Figura K & Hasilik A (1986): Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu Rev Biochem* <u>55</u>: 167-93.

Waguri S, Dewitte F, Le\_Borgne R, Rouille Y, Uchiyama Y, Dubremetz JF & Hoflack B (2003): Visualization of TGN to endosome trafficking through fluorescently labeled MPR and AP-1 in living cells. *Mol Biol Cell* <u>14</u>: 142-55.

Wasiak S, Legendre\_Guillemin V, Puertollano R, Blondeau F, Girard M, de Heuvel E, Boismenu D, Bell AW, Bonifacino JS & McPherson PS (2002): Enthoprotin: a novel clathrin-associated protein identified through subcellular proteomics. *J Cell Biol* <u>158</u>: 855-62.

Wessel D & Flugge UI (1984): A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* <u>138</u>: 141-3:

Witkop C, Nunez Babcock M, Rao G, Gaudier F, Summers C, Shanahan F, Harmon K, Townsend D, Sedano H & King R (1990): Albinism and Hermansky-Pudlak syndrome in Puerto Rico. *Bol Asoc Med P R* <u>82(8)</u>: 333-9.

Xu Y, Vijayasaradhi S, Takechi Y & Houghton A (1997): Sorting and secretion of a melanosome membrane protein, gp75/TRP1. *J Invest Dermatol* <u>109</u>: 788-795.

Yang W, Li C, Ward DM, Kaplan J & Mansour SL (2000): Defective organellar membrane protein trafficking in Ap3b1-deficient cells. *J Cell Sci* <u>113</u>: 4077-4086.

Zhen L, Jiang S, Feng L, Bright NA, Peden AA, Seymour AB, Novak EK, Elliott R, Gorin MB, Robinson MS, et al. (1999): Abnormal expression and subcellular distribution of subunit proteins of the AP-3 adaptor complex lead to platelet storage pool deficiency in the pearl mouse. *Blood* <u>94</u>: 146-55.

## Danksagung

Herrn PD Dr. rer. nat. Stefan Höning gilt mein ganz besonderer Dank. Er hat mir nicht nur dieses Thema bereitgestellt, sondern ohne seine vorbildhafte Betreuung wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen!

Auch bedanke ich mich bei Prof. Dr. med Dr. h.c. Kurt von Figura, in dessen Abteilung ich diese Arbeit durchführen konnte. Ihm danke ich aber im Besonderen für seine stetige Diskussionsbereitschaft.

Während dieser Arbeit konnte ich immer auf die Hilfe anderer Arbeitsgruppenmitglieder zählen. Ich bedanke mich bei jedem von ihnen für die angenehme Laboratmosphäre, insbesondere bei Chris, Anja, Steffi, Martin, Kristina, Anna und Kira. Von allen möchte ich dabei aber Frau Dr. med. Doris Ricotta besonders danken. Neben vielen Diskussionen stellte sie mir den AP-1/AP-2 Pool zur Verfügung.

Alle MTAs standen mir immer hilfreich zur Seite beim Erlernen von alltäglichen und auch nicht so alltäglichen Verfahren. Christina und allen voran Andrea gilt dabei mein besonderer Dank für jeden Kniff im nicht immer so einfachen Laborleben.

Ich danke den Arbeitsgruppenleitern aus dem ganzen Labor für jeden noch so kleinen Tip: Herrn PD Dr. rer. nat. Peter Schu für seine Hilfe bei der Präparation der embryonalen Fibroblasten, Frau Prof. Dr. rer. nat. Gabi Fischer von Mollard für ihre Hilfe mit den rabs, SNAREs und SNAPs, Jun. Prof. Dr. rer. nat. Torben Lübke für die Hilfe bei dem Assay zur Bestimmung der Galactosyltransferase-Aktivität und Prof. Dr. rer. nat. T. Dirks für die oft hilfreichen Ratschläge in allgemeinbiochemischen Belangen!

Allen anderen, nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Institutes danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

Für die Bereitstellung des Sec61α-Antikörpers bedanke ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Eno Hartmann/Lübeck. Mein Dank gilt auch der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Jahn am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, die mir dankenswerterweise Antikörper gegen rab5 zur Verfügung stellte. Besonders möchte ich aus dieser Arbteisgruppe Wolfram Antoni danken, der mir bei Markern und der subzellulären Fraktionierung immer hilfreich zur Seite stand, sowie bei Herrn Dr. rer. nat. Dirk Wenzel für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder und die Bereitstellung von Catalase- und LDH-Antikörpern.

Von Herrn Dr. rer. nat Dieter Schmidt aus der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. Dieter Gallwitz, ebenfalls am Max-Planck-Institut für physikalische Chemie in Göttingen tätig, habe ich netterweise die gereinigten ARF Proteine zur Verfügung gestellt bekommen.
## **Lebenslauf**

Am 12. Juni 1977 wurde ich als erstes Kind von Kornelia Chapuy, geb. Buhmann, und Volker Chapuy in Kassel geboren.

Nach der Grundschule in Herstelle-Beverungen von 1983 bis 1987 wechselte ich zum städtischen Gymnasium Beverungen. Innerhalb meiner Schullaufbahn lernte ich acht Jahre Englisch, viereinhalb Jahre Latein (großes Latinum) und zweieinhalb Jahre Russisch. Nach Abschluss des Gymnasiums mit der allgemeinen Hochschulreife 1996 absolvierte ich für 13 Monate meinen Zivildienst in der Hessenklinik Helmarshausen.

Von Oktober 1997 bis Juni 2004 studierte ich an der Georg-August-Universität Göttingen Humanmedizin an der ich meine vorärztliche Prüfung 8/1999, den 1. Teil der Ärztlichen Prüfung 4/2001, den 2. Teil 4/2003 und den 3. Teil 6/2004 bestand.

Im Rahmen meines Studiums famulierte ich an der Hessenklinik Helmarshausen, an der Universität Göttingen sowie am General-Hospital der Insel Jersey/UK. Mein praktisches Jahr habe ich am Kantonsspital St. Gallen/Schweiz, der Georg-August-Universität Göttingen und an der University of West Virginia, Morgantown/USA absolviert.

Während meiner klinischen Studienzeit war ich in der Fachschaftsgruppe "Unabhängige Mediziner" engagiert und habe dabei zahlreiche Orientierungsphasen und die Fachschaftszeitung "Äskulap" als Redakteur mitgestaltet. Neben verschiedenen Funktionen in der studentischen Selbstverwaltung war ich Studierendenvertreter im Fakultätsrat Medizin, in der Forschungskommission vom Bereich Humanmedizin und in der Universität sowie im Konzil bis zu seiner Auflösung. Als Studierendenvertreter war ich in den Vorstand des Göttinger Zentrums für Molekulare Biowissenschaften (GZMB) für den Zeitraum 4/2001 bis 4/2004 gewählt.

Seit Oktober 1999 promoviere ich im Labor von PD Dr. rer. nat. S. Höning in der Abteilung Biochemie II unter der Leitung von Prof. Dr. K. von Figura über das vorliegende Thema.

Von August bis September 2004 arbeitete ich zunächst als Arzt im Praktikum und seit Erhalt meiner Vollapprobation im Oktober 2004 als Assistenzarzt in der Abteilung Hämatologie und Onkologie an der Georg-August-Universität Göttingen.