

Aus der Abteilung Biochemie II
(Prof. Dr. rer. nat. P. Rehling)
im Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Molekulare Charakterisierung des murinen 66.3-kDa-Proteins

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Florian G. Deuschl

aus

Dachau

Göttingen 2008

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: JProf. Dr. rer. nat. T. Lübke

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Lysosomen	2
1.2	Lysosomale Proteine	2
1.2.1	Synthese und Sortierung lysosomaler Matrixproteine	2
1.2.2	Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren	4
1.3	Lysosomale Speichererkrankungen	4
1.4	Therapie von lysosomalen Speichererkrankungen	5
1.5	Proteomanalyse des Lysosoms	7
1.5.1	Aufreinigung M6P-markierter-Proteine aus MPR-defizienten Mausfibroblasten	7
1.5.2	Analyse des lysosomalen Proteoms	7
1.6	Klonierung und stabile Expression des 66.3-kDa-Proteins	10
1.7	MPR-Bindung und MPR-abhängige Internalisierung des 66.3-kDa-Proteins	10
1.8	Fragestellung	14
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Material	16
2.1.1	Geräte	16
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3	Chemikalien	19
2.1.4	Enzyme	23
2.1.5	Standards	23
2.1.6	Kits für das Arbeiten mit RNA, DNA und Protein	23
2.1.7	Radioaktive Substanzen	23
2.1.8	Säulen und Säulenfüllmaterial	24
2.1.9	Antikörper	24
2.1.9.1	Primärantikörper	24
2.1.9.2	Sekundärantikörper	25
2.1.10	Tierversuchsanträge und -genehmigungen	25
2.1.11	Zelllinien	25
2.1.12	Häufig verwendete Puffer und Stammlösungen	26

2.1.13 Medien und Stammlösungen zur Anzucht eukaryoter Zellen.....	26
2.1.14 Medien zur Kultur prokaryoter Zellen.....	27
2.1.15 EDV	27
2.2 Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1 Methoden zum Arbeiten mit DNA	28
2.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	28
2.2.1.2 DNA-Präzipitation mit Ethanol.....	28
2.2.1.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	29
2.2.1.4 Agarosegel-Elektrophorese.....	29
2.2.1.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	30
2.2.1.6 Ligation.....	30
2.2.1.7 DNA-Amplifikation über die Polymerase-Ketten-Reaktion.....	31
2.2.1.8 Herstellung chemisch kompetenter DH5 α - <i>Escherichia-coli</i>	32
2.2.1.9 Transformation chemisch kompetenter DH5 α - <i>Escherichia-coli</i>	32
2.2.1.10 Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	33
2.2.1.11 Midi-Präparation von Plasmid-DNA.....	33
2.2.2 Methoden zum Arbeiten mit RNA	34
2.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von RNA.....	34
2.2.2.2 RNA-Präparation aus Mausgeweben.....	34
2.2.2.3 Northern Blot.....	35
2.2.2.4 Markierung einer DNA - Sonde mit α - [³² P]- dCTP	36
2.2.2.5 Hybridisierung der α -[³² P]-dCTP-markierten Sonde.....	36
2.3 Zellbiologische Methoden	37
2.3.1 Methoden zum Arbeiten mit eukaryoten Zellen	37
2.3.1.1 Kultivieren.....	37
2.3.1.2 Passagieren.....	37
2.3.1.3 Kryokonservieren	38
2.3.1.4 Revitalisieren.....	38
2.3.2 Transfektion von eukaryoten Zellen.....	38
2.3.3 Gewinnung von Zellkulturmedium zur Proteinaufreinigung.....	39
2.4 Histologische Methoden.....	39
2.4.1 Indirekte Immunfluoreszenz	39
2.4.2 Methanol-Fixierung und Antikörperinkubation.....	39
2.5 Biochemische Methoden	40
2.5.1 Gewinnung von Zell- und Gewebhomogenaten.....	40
2.5.2 Proteinbestimmung mit dem <i>BioRad-DC-Protein-Assay</i>	40
2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	41
2.5.4 Silberfärbung.....	42

2.5.5 Färbung nach Coomassie.....	43
2.5.6 Western Blot (<i>Semi-Dry</i>) und Immundetektion	43
2.5.7 Freiwaschen einer PVDF-Membran.....	44
2.5.8 Färbung einer PVDF-Membran für die N-terminale Sequenzierung	45
2.5.9 Ni-NTA-Aufreinigung des 66.3-kDa-Proteins aus Zellkulturüberstand	45
2.5.10 HPLC-Aufreinigung	46
2.5.11 Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen das 66.3-kDa-Protein	47
2.5.12 Edman-Abbau.....	47
2.5.13 Massenspektrometrie	48
2.5.14 TCA-Fällung von Protein	48
2.5.15 Reinigung von <i>Pansorbin</i>	48
2.5.16 Metabolische Markierung von Proteinen mit [³⁵ S]-Methionin/Cystein	49
2.5.17 Immunpräzipitation des metabolisch markierten 66.3-kDa-Proteins.....	49
2.5.18 Subzelluläre Fraktionierung (Tritosomenpräparation)	50
2.5.19 Enzymaktivitätsbestimmung	52
2.5.19.1 β -Hexosaminidase (Lysosom).....	52
2.5.19.2 β -Glucuronidase (Lysosom).....	52
2.5.19.3 Succinatdehydrogenase (Mitochondrium)	53
2.5.19.4 Glukose-6-Phosphatase (Endoplasmatisches Retikulum).....	53
2.5.20 Membranassoziation	53
2.5.21 Deglykosylierung mit N-Glykosidase F (PNGase F)	54
2.5.22 Affinitätschromatographie an 66.3-kDa-Protein-Affigel-10-Matrix.....	54
2.5.23 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Bindungspartnern	55
2.5.24 Yeast-two-Hybrid	56
2.5.24.1 Klonierung.....	56
2.5.24.2 Hefekultur	57
2.5.24.3 Transformation von Hefen	58
2.5.24.4 His- / -Adenin- / X-Gal-Test.....	59
2.6 Tierexperimentelle Versuche.....	60
2.6.1 Maushaltung	60
2.6.2 Entnahme von Organen	60

3	ERGEBNISSE	61
3.1	Klonierung und Expression des 66.3-kDa-Proteins	62
3.1.1	Klonierung des 66.3-kDa-Proteins mit RGS-His6-Markierung	62
3.1.2	Stabile Expression des RGS-His6-markierten 66.3-kDa-Proteins in HT1080	62
3.2	Aufreinigung des 66.3-kDa-Proteins	63
3.3	Herstellung eines Antiserums	65
3.4	Charakterisierung der aufgereinigten Polypeptide (75, 66, 40, 28 und 15 kDa)	66
3.5	Expression des 66.3-kDa-Proteins in murinen Geweben	68
3.5.1	Gewebespezifische Expression des 66.3-kDa-Proteins auf Transkriptebene	68
3.5.2	Proteinexpressionslevel im Western Blot auf murine Gewebe	69
3.6	Lysosomale Lokalisation des endogenen 66.3-kDa-Proteins	70
3.6.1	Das endogene 66.3-kDa-Protein in der Immunfluoreszenz	70
3.6.2	Nachweis des 66.3-kDa-Proteins mittels subzellulärer Fraktionierung von Mausleber	72
3.7	Charakterisierung des 66.3-kDa-Proteins in HT1080	76
3.7.1	Überprüfung auf Disulfidbrücken	76
3.7.2	N-Glykosylierung des 66.3-kDa-Proteins in HT1080-Zellen	77
3.7.3	Membranassoziation oder Matrix-Protein	78
3.7.4	Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins in HT1080	80
3.7.5	Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins in 3T3-Zellen	81
3.8	Funktionelle Analyse des 66.3-kDa-Proteins	82
3.8.1	Identifizierung von Interaktionspartnern durch Affinitätschromatographie	82
3.8.2	<i>Yeast-two-Hybrid (Y2H)</i> mit dem 66.3-kDa-Protein und Cathepsin D	87
3.8.3	Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins in Abhängigkeit von Cathepsin D	88
3.8.3.1	Verdau des 66.3-kDa-Proteins mit Cathepsin D	89
3.8.3.2	Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins in Cathepsin-D-defizienten MEF	89
3.8.4	Subzelluläre Verteilung des 66.3-kDa-Proteins in Abhängigkeit von Cathepsin D (Cathepsin-D-defiziente MEF)	90

4	DISKUSSION	92
4.1	Bioinformatische Analyse	93
4.1.1	Homologe Proteine des 66.3-kDa-Proteins	94
4.2	Nachweis der subzellulären Lokalisation	96
4.2.1	Expression und Aufreinigung des 66.3-kDa-Proteins	96
4.2.2	Lysosomale Lokalisation des 66.3-kDa-Proteins	97
4.3	Molekulare Charakterisierung des 66.3-kDa-Proteins	98
4.3.1	Gewebesspezifische Expression des 66.3-kDa-Proteins	98
4.3.2	Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins	99
4.3.3	Posttranslationale Modifikation des 66.3-kDa-Proteins	100
4.4	Funktionelle Analyse des 66.3-kDa-Proteins	101
4.4.1	Identifizierung von Bindungspartnern	101
4.5	Ausblick	105
5	ZUSAMMENFASSUNG	106
6	ANHANG	108
6.1	Ergebnis der Proteomanalyse von Kollmann et al. (2005)	109
6.2	Klonierung des 66.3-kDa-Proteins in HT1080	111
6.2.1	Primer	111
6.2.2	Vektor	111
6.3	<i>Yeast-two-Hybrid</i>	112
6.3.1	Vektorkarten	112
6.3.2	<i>Yeast-two-Hybrid</i> -Klonierung	114
6.3.3	Sequenzvergleich des 66.3-kDa-Proteins mit homologen Proteinen	115
7	LITERATURVERZEICHNIS	116

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Ade	Adenin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
β-Gluc.	β-Glucuronidase
β-Hex.	β-Hexosaminidase
BHK21	<i>Cell-type-Syrian-hamster-kidney-21</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
<i>C. familiaris</i>	<i>Canis familiaris</i>
Cat-D	Cathepsin D
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie ($2,22 \times 10^6$ counts per minute)
CMV	Zytomegalievirus
cpm	Zählpulse pro Minute (counts per minute)
Cys	Cystein
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
dATP	Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-Triphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dFKS	Dialysiertes, hitzeinaktiviertes FKS
dGTP	Desoxyguanin-5'-Triphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagles medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	die vier Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat

ε	Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Endo-H	Endo- β -N-Acetylglucosaminidase H
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS und [-MS/MS]	<i>Electrospray-ionisation-[tandem]-mass-spectrometry</i>
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
FKS	fötale Kälberserum
g	Gramm
$\times g$	-fache Erdbeschleunigung
G6P	Glukose-6-Phosphat
G6Pase	Glukose-6-Phosphatase
Gal	Galaktose
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
His	Histidin
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horse-radish-peroxidase</i>
HSP60	<i>Heat-shock-protein-60</i>
HT1080	humane Fibrosarkom-Zelllinie
HT1080-66	66.3-kDa-Protein-überexprimierende HT1080
IMM	Immunomix
JAA	Jodacedamin
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
LAMP-1/-2	Lysosomal assoziiertes Membranglykoprotein-1/-2
Leu	Leucin
LSD	Lysosomale Speichererkrankung (<i>Lysosomal Storage Disorder</i>)
LSM	Laserscanmikroskop
M	molar
μ	<i>mikro</i>
m	milli

MALDI-TOF-MS	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
MEF	embryonale Mausfibroblasten
MES	2-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
Met	Methionin
MHCII	<i>Major histocompatibility complex II</i>
min	Minuten
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
Mops	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MPR 300	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor mit 300 kDa
MPR 46	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor mit 46 kDa
MudPIT	<i>Multidimensional protein identification technology</i>
M6P	Mannose-6-Phosphat
n	nano
Ni-NTA	<i>Nickel-nitrilotriacetic acid</i>
NP-40	Nonidet P-40
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannt
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	<i>Pondus hydrogenii</i> (negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration)
PIMM	Präzipitationsimmunomix
PMF	<i>Peptide mass fingerprint</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNGase F	Peptid-N-Glykosidase F
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ρ	Dichte
RGS-His6	Arginin-Glycin-Serin-6 \times -Histidin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA-interference</i>
Rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)

RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDH	Succinatdehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
Ser	Serin
SSC	<i>Standard saline citrate</i>
t	Zeit
Tab.	Tabelle
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Trp	Tryptophan
U	Einheit (<i>Unit</i>)
UAS	Upstream Activating Sequence
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
V/cm	Volt/Zentimeter
v/v	Volumen zu Volumen
w/v	Gewicht zu Volumen
<i>Y2H</i>	<i>Yeast-two-Hybrid</i>
YPDA	<i>Yeast peptone dextrose adenine</i>
z. B.	zum Beispiel

Chemische Elemente wurden mit den üblichen Buchstaben abgekürzt. Die Aminosäuren wurden entweder im Drei- oder Einbuchstabencode angegeben. Bei einigen Begriffen wurden die englischen Fachtermini benutzt, weil auch in der deutschsprachigen Fachliteratur eine Übersetzung dieser Begriffe unüblich und unzureichend ist.

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1-1	3
Abb. 1-2	6
Abb. 1-3	9
Abb. 1-4	11
Abb. 1-5	12
Abb. 1-6	13
Abb. 2-1	36
Abb. 2-2	44
Abb. 3-1	63
Abb. 3-2	64
Abb. 3-3	65
Abb. 3-4	66
Abb. 3-5	66
Abb. 3-6	67
Abb. 3-7	68
Abb. 3-8	69
Abb. 3-9	71
Abb. 3-10	72
Abb. 3-11	75
Abb. 3-12	76
Abb. 3-13	77
Abb. 3-14	78
Abb. 3-15	78
Abb. 3-16	79
Abb. 3-17	80
Abb. 3-18	81
Abb. 3-19	83
Abb. 3-20	84
Abb. 3-21	87
Abb. 3-22	89
Abb. 3-23	89
Abb. 3-24	91
Abb. 4-1	94
Abb. 4-2	94
Abb. 6-1	111
Abb. 6-2	111
Abb. 6-3	112
Abb. 6-4	112
Abb. 6-5	113
Abb. 6-6	113
Abb. 6-7	115

Tabellenverzeichnis:

Tab. 2-1	24
Tab. 2-2	25
Tab. 2-3	30
Tab. 2-4	40
Tab. 2-5	41
Tab. 2-6	46
Tab. 2-7	47
Tab. 3-1	66
Tab. 3-2	74
Tab. 3-3	86
Tab. 3-4	88
Tab. 6-1	109
Tab. 6-2	114

1 Einleitung

1.1 Lysosomen

Zellen eukaryotischer Organismen sind in funktionell unterschiedliche Kompartimente, die so genannten Organellen, unterteilt. Das Lysosom als Organell wurde 1955 von de Duve erstmals beschrieben und ist von einer einfachen Membran umgeben (de Duve 1963; de Duve et al. 1955). Das Lumen des Lysosoms wird auch als lysosomale Matrix bezeichnet und die darin vorkommenden, löslichen Proteine als lysosomale Matrixproteine.

Die Hauptfunktion des Lysosoms ist die enzymatische Degradation von Makromolekülen durch saure Hydrolasen (de Duve 1983). Saure Hydrolasen sind hydrolytisch aktive Enzyme, die zum überwiegenden Teil der Gruppe der lysosomalen Matrixproteine zugeordnet werden. Es sind bislang über 50 Hydrolasen bekannt (Sleat et al. 2006b), die ihrer Funktion nach in Nukleasen, Proteasen, Glykosidasen, Lipasen, Phosphatasen, Sulfatasen und Phospholipasen eingeteilt werden. Lysosomale Hydrolasen entfalten ihr Funktionsoptimum bei einem sauren pH-Wert von 4,7-4,8 (Ohkuma und Poole 1978), der in den Lysosomen durch die membranständige H^+ -ATPase vom V-Typ (Cuppoletti et al. 1987) und den lysosomalen Chloridkanal *CLC7* (Jentsch et al. 2002) generiert wird. Die abzubauenen Makromoleküle gelangen einerseits durch Phagozytose und rezeptorvermittelte Endozytose aus dem Extrazellulärraum (Goldstein et al. 1985) und andererseits in autophagozytotischen Vakuolen aus dem Zytoplasma in das Lysosom (Ahlberg et al. 1982; Arstila und Trump 1968). Nach dem Abbau im Lysosom gelangen die Abbauprodukte über spezifische Transportkanäle ins Zytoplasma zurück und stehen der Zelle dort erneut für den Stoffwechsel zur Verfügung (Gahl et al. 1982; Rome und Hill 1986).

Neben der katabolen Funktion werden dem Lysosom auch andere wichtige zelluläre Aufgaben zugesprochen (Sun-Wada et al. 2003), z.B. bei der Antigenpräsentation durch Klasse-II-MHC-Proteine (Geuze 1998), der Regulation von Hormonen und Wachstumsfaktoren (Brix et al. 2001) und der Knochenumbildung (Baron et al. 1985; Saftig et al. 2000).

1.2 Lysosomale Proteine

1.2.1 Synthese und Sortierung lysosomaler Matrixproteine

Die meisten lysosomalen Matrixproteine werden anhand einer N-terminalen Signalsequenz, dem so genannten Signalpeptid, am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und dabei in das Lumen des ER transloziert. Dort erfolgt die Abspaltung der Signalsequenz und die

N-Glykosylierung an einem oder mehreren Asparaginresten (Kornfeld R und Kornfeld S 1985). Nach dem Transport in den Golgi-Apparat erfahren die Proteine weitere Modifikationen (von Figura und Hasilik 1986). Die wichtigste Modifikation für lysosomale Matrixproteine ist die Mannose-6-Phosphat-Markierung (M6P). Bei dieser den lysosomalen Matrixproteinen spezifischen Modifikation wird im Cis-Golgi-Apparat ein Mannose-Rest der N-Glykane an Position 6 phosphoryliert (Pohlmann et al. 1982). Diese M6P-Markierung dient als Signal für den Transport in das lysosomal-endosomale Kompartiment.

Im Trans-Golgi-Kompartiment binden die M6P-haltigen Proteine an einen der beiden membranständigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR), MPR46 oder MPR300 (Hille-Rehfeld 1995). Mittels *Clatrin-coated-Vesikeln* werden die M6P-haltigen Proteine zu den Endosomen transportiert (Kornfeld S 1992) und dissoziieren dort pH-abhängig nach der Fusion von Vesikel und Endosom vom Rezeptor (Dahms et al. 1989). Die Proteine gelangen über den endosomal-lysosomalen Weg in die Lysosomen, während die Rezeptoren zurück zum Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zirkulieren oder zur Zellmembran gelangen (von Figura und Hasilik 1986). Die Vorläuferformen der lysosomalen Enzyme werden teilweise endosomal, jedoch zum größeren Teil lysosomal proteolytisch zu reifen Enzymen prozessiert (Hasilik 1992) und der M6P-Rest dephosphoryliert (Bresciani und Von Figura 1996; Kornfeld S und Mellman 1989).

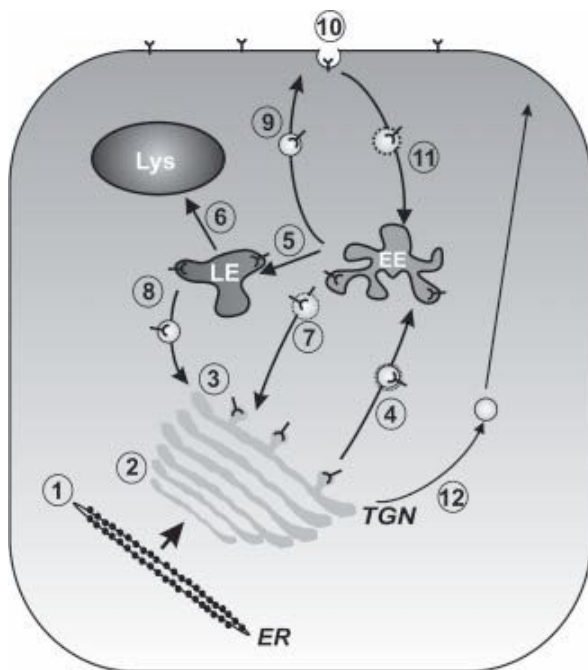


Abb. 1-1: Schema für den intrazellulären Transport von MPR's und Proteinen zum Lysosom

(1) Lösliche lysosomale Enzyme werden am ER synthetisiert und in das Lumen des ER transloziert. (2) Im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) werden die Enzyme mit M6P modifiziert und die Bindung (3) an die MPRs findet statt. (4) Der Liganden-Rezeptor-Komplex wird in Vesikeln zu den frühen Endosomen (Early Endosomes = EE) transportiert. (5) Der saure pH-Wert in Endosomen führt zu einer Dissoziation der Rezeptor-Ligandenbindung. (6) Die Enzyme gelangen ins Lysosom und die Rezeptoren zirkulieren zurück zum TGN (7 und 8) oder zur Plasmamembran (9). (10) Exogene, M6P-markierte Proteine können über den MPR300 internalisiert werden und gelangen über den endozytotischen Weg (11) in das Lysosom. Lysosomale Proteine, die im TGN nicht an MPRs binden, werden in den extrazellulären Raum sezerniert (12). (Storch und Braulke, 2005, S. 18).

1.2.2 Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren

Mannose-6-Phosphat Rezeptoren (MPR) sind integrale Membranproteine (Dahms et al. 1987; Dahms et al. 1989), die M6P-haltige Proteine binden und somit für deren spezifischen Transport in die Lysosomen sorgen. Die MPRs unterscheiden sich zum einen durch ihre namensgebenden Molekulargewichte von 46- bzw. 300-kDa und zum anderen in ihrer Abhängigkeit Kationen-abhängig (MPR46) bzw. Kationen-unabhängig (MPR300) M6P-haltige Proteine zu binden. Beide Rezeptoren kommen im Golgi-Apparat und den endosomalen Kompartimenten, nicht aber im Lysosom vor. In geringerer Anzahl sind MPRs auch an der Außenseite der Zellmembran lokalisiert, wobei jedoch nur der MPR300 extrazellulär M6P-Liganden zu binden und zu internalisieren vermag (Byrd und MacDonald 2000; Byrd et al. 2000; Stein et al. 1987; York et al. 1999).

1.3 Lysosomale Speichererkrankungen

Die Gruppe der lysosomalen Speichererkrankungen (engl. *Lysosomal Storage Disorder* = LSD) umfasst bislang über 40 Erkrankungen, die zumeist durch Defekte in lysosomalen Matrixproteinen hervorgerufen werden (Vellodi 2005). Gemeinsam ist dem Großteil der Erkrankungen die Akkumulation von nicht-degradierten Makromolekülen in Lysosomen und Speichervesikeln durch den Defekt eines Enzyms oder eines enzymalen Cofaktors (Gieselmann 1995). Die LSDs werden nach ihrem jeweiligen Defekt in fünf Gruppen eingeteilt: a) Defekte im Glykanabbau, b) Defekte im Lipidabbau, c) Defekte im Proteinabbau, d) Defekte lysosomaler Transporter und e) Defekte bei der lysosomalen Sortierung (Tollersrud und Berg 2005).

Fasst man die LSDs als Gruppe zusammen, kommt auf 8000 gesunde Neugeborene ein Neugeborenes mit einer LSD (Meikle et al. 1999; Poorthuis et al. 1999). Bis auf die Fabry-Erkrankung (Masson et al. 2004), die Hunter-Erkrankung (Hopwood et al. 1993) und die Danon-Erkrankung (Nishino et al. 2000), die x-chromosomal vererbt werden, werden alle anderen bekannten LSDs autosomal-rezessiv vererbt. Der klinische Verlauf der meisten LSDs ist progressiv (Vellodi 2005). Jede LSD für sich betrachtet variiert in ihrer Prävalenz nicht nur geographisch, sondern auch zwischen einzelnen Ethnien erheblich. So treten z.B. die Gaucher-Erkrankung (Horowitz et al. 1998) und die Tay-Sachs-Erkrankung (Myerowitz 1997) bei Askenasi-Juden 20-mal bzw. 10-mal häufiger als in der Durchschnittsbevölkerung auf.

Ebenso wie die Prävalenz variiert auch der Phänotyp lysosomaler Speichererkrankungen stark, so dass der Genotyp nur bedingt Aussagen über den Phänotyp zulässt. Dies ist zum einen abhängig vom Enzymdefekt und liegt zum anderen daran, dass es bei manchen Erkrankungen

erst ab einer sehr geringen Restaktivität zur Ausprägung eines Phänotyps kommt (Conzelmann und Sandhoff 1983). Die Ausprägung verschiedener LSDs ist daher nicht nur bei Erkrankungen verschiedener Genese, sondern auch bei ein und derselben Erkrankung von Patient zu Patient sehr heterogen. Geringe enzymatische Restaktivität kann zum Beispiel bei der β -Galaktosidase-Defizienz zu einem milden Krankheitsverlauf (MPS IV) mit einem so genannten *Late onset* ohne neuronale Beteiligung führen, während sich bei einer Nullmutation des defekten Enzyms ohne entsprechende Restaktivität ein rasch fortschreitender Krankheitsverlauf (GM1-Gangliosidose) mit so genanntem *Early onset* und schwersten neurologischen Symptomen manifestiert (Suzuki et al. 2001).

Die Symptome einer LSD hängen neben der enzymatischen Restaktivität auch von den betroffenen Gewebe- bzw. Zelltypen ab. Zellen, in denen das Substrat besonders stark umgesetzt wird, bilden schnell große Speichervesikel und sind in ihrer Funktion eingeschränkt, wohingegen die Morphologie und Funktion anderer Zellen gänzlich erhalten bleiben kann (Neufeld und Muenzer 2001). Häufig sind besonders die Zellen des Nervensystems von der Überladung durch Speichervesikel beeinträchtigt, was die schweren neurologischen Defizite der meisten Patienten erklärt. So sind die Leitsymptome vieler lysosomaler Speichererkrankungen mentale Retardierung und Demenz, sowie motorische und sensorische Störungen. Aber auch Funktionsausfälle und Beeinträchtigung der viszerale Organe, der Herz- und Skelettmuskeln, sowie der Knochen- und Knorpelgewebe sind je nach Erkrankung möglich (Futerman und van Meer 2004; Gieselmann 1995; Vellodi 2005).

1.4 Therapie von lysosomalen Speichererkrankungen

Es sind mehrere Ansätze zur Behandlung von LSDs beschrieben. Der Enzymersatztherapie wird wegen ihrer guten Erfolgsaussichten eine besondere Stellung eingeräumt. Sie bedient sich meist rekombinanter M6P-haltiger, lysosomaler Enzyme, die an den membranständigen MPR300 binden und von der Zelle aus dem Extrazellulärraum internalisiert und ins Lysosom transportiert werden können. Die funktionelle Enzymersatztherapie ist bereits in klinischer Anwendung, z.B. bei der Gaucher-Erkrankung (Barton et al. 1991; Weinreb et al. 2002; Whittington und Goa 1992), der Fabry-Erkrankung (Eng CM et al. 2001; Mignani und Cagnoli 2004) und der Hurler-Erkrankung (Kakkis et al. 2001; Wraith et al. 2004). Für andere Erkrankungen laufen klinische Studien, wie z.B. bei der Mucopolysaccharidose VI (Harmatz et al. 2006) oder vorklinische Studien im Tiermodell, wie z.B. bei der α -Mannosidose (Roces et al. 2004). Die Enzymersatztherapie wird weiterhin die zentrale Rolle einnehmen, insbesondere

wenn effizientere Wege für die Passage von therapeutisch wirksamen Enzymmengen über die Blut-Hirn-Schranke beschrieben werden und damit eine Verbesserung von neurologischen Phänotypen erreicht wird.

Ein zweiter, vielversprechender Ansatz ist die symptomatische Therapie durch die Inhibition der Substratbiosynthese, so z.B. bei der Tay-Sachs-Erkrankung (Platt et al. 1997) und der Sandhoff-Erkrankung (Jeyakumar et al. 1999). Weitere Ansätze zur Therapie von LSDs sind die Knochenmarkstransplantation wie z.B. bei der α -Mannosidose (Wall et al. 1998) und die in-vivo-Gentherapie (Cheng und Smith 2003) durch adenoviralen Gentransfer wie z.B. im Mausmodell bei Mucopolysaccharidose VII (Ohashi et al. 1997) sowie die Optimierung der enzymatischen Restaktivität durch chemische Chaperone wie z.B. im Mausmodell bei GM1-Gangliosidose (Matsuda et al. 2003). Für eine Übersicht der einzelnen Therapieansätze vergleiche Abb. 1-2.

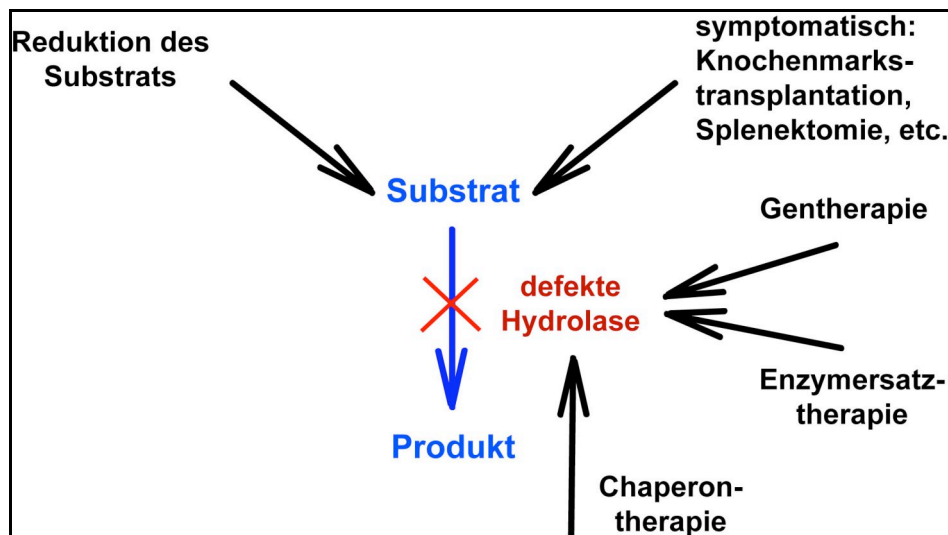


Abb. 1-2: Therapieansätze lysosomaler Speichererkrankungen

Therapien von lysosomalen Speichererkrankungen können in solche eingeteilt werden, die direkt auf Ebene der Hydrolase ansetzen, und solche, die symptomatisch entweder das umzusetzende Substrat reduzieren oder die Symptome behandeln. Modifiziert nach Futerman und van Meer (2004, S. 562).

Trotz der Fortschritte auf dem Gebiet der klinischen Diagnostik und Therapie lysosomaler Erkrankungen sind viele Erkrankungen mit lysosomaler Speicherung derzeit noch nicht therapierbar. Zudem gibt es immer noch Erkrankungen unbekannter Ätiologie, so z.B. die neuronale Ceroid-Lipofuszinose Typ 4 (CLN-4) (Berkovic et al. 1988).

1.5 Proteomanalyse des Lysosoms

Im Allgemeinen ist das Proteom als die Gesamtheit aller in einem Organismus vorkommenden Proteine definiert. Das lysosomale Proteom umfasst als „Sub-Proteom“ demnach alle im Lysosom vorkommenden Proteine. Da bis jetzt annähernd jedem bekannten lysosomalen Matrixprotein eine lysosomale Erkrankung zugeordnet werden kann, soll das lysosomale Proteom möglichst vollständig analysiert werden.

In den Vorarbeiten zur vorliegenden Arbeit wurde eine Proteomanalyse lysosomaler Matrixproteine in der Maus durchgeführt. Das Mausmodell bietet dabei mehrere Vorteile, so z.B. die einfache Zugänglichkeit für Gewebeprobe, die vollständige Analyse des Mausgenoms (über 90 % Homologie zum Menschen) und die Möglichkeit, über *Knock-out*-Mäuse Krankheitsmodelle für lysosomale Speichererkrankungen zu etablieren. Die Arbeitsgruppe konnte bei der Proteomanalyse neben 34 bekannten lysosomalen Proteinen drei bis dahin unbekannte Proteine identifizieren (Kollmann et al. 2005). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem nach seiner Molekularmasse von 66.3 kDa benannten, putativ lysosomalen 66.3-kDa-Protein.

1.5.1 Aufreinigung M6P-markierter-Proteine aus MPR-defizienten Mausfibroblasten

Für eine Sub-Proteomanalyse müssen Organellen üblicherweise hoch rein aus Zellen isoliert werden. Lysosomale Matrixproteine lassen sich aufgrund ihres M6P-Restes (vgl. Kap. 1.2.2) von anderen Proteinen trennen. In der Abteilung sind embryonale Mausfibroblasten (MEF) etabliert, die defizient für MPRs sind (MPR46 *-/-* und MPR300 *-/-*) und M6P-haltige Proteine nicht in das Lysosom transportieren, sondern in den extrazellulären Raum bzw. in das Zellkulturmedium sezernieren. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden M6P-haltige Proteine aus Zellkulturüberstand mittels Affinitätschromatographie über die Bindung von M6P an immobilisierten MPRs von den nicht M6P-haltigen Proteinen getrennt (Kollmann et al. 2005).

1.5.2 Analyse des lysosomalen Proteoms

Zur Identifizierung der M6P-haltigen Proteine wurden nach der Aufreinigung zwei unterschiedliche Verfahren angewendet. Im ersten Verfahren wurden die M6P-haltigen Proteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese getrennt. In der ersten Dimension wurden die Proteine durch die isoelektrische Fokussierung anhand ihres isoelektrischen Punktes an einem immobilisierten pH-Gradienten getrennt. In der zweiten Dimension wurden sie elektrophoretisch durch SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht separiert. Die Proteine wurden tryptisch

verdaut, massenspektrometrisch (*Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* = MALDI-TOF-MS) analysiert und schließlich anhand ihrer PMF (Peptide mass fingerprint) über die *NCBI Entrez Gene*-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) identifiziert. Abb. 1-3A zeigt die aufgetrennten Proteine, Abb. 1-3B zeigt die Nummerierung und die dem 66.3-kDa-Protein zugeordneten Spots. 198 von 201 *Spots* wurden erfolgreich analysiert.

Beim zweiten Verfahren zur Analyse des lysosomalen Proteoms wurden die an der MPR-Matrix isolierten Proteine mit der so genannten MudPIT-Analyse (*Multidimensional-protein-identification-technology*) analysiert. Dabei werden die M6P-haltigen Proteine nach der Elution von der MPR-Säule tryptisch verdaut und durch zwei chromatographische Schritte anhand ihrer Ladung an einem starken Kationenaustauscher und anschließend anhand ihrer Hydrophobizität an einer *reversed-phase*-Säule aufgetrennt. Die Analyse der aufgetrennten Peptide erfolgte direkt über das angeschlossene ESI-MS und ESI-MS/MS (*Electrospray Ionisation [tandem] Mass Spectrometry*). Die Identifizierung der Proteine fand ebenfalls über die oben erwähnte Datenbank durch Abgleich der erhaltenen Aminosäuresequenzen statt. Dabei galt ein Protein als eindeutig identifiziert, wenn mindestens zwei unterschiedliche Peptide mit jeweils fünf Aminosäuren einem Protein zugeordnet werden konnten (vgl. Tab. 6-1).

Mittels 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF konnten 28 bekannte lysosomale Proteine, ein bekanntes, aber nicht lysosomales Protein und drei noch nicht beschriebene Proteine identifiziert werden. Eines dieser nicht beschriebenen Proteine war das 66.3-kDa-Protein, das in 17 *Spots* (vgl. die *Spot*-Nummern in Abb. 1-3: Nr. 9, 67-70, 162-167, 177-181 und 200) identifiziert wurde. Es fand sich eine Gruppe von *Spots* mit einer apparenten Größe von 66 kDa bei pH 5 (67-70), eine Gruppe mit einer apparenten Größe von 40 kDa bei pH 6,5 (162-167, 200) und eine Gruppe mit einer apparenten Größe von 30 kDa bei pH 4,5 (177-181). Bei der MudPIT-Analyse konnten neben 22 bereits in der MALDI-TOF-MS-Analyse identifizierten Proteinen zusätzlich sechs weitere bekannte lysosomale Proteine, sowie drei bekannte nicht-lysosomale Proteine und vier potentiell lysosomale Proteine identifiziert werden. Das 66.3-kDa-Protein konnte mit sechs spezifischen Peptiden (mit entsprechend sieben, sieben, neun, zehn, 13 und 15 Aminosäuren) identifiziert werden. Die Peptide deckten damit 16 % der Proteinsequenz des 66.3-kDa-Proteins ab.

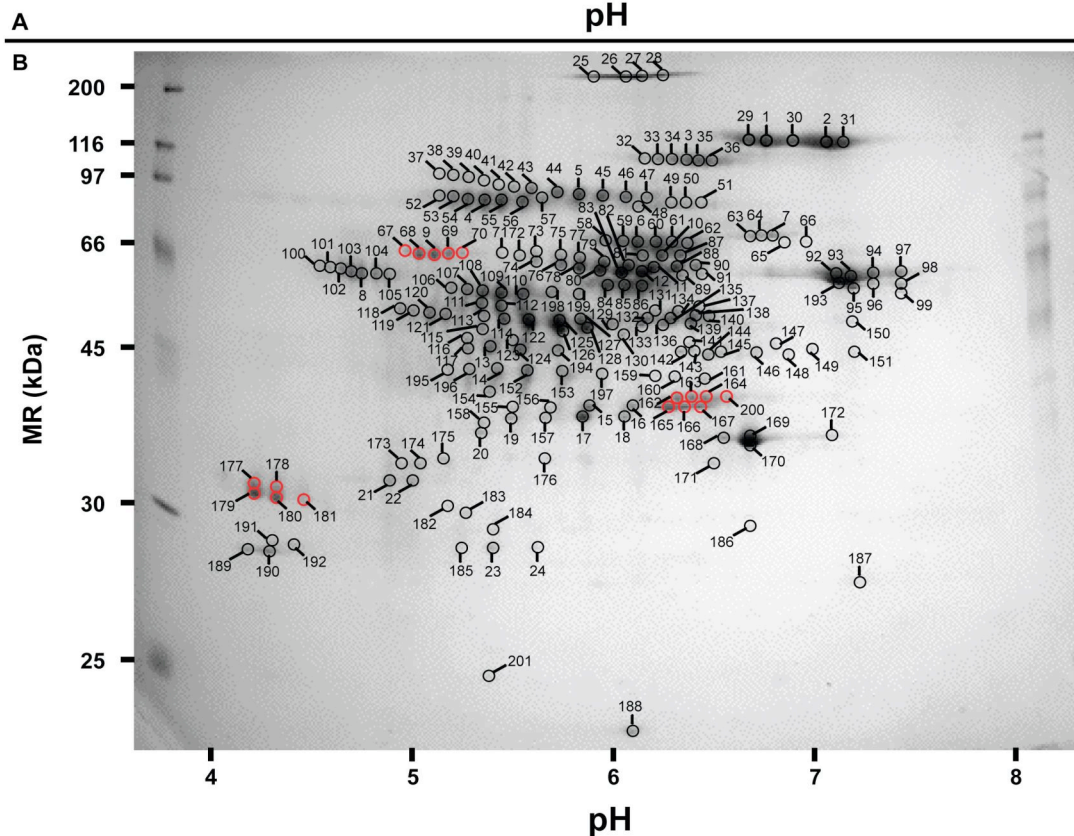
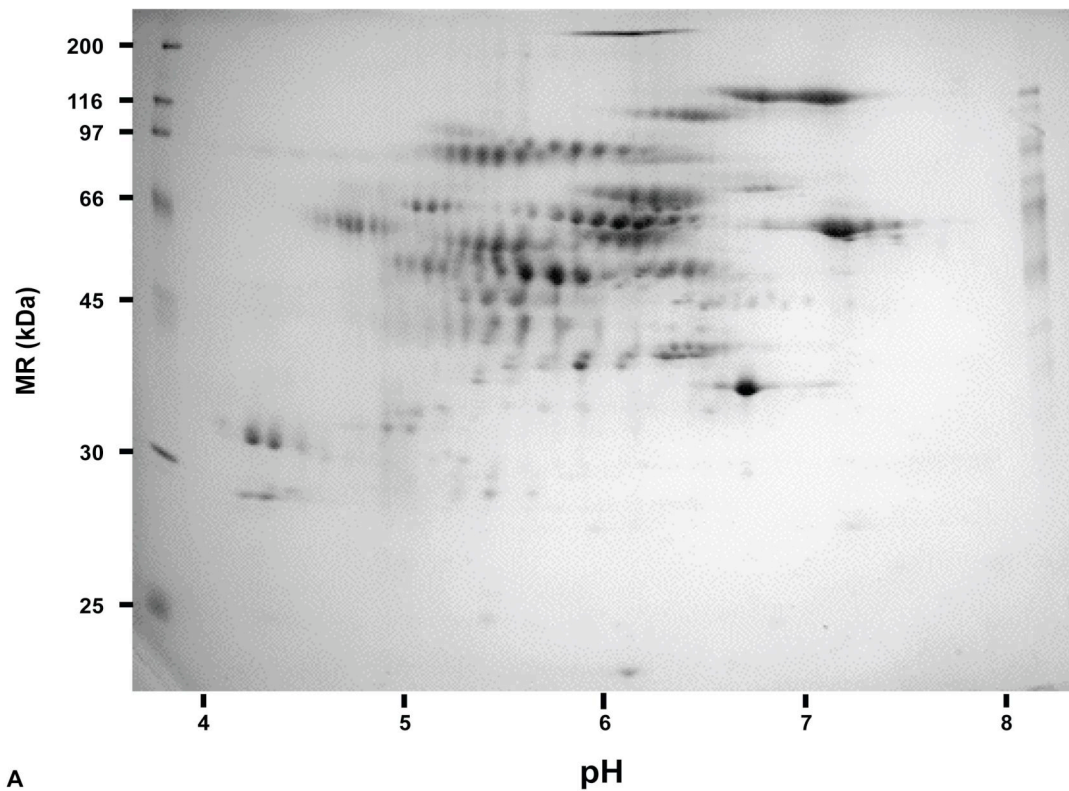


Abb. 1-3: 2-D-Gel Elektrophorese

Die von der MPR-Säule eluierten Proteine wurden in der ersten Dimension über einen immobilisierten pH-Gradienten und in der 2. Dimension über ein SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Teil A: 2-D-Gel, Teil B: Alle detektierten Proteinspots wurden durchnummeriert. Die roten Kreise zeigen die Proteinspots an, die durch die Massenspektrometrie dem 66,3-kDa-Protein zugeordnet werden konnten (modifiziert nach Kollmann et al 2003, S. 3971).

1.6 Klonierung und stabile Expression des 66.3-kDa-Proteins

Das 66.3-kDa-Protein besteht aus 594 Aminosäuren und besitzt ein N-terminales Signalpeptid mit 41 Aminosäuren (Datenbankeinträge: gi:24047307; cDNA *Accession-No.* BC038605; Protein *Accession-No.* AAH38605). Die Aminosäuresequenz enthält fünf putative N-Glykosylierungsstellen (-N-X-S/T-) und laut *Pfam*-Proteindatenbank (<http://www.pfam.sanger.ac.uk>; Stand Januar 2008) von Aminosäure 75 bis 594 eine Phospholipase-B-Domäne. Es existieren homologe Proteine u.a. in *Homo sapiens* (82 % Identität), *Rattus norvegicus* (94 % Identität), *Canis familiaris* (74 % Identität), *Caenorhabditis elegans* (43 % Identität), *Dictyostelium discoideum* (39 % Identität) und *Trypanosoma brucei* (33 % Identität). Die cDNA für das Protein wurde mittels Reverser Transkription und Polymerase-Kettenreaktion aus Gesamt-RNA der Mausleber amplifiziert. C-terminal wurde die cDNA mit einer Sequenz für einen V5-His6-*Tag* modifiziert und als solches in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA-Dest40 inseriert. Nach der Transfektion wurde das murine 66.3-kDa-Protein in BHK21-Zellen exprimiert und aufgrund der hohen Expression in das Zellkulturmedium sezerniert. Aus dem Zellkulturmedium konnte das 66.3-kDa-Protein affinitätschromatographisch über die Bindung des His6-*Tags* an einer Ni-NTA-Matrix für weitere Versuche partiell aufgereinigt werden.

1.7 MPR-Bindung und MPR-abhängige Internalisierung des 66.3-kDa-Proteins

Mit dem partiell aufgereinigten Protein wurden Versuche zur Verifizierung der lysosomalen Lokalisation des 66.3-kDa-Proteins durchgeführt. Mittels einer MPR-Säule wurde die M6P-abhängige Bindung des 66.3-kDa-Proteins an MPRs nachgewiesen (Abb. 1-4). Dazu wurde das partiell aufgereinigte Protein mit der MPR-Matrix inkubiert, mit steigender Stringenz gewaschen und mit M6P eluiert (vgl. Abb. 1-4). Es konnte die Bindung einer 75-kDa- und einer 40-kDa-Form des Proteins nachgewiesen werden. Letztere stellt aufgrund des nachgewiesenen His-*Tags* das C-terminale Ende des Proteins dar.

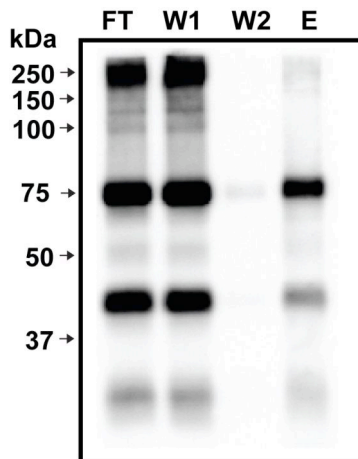


Abb. 1-4: Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Bindung des 66.3-kDa-Proteins

Auf eine MPR-Affigel-10-Säule wurde im Überschuss V5-His6-markiertes- und Ni-NTA-aufgereinigtes Protein gegeben. Nach einer Inkubation wurde die Säule gründlich gewaschen und Bindungspartner von der Säule eluiert. Es wurden die einzelnen Wasch- und Elutionsfraktionen TCA-gefällt, über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit dem α -His-Antikörper analysiert. (FT) „Flow-through“ = Durchfluss, entspricht dem auf die Säule geladenen Material abzüglich der gebundenen Anteile. (W1)/(W2) 1. und 2. Waschdurchgang. (E) Elution der gebundenen Proteine durch einen Überschuss an M6P im Waschpuffer (Kollmann et al. 2005, S. 3975).

Darüber hinaus wurden Versuche mit Fibroblasten von Patienten mit *I-cell*-Erkrankung (Mucopolipidose II) durchgeführt. Bei der *I-cell*-Erkrankung wird durch einen Defekt der Golgi-Phosphotransferase (N-Acetylglucosamin-1-phosphotransferase) kein M6P-Rest generiert (Tiede et al. 2005). Somit wird der MPR-abhängige Transport von Hydrolasen in das Lysosom verhindert und folglich die lysosomale Proteaseaktivität reduziert. Dies führt zu einer Speicherung von abzubauenem Material in so genannten Speichervakuolen (Hickman und Neufeld 1972). *I-cell*-Fibroblasten wurden mit partiell aufgereinigtem 66.3-kDa-Protein inkubiert, um die Aufnahme des Proteins in die Zelle und den Transport ins Lysosom mittels Immunfluoreszenz nachzuweisen (Abb. 1-5). Um zu zeigen, dass die Internalisierung von 66.3-kDa-Protein M6P-abhängig ist, wurden *I-cell*-Fibroblasten mit partiell aufgereinigtem 66.3-kDa-Protein und zusätzlich entweder M6P oder G6P inkubiert. Abb. 1-6 zeigt, wie eine hohe M6P-Konzentration die Aufnahme des Proteins in die Zelle verhindert, während die Aufnahme unter G6P nicht beeinflusst wird. Mit diesem experimentellen Ansatz konnte gezeigt werden, dass das 66.3-kDa-Protein M6P-abhängig in das Lysosom transportiert wird.

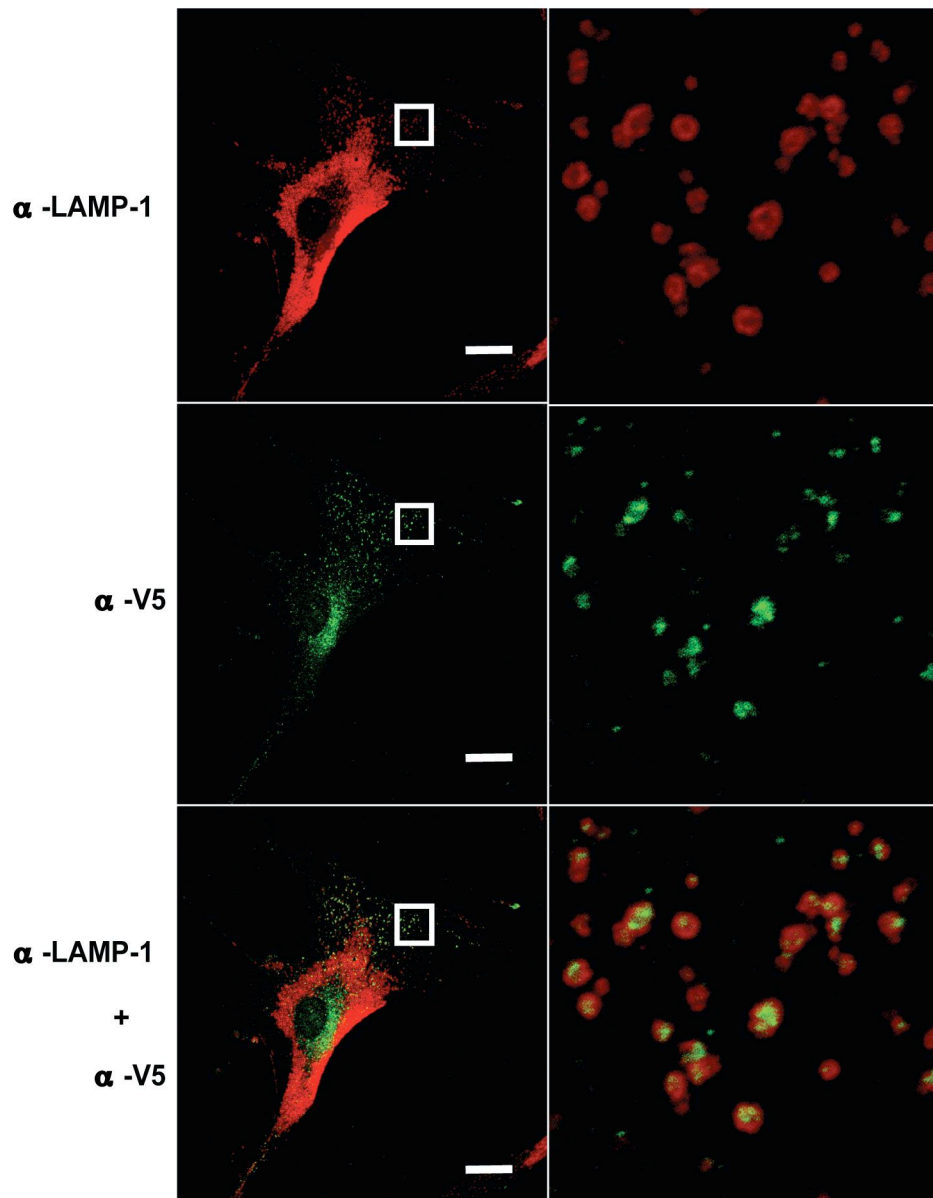


Abb. 1-5: Internalisierung des 66.3-kDa-Proteins in I-Cell-Fibroblasten

Immunfluoreszenzaufnahmen von I-Cell-Fibroblasten nach zweistündiger Inkubation mit dem partiell aufgereinigten Protein in Zellkulturmedium, Methanolfixierung und Immundetektion mit Antikörpern gegen das lysosomale Markerprotein LAMP-1 und den V5-Tag des 66.3-kDa-Proteins. Die Quadrate in der Übersichtsaufnahme auf der linken Seite geben die Lokalisation des Vergrößerungsausschnittes auf der rechten Seite an. Typisch für I-Cell-Fibroblasten ist die massive Akkumulation von Lysosomen. Die Balken entsprechen einer Länge von 20 μ m (Kollmann et al. 2005, S. 3976).

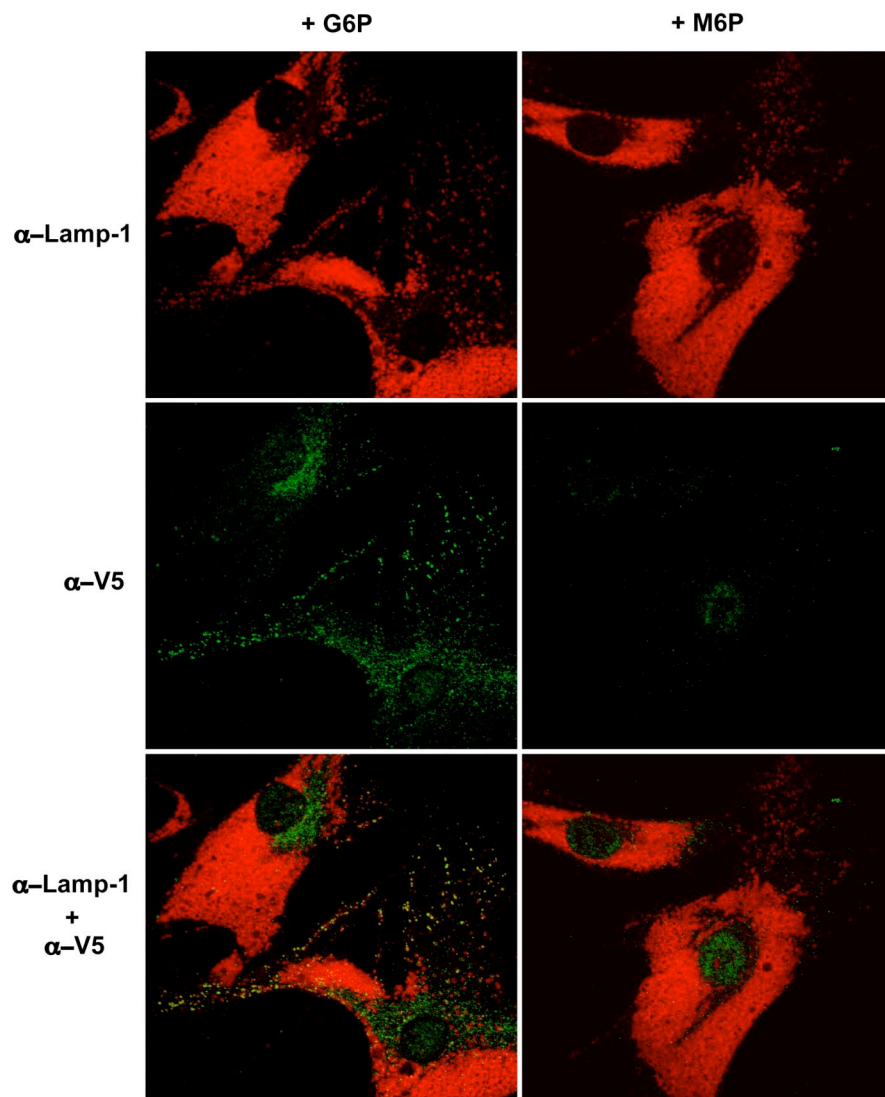


Abb. 1-6: Proteinaufnahme unter Einfluss von M6P und G6P

I-Cell-Fibroblasten wurden mit partiell aufgereinigtem Protein in Zellkulturmedium und zusätzlich entweder 5 mM G6P oder 5 mM M6P inkubiert und anschließend mit Methanol fixiert. Die Immundetektion wurde mit Antikörpern gegen das lysosomale Markerprotein LAMP-1 und den V5-Tag des 66.3-kDa-Proteins durchgeführt und Immunfluoreszenzaufnahmen angefertigt (Lübke 2006).

1.8 Fragestellung

In Vorarbeiten zur vorliegenden Arbeit wurde anhand einer lysosomalen Proteomanalyse erstmals die murine Form des putativ lysosomalen 66.3-kDa-Proteins beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass eine C-terminal markierte Variante des Proteins an immobilisierte Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren bindet bzw. Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-abhängig von Fibroblasten internalisiert und zu Lysosomen transportiert wird. Diese Ergebnisse von Kollmann et al. (2005) wiesen somit auf die Identifizierung eines bis dato unbekanntes Proteins mit lysosomaler Lokalisation hin. Ziel der vorliegenden Arbeit war der endogene Nachweis der lysosomalen Lokalisation, sowie die biochemische und die funktionelle Charakterisierung des murinen 66.3-kDa-Proteins.

Zu Beginn der Arbeit sollte eine Methode zur Aufreinigung des 66.3-kDa-Proteins aus dem Zellkulturüberstand von stabil exprimierenden Zellen etabliert werden. Das rekombinante Protein sollte für die Herstellung eines Antiserums genutzt werden, mit dessen Hilfe die subzelluläre Lokalisation des endogenen Proteins in der Immunfluoreszenz sowie die Gewebeverteilung des endogenen Proteins in Mausgewebe nachgewiesen werden sollte. Des Weiteren sollten das rekombinante Protein und die stabil exprimierenden Zellen für die biochemische und funktionelle Charakterisierung des Proteins genutzt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte eine funktionelle Analyse des murinen 66.3-kDa-Proteins vorgenommen werden. Dazu sollte die Analyse eines möglichen Phänotyps im *RNA-Interference-(RNAi)*-Modell und Interaktionsstudien mit *Yeast-two-Hybrid*-Versuchen erste Hinweise auf die vollkommen unbekanntes Funktion des murinen 66.3-kDa-Proteins geben. Zum anderen sollte über die Identifizierung von Interaktionspartnern die Einordnung des 66.3-kDa-Proteins in ein Funktionsumfeld vorgenommen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Allgemein

Analysenwaagen Modell 1602 MP und M5P	Sartorius, Göttingen
Autoklav Modell Tecnoclav 50	Tecnomara AG, Zürich, Schweiz
Brutschrank Modell 2771	Köttermann, Häningsen
CCD-Kamera Modell Las-1000	Fujifilm, Tokyo, Japan
Digitales pH-Meter	Schütt, Göttingen
Drehrad für Eppendorfgefäße	Eigenbau, Werkstatt der Fakultät
Durchlicht-Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Eismaschine Modell Scotsman MF 30	Frimont, Mailand, Italien
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Eigenbau, Werkstatt der Fakultät
Elektrophoresekammer für Polyacrylamidgele	Eigenbau, Werkstatt der Fakultät
Flugzeit-Massenspektrometer Modell REFLEX III (MALDI-TOF)	Bruker Daltonik, Bremen
Fluoreszenzspektrophotometer Cary 50 Bio	Varian, Darmstadt
Flüssigkeitsszintillationszähler LS 6500	Beckman, München
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank (-85 °C) Modell U57085	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Geltrockner Modell Gel Air Dryer	BioRad, Hercules, USA
Heizblock Modell Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Heizblock Modell Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
HPLC-Proteinaufreinigung Modell Biocad-Vision-Workstation	Applied Biosystems, Framingham, USA
Imaging plate (Speicherfolie)	FujiFilm, Düsseldorf
Inkubationsschüttler Modell G25	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Laser-Scan Mikroskop Modell TCS Sp2 AOBS	Leica, Heidelberg
Magnetrührer Modell Ika-Combimag Ret	Janke & Kunkel, Staufen
Massenanalysegerät Modelle Reflex I und III	Bruker Daltonik, Bremen

Mikroliterpipette Modell Exmire Microsyringe	ITO, Fuji, Japan
Microplate Reader Modell Spectra II	Tecan, Crailsheim
Mikrowellenherd Modell M1719N	Samsung, Schwalbach/Ts.
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Nass-Blot-System Modell Trans-Blot	BioRad, Hercules, USA
Netzgerät für Agarosegelelektrophorese	H. Hölzel, München
Netzgerät Typ Power Pac 1000 für Polyacrylamid-Gelelektrophorese	BioRad, München
Phosphoimager Fujix BAS 1000	Fuji, Tokio, Japan
Photometer Modell UV 160 A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Procise cLC Sequenator	Applied Biosystems, Framingham, USA
Schwenktisch	Eigenbau, Werkstatt der Fakultät Cti GmbH, Idstein/Ts.
Semi-Dry Western-Blot-Apparatur	Forma Scientific, Marietta, USA
Steri-Kult Inkubator Modell 3035/200	Baker Company, Sanford, USA
Sterilbank Modelle A/B3 und SG 400	Messer Griesheim, Frankfurt/M.
Stickstofftank Modell Biosafe Chronos	B. Braun Melsungen, Melsungen
Teflon Homogenisator	Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA
Thermocycler Modell Gene Amp PCR 9600	LTF Labortechnik, Wasserburg
Transilluminator Modell ETX 20 M	Branson Ultrasonic, Carouge- Geneve, USA
Ultraschall-Desintegrator Sonifier W-450	Bachhofer, Reutlingen
UV-Handlampe (312 nm, 254 nm)	Bachhofer, Reutlingen
Vakuum Konzentrator Modell Speed Vac SVC 100H	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Vortex Modell Genie 2	Sartorius, Göttingen
Waage Modelle 1264 MP und 1265	Memmert, Schwabach
Wärmeschrank	Köttermann, Häningsen
Wasserbad Modelle GFL 1083 und HOR 7225	

Zentrifugen

Biofuge A	Heraeus Sepatech, Osterode
Biofuge Fresco	Heraeus Sepatech, Osterode
Eppendor fzentrifuge Modelle 5414 und 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge Modelle J-21 C und J2-MC mit Rotoren JA-10 und JA-20	Beckman, München
Labofuge GL	Heraeus Sepatech, Osterode
Tisch-Ultrazentrifuge Modell TL-100 mit Rotoren TLA-100.3 und TLA-45	Beckman, München
Ultrazentrifuge Modell Optima L90K mit Rotoren SW 41 und 75 Ti	Beckman Coulter, Krefeld

Geräte zur Präparation von murinen Geweben

Chirurgische Schere, gebogen	Aesculap, Tuttlingen
Chirurgischer Löffel	Aesculap, Tuttlingen
Pinzette, stumpf	Aesculap, Tuttlingen
Präparationstisch	Eigenbau, Werkstatt der Fakultät

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Braunülen Modell Jelco	B. Braun Melsungen, Melsungen
Dialyseschlauch Typ 8, <i>cut-off</i> : 12-16 kDa, Porengröße 25A	Biomol, Hamburg
Einfrierkästen	National Lab, Mölln
Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Einmalkanülen Modell Microlance 3	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalspritzen Modell Discardit II mit 5-, 10- und 20 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Fixierpflaster Modell Leukosilk S	BSN medical, Hamburg
Gewebekulturflaschen Modell T25 und T75	Greiner, Nürtingen
Gewebekulturschalen mit 35-, 60-, 100- und 140 mm Durchmesser	Greiner, Nürtingen
Glaskolben mit 100-, 250- und 1000 ml	Schott, Mainz

Hybond-N	Amersham Biosciences, München
Immersionsöl	Zeiss, Oberkochen
Injektionsspritzen Modell Micro-Fine + Demi, 0,3 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Objektträger und Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm® M	American National, Menasha, USA
Pasteurpipetten	Schütt, Göttingen
Plastikpipetten 5-, 10- und 25 ml	Greiner, Nürtingen
Plastikröhrchen 10 und 50 ml	Greiner, Nürtingen
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Transfermembran	Schleicher und Schüll, Dassel
Qiagen-Säulen für DNA-Präparation	Qiagen, Düsseldorf
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpelle	B. Braun Melsungen, Melsungen
Spritzenfilter 0,2 µm und 0,45 µm	Heinemann Labortechnik, Duderstadt
Ultrazentrifugenröhrchen Modelle Microfuge Tube 1,5 ml (Polyallomer) 14 x 95 mm und 16 x 76 mm	Beckman, München
Whatman-Papier, 3 mm	Whatman, Göttingen
Zellkulturplatten, 6- bzw. 24-Well	Greiner, Nürtingen
Zentrifugenröhrchen Modelle JA-10 und JA-20 (Polypropylen)	Beckman, München

2.1.3 Chemikalien

Adeninhemisulfat	Sigma, Deisenhofen
30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Serva, Heidelberg
ε-Aminocapronsäure	Roth, Karlsruhe

Ammoniumacetat	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt
Ascorbinsäure	Roth, Karlsruhe
Bacto-Hefe-Extrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto-Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Borsäure	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	BioRad, München
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Chlorwasserstoff (HCl)	Roth, Karlsruhe
Coomassie, Blue R-250	Serva, Heidelberg
Dextransulfat	Sigma, Deisenhofen
Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Dinatriummethylenediaminetetraacetat (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethanolamin	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylacetat	Sigma, Deisenhofen
Fluormount Medium	Biacore, Freiburg
Formaldehydlösung (37 %)	Merck, Darmstadt
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glucose	Merck, Darmstadt
Glucose-6-Phosphat	Sigma, Deisenhofen
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	BioRad, München
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe

Hefe Stickstoff-Base	Invitrogen, Karlsruhe
Hering-Sperma-DNA	Sigma, Deisenhofen
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (Hepes)	Serva, Heidelberg
Imidazol	Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Jodacetamid (JAA)	Serva, Heidelberg
Kaliumacetat (KAc)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Kaliumnatriumtartrat	Merck, Darmstadt
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Lithiumacetat (LiAc)	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Engel, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN_3)	Sigma, Deisenhofen
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumsuccinat	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfatpentahydrat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$)	Sigma, Deisenhofen
2-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MES)	Sigma, Deisenhofen
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (Mops)	Sigma, Deisenhofen
NNN'N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen

Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma, Deisenhofen
Pansorbin	Calbiochem, Darmstadt
PEG 3350	Sigma, Deisenhofen
Pepton	Sigma, Deisenhofen
1,10-Phenanthroline	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
p-Iodonitrotetrazolium (violett)	Sigma, Deisenhofen
p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid	Sigma, Deisenhofen
p-Nitrophenyl- β -D-glucuronid	Sigma, Deisenhofen
Polyethylenglykol (PEG)	Roth, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon	Roth, Karlsruhe
Protaminsulfat	Roth, Karlsruhe
Rapid-Hyb Buffer	GE Healthcare, München
Saccharose (Sucrose)	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat (AgNO ₃)	Merck, Darmstadt
Stickstoff	Messer Griesheim, Siegen
Stimune Adjuvant	Cedi Diagnostic, Lelystad, Niederlande
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Triton X-100 (TX-100)	Sigma, Deisenhofen
Tween-20	Sigma, Deisenhofen
Tyloxapol (Triton WR-1339)	Sigma, Deisenhofen
Ultrapure dNTP Set	Pharmacia, Uppsala, Schweden

2.1.4 Enzyme

PF α -DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Endoglykosidase F (PNGase F)	Roche Applied Science, Indianapolis, USA
Restriktionsendonukleasen	NEB, Ipswich, USA
Taq-DNA-Polymerase	Roche Applied Science, Indianapolis, USA
Trypsin, modifiziert aus Rinderpankreas	Boehringer, Mannheim

2.1.5 Standards

TrackIt-1-kb-Plus-DNA-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
0,5-10-kb-RNA-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
All-Blue-Protein-Ladder	BioRad, München

2.1.6 Kits für das Arbeiten mit RNA, DNA und Protein

Bio-Rad D _C -Assay Reagenz A/B/S	BioRad, München
Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrat	Pierce, Rockford, USA
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraktion	Qiagen, Hilden
Megaprime Labeling Kit	Amersham Pharmacia, München
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.7 Radioaktive Substanzen

[³⁵ S]-Methionin/Cystein, wässrige Lösung, 10 mCi/ml	Hartmann Analytik, Braunschweig
[³² P]-dCTP, 3000 Ci/mmol	Hartmann Analytik, Braunschweig

2.1.8 Säulen und Säulenfüllmaterial

Affigel-10	BioRad, München
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Sephadex G50	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Poros HQ	Applied Biosystems, Foster City, USA

2.1.9 Antikörper

2.1.9.1 Primärantikörper

Tab. 2-1: Primärantikörper

Name	Antigen, (H.-Name) Ag-Spezies	immun. Spezies	WB / IF / IP	Referenz/Hersteller
66-Antiserum	66.3-kDa-Protein Murin	Kaninchen, polyklonal	1:1000 / 1:50 / 20 µl	eigene Produktion (Deuschl et al. 2006)
α-Cat-D	Cathepsin D Human	Ziege (1004) polyklonal	1:500 / 1:50 / -	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Hasilik, Marburg, (Hasilik und Neufeld 1980) Qiagen, Hilden
α-His	RGS-His6-Epitop (RGS-His)	Maus monoklonal	1:3000 / - / -	
α-HSP60	Hitze-Schock- Protein 60 (Hspd1) Murin	Maus monoklonal	1:1000 / - / -	Calbiochem, Darmstadt, (Li et al. 2000)
α-Porin	Porin (31HL, Anti-VDAC) Human	Maus monoklonal	1:1000 / - / -	Calbiochem, Darmstadt
α-LAMP-1	LAMP-1, (1D4B, CD107a) Murin	Ratte, monoklonal	1:250 / 1:25 / -	Hybridomabank, USA

Name = Antikörperbezeichnung, wie sie in dieser Arbeit verwendet wird; Antigen = Epitop oder Protein, gegen das der Antikörper oder das Serum gerichtet ist; H. Name = Handelsname bei käuflich erwerbbaeren Antikörpern; Ag-Spezies = Spezies, gegen deren Protein der Antikörper gerichtet ist; immun. Spezies = Spezies, in der der Antikörper generiert wurde; WB = Western Blot; IF = Immunfluoreszenz; IP = Immunpräzipitation.

2.1.9.2 Sekundärantikörper

Für Western Blot:

Zweitantikörper für die Western-Blot-Analyse wurden standardmäßig in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt.

Kaninchen-anti-Ziege, HRP-konjugiert	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen, HRP-konjugiert	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus, HRP-konjugiert	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Ratte, HRP-konjugiert	Dianova, Hamburg

Für Immunfluoreszenz:

Zweitantikörper für die Immunfluoreszenz wurden standardmäßig 1:400 eingesetzt.

Ziege-anti-Ratte, Alexa-488-konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege-anti-Kaninchen, Alexa-674-konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe
Esel-anti-Ratte, Alexa-488-konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe
Esel-anti-Ziege, Alexa-546-konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe
Esel-anti-Kaninchen, Alexa-674-konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.10 Tierversuchsanträge und -genehmigungen

Antikörperherstellung: 33.42502/01-A-02.05

Versuche mit Tyloxapol: 33.42502/A-011/06

Organentnahme: 33.42502/01-A-07.05

2.1.11 Zelllinien

Tab. 2-2: Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
3T3 (NIH-3T3)	murine embryonale Fibroblasten	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HT1080	humane Fibrosarkom-Zelllinie	Stratagene, La Jolla, USA
MEF (Kontrolle)	primäre embryonale Mausfibroblasten	Zellen des Instituts
MEF CD -/-	primäre embryonale Mausfibroblasten, defizient für endogenes Cathepsin-D	Zellen des Instituts (Saftig et al. 1995)

2.1.12 Häufig verwendete Puffer und Stammlösungen

Die verwendeten Lösungen und Puffer wurden nach den Vorschriften des Laborhandbuchs von Sambrook (Sambrook et al. 1989) hergestellt.

10 × PBS	400 g NaCl, 10 g KCl, 72 g Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O und 10 g KH ₂ PO ₄ in 5000 ml dH ₂ O, pH 7,4
10 × TBS	12,12 g Tris/HCl und 87,66 g NaCl in 1000 ml dH ₂ O, pH 7,4
50 × TAE	242 g Tris, 57 ml Essigsäure und 37 g EDTA in 1000 ml dH ₂ O, pH 8,0
20 % SDS	20 g SDS in 100 ml dH ₂ O bei 65 °C gelöst und sterilfiltriert
0,5 M EDTA	181,1 g EDTA in 800 ml ddH ₂ O, pH 8,0; das Volumen auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert
10 × TE	12,1 g Tris/HCl pH 7,6 und 2,92 g EDTA in 1000 ml dH ₂ O
1 M Tris/HCl	121,1 g Tris in 800 ml dH ₂ O; pH-Wert nach Bedarf eingestellt, das Volumen auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert
Na-Acetat-Puffer	17,2 g Essigsäure in 800 ml dH ₂ O; pH-Wert nach Bedarf eingestellt und das Volumen auf 1000 ml aufgefüllt
1 M Hepes	238,3 g Hepes in 800 ml dH ₂ O; pH-Wert nach Bedarf eingestellt, das Volumen auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert

2.1.13 Medien und Stammlösungen zur Anzucht eukaryoter Zellen

<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin (200 mM)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Nicht essentielle Aminosäuren	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
1,782 g α-Alanin, 2,642 g α-Asparagin, 1,502 g Glycin, 2,302 g α-Prolin und 2,102 g α-Serin in 200 ml ddH ₂ O	
0,05% (w/v) Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Calbiochem, Frankfurt
Hygromycin B	Calbiochem, Frankfurt
Neomycin (G418)	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin

PBS (für Zellkultur):	40 g NaCl, 1 g KCl, 7,2 Na ₂ HPO ₄ + 2H ₂ O, 1 g KH ₂ PO ₄ und 0,1 g Phenolrot in 5000 ml ddH ₂ O pH 7,4
-----------------------	--

Hitzeinaktivierung und Dialyse von fötalem Kälberserum:

Das Serum wurde für 45 min bei 56 °C in einem geschlossenen Wasserbad inkubiert und ü.N. bei 4 °C gegen 5 l PBS in einem Dialyseschlauch (Porengröße: 12-14 kDa) dialysiert.

2.1.14 Medien zur Kultur prokaryoter Zellen

LB-Medium	10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefe-Extrakt und 5 g NaCl in 1000 ml dH ₂ O, pH 7,5; das Medium wurde autoklaviert und bei 4 °C gelagert. Vor dem Gebrauch wurde dem Medium bei Bedarf 125 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin zugesetzt.
LB- Agarplatten Ampicilin/ Kanamycin-	Dem LB-Medium wurde für die Bakterienkultur auf Agarplatten vor dem Autoklavieren 15 g Agar pro Liter dH ₂ O zugefügt. Nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen auf 50 °C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 125 µg/ml und Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugefügt. Die Agarlösung wurde in 10 cm Zellkulturschalen gegossen, bei RT abgekühlt und anschließend bei 4 °C und unter Lichtausschluss gelagert.

2.1.15 EDV

Hardware:

Drucker HP LaserJet 4050	Hewlett&Packard, Palo Alto, USA
Drucker Z65	Lexmark, Lexington, USA
iBook G4	Apple, Cupertino, USA
iMac	Apple, Cupertino, USA
PC Pentium 4	Dell, Round Rock, USA

Software:

Adobe Illustrator CS2	Adobe, San Jose, USA
Adobe-Photoshop CS2	Adobe, San Jose, USA
AIDA Image analysing software	FujiFilm, Düsseldorf
Image Gauge 3.0	FujiFilm, Düsseldorf
Image Reader	FujiFilm, Düsseldorf
Mac OS X	Apple, Cupertino, USA
Microsoft Office für Mac 2004	Microsoft, Redmond, USA
Vektor NTA Suite	Invitrogen, Carlsbad, USA
WinCam 2.2	Cybertech, Berlin
Windows XP/98	Microsoft, Redmond, USA

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Methoden zum Arbeiten mit DNA

Die Methoden wurden, soweit nicht anders erwähnt, dem Handbuch *Molecular Cloning* (Sambrook et al. 1989) entnommen.

2.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch über die Absorption bei $\lambda = 260$ nm in einer Quarzküvette gegen dH₂O oder TE ermittelt. Eine OD₂₆₀ = 1 entspricht der Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der Probe wurde über das Verhältnis der Extinktionen für Nukleinsäurebasen ($\lambda = 260$ nm) und für Dipeptidbindungen ($\lambda = 280$ nm) ermittelt. Ein Wert zwischen 1,8 und 2 wurde angestrebt.

2.2.1.2 DNA-Präzipitation mit Ethanol

Einem Volumen zu präzipitierender DNA-Lösung wurde 1/10 Volumen 3 M NaAc, 1/10 Volumen 125 mM EDTA und 5 Volumen Ethanol (100 %) zugegeben, vorsichtig gemischt und für 15 min bei 14 000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und durch 7 Volumen Ethanol (70 %) ersetzt. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 14 000 rpm. Das DNA-Pellet wurde für 2 min in der *Speedvak* getrocknet und anschließend im gewünschten Volumen ddH₂O oder TE-Puffer aufgenommen.

2.2.1.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde das System von *New England Biolabs* (NEB) verwendet. Der Hersteller liefert neben den Enzymen auch das Puffersystem, bestehend aus vier Basispuffern (Zusammensetzung in einfacher Konzentrationen angegeben):

NEB 1:	10 mM Tris/HCl pH 7, 10 mM MgCl ₂ und 1 mM DTT
NEB 2:	10 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT und 50 mM NaCl
NEB 3:	50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT und 100 mM NaCl
NEB 4:	20 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM MgAc ₂ , 1 mM DTT und 50 mM KAc

Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in Units (U) angegeben. Eine Unit ist definiert als die Menge an Restriktionsenzym, die benötigt wird, um in einer Stunde 1 µg Lambda-DNA vollständig zu schneiden.

Reaktionsansatz:

x µl	DNA (ca. 2 µg)
+ 2 µl	Enzym-spezifischer 10×-Puffer
+ 2 µl	Restriktionsendonuklease (1 µl = 1 U)
+ y µl	dH ₂ O
<hr/>	
20 µl	Ansatz

Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend zur Analyse durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Für einen präparativen Verdau wurde das Volumen des Ansatzes sowie die Menge an 10×-Puffer und Enzym entsprechend angepasst.

2.2.1.4 Agarosegel-Elektrophorese

DNA-Proben-Puffer 0,25 % (w/v) Bromphenolblau und 40 % (w/v) Saccharose in 1×-TAE

Die Zusammensetzung des Agarosegels richtete sich nach der erwarteten Größe der DNA-Fragmente (vgl. Tab. 2-3). Für die Herstellung eines Agarosegels wurde die benötigte Menge Agarose in der Mikrowelle mit 300 ml 1×-TAE aufgekocht. Unter ständigem Rühren wurde die flüssige Agarosemasse auf 55 °C abgekühlt und Ethidiumbromid auf eine Endkonzentration von 0,5 µg/ml hinzugefügt. Die Agaroselösung wurde in eine Gelform gegossen bei RT abgekühlt und nach dem Erhärten bei 4 °C bis zum Gebrauch gelagert.

Tab. 2-3: Agarsekonzentrationen

Agarsekonzentration (%)	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

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach DNA-Verdau oder zur Analyse von PCR-Produkten wurde die bearbeitete DNA über ein Agarosegel aufgetrennt. Dem DNA-Ansatz wurde 15 % des DNA-Proben-Puffers zugesetzt. Die DNA wurde bei einer Spannung von 4 V/cm aufgetrennt. Die Auftrennung konnte durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid mit einer UV-Handlampe verfolgt werden. Das Ergebnis wurde mit einer Kamera über dem UV-Transilluminator festgehalten.

2.2.1.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

(*Qiagen QIAquick® Spin Handbook 2002*)

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde mit dem Kit von *Qiagen (Qiagen Gel Extraction Kit)* durchgeführt. *Qiagen* stellt einen Puffer zum Auflösen des Agarosegels (QG-Puffer) und einen Waschpuffer (PE-Puffer) zur Verfügung, gibt aber die Zusammensetzung nicht bekannt. Die DNA-Bande wurde mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen und in drei Volumen (w/v) QG-Puffer für 10 min bei 50 °C aufgelöst. Der Lösung wurde ein Volumen Isopropanol zugesetzt und gründlich vermischt. Die Lösung wurde in einer *Qiaquick*-Säule für 1 min bei 13 000 rpm zentrifugiert, um die DNA an das Säulenmaterial zu binden. Die DNA wurde nacheinander mit 500 µl QG-Puffer und 750 µl PE-Puffer gewaschen. Reste des PE-Puffers wurden durch erneute Zentrifugation entfernt und die DNA mit 30-50 µl ddH₂O eluiert.

2.2.1.6 Ligation

Über eine Ligrationsreaktion wurden DNA-Fragmente mit dem Enzym Ligase in einen Vektor integriert. Dazu wurde der Vektor durch Inkubation mit zwei spezifischen Restriktionsendonukleasen im Klonierungsabschnitt geschnitten und linearisiert. Über Agarosegel-Elektrophorese wurde der linearisierte Vektor aufgetrennt und aus dem Gel isoliert. Die Menge des in der Ligation eingesetzten *Inserts* errechnete sich durch folgende Formel:

$$\frac{100 \text{ ng Vektor} \times \text{kb Länge Insert}}{\text{kb Länge Vektor}} \times \frac{3}{1} = x \text{ ng Insert}$$

Die Ligation des zu inserierenden DNA-Fragmentes und des Vektors erfolgte nach folgendem Ansatz:

x µl	Vektor-DNA (100 ng)
y µl	DNA-Fragment (s. Formel)
1 µl	10×-T4-Ligase-Puffer (Endkonzentration: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM DTT; 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA)
1 µl	T4-Ligase (80 NEB-Einheiten/µl)
	mit ddH ₂ O auffüllen
10 µl	Ansatz

Die Ligation erfolgte ü.N. bei 16 °C im Wasserbad.

2.2.1.7 DNA-Amplifikation über die Polymerase-Ketten-Reaktion

(Mullis et al. 1986)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Standardmethode, um DNA-Abschnitte einer DNA-Sequenz selektiv zu amplifizieren. Für PCRs in dieser Arbeit wurde, wenn nicht anders erwähnt, Taq-Polymerase verwendet. Ein PCR-Ansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

x µl	DNA-Template (ca. 100 ng)
y µl	Primer A (0,1-0,6 µM)
z µl	Primer B (0,1-0,6 µM)
1 µl	dNTP-Mix (5-10 mM)
5 µl	10×-PCR Puffer passend zur jeweiligen Taq-DNA-Polymerase
0,25 µl	Taq-DNA-Polymerase (5U/µl)
	mit ddH ₂ O auffüllen
50 µl	Ansatz

Der Ansatz wurde nach folgendem Temperaturschema im PCR-Cycler inkubiert, wobei die *Annealing*-Temperatur vom Schmelzpunkt der Primer abhing.

2 min 35x :	94 °C	initiale Denaturierung des DNA-Doppelstranges
30 sec	94 °C	Denaturierung des DNA-Doppelstranges
30-60 sec	55 °C-65 °C	<i>Annealing</i> (Bindung) der Primer an Einzelstränge
3 min	72 °C	Extension der DNA mit Ausgangspunkt an den Primern
10 min 4 °C	72 °C ∞	finale Extension an zuvor nicht komplettierten Produkten

2.2.1.8 Herstellung chemisch kompetenter DH5 α -*Escherichia-coli*

(Nishimura et al. 1990)

Medium A: 10 mM MgSO₄ × 7 H₂O und 0,2 % Glucose in LB-Medium, pH 7,0

Medium B: 12 mM MgSO₄ × 7 H₂O, 36 % Glycerin, 12 % PEG (MW 7500) in LB-Medium, pH 7,0

Einen Tag vor der Präparation wurden 3 ml LB-Medium mit DH5 α (*E. coli*) angeimpft und ü.N. bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Am folgenden Tag wurden 99 ml Medium A mit 1 ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert, für 10 min auf Eis abgekühlt und für 15 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet vorsichtig in 1 ml kaltem Medium A aufgenommen und unter Zugabe von 2,5 ml Medium B vermischt. Die Zellsuspension wurde in 100- μ l-Aliquots abgefüllt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.9 Transformation chemisch kompetenter DH5 α -*Escherichia-coli*

Kompetente DH5 α wurden langsam auf Eis aufgetaut. Zu dem 100- μ l-Ansatz wurde 1 ng Plasmid-DNA gegeben und der Ansatz für 20 min bei 4 °C auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 2 min bei 42 °C einem Hitzschock ausgesetzt und anschließend sofort für weitere 20 min bei 4 °C auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 μ l LB-Medium wurde der Ansatz für 60 min bei 37 °C auf dem Drehrad inkubiert. Danach wurden 100 μ l des Ansatzes auf einer Agarplatte mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (vgl. Kap. 2.1.14) ausgestrichen. Die Platten wurden ü.N. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und gewachsene Klone am nächsten Morgen in 5 ml LB-Medium (mit Selektionsantibiotikum) bei 37 °C im Schüttelinkubator in Kultur genommen. Aus den Kulturen wurden die Plasmide durch Mini-Präparationen (vgl. Kap. 2.2.1.10) isoliert.

Bakterienkulturen wurden in Form von Glycerinkulturen aufbewahrt. Ein Volumen von 500 µl überprüfter DH5α wurden mit 0,25 Volumen 80 %igen Glycerins versetzt und bei -80 °C gelagert. Aus Glycerinkulturen transformierter Bakterien konnten zu einem späteren Zeitpunkt eine Flüssigkultur zur Präparation von Plasmid-DNA (s. 2.2.1.10 und 2.2.1.11) angeimpft werden.

2.2.1.10 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

(Qiagen Miniprep Handbook 2003)

Die Plasmidpräparationen wurden nach Vorschrift des Herstellers *Qiagen* unter Verwendung der mitgelieferten Puffer P1, P2, N3, PB, PE und EB durchgeführt, deren Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben wird.

2 ml einer bei 37 °C ü.N. im Schüttelinkubator inkubierten *E.-coli*-Kultur (s. 2.2.1.9) wurde für 5 min bei 13 000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 250 µl 4 °C-kaltem P1-Puffer resuspendiert und mit 250 µl P2-Puffer (Lysispuffer) durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Nach erfolgter Lyse wurden 350 µl N3-Puffer zugesetzt, durch sofortiges und vorsichtiges Schwenken vermischt und der Ansatz für 10 min bei 13 000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine *Qiaprep-Spin*-Säule überführt und für 1 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde nacheinander mit 500 µl PB-Puffer und 750 µl PE-Puffer gewaschen, für eine weitere Minute bei 13 000 rpm von restlichem PE-Puffer befreit und die DNA mit 50 µl EB-Puffer eluiert.

2.2.1.11 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

(Qiagen Plasmid Purification Handbook 2003)

Die Plasmidpräparationen wurden nach Vorschrift des Herstellers *Qiagen* unter Verwendung der mitgelieferten Puffer P1, P2, P3, QBT, QC, QF und TE durchgeführt, deren Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben wird.

100 ml einer ü.N. bei 37 °C inkubierten *E.-coli*-Kultur wurden für 15 min bei 4 °C und 6000 rpm (JA-10, Beckman) zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in 4 ml P1-Puffer resuspendiert und mit 4 ml P2-Puffer vorsichtig vermischt. Nach erfolgter Lyse wurden 4 ml P3-Puffer zugesetzt, durch sofortiges und vorsichtiges Schwenken vermischt und für 20 min bei 4 °C auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 30 min bei 4 °C und 16 000 rpm (JA-20, Beckman) zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort abgenommen und erneut für 15 min bei 4 °C und 16 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit QBT-Puffer

äquilibrierte *Qiagen-tip100*-Säule gegeben. Die auf der Säule gebundene Plasmid-DNA wurde zweimal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen und in ein 50-ml-Falkon mit 5 ml QF-Puffer eluiert. Der Lösung wurden 3,5 ml Isopropanol zugesetzt und die DNA für 60 min bei 4 °C und 5000 rpm in der Labofuge präzipitiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, die DNA mit 2 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut für 60 min bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA für 10 min bei RT getrocknet. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 150 µl ddH₂O aufgenommen und die Konzentration der DNA bestimmt.

2.2.2 Methoden zum Arbeiten mit RNA

Die Methoden wurden, soweit nicht anders erwähnt, dem Handbuch „*Molecular Cloning*“ (Sambrook et al. 1989) entnommen.

2.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch über die Absorption bei 260 nm in einer Quarzküfette gegen dH₂O oder TE ermittelt. Eine OD₂₆₀ = 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml RNA.

2.2.2.2 RNA-Präparation aus Mausegeweben

(*Qiagen RNeasy® Mini Handbook 1999*)

Die RNA-Präparation wurde nach Vorschrift des Herstellers *Qiagen* unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt. Der Hersteller gibt die Zusammensetzung der Puffer nicht bekannt. Bei dem RLT-Puffer handelt es sich um einen Lysispuffer und bei den Puffern RW1 und RPE handelt es sich um Waschpuffer.

20 µg frisch entnommenes Mausegewebe (vgl. Kapitel 2.6.2) wurde in 350 µl RLT-Puffer aufgenommen und im Teflon-Homogenisator gründlich homogenisiert. Das Lysat wurde für 3 min bei 10 000 × g zentrifugiert, der Überstand abgenommen, mit 350 µl 70 %igem Ethanol versetzt, durch Pipettieren vermischt, auf eine *RNeasy*-Säule geladen und für 15 sec bei 8000 × g zentrifugiert. Der Durchbruch wurde verworfen und die auf der Säule gebundene RNA jeweils einmal mit 500 µl RW1-Puffer und einmal RPE-Puffer gewaschen. Die Säule wurde ein zweites Mal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und für 2 min bei 10 000 × g zentrifugiert, die Membran dadurch getrocknet und die RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser in ein neues Eppendorfgefäß eluiert. Die RNA-Konzentration wurde bestimmt.

2.2.2.3 Northern Blot

DEPC-H ₂ O	0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) ü.N. in ddH ₂ O gerührt und autoklaviert
5×-Ladepuffer	16 µl gesättigte Bromphenolblaulösung, 80 µl 500 mM EDTA, 720 µl Formaldehyd (37 %), 2 ml Glycerol, 3,1 ml Formamid, 4 ml 10×-Laufpuffer in 10 ml DEPC-H ₂ O pH 8,0
10×-Laufpuffer	200 mM Mops pH 7,0 , 50 mM Natriumcitrat und 10 mM EDTA
20×-SSC	175,3 g NaCl und 8,2 g Natriumcitrat in 1000 ml ddH ₂ O, pH 7,0

Zur Herstellung eines RNA-Gels wurden 20 ml 10×-Laufpuffer, 180 ml DEPC-H₂O und 2 g Agarose kurz aufgekocht und anschließend auf 65 °C abgekühlt. Die abgekühlte Lösung wurde auf 2 % (w/v) Formaldehyd eingestellt und 20 µl einer 10 mg/ml-Ethidiumbromid-Lösung zugegeben.

Der Northern Blot wurde verwendet, um in den verschiedenen Mausgeweben RNA-Expressionslevel des 66.3-kDa-Proteins zu analysieren. 10 µg isolierter-RNA des jeweiligen Gewebes (zur Isolierung vgl. Kap. 2.2.2.2) wurde mit Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 65 °C denaturiert. Die Proben wurden über ein RNA-Gel bei 40 mA für 6-7 h aufgetrennt und das Gel mit einem Referenzlineal abfotografiert. Danach wurde das Gel in 20×-SSC-Puffer äquilibriert und die RNA auf eine Nylonmembran transferiert (für Aufbau vgl. Abb. 2-1). Durch kurze Exposition mit UV-Licht (30 sec) wurde die RNA an die Membran gebunden und anschließend bei 60 °C getrocknet.

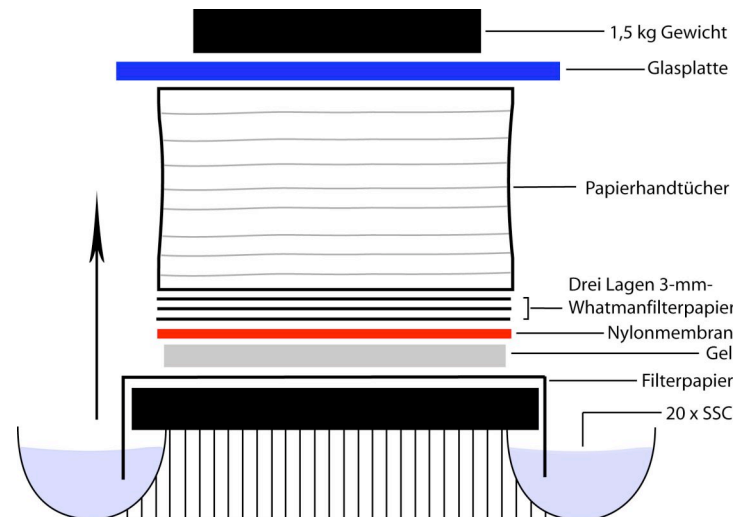


Abb. 2-1: Northern-Blot-Versuchsaufbau

Über zwei Gefäße mit 20x-SSC (s. 2.2.2.4) wurde in folgender Reihenfolge eine Glasplatte, ein Blatt Filterpapier, das die 20x-SSC-Lösung leitet, das Gel, eine in 20x-SSC getränkte Nylonmembran, eine Lage in 20x-SSC getränktes Whatmanfilterpapier, zwei Lagen trockenes Whatmanfilterpapier, eine ca. 15 cm dicke Schicht aus Papierhandtüchern, eine Glasplatte und ein ca. 1,5 kg schweres Gewicht gelegt.

2.2.2.4 Markierung einer DNA - Sonde mit α - ^{32}P -dCTP

Mit aufgereinigten PCR-Produkten (*Full-length*-66.3-kDa-Protein-cDNA und GAPDH-cDNA) wurden radioaktiv markierte Sonden hergestellt. 50 ng eines PCR-Produktes wurden in 45 μl ddH₂O aufgenommen, für 10 min auf 95 °C erhitzt und für 5 min auf Eis abgekühlt. Die DNA-Lösung wurde in ein Reaktionsgefäß mit *Rediprime-II-Random-Prime*-Hybridisierungsmix (Amersham Bioscience) überführt, 5 μl α - ^{32}P -dCTP (entspricht 50 μCi) zugefügt, die Lösung durch Pipettieren vermischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Sonde durch das *Quiagen-PCR-Purification-Kit* für radioaktive PCR-Produkte aufgereinigt und 10 μl der DNA-Sonde im Flüssigkeitsszintillationszähler analysiert. Zu einer DNA-Sonde mit 5×10^6 cpm wurde 50 μl Herings-Sperma-DNA gegeben und für 5 min bei 95 °C denaturiert.

2.2.2.5 Hybridisierung der α - ^{32}P -dCTP-markierten Sonde

Waschlösung 1	2x-SSC mit 0,1 % SDS
Waschlösung 2	0,2x-SSC mit 0,1 % SDS

Die Hybridisierung wurde mit einer *Full-length*-Sonde des 66.3-kDa-Proteins bzw. einer GAPDH-Sonde durchgeführt. Die getrocknete Nitrocellulose-Membran (vgl. Kap. 2.2.2.3) wurde in ein Hybridisierungsröhrchen überführt und für 30 min bei 65 °C unter Rotation mit 5 ml *Rapid-Hyb*-Puffer (GE Healthcare) inkubiert. Anschließend wurden 5 ml *Rapid-Hyb*-Puffer ersetzt, der komplette Ansatz markierter und denaturierter DNA-Sonde (vgl. Kap. 2.2.2.4) in das

Hybridisierungsröhrchen gegeben und ü.N. unter Rotation bei 65 °C inkubiert. Die Membran wurde zweimal für 10 min bei RT mit Waschlösung 1, zweimal für 10 min bei RT mit Waschlösung 2 und zweimal für 10 min bei 65 °C mit Waschlösung 2 gewaschen, in Folie eingeschweißt und ü.N. auf einem *Bio-Imager-Screen* exponiert.

Der Northern Blot konnte erneut verwendet werden. Dafür wurde H₂O mit 0,1 % SDS in der Mikrowelle kurz aufgekocht und mit der Membran inkubiert, bis die Lösung RT hatte. Danach wurde der Northern Blot zweimal mit 2×-SSC gewaschen, in Folie eingeschweißt und ü.N. mit einem *BioImager-Screen* exponiert. War kein Signal zu detektieren, konnte die Membran mit einer anderen Sonde hybridisiert werden.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Methoden zum Arbeiten mit eukaryoten Zellen

2.3.1.1 Kultivieren

Alle in Tab. 2-2 aufgeführten Zelllinien wurden in wassergesättigter Atmosphäre unter 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert. Medien und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, auf 37 °C vorgewärmt. Im Allgemeinen erfolgte die Kultivierung der Zellen mit folgendem Medium: DMEM + 10 % FKS + 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin. Medien für stabil transfizierte Zellen enthielten zusätzlich 600 µg/ml Hygromycin B.

2.3.1.2 Passagieren

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

Zellen in Kultur wurden nach Erreichen der Konfluenz oder um die Zellen für Versuche in der gewünschten Dichte auszuplattieren passagiert. Dazu wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen etwa für 5 min mit Trypsin-EDTA-Lösung auf einer 37 °C-Wärmeplatte unter mikroskopischer Kontrolle bis zur Abrundung der Zellen inkubiert. Durch die Zugabe von Zellkulturmedium wurde die Trypsin-Reaktion gestoppt, die Zellen durch gründliches Pipettieren vereinzelt und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in der gewünschten Dichte ausplattiert.

2.3.1.3 Kryokonservieren

Einfriermedium: 10 % (v/v) DMSO in Zellkulturmedium

Für die Kryokonservierung wurden Zellen trypsinisiert, in Zellkulturmedium aufgenommen und für 5 min bei 1000 rpm in der Labofuge zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Zellkulturmediums wurden die Zellen in 4 °C kaltem Einfriermedium resuspendiert und jeweils 1 ml in Einfrierröhrchen überführt. Die Zellen wurden für eine Woche bei -80 °C im Gefrierschrank und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.3.1.4 Revitalisieren

Das Kryoröhrchen wurde aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, für 1 min bei RT erwärmt und anschließend in 70 % Ethanol bei 37 °C inkubiert bis im Zellkulturmedium lediglich ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellsuspension wurde in 5 ml 4 °C kaltem Zellkulturmedium aufgenommen und für 5 min bei 1000 rpm in der Labofuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, da DMSO bei Kultivierungstemperatur zytotoxisch wirkt. Das Zellpellet wurde in 5 ml 4 °C kaltem Zellkulturmedium ohne Selektionsantibiotikum resuspendiert. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und gegebenenfalls Antibiotikum zur Selektion beigelegt.

2.3.2 Transfektion von eukaryoten Zellen

(*Invitrogen Lipofectamine 2000 Transfection Reagent Users Manual 2006*)

Die Etablierung einer stabil transfizierten Zelllinie, die das 66.3-kDa-Protein überexprimiert, wurde nach der Anleitung des Transfektionsreagenzherstellers *Invitrogen* durchgeführt. 2×10^5 Zellen wurden in einer 35-mm-Platte ü.N. kultiviert. Es wurden 250 µl serumfreies Zellkulturmedium mit 10 µl *Lipofectamine 2000* vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Parallel wurden 4 µg DNA in 250 µl Serum-freiem Zellkulturmedium aufgenommen und für 5 min bei RT inkubiert. Beide Ansätze wurden vereint und nach vorsichtigem Durchmischen für 20 min bei RT inkubiert. In der Inkubationsphase wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 2 ml Zellkulturmedium überdeckt. Der DNA-*Lipofectamine-2000*-Komplex wurde tröpfchenweise auf das Medium gegeben und die Zellkulturplatte zur gleichmäßigen Durchmischung vorsichtig geschwenkt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen auf eine 14-cm-Platte überführt und nach weiteren 24 h mit dem Zusatz von 600 µg/ml Hygromycin (stabil exprimierende HT1080) unter Selektionsdruck gesetzt. Nach zehn Tagen wurden Einzelklonkolonien isoliert und von 24-well-Platten über T25-Flaschen bis in T75-Flaschen passagiert.

2.3.3 Gewinnung von Zellkulturmedium zur Proteinaufreinigung

Das 66.3-kDa-Protein stabil exprimierende BHK21 und HT1080-Zellen wurden von einer konfluent bewachsenen T-75 Zellkulturflasche auf drei 14-cm-Platten aufgeteilt. Nach 24 h wurde das Zellkulturmedium vorsichtig abgenommen und mit 20 ml Sammelmedium (DMEM mit 0,05 % FKS und 1×-Penicillin/Streptomycin) aufgefüllt. Nach weiteren 48 h und danach max. dreimal im Intervall von 48 h wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und mit 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{ml}$ Zellkulturüberstand zur Proteinfällung versetzt. Überstände wurden bis zur Aufreinigung bei 4 °C gelagert.

2.4 Histologische Methoden

2.4.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz wurde mit MEF und Cathepsin-D-defizienten MEF durchgeführt. Um eine starke Adhärenz der Zellen auf den Deckgläschen zu erreichen, wurden sterile Deckgläschen in einer 24-Loch-Platte für 10 min mit einer 1 %igen Gelatinelösung bei 37 °C inkubiert. Die Gelatine wurde abgesaugt und die Zellen auf den vorbereiteten Deckgläschen ausplattiert.

2.4.2 Methanol-Fixierung und Antikörperinkubation

Nach dem gründlichen Waschen mit PBS wurden die Zellen für 5 min mit -20 °C kaltem Methanol bei 4 °C fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal gründlich mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in PBS aufbewahrt oder direkt mit dem 1. Antikörper inkubiert. Die Inkubation mit Antikörpern (vgl. Tab. 2-4) wurde in einer feuchten Kammer, die Waschschritte in der 24-Loch-Platte durchgeführt. Um einen frühzeitigen Intensitätsverlust der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern wurden die Inkubationsschritte im Dunkeln durchgeführt. Nach dem Waschen mit dH_2O wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen *Fluormount* (Biacore) auf einem Objektträger eingebettet. Danach konnten die fixierten Zellen mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop ausgewertet werden.

Tab. 2-4: Immunfluoreszenz

Zeit (min)	Anwendung
15	Blocken mit 1 % BSA in PBS
60	Inkubation mit Erstantikörper
3 x 5	Waschen mit PBS
15	Blocken mit Serum des Zweitantikörpers
60	Inkubation mit Zweitantikörper
5 x 5	Waschen mit PBS
3 x 1	Mit H ₂ O spülen

Konzentrationen der benutzten Antikörper sind der Tab. 2-1 zu entnehmen.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Gewinnung von Zell- und Gewebehomogenaten

Für Homogenate von Zellen aus der Zellkultur wurden trypsinierte Zellen zweimal mit PBS gewaschen und im gewünschten Puffer aufgenommen. Auf Eis wurden die Zellen durch 5 × 20 sec Ultraschall homogenisiert und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Es folgte eine Proteinbestimmung (s. Kap. 2.5.2). Für Homogenate aus murinen Organen wurden die frisch entnommenen Organe (vgl. Kap. 2.6.2) in zehnfachem Volumen TBS-Puffer (+ Proteaseinhibitoren 1 mM EDTA, 1 mM PMSF und 5 mM JAA) aufgenommen und mit dem *Dounce*-Homogenisator homogenisiert. Anschließend wurden Membranbestandteile für 30 min bei 4 °C und 12 000 rpm abzentrifugiert und eine Proteinbestimmung durchgeführt (vgl. Kap. 2.5.2).

2.5.2 Proteinbestimmung mit dem *BioRad-DC-Protein-Assay*

(Lowry et al. 1951; Peterson 1979)

Reagenz A	Alkalische Kupfer-Tartrat-Lösung
Reagenz B	Folin-Reagenz
Reagenz S	Die Zusammensetzung wird vom Hersteller nicht bekannt gegeben.
Reagenz A`	1 ml Reagenz A und 20 µl Reagenz S (immer frisch angesetzt)

Bei der Proteinbestimmungsmethode der Firma *BioRad* werden Detergenzien, wie Triton-X 100, SDS und Tween-20 in bis zu einprozentiger Konzentration toleriert. Die Proteinbestimmung fand im Mikromaßstab und durch Erhebung von Doppelwerten in unbeschichteten 96-Loch-Platten statt. Zur Erstellung einer Eichgraden wurden 0-, 2-, 4-, 8-, 12-

und 16 µl einer 0,5 mg/ml BSA-Standardlösung in die 96-Loch-Platte pipettiert (Doppelwerte) und mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt. Die zu bestimmenden Proben wurden je nach Bedarf verdünnt. Für die Probenwerte wurden jeweils 10 µl der verdünnten Probe pro Loch eingesetzt und auf 100 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Anschließend wurden zu allen Proben 25 µl Reagenz A' und 200 µl Reagenz B pipettiert. Nach Inkubation für 15 min bei RT wurde die Absorption im *Microplate-Reader* (Tecan) bei einer Wellenlänge von 690 nm gemessen und der Proteingehalt über die Eichgerade bestimmt.

2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(Laemmli 1970)

Anodenpuffer	50 mM Tris pH 8,6 und 380 mM Glycin in dH ₂ O
Kathodenpuffer	0,1 % (w/v) SDS und 0,001 % (w/v) Bromphenolblau in Anodenpuffer
2x-Probenpuffer (wahlweise reduzierend)	100 mM Tris pH 6,8; 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, und wahlweise 2 % β-Mercaptoethanol in dH ₂ O
Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8 und 0,4 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris pH 6,8 und 0,4 % (w/v) SDS
Acrylamidlösung	30 % (w/v) Acrylamid und 0,8 % (w/v) Bisacrylamid in dH ₂ O
Ammoniumperoxid-sulfatlösung (APS)	10 % (w/v) Ammoniumperoxidsulfat in dH ₂ O

Tab. 2-5: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel bei SDS-PAGE

	Trenngel			Sammelgel
	10 %	12,5 %	15 %	4 %
Acrylamid-Konz.				
Acrylamid-Lösung (ml)	10,5	13,1	17,75	1,3
Trenngelpuffer (ml)	7,5	7,5	7,5	–
Sammelgelpuffer (ml)	–	–	–	2,5
APS (µl)	250	250	250	100
TEMED (µl)	25	25	25	10
ddH₂O	Ad 30 ml	Ad 30 ml	Ad 30 ml	Ad 10 ml

Die elektrophoretische Trennung von Proteingemischen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einer Apparatur aus vertikal ausgerichteten Glasplatten (16 cm × 18 cm). Das Trenngel wurde zwischen die Glasplatten

gegossen und gegen die Austrocknung mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation für ca. 30 min bei RT wurde das Isopropanol entfernt, die Oberfläche des Trenngels mit H₂O gespült, das Sammelgel eingegossen und der Probenkamm eingefügt. Nach der Polymerisation für ca. 30 min bei RT wurde das Gel in einer feuchten Kammer bis zur Verwendung für max. vier Tage bei 4 °C gelagert. Vor Gebrauch wurde der Probenkamm entfernt und die Probenaschen mit H₂O gespült. Gelreste wurden aus den Taschen entfernt. Die Proben wurden mit 2×-Probenpuffer 1 : 1 verdünnt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und die Probe für 30 sec bei 14 000 rpm abzentrifugiert. Die Probe wurde mit einer Mikroliterpipette in die Taschen unter den Kathodenpuffer geschichtet. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA, bis die Proben in das Trenngel eingelaufen waren, und anschließend bei 50 mA.

2.5.4 Silberfärbung

(Heukeshoven und Dernick 1988)

Fixierlösung 1:	30 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Essigsäure in ddH ₂ O
Fixierlösung 2:	0,5 M NaAc, 30 % (v/v) Ethanol, 0,5 % Glutaraldehyd und 0,2 % Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O in ddH ₂ O
Silberfärbelösung:	0,1 % (w/v) AgNO ₃ und 0,02 % (v/v) Formaldehyd in ddH ₂ O
Entwicklungslösung:	2,5 % (w/v) Na ₂ CO ₃ und 0,01 % (v/v) Formaldehyd in ddH ₂ O
Stopplösung:	0,05 M Glycin in ddH ₂ O

Alle Lösungen wurden frisch angesetzt. Alle Inkubationsschritte wurden bei leichtem Schütteln durchgeführt.

Nach dem Auftrennen der Proteine durch SDS-PAGE wurde das Gel in 250 ml Fixierlösung 1 für 1,5 h bei RT fixiert und anschließend in 250 ml Fixierlösung 2 für 2 h bei RT oder ü.N. bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Gel dreimal für 20 min in ddH₂O gewaschen und in 125 ml Silberfärbelösung für 1 h bei RT inkubiert und im Anschluss für 2 min in ddH₂O gewaschen.

Unter leichtem Schwenken wurde das Gel zweimal mit 125 ml und nach leichter Braunfärbung (nach ca. 1 min) mit weiteren 125 ml Entwicklungslösung für 1-4 min entwickelt bis die gewünschte Intensität der Färbung erreicht war. Das Abstoppen der Entwicklungsreaktion erfolgte durch Zugabe von 125 ml Stopplösung. Nach dreimaligem Waschen mit ddH₂O konnte das Gel fotografiert und getrocknet werden.

2.5.5 Färbung nach Coomassie

(Neuhoff et al. 1988)

Coomassie-Stammlösung	0,1 % (w/v) <i>Coomassie-Brilliant-Blue G250</i> , 2 % (w/v) Orthophosphorsäure und 10 % Ammoniumsulfat in ddH ₂ O
Coomassie-Färbelösung	80 % Coomassie-Stammlösung und 20 % Methanol
Fixierlösung	40 % Ethanol und 10 % Essigsäure in ddH ₂ O
Entfärber-Lösung	1 % Essigsäure in ddH ₂ O

Das SDS-Gel wurde direkt nach der Elektrophorese für 1 h bei RT auf einer Wippe in der Fixierlösung inkubiert und anschließend für 10 min gewässert. Danach erfolgte ü.N. bei RT die Färbung mit frisch angesetzter Coomassie-Färbelösung. Das gefärbte Gel wurde abschließend mit der Entfärberlösung bis zur gewünschten Farbtintensität entfärbt. Das Gel konnte nach erneuter Wässerung entweder getrocknet oder aber eingeschweißt und der Massenanalytik zugeführt werden.

2.5.6 Western Blot (*Semi-Dry*) und Immundetektion

Anodenpuffer	75 mM Tris/HCl pH 7,4 und 20 % Methanol
Blotto	5 % Milchpulver in PBST
Kathodenpuffer	40 mM ϵ -Aminocapronsäure, 20 mM Tris/ HCl, pH 9,0 und 20 % (v/v) Methanol
PBST	10 mM PBS und 0,1 % Tween 20 in ddH ₂ O

Nach Durchführung der SDS-PAGE (vgl. Kap. 2.5.3) wurden das Trenngel und eine PVDF-Membran (letztere nach einminütiger Aktivierung in Methanol) für 10 min in Kathodenpuffer äquilibriert. Drei *Whatman*-Filterpapiere (3 mm) wurden in Kathodenpuffer und drei weitere *Whatman*-Filterpapiere (3 mm) in Anodenpuffer getränkt. Der Transfer des im Gel gebundenen Proteins auf die PVDF-Membran erfolgte im *Semi-Dry-Blot*-Verfahren bei 1 mA/cm² für 70 min bei RT in der dafür vorgesehenen Western-Blot-Apparatur (für Aufbau vgl. Abb. 2-2).

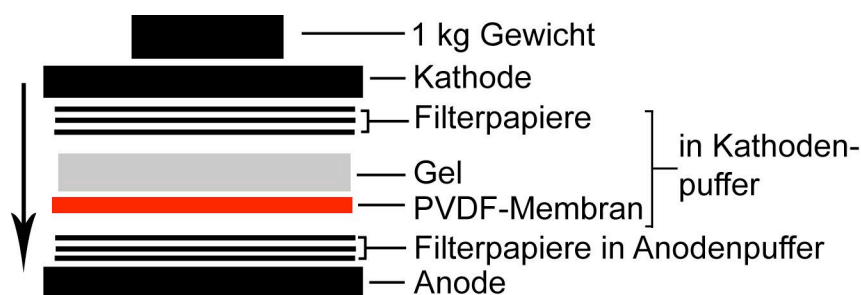


Abb. 2-2: Aufbau Western Blot

Die Abbildung zeigt den Aufbau des Western Blots für die Semi-Dry-Transfer Methode. Wichtig ist die luftblasenfreie Schichtung der einzelnen Bestandteile zwischen den Elektroden.

Die Immundetektion von Proteinen wurde über Primärantikörper (vgl. Tab. 2-1) und passende Sekundärantikörper (vgl. Kap. 2.1.9.2) über die Detektion eines Chemolumineszenzsignals vorgenommen. Bis auf den α -His-Antikörper, der mit einer 3 %igen Lösung von BSA in PBST bessere Ergebnisse erzielte, wurden alle anderen Antikörper mit Blotto verdünnt und die PVDF-Membran nach folgendem Schema inkubiert:

Blocken	2 h bei RT in Blotto
Inkubation Primärantikörper	ü.N. bei 4 °C in Blotto
Waschen	6 × 10 min bei RT in PBST
Inkubation Sekundärantikörper	1,5 h bei RT in Blotto
Waschen	6 × 10 min bei RT in PBST.

Die Membran wurde mit einer 1 : 1 Mischung der beiden Lösungen des *Supersignal-Detection-Systems* (Pierce) unter leichtem Schwenken für 5 min inkubiert. Das Chemolumineszenzsignal wurde mit der CCD-Kamera detektiert und als elektronisches Bild gespeichert. Die Expositionszeiten variierten zwischen 10 sec und 10 min und richteten sich nach der Stärke des Signals.

2.5.7 Freiwaschen einer PVDF-Membran

Um eine PVDF-Membran mehrmals für die Immundetektion mit verschiedenen Antikörpern benutzen zu können, wurde die Membran durch Freiwaschen mit 0,2 M NaOH-Lösung von gebundenen Antikörpern befreit. Dazu wurde die Membran unter gleichmäßiger Bewegung auf dem Wipptisch für 5 min in dH₂O gewässert, für zweimal 5 min mit 0,2 M NaOH freigewaschen (Auflösung der Antigen-Antikörperbindung) und anschließend fünfmal für 5 min in dH₂O gewässert. Nach dem Freiwaschen konnte die Membran einer weiteren Immundetektion zugeführt werden (vgl. Kap. 2.5.6).

2.5.8 Färbung einer PVDF-Membran für die N-terminale Sequenzierung

(Weber und Osborn 1969)

Coomassie-Lösung 0,5 % (w/v) Coomassie-Blau-R, 50 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure in ddH₂O

Entfärber-Lösung 50 % Methanol und 10 % Essigsäure in ddH₂O

Die PVDF-Membran wurde ü.N. bei RT (oder 2 h bei 37 °C) auf einer Wippe in Coomassie-Lösung gefärbt und in der Entfärber-Lösung ü.N. wieder entfärbt. Die Entfärber-Lösung wurde mehrmals gewechselt. Das Gel wurde anschließend zweimal für 15 min gewässert und getrocknet.

2.5.9 Ni-NTA-Aufreinigung des 66.3-kDa-Proteins aus Zellkulturüberstand

(*The QIAexpressionist – Handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins* 2003)

Waschpuffer 1 (W1) 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 mM NaCl

Waschpuffer 2 (W2) W1 + 10 mM Imidazol

Elutionspuffer 1 (E1) W1 + 100 mM Imidazol

Elutionspuffer 2 (E2) W1 + 250 mM Imidazol

Um Proteindegeneration vorzubeugen wurde die Umgebungstemperatur, sowie die Temperatur der Träger- und Dialyseflüssigkeiten und Zentrifugen für die gesamte Aufreinigungsdauer auf 4 °C eingestellt. Die Proteinaufreinigung wurde mit fünf Litern des mit (NH₄)₂SO₄ versetzten Zellkulturmediums durchgeführt (vgl. Kap. 2.3.3).

Zuerst wurde das gefällte Protein für 30 min bei 10 000 rpm im JA10-Rotor gesammelt und in 50 ml PBS resuspendiert. Unter kontinuierlichem Rühren erfolgte eine Dialyse gegen 5 l PBS im Dialyseschlauch (Biomol), wobei der Dialysepuffer dreimalig ausgewechselt wurde. Das Dialysat wurde für 15 min bei 5000 rpm in der Kühltischzentrifuge zentrifugiert, um ausgefallenes Protein abzutrennen. Danach wurden dem Überstand 0,5 ml Ni-NTA pro gesammeltem Liter Zellkulturmedium zugegeben und zur Bindung des Proteins an das Säulenmaterial die Suspension ü.N. auf dem Drehrad inkubiert. Die Suspension wurde für 5 min bei 400 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Ni-NTA-Pellet wurde in W1 resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde bis zu einer OD₂₈₀= 0 wiederholt. Dann wurde die Suspension auf eine 10-ml-MoBiTec-Säule (35 µm Porengröße) gegeben, der Überstand abgelassen, verworfen und das Säulenmaterial mit W2 bis zur OD₂₈₀= 0 gewaschen. Danach wurde, um das Protein vom Säulenmaterial zu lösen, dreimal mit 1 ml E1 und danach dreimal

mit 1 ml E2 eluiert. Die Eluate wurden ü.N. im Dialyseschlauch gegen den gewünschten Puffer (10 mM Tris, pH 8,0 oder 10 mM Hepes, pH 8,0) dialysiert. Für die Analyse in Western Blot und die Darstellung im Silbergel wurden 0,1 % des Eluates entnommen. Das Ni-NTA-aufgereinigte Protein wurde zur weiteren Aufreinigung auf die HPLC-Anlage aufgetragen.

2.5.10 HPLC-Aufreinigung

Puffer A 10 mM Hepes pH 8,0

Puffer B 10 mM Hepes und 1 M NaCl, pH 8,0

Die HPLC-Aufreinigung des 66.3-kDa-Proteins fand an der *Vision-Workstation* (Applied Biosystems) statt. Das Ni-NTA-aufgereinigte Protein wurde in einem Volumen von ca. 8-9 ml gegen Puffer A (Auftragspuffer für Anionenaustauscher) dialysiert. Es folgte eine Anionenaustauscherchromatographie an der *Poros-HQ*-Matrix mit einem Stufengradienten (vgl. Tab. 2-6). Da maximal 4 ml Proteinlösung auf die Säule geladen werden konnten, wurden sukzessive bis zu drei Läufe vorgenommen. Die einzelnen Fraktionen der Aufreinigungen wurden gepoolt und 1 % jeder Fraktion wurden zur Analyse in Silbergel und Western Blot (α -His-Antikörper) eingesetzt. Fraktionen, die das entsprechende Protein enthielten, wurden lyophilisiert, in PBS im entsprechenden Volumen aufgenommen, gegen PBS dialysiert und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert. Die Aufreinigung konnte wahlweise auch in einem Puffer-System mit 10 mM Tris, pH 8,0 durchgeführt werden.

Tab. 2-6: Laufbedingungen der HPLC-Aufreinigung des 66.3-kDa-Proteins

Methode	Säulenvolumen	Puffer A	Puffer B
Injektion der Probe	Max. 4 ml	in Puffer A	
Konstante Stufe	2	100 %	0 %
Linearer Gradient	5	85 %	15 %
Konstante Stufe	3	85 %	15 %
Linearer Gradient	5	70 %	30 %
Konstante Stufe	3	70 %	30 %
Linearer Gradient	5	50 %	50 %
Konstante Stufe	3	50 %	50 %
Linearer Gradient	5	0 %	100 %
Konstante Stufe	4	0 %	100 %

Die Aufreinigung fand bei konstanter Flussgeschwindigkeit von 5 ml/min statt. Das Säulenvolumen betrug 1,662 ml. Puffer A = 10 mM Hepes (pH 8,0), Puffer B = 10 mM Hepes (pH 8,0), 1 M NaCl.

2.5.11 Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen das 66.3-kDa-Protein

Das aufgereinigte Protein (vgl. Kap. 2.5.10) wurde ü.N. gegen PBS dialysiert und 1:1 in *Stimune-Adjuvans* (Cedi Diagnostics) aufgenommen und in vier Immunisierungsschritten (vgl. Tab. 2-7) einem Kaninchen injiziert. Vor der ersten Immunisierung wurde dem Kaninchen zur Gewinnung von Präimmenserum 6,5 ml Blut abgenommen, um den Immunstatus vor Immunisierung festzustellen. Zwischen den Immunisierungen wurden Blutentnahmen vorgenommen, um die Immunisierungswirkung zu überprüfen (Titerbestimmung). Am Tag 104 nach der ersten Immunisierung fand die Ausblutung des Kaninchens statt. Das Blut wurde ü.N. bei 4 °C gelagert. Danach wurden in der Tischkühlzentrifuge bei 5000 × g die zellulären Blutbestandteile vom Serum getrennt. Das gewonnene Antiserum wurde aliquotiert und zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Das Serum konnte für die Western-Blot-Analyse, die Immunfluoreszenz und die Immunpräzipitation verwendet werden (vgl. Tab. 3-1). Die einzelnen Immunisierungen, die Abnahme von Serum und das Ausbluten wurde von Mitarbeitern der „Zentrale Tierexperimentele Einrichtung“ der Georg-August Universität Göttingen durchgeführt.

Tab. 2-7: Immunisierungsprotokoll

Tag	Behandlung
0	Blutentnahme von 6,5 ml (Gewinnung des Präimmunerums) Injektion von 0,3 ml Immunisierungslösung (300 µg Protein)
28	Injektion von 0,3 ml Immunisierungslösung (150 µg Protein)
42	Blutentnahme von 6,5 ml
56	Injektion von 0,1 ml Immunisierungslösung (150 µg Protein)
68	Blutentnahme von 7,5 ml
83	Injektion von 0,1 ml Immunisierungslösung (150 µg Protein)
95	Blutentnahme von 7,5 ml
104	Ausblutung ergab ca. 80 ml Blut

2.5.12 Edman-Abbau

Die bei der HPLC-Aufreinigung aufgereinigten Proteinfragmente des 66.3-kDa-Proteins wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Coomassie-Blau (vgl. Kap. 2.5.5) angefärbt. Proteinbanden wurden ausgeschnitten und der automatischen N-terminalen Sequenzierung im *Procise cLC sequenator* (Applied Biosystems) zugeführt. Die Edman-Analyse wurde nach Abgabe der vorbereiteten Membran von Dr. Bernhard Schmidt und Klaus Neifert der Abteilung Biochemie II durchgeführt.

2.5.13 Massenspektrometrie

Massenanalytische Identifizierung von Proteinen und Proteinfragmenten wurde nach Abgabe der vorbereiteten Proben (gefärbte Coomassiegele) von Dr. Bernhard Schmidt und Nicole Eiselt der Abteilung Biochemie II am MALDI-TOF/TOF-MS (Reflex I/III, Bruker Daltonik) der Proteomics-Gruppe des MPI für Experimentelle Medizin Göttingen durchgeführt.

Der bei o.g. Versuchen benutzte *Mascot-Score* errechnet sich aus $-10 \times \log(P)$, wobei P der Wahrscheinlichkeit entspricht, dass die analysierte Übereinstimmung zwischen detektierten Massen und den Massen aus der Datenbank ein zufälliges Ergebnis ist (die Berechnung erfolgt nach einem von der Firma nicht näher definierten Algorithmus).

2.5.14 TCA-Fällung von Protein

Die Fällung von Protein aus Proteinlösungen wurde mittels TCA vorgenommen. Mit 100 % TCA wurde eine Probe auf eine TCA-Endkonzentration von 10 % gebracht, gründlich vermischt und das Protein ü.N. bei 4 °C gefällt. Anschließend wurde das gefällte Protein für 15 min bei 14 000 rpm in der Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde mit 400 ml -20 °C kaltem, 100 %igem Ethanol überdeckt und erneut für 10 min bei 14 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 30 min bei 37 °C und mit offenem Deckel getrocknet.

2.5.15 Reinigung von *Pansorbin*

(Lemansky et al. 1985)

NET-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl und 5 mM EDTA in dH ₂ O
NET/BSA-Puffer	NET-Puffer, 5 mg/ml BSA und 0,5 % TX-100
Lagerungspuffer	10 mg/ml BSA und 0,04 % NaN ₃ in PBS

Eppendorfgefäße wurden abgewogen, mit 1 ml ungewaschenem *Pansorbin* gefüllt und für 2 min bei 12 000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in je 1 ml NET-Puffer resuspendiert und die Proben für 30 min bei 85 °C inkubiert. Anschließend wurde für 2 min bei 12 000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml NET-Puffer mit 1 % (w/v) SDS resuspendiert und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Pellets wurden dreimal mit 1 ml NET/BSA-Puffer und zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Pellets gewogen, mit Lagerungspuffer auf eine *Pansorbin*-Konzentration von 100 mg/ml eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.5.16 Metabolische Markierung von Proteinen mit [³⁵S]-Methionin/Cystein

Hungermedium	1 % Glutamin und 5 % hitzeinaktiviertes sowie dialysiertes FKS in DMEM (ohne Methionin und Cystein)
Markierungsmedium	Hungermedium und 100 µCi/ml [³⁵ S]-Methionin/Cystein
Lysispuffer	1× TBS mit 0,1 % TX-100, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF und 5 mM JAA (Proteaseinhibitoren)

Am Vortag der metabolischen Markierung wurden die zu markierenden Zellen in 3-10 cm großen Zellkulturschalen ausplattiert. Nach 12 h waren die Zellen zu 80 % konfluent. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für eine Stunde mit Hungermedium inkubiert. Danach erfolgte die halb- bis einstündige Inkubation der Zellen mit Markierungsmedium (im Weiteren mit dem engl. Fachterminus *Pulse* bezeichnet), bei der die Inkorporation der radioaktiv markierten Aminosäuren stattfand. Anschließend wurde das Medium durch normales Zellkulturmedium ersetzt. Die Inkubationszeit vom Ende der Markierung bis zur Gewinnung der Zell- und Mediumproben (im Weiteren mit dem engl. Fachterminus *Chase* bezeichnet) variierte von 0-72 h. Nach Abschluss der *Chase*-Zeit wurde das Medium abgenommen und für 5 min mit 1000 × g zentrifugiert, um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, das Pellet verworfen. Die Zellen wurden in der Zellkulturschale zweimal mit 4 °C-kaltem TBS gewaschen, mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst, in zweimal 200 µl 4 °C-kaltem Lysispuffer aufgenommen und entweder sofort in der Immunpräzipitation weiter benutzt oder bei -20 °C gelagert.

2.5.17 Immunpräzipitation des metabolisch markierten 66.3-kDa-Proteins

Protaminsulfat	3 % (w/v) in ddH ₂ O gelöst
Immunomix (IMM)	0,5 % Natriumdesoxycholat und 1 % TX-100 in PBS
Präzipitationsimmunomix (PIMM)	0,2 % SDS und 10 % BSA in IMM mit 1 mM EDTA, 1 mM PMSF und 5 mM JAA
Neufeldpuffer	10 mM Tris/HCl pH 8,5, 0,6 M NaCl, 0,1 % SDS und 0,05 % Nonidet P-40

Zellen und Zellkulturmedium wurden nach der metabolischen Markierung (vgl. Kap. 2.5.16) auf Eis gelagert. Die Zellen wurden für 3 × 20 sec bei 4 °C durch Ultraschall homogenisiert. Den Medien und Zellhomogenaten wurden 0,8 Volumen PIMM zugesetzt. Um die genomische DNA aus den Proben zu entfernen, wurde die Lösung auf 0,03 % Protaminsulfat eingestellt und für 15 min auf Eis inkubiert. Die ausgefallene DNA wurde für 10 min bei 4 °C und 12 000 × g

abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 15-ml-*Falcon*-Gefäße überführt. Dann wurden jeweils 20 µl Präimmunserum des 66-Antiserums und 60 µl ungewaschenes *Pansorbin* zugegeben und für 6 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Durch eine Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 100 000 × g (TLA 45) wurden unspezifisch an das Serum und das *Pansorbin* bindende Proteine aus der Lösung entfernt. Der Überstand wurde in ein neues 15-ml-*Falcon*-Gefäße überführt und der Lösung 10 µl des Antiserums zugesetzt. Die Bildung der Antigen-Antikörperkomplexe erfolgte ü.N. bei 4 °C auf dem Drehrad. Am nächsten Morgen wurden 60 µl gewaschenes *Pansorbin* hinzugefügt, für 2 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert und anschließend bei 12 000 × g zentrifugiert. Der Waschvorgang bestand aus vier sukzessiven Waschschritten mit je 800 µl 4 °C kaltem Neufeldpuffer, Immunomix, 2 M KCl + Immunomix und 1×-PBS. Bei jedem Waschdurchgang wurde das Pellet durch sorgfältiges Resuspendieren gewaschen, das *Pansorbin* mit den gebundenen Antikörper-Antigenkomplexen für 1 min bei 12 000 × g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dem letzten Waschdurchgang wurde das Pellet in 75 µl 1,5×-SDS-Ladepuffer (reduzierend) aufgenommen und die Lösung für 8 min auf 98 °C erhitzt. Das *Pansorbin* wurde abzentrifugiert und der Überstand über ein 15 %iges SDS-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde eingeschweißt, getrocknet und für 3-7 Tage auf einem *BioImager-Screen* exponiert.

2.5.18 Subzelluläre Fraktionierung (Tritosomenpräparation)

(Leighton et al. 1968; Wattiaux et al. 1963)

Bei der Tritosomenpräparation werden Lysosomen in zwei Stufen durch differentielle Zentrifugation und durch Zentrifugation in einem diskontinuierlichen Sucrosegradienten von anderen Zellbestandteilen insbesondere den Mitochondrien zu trennen (Leighton et al. 1968). Das Leberhomogenat wurde dazu durch Zentrifugation in eine nukleäre Fraktion (N) und einen post-nukleären Überstand (E) aufgetrennt. Anschließend wurde E in eine mitochondriale Fraktion (M), eine lysosomale und mitochondrial Fraktion (L), eine mikrosomale Fraktion (P) und einen zytosolischen Überstand (S) aufgetrennt. Die Fraktion L wurde anschließend unter einen diskontinuierlichen Sucrosegradienten geschichtet und durch Zentrifugation in die Fraktionen 1-4 aufgetrennt (vgl. Abb. 3-10).

Den Mäusen wurden 3-4 Tage vor der Präparation 0,75 mg/g Körpergewicht Tyloxapol (Triton WR-1339) intraperitoneal injiziert. Tyloxapol führt zu einer Abnahme der Dichte von Lysosomen. Am Tag der Präparation wurden die Mäuse mit CO₂ narkotisiert und dekapitiert. Nach dem Ausbluten wurde den Mäusen die Leber über einen Bauchschnitt entnommen. Für

jeden Gradienten wurden 2 g Lebergewebe eingewogen und nach Zugabe von 2,5 Volumen 4 °C-kalter 0,25 M Sucrose (in ddH₂O) im Teflon-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 0,25 M Sucrose auf ein Gesamtvolumen von 12 ml gebracht und für 10 min bei 4 °C mit 2300 rpm (Labofuge) zentrifugiert. Der Überstand (E1), ca. 9 ml, wurde abgenommen, das Sediment kurz gemischt, in 5 ml 0,25 % Sucrose resuspendiert, homogenisiert (s.o.), mit 0,25 % Sucrose auf ein Endvolumen von 12 ml gebracht und erneut für 10 min bei 4 °C mit 2300 rpm zentrifugiert. Der Überstand (E2), ca. 9 ml, wurde abgenommen, mit E1 vereinigt und auf ein Volumen von 22 ml gebracht. Das Sediment stellt N, die nukleäre Fraktion dar. Jeweils 10 ml des vereinten Überstandes wurden auf zwei UZ-Röhrchen (14 × 95 mm, Beckman) verteilt und für 3 min bei 4 °C mit 13 000 rpm (Ultrazentrifuge, Rotor SW41) zentrifugiert. Der Überstand (LPS1) wurde abgenommen, das Sediment mit einem Glasstab in 10 ml 0,25 M Sucrose in einem Ti-50-Röhrchen vereint und erneut für 3 min bei 4 °C mit 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (LPS2) wurde mit LPS1 vereint und das Sediment, die Fraktion M, wurde zur Analyse in 0,25 M Sucrose aufgenommen. LPS wurde für 7 min bei 4 °C mit 25 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (PS1) wurde quantitativ abgenommen und das Pellet (Fraktion L) mit einem Glasstab resuspendiert und mit 10 ml Sucrose gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 7 min bei 4 °C mit 25 000 rpm. Die Überstände (PS2) wurden erneut quantitativ abgenommen und mit PS1 vereint (PS1 + PS2 = PS = ca. 30 ml).

Fraktion L wurde mit einem Glasstab in 1.21 ρ Sucrose resuspendiert. Der Gradient wurde wie folgt geschichtet (UZ-Röhrchen, 16 × 76 mm, Beckman): 3,5 ml L in 1.21 ρ Sucrose, 3 ml 1.15 ρ Sucrose, mit 3 ml 1.14 ρ Sucrose und ~ 2 ml 1.06 ρ Sucrose. Der Gradient wurde für 150 min bei 4 °C mit 25 000 rpm in der Ultrazentrifuge bei langsamer Beschleunigung und Bremsung (Rotor 75Ti) zentrifugiert. Anschließend wurden folgende vier Fraktionen abgenommen. F1 entsprach der 1,06 ρ Sucrose-Schicht. Die lysosomale Fraktion (F2), entsprach der Interphase zwischen 1,06 ρ und 1,14 ρ Sucrose. F3 entsprach den Schichten mit 1,14 ρ und 1,15 ρ Sucrose. Die mitochondriale Fraktion (F4) entsprach der Schicht mit 1.21 ρ Sucrose und dem Pellet.

2.5.19 Enzymaktivitätsbestimmung

Im Anschluss an die Tritosomenpräparation wurde für jede gewonnene Fraktion eine Enzymbestimmung der folgenden Enzyme durchgeführt.

2.5.19.1 β -Hexosaminidase (Lysosom)

Puffer	0,1 M Natriumcitrat pH 4,6, 0,04 % NaN ₃ und 0,2 % BSA
Substrat	10 mM p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid in Puffer
Stopplösung	0,4 M Glycin/NaOH pH 10,4

10 μ l Probenvolumen in 0,1 % Triton X-100 und 100 μ l Substrat wurden für bis zu 60 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert und die Reaktion mit 500 μ l 0,4 M Glycin/NaOH (pH 10,4) gestoppt. Es wurden ebenfalls ein Enzymleerwert und Substratleerwert erhoben. Die Extinktion wurde bei 405 nm gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ beträgt 18,5 cm²/mol. Die Aktivität wurde nach Formel 1 berechnet.

$$\frac{\Delta E_{405} \times \text{Gesamtvolumen [ml]}}{\epsilon \times \text{Probenvolumen [ml]} \times t [\text{min}] \times 1 \text{ cm}} \times \text{Verdünnung} = \text{Aktivität [mU/ml]}$$

Formel 1: ΔE = Extinktion bei 405 nm; Gesamtvolumen = Reaktionsvolumen nach Abstoppen der Reaktion; Verdünnung = Verdünnung der Probe; ϵ = Extinktionskoeffizient; Probenvolumen = Menge der eingesetzten Probe; t = Zeit.

2.5.19.2 β -Glucuronidase (Lysosom)

Puffer	0,1 M Natriumcitrat pH 4,6, 0,04 % NaN ₃ , 0,4 % BSA
Substrat	20 mM p-Nitrophenyl- β -D-glucuronid in Puffer
Stopplösung	0,4 M Glycin/NaOH pH 10,4

50 μ l Probenvolumen, 100 μ l Substratlösung und 50 μ l NaCl wurden für 120 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert und die Reaktion mit 1 ml 0,4 M Glycin/NaOH (pH 10,4) gestoppt. Es wurden ein Enzymleerwert und Substratleerwert erhoben. Die Extinktion wurde bei 405 nm gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ beträgt 18,5 cm²/mol. Die Aktivität wurde nach Formel 1 berechnet.

2.5.19.3 Succinatdehydrogenase (Mitochondrium)

(Lester und Smith 1961)

Puffer	50 mM Phosphatpuffer pH 7,5
Substrat	10 mM Natriumsuccinat und 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5
Indikatorlösung	0,25 % p-Iodonitrotetrazolium (violett) in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5
Stopplösung	5/11 Ethylacetat, 5/11 Ethanol und 1/11 TCA

10 µl Probenvolumen wurden für 10 min bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl Indikatorlösung und eine weitere Inkubation von 10 min, die durch 1 ml Stopplösung beendet wurde. Es wurden ebenfalls ein Enzymleerwert, Indikatorleerwert und Substratleerwert erhoben. Die Proben wurden für 5 min bei 13 000 rpm zentrifugiert und die Extinktion bei 490 nm gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ beträgt 18,3 cm²/mol. Die Aktivität wurde nach Formel 1 berechnet.

2.5.19.4 Glukose-6-Phosphatase (Endoplasmatisches Retikulum)

Puffer	116 mg Maleinsäure in ddH ₂ O und 10 mM Kaliumnatriumtartrat pH 6,5
Substrat	0,1 M Glukose-6-Phosphatlösung pH 6,5
Stopplösung	8 % TCA in ddH ₂ O
Phosphatreagenz	1/6 A und 5/6 B auf Eis: A) 10 % Ascorbinsäure (frisch); B) 28,6 ml konz. H ₂ SO ₄ , 4,2 g Ammoniummolybdat × 4H ₂ O auf 1000 ml mit H ₂ O auffüllen.

50 µl Probenvolumen, 300 µl Puffer und 100 µl Substrat wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert mit Stopplösung versetzt und anschließend für 10 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Für den Phosphatnachweis wurden 300 µl des Überstandes mit 700 µl Phosphatreagenz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die OD bei 820 nm gegen H₂O gemessen. Eine OD = 0,260 entspricht 0,01 mM Phosphat.

2.5.20 Membranassoziation

Die HT1080-66-Zellen wurden trypsiniert, mit PBS gewaschen und in Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA, 1 mM PMSF und 5 mM JAA) aufgenommen. Die Zellen wurden 4 × 30 sec durch Ultraschall homogenisiert und Zelltrümmer für 5 min bei 4 °C bei 500 × g abzentrifugiert. Danach wurde vom Überstand eine Proteinbestimmung durchgeführt, das Homogenat auf eine Konzentration von 1,3 µg/µl eingestellt und jeweils 150 µl (ca. 200 µg)

in UZ-stabile Eppendorfgläser überführt. In die verschiedenen Eppendorfgläser wurde jeweils entweder 150 µl Lysepuffer, 150 µl 2 M Kaliumacetat, 150 µl Na₂CO₃, 150 µl 2,5 M Harnstoff oder 2 % Triton X-100 gegeben, kurz durchmischt und dann für 45 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 45 min mit 100 000 × g bei 4 °C, durch die Membranen pelletiert und Matrixbestandteile isoliert wurden. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und ü.N. mit TCA gefällt. Das Sediment wurde in 50 µl SDS-Ladepuffer aufgenommen. Die Proteine wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt und das 66.3-kDa-Protein mit dem 66-Antiserum detektiert.

2.5.21 Deglykosylierung mit N-Glykosidase F (PNGase F)

(Roche PNGase F Produktbeschreibung 2003)

Zellhomogenat von HT1080-66-Zellen wurden mit PBS auf eine Proteinkonzentration von 5 µg/µl gebracht. 50 µg Protein und 25 µl 0,1 M β-Mercaptoethanol mit 1 % SDS wurden für 5 min bei 100 °C erhitzt. Anschließend wurde dieser Lösung auf Eis 30 µl einer 0,5 M Tris/HCl-Lösung (pH 8,0) mit 50 mM EDTA, 11,7 µl Triton X-100 (10 % v/v), 11,7 µl 0,1 M 1,10-Phenanthroline/MetOH und 2 µl PNGase F (100 U/mg, Roche) zugegeben. Die Ansätze wurden im Inkubator bei 37 °C je nach gewünschter Zeit inkubiert. Bei Inkubationszeiten über 12 h wurde nach 12 h jeweils 2 µl PNGase F ergänzt. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Ansätze für 5 min auf 100 °C erhitzt und anschließend ü.N. mit TCA gefällt. Die Proben wurden in SDS-Ladepuffer aufgenommen und eine Analyse im Western Blot durchgeführt.

2.5.22 Affinitätschromatographie an 66.3-kDa-Protein-Affigel-10-Matrix

(BioRad Activated Immunoaffinity Supports for Affi-Gel-10 2000)

Zur Immobilisierung von 66.3-kDa-Protein wurde aufgereinigtes 66.3-kDa-Protein an Affi-Gel-10-Material gekoppelt. Die Bindungskapazität der Affi-Gel-10-Matrix beträgt ungefähr 30 mg Protein pro Milliliter Säulenmaterial. Die Kopplung des Proteins erfolgt über eine Reaktion der freien Aminogruppe des Proteins mit den an die Agarose-Matrix gekoppelten N-hydroxysuccinimid-Estern. Die Kopplung des Proteins an die Matrix fand bei 4 °C im Kühlraum mit gekühlten Lösungen statt, um proteolytische Degradation des Proteins zu verhindern. Die Matrix wurde zuerst mit zwei Matrixvolumen dH₂O gewaschen und anschließend mit zwei Matrixvolumen des jeweiligen Bindungspuffers äquilibriert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem zu immobilisierenden Protein in Bindungspuffer (aufgereinigtes 66.3-kDa-Protein in 0,1 M HEPES, pH 8,0 und BSA in 0,1 M MES-Puffer,

pH 4,8) in einem Verhältnis von 3:1 zum Matrixvolumen ü.N. bei 4 °C auf dem Drehrad. Nach der Inkubation wurde der Durchfluss aufgefangen und analysiert. Freie Bindungsstellen der Affi-Gel-10-Matrix wurden durch eine dreistündige Inkubation mit einem Säulenvolumen 200 mM Ethanolamin, pH 8,0 abgesättigt. Die Säule wurde mit Bindungspuffer bis zu einer $OD_{260} = 0$ gewaschen und anschließend bis zum Gebrauch in 0,02 % NaN_3 in PBS bei 4 °C gelagert.

2.5.23 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Bindungspartnern

Bindungspuffer: 100 mM NaAc-Puffer pH 5,2, 5 mM $MgCl_2$, 150 mM NaCl. Proteaseinhibitoren, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF und 5 mM JAA (frisch dazugegeben)

Der gesamte Versuch wurde im Kühlraum bei 4 °C mit vorgekühlten Puffern durchgeführt. Eine F2-Fraktion (vgl. Kap. 2.5.18) wurde 6×30 sec durch Ultraschallbehandlung homogenisiert und mit Bindungspuffer 1:4 verdünnt. Im ersten Schritt fand eine Präadsorption auf der BSA-Säule statt, um unspezifisch an das Säulenmaterial oder BSA-bindendes Protein aus der F2-Fraktion zu entfernen. Dafür wurde die F2-Fraktion auf der BSA-Säule für 30 min auf dem Drehrad inkubiert. Der Durchfluss wurde direkt auf die mit Bindungspuffer äquilibrierte 66.3-kDa-Protein-Säule gegeben und für eine Stunde auf dem Drehrad inkubiert. Die 66.3-kDa-Protein-Säule wurde anschließend mit Bindungspuffer bis zu einer $OD_{280nm} \approx 0$ gewaschen. Bindungspartner wurden mit steigender Salzkonzentration in Bindungspuffer eluiert (E1 = 500 mM NaCl, E2 = 1 M NaCl, E3 = 1,5 M NaCl, E4 = 3 M NaCl). Für jede Salzkonzentration wurden dreimal hintereinander 1,5 ml Elutionspuffer für 1 min auf der Säule inkubiert und anschließend in Eppendorfgefäßen aufgefangen. Die Elutionsfraktionen wurden ü.N. durch TCA gefällt, die drei Sedimente der jeweiligen Elution wurden vereint und über Coomassie-, Silbergel- oder Western-Blot-Analyse ausgewertet. Die Säulen wurden nach dem Gebrauch mit zehn Säulenvolumen Bindungspuffer und 1,5 M NaCl, mit 20 Säulenvolumen Bindungspuffer und mit 20 Säulenvolumen PBS gewaschen und in 0,02 % NaN_3 bei 4 °C abgestellt.

2.5.24 Yeast-two-Hybrid

(Clontech Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual 1999)

Durch das *Yeast-two-Hybrid*-(Y2H)-System lassen sich Proteinwechselwirkungen *in vivo* untersuchen (Fields und Song 1989). Für einen funktionsfähigen Transkriptionsfaktor Gal4 der Hefe *S. cerevisiae* müssen sich die GAL4-DNA-Bindungsdomäne und die GAL4-Aktivierungsdomäne sterisch annähern. Im *Matchmaker-GAL4-Two-Hybrid-System-3* (Clontech) kodiert der pGBKT7-Vektor die DNA-Bindungsdomäne und der pGADT7-Vektor die Aktivierungsdomäne. In den Vektoren lassen sich Zielproteine als Fusionsproteine (*bait* und *prey* Protein) mit der jeweiligen GAL4-Domäne in *S. cerevisiae* exprimieren. Interagieren die Zielproteine miteinander, so führt die sterische Annäherung der GAL4-DNA-Bindungs- und Aktivierungsdomäne zu einem funktionellen Transkriptionsfaktor und somit zur Expression von Reportergenen. Dabei lassen sich über den Wachstum auf Mangelmedium Rückschlüsse über die Intensität der Proteininteraktion ziehen. So wachsen Hefen bei schwacher Interaktion lediglich auf His-Mangelmedium und bei starker Proteininteraktion auf His-/Ade-Mangelmedium. Als Positivkontrolle für eine starke Interaktion gilt die Interaktion von p53 und SV40-large-T-Antigen und als Negativkontrolle das Mitführen von mock-Vektoren.

2.5.24.1 Klonierung

Über *Add-on-PCR* auf das pcDNA3.1/Hygro+66.3-kDa-Protein-Konstrukt (vgl. Kap. 3.1.1) wurden verschiedene Fragmente des 66.3-kDa-Proteins unter Einführung der benötigten Schnittstellen amplifiziert; mit den Primern A und E (für Vektoren und Primer vgl. Kap. 6.3) die Prä-Proform (AS Met1 - Asp594), mit den Primern B und E die Proform (AS Leu47 - Asp594), mit den Primern B und G das 28-kDa-Fragment (AS Leu47 - Ser248), mit den Primern C und E das 40-kDa-Fragment (AS Cys249 - Asp594), mit den Primern D und E das 15-kDa-Fragment (AS Ser514 - Asp594) und mit den Primern C und F ein Mittelfragment (AS Cys249 - Arg513). Die Fragmente wurden am 5'-Ende über EcoR1 und am 3'-Ende über BamH1 als Fusionsprotein mit der Gal-Domäne in den pGBKT7-Vektor ligiert. Die Cathepsin-D-cDNA (R&D System, Cat. 1029AS) wurde in den pcDNA3.1-Hygro-Vektor kloniert. Aus diesem Konstrukt wurden über *Add-on-PCR* mit den Primern H und J die *Full-length*-Form von Cathepsin D mit den Schnittstellen Nde1 (5') und Sal1 (3') amplifiziert und in den pGADT7-Vektor ligiert.

2.5.24.2 Hefekultur

(*Clontech Yeast Protocols Handbook 2001*)

Die Versuche wurden mit der Unterstützung von Peter Braun durchgeführt.

Reagenzien und Lösungen:

50×-Aminosäure-Cocktail (-His/ -Trp/ -Leu)	300 mg L-Lysin-HCl, 200 mg Uracil, 1500 mg L-Valin, 300 mg L-Isoleucin, 200 mg L- Arginin-HCl, 200 mg L-Methionin, 300 mg L-Tyrosin, 500 mg L-Phenylalanin, 1000 mg L-Glutamat, 3750 mg L-Serin und 2000 mg L-Threonin in 200 ml ddH ₂ O in der Mikrowelle erwärmt
Adeninhemisulfat-Stammlösung	100 mg Adeninhemisulfat in 50 ml ddH ₂ O
Histidin-Stammlösung	100 mg Histidin in 50 ml ddH ₂ O
Glukose-Stammlösung	20 % (w/v) Glucose in 1 l ddH ₂ O gelöst und sterilfiltriert
10×-Lithiumacetat-Puffer	1 M Lithiumacetat auf pH 7,5 mit verdünnter Essigsäure eingestellt und autoklaviert
1×-Lithiumacetat/TE-Puffer	5 ml 10× TE Puffer, 5 ml 10× Lithiumacetat Puffer mit ddH ₂ O auf 50 ml aufgefüllt
50 % PEG-LiAc-Lösung	25 g (w/v) PEG3350 mit 50 ml 1× Lithiumacetat/TE-Puffer versetzt und zur Lösung in der Mikrowelle aufgeköcht
65 % Glycerol/MgSO ₄ -Lösung	65 % (v/v) Glycerol, 100 mM MgSO ₄ und 25 mM Tris/HCl pH 8,0
YPDA-Medium	20 g Pepton, 10 g Hefeextrakt und 15 ml 0,2 %ige Adeninhemisulfat-Stammlösung pH 6,5 mit dH ₂ O auf 900 ml aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 55 °C wurden 100 ml sterile, 20 %ige Glukose-Stammlösung zugesetzt

SD-Medien	3,35 g Yeast-N ₂ -Base, 10 ml 50×-Aminosäure-Cocktail (-His/-Trp/-Leu und ohne Adenin) und 5 ml der jeweiligen 100×-Aminosäure-Stammlösung bzw. Adenin (für Platten 10 g Agar zugeben) mit ddH ₂ O auf 450 ml aufgefüllt und autoklaviert, nach Abkühlung auf ca. 55 °C wurden 50 ml Glukose-Stammlösung zugeben
-----------	--

Für die Y2H-Versuche wurde der Hefestamm AH109 verwendet. Er besitzt drei Reportergene (HIS3, Ade2, lacZ), deren Transkription von verschiedenen Gal4-UAS (*Upstream Activating Sequences*) und *TATA-Boxes* kontrolliert wird. Über die Reportergene HIS3 und Ade2 können starke und schwache Proteinwechselwirkungen detektiert werden. Dem Hefestamm fehlen außerdem die Gene für die Synthese von Trp und Leu. Diese Gene sind in den beiden Vektoren pGADT7 und pGADT7 (s. 2.5.24.1) enthalten, was die Selektion von transformierten Hefen auf Selektionsmedium/-agar ermöglicht.

Hefevorkulturen wurden aus *Glycerolstocks* (Hefe in YPDA-Medium mit 50 % [v/v] Glycerol) auf YPD-Agarplatten angeimpft. Nach 3-4 Tagen bei 30 °C konnten die Kulturen zum Animpfen von Flüssigkulturen in YPDA-Medium verwendet werden.

2.5.24.3 Transformation von Hefen

(Clontech Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual 1999)

Die Transformation von Hefen wurde unter Verwendung von Lithiumacetat durchgeführt. Eine etwa eine Woche alte AH109 Hefekolonie wurde in 10 ml YPDA aufgenommen und ü.N. bei 30 °C und 230 rpm inkubiert. 300 ml YPDA wurden mit der Vorkultur versetzt und für 3 h bei 30 °C und 230 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min bei RT und 1000 × g abzentrifugiert, mit 50 ml ddH₂O gewaschen und in 1,5 ml 1×-TE/Lithiumacetatlösung (frisch angesetzt) aufgenommen. Eine 50 % PEG/Lithiumacetat/TE-Lösung wurde frisch angesetzt und auf RT abgekühlt. Die Hering-Sperma-DNA wurde für 10 min auf 95 °C erhitzt und sofort auf Eis gestellt.

Für einen Transformationsansatz wurden 0,1 ug *bait*-DNA, 0,1 ug *prey*-DNA, 0,1 mg Hering-Sperma-DNA und 100 ul Zellsuspension sorgfältig vermischt, bevor 600 µl einer 50 %igen PEG/Lithiumacetat/TE-Lösung zum Ansatz gegeben werden. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 30 °C. Anschließend wurde der Ansatz für 15 min bei 42 °C einem Hitzschock unterzogen und für 2 min auf Eis abgekühlt. Es folgte eine zweiminütige Zentrifugation bei 4 °C

und 2500 rpm, der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 250 µl 1 x TE aufgenommen, auf SD-Platten (-Leu/ -Trp) ausplattiert und für 2-4 Tage bei 30 °C inkubiert.

Die Platten wurden für 3-4 h bei 4 °C gelagert, die Kolonien mit 5 ml TE Puffer abgeschabt und die Platten dreimal mit TE-Puffer gespült. Die Zellen wurden für 5 min bei 1000 × g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 2,5 ml TE und 2,5 ml 65 %igem Glycerol/MgSO₄ resuspendiert und für eine Woche bei 4 °C und für bis zu einem Jahr bei -80 °C gelagert

2.5.24.4 -His- / -Adenin- / X-Gal-Test

(Clontech Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual 1999)

Z-Puffer	60 mM Na ₂ HPO ₄ , 10 mM KCl und 1 mM MgSO ₄ mit pH 7,0 autoklaviert
X-Gal-Stammlösung	50 mg/ml X-Gal in DMF lösen, Lagerung bei -20 °C, (lichtgeschützt)
Z-Puffer/X-Gal-Lösung	5 ml Z-Puffer, 13,5 µl β-Mercaptoethanol, 100 µl X-Gal- Stammlösung

In 4 ml SD-T/-L-Medium wurde eine Vorkultur ü.N bei 30 °C und 230 rpm mit den zu untersuchenden Klonen angelegt. Am nächsten Tag mit der Vorkultur 5 ml SD-Trp/-Leu-Medium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,7 bei 30 °C und 230 rpm inkubiert. Es wurde mit ddH₂O eine Verdünnungsreihe hergestellt. Anschließend wurden auf SD-Trp/-Leu-, SD-His/-Trp/-Leu- und SD-Adenin/-His/-Trp/-Leu-Verdünnungen mit einer OD₆₀₀ von 0,5, 0,25 und 0,1 ausplattiert. Die Platten wurden für 1-3 Tage bei 30 °C inkubiert und das Wachstum dokumentiert (Digitalkamera).

Auf eine SD-His/-Trp/-Leu-Platte oder einer SD-Trp/-Leu-Platte wurde mit einem dünnen Whatman-Filterpapier ein Abklatsch der Hefekolonien gemacht. Dazu wurde das Filterpapier vorsichtig und luftblasenfrei auf die Platte gelegt bis es durchtränkt war. Filterpapier und Platte wurden markiert. Das Filterpapier wurde abgezogen, auf eine neue Agarplatte gelegt und ü.N. bei 30 °C inkubiert. Das Filterpapier wurde abgenommen und die Zellen durch dreimaliges Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff für jeweils 20 sec permeabilisiert. Ein zweites Filterpapier wird in Z-Puffer/X-Gal-Lösung benetzt und auf das andere Filterpapier gelegt. Dadurch entstand eine Übertragung der lysierten Zellen. Es folgte eine einstündige oder ü.N.-Inkubation bei 30 °C. Spätestens nach 12 h war eine Blaufärbung der Positivkontrollen sichtbar.

2.6 Tierexperimentelle Versuche

2.6.1 Maushaltung

Die in dieser Arbeit verwendeten Kontrollmäuse aus institutseigener Zucht (C 57 BL/B6J × 129 SV/J) dienten der Gewinnung von Mausleberproben für die subzelluläre Fraktionierung (vgl. Kapitel 2.5.18) und der Gewinnung von Geweben zum Nachweis der Gewebsverteilung des endogenen 66.3-kDa-Proteins in Western und Northern Blot (vgl. Kapitel 2.5.6 und 2.2.2.2.) Die Kontrollmäuse wurden in der „Zentralen Tierstalleinrichtung“ (ZTE) der Universität Göttingen und im Mausstall des Instituts (Biochemie II, Universität Göttingen) bei 19 – 21 °C, ca. 45-60 % Luftfeuchtigkeit und einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus (hell von 6-18 Uhr) gehalten. Die Ernährung bestand aus ständig zugänglichem pelletiertem Alleinfutter für Mäusezucht und Leitungswasser.

2.6.2 Entnahme von Organen

Mäuse wurden nach CO₂-Narkose durch zervikale Dislokation getötet und auf dem Präparationstisch fixiert. Die Brust- und Bauchhaut wurde mit 70 % Ethanol desinfiziert, entlang der Mittellinie durchtrennt und seitlich auf dem Präparationstisch befestigt. Abdomen und Thorax wurde entlang der Mittellinie eröffnet, die Aorta durchtrennt, die Maus ausgeblutet und die Organe entnommen. Für die Entnahme des Gehirns wurde die Maus auf dem Präparationstisch gedreht, die Kopfhaut mit 70 % Ethanol desinfiziert und durch einen Rundschnitt entfernt. Die Schädelkalotte wurde vom *Foramen magnum* ausgehend vorsichtig abpräpariert und das Gehirn mit einem chirurgischen Löffel entnommen.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung und Expression des 66.3-kDa-Proteins

3.1.1 Klonierung des 66.3-kDa-Proteins mit RGS-His6-Markierung

Bei einer Proteomanalyse mit M6P-haltigen Proteinen konnte das 66.3-kDa-Protein als bis dahin unbekanntes Protein identifiziert werden (vgl. Kap. 1.5). In Vorarbeiten konnte ferner gezeigt werden, dass eine C-terminal markierte Variante des Proteins an immobilisierte Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR) bindet bzw. MPR-abhängig von Fibroblasten internalisiert und zu den Lysosomen transportiert wird (vgl. Kap. 1.7).

Für den Nachweis der intrazellulären Lokalisation des endogenen 66.3-kDa-Proteins und für weitere biochemische und molekulare Untersuchungen wurde ein Antikörper bzw. ein polyklonales Antiserum benötigt. Für die Herstellung eines Antiserums in Kaninchen sollte 66.3-kDa-Protein stabil in BHK21-Zellen exprimiert und aus dem Zellkulturmedium aufgereinigt werden. Die Proteinexpression des auf BHK21-basierenden Systems war jedoch nicht so effizient (vgl. Abb. 3-1), als dass sie ausreichend große Mengen an 66.3-kDa-Protein für die Immunisierung von Kaninchen ergab, so dass in Vorarbeiten verschiedene eukaryotische und prokaryotische Expressionssysteme etabliert wurden. Diese wiesen jedoch durchweg eine unzureichende Expression auf.

Die eigenen Arbeiten beginnen mit der Klonierung der cDNA des 66.3-kDa-Proteins aus dem in Vorarbeiten verwendeten pcDNA-DEST40-Vektor in den pcDNA3.1/Hygro-Vektor. Dieser Expressionsvektor besitzt einen CMV-Promotor und ein Hygromycin-Resistenzgen, welches die Selektion von positiven Zellklonen zulässt. Der zuvor benutzte V5-His6-Tag (vgl. Abb. 1-6) wurde durch einen einfachen RGS-His6-Tag ersetzt. Für die Klonierung wurde der cDNA des 66.3-kDa-Proteins über *add-on*-PCR vor dem ATG-Startcodon eine EcoRV-Schnittstellensequenz angefügt. Am 3'-Ende der cDNA wurde das ursprüngliche STOP-Codon deletiert und durch die RGS-His6-Sequenz mit nachfolgendem STOP-Codon und einer NotI-Schnittstellensequenz ersetzt (vgl. Kap. 6.2).

3.1.2 Stabile Expression des RGS-His6-markierten 66.3-kDa-Proteins in HT1080

Die humane Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 wurde mit dem 66.3-kDa-Protein-Konstrukt transfiziert, auf 14-cm-Platten ausplattiert und Einzelklone mit 600 U/ml Hygromycin selektioniert. Die stabil transfizierten Einzelklone zeigten eine starke Expression des 66.3-kDa-Proteins und sezernierten einen großen Anteil des Proteins in das Zellkulturmedium, aus dem das Protein aufgereinigt werden konnte. Wie in den Vorarbeiten konnte im Zellkulturüberstand eine 75-kDa-Form und ein C-terminales 40-kDa-Fragment des 66.3-kDa-Proteins mit dem α -His-

Antikörper detektiert werden. Um kontaminierende Proteine bei der späteren Aufreinigung aus dem Zellkulturmedium zu reduzieren, wurden die Zellen testweise bei geringeren FKS-Konzentrationen kultiviert. Die Proteinmenge des 66.3-kDa-Proteins im Zellkulturüberstand wurde mit dem α -His-Antikörper im Western Blot dargestellt und densitometrisch gemessen (Abb. 3-1), wobei mit dem RGS-His6-*Formylglycine-Generating-Enzyme* (FGE) ein in der Abteilung aufgereinigtes Protein als Proteinstandard verwendet wurde (Preusser-Kunze et al. 2005).

In Abb. 3-1 wurde für den Klon 5 bei 0,05 % FKS-Konzentration 70 ng RGS-His6-66.3-kDa-Protein quantifiziert (in 60 μ l). Im Vergleich zu Klon 5 hat Klon 7 bei gleicher FKS-Konzentration eine um ~ 30 % und die BHK21-Zelllinie mit dem pcDNA-Dest40-Konstrukt eine um ~ 80 % niedrigere Signalstärke. Der Klon 5 wurde expandiert und in dieser Arbeit unter dem Namen HT1080-66 in allen weiteren Versuchen verwendet.

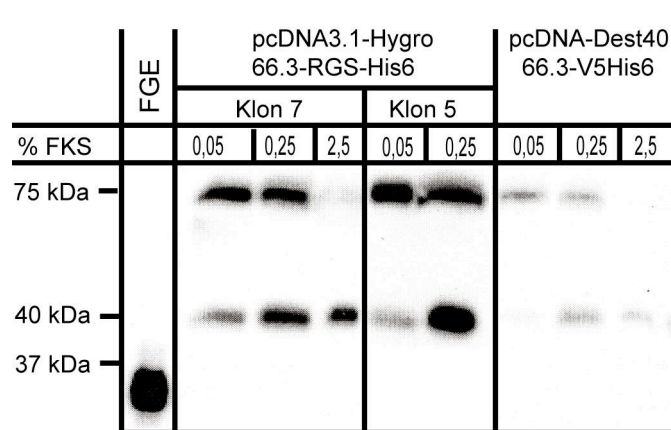


Abb. 3-1: Überexpression in HT1080-Zellen

Stabil exprimierende Zellen wurden mit 600 μ g/ml Hygromycin und unter verschiedenen FKS-Konzentrationen kultiviert. 60 μ l Zellkulturüberstand der einzelnen Klone und 80 ng FGE-RGS-His6 als Proteinstandard wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit dem α -His-Antikörper nachgewiesen. Zum Vergleich wurden die in Vorarbeiten etablierten BHK21-Zellen aufgetragen.

Zur Aufreinigung von 1 mg 66.3-kDa-Protein wurden etwa 4 l Zellkulturüberstände von HT1080-66 benötigt. Dazu wurde alle 48 h der Zellkulturüberstand abgenommen, mit 0,5 g Ammoniumsulfat / ml Zellkulturmedium gefällt und bei 4 °C bis zur Aufreinigung gelagert.

3.2 Aufreinigung des 66.3-kDa-Proteins

Das mit Ammoniumsulfat gefällte 66.3-kDa-Protein (vgl. Kap. 3.1.2) wurde pelletiert, gegen PBS dialysiert und mittels Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Matrix partiell gereinigt. Danach erfolgte ein weiterer Aufreinigungsschritt mittels Anionenaustauscherchromatographie. Dazu wurde das gegen Bindungspuffer dialysierte Eluat der Ni-NTA-Matrix auf die Ionenaustauschersäule geladen und mit einem Stufengradienten aus Bindungspuffer und 0 - 1 M NaCl fraktionsweise eluiert (vgl. Abb. 3-2).

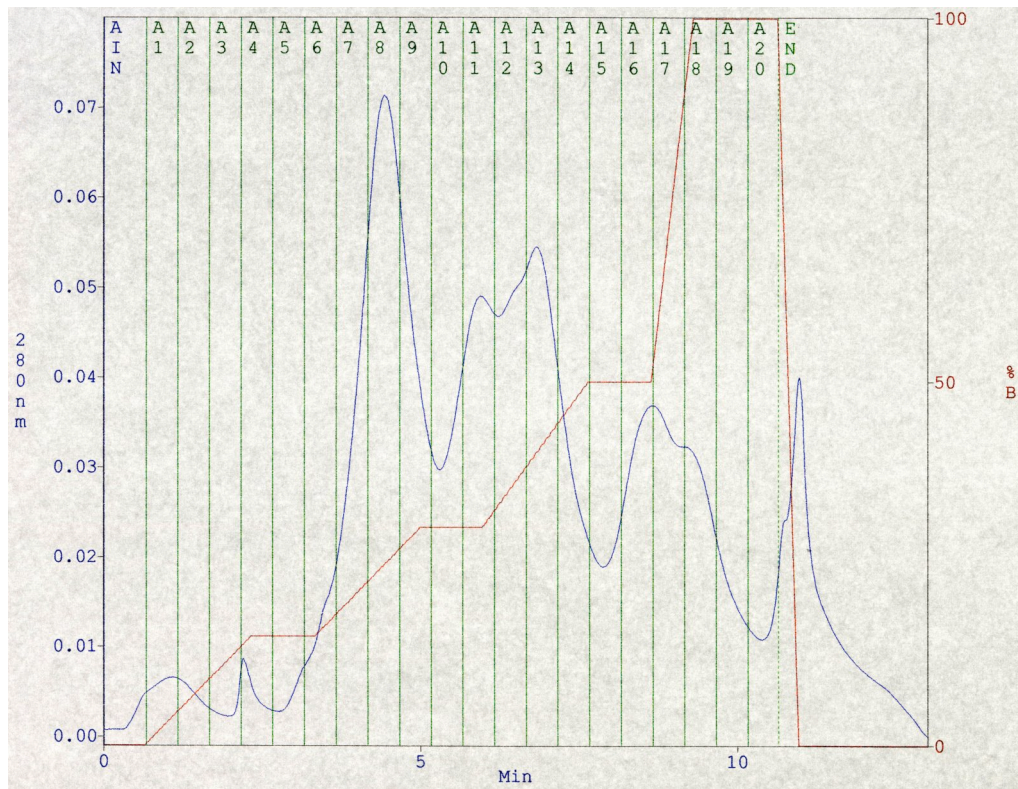


Abb. 3-2: *Aufreinigungsprofil des 66.3-kDa-Proteins*

Die Abbildung zeigt das Protein-Elutionsprofil (blau) in Abhängigkeit von der Zeit. Auf der x-Achse ist die Zeit, auf der y-Achse links die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm und rechts die Konzentration des Elutionspuffers (10 mM Hepes und 1 M NaCl, pH 8,0) aufgetragen (rot). Die Zahlen oberhalb des Graphen bezeichnen die jeweiligen Fraktionen, in denen das eluierte Protein gesammelt wurde (grün).

Die Qualität der Aufreinigung wurde anhand von Silbergel- und Western-Blot-Analyse (vgl. Abb. 3-3) mit dem α -His-Antikörper und einem Antiserum gegen das 66.3-kDa-Protein (66-Antiserum) bestimmt (vgl. Kap. 3.3). Die Fraktionen 7 - 10 enthalten große Mengen des 66.3-kDa-Proteins, das als 75-kDa-Polypeptid mit einem Antikörper gegen das RGS-His6-Tag nachweisbar ist und zu einem späteren Zeitpunkt (vgl. Kap. 3.4) als Proform des 66.3-kDa-Proteins identifiziert wurde. Das starke Signal bei 40 kDa entspricht dem C-Terminus des Proteins mit dem RGS-His6-Tag (Abb. 3-3b). Mit dem 66-Antiserum lassen sich zusätzlich die Banden bei 66 kDa und bei 28 kDa als weitere Formen des 66.3-kDa-Proteins identifizieren (Abb. 3-3c). Von den drei aus der 2D-Gelelektrophorese (vgl. Abb. 1-3) bekannten Formen des 66.3-kDa-Proteins lassen sich die 40-kDa-Form besonders effizient, die 66-kDa- und 28-kDa-Formen dagegen nur in vergleichsweise geringen Mengen aufreinigen. Durch die zwei sukzessiven Aufreinigungsschritte konnte ausreichend reines 66.3-kDa-Protein für die Immunisierung gewonnen werden. Für nachfolgende Versuche mit aufgereinigtem, rekombinantem Protein wurden Fraktionen 8 und 9 (F8/9) bzw. 7 und 10 (F7/10) vereint.

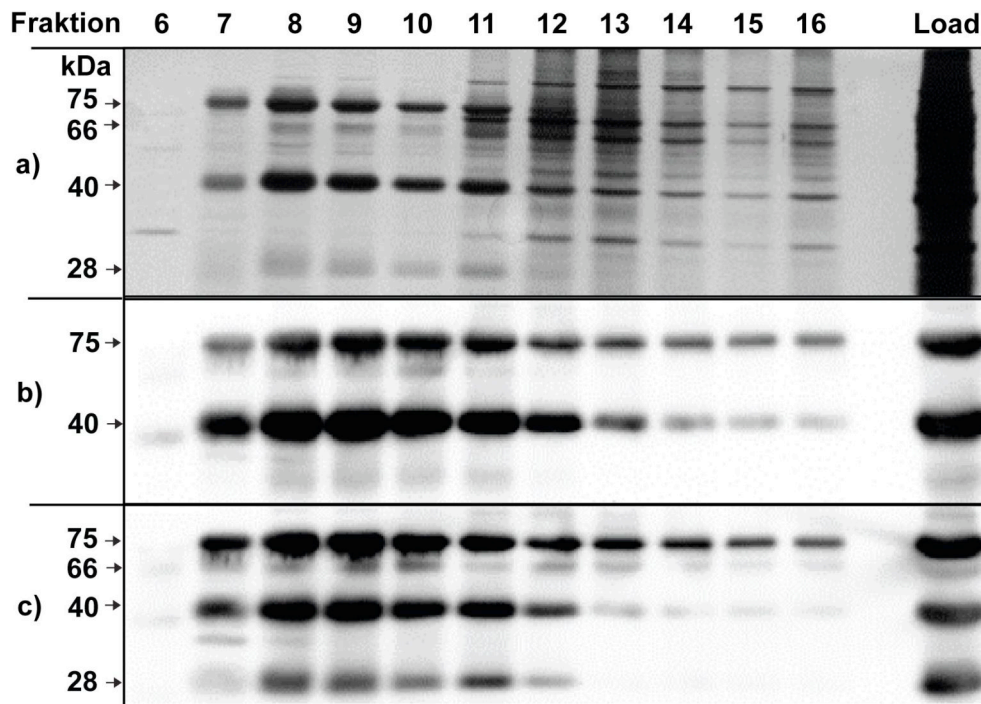


Abb. 3-3: Proteinaufreinigung aus Zellkulturüberständen

Die Fraktionen der HPLC-Aufreinigung (6-16) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und a) im Silbergel oder im Western Blot mit b) dem α -His-Antikörper bzw. später auch mit c) dem 66-Antiserum (vgl. Kapitel 3.3) analysiert. Es wurde jeweils 1 % pro Fraktion (6-16) und 0,1 % der Ni-NTA aufgereinigten Proteinlösung (Load) eingesetzt.

3.3 Herstellung eines Antiserums

Der bis zu diesem Zeitpunkt verwendete monoklonale α -His-Antikörper ließ nur den Nachweis des rekombinanten 66.3-kDa-Proteins mit RGS-His6-Tag zu. Zum Nachweis des endogenen 66.3-kDa-Proteins sollte ein polyklonales Antiserum gegen das 66.3-kDa-Protein hergestellt werden, das auch endogene 66.3-kDa-Protein-Polypeptide ohne RGS-His6-Tag detektiert. Dazu wurden Kaninchen mit dem aufgereinigten Protein immunisiert (vgl. Tab. 2-7). Das gewonnene Antiserum wird im Folgenden 66-Antiserum genannt. Das 66-Antiserum wurde vergleichend mit dem Präimmunsrum auf die Erkennung des 66.3-kDa-Proteins als Antigen getestet (vgl. Abb. 3-8).

Das 66-Antiserum detektiert in Homogenaten von HT1080-66 eine 75-kDa-, eine 66-kDa-, eine 40-kDa-, eine 28-kDa- und eine 15-kDa-Bande (vgl. Abb. 3-4). In Homogenaten von HT1080 konnten auf endogenem Expressionsniveau schwache Banden bei 66 kDa bzw. 15 kDa nachgewiesen werden. Bei der Analyse weiterer Zelllinien konnte in Homogenaten von MEF schwache Signale bei 75-kDa, 66-kDa und 30-kDa detektiert werden. In Homogenaten von 3T3-Zellen wurde eine Hauptbande bei 28 kDa und eine schwache Bande bei 66 kDa detektiert.

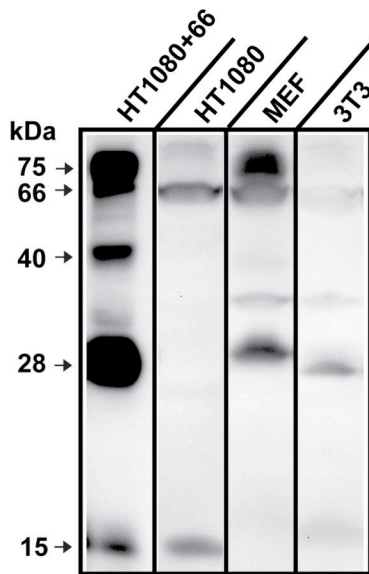


Abb. 3-4: Antikörpertest an verwendeten Zelllinien

50 μ g Zellhomogenat von HT1080-66 und 400 μ g Zellhomogenat von HT1080, von MEF und von 3T3-Zellen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und im Western Blot mit dem 66-Antiserum detektiert.

Tab. 3-1: Anwendung des 66-Antiserum

Anwendung	Konzentration
Western Blot	1:1000
Immunfluoreszenz	1:50 - 1:100
Immunpräzipitation	1:300 - 1:900

Das 66-Antiserum wurde im weiteren Verlauf des Projektes im Western Blot, in der Immunfluoreszenz und für die Immunpräzipitationen verwendet (für Konzentrationen vgl. Tab. 3-1).

3.4 Charakterisierung der aufgereinigten Polypeptide (75, 66, 40, 28 und 15 kDa)

Zur genauen Analyse der unterschiedlichen Fragmente des 66.3-kDa-Proteins wurden die Fragmente mittels N-terminaler Proteinsequenzierung (Edman-Abbau) analysiert. Dazu wurde 300 μ mol des aufgereinigten Proteins über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Coomassie-Blau gefärbt.

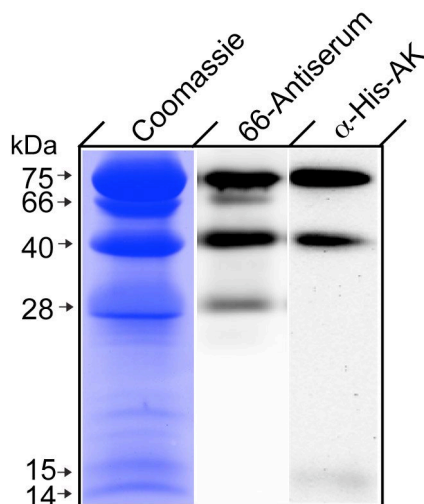


Abb. 3-5: Edman-Abbau

300 μ mol aufgereinigtes Protein wurde über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Coomassie-Blau gefärbt. Die Banden wurden ausgeschnitten und durch N-terminale Sequenzierung (Edman-Abbau) analysiert. Zum Vergleich wurde aufgereinigtes Protein im Western Blot mit dem 66-Antiserum und dem α -His-Antikörper (α -His-AK) detektiert.

Mittels der Edman-Analyse konnten die N-terminalen Aminosäuren von fünf Fragmenten des 66.3-kDa-Proteins bestimmt werden. Das 75-kDa-Fragment beginnt mit Leu47 und kann mit

dem α -His-Antikörper detektiert werden. Das 75-kDa-Fragment (Proform) geht demnach über die Abspaltung des Signalpeptids aus der Prä-Proform hervor. Das 66-kDa-Fragment beginnt N-terminal mit Leu47 und ist mit dem 66-Antiserum, jedoch nicht mit dem α -His-Antikörper zu detektieren, was für eine proteolytische Abspaltung des RGS-His6-Tags spricht. Das 40-kDa-Fragment beginnt mit Cys249, ist mit dem α -His-Antikörper nachweisbar und stellt somit den C-terminalen Bereich des Gesamtproteins dar. Das 28-kDa-Fragment ist nur mit dem 66-Antiserum zu detektieren. Da es zudem N-terminal mit Leu47 beginnt, handelt es sich um den N-terminalen Bereich des Gesamtproteins. Das 15-kDa-Fragment ist mit dem 66-Antiserum und dem α -His-Antikörper zu detektieren und beginnt mit Ser514. Abb. 3-6 zeigt eine schematische Darstellung der Prä-Proform, der Proform sowie der verschiedenen prozessierten Fragmente des 66.3-kDa-Proteins. Die Edman-Analyse wurde von Dr. Bernhard Schmidt und Klaus Neifert der Abteilung Biochemie II durchgeführt.

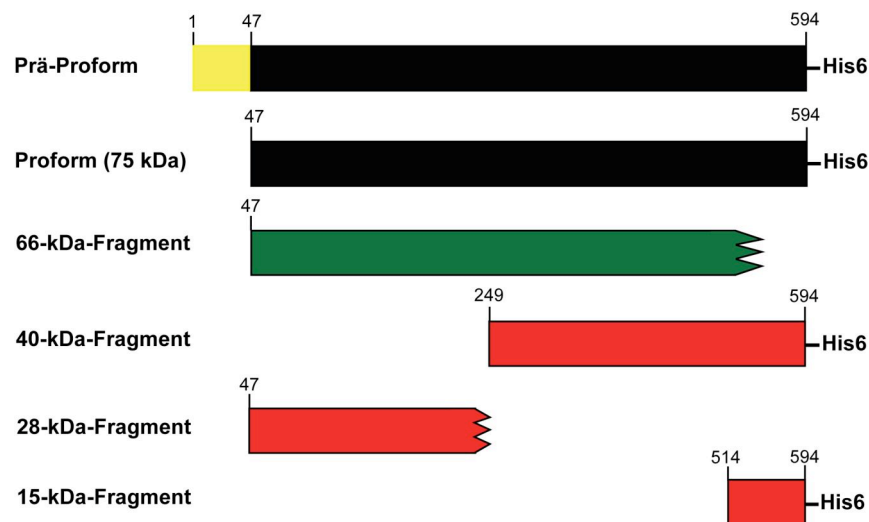


Abb. 3-6: *Schematische Darstellung des 66.3-kDa-Proteins*

Schematische Darstellung des 66.3-kDa-Proteins von der Prä-Proform bis zu den einzelnen Fragmenten, die anhand der Ergebnisse aus Edman-Abbau (N-Terminus) und Western Blot (Vorhandensein des RGS-His6-Tags am C-Terminus) erstellt wurde. Zahlen geben die Position der Aminosäuren an, mit denen ein prozessiertes Fragment beginnt und endet. Das Signalpeptid befindet sich zwischen AS 1-46 (gelb).

3.5 Expression des 66.3-kDa-Proteins in murinen Geweben

Zur Überprüfung der Expression des 66.3-kDa-Proteins in verschiedenen Geweben wurden Northern- und Western-Blot-Analysen durchgeführt.

3.5.1 Gewebespezifische Expression des 66.3-kDa-Proteins auf Transkriptebene

Zur gewebespezifischen Analyse der 66.3-kDa-Protein-Transkripte wurde ein Northern Blot mit Gesamt-RNA verschiedener Mausgewebe mit einer 66.3-kDa-Protein-spezifischen Sonde (*Full-length*) durchgeführt und gegen Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) normalisiert.

Im Northern Blot (vgl. Abb. 3-7) wurden Transkripte des 66.3-kDa-Proteins mit unterschiedlicher molekularer Größe zwischen 2 kb und 4 kb detektiert und große Unterschiede im Transkriptionsniveau der unterschiedlichen Gewebe festgestellt. Im Lungengewebe lässt sich nach der Normalisierung mit dem GAPDH-Signal das höchste Transkriptionsniveau nachweisen.

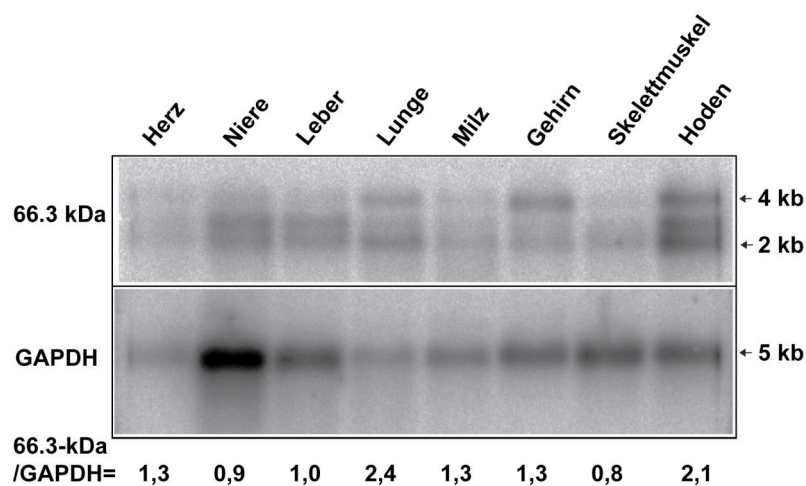


Abb. 3-7: 66.3-kDa-Protein im Northern Blot

Es wurden 10 µg RNA pro Ladebahn elektrophoretisch in einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Anschließend wurden mit radioaktiv markierten Sonden die Transkripte des 66.3-kDa-Proteins und der GAPDH detektiert.

Ein ähnlich hohes Transkriptionsniveau konnte in Hodengewebe gezeigt werden. In Herz-, Milz- und Gehirngewebe konnte ein mittleres Transkriptionsniveau und in Leber-, Nieren- und Skelettmuskelgewebe ein niedrigeres Transkriptionsniveau nachgewiesen werden. Die drei Transkripte zeigen untereinander gewebeabhängig variierende Signalstärken. Beim gewebeinternen Vergleich zeigt die 4-kb-Bande in Herz, Niere, Leber, Milz, Skelettmuskel und Hoden das schwächste Signal, in Gehirngewebe jedoch das stärkste. Die mittlere Bande dominiert in Herz, Nieren und Leber. Die 2-kb-Bande ist in Lungen, Milz, Skelettmuskel und Hoden dominant und liefert im Gehirn das schwächste Signal.

3.5.2 Proteinexpressionslevel im Western Blot auf murine Gewebe

Zur Überprüfung des Expressionsniveaus wurde Mausgewebe homogenisiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und für die Western-Blot-Analyse auf eine PVDF-Membran übertragen.

Die Western-Blot-Analyse verschiedener Gewebe (vgl. Abb. 3-8) zeigte, dass die Expressionshöhe des 66.3-kDa-Proteins in den untersuchten Geweben stark variierte und dass je nach Gewebe Fragmente unterschiedlicher Größe nachzuweisen sind. In Gehirn, Lunge und Milz konnte ein hohes Expressionsniveau auf Proteinebene mit dem 66-Antiserum nachgewiesen werden, wobei die Expression in der Lunge am höchsten war. Im Vergleich dazu wurde ein schwächeres Expressionsniveau in Herzgewebe und ein kaum nachweisbares in Hoden-, Leber- und Nierengewebe festgestellt.

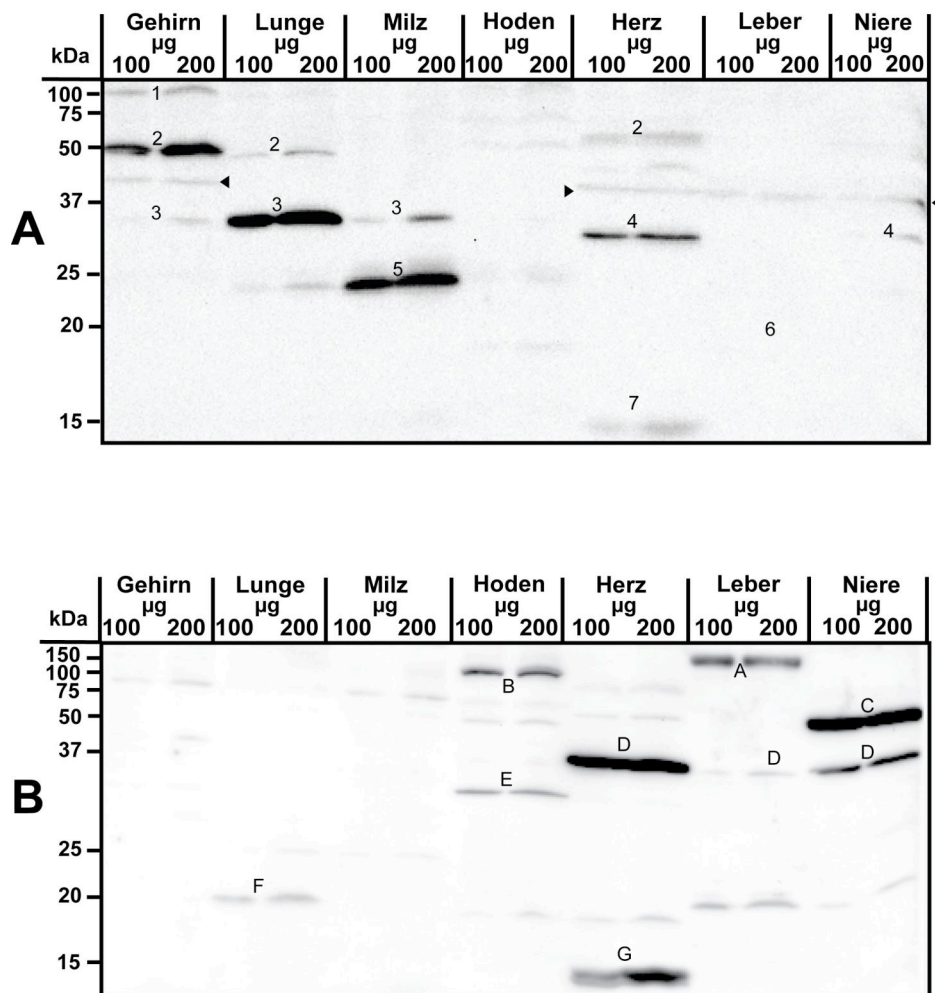


Abb. 3-8: Vorkommen des 66.3-kDa-Proteins in Mausgewebe

Mausgewebe wurden homogenisiert und jeweils 100 µg und 200 µg Homogenat unter reduzierenden Bedingungen über SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot mit dem 66-Antiserum (Abbildung A) und dem Präimmunsereum (Abbildung B) analysiert (für die Gewinnung des Präimmunsereums vgl. Kap. 3.3). Die mit den gefüllten Pfeilspitzen markierten Banden ließen sich auch mit dem Präimmunsereum detektieren und sind aus diesem Grund nicht dem 66.3-kDa-Protein zuzuordnen. Banden wurden mit 1-7 und A-G durchnummeriert (s. Text).

In Gehirngewebe wurde mit dem 66-Antiserum (vgl. Abb. 3-8A) eine prominente 50-kDa-Bande (2) und zwei schwache Banden bei 100 kDa (1) und 34 kDa (3) detektiert. In der Lunge dagegen wurde mit einer dominanten 34-kDa-Bande (3) und zwei schwachen Banden bei ca. 50 kDa (2) und 24 kDa (5) eine abweichende Expression festgestellt. In Milzgewebe konnte eine starke Bande bei 24 kDa (5) und eine schwache Bande bei 34 kDa (3) nachgewiesen werden. In Hodengewebe ließen sich nur bei 200 µg Protein sehr schwache Banden bei 75-, 50- und 24 kDa nachweisen. In Herzgewebe dagegen dominierte eine Bande bei 32 kDa (4) neben zwei schwachen Banden bei 50 kDa (2) und 15 kDa (7). In der Leber ließ sich über den Western Blot auch bei Beladung mit 200 µg kein 66.3-kDa-Protein und in Nierengewebe nur eine schwache 34-kDa-Bande (4) nachweisen, so dass in diesen Geweben von einer schwachen Proteinexpression ausgegangen werden muss. In der Leber konnte in einer lysosomalen Fraktion nach 50-facher Anreicherung durch subzelluläre Fraktionierung eine Expression der endogenen 28- und 15-kDa Fragmente gezeigt werden (vgl. Kap. 3.6.2).

Parallel zu der Expressionsanalyse verschiedener Gewebe mit dem 66-Antiserum wurde ein Western Blot bei gleicher Beladung mit dem entsprechenden Präimmunserum (Gewinnung des Präimmunserums vgl. Kap. 3.3) inkubiert. Mit dem Präimmunserum (vgl. Abb. 3-8B) wurden in der Leber bei 150 kDa (A), in Hodengewebe bei 100 kDa (B) und bei 33 kDa (E), in Nierengewebe bei 60 kDa (C), in Lungengewebe bei 20 kDa (F) und in Herzgewebe bei 13 kDa (G) Banden detektiert. Diese Signale haben kein Äquivalent bei der Immundetektion mit dem Antiserum. In Herz und Niere und in Leber ist eine Bande bei 40 kDa (D) zu detektieren, die auch mit dem Antiserum nachzuweisen ist und als unspezifisches Signal einzuordnen ist.

3.6 Lysosomale Lokalisation des endogenen 66.3-kDa-Proteins

3.6.1 Das endogene 66.3-kDa-Protein in der Immunfluoreszenz

Mit dem Nachweis einer M6P-abhängigen Internalisierung des 66.3-kDa-Proteins und der Darstellung von rekombinantem 66.3-kDa-Protein in MEF durch Immunfluoreszenz konnten bereits erste Hinweise auf eine lysosomale Lokalisation erbracht werden (vgl. Kap. 1.7). Die intrazelluläre Lokalisation des endogenen 66.3-kDa-Proteins in MEF wurde durch indirekte Immunfluoreszenz am konfokalen Lasersscanmikroskop (LSM) untersucht. Bei dieser Darstellungsmethode werden einzelne Ebenen der Präparate gescannt. So erscheinen die Lysosomen durch die Signale der integralen Membranproteine (LAMP-1) als ringförmige Strukturen. In der Überlagerung der Bilder bildet sich das Signal des 66.3-kDa-Proteins

innerhalb der LAMP-1-markierten, lysosomalen Membran ab, was für eine Lokalisation des 66.3-kDa-Proteins in der lysosomalen Matrix spricht.

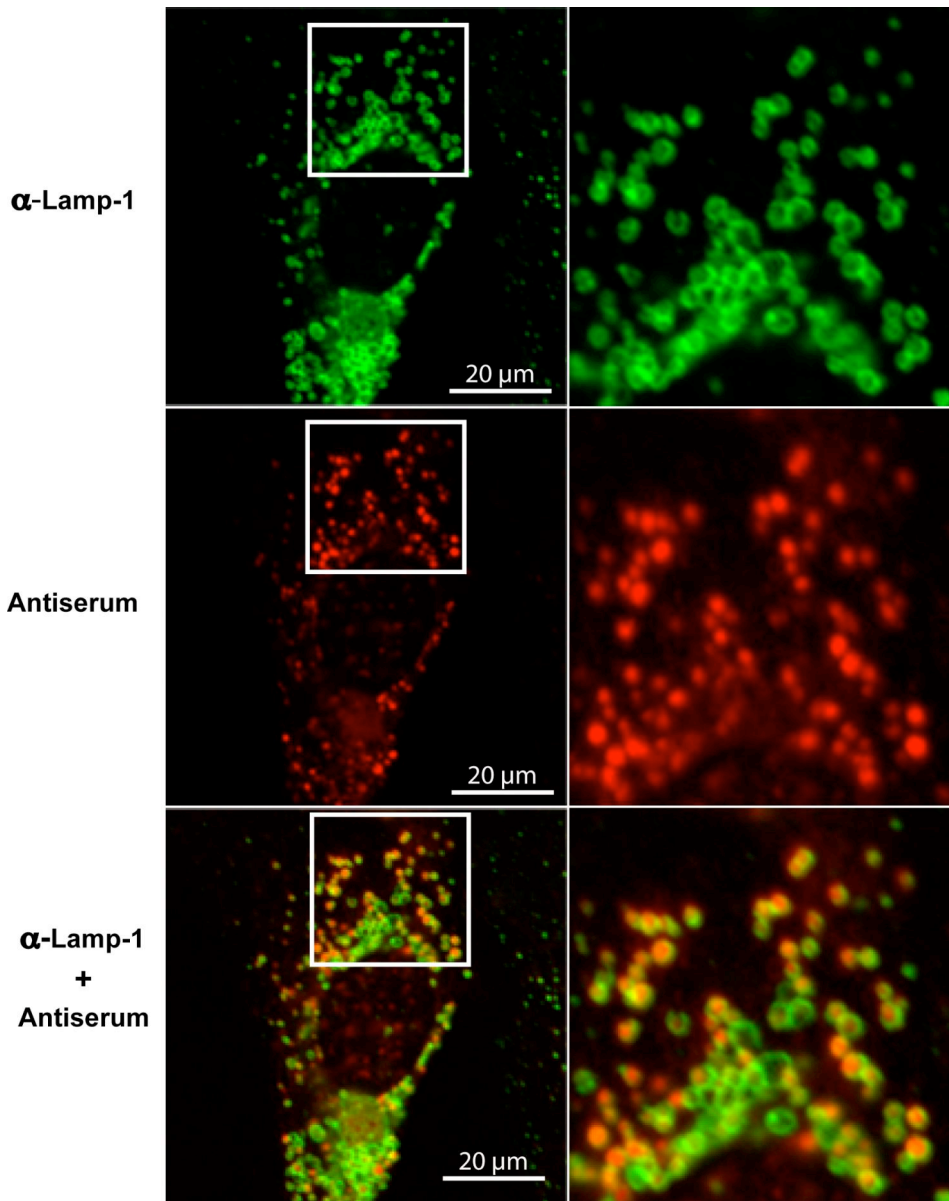


Abb. 3-9: Endogener Nachweis in MEF durch Immunfluoreszenz

MEF wurden mit Methanol fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz mit dem α -LAMP-1-Antikörper und dem 66-Antiserum mit dem konfokalen LSM analysiert. In der rechten Bildhälfte sieht man die Vergrößerung der in der linken Bildhälfte markierten Bildausschnitte.

3.6.2 Nachweis des 66.3-kDa-Proteins mittels subzellulärer Fraktionierung von Mausleber

Die lysosomale Lokalisation des endogenen 66.3-kDa-Proteins sollte mit einem zweiten experimentellen Ansatz bestätigt werden. Durch die Behandlung der Mäuse mit Tyloxapol (Triton WR 1339) verringert sich insbesondere die Dichte von Lysosomen der Hepatozyten (sog. Tritosomen). Durch die verringerte Dichte können Tritosomen durch differentielle Zentrifugation und anschließend durch Zentrifugation in einem diskontinuierlichen Sucrosegradienten von anderen Organellen getrennt werden (de Duve et al. 1955; Leighton et al. 1968). Bei der differentiellen Zentrifugation wurden die Homogenate zuerst in die nukleäre Fraktion (N) und die Fraktion des postnukleären Überstandes (E) fraktioniert (vgl. Abb. 3-10). Durch die Zentrifugation von E entstanden eine mitochondriale Fraktion (M), eine lysosomale Fraktion (L), eine mikrosomale Fraktion (P) und eine zytosolische Fraktion (S). Die Lysosomenangereicherte Fraktion L wurde unter einen diskontinuierlichen Sucrosegradienten geschichtet. Durch Zentrifugation sammeln sich die Lysosomen in der Interphase zwischen den 1,14- ρ - und 1,06- ρ -Sucrose-Schichten (Fraktion 2; F2).

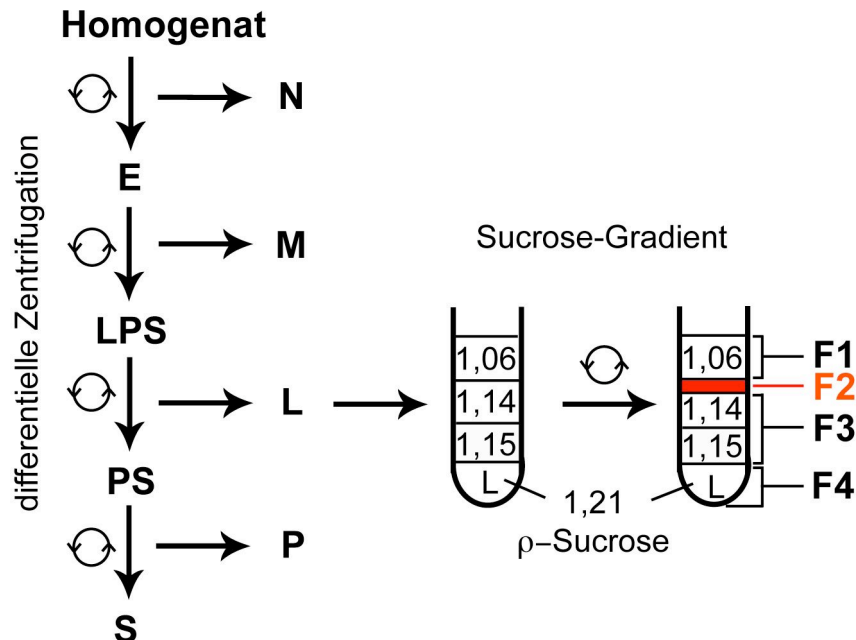


Abb. 3-10 Schema der Tritosomenpräparation (Erklärung s. Text)

In Tab. 3-2 wurde die Analyse der einzelnen Fraktionen der subzellulären Fraktionierung hinsichtlich der Aktivität von ausgewählten Leitenzymen unterschiedlicher Organellen differentiell dargestellt. Dabei sind β -Hexosaminidase (β -Hex) und β -Glucuronidase (β -Gluc) lysosomale Leitenzyme, die Succinatdehydrogenase (SDH) ist ein mitochondriales Leitenzym und die Glukose-6-Phosphatase (G6Pase) ein Leitenzym des ER. Die Aktivität des jeweiligen Enzyms im Homogenat wurde als 100 % definiert. Alle übrigen Enzymaktivitäten sind als prozentualer Anteil dieser Aktivität angegeben. Aus Tab. 3-2 geht hervor, dass es in L zu einer etwa 3-fachen Anreicherung von β -Hex (49 % Aktivität des Homogenates bei 15 % Proteingehalt) und einer etwa 2,5-fachen Anreicherung für β -Gluc (38 % Aktivität bei 15 % Proteingehalt) kommt. In F2 ist eine 200-fache Abnahme des Proteingehaltes gegenüber dem Homogenat (100 % zu 0,5 %) festzustellen. In F2 beträgt die Aktivität von β -Hex 32 % und von β -Gluc 19 % der Aktivität des Homogenates. Das entspricht in Bezug auf den Gesamtproteingehalt einer Anreicherung für β -Hex um das 64-fache (32 % β -Hex Aktivität in 0,5 % des Gesamtproteins) und für β -Gluc um das ~40-fache (19 % Aktivität in 0,5 % des Gesamtproteins). Die SDH-Aktivität zeigt in F2 dagegen eine Abreicherung um den Faktor fünf und in F4 eine Anreicherung um den Faktor drei (42 % der Aktivität des Homogenates). Gleichermäßen wird für die G6Pase in F2 eine Abreicherung um das 25-fache und in der mikrosomalen Fraktion (P) eine Anreicherung um das 3,7-fache gezeigt (74 % der Aktivität des Homogenates). Die Analyse der Leitenzyme zeigte eine 40- bis 60-fache Anreicherung lysosomaler Proteine in F2.

In weiteren Versuchen wurden auch die Leitenzyme anderer Organellen, wie z.B. der Peroxisomen (Katalase) und des Golgi-Apparates (Galaktosyl-Transferase), gemessen.

Tab. 3-2: Analyse von Leitenzymen nach der subzellulären Fraktionierung

	Proteingehalt in [%]	β -Hex-A. in [%]	β -Gluc-A. in [%]	SDH-A. in [%]	G6Pase-A. in [%]
Homogenat	100	100	100	100	100
N (nukleär)	14	9	5	9	7
E (post-nukleär)	80	91	95	91	93
M (mitochondrial)	11	14	6	49	2
L (lysosomal und mitochondrial)	15	49	38	36	16
P (mikrosomal)	20	21	32	5	74 3,7-fach angereichert
S (zytosolische Fraktion)	39	7	19	2	1
F2 (Lysosomen)	0,5	32 60-fach angereichert	19 40-fach angereichert	0,11 5-fach abgereichert	0,02 25-fach abgereichert
F3 (Mitochondrien)	0,25	3	3	0,11	0,15
F4 (Mitochondrien)	14	13	15	42 3-fach angereichert	14

Die Aktivität (A.) der Leitenzyme β -Hexosaminidase (β -Hex), β -Glucuronidase (β -Gluc) Succinatdehydrogenase (SDH) und Glukose-6-Phosphatase (G6Pase) wurde bestimmt. Die Aktivitäten der Enzyme im Homogenat wurden als 100 % definiert. Alle Enzymaktivitäten sind als prozentualer Anteil der Aktivität des Homogenates angegeben. In der linken Spalte (gelb), steht die prozentuale Proteinmenge der jeweiligen Fraktion bezogen auf das Homogenat.

Neben der Analyse der Leitenzyme einiger Organellen wurden die einzelnen Fraktionen der subzellulären Fraktionierung auch im Western Blot analysiert. Dazu wurden 50 μ g jeder Fraktion über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Antikörpern/-seren gegen LAMP-1 als lysosomales Membranprotein, Cathepsin D als lysosomales Matrixprotein, sowie den mitochondrialen Proteinen *Heat-Shock-Protein 60* (HSP60) und Porin (*Voltage-Dependent-Anion-Channel*) analysiert, da Mitochondrien die Hauptkontamination der lysosomalen Präparation darstellen.

Das 66,3-kDa-Protein konnte in den Fraktionen L und F2 detektiert werden (vgl. Abb. 3-11A). Während in L nach 3-facher Anreicherung nur ein schwaches Signal bei 28 kDa zu detektieren war, ist in F2 nach einer 40- bis 60-fachen Anreicherung (vgl. Tab. 3-2: β -Hex und β -Gluc) der Lysosomen eine 28-kDa- und eine 15-kDa-Bande zu detektieren. Die in Fraktion S detektierte 40-kDa-Bande wurde schon im Western Blot mit Lebergewebe (vgl. Kapitel 3.5.2) als unspezifische Bande erkannt. Das lysosomale Matrixprotein Cathepsin D und das lysosomale Membranprotein LAMP-1 lassen sich bereits in Fraktion L nachweisen (vgl. Abb. 3-11B). Nach

weiterer Anreicherung waren beide lysosomalen Proteine als sehr starke Signale in F2 zu detektieren. Die schwächeren Cathepsin-D- und LAMP-1-Signale in den Fraktionen F1 und F3 sind auf die Fraktionierung von F2 aus dem Sucrosegradienten zurückzuführen, da F2 nur zu ~ 80 % abgenommen wird und die übrigen ~ 20 % auf F1 und F3 entfallen. Die mitochondrialen Proteine HSP60 und Porin wurden in Abb. 3-11C dargestellt. Während in F2 weder für HSP60 noch für Porin ein Signal detektiert wurde, wurden in F4 starke Signale bei 60 kDa für HSP60 und bei 25 kDa für Porin detektiert. Weiterhin ließen sich für HSP60 in den Fraktionen N, E, M und L und für Porin in den Fraktionen M, L und P Signale nachweisen.

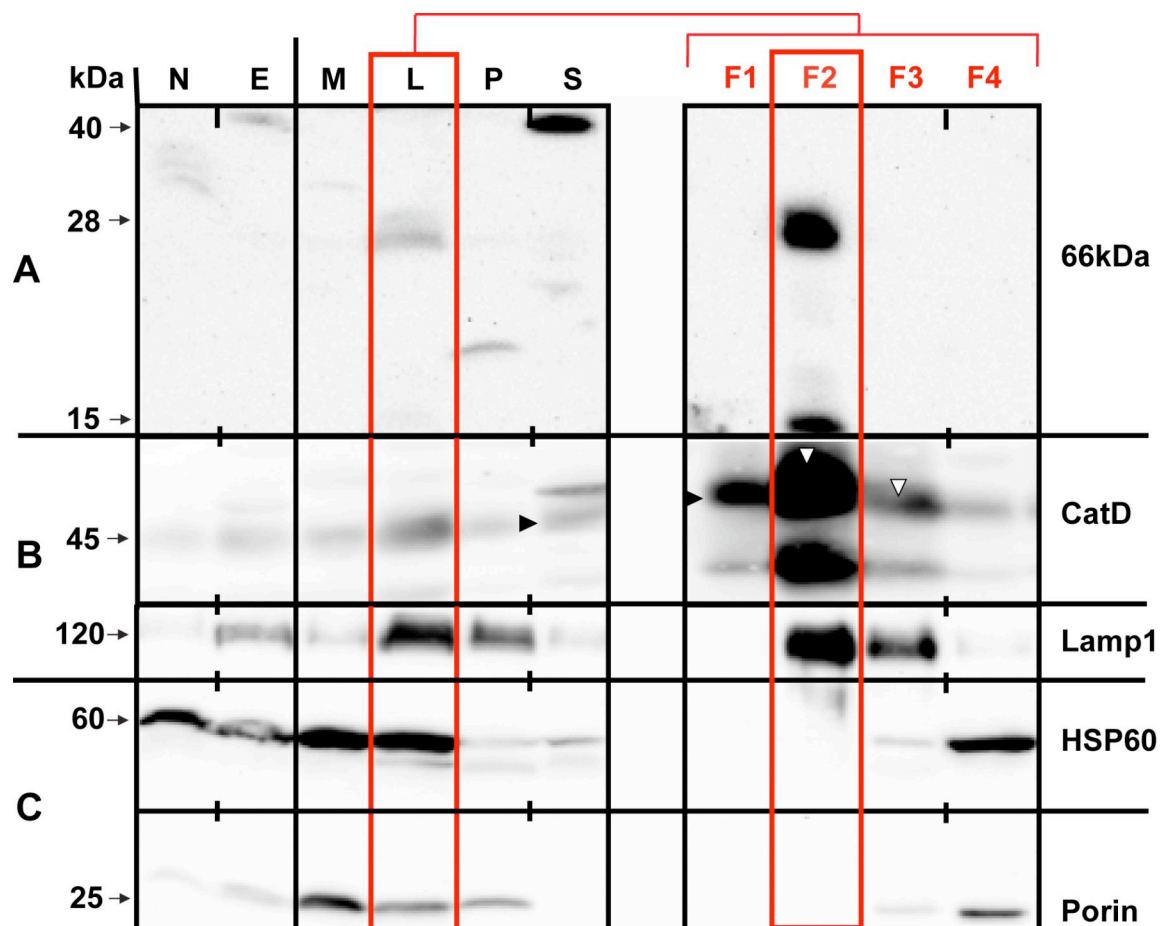


Abb. 3-11: Tritosomenpräparation

50 μ g Protein jeder Fraktion der subzellulären Fraktionierung wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit dem 66-Antiserum und den Antikörpern gegen CatD, LAMP-1, HSP60 und Porin analysiert. (N) nukleäre Fraktion; (E) post-nukleärer Überstand; (M) mitochondriale Fraktion; (L) lysosomale/mitochondriale Fraktion; (P) mikrosomale Fraktion; (S) zytosolische Fraktion; (F2) isolierte Lysosomen; (F3) und (F4) isolierte Mitochondrien. 75-kDa- und 66-kDa-Banden sind in Lebergewebe nicht detektierbar (vgl. Abb. 3-8).

3.7 Charakterisierung des 66.3-kDa-Proteins in HT1080

3.7.1 Überprüfung auf Disulfidbrücken

Bei einer Reihe von lysosomalen Matrixproteinen, die einer limitierten Proteolyse unterliegen, sind die prozessierten Fragmente über Disulfidbrücken miteinander verbunden (z.B. Ceramidase, Cathepsin B und Cathepsin D). Das 66.3-kDa-Protein besitzt sieben Cysteine an den Positionen 147, 157, 249, 347, 500, 497 und 562 der Aminosäuresequenz. Es sollte überprüft werden, ob zwischen den drei Fragmenten von 40-, 28- und 15 kDa Disulfidbrücken existieren. Dazu wurden Zellhomogenate von HT1080-66 unter reduzierenden Bedingungen (mit β -Mercaptoethanol = β -ME) und nicht reduzierenden Bedingungen (ohne β -ME) hinsichtlich des Laufverhaltens der verschiedenen Fragmente des 66.3-kDa-Proteins im SDS-PAGE und anschließender Western-Blot-Analyse untersucht. Abb. 3-12 zeigt eine weitgehend identische Bandenverteilung der 75-, 40-, 28- und 15-kDa-Banden unter beiden Bedingungen. Lediglich bei 14 kDa ist eine zusätzliche schwache Bande unter reduzierenden Bedingungen zu detektieren, wobei das 15-kDa-Fragment keinen Cysteinrest aufweist und daher keine Disulfidbrücken bilden kann. Die weitgehend gleiche Bandenverteilung unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen spricht gegen die Bildung von Disulfidbrücken zwischen Fragmenten des 66.3-kDa-Proteins in HT1080-66.

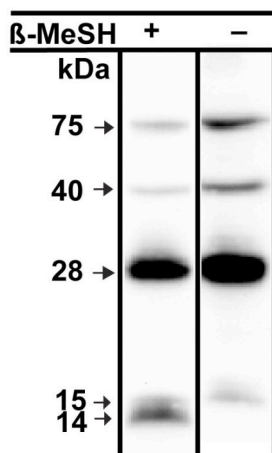


Abb. 3-12: 66.3-kDa-Protein unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen

Homogenate von HT1080-66 (50 μ g) wurden unter reduzierenden (+ β -Me) und nicht-reduzierenden Bedingungen (- β -Me) mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Western-Blot-Analyse mit dem 66-Antiserum analysiert.

3.7.2 N-Glykosylierung des 66.3-kDa-Proteins in HT1080-Zellen

Das murine 66.3-kDa-Protein besitzt fünf potentielle N-Glykosylierungsstellen (N-X-S/T) an Position 93, 115, 236, 441 und 520. Zur Analyse des Glykosylierungsstatus des 66.3-kDa-Proteins wurden 50 µg Homogenat von HT1080-66 mit N-Glykosidase F (PNGase F) behandelt.

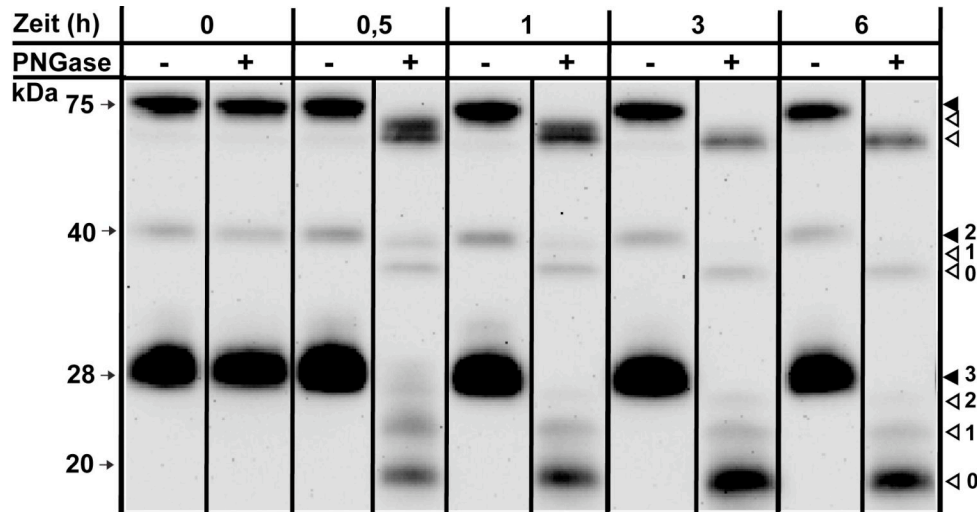


Abb. 3-13: Glykosylierung

Homogenate von HT1080-66 (50 µg) wurden bis zu 6 h mit und ohne PNGase F bei 37 °C inkubiert. Die Peptide wurden über SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mit dem 66-Antiserum im Western Blot detektiert. Gefüllte Pfeilspitzen zeigen auf die vollständig N-glykosylierten Polypeptide, leere Pfeilspitzen auf teilweise deglykosylierte Polypeptide. Die Zahlen stehen für die Anzahl der an dem markierten Polypeptid abspaltbaren N-Glykane.

Nach 30- bzw. 60-minütigem PNGase-F-Verdau wurde die Proform (75-kDa) über eine ~ 70-kDa-Zwischenform und nach 3 h bzw. 6 h in eine 66-kDa-Form deglykosyliert (Abb. 3-13). Die Abnahme des Molekulargewichtes um 9 – 10 kDa entspricht fünf abspaltbaren N-Glykanen (~ 2 - 2,5 kDa pro N-Glykan). Das 40-kDa-Fragment wurde nach 30- bzw. 60-minütigem PNGase-F-Verdau zu einer Zwischenform von 38 kDa und nach dreistündigem Verdau zu einem 35-kDa-Fragment deglykosyliert. Das 40-kDa-Fragment sollte demnach mit zwei N-Glykanen modifiziert sein. Das 28-kDa-Fragment wird über eine ~ 26-kDa- und eine ~ 23-kDa-Zwischenform in eine deglykosylierte ~ 19-kDa-Form überführt. Es könnte demnach mit drei N-Glykanen modifiziert sein. In HT1080-66 werden demnach alle fünf potentiellen N-Glykosylierungsstellen des 66.3-kDa-Proteins genutzt. In Abb. 3-14 wurde das 66.3-kDa-Proteins mit den N-Glykosylierungsstellen schematisch dargestellt.

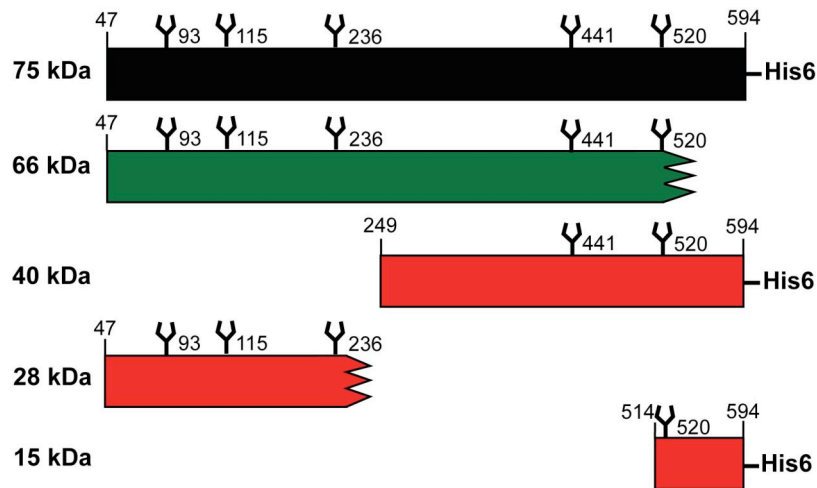


Abb. 3-14: Glykosylierungspositionen

Schematische Darstellung der Proform (75 kDa) und der Fragmente des 66.3-kDa-Proteins. Die Zahlen an N- und C-Terminus geben die bekannten N- und C-terminalen Aminosäuren der Fragmente an, die Zahlen innerhalb der Polypeptide die N-glykosylierten Asparaginreste.

3.7.3 Membranassoziation oder Matrix-Protein

Abb. 3-15 zeigt eine graphische Darstellung der Hydrophobizität der Aminosäuresequenzen homologer Proteine des 66.3-kDa-Proteins. Daraus geht hervor, dass das homologe Protein, p67, in *T. brucei* eine C-terminale Transmembrandomäne besitzt. Das humane und murine Protein weisen keine Transmembrandomäne auf. Dies schließt eine Membranassoziation allerdings nicht aus.

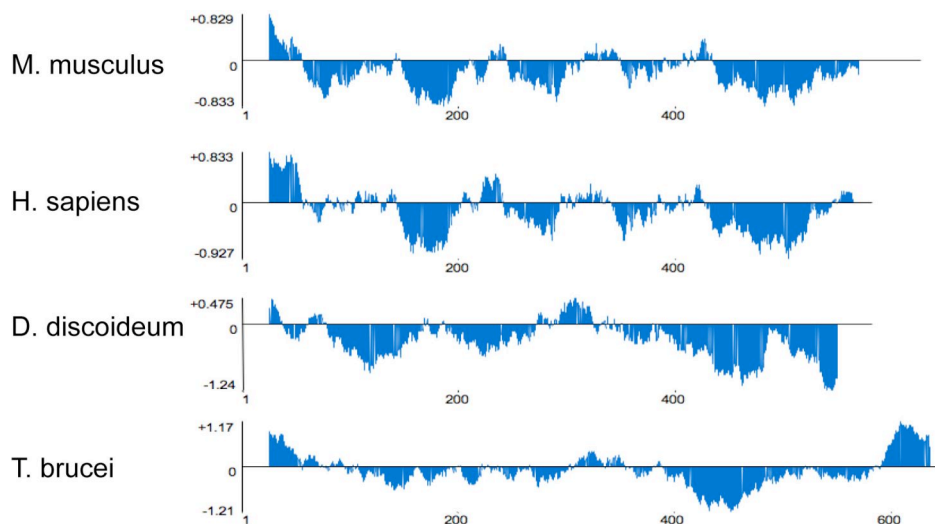


Abb. 3-15: Graphische Darstellung der Hydrophobizität

Das 66.3-kDa-Protein und die homologen Proteine in *H. sapiens*, *D. discoideum* und *T. brucei* wurden auf ihre Hydrophobizität (Kyte und Doolittle 1982) untersucht. Ausschläge die oberhalb der eingezeichneten Nulllinie liegen zeigen hydrophobe, Ausschläge unterhalb hydrophile Proteinanteile an. Die X-Achse gibt die Aminosäurezahl an. Die Abbildung wurde mit dem Programm VectorNTI Advance V.10 (Invitrogen) erstellt.

Um die potentielle Membranassoziation des 66.3-kDa-Proteins zu untersuchen, wurden Homogenate von HT1080-66 unter verschiedenen Pufferbedingungen inkubiert und die Membranen nach der Inkubation mittels Zentrifugation von den löslichen Proteinen getrennt. Das 66.3-kDa-Protein liegt unter allen getesteten Bedingungen in den HT1080-66 als lösliches Protein vor, so dass auch eine lockere Membranassoziation ausgeschlossen werden kann.

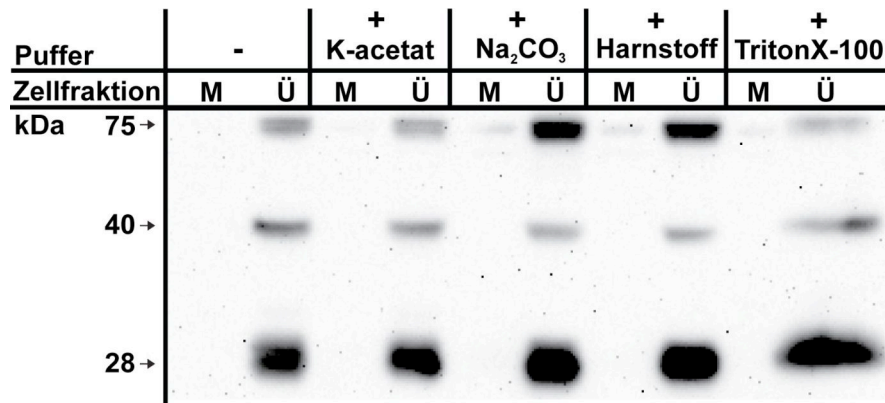


Abb. 3-16: Membranassoziation

Homogenate von HT1080-66 wurden 45 min auf Eis mit Lysepuffer und den jeweiligen Pufferbedingungen inkubiert und anschließend bei $100\,000 \times g$ für 45 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, gefällt und wie das Membranpellet in SDS-Ladepuffer aufgenommen. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und das 66.3-kDa-Protein mit dem 66-Antiserum detektiert. M = Membran; Ü = Überstand. $200\text{ }\mu\text{g}/\text{Ansatz}$ (= M + Ü).

3.7.4 Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins in HT1080

Zur Analyse der Prozessierungskinetik des 66.3-kDa-Proteins von der Proform zu gereiften Proteinfragmenten wurden HT1080-66 und HT1080 für 0,5 h mit [³⁵S]-Methionin/Cystein metabolisch markiert (*Pulse*), nach verschiedenen langen Inkubationszeiten (*Chase*) homogenisiert und das 66.3-kDa-Protein mit dem 66-Antiserum immunpräzipitiert.

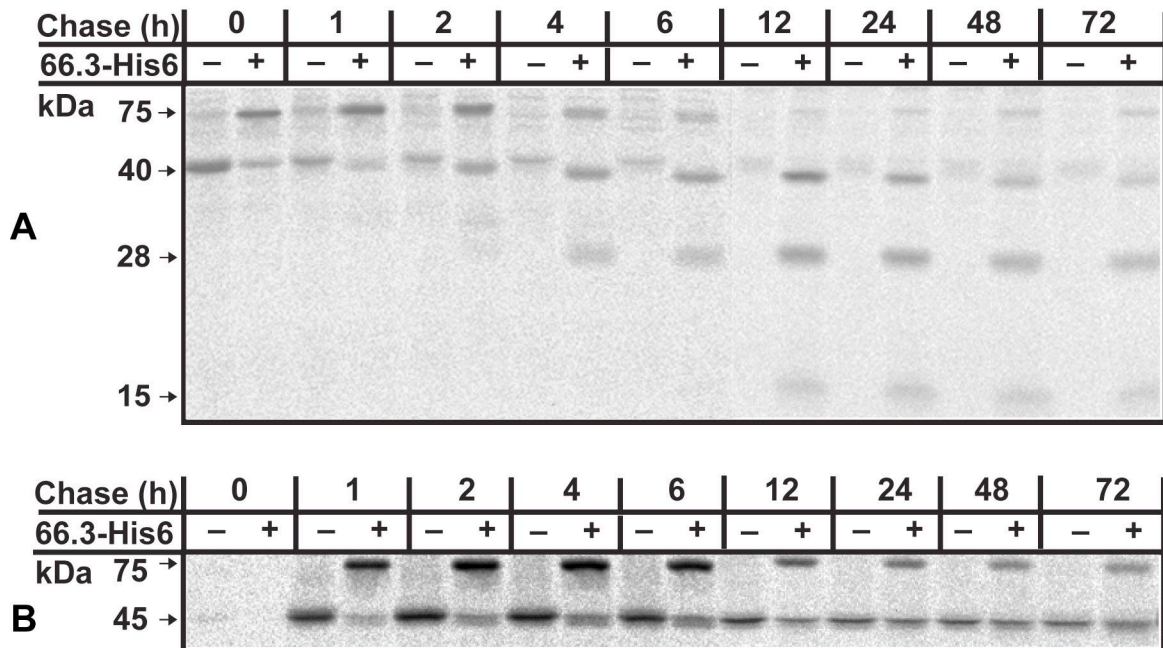


Abb. 3-17: Prozessierung in HT1080-66

A) Zellen B) Medium. HT1080 und HT1080-66 wurden radioaktiv markiert und nach der Markierung unterschiedlich lange in Kultur gehalten (*Chase*). Mit dem 66-Antiserum wurden durch Immunpräzipitation alle immunreaktiven Polypeptide aus den Medien und den Zellhomogenaten isoliert. Um die vollständige Prozessierung in einer Abbildung darzustellen, wurden jeweils zwei SDS-PAGE-Gele zusammengefügt (0-6 h und 12-72 h).

Abb. 3-17 A zeigt die intrazelluläre Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins in HT1080 und HT1080-66. In HT1080 war zwischen 0 h und 2 h ein schwaches Signal der endogenen Proform (75 kDa) zu detektieren. Andere Fragmente des 66.3-kDa-Proteins waren bei der Immunpräzipitation in HT1080 nicht nachweisbar. Daneben wurde in HT1080 ein Protein mit einem Molekulargewicht von ~40 kDa präzipitiert, das über die gesamte *Chase*-Periode nachweisbar war. In HT1080-66 war dieses Protein nur zu Beginn der *Chase*-Periode zu detektieren. Bei diesem Signal handelt es sich um ein unspezifisches Signal, das auch schon im Gewebewestern (vgl. Abb. 3-8) und bei der subzellulären Fraktionierung (vgl. Fraktion S in Abb. 3-11) zu detektieren war.

In HT1080-66 war die Proform schon zur *Chase-Zeit* 0 h zu detektieren (Abb. 3-17A). Die Proform konnte über 2 h in konstanter Signalstärke und von 4 h bis 72 h mit abnehmender Signalstärke detektiert werden. Während die Proform an Signalstärke abnahm, konnten das 40- und das 28- kDa-Fragment verstärkt nachgewiesen werden. Das 40-kDa-Fragment wurde erstmals nach 1 h detektiert. Die Signalstärke nahm innerhalb der ersten zwölf Stunden an Intensität zu und danach langsam bis zur *Chase-Zeit* 72 h wieder ab. Das 28-kDa-Fragment war nach 2 h erstmals zu detektieren. Die Signalstärke nahm bis zur *Chase-Zeit* 24 h zu und danach langsam wieder ab. Das 15-kDa-Fragment konnte vom Zeitwert 12 h bis 72 h nachgewiesen werden.

Im Medium der HT1080-66 ist bereits nach einer Stunde die 75-kDa-Vorläuferform des 66.3-kDa-Proteins zu detektieren (vgl. Abb. 3-17B). Diese war für 6 h stabil, ehe eine langsame Reduktion der Signalstärke bis zur *Chase-Zeit* 72 h zu registrieren war. Bei 45 kDa wurde ein Signal detektiert, das allerdings sowohl in HT1080-66 als auch in HT1080 nachgewiesen werden konnte und daher ein unspezifisches Signal darstellt. Andere Fragmente wurden nicht detektiert.

3.7.5 Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins in 3T3-Zellen

Nach der Prozessierung in HT1080-66 wurde die Prozessierung des endogenen 66.3-kDa-Proteins in 3T3-Zellen untersucht. Aufgrund der niedrigen Expressionshöhe des 66.3-kDa-Proteins in 3T3 (vgl. Abb. 3-4) wurde die fünffache Menge an Zellen für 1 h metabolisch markiert. Auch in 3T3-Homogenaten wurde eine Kreuzreaktion mit einem Protein bei ca. ~ 40/43 kDa in Zellkulturmedium und den Zellen festgestellt (vgl. ▶ in Abb. 3-18).

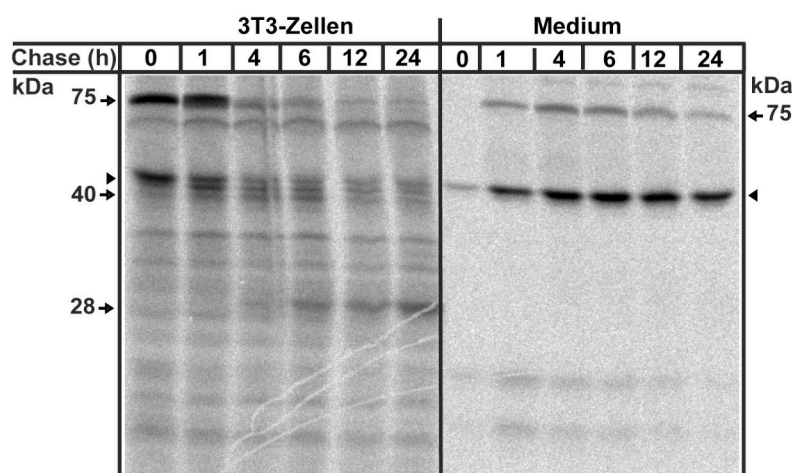


Abb. 3-18: Endogene Prozessierung in 3T3-Zellen

Die Abbildung zeigt in 3T3-Zellen radioaktiv markierte Proteine, die wie in Abb. 3-17 mit dem Antiserum immundetektiert und über SDS-PAGE aufgetrennt wurden. (▶) Kreuzreaktion des Antikörpers mit einem Protein bei 43 kDa.

Die Proform (75 kDa) des 66.3-kDa-Proteins wurde direkt nach der Markierung und nach einer Stunde *Chase-Zeit* detektiert (Abb. 3-18). Das Auftreten der Proform zum Zeitpunkt 0 h lässt sich durch die verlängerte *Pulse-Zeit* erklären. Nach 4 h *Chase-Zeit* nimmt die Intensität

des Signals der Proform zunehmend ab, während Signale bei 40 kDa und 28 kDa zu detektieren sind. Die 28-kDa-Bande scheint in 3T3-Zellen die stabilste Form des 66.3-kDa-Proteins zu sein. Im Zellkulturmedium konnte ab der *Chase*-Zeit 1 h die Proform detektiert werden.

3.8 Funktionelle Analyse des 66.3-kDa-Proteins

Das murine 66.3-kDa-Protein wurde von Kollmann et al. (2005) erstmals identifiziert und ist in seiner Funktion nicht beschrieben. Eine Möglichkeit zur Funktionsanalyse stellen *RNA-interference-(RNAi)*-Versuche oder *Knock-out*-Modelle dar. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte *RNAi*-Versuche führten zu nicht verwendbaren Ergebnissen und sind daher nicht dargestellt. Ein *Knock-out*-Modell in der Maus wurde parallel zu dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe konzipiert. Die Identifizierung von Bindungspartnern des 66.3-kDa-Proteins ist eine weitere Methode, um Rückschlüsse auf das Funktionsumfeld eines Proteins vorzunehmen.

3.8.1 Identifizierung von Interaktionspartnern durch Affinitätschromatographie

Für die Identifikation möglicher Interaktionspartner des 66.3-kDa-Proteins wurde rekombinantes 66.3-kDa-Protein an eine AffiGel-10-Säule gekoppelt und in drei unabhängigen Versuchen (V1-3) mit hoch aufgereinigten lysosomalen Proteinen inkubiert (vgl. Subzelluläre Fraktionierung, F2-Fraktion: V1= 2 mg, V2= 8 mg und V3= 2 mg). Die F2-Fraktionen wurden vorher über eine BSA-Säule gegeben, um unspezifische Bindungspartner zu entfernen. Die AffiGel-10-Säule mit immobilisiertem 66.3-kDa-Protein wurde nach der Inkubation mit der F2-Fraktion zuerst intensiv gewaschen. Anschließend wurden mögliche Bindungspartner mit steigenden Salzkonzentrationen eluiert (vgl. Abb. 3-19). Wasch- und Elutionsfraktionen wurden mit 10% TCA gefällt, über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau (V1 und V2) bzw. im Western Blot (V3) analysiert. Aus den Coomassie-Gelen (vgl. Abb. 3-19 A) wurden sichtbare Banden ausgestanzt, die Proteine im Gel mit Trypsin verdaut und die Peptide massenspektrometrisch analysiert (MALDI-TOF-MS und -MS/MS). Im dritten Versuch (V3) wurden die Elutionsfraktionen im Western Blot analysiert (vgl. Abb. 3-19B).

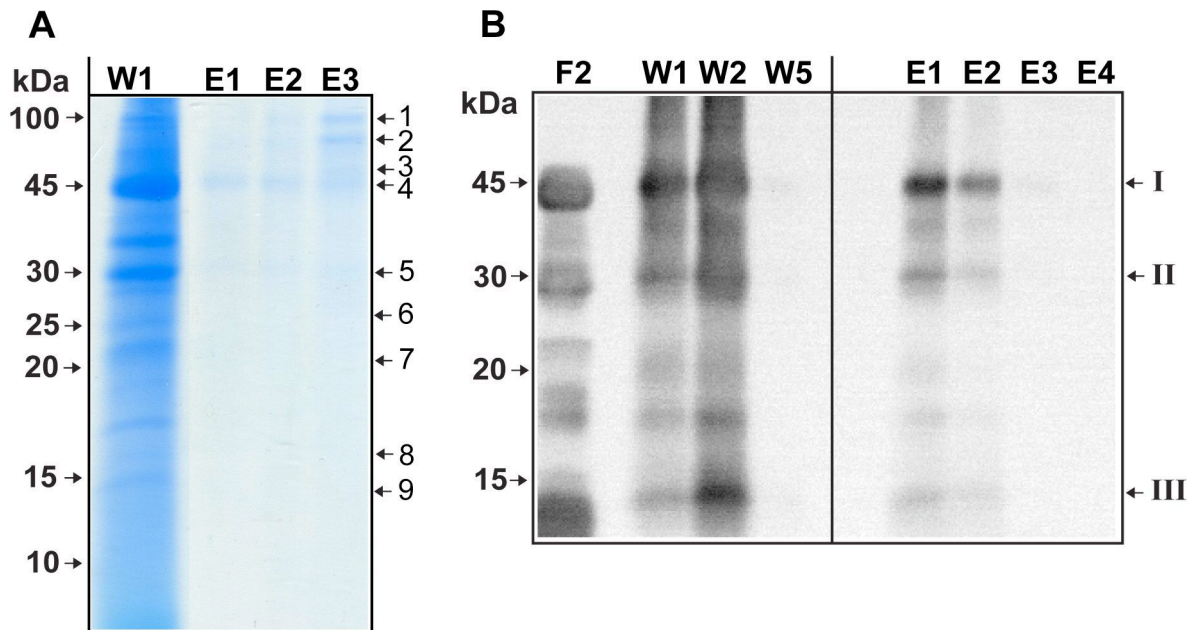


Abb. 3-19: Affinitätschromatographie

Eine Lysosomen-angereicherte-Fraktion (Fraktion 2 [F2] der subzellulären Fraktionierung, vgl. Kap. 3.6.2) wurde nach 30-minütiger Präinkubation auf einer BSA-Säule für 60 min bei einem pH-Wert von 5,2 mit immobilisiertem 66,3-kDa-Protein inkubiert. Nicht-gebundenes Protein wurde mit Bindungspuffer (bis $OD_{280}=0$) gewaschen (W1-W5) und mögliche Bindungspartner anschließend mit schrittweise steigenden Salzkonzentrationen eluiert (E1-E4). Lade-, Wasch- und Elutionsfraktionen wurden mit 10 % TCA gefällt, über SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie-Blau angefärbt (A) oder im Western Blot mit dem Cat-D-Antikörper (B) dargestellt. Aus den Coomassie-Gelen (in V2 exemplarisch gezeigt) wurden die Banden 1-9 der Elutionsfraktionen 1-3 (E1-3) ausgestanzt, die Proteine mit Trypsin verdaut und die Peptide massenspektrometrisch analysiert (vgl. Tab. 3-3). Im digitalen Bild des Gels sind Banden 6-9 nicht mehr zu erkennen, ihre Position ist jedoch mit Pfeilen angedeutet. Die Elution erfolgte mit 0,5 M NaCl (E1), 1 M NaCl (E2), 1,5 M NaCl (E3) und 3 M NaCl (E4); Aufgetragene Proteinmenge 50 μ g (F2), 10 % des TCA-gefällten Proteins (W1 und W2), 100 % des TCA-gefällten Proteins (W5, E1, E2, E3 und E4).

Die ermittelten Massen wurden mit Hilfe des Programms *Mascot* (Matrix-Science) mit den Einträgen von *in silico* verdauten Proteinen mit der Proteindatenbank *NCBIInr* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Stand 17.05.07) verglichen. Für jede Übereinstimmung zwischen experimentell bestimmten Daten und den theoretischen Daten eines Datenbankeintrages wurde ein *Mascot*-Score ermittelt. Ein Protein galt als identifiziert, wenn der *Mascot*-Score einem p-Wert $< 0,05$ entsprach (vgl. Abb. 3-20 B). Bei der massenspektrometrischen Untersuchung wurden in allen neun Banden Proteine identifiziert (vgl. Tab. 3-3).

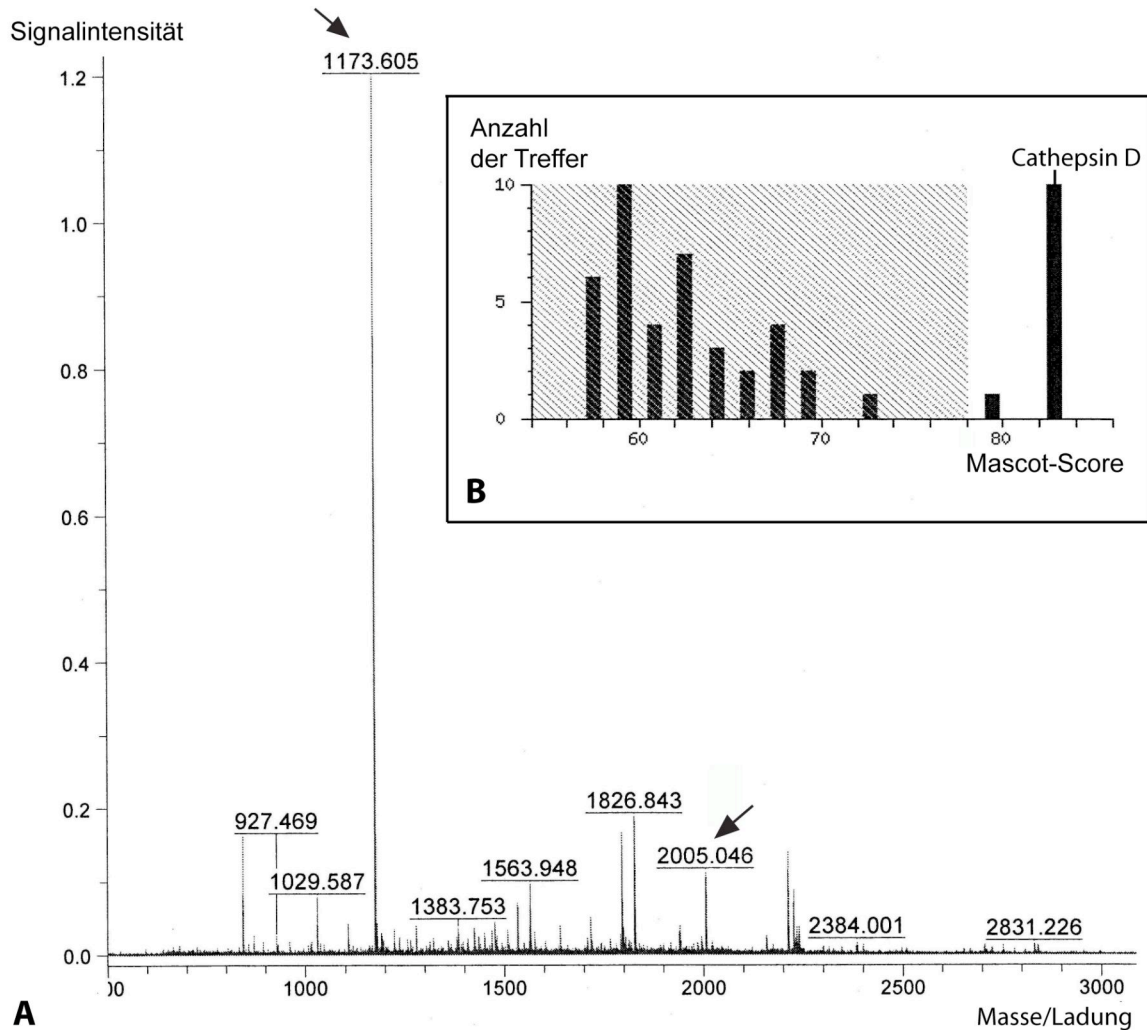


Abb. 3-20: MALDI-TOF Massenspektrum und Datenbankanalyse

(A) Über MALDI-TOF-MS ermitteltes Massenspektrum von Bande 4 (V1) (vgl. Bande 4 Coomassie-Gel in Abb. 3-19 und Bande 4 [V1] in Tab. 3-3). Pfeile markieren die Massen, die auch durch MS/MS Analyse Cathepsin D zugeordnet werden konnten. (B) Häufigkeitsverteilung der Datenbankeinträge mit einem bestimmten Mascot-Score für die Analyse von Bande 4 (V1) (vgl. Coomassie-Gel in Abb. 3-19 und Bande 4 [V1] in Tab. 3-3). Der Eintrag für Cathepsin D ist markiert. Der nicht signifikante Bereich ($p \geq 0,05$) ist grau hinterlegt.

Die Kriterien für eine Identifizierung von Interaktionspartnern waren wie folgt definiert: ein Protein musste sowohl in beiden Versuchen (V1/V2) mit signifikantem Score und durch MALDI-TOF-MS als auch durch MALDI-TOF-MS/MS identifiziert werden. Des Weiteren mussten potentielle Bindungspartner der Spezies Maus angehören und lysosomale Proteine oder nach bioinformatischer Überprüfung potentiell lysosomale Proteine sein.

In den Banden 1, 2 und 3 (V1 und V2) wurden humanes Albumin und Keratin detektiert, die typische Kontaminanten bei massenspektrometrischen Versuchen darstellen. Das in den Banden

6 und 7 (V2) detektierte Keratin (*Bos taurus*) stammt von der Vorreinigung an der BSA-Säule. Des Weiteren wurde in der Bande 1 das murine Protein *Partitioning-defective protein 3 homolog isoform 1* (GI61888844, auch *Par3*) und in Bande 2 die murinen Proteine *Odf21* (GI18043255) und *Glial fibrillary acidic protein* (GI387164, auch GFAP) detektiert. Diese drei Proteine sind zytosolisch lokalisiert und daher keine potentiellen Interaktionspartner für das 66.3-kDa-Protein.

Die in Bande 4, 5 und 9 identifizierte lysosomale Aspartat-Peptidase Cathepsin D erfüllte alle Kriterien eines potentiellen Interaktionspartners für das 66.3-kDa-Protein (vgl. [V1] Abb. 3-19 A Bande 4, 5 und 9; Tab. 3-3). Im Western Blot [V3] mit dem Cat-D-Antikörper konnte Cathepsin D ebenfalls in den Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie dargestellt werden (vgl. Abb. 3-19 B, Bande I, II und III). Die Interaktion des Cathepsin D mit dem 66.3-kDa-Protein sollte durch einen weiteren experimentellen Ansatz bestätigt werden, da die Möglichkeit einer unspezifischen Bindung von Cathepsin D an das 66.3-kDa-Protein oder die Affigel-10-Matrix nicht ausgeschlossen werden konnte.

Im Anschluss wurden daher Co-Immunopräzipitationen und in Kooperation mit Prof. Dr. Stefan Höning (Köln) Interaktionsstudien mit dem Biacore-Analysegerät durchgeführt. Aus technischen Gründen waren diese beiden Ansätze nicht aussagekräftig (vgl. dazu Diskussion Kap. 4.4). Für weitere Interaktionsstudien wurden *Yeast-two-Hybrid*-Versuche durchgeführt.

Die Massenanalytik wurde von Bernhard Schmidt und Nicole Eiselt der Abteilung Biochemie II am MALDI-TOF/TOF-MS (Reflex I/III, Bruker Daltonik) der Proteomics-Gruppe des MPI für Experimentelle Medizin Göttingen durchgeführt.

Tab. 3-3: Ergebnisse der Massenanalyse

Bande	Versuch	Mascot- Score	GI- Nummer	Proteinname	Peptid-Massen identifiziert durch MS (MS/MS)
1	V1	106	55669910	Chain A, Crystal structure of the Ga Module Complexed with human serum Albumin (H. sapiens)	19 (1)
	V2	63	61888844	Partitioning-defective protein 3 homolog isoform 1 (M. musculus)	17 (11)
	V2	132	7428712	Keratin 1, type II, cytoskeletal (H. sapiens)	13 (1)
2	V1	122	763431	Similar to human albumin, Swiss-Prot Accession Number P02768 (H. sapiens)	16 (2)
	V1	70	18043255	Odf21 protein (M. musculus)	15 (-)
	V2	77	387164	Glial fibrillary acidic protein (M. musculus)	16 (-)
	V2	95	7331218	Keratin1 (H. sapiens)	34 (-)
3	V1	104	11493459	PRO2619 / Albumin (H. sapiens)	13 (2)
	V2	239	40354192	Keratin (H. sapiens)	37 (-)
4	V1	83	74220823	Cathepsin D (M. musculus)	8 (2)
	V2	40	74220823	Cathepsin D (M. musculus)	2 (1)
5	V2	p > 0,05	74204799	Cathepsin D (M. musculus)	5 (1)
6/7	V2	236	76649747	Predicted: similar to type I hair keratin KA28 (B. taurus)	16 (2)
9	V2	158	74204799	Cathepsin D (M. musculus)	8 (2)

Massenspektrometrisch ermittelte Peptide wurden mit Hilfe des Mascot-Programmes mit der NCBI-Inr-Protein-Datenbank verglichen. Alle Proteine mit signifikantem Mascot-Score (p -Wert < 0,05) wurden in der Tabelle zusammengefasst. Proteine sind der Bande des Coomassie-Gels zugeordnet, in der sie detektiert wurden (vgl. Abb. 3-19). Murine Proteine sind grau hinterlegt. (V1, V2) Versuch, bei dem das jeweilige Protein identifiziert wurde. (MS) MALDI-TOF-MS; (MS/MS) MALDI-TOF MS/MS.

3.8.2 *Yeast-two-Hybrid (Y2H)* mit dem 66.3-kDa-Protein und Cathepsin D

Zur weiteren Analyse der Interaktion wurde das 66.3-kDa-Protein und Cathepsin D im *Y2H*-System untersucht. Dazu wurde das *Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3* (Clontech) mit den Vektoren pGADT7 (*prey*-Vektor) und pGBKT7 (*bait*-Vektor) verwendet (vgl. Kap. 6.3).

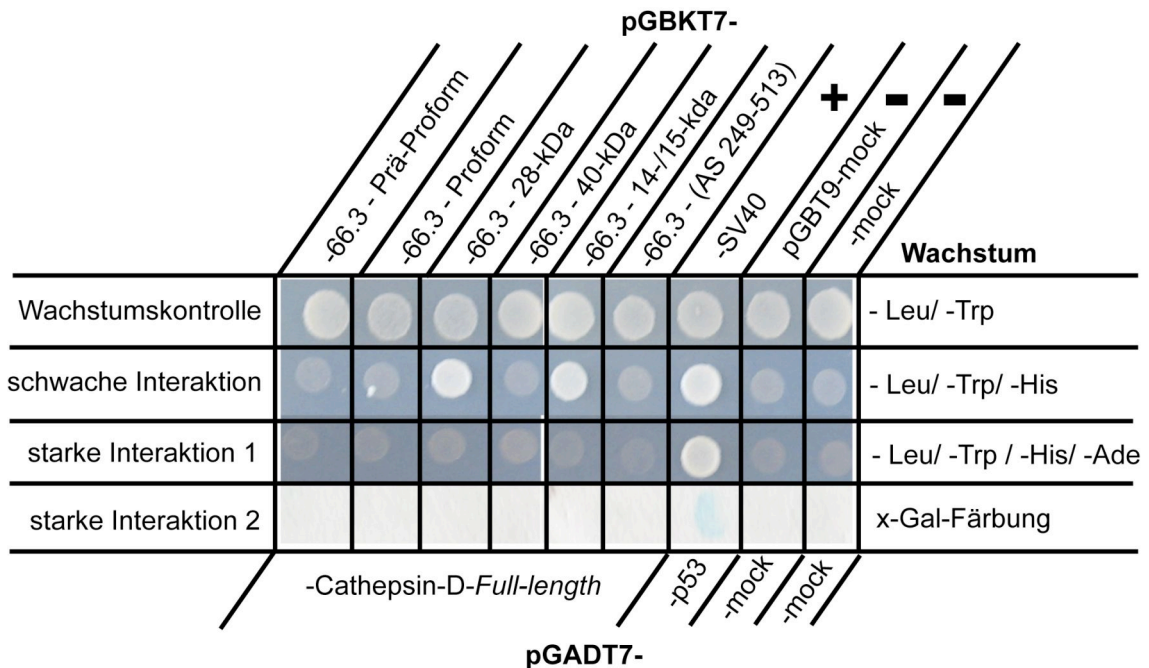


Abb. 3-21: Interaktion von 66.3-kDa-Protein und Cathepsin D

Im *Yeast-two-Hybrid*-Versuch wurden im *prey*-Vektor (pGADT7) die *Full-length*-Form von Cathepsin D und im *bait*-Vektor (pGBKT7) die verschiedenen Fragmente des 66.3-kDa-Proteins in Hefe exprimiert. Die Interaktion zwischen SV-40 und p53 diente als Positivkontrolle. Die Verwendung von *mock*-Vektoren diente als Negativkontrolle. Das Wachstum wurde auf Mangelnährböden ohne Tryptophan (-Trp), ohne Leucin (-Leu); ohne Histidin (-His) und ohne Adenin (-Ade) untersucht.

Hefen wurden mit Cathepsin D und jeweils einem Fragment des 66.3-kDa-Proteins (Prä-Proform, Proform, 40-, 28- und 15-kDa-Fragmente) doppel-transfiziert. Das Wachstum der Hefen auf Selektionsmedium ohne die Aminosäuren Leu und Trp diente als Transfektionskontrolle. Das Wachstum auf Selektionsmedium ohne Leu/Trp und His diente als Nachweis einer schwachen Interaktion. Wachstum auf Selektionsmedium ohne Leu/Trp/His und Adenin, sowie eine positive X-Gal-Färbung (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid) diente als Nachweis einer starken Interaktion. Für das 28-kDa-Fragment und das 15-kDa-Fragment lässt sich mit der Cathepsin-D-*Full-length*-Form eine Interaktion detektieren. Die Positivkontrolle mit *large-T* und p53 war in allen vier Tests positiv, die Negativkontrollen der leeren *mock*-Vektoren miteinander waren negativ. Die beiden mit Cathepsin D interagierenden

Fragmente, das 28- und 15-kDa-Fragment, waren die Fragmente des 66.3-kDa-Proteins, die in der Mausleber nachgewiesen wurden (vgl. Abb. 3-11). Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis auf eine Interaktion zwischen Cathepsin D und dem 66.3-kDa-Protein, wobei anzumerken ist, dass es sich bei den Versuchsbedingungen um ein unphysiologisches Milieu bei pH 7,4 im Zellkern der Hefe handelt. Die Y2H-Versuche wurden unter Mitarbeit von Dipl. Biologe Peter Braun durchgeführt.

Tab. 3-4: Yeast-two-hybrid

	Cathepsin D (full-length)
Prä-Proform (AS 1-594)	-
75-kDa-Proform (AS 47-594)	-
28-kDa-Fragment (AS 47-248)	+
40-kDa-Fragment (AS 249-594)	-
15-kDa-Fragment (AS 514-594)	+
Mittelfragment (AS 249-513)	-

Darstellung der Interaktion von Cathepsin D (full-length) mit den Fragmenten des 66.3-kDa-Proteins im Yeast-two-Hybrid-Versuch. (AS) = Aminosäure

3.8.3 Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins in Abhängigkeit von Cathepsin D

Mit dem Hinweis einer Interaktion zwischen dem 66.3-kDa-Protein und Cathepsin D ergaben sich verschiedene Überlegungen zur möglichen Funktion. So wäre es denkbar, dass Cathepsin D im endosomalen oder lysosomalen Kompartiment bei der proteolytischen Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins beteiligt ist. Um eine solche Cathepsin-D-abhängige Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins zu untersuchen, wurde aufgereinigtes 66.3-kDa-Protein mit aktiviertem, rekombinantem Cathepsin D inkubiert. Darüber hinaus wurde ein *pulse-chase*-Experiment mit MEF im Vergleich zu Cathepsin-D-defizienten MEF durchgeführt.

3.8.3.1 Verdau des 66.3-kDa-Proteins mit Cathepsin D

Aufgereinigtes 66.3-kDa-Protein (400 ng) wurde mit katalytischen Mengen (10 ng) von aktiviertem, rekombinantem Cathepsin D (R&D System, Cat. 1029AS) bei einem lysosomalen pH von 4,5 bis zu 1 h inkubiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit 66-Antiserum analysiert (vgl. Abb. 3-22). Cathepsin D wurde zuvor für 30 min bei pH 4,5 in 0,1 M NaAcetat-Puffer autokatalytisch aktiviert. Es zeigten sich keine Veränderung im Prozessierungsmuster des 66.3-kDa-Proteins. Auch beim Einsatz von 100 ng Cathepsin D zeigten sich keine Veränderung in der Bandenverteilung des 66.3-kDa-Proteins. Eine Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins durch Cathepsin D ist somit unwahrscheinlich.

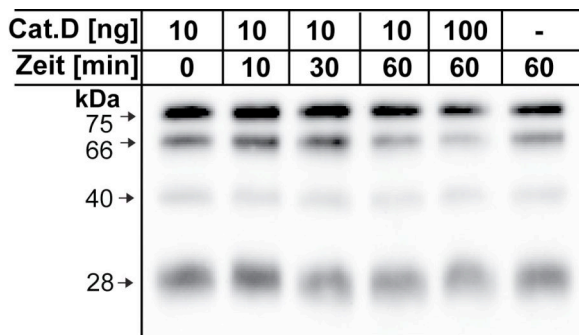


Abb. 3-22: Inkubation von 66.3-kDa-Protein mit Cathepsin D

400 ng 66.3-kDa-Protein wurden mit jeweils 10 ng und 100 ng Cathepsin D für bis zu 1 h bei 37 °C in 0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 4,5 inkubiert. Das Protein wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem 66-Antiserum analysiert.

3.8.3.2 Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins in Cathepsin-D-defizienten MEF

Cathepsin-D-defiziente MEF bzw. Kontroll-MEF wurden für eine Stunde mit [³⁵S]-Methionin/Cystein metabolisch markiert. Das 66.3-kDa-Protein wurde anschließend mit dem 66-Antiserum immunpräzipitiert, autoradiographisch analysiert und densitometrisch quantifiziert.

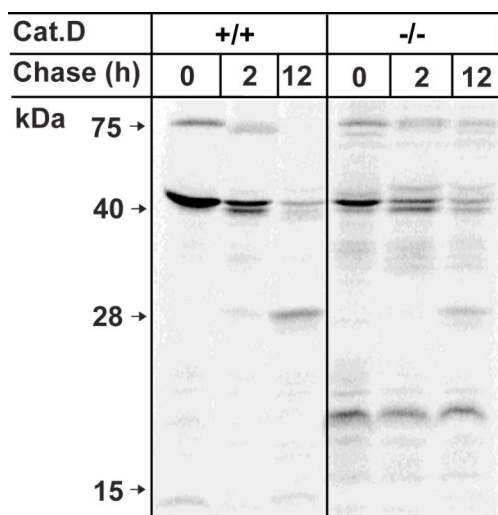


Abb. 3-23: Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins in Cathepsin-D-defizienten MEF

Cathepsin-D-defiziente MEF und Kontroll-MEF wurden 1 h metabolisch markiert, das 66.3-kDa-Protein mittels Immunpräzipitation mit dem 66-Antiserum isoliert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und autoradiographisch analysiert. Cat.D =Cathepsin D.

Die 75-kDa-Proform des 66.3-kDa-Proteins wurde nach 0 h *Chase-Zeit* in Kontroll-MEF und in Cathepsin-D-defizienten MEF mit fast identischer Signalstärke detektiert (vgl.

Abb. 3-23). Nach 2 h *Chase-Zeit* wurde in Kontroll-MEF ein etwa 15 % schwächeres Signal als in den Cathepsin-D-defizienten MEF festgestellt. Nach 12 h *Chase-Zeit* war das Signal der Proform in Kontroll-MEF 50 % schwächer als in Cathepsin-D-defizienten MEF. Die 40-kDa-Form konnte in beiden Zelllinien nach 2 h *Chase-Zeit* mit intensiver Signalstärke und nach 12 h *Chase-Zeit* mit abgeschwächter Signalstärke detektiert werden. In Cathepsin-D-defizienten MEF wurde ein schwaches 40-kDa-Signal bereits bei 0 h *Chase-Zeit* detektiert. Das 28-kDa-Signal war nach 12 h *Chase-Zeit* in beiden Zelllinien detektierbar, in Kontroll-MEF allerdings mit 30 % höherer Intensität als in den Cathepsin-D-defizienten MEF. Zusätzlich konnte in Cathepsin-D-defizienten MEF eine Bande bei etwa 20 kDa präzipitiert werden, die zu allen drei *Chase-Zeiten* detektierbar war.

Anhand der metabolischen Markierung und Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass das 66.3-kDa-Protein in MEF und in Cathepsin-D-defizienten MEF annähernd gleich prozessiert wird. Cathepsin-D-defiziente MEF zeigen lediglich ein Polypeptid bei 20 kDa, das jedoch bereits nach 0 h *Chase-Zeit* nachweisbar ist und daher als unspezifisches Signal angesehen werden kann. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Cathepsin D keine essentielle proteolytische Rolle bei der Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins übernimmt. Die Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins findet in Cathepsin-D-defizienten MEF statt, jedoch mit einer langsameren Prozessierungskinetik.

3.8.4 Subzelluläre Verteilung des 66.3-kDa-Proteins in Abhängigkeit von Cathepsin D (Cathepsin-D-defiziente MEF)

Zur Untersuchung der intrazellulären Verteilung des 66.3-kDa-Proteins in Abhängigkeit von Cathepsin D wurden Cathepsin-D-defiziente MEF und Kontroll-MEF auf gelatinisierten Deckplättchen ü.N. kultiviert, fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz mit dem LSM hinsichtlich der intrazellulären Verteilung des 66.3-kDa-Proteins, Cathepsin D und LAMP-1 analysiert. In Abb. 3-24 wurde das 66.3-kDa-Protein rot, LAMP-1 blau, und Cathepsin D grün dargestellt. In Cathepsin-D-defizienten MEF konnte erwartungsgemäß kein spezifisches Signal für Cathepsin D detektiert werden.

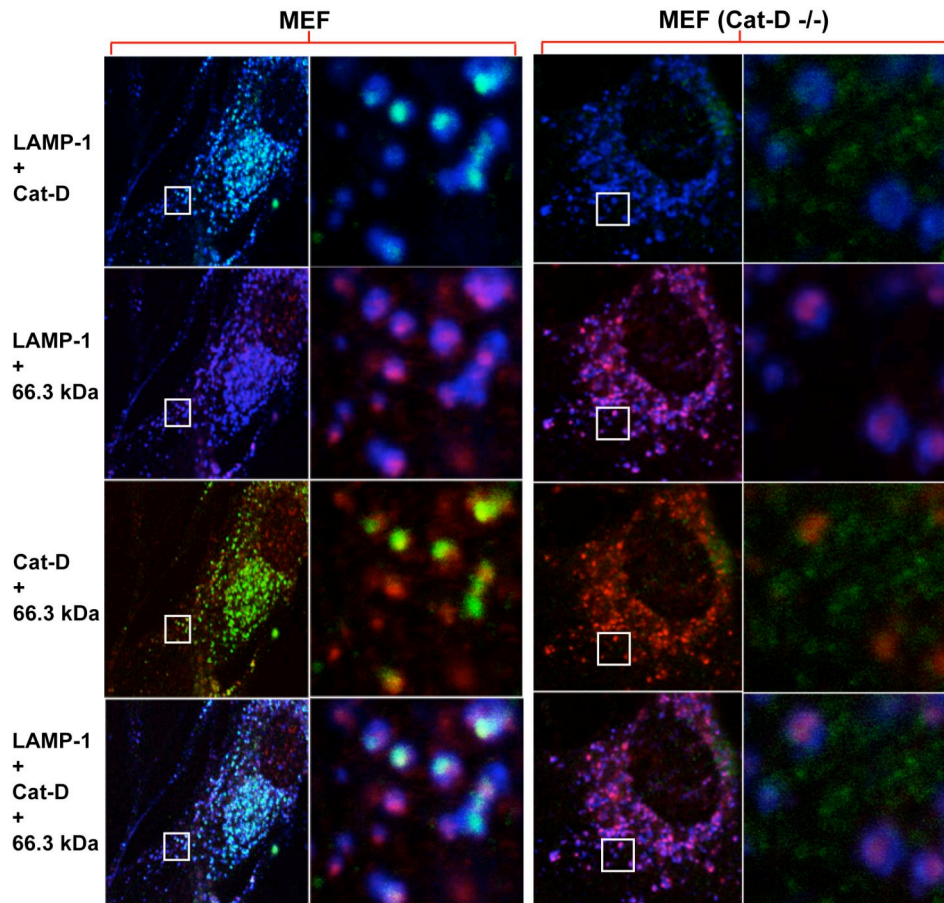


Abb. 3-24: Zelluläre Verteilung des 66.3-kDa-Proteins in Abhängigkeit von Cathepsin D

Immunfluoreszenzaufnahmen von MEF und Cathepsin-D-defizienten MEF nach Immundetektion mit dem α -LAMP-1-Antikörper und den 66.3-kDa-Protein- und Cat-D-Antiseren. Die Quadrate in der Übersichtsaufnahme auf der linken Seite geben die Lokalisation des Vergrößerungsausschnittes auf der rechten Seite an. Blau = LAMP-1; Grün = Cathepsin D (Cat-D); Rot = 66.3-kDa-Protein.

In der Immunfluoreszenz weisen MEF eine eindeutige Co-Lokalisation mit LAMP-1 und Cathepsin D auf, wobei das integrale Membranprotein LAMP-1 im LSM-Bild als ringförmiges Signal um das luminal Cathepsin-D-Signal detektiert wird (obere Reihe, links). In den Cathepsin-D-defizienten MEF wurde erwartungsgemäß nur LAMP-1 detektiert (obere Reihe, rechts). In der zweiten Reihe sind LAMP-1 und das 66.3-kDa-Protein dargestellt. Es konnte in beiden Zelllinien gleichermaßen LAMP-1 als ringförmige Struktur und luminal davon das 66.3-kDa-Protein detektiert werden. In der dritten Reihe wurden Cathepsin D und das 66.3-kDa-Protein dargestellt. In MEF auf der linken Abbildungsseite konnte eine Co-Lokalisation nachgewiesen werden. Auf der rechten Abbildungsseite wurde lediglich das Signal des 66.3-kDa-Proteins detektiert. In der vierten Reihe sind in den Kontroll-MEF alle drei lysosomalen Proteine übereinander dargestellt. In Cathepsin-D-defizienten MEF konnte lediglich das 66.3-kDa-Protein und LAMP-1 detektiert werden. Die intrazelluläre Verteilung des 66.3-kDa-Proteins in Cathepsin-D-defizienten MEF im Vergleich zu MEF ist identisch.

4 Diskussion

Es sind ca. 50 lysosomale Matrixproteine bekannt und etwa 40 humane Erkrankungen konnten bislang mit Defekten in diesen Proteinen in Verbindung gebracht werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass durch die Identifikation und Charakterisierung bislang unbekannter lysosomaler Proteine auch unbekannte lysosomale Erkrankungen identifiziert werden können (Naureckiene et al. 2000; Sleat et al. 1997). Im Idealfall können nach eingehender molekularer und biochemischer Charakterisierung der Proteine und der Erkrankungen Therapien entwickelt werden, so wie z.B. bereits für die Glucocerebrosidase bei Morbus Gaucher (Barton et al. 1991; Weinreb et al. 2002), für die α -Galactosidase bei Morbus Fabry (Baehner et al. 2003; Brady et al. 2001; Hajioff et al. 2003) und für die α -Glucosidase bei Morbus Pompe (Glykogenose Typ II) (Van den Hout et al. 2001; Winkel et al. 2003) beschrieben. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht das murine 66.3-kDa-Protein, das erstmals von Kollmann et al. (2005) im Rahmen einer Proteomanalyse als putativ lysosomales Matrixprotein beschrieben wurde (vgl. Kap. 1.5). In dieser Analyse gab es erste Hinweise auf eine lysosomale Lokalisation des 66.3-kDa-Proteins. So konnte gezeigt werden, dass eine C-terminal markierte Variante des 66.3-kDa-Proteins MPR-abhängig von Fibroblasten internalisiert und in Lysosomen transportiert wird (vgl. Kap. 1.7) (Kollmann et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde das 66.3-kDa-Protein hinsichtlich seines molekularen Aufbaus, seines Expressionsmusters und seiner Funktion untersucht.

4.1 Bioinformatische Analyse

Eine Sequenzanalyse des 66.3-kDa-Proteins (*Accession*-Nr. AAH38605) in Proteindatenbanken wie *Pfam* und *ExPASy* (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam> und <http://expasy.org>; Stand Januar 2008) zählt das Protein zur Phospholipase-B-Familie (Domäne von AS 75 – AS 594; *pfam*-Nummer: pfam04916). Zuvor wurde diese Proteinfamilie in den Datenbanken lange Zeit als Laminin-A-Familie geführt, da sie nach ihrer Sequenzhomologie des erstbeschriebenen Proteins dieser Familie, *Lama* (*lamina ancestor*) aus *Drosophila melanogaster*, benannt wurde (Perez und Steller 1996). Mit dem Nachweis der Phospholipase-B-Aktivität des homologen Proteins im Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* wurde die Proteinfamilie nach dieser Lipase umbenannt (Morgan et al. 2004). Es existieren homologe Proteine des 66.3-kDa-Proteins sowohl in anderen Säugern (u.a. *Rattus norvegicus*, *Bos taurus*, *Canis familiaris* und *Homo sapiens*) als auch in *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) und *D. discoideum*, nicht aber in der *S. cerevisiae* (vgl. Abb. 4-1).

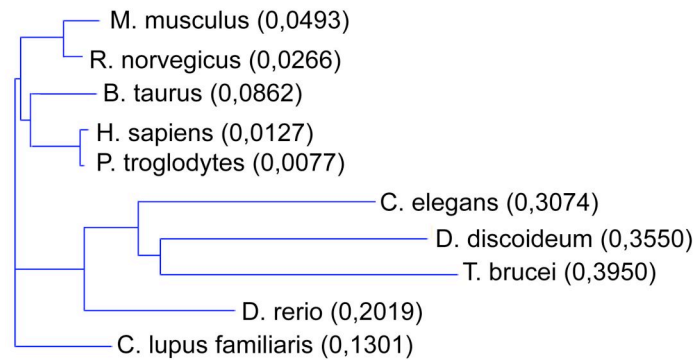


Abb. 4-1: Phylogenetischer Stammbaum ausgesuchter homologer Proteine des 66.3-kDa-Proteins

Die Berechnung erfolgte nach dem „Neighbor Joining Algorithmus“ (Saitou und Nei 1987). Die Abbildung wurde mit VectorNTI Advance V.10 (Invitrogen) erstellt.

4.1.1 Homologe Proteine des 66.3-kDa-Proteins

Bislang wurde nur für das homologe Protein in *D. discoideum* eine Funktion beschrieben (Morgan et al. 2004). Das Protein spaltet beide Fettsäuren von Phosphoglyceriden, wie Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol ab (Morgan et al. 2004) und besitzt somit sowohl Phospholipase-A₁-Aktivität, da es die Esterbindung am C₁-Atom des Glycerins hydrolysiert, als auch Phospholipase-A₂-Aktivität, da es die Esterbindung am C₂-Atom des Glycerins hydrolysiert. Daraus ergibt sich definitionsgemäß eine Phospholipase-B-Aktivität (vgl. Abb. 4-2) (Waite 1985). Die Aminosäuresequenz dieses Proteins weist eine 36 %ige Identität zu der des 66.3-kDa-Proteins auf. Morgan et al. (2004) zeigten, dass die Sequenz -NSGTYNNQ- (vgl. Aminosäure 410 und 417 in Abb. 6-7) eine in *D. discoideum*, *M. musculus* und *H. sapiens* hoch konservierte Sequenz der Phospholipase-B ist, in der Serin potentiell an der Hydrolyse beteiligt sein könnte (Morgan et al. 2004). In *M. musculus* und *H. sapiens* gibt es mit der Sequenz GxSxG (zwischen Aminosäure 430 und 435 in Abb. 6-7) eine weitere Sequenz, in der Serin als katalytisches Zentrum mit Lipaseaktivität fungieren könnte (Morgan et al. 2004).

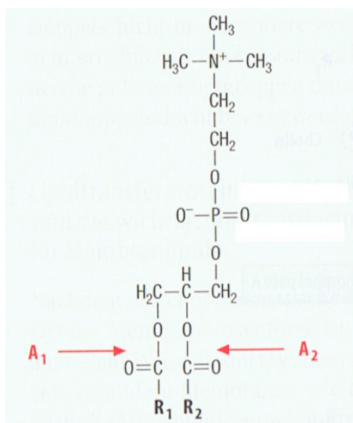


Abb. 4-2 Phospholipase B

Dargestellt ist die Funktion der Phospholipase B am Beispiel von Phosphatidylcholin. Die Pfeile markieren die Angriffspunkte der Phospholipase-A₁-Aktivität am C₁-Atom und der Phospholipase-A₂-Aktivität am C₂-Atoms des Glycerins (modifiziert nach Löffler und Petrides 2003, S. 606).

Das homologe Protein des 66.3-kDa-Proteins in *T. brucei*, p67, ist ein integrales Membranprotein, mit lysosomal-endosomaler Lokalisation. Die Aminosäuresequenz von p67 weist eine 28 %ige Identität zu der des murinen 66.3-kDa-Proteins auf. p67 besitzt ein Signalpeptid, eine große mit 14 putativen N-Glykosylierungsstellen hoch glykosylierte, N-terminale, luminaire Domäne, eine Typ-1-Transmembrandomäne (vgl. Abb. 3-15) und eine kurze, C-terminale zytoplasmatische Domäne (Kelley et al. 1999) und ähnelt damit den integralen lysosomalen Membranproteinen LAMP-1 und LAMP-2 (Lysosomen-assoziierte Membranproteine). Im Vektororganismus *Glossina morsitans* (Tsetsefliege) gelangt p67 ohne Modifikationen der N-Glykane im Golgi-Apparat als 100-kDa-Glykoprotein zum Lysosom (Kelley et al. 1995). Im menschlichen Wirtsorganismus gelangt p67 als 100-kDa-Glykoprotein nach Modifikationen der N-Glykane im Golgi-Apparat als 150-kDa-Polypeptid zum Lysosom (Brickman und Balber 1994). Interessanterweise werden die jeweiligen Formen beider Lebenszyklen im endosomalen/lysosomalen Kompartiment gleichermaßen proteolytisch zuerst in eine etwa 75-kDa- und eine 32-kDa-Form abgebaut. Die 75-kDa-Form wird anschließend in eine 42-kDa- und eine 28-kDa-Form prozessiert (Brickman und Balber 1994; Kelley et al. 1999; Kelley et al. 1995). Dies bedeutet, dass die 150-kDa-Form im Lysosom parallel zur oder kurz vor der proteolytischen Spaltung die Modifikationen an den N-Glykanen durch endogene Glykosidaseaktivität wieder verliert (Alexander et al. 2002). Alexander et al. (2002) vermuten, dass die Modifikationen an N-Glykanen den vorzeitigen Abbau des Proteins in den wesentlich aktiveren Lysosomen der Lebensform im Wirtsorganismus verhindern soll. Vorläufige und unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe Alexander et al. (2002) deuten in *T. brucei* auf einen letalen *Knock-down* des p67 durch RNAi hin (Alexander et al. 2002). Über die Analyse der 66.3-kDa-Protein-*Knock-out*-Maus können demnächst Aussagen über eine mögliche Letalität in der Maus getroffen werden.

Aufgrund seiner Molekülstruktur (vgl. oben) ähnelt das p67 den integralen lysosomalen Membranproteinen LAMP-1 und LAMP-2 (Kelley et al. 1999). LAMP-2 kann in verschiedenen Isoformen vorkommen. Durch alternatives Spleißen des primären LAMP-2-mRNA-Transkriptes entstehen die Isoformen LAMP-2A / -2B/ -2C. Diese zeigen eine gewebespezifische Expression (Gough und Fambrough 1997; Konecki et al. 1995; Lichter-Konecki et al. 1999).

Die Funktion von LAMP-1 und LAMP-2 wurde lange Jahre besonders in einer Schutzfunktion der lysosomalen Membran gegenüber sauren Hydrolasen der lysosomalen Matrix gesehen (Kornfeld S und Mellman 1989). Insbesondere für das LAMP-2-Protein werden noch weitere Funktionen beschrieben. In Hepatozyten von Mäusen mit LAMP-2-Defizienz wurde die vermehrte Bildung von autophagozytotischen Vakuolen, eine Fehlsortierung von MPR46 und

eine Sekretion von Cathepsin D in das Zellkulturmedium beschrieben (Eskelinen et al. 2002). LAMP-2A fungiert u. a. als Rezeptor und Mediator für die Chaperon-vermittelte und autophagozytische Aufnahme von zytosolischen Proteinen in das Lysosom (Cuervo und Dice 1996, 1998, 2000). Zudem spielt LAMP-2A eine Rolle bei der Präsentation zytosolischer Peptide über den MHC-II-Rezeptor (Zhou et al. 2005). Verschiedene Mutationen im Gen für LAMP-2 konnten mit der Danon-Erkrankung in Verbindung gebracht werden (Nishino et al. 2000). Die Danon-Erkrankung wurde erstmals als „Lysosomale Glykogenspreichererkrankung mit normaler Aktivität der sauren α -1,4-Glukosidase“ beschrieben und manifestiert sich in Form einer Kardiomyopathie, Myopathie und mentalen Retardierung (Danon et al. 1981). Für LAMP-2C ist noch keine Funktion beschrieben.

4.2 Nachweis der subzellulären Lokalisation

4.2.1 Expression und Aufreinigung des 66.3-kDa-Proteins

Prinzipiell können Proteine mit wenig Aufwand und in großer Menge rekombinant in prokaryotischen Systemen synthetisiert und aufgereinigt werden. In diesen Systemen sind jedoch co- und posttranslationale Modifikationen, wie N-Glykane oder M6P-Reste, sowie die Bildung von Disulfidbrücken nicht möglich (vgl. Kap. 1.2). Da diese Modifikationen für lysosomale Proteine und Proteine des sekretorischen Weges von besonderer Bedeutung sind, wurde das 66.3-kDa-Protein in einem eukaryotischen Zellsystem exprimiert, in dem das Protein zum überwiegenden Teil in das Zellkulturmedium sezerniert wurde.

Die in den Vorarbeiten von Kollmann et al. (2005) etablierte Aufreinigung des V5-His6-markierten 66.3-kDa-Proteins aus BHK-Zellen ergab vergleichsweise geringe Proteinmengen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die cDNA als RGS-His6-Variante in den pcDNA3.1/Hygro-Vektor kloniert. Diese RGS-His6-Variante wurde stabil in HT1080 transfiziert und ein Einzelklon (HT1080-66) isoliert, der gegenüber dem alten Expressionssystem eine etwa sechsfach höhere Sekretion des Proteins in den Zellkulturüberstand aufwies (vgl. Abb. 3-1). Aus dem Zellkulturüberstand von HT1080-66 konnten etwa 0,25 mg/l 66.3-kDa-Protein durch eine zweistufige chromatographische Aufreinigung mittels Ni-NTA und Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt werden (vgl. Abb. 3-2 und Abb. 3-3).

Bei der qualitativen Analyse der Proteinaufreinigung im Silbergel konnten zwei dominante Proteinfragmente mit Molekulargewichten von 75 kDa und 40 kDa, sowie zwei weitere Proteinfragmente mit Molekulargewichten von 66 kDa und 28 kDa nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3-3). Das 75-kDa-Vorläufer-Fragment ist die Proform des Proteins und geht durch die

Abspaltung des Signalpeptids (AS 1-46) aus der Prä-Proform hervor. Die übrigen Fragmente entstehen durch limitierte Proteolyse der Proform. Alle vier Formen konnten durch die N-terminale Sequenzierung als Fragmente des 66.3-kDa-Proteins identifiziert werden (vgl. Abb. 3-5 und Abb. 3-6), wobei die Proform und die Fragmente mit 66 kDa und 28 kDa N-terminal erst mit der Aminosäure Leu47 beginnen und damit nicht mit Aminosäure Pro42, wie von Kollmann et al. (2005) anhand bioinformatischer Analysen postuliert.

Zur weiteren Charakterisierung des endogenen bzw. des rekombinanten Proteins wurde das aufgereinigte, rekombinante 66.3-kDa-Protein zur Generierung eines Antiserums in Kaninchen genutzt. Das 66-Antiserum detektierte die verschiedenen Fragmente des 66.3-kDa-Proteins in der Western-Blot-Analyse (vgl. Abb. 3-4) und konnte auch für den Nachweis der lysosomalen Lokalisation des Proteins durch indirekte Immunfluoreszenz (vgl. Abb. 3-9) und für die Immunpräzipitation des metabolisch markierten 66.3-kDa-Proteins verwendet werden (vgl. Abb. 3-17 und Abb. 3-18). Neben den schon bekannten Fragmenten des 66.3-kDa-Proteins detektierte das 66-Antiserum ein zuvor nicht beschriebenes 15-kDa-Fragment. Mit der N-terminalen Sequenzierung konnte bestätigt werden, dass es sich um ein Fragment des 66.3-kDa-Proteins handelt, das mit AS 514 beginnt. Zudem konnte das 15-kDa-Fragment mit dem α -His-Antikörper detektiert werden, so dass dieses Fragment C-terminal nicht prozessiert wurde (vgl. Abb. 3-5). Mit dem 66-Antiserum ist zudem ein \sim 40-kDa Polypeptid im Western Blot (vgl. Abb. 3-8) und der Immunpräzipitation (vgl. Abb. 3-17) zu detektieren, das nicht dem 66.3-kDa-Protein zugeordnet werden kann. Aufgrund der Ergebnisse des zugehörigen Präimmuserums wurde diese Interaktion als Kreuzreaktion beschrieben (vgl. Abb. 3-8 und Abb. 3-11).

4.2.2 Lysosomale Lokalisation des 66.3-kDa-Proteins

Das 66.3-kDa Protein besitzt mit dem Signalpeptid und mehreren N-Glykosylierungsstellen die Eigenschaften eines lysosomalen Matrixproteins. Mittels Immunfluoreszenz mit dem 66-Antiserum konnte erstmals das endogene 66.3-kDa-Protein in Lysosomen von MEF durch die Co-Lokalisation mit LAMP-1-markierten Lysosomen und mit dem lysosomalen Matrixprotein Cathepsin D gezeigt werden (vgl. Abb. 3-9). Bei der subzellulären Fraktionierung von Mausleberhomogenaten wurde das 66.3-kDa-Protein in der lysosomalen Fraktion zusammen mit den lysosomalen Proteinen β -Hexosaminidase, β -Glucuronidase, LAMP-1 und Cathepsin D angereichert und co-fraktioniert (vgl. Abb. 3-11 und Tab. 3-2). Anhand dieser beiden Methoden konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei dem 66.3-kDa Protein um ein lysosomal lokalisiertes Protein handelt. In einer Analyse des humanen homologen Proteins (p76) und des

murinen Proteins konnten Jensen et al. (2007) die Ergebnisse durch die Immunfluoreszenz bzw. die subzelluläre Fraktionierung bestätigen.

4.3 Molekulare Charakterisierung des 66.3-kDa-Proteins

4.3.1 Gewebesspezifische Expression des 66.3-kDa-Proteins

Bei der Northern-Blot-Analyse verschiedener Mausgewebe wurden mit einer *full-length*-Sonde des 66.3-kDa-Proteins drei Transkripte zwischen 2 kb und 4 kb detektiert (vgl. Abb. 3-7). Dabei variieren sowohl die Stärke der Transkription in den untersuchten Geweben als auch die relativen Mengen der drei Transkripte untereinander. Auf Proteinebene fallen bei der Western-Blot-Analyse verschiedener Mausgewebe 66.3-kDa-Protein-Fragmente verschiedener Größen in einer gewebsspezifischen Verteilung und einer gewebespezifischen Expressionshöhe auf (vgl. Abb. 3-8). So wurden in Gehirn-, Herz- und Milzgewebe Proteine bei 50, 34 bzw. 24 kDa detektiert, während in Hoden-, Leber- und Nierengewebe nur sehr schwache oder keine Signale des 66.3-kDa-Proteins zu detektieren waren. Dagegen konnte nach 40- bis 60-facher Anreicherung von Lysosomen aus Leberhomogenat nach der subzellulären Fraktionierung das 28- und 15-kDa-Fragment detektiert werden, so dass davon auszugehen ist, dass die Expression in der Leber unterhalb der Nachweisgrenze unserer Western Blots lag (vgl. Abb. 3-11).

Die beschriebene gewebsspezifische Expression und Prozessierung unterscheidet das 66.3-kDa-Protein von den meisten anderen lysosomalen Proteinen und könnte auf gewebespezifische Funktionen des Proteins hinweisen. Für ein anderes lysosomales Protein, die lysosomale Serin-Protease Cathepsin A, wurde zuvor eine solche gewebespezifische Transkription (Galjart et al. 1990) und Expression beschrieben (Luedtke et al. 2000). In Northern-Blot-Analysen lassen sich für das Cathepsin A in allen untersuchten Mausgeweben Transkripte mit sehr unterschiedlicher Transkriptionshöhe nachweisen. Während in der Niere und der Plazenta sehr große Mengen eines 2 kb großen Transskriptes vorkommen, sind es im Hoden sehr geringe. Zusätzlich findet sich ein mittleres Transkript im Gehirn und ein wesentlich größeres in Gehirn und Niere (Galjart et al. 1990). In licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte für das Hoden- und Nebenhodengewebe (*R. norvegicus*) eine ausgeprägte zellspezifische Expression beschrieben werden. So konnten Cathepsin A in Sertoli- und Leydig-Zellen, nicht aber in Keimzellen nachgewiesen werden (Luedtke et al. 2000).

Die lysosomale Serin-Protease Cathepsin A besitzt neben ihrer Carboxypeptidaseaktivität bei pH 5,6, Esterase- und Deamidaseaktivität bei neutralem pH (Itoh et al. 1993). Darüber hinaus aktiviert und stabilisiert Cathepsin A die Neuraminidase (van der Spoel et al. 1998) und fungiert

als so genanntes „protektives Protein“ in einem Multienzymkomplex aus β -Galaktosidase und Neuraminidase (D'Azzo et al. 1982; Hoogeveen et al. 1983; Morreau et al. 1992). Eine Defizienz von Cathepsin A führt zu der lysosomalen Speichererkrankung Galaktosialidose, die durch eine mangelnde Aktivität von β -Galaktosidase und Neuraminidase gekennzeichnet ist (D'Azzo et al. 1982). Das 66.3-kDa-Protein weist in Expression und Prozessierung Ähnlichkeiten zu Cathepsin A auf und so besteht die Möglichkeit, dass das 66.3-kDa-Protein ebenfalls multiple Funktionen ausführen könnte. Ein Protein, das verschiedene Funktionen ausübt, interagiert möglicherweise mit unterschiedlichen Bindungspartnern. Über die Identifizierung von Bindungspartnern könnten somit wichtige Hinweise auf mögliche Funktionen des 66.3-kDa-Proteins gefunden werden (vgl. auch Kap. 4.4).

4.3.2 Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins

Durch Immunpräzipitation nach metabolischer Markierung konnte die Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins in HT1080-66 und in 3T3-Zellen verfolgt werden (vgl. Abb. 3-17, Abb. 3-18). Durch die N-terminale Sequenzierung (Edmann-Abbau) wurden die N-terminalen Aminosäuren aller Fragmente und durch die Western-Blot-Analyse mit dem α -His-Antikörper die C-terminalen Aminosäuren für die Fragmente mit 75-, 40- und 15 kDa bestimmt (vgl. Abb. 3-5). Die Analyse dieser Ergebnisse spricht für folgenden Ablauf einer Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins in HT1080-66. Bei der Translation und Translokation des Proteins ins Lumen des ER wird das 46 Aminosäuren lange Signalpeptid von der Prä-Proform des Proteins abgespalten und es entsteht die 75-kDa-Proform. Diese Proform wird in ein N-terminales 28-kDa-Fragment und ein C-terminales 40-kDa-Fragment prozessiert. Durch weitere Proteolyse aus dem C-terminalen 40-kDa-Fragment wird das C-terminale 15-kDa-Fragment prozessiert (vgl. Abb. 3-6).

Unsere Ergebnisse stehen denen von Jensen et al. (2007) gegenüber, die mit einem Peptidantikörper, der gegen den C-Terminus des homologen Proteins in der Ratte gerichtet ist (*Accession-No.* AAM23313), ein C-terminales 27-kDa-Fragment in stabil exprimierenden HeLa-Zellen und in M6P-aufgereinigten Proteinen aus murinem Hirngewebe nachweisen. Jensen et al. (2007) schlagen für das 66.3-kDa-Protein daher eine Prozessierung von der 76-kDa-Proform zu einem C-terminalen 40-kDa-Fragment vor, aus dem wiederum in einem proteolytischen Schritt ein C-terminales 27-kDa-Fragment entsteht. Weder das N-terminale 27-kDa-Fragment noch das C-terminale 15-kDa-Fragment des murinen Proteins wurde von Jensen et al. beschrieben. Für das humane homologe Protein, p76, beschreiben die Autoren eine Prozessierung der Vorläuferform (80 kDa) in ein N-terminales 32-kDa-Fragment und ein C-terminales 45/50-kDa-

Fragment (Jensen et al. 2007). Es wird kein Äquivalent zu dem murinen 15-kDa-Fragment beschrieben. Für das murine 66.3-kDa-Protein kann die von Jensen et al. (2007) vorgeschlagene Prozessierung durch die hier vorliegenden Ergebnisse widerlegt werden. Zum einen wurde das 28-kDa-Fragment durch die von Kollmann et al. (2005) durchgeführte Massenspektrometrie als N-terminales Ende der Vorläuferform definiert (vgl. Kap. 1.5.2 und Tab. 6-1) und zum anderen wurde es durch die N-terminale Sequenzierung des rekombinant entstandenen Proteins identifiziert (vgl. Abb. 3-5). In Deglykosylierungsversuchen konnte zudem gezeigt werden, dass die drei putativen Glykosylierungsstellen des murine 28-kDa-Fragment genutzt werden (vgl. Abb. 3-13). Ein C-terminales Fragment mit drei N-Glykosylierungsstellen ist anhand der Aminosäuresequenz nicht abzuleiten. Das kleinste C-terminal-gelegene Fragment mit drei besetzten N-Glykosylierungsstellen wäre ein Fragment von AS 235 bis AS 521 und einer errechneten Größe von 36 kDa. Ein Fragment dieser Größe konnte weder von Jensen et al. noch in dieser Arbeit nachgewiesen werden.

Die Aufreinigung der einzelnen endogenen 66.3-kDa-Protein-Fragmente aus den murinen Geweben und deren massenspektrometrische Analyse bzw. N-terminale Sequenzierung könnte in weiterführenden Arbeiten diese Ergebnisse bestätigen.

4.3.3 Posttranslationale Modifikation des 66.3-kDa-Proteins

Das 66.3-kDa-Protein wurde hinsichtlich seiner Glykosylierung und der Bildung von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken untersucht. Im Western Blot von HT1080-66-Homogenaten konnte ein annähernd identisches Bandenmuster der 66.3-kDa-Protein-Fragmente unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen gezeigt werden (vgl. Abb. 3-12). Dies spricht dafür, dass einzelne Fragmente des Proteins nicht über Disulfidbrücken verbunden sind. Die limitierte Deglykosylierung mit PNGase-F zeigte, dass alle fünf putativen N-Glykosylierungsstellen (Position 93, 115, 236, 441, 520 der Aminosäuresequenz) in HT1080-66-Zellen genutzt werden (vgl. Abb. 3-13, Abb. 3-14).

In einer massenspektrometrischen Analyse zur Identifizierung von M6P-Markierungen an lysosomalen und potentiell lysosomalen Proteinen wurde gezeigt, dass das humane p76 fünf Endo-H-sensible N-Glykane besitzt (Sleat et al. 2006a). Endo- β -N-Acetylglukosaminidase-H (Endo-H) hydrolysiert bevorzugt N-Glykane mit Mannose-reichen Oligosaccharid-Seitenketten (Tarentino et al. 1974). Diese können wegen eines M6P-Restes nicht zu komplexen Oligosacchariden synthetisiert werden (Varki und Kornfeld S 1980, 1983). Im Vergleich zu anderen lysosomalen Proteinen besitzt p76 damit überdurchschnittlich viele Mannose-reiche Oligosaccharid-Seitenketten und potentielle M6P-Markierungen. Dies könnte zu einer

besonderen Spezifität der Bindung am MPR beitragen und zu einer erhöhten Effizienz beim Transport in das Lysosom führen.

4.4 Funktionelle Analyse des 66.3-kDa-Proteins

Die Funktion des murinen 66.3-kDa-Proteins ist gänzlich unbekannt. Wie in Kap. 4.1 beschrieben, wurde unter den homologen Proteinen lediglich für p67 in *D. dictyostelium* eine Phospholipase-B-Aktivität beschrieben. Die Arbeitsgruppe etabliert derzeit einen in-vivo-Assay zur Überprüfung dieser Aktivität des 66.3-kDa-Proteins in der Maus. Bislang konnte jedoch keine Phospholipase-B-Aktivität nachgewiesen werden (Lübke, 2008). Parallel dazu wurde ein *Knock-out*-Maus-Modell konzipiert (Lübke, 2008) mit dem u.a. eine Phospholipase-B-Aktivität *in-vivo* untersucht werden soll. Jensen et al. (2007) konnten in Phospholipase-B-Aktivitätsassays für das p76 ebenfalls keine Aktivität nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit sollten durch *RNAi* des 66.3-kDa-Proteins Hinweise auf seine Funktion erlangt werden. Zum anderen sollten über Affinitätschromatographie mit immobilisiertem 66.3-kD-Protein mögliche Interaktionspartner identifiziert und eine Interaktion dieser Proteine durch *in-vitro*-Co-Immunpräzipitation und *Yeast-Two-Hybrid* bestätigt werden.

Die *RNAi* eines Proteins auf zellulärer Ebene ist eine Methode, um die Auswirkungen einer selektiv induzierten Proteindefizienz auf den Stoffwechsel einer Zelle zu untersuchen (Elbashir et al. 2001; Fire et al. 1998; Tuschl 2001). In dieser Arbeit wurde eine stabile Transfektion der *RNAi*-Sequenz in 3T3-Zellen gewählt. In Western-Blot-Analysen konnte für das 66.3-kDa-Protein und die Serincarboxypeptidase-1 (als Kontrolle) eine Suppression der Protein-Expression von maximal 50 % nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Ursächlich für die geringe Suppression ist höchstwahrscheinlich die Wahl der *short-interference*-RNA (siRNA). Es existieren noch keine sicheren Vorhersagen für die Effizienz von siRNA (Campbell und Choy 2004). Um an Zellen Versuche zum Stoffwechsel durchführen zu können, wird eine Suppression von unter 10 % angestrebt und häufig erreicht. Da die *Knock-out*-Maus zeitnah zur Verfügung steht, wurde von weiteren *RNAi*-Versuchen in dieser Arbeit abgesehen.

4.4.1 Identifizierung von Bindungspartnern

Zur Identifizierung von Bindungspartnern des 66.3-kDa-Proteins wurde eine Fraktion hoch angereicherter lysosomaler Proteine mit immobilisiertem 66.3-kDa-Protein in saurem pH inkubiert und potentielle Bindungspartner mit schrittweise steigenden Salzkonzentrationen eluiert. Die eluierten Proteine wurden massenspektrometrisch analysiert (vgl. Abb. 3-19, Abb. 3-20 und Tab. 3-3). Unter den identifizierten Proteinen waren für den experimentellen Ansatz

typische Kontaminanten, wie humanes Keratin oder bovines Serum-Albumin, die wahrscheinlich aus der Vorinkubation mit einer BSA-Säule resultierten. Vier Proteine aus der Maus wurden identifiziert: die drei zytoplasmatischen Proteine, *Partitioning-defective protein 3 homolog isoform 1 (Par3)*, *Glial fibrillary acidic protein (GFAP)* und *Outer-Dense-Fiber-21 (Odf21)* und das lysosomale Protein Cathepsin D. Für *Par3* wurden bislang verschiedene Funktionen beschrieben. So ist es in *C. elegans* für die asymmetrische Zellteilung während der Embryogenese essentiell (Kemphues et al. 1988). Eine jüngere Arbeit beschreibt *Par3* als Teil eines Multienzymkomplexes, der die Entwicklung von Cilien in Säugerzellen steuert (Sfakianos et al. 2007). Das *GFAP* ist ein Intermediärfilament-Protein und an der Bewegung und Struktur von Gliazellen, insbesondere den Astrozyten, beteiligt und wird bei der Astroglieose überexprimiert (Eng LF et al. 2000). Die Funktion von *Odf21* ist bislang nicht bekannt.

Aufgrund ihres extra-lysosomalen Vorkommens und der Detektion in jeweils nur einem der beiden affinitätschromatographischen Versuche (V1 oder V2) wurde eine Interaktion dieser murinen Proteine mit dem 66.3-kDa-Protein als unwahrscheinlich angesehen. Lediglich Cathepsin D konnte in allen drei Versuchen (V1-V3) reproduzierbar detektiert werden. Cathepsin D ist zudem ein lysosomales Protein, so dass ein erster Hinweis auf eine Proteininteraktion des 66.3-kDa-Proteins mit Cathepsin D erbracht wurde.

Cathepsin D ist ein in Eukaryoten konserviertes, ubiquitär vorkommendes Protein und katalysiert die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen. Cathepsin D ist eine Endopeptidase und wird aufgrund von zwei katalytisch aktiven Aspartatresten im aktiven Zentrum zu den Aspartatpeptidasen (A1-Familie) gezählt. Das aktive Zentrum von Cathepsin D besitzt eine hohe Affinität zu hydrophoben Aminosäuresequenzen aus fünf Aminosäuren (Conner 2002). Das pH-Optimum von Cathepsin D liegt bei 3,5 (Bond und Butler 1987). Das N-acylierte Pentapeptid Pepstatin A bindet mit hoher Affinität im aktiven Zentrum von Cathepsin D und inhibiert dessen Funktion (Morishima et al. 1970). Procathepsin D (53 kDa) wird lysosomal teils durch Cysteinpeptidasen und teils autoproteolytisch über eine Zwischenstufe (47 kDa) zu nicht-kovalent verknüpftem, enzymatisch aktivem Cathepsin D (31 kDa und 15 kDa) aktiviert (Gieselmann et al. 1983). Neben seiner Funktion als Endopeptidase beim allgemeinen lysosomalen Proteinabbau spielt Cathepsin D eine wichtige Rolle bei der Apoptose. Auf der einen Seite ist Cathepsin D ein Mediator der durch TNF- α , FAS/APO1 und Interferon- γ induzierten Apoptose und kann bei entsprechender Überexpression in Hela-Zellen zum früheren Zelltod führen (Deiss et al. 1996). Auf der anderen Seite aber führt die Defizienz von Cathepsin D in Photorezeptorzellen von Cathepsin-D-Knock-out-Mäusen zur frühzeitigen

Apoptose (Koike et al. 2003). Zudem wurde Cathepsin D eingehend zu seiner Rolle bei der Proliferation (Glondou et al. 2002), Angiogenese (Berchem et al. 2002) und Metastasierung (Garcia et al. 1990) des Mammakarzinoms untersucht.

Cathepsin-D-*Knock-out*-Mäuse entwickeln sich bis zur zweiten Lebenswoche normal. Nach 14 Tagen ist eine Atrophie der Mukosa des Ileums festzustellen, die sich zu einer fulminanten nekrotisierenden Enteritis mit vermehrten Thromboembolien entwickelt. Zudem kommt es zu einem nekrotisierenden Abbau von Milz und Thymus und einem Verlust von T- und B-Zellen in lymphatischem Gewebe. Die Mäuse sterben mit 26 ± 1 Tagen an den Auswirkungen dieser Symptome (Saftig et al. 1995). Cathepsin D scheint damit eine wichtige Rolle bei der Umwandlung der neonatalen zur adulten Schleimhaut zu spielen. Die proteolytische Aktivität von den Fibroblasten Cathepsin-D-defizienter Mäuse war nicht eingeschränkt, was darauf schließen lässt, dass die Endopeptidaseaktivität von Cathepsin D von anderen Proteinen übernommen werden kann (Saftig et al. 1995).

Es besteht die Möglichkeit, dass Cathepsin D als Aspartatpeptidase eine Rolle bei der Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins spielt. Aus diesem Grund wurde versucht, aufgereinigtes 66.3-kDa-Protein mit aktiviertem Cathepsin D zu prozessieren, bzw. die Prozessierung in MEF und in Cathepsin-D-defizienten MEF durch Immunpräzipitation zu vergleichen und die subzelluläre Verteilung des 66.3-kDa-Proteins in der Immunfluoreszenz zu untersuchen (vgl. Abb. 3-23 und Abb. 3-24). Da bei der *in-vitro*-Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins keine Prozessierung durch Cathepsin D detektiert werden konnte und auch die subzelluläre Verteilung in Kontroll-MEF und in Cathepsin-D-defizienten MEF identisch war, kann davon ausgegangen werden, dass Cathepsin D keine essentielle Rolle bei der Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins einnimmt. Bei der metabolischen Markierung konnte eine leicht verzögerte Prozessierungskinetik des 66.3-kDa-Proteins in Cathepsin-D-defizienten MEF festgestellt werden (vgl. Abb. 3-23).

Um die Protein-Protein-Interaktion zwischen Cathepsin D und dem 66.3-kDa-Protein mit einer zweiten, unabhängigen Methode zu bestätigen, wurden Co-Immunpräzipitationen in HT1080-66 mit dem 66-Antiserum durchgeführt. Bei der Detektion von Cathepsin D mit dem Cat-D-Antiserum (Kaninchen) wurden die Cathepsin-D-Fragmente (31, 47- und 53 kDa) von den überstrahlenden Signalen der leichten (~ 25 kDa) und schweren (~ 50 kDa) Ketten der Immunglobuline des Immunpräzipitationsantikörpers (66-Antiserum) überlagert. Alternativ zur Co-Immunpräzipitation wurde Pepstatin A als bekannter Bindungspartner von Cathepsin D (s.o.) immobilisiert und mit einer Fraktion 50-fach angereicherter lysosomaler Proteine (F2,

subzelluläre Fraktionierung) inkubiert. Allerdings konnte das 66.3-kDa-Protein nicht als Komplex mit Cathepsin D über Pepstatin A co-präzipitiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Mit der *Y2H*-Methode wurde die potentielle Proteininteraktion zwischen dem Cathepsin D und dem 66.3-kDa-Protein bzw. Fragmenten des 66.3-kDa-Proteins untersucht. Die Protein-Protein-Interaktion bei *Y2H*-Versuchen finden bei etwa neutralen pH-Bedingungen im Zellkern der Hefen statt, da dort die entsprechenden Transkriptionsfaktoren reassembliert werden und an die DNA binden können. Trotz dieses für lysosomale Proteine unphysiologischen pH-Wertes wurden bereits erfolgreich lysosomale Protein-Protein Interaktionen mit *Y2H* nachgewiesen (Liu et al. 2006a; Liu et al. 2006b; Ye et al. 2005). Die cDNA der einzelnen Fragmente des 66.3-kDa-Proteins (Prä-Proform, Proform, 40-, 30-, 15-kDa und ein Mittelfragment) sowie die cDNA von Cathepsin D wurden in das entsprechende *Y2H*-Vektorensystem kloniert.

Im *Y2H* konnte ein weiterer Hinweis einer schwachen Interaktion zwischen Cathepsin D und dem 28-kDa- und 15-kDa-Fragment des 66.3-kDa-Proteins geführt werden, jedoch nicht mit der Proform des 66.3-kDa-Proteins (vgl. Abb. 3-21). Dies kann einerseits darin begründet sein, dass unter den gegebenen Bedingungen nur diese Fragmente und nicht die Proform reagieren. Andererseits könnten bei der Affinitätschromatographie nicht die Proform des 66.3-kDa-Proteins sondern auch die bei der Aufreinigung des rekombinanten Proteins co-aufgereinigten 28-kDa- und 15-kDa-Fragmente (vgl. Abb. 3-3) das Cathepsin D gebunden haben. In weiteren *Y2H*-Versuchen muss die Interaktion der beiden Fragmente genauer untersucht werden. Dazu gehören einerseits weitere Negativkontrollen mit den interagierenden Fragmenten und dem komplementären, leeren *bait*- oder *prey*-Vektor und andererseits weitere Interaktionen mit Teilen der interagierenden Fragmente, um die Bindungsstellen des 66.3-kDa-Proteins zu identifizieren. Zudem sollte über mindestens eine weitere Methode die Interaktion unter lysosomalen pH-Bedingungen verifiziert werden. Dies ist mit dem *Y2H*-Vektorensystem z.B. auch durch eine Co-Immunpräzipitation nach einer *in-vitro*-Translation mit radioaktiver Markierung des Proteins möglich, bei der nicht die zuvor genannte Problematik der Detektion nach einfacher Co-Immunopräzipitation bestünde.

4.5 Ausblick

An die molekulare Charakterisierung des 66.3-kDa-Proteins wird sich nun eine intensive funktionelle Charakterisierung anschließen. In dieser Arbeit konnte bereits über eine affinitätschromatographische Interaktion Cathepsin D als möglicher Interaktionspartner identifiziert werden. Dieser Hinweis wurde zudem in den *Y2H*-Versuchen durch die Interaktion zwischen Cathepsin D und den 28-kDa- und 15-kDa-Fragmenten bestätigt. In weiteren Versuchen sollte die Interaktion unter physiologischen Bedingungen, d.h. bei lysosomalem pH-Wert bestätigt werden. Dies könnte z.B. durch eine Immunpräzipitation des Komplexes nach Behandlung mit einem membrangängigen *Crosslinkers* bzw. über die Immunopräzipitation aufgereinigter, rekombinanter Fragmente *in vitro* geschehen.

Das *Knock-out*-Maus-Modell befindet sich derzeit in einem Stadium, in dem in absehbarer Zeit die ersten funktionellen Untersuchungen an diesen Tieren und ihren Geweben durchführbar sind. So sind Wachstums- und Entwicklungsstudien ebenso wie die biochemischen und histologischen Analysen von Geweben, Zellen und Organellen geplant. Über diesen „*reverse-genetic-approach*“ soll die Funktion des 66.3-kDa-Proteins identifiziert werden. Sollte der *Knock-out* des Proteins einen pathologischen Phänotyp aufweisen, so sollten humane Erkrankungen unbekannter Ätiologie mit diesem Phänotyp in Verbindung gebracht werden. Für eine Reihe lysosomaler Enzyme wurden bereits Mausmodelle für LSDs etabliert, an denen der pathophysiologische Mechanismus und eine mögliche Therapie untersucht werden.

Ein weiterer Ansatz zur Analyse der Funktion könnte die Kristallisation des Proteins und die anschließende Strukturanalyse anhand von Röntgen-Beugungsmustern sein. Ein dreidimensionales Modell der Proteinstruktur könnte über Vergleiche mit Datenbanken Hinweise auf eine Funktion des Proteins oder einzelner Domänen ermöglichen.

Die gewebespezifische Expression des 66.3-kDa-Proteins ist für lysosomale Proteine ungewöhnlich. Daher wäre die genaue Analyse der einzelnen Fragmente aus Gehirn (50 kDa), Lunge (34 kDa) und Milz (24 kDa) von Interesse. Eine Aufreinigung der Fragmente aus murinem Gewebe und die N-terminale Sequenzierung würden Rückschlüsse auf ihre Lokalisation im Gesamtprotein zulassen. In diesem Zusammenhang wäre auch die Synthese von Peptidantikörpern bzw. monoklonalen Antikörpern für die selektive Detektion der einzelnen Fragmente (40 kDa, 28 kDa und 15 kDa) vorzunehmen.

5 Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der Arbeit steht das murine 66.3-kDa-Protein, das erstmals von Kollmann et al. (2005) im Rahmen einer Proteomanalyse als putativ lysosomales Matrixprotein beschrieben wurde. Erste Hinweise auf eine lysosomale Lokalisation ergaben sich mit dem Nachweis der M6P-abhängigen Internalisierung einer C-terminal markierten Form des 66.3-kDa-Proteins in Kontrollfibroblasten und dessen Transport in Lysosomen (Kollmann et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit gelang es, das 66.3-kDa-Protein stabil in HT1080-Zellen zu exprimieren, es für analytische Zwecke aus dem Zellkulturmedium aufzureinigen und ein Antiserum gegen das 66.3-kDa-Protein herzustellen. Das endogene 66.3-kDa-Protein konnte sowohl in Lysosomen überexprimierender HT1080-Zellen als auch in einer Fraktion angereicherter lysosomaler Proteine den lysosomalen Matrixproteinen zugeordnet werden. Das 66.3-kDa-Protein wird in stabil-exprimierenden-HT1080-Zellen aus einer Proform von 75 kDa in ein C-terminales 40-kDa-Fragment und ein N-terminales 28-kDa-Fragment prozessiert. Durch limitierte Proteolyse erfolgt vom C-terminalen 40-kDa-Fragment die Abtrennung eines C-terminalen 15-kDa-Fragmentes. Da das 28-kDa- und das 15-kDa-Fragment bei der subzellulären Fraktionierung in der lysosomalen Fraktion nachgewiesen werden konnten, handelt es sich wahrscheinlich um die aktiven Formen des Proteins. Es wurde gezeigt, dass die einzelnen Fragmente des Proteins nicht über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und dass alle fünf putativen N-Glykosylierungsstellen in HT1080-66 mit N-Glykanen besetzt sind. Im Northern Blot konnten drei Transkripte zwischen 2 kb und 4 kb Größe detektiert werden. Dabei variieren sowohl die Höhe der Transkripte in den untersuchten Geweben als auch die relativen Mengen der drei Transkripte untereinander im jeweiligen Gewebe. Zudem fallen auf Proteinebene bei der Western-Blot-Analyse verschiedener Mausgewebe unterschiedliche Größen gewebespezifischer Varianten des 66.3-kDa-Proteins und eine gewebespezifische Expressionshöhe auf. So wurden in Gehirn-, Herz- und Milzgewebe Fragmente bei entsprechend 50, 34 bzw. 24 kDa detektiert, während in Hoden-, Leber- und Nierengewebe nur sehr schwache oder keine Signale des 66.3-kDa-Proteins zu detektieren waren.

Bei der Affinitätschromatographie von hoch angereicherten lysosomalen Proteinen an immobilisiertem 66.3-kDa-Protein konnte Cathepsin D als ein möglicher Bindungspartner des 66.3-kDa-Proteins identifiziert werden. Dieses Ergebnis wurde durch eine Interaktion zwischen Cathepsin D und dem 28-kDa- bzw. 15-kDa-Fragment des 66.3-kDa-Proteins in *Y2H*-Analysen bestätigt. Eine Prozessierung des 66.3-kDa-Proteins durch Cathepsin D konnte ausgeschlossen

werden. Über das parallel zu dieser Arbeit generierte *Knock-out*-Maus-Modell werden in Kürze erste Ergebnisse von Wachstums- und Entwicklungsstudien sowie biochemische und histologische Analysen von Geweben, Zellen und Organellen verwertbar sein, die bei der funktionellen Analyse des 66.3-kDa-Proteins helfen können.

6 Anhang

6.1 Ergebnis der Proteomanalyse von Kollmann et al. (2005)

Tab. 6-1: Ergebnis Proteomanalyse

Proteins	gi number	Theoretical M_r ($\times 10^3$)	2D-GE number of spots (spot #)	MudPIT: number of unique peptides (length of peptides in amino acids)	Sequence coverage in MudPIT
Known lysosomal matrix proteins:					
α -D-mannosidase-acidic	1914843	112	4 (1,2,29,30)	4 (9,13,14,14)	5 %
α -L-fucosidase	12832063	52	1 (140)	---	---
α -glucosidase	20913867	106	4 (37→40)	3 (11,12,13)	3 %
α -N-acetyl-galactosaminidase	3327016	47	5 (13,116,117,124,194)	4 (9,10,11,17)	11 %
α -N-acetylglucosaminidase	3329361	83	4 (48→51)	7 (8,8,8,11,13,13,13)	10 %
acid ceramidase	9790019	45	---	5 (10,11,11,14,17)	16 %
acid lipase I, lysosomal	11496259	46	---	2 (10,11)	5 %
arylsulfatase A	1703420	54	1 (198)	6 (6,6,8,9,11,16)	11 %
arylsulfatase B	33302601	43	8 (6,10,58→62,87)	3 (7,11,13)	8 %
β -galactosidase	192185	73	12 (5,41→47,106,150,159,171)	2 (12,13)	4 %
β -glucuronidase	309257	74	9 (7,25→28, 63→66)	4 (6,11,13,15)	7 %
β -hexosaminidase alpha	232255	61	34 (11,12,71→83,88→91,106→113,130,154,174,195,196,198,199)	3 (7,8,13)	5 %
β -hexosaminidase beta	1346280	61	10 (92→99,151,193)	4 (8,10,10,16)	8 %
β -mannosidase	13310141	101	6 (3, 32→36)	1 (12)	2 %
cathepsin B	6681079	37	4 (14,152,195,197)	5 (8,10,11,13,14)	17 %
cathepsin C / DPP-I	31560607	52	10 (131→140)	10 (6,7,7,8,8,10,12,12,14,14)	21 %
cathepsin D	115718	45	10 (141→149,151)	5 (9,10,10,10,18)	14 %
cathepsin F	4826565	52	---	1 (15)	3 %
cathepsin L	200501	38	6 (168→170,172,183,186)	3 (10,16,16)	13 %
cathepsin Z	11066226	34	9 (15,16,18→20,155→158)	5 (9,10,11,12,17)	19 %
ceroid-lipofusc. neur. prot. 5	20881345	39	1 (141)	---	---
deoxyribo nuclease II	6753654	39	2 (160,161)	1 (9)	3 %
dipeptidyl peptidase II	13626390	56	7 (8,100→105)	3 (10,12,14)	7 %
galactocerebrosidase	2459856	76	---	1 (16)	2 %
legumain	7242187	49	3 (84→86)	1 (12)	3 %
N-acetyl-glucosamine-6-	29789239	61	7 (4,52→57)	13 (6,7,8,9,9,10,12,12,12,1)	27 %

Proteins	gi number	Theoretical M_r ($\times 10^3$)	2D-GE number of spots (spot #)	MudPIT: number of unique peptides (length of peptides in amino acids)	Sequence coverage in MudPIT
sulfatase neuraminidase 1	24496770	45	2 (115,123)	3,13,16,17	---
Niemann Pick type C2 prot. prosaposin	12963667	16	---	4 (7,11,12,16)	31 %
	1381582	61	---	12 (7,9,10,10,10,11,11,11,11,12,14,15)	24 %
protective protein for β-galactosidase	6679437	54	19(14,111 \rightarrow 114,122,125 \rightarrow 129,152,153,173 \rightarrow 175,189 \rightarrow 191)	5 (7,8,11,13,18)	12 %
ribonuclease 6	12858578	30	1 (176)	---	---
tripeptidyl peptidase I	12644085	61	1 (77)	---	---
cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG)	6753520	25	4 (23,24,184,185)	---	---
secreted α-mannosidase class 2B (M2B2)	6678792	116	4 (1,2,29,30)	3 (11,12,13)	4 %
Putative lysosomal matrix proteins:					
mammalian endymin related protein 2(MERP-2)	13562142	26	4 (21,22,174,175)	3 (11,11,18)	18 %
retinoid-inducible serine carboxypeptidase (RISC)	12852682	51	4 (118 \rightarrow 121)	6 (7,7,9,10,13,15)	14 %
hypothetical 66.3-kDa protein	12004583	66	17 (9,67 \rightarrow 70,162 \rightarrow 167,177 \rightarrow 181,200)	6 (7,8,9,12,12,13)	11 %
progranulin/epithelin	26384542	65	---	5 (7,10,13,13,14)	10 %
Non-lysosomal contaminants					
dynamin 2	6681207	98	1 (192)	---	---
unnamed protein product	26354020	20	---	2 (7,15)	12 %
similar to RIKEN cDNA 9030227G01	38081771	62	---	1 (8)	2 %
keratin complex 2, gene 17	38077188	121	---	2 (12,12)	2 %

Die Tabelle aus Kollmann et al. (2005, S. 3972) zeigt alle in der Proteomanalyse identifizierten Proteine.

6.2 Klonierung des 66.3-kDa-Proteins in HT1080

6.2.1 Primer

Klonierungsprimer:

Not-I-reverse:

Not-I Stop 6 x His S G R

5' - G TAC AGC GG C CGC TTA TCC GTG ATG GTG ATG GTG ATG CGA TCC TCT TCC -

66.3-kDa Sequenz -

-GTC CCA TGG CAC CCT GAT GGG - 3'

EcoR-V-forward:

EcoR-V

5' - GT ACA GAT ATC ATG GCG GCC CCC GTT GAT - 3'

Start

Sequenzierungsprimer:

Forward:

T7: 5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'

F3: 5' - GCA GCT GGT GTG GTG GAG G - 3'

F4: 5' - GCT GCT GCC TGG CGG GCA TG - 3'

F9: 5' - CAT TCC TCC CCA ACG GAC C - 3'

Reverse:

Hygro-reverse: 5' - TAG AAG GCA CAG TCG AGG - 3'

Abb. 6-1: Klonierungsprimer

Primer für die Klonierung des 66.3-kDa-Protein in den pcDNA-3.1-Hygro Vektor

6.2.2 Vektor

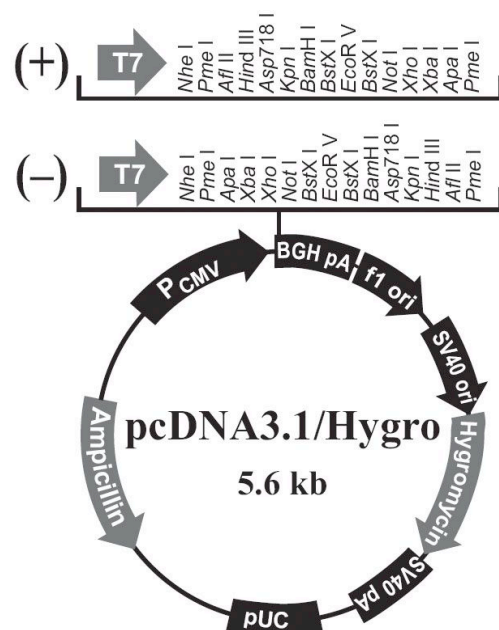


Abb. 6-2: pcDNA3.1/HYGRO-Vektor

(Invitrogen, Karlsruhe) Transfektionsvektor für 66.3-kDa-Protein-Sequenz in HT1080-Zellen.

6.3 Yeast-two-Hybrid

6.3.1 Vektorkarten

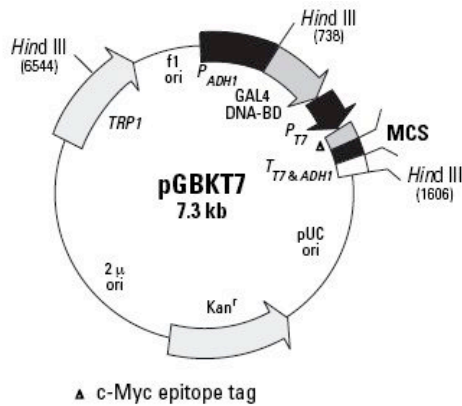


Abb. 6-3: pGBKT7-Vektor

(Clontech, Palo Alto, USA)



Abb. 6-4: pGBKT7-p53-Vektor

(Clontech, Palo Alto, USA)

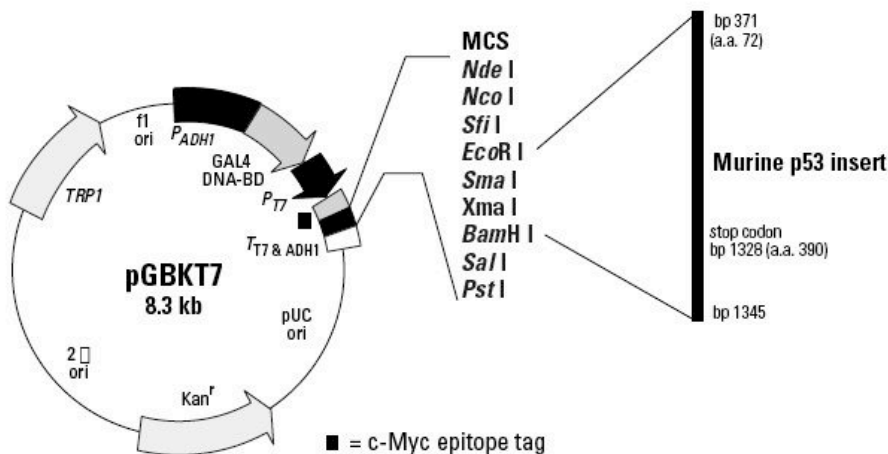


Abb. 6-4: pGBKT7-p53-Vektor

(Clontech, Palo Alto, USA)

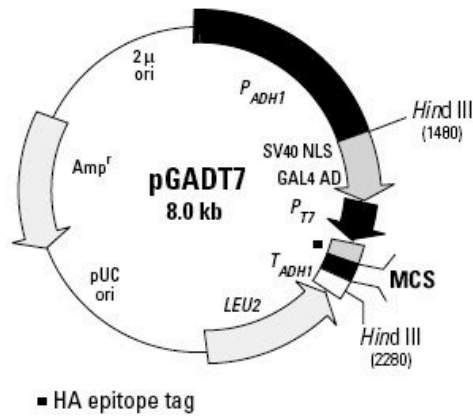


Abb. 6-5: pGADT7-Vektor
(Clontech, Palo Alto, USA)

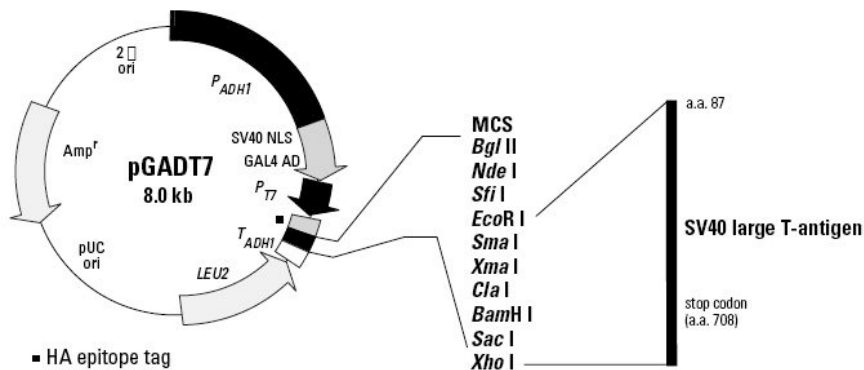
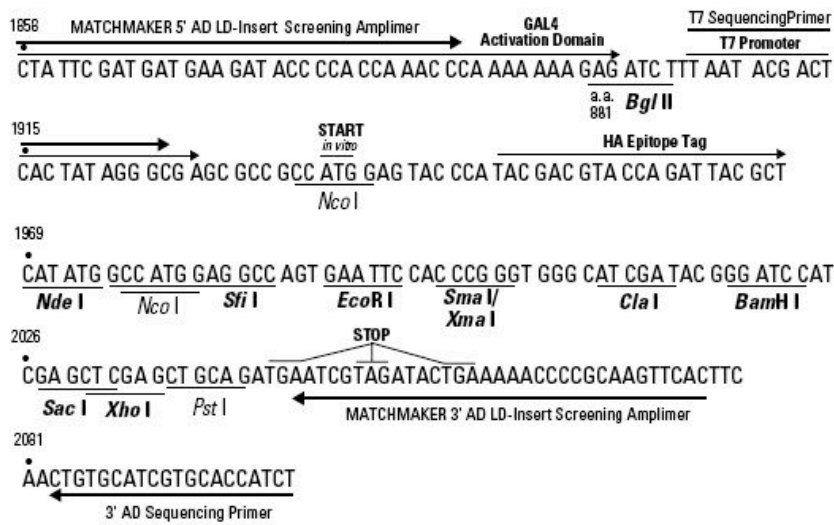


Abb. 6-6: pGADT7-SV40-
large-T antigen-Vektor
(Clontech, Palo Alto, USA)

6.3.2 *Yeast-two-Hybrid-Klonierung*

Tab.6-2: Primertabelle

	Primer Name	Primersequenz (5' nach 3')
Klonierungs- primer		
66.3-kDa- 66Protein Cathepsin D	A: 66-EcoR1-Met1-F	GAATTC ATGATGGCGGCCCGGCGTGGATGG
	B: 66-EcoR1-Leu47-F	GAATTC CTCCTACCCTGGGGCCCGGC
	C: 66-EcoR1-Cys249-F	GAATTC TGCTCTGCCCTCATCAAGCTGC
	D: 66-EcoR1-Ser514-F	GAATTC TCTGACCTCAACCCCGCCAATG
	E: 66-BamH1-Asp594-R	GGATCC TCAGTCCCATGGCACCCTGATG
	F: 66-BamH1-Arg513-R	GGATCC TCA GCGGGCAGAGATGGCATTCTC
	G: 66-BamH1-Ser248-R	GGATCC TCA TGAACCGGAGCCCAGGGAAG
	H: mCatD-Nde1-Met1-F	CATATG ATGAAGACTCCCGCGTCTTG
	J: mCatD-SAL1-STOP-R	GTCGAC TTAGAGTACGACAGCATTGGC
	Sequenzie- rungsprimer	
66.3-kDa- Protein Cathepsin D 66.3-kDa- Protein und Cathepsin D	E: 66BamH1-Asp594-R	GGATCC TCAGTCCCATGGCACCCTGATG
	F: 66-BamH1-Arg513-R	GGATCC TCA GCGGGCAGAGATGGCATTCTC
	G: 66-BamH1-Ser248-R	GGATCC TCA TGAACCGGAGCCCAGGGAAG
	J: mCatD-Sal1-STOP-R	GTCGAC TTAGAGTACGACAGCATTGGC
	K: T7-Sequenzig-Primer	TAATACGACTCACTATAGGGC
L: pGADT-3'R	pGADT-3'R AD-Sequenzig Primer (Matchmaker)	
M: pGBKT-3'R	pGBKT-3'R AD-Sequenzig Primer (Matchmaker)	

6.3.3 Sequenzvergleich des 66.3-kDa-Proteins mit homologen Proteinen

	(1)	10	20	30	40	50	60	70	80	90																																																																											
Mus musculus (1)	--MAAPVDGSSGWAARALRRALALTS	LTTL	LALLASLTLCLL	SGPAGAL	PTDGP	GMQRQNPDP	PVSRTRSL	LDAA	SGQLR	LEDGFHP-D																																																																											
Homo sapiens (1)	--MVGQMYCYPGSHL	ARALTRALALA	---	L-VLALLV	EPFL	SGLAGA	IPAPGG	RWARDG	QVPE	PASRSRSVLDV	SAGQLL	MVDGRHP-D																																																																									
Dictyostelium discoideum (1)	-----	MRVIRS	LLLL	LT	---	TAIT	SWLS	---	QSS	---	IDDGYT	VFFYS	QPDNY	VKPG	TFS-N																																																																						
Trypanosoma brucei (1)	MMCTAT	MMRTPE	SAVCLL	AAATL	PLS	---	TPVA	VR	EEV	LK	---	DATP	---	AVVT	VY	YNAT	SGG	FFATD	GLASGK																																																																		
Consensus (1)	M	A	V	SPGA	LARALRRALALT		L	LLAALIG	VLSG	AGAIP	G	W	RS	PP	SR	SR	SVLLD	ASSG	QLYL	DG	HS	D																																																															
	(91)	91	100	110	120	130	140	150	160	170	180																																																																										
Mus musculus (88)	AVAWANL	SN	AIRE	TG	WAF	LDL	STN	---	GR	NDS	LQ	YAA	GV	VE	AS	VSE	ELI	YH	HM	NT	VV	NYC	GP	F	E	Y	VG	C	E	K	L	K	N	F	L	E																																																	
Homo sapiens (83)	AVAWANL	SN	AIRE	TG	WAF	L	DL	STN	---	GQ	NDS	LQ	YAA	GV	VE	AA	VSE	ELI	YH	HM	NT	VV	NYC	GP	F	E	Y	VG	C	E	K	L	K	N	F	L	E																																																
Dictyostelium discoideum (48)	GVAQAL	IF	SN	EM	MT	TG	MS	ESSE	---	EL	PND	II	A	G	A	G	Y	L	E	G	Y	IS	Q	EM	L	W	Q	MM	MY	NN	---	EY	H	N	V	I	C	S	D	V	E	N	W	I	Q																																								
Trypanosoma brucei (66)	YAAI	WV	SM	TF	M	K	T	G	D	V	V	T	A	V	A	N	D	G	F	M	H	L	P	G	E	A	E	P	S	A	E	R	V	L	A	Y	K	A	V	F	G	E	G	A	T	Y	S	M	K	A	S	I	N	T	F	E	G	P	E	G	L	S	A	L	L	S	D	A	P	Q	A	H	W	I	E										
Consensus (91)	AVAWANL	SN	AIRE	TG	WAF	L	S	L	S	T	S	D		G	Y	N	D	S	L	Q	Y	A	A	G	V	V	E	A	V	S	E	L	I	Y	H	M	N	T	V	V	N	Y	C	G	P	F	E	Y	V	G	C	E	K	L	K	N	F	L	E																										
	(181)	181	190	200	210	220	230	240	250	260	270																																																																										
Mus musculus (166)	ANLE	MMQ	RE	ME	SN	PD	---	SP	Y	W	Q	V	R	L	T	L	Q	L	K	G	L	E	D	S	Y	E	R	L	T	F	F	---	T	R	F	T	I	K	P	L	G	F	L	L	Q	I	S	G	D	L	E	L	E	P	A	L	N	K	T	N	I	K	---																						
Homo sapiens (161)	ANLE	MMQ	RE	ME	SN	PD	---	SP	Y	W	Q	V	R	L	T	L	Q	L	K	G	L	E	D	S	Y	E	R	V	S	F	F	---	A	S	K	F	T	I	K	P	L	G	F	L	L	Q	I	S	G	D	L	E	L	E	P	A	L	N	K	T	K	T	---																						
Dictyostelium discoideum (122)	ENL	Q	Y	L	I	M	I	D	S	A	P	S	N	D	L	Y	M	V	E	T	V	I	T	I	T	Y	M	Q	R	G	V	Q	S	V	I	D	N	G	V	D	A	S	Q	S	L	G	I	T	E	F	E	L	M	N	D	G	M	I	D	L	G	P	A	L	N	G	I	N	G	Q	W	T	S	P	A	T	A	T	S	P					
Trypanosoma brucei (155)	E	H	V	R	Y	M	A	A	K	F	E	S	S	A	---	F	Y	T	Q	L	R	N	M	L	A	L	I	D	H	V	A	G	N	A	R	A	P	A	D	---	E	R	L	D	R	M	K	L	M	Y	N	M	Q	A	E	I	G	D	V	R	A	T	S	P	A	E	V	L	D	D	M	R	---												
Consensus (181)	ENLE	MMQ	RE	ME	SN	PD	---	SP	Y	W	Q	V	R	L	T	L	Q	L	K	G	L	E	D	S	Y	E	R	V	S	F	F	---	G	K	F	T	I	K	P	L	G	F	L	L	N	M	S	G	D	L	E	L	E	P	A	L	N	K	T	N	I	K	---																						
	(271)	271	280	290	300	310	320	330	340	350	360																																																																										
Mus musculus (242)	---	---	P	S	L	G	S	C	S	A	L	I	K	L	P	G	G	H	L	L	V	A	H	M	T	W	S	Y	Q	M	L	R	I	I	K	K	Y	R	L	Q	F	R	E	G	P	Q	E	E	Y	P	L	V	A	G	N	L	V	F	S	S	Y	P	G	I	F	S	G	D	F	Y	I	L	G	S	G	L	V								
Homo sapiens (237)	---	---	P	S	L	G	S	C	S	A	L	I	K	L	P	G	G	H	L	L	V	A	H	M	T	W	S	Y	Q	M	L	R	I	I	K	K	Y	R	L	Q	F	R	E	G	P	Q	E	E	Y	P	L	V	A	G	N	L	V	F	S	S	Y	P	G	I	F	S	G	D	F	Y	I	L	G	S	G	L	V								
Dictyostelium discoideum (212)	K	A	F	K	E	F	M	R	R	T	H	C	S	A	L	L	K	M	T	D	D	L	S	L	F	S	G	H	T	W	S	S	Y	E	M	V	R	M	F	K	W	Y	N	L	K	Y	L	F	N	G	O	P	P	---	A	S	K	V	T	M	S	E	P	G	L	S	S	I	D	F	Y	L	D	T	K	L	V								
Trypanosoma brucei (230)	Q	M	M	P	R	M	F	V	D	H	C	S	A	L	I	K	M	T	D	D	L	S	L	F	S	G	H	T	W	S	S	Y	E	M	V	R	M	F	K	W	Y	N	L	K	Y	L	F	N	G	O	P	P	---	A	S	K	V	T	M	S	E	P	G	L	S	S	I	D	F	Y	L	D	T	K	L	V									
Consensus (271)	Q	M	M	P	R	M	F	V	D	H	C	S	A	L	I	K	M	T	D	D	L	S	L	F	S	G	H	T	W	S	S	Y	E	M	V	R	M	F	K	W	Y	N	L	K	Y	L	F	N	G	O	P	P	---	A	S	K	V	T	M	S	E	P	G	L	S	S	I	D	F	Y	L	D	T	K	L	V									
	(361)	361	370	380	390	400	410	420	430	440	450																																																																										
Mus musculus (326)	V	L	E	T	T	I	G	N	K	N	P	A	L	M	K	Y	V	Q	P	G	V	L	E	W	R	N	I	V	A	N	R	L	A	D	G	A	T	A	D	V	F	K	R	F	N	S	G	T	Y	N	N	Q	W	M	I	V	D	Y	K	A	F	I	P	G	G	P	S	P	G	S	R	---	V	L	T	I	L	E	Q	I	P	G	M	V	
Homo sapiens (321)	V	L	E	T	T	I	G	N	K	N	P	A	L	M	K	Y	V	Q	P	G	V	L	E	W	R	N	I	V	A	N	R	L	A	D	G	A	T	A	D	V	F	K	R	F	N	S	G	T	Y	N	N	Q	W	M	I	V	D	Y	K	A	F	I	P	G	G	P	S	P	G	S	R	---	V	L	T	I	L	E	Q	I	P	G	M	V	
Dictyostelium discoideum (298)	V	L	E	T	T	I	G	N	K	N	P	A	L	M	K	Y	V	Q	P	G	V	L	E	W	R	N	I	V	A	N	R	L	A	D	G	A	T	A	D	V	F	K	R	F	N	S	G	T	Y	N	N	Q	W	M	I	V	D	Y	K	A	F	I	P	G	G	P	S	P	G	S	R	---	V	L	T	I	L	E	Q	I	P	G	M	V	
Trypanosoma brucei (303)	V	M	E	T	T	N	V	I	H	M	A	T	L	L	R	N	H	V	G	S	S	V	A	T	L	R	A	M	A	N	F	L	A	V	D	A	P	S	V	S	N	F	S	R	E	S	S	G	A	Y	N	N	Q	W	M	I	V	D	Y	K	A	F	I	P	G	G	P	S	P	G	S	R	---	V	L	T	I	L	E	Q	I	P	G	M	V
Consensus (361)	V	L	E	T	T	I	G	N	K	N	P	A	L	M	K	Y	V	Q	P	G	V	L	E	W	R	N	I	V	A	N	R	L	A	D	G	A	T	A	D	V	F	K	R	F	N	S	G	T	Y	N	N	Q	W	M	I	V	D	Y	K	A	F	I	P	G	G	P	S	P	G	S	R	---	V	L	T	I	L	E	Q	I	P	G	M	V	
	(451)	451	460	470	480	490	500	510	520	530	540																																																																										
Mus musculus (414)	---	---	V	V	A	D	K	T	A	E	L	Y	K	I	T	Y	W	A	S	Y	N	I	P	F	E	T	V	F	N	S	L	Q	L	A	V	A	Q	Y	G	D	W	F	S	Y	T	K	N	P	R	A	K	I	F	O	R	D	Q	S	L	V	E	D	M	A	M	V	R	L	M	R	Y	M	D	F	L	H	D	P	L	S	L	C	E		
Homo sapiens (409)	---	---	V	V	A	D	K	T	S	E	L	W	K	T	Y	W	A	S	Y	N	I	P	S	F	E	T	V	F	N	S	L	Q	L	A	V	A	Q	Y	G	D	W	F	S	Y	T	K	N	P	R	A	K	I	F	O	R	D	Q	S	L	V	E	D	M	A	M	V	R	L	M	R	Y	M	D	F	L	H	D	P	L	S	L	C	E		
Dictyostelium discoideum (384)	---	---	E	Y	G	D	T	A	I	L	R	---	T	S	W	P	S	F	N	I	P	F	Y	E	N	I	G	L	T	E	F	N	E	T	Y	A	Q	F	E	M	F	S	Y	A	S	P	S	M	I	F	K	R	D	A	N	N	I	H	S	L	T	O	F	A	M	L	R	Y	M	W	Q	N	D	P	F	S	---								
Trypanosoma brucei (393)	P	P	L	G	I	T	S	K	M	T	S	V	L	N	T	T	Y	W	A	S	Y	N	I	P	F	E																																																											

7 Literaturverzeichnis

- Ahlberg J, Marzella L, Glaumann H (1982): Uptake and degradation of proteins by isolated rat liver lysosomes. Suggestion of a microautophagic pathway of proteolysis. *Lab Invest* 47, 523-532.
- Alexander DL, Schwartz KJ, Balber AE, Bangs JD (2002): Developmentally regulated trafficking of the lysosomal membrane protein p67 in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 115, 3253-3263.
- Arstila AU, Trump BF (1968): Studies on cellular autophagocytosis. The formation of autophagic vacuoles in the liver after glucagon administration. *Am J Pathol* 53, 687-733.
- Baehner F, Kampmann C, Whybra C, Miebach E, Wiethoff CM, Beck M (2003): Enzyme replacement therapy in heterozygous females with Fabry disease: results of a phase IIIB study. *J Inherit Metab Dis* 26, 617-627.
- Baron R, Neff L, Louvard D, Courtoy PJ (1985): Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. *J Cell Biol* 101, 2210-2222.
- Barton NW, Brady RO, Dambrosia JM, Di Bisceglie AM, Doppelt SH, Hill SC, Mankin HJ, Murray GJ, Parker RI, Argoff CE, et al. (1991): Replacement therapy for inherited enzyme deficiency--macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N Engl J Med* 324, 1464-1470.
- Berchem G, Glondu M, Gleizes M, Brouillet JP, Vignon F, Garcia M, Liaudet-Coopman E (2002): Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: proliferation, angiogenesis and apoptosis. *Oncogene* 21, 5951-5955.
- Berkovic SF, Carpenter S, Andermann F, Andermann E Wolfe LS (1988): Kufs' disease: a critical reappraisal. *Brain* 111 (Pt 1), 27-62.
- BioRad Activated Immunoaffinity Supports Affi-Gel 10. BioRad, Hercules 2000.

- Bond JS, Butler PE (1987): Intracellular proteases. *Annu Rev Biochem* 56, 252-253.
- Brady RO, Murray GJ, Moore, DF Schiffmann R (2001): Enzyme replacement therapy in Fabry disease. *J Inherit Metab Dis* 24 Suppl 2, 18-24; discussion 11-12.
- Bresciani R, von Figura K (1996): Dephosphorylation of the mannose-6-phosphate recognition marker is localized in later compartments of the endocytic route. Identification of purple acid phosphatase (uteroferrin) as the candidate phosphatase. *Eur J Biochem* 238, 669-674.
- Brickman MJ, Balber AE (1994): Transport of a lysosomal membrane glycoprotein from the Golgi to endosomes and lysosomes via the cell surface in African trypanosomes. *J Cell Sci* 107 (Pt 11), 3191-3200.
- Brix K, Linke M, Tepel C, Herzog V (2001): Cysteine proteinases mediate extracellular prohormone processing in the thyroid. *Biol Chem* 382, 717-725.
- Byrd JC, MacDonald RG (2000): Mechanisms for high affinity mannose 6-phosphate ligand binding to the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 275, 18638-18646.
- Byrd JC, Park JH, Schaffer BS, Garmroudi F, MacDonald RG (2000): Dimerization of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 275, 18647-18656.
- Campbell TN, Choy FY (2004): Knockdown of chimeric glucocerebrosidase by green fluorescent protein-directed small interfering RNA. *Genet Mol Res* 3, 282-287.
- Cheng SH, Smith AE (2003): Gene therapy progress and prospects: gene therapy of lysosomal storage disorders. *Gene Ther* 10, 1275-1281.
- Clontech Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual. Clontech, Palo Alto 1999.
- Clontech Yeast Protocols Handbook. Clontech, Palo Alto 2001.
- Conner GE: Cathepsin D. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. hrsg. v. Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF, Academic press, New York 2002, 746-751.

- Conzelmann E, Sandhoff K (1983): Partial enzyme deficiencies: residual activities and the development of neurological disorders. *Dev Neurosci* 6, 58-71.
- Cuervo AM, Dice JF (1996): A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273, 501-503.
- Cuervo AM, Dice JF (1998): Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J Mol Med* 76, 6-12.
- Cuervo AM, Dice JF (2000): Unique properties of LAMP2a compared to other LAMP2 isoforms. *J Cell Sci* 113 Pt 24, 4441-4450.
- Cuppoletti J, Aures-Fischer D, Sachs G (1987): The lysosomal H⁺ pump: 8-azido-ATP inhibition and the role of chloride in H⁺ transport. *Biochim Biophys Acta* 899, 276-284.
- Dahms NM, Lobel P, Breitmeyer J, Chirgwin JM, Kornfeld S (1987): 46 kd mannose 6-phosphate receptor: cloning, expression, and homology to the 215 kd mannose 6-phosphate receptor. *Cell* 50, 181-192.
- Dahms NM, Lobel P, Kornfeld S (1989): Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *J Biol Chem* 264, 12115-12118.
- Danon MJ, Oh SJ, DiMauro S, Manaligod JR, Eastwood A, Naidu S, Schliselfeld LH (1981): Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase. *Neurology* 31, 51-57.
- D'Azzo A, Hoogeveen A, Reuser AJ, Robinson D, Galjaard H (1982): Molecular defect in combined beta-galactosidase and neuraminidase deficiency in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 4535-4539.
- de Duve C (1963): The lysosome. *Sci Am* 208, 64-72.
- de Duve C (1983): Lysosomes revisited. *Eur J Biochem* 137, 391-397.
- de Duve C, Pressman B, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F (1955): Tissue fraction studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem J* 604-617.

- Deiss LP, Galinka H, Berissi H, Cohen O, Kimchi A (1996): Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J* 15, 3861-3870.
- Deuschl F, Kollmann K, von Figura K, Lubke T (2006): Molecular characterization of the hypothetical 66.3-kDa protein in mouse: lysosomal targeting, glycosylation, processing and tissue distribution. *FEBS Lett* 580, 5747-5752.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, Germain DP, Lee P, Waldek S, Caplan L, Linthorst GE, Desnick RJ (2001): Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A--replacement therapy in Fabry's disease. *N Engl J Med* 345, 9-16.
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000): Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 25, 1439-1451.
- Eskelinen EL, Illert AL, Tanaka Y, Schwarzmann G, Blanz J, Von Figura K, Saftig P (2002): Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Biol Cell* 13, 3355-3368.
- Fields S, Song O (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Futerman AH, van Meer G (2004): The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 554-565.
- Gahl WA, Bashan N, Tietze F, Bernardini I, Schulman JD (1982): Cystine transport is defective in isolated leukocyte lysosomes from patients with cystinosis. *Science* 217, 1263-1265.
- Galjart NJ, Gillemans N, Meijer D, d'Azzo A (1990): Mouse "protective protein". cDNA cloning, sequence comparison, and expression. *J Biol Chem* 265, 4678-4684.

- Garcia M, Derocq D, Pujol P, Rochefort H (1990): Overexpression of transfected cathepsin D in transformed cells increases their malignant phenotype and metastatic potency. *Oncogene* 5, 1809-1814.
- Geuze HJ (1998): The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol Today* 19, 282-287.
- Gieselmann V (1995): Lysosomal storage diseases. *Biochim Biophys Acta* 1270, 103-136
- Gieselmann V, Pohlmann R, Hasilik A, Von Figura K (1983): Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts. *J Cell Biol* 97, 1-5.
- Glondou M, Liaudet-Coopman E, Derocq D, Platet N, Rochefort H, Garcia M (2002): Down-regulation of cathepsin-D expression by antisense gene transfer inhibits tumor growth and experimental lung metastasis of human breast cancer cells. *Oncogene* 21, 5127-5134.
- Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ (1985): Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol* 1, 1-39.
- Gough NR, Fambrough DM (1997): Different steady state subcellular distributions of the three splice variants of lysosome-associated membrane protein LAMP-2 are determined largely by the COOH-terminal amino acid residue. *J Cell Biol* 137, 1161-1169.
- Hajioff D, Enever Y, Quiney R, Zuckerman J, Mackermot K, Mehta A (2003): Hearing loss in Fabry disease: the effect of agalsidase alfa replacement therapy. *J Inher Metab Dis* 26, 787-794.
- Harmatz P, Giugliani R, Schwartz I, Guffon N, Teles EL, Miranda MC, Wraith JE, Beck M, Arash L, Scarpa M, et al. (2006): Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: a phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled, multinational study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase (recombinant human arylsulfatase B or rhASB) and follow-on, open-label extension study. *J Pediatr* 148, 533-539.
- Hasilik A (1992): The early and late processing of lysosomal enzymes: proteolysis and compartmentation. *Experientia* 48, 130-151.

- Hasilik A, Neufeld EF (1980): Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Synthesis as precursors of higher molecular weight. *J Biol Chem* 255, 4937-4945.
- Heukeshoven J, Dernick R (1988): Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9, 28-32.
- Hickman S, Neufeld EF (1972): A hypothesis for I-cell disease: defective hydrolases that do not enter lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 49, 992-999.
- Hille-Rehfeld A (1995): Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1241, 177-194.
- Hoogeveen AT, Verheijen FW, Galjaard H (1983): The relation between human lysosomal beta-galactosidase and its protective protein. *J Biol Chem* 258, 12143-12146.
- Hopwood JJ, Bunge S, Morris CP, Wilson PJ, Steglich C, Beck M, Schwinger E, Gal A (1993): Molecular basis of mucopolysaccharidosis type II: mutations in the iduronate-2-sulphatase gene. *Hum Mutat* 2, 435-442.
- Horowitz M, Pasmanik-Chor M, Borochowitz Z, Falik-Zaccai T, Heldmann K, Carmi R, Parvari R, Beit-Or H, Goldman B, Peleg L, et al. (1998): Prevalence of glucocerebrosidase mutations in the Israeli Ashkenazi Jewish population. *Hum Mutat* 12, 240-244.
- Invitrogen Lipofectamine 2000 Transfection Reagent Users Manual. Invitrogen, Karlsruhe 2006.
- Itoh K, Takiyama N, Kase R, Kondoh K, Sano A, Oshima A, Sakuraba H, Suzuki Y (1993): Purification and characterization of human lysosomal protective protein expressed in stably transformed Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 268, 1180-1186.
- Jensen AG, Chemali M, Chapel A, Kieffer-Jaquinod S, Jadot M, Garin J, Journet A (2007): Biochemical characterization and lysosomal localization of the mannose-6-phosphate protein p76 (hypothetical protein LOC196463). *Biochem J* 402, 449-458.
- Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA (2002): Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 82, 503-568.

- Jeyakumar M, Butters TD, Cortina-Borja M, Hunnam V, Proia RL, Perry VH, Dwek RA, Platt FM (1999): Delayed symptom onset and increased life expectancy in Sandhoff disease mice treated with N-butyldeoxynojirimycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6388-6393.
- Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE, Waber L, Belmont J, Passage M, Izykowski B, Phillips J, Doroshov R, Walot I, et al. (2001): Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *N Engl J Med* 344, 182-188.
- Kelley RJ, Brickman MJ, Balber AE (1995): Processing and transport of a lysosomal membrane glycoprotein is developmentally regulated in African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* 74, 167-178.
- Kelley RJ, Alexander DL, Cowan C, Balber AE, Bangs JD (1999): Molecular cloning of p67, a lysosomal membrane glycoprotein from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 98, 17-28.
- Kemphues KJ, Priess JR, Morton DG, Cheng NS (1988): Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* 52, 311-320.
- Koike M, Shibata M, Ohsawa Y, Nakanishi H, Koga T, Kametaka S, Waguri S, Momoi T, Kominami E, Peters C, et al. (2003): Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D-deficient mice. *Mol Cell Neurosci* 22, 146-161.
- Kollmann K, Mutenda KE, Balleininger M, Eckermann E, von Figura K, Schmidt B, Lubke T (2005): Identification of novel lysosomal matrix proteins by proteome analysis. *Proteomics* 5, 3966-3978.
- Konecki DS, Foetisch K, Zimmer KP, Schlotter M, Lichter-Konecki U (1995): An alternatively spliced form of the human lysosome-associated membrane protein-2 gene is expressed in a tissue-specific manner. *Biochem Biophys Res Commun* 215, 757-767.
- Kornfeld R, Kornfeld S (1985): Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54, 631-664.
- Kornfeld S (1992): Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem* 61, 307-330.
- Kornfeld S, Mellman I (1989): The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* 5, 483-525.

- Kyte J, Doolittle RF (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105-132.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Leighton F, Poole B, Beaufay H, Baudhuin P, Coffey JW, Fowler S, De Duve C (1968): The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria, and lysosomes from the livers of rats injected with triton WR-1339. Improved isolation procedures, automated analysis, biochemical and morphological properties of fractions. *J Cell Biol* 37, 482-513.
- 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* 260, 9023-9030.
- Lester RL, Smith AL (1961): Studies on the electron transport system. 28. The mode of reduction of tetrazolium salts by beef heart mitochondria; role of coenzyme Q and other lipids. *Biochim Biophys Acta* 47, 475-496.
- Li H, Kolluri SK, Gu J, Dawson MI, Cao X, Hobbs PD, Lin B, Chen G, Lu J, Lin F, et al. (2000): Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science* 289, 1159-1164.
- Lichter-Konecki U, Moter SE, Krawisz BR, Schlotter M, Hipke C, Konecki DS (1999): Expression patterns of murine lysosome-associated membrane protein 2 (LAMP-2) transcripts during morphogenesis. *Differentiation* 65, 43-58.
- Liu J, Guo Q, Chen B, Yu Y, Lu H, Li YY (2006a): Cathepsin B and its interacting proteins, bikunin and TSRC1, correlate with TNF-induced apoptosis of ovarian cancer cells OV-90. *FEBS Lett* 580, 245-250.
- Liu J, Liu NS, Yuan HY, Guo Q, Lu H, Li YY (2006b): Human homologue of SETA binding protein 1 interacts with cathepsin B and participates in TNF-Induced apoptosis in ovarian cancer cells. *Mol Cell Biochem* 292, 189-195.

- Löffler G, Petrides PE: Biochemie und Pathobiochemie. 7. Auflage; Springer-Verlag, Berlin 2003, 606.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Lübke T, Göttingen: Abbildung für diese Arbeit bereitgestellt, November 2006.
- Lübke T, Göttingen: mündliche Mitteilung, Januar 2008.
- Luedtke CC, Andonian S, Igdoura S, Hermo L (2000): Cathepsin A is expressed in a cell- and region-specific manner in the testis and epididymis and is not regulated by testicular or pituitary factors. *J Histochem Cytochem* 48, 1131-1146.
- Masson C, Cisse I, Simon V, Insalaco P, Audran M (2004): Fabry disease: a review. *Joint Bone Spine* 71, 381-383.
- Matsuda J, Suzuki O, Oshima A, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Itoh M, Matsuzaki Y, Yasuda Y, Ogawa S, et al. (2003): Chemical chaperone therapy for brain pathology in G(M1)-gangliosidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15912-15917.
- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF (1999): Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 281, 249-254.
- Mignani R, Cagnoli L (2004): Enzyme replacement therapy in Fabry's disease: recent advances and clinical applications. *J Nephrol* 17, 354-363.
- Morgan CP, Insall R, Haynes L, Cockcroft S (2004): Identification of phospholipase B from *Dictyostelium discoideum* reveals a new lipase family present in mammals, flies and nematodes, but not yeast. *Biochem J* 382, 441-449.
- Morishima H, Takita T, Aoyagi T, Takeuchi T, Umezawa H (1970): The structure of pepstatin. *J Antibiot (Tokyo)* 23, 263-265.
- Morreau H, Galjart NJ, Willemsen R, Gillemans N, Zhou XY, d'Azzo A (1992): Human lysosomal protective protein. Glycosylation, intracellular transport, and association with beta-galactosidase in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 267, 17949-17956.

- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Myerowitz R (1997): Tay-Sachs disease-causing mutations and neutral polymorphisms in the Hex A gene. *Hum Mutat* 9, 195-208.
- Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H, Fensom A, Vanier MT, Wattiaux R, Jadot M, Lobel P (2000): Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science* 290, 2298-2301.
- Neufeld EF, Muenzer J: The Mucopolysaccharidoses. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, hrsg. v. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, 8th Edition, Vol. 3, McGraw-Hill, New York 2001, 3421-3452.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988): Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262.
- Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y (1990): A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res* 18, 6169.
- 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* 406, 906-910.
- Ohashi T, Watabe K, Uehara K, Sly WS, Vogler C, Eto Y (1997): Adenovirus-mediated gene transfer and expression of human beta-glucuronidase gene in the liver, spleen, and central nervous system in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1287-1292.
- Ohkuma S, Poole B (1978): Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 3327-3331.

- Perez SE, Steller H (1996): Molecular and genetic analyses of lama, an evolutionarily conserved gene expressed in the precursors of the Drosophila first optic ganglion. *Mech Dev* 59, 11-27.
- Peterson GL (1979): Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem* 100, 201-220.
- Platt FM, Neises GR, Reinkensmeier G, Townsend MJ, Perry VH, Proia RL, Winchester B, Dwek RA Butters TD (1997): Prevention of lysosomal storage in Tay-Sachs mice treated with N-butyldeoxynojirimycin. *Science* 276, 428-431.
- Pohlmann R, Waheed A, Hasilik A, von Figura K (1982): Synthesis of phosphorylated recognition marker in lysosomal enzymes is located in the cis part of Golgi apparatus. *J Biol Chem* 257, 5323-5325.
- Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, Niezen-Koning KE, van Diggelen OP (1999): The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet* 105, 151-156.
- Preusser-Kunze A, Mariappan M, Schmidt B, Gande SL, Mutenda K, Wenzel D, von Figura K, Dierks T (2005): Molecular characterization of the human Calpha-formylglycine-generating enzyme. *J Biol Chem* 280, 14900-14910.
- Qiagen Miniprep Handbook. Qiagen, Hilden 2003.
- Qiagen Plasmid Purification Handbook, Qiagen, Hilden 2003.
- Qiagen QIAquick® Spin Handbook. Qiagen, Hilden 2002.
- Qiagen RNeasy® Mini Handbook. Qiagen, Hilden 1999.
- Roces DP, Lullmann-Rauch R, Peng J, Balducci C, Andersson C, Tollersrud O, Fogh J, Orlacchio A, Beccari T, Saftig P, et al. (2004): Efficacy of enzyme replacement therapy in alpha-mannosidosis mice: a preclinical animal study. *Hum Mol Genet* 13, 1979-1988.
- Roche PNGase F Produktbeschreibung. Version 4, Roche, Mannheim 2003.

- Rome LH, Hill DF (1986): Lysosomal degradation of glycoproteins and glycosaminoglycans. Efflux and recycling of sulphate and N-acetylhexosamines. *Biochem J* 235, 707-713.
- Saftig P, Hetman M, Schmahl W, Weber K, Heine L, Mossmann H, Koster A, Hess B, Evers M, von Figura K, et al. (1995): Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *Embo J* 14, 3599-3608.
- Saftig P, Hunziker E, Everts V, Jones S, Boyde A, Wehmeyer O, Suter A, von Figura K (2000): Functions of cathepsin K in bone resorption. Lessons from cathepsin K deficient mice. *Adv Exp Med Biol* 477, 293-303.
- Saitou N, Nei M (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
- Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.
- Sfakianos J, Togawa A, Maday S, Hull M, Pypaert M, Cantley L, Toomre D, Mellman I (2007): Par3 functions in the biogenesis of the primary cilium in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 179, 1133-1140.
- Sleat DE, Donnelly RJ, Lackland H, Liu CG, Sohar I, Pullarkat RK, Lobel P (1997): Association of mutations in a lysosomal protein with classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Science* 277, 1802-1805.
- Sleat DE, Zheng H, Qian M, Lobel P (2006a): Identification of sites of mannose 6-phosphorylation on lysosomal proteins. *Mol Cell Proteomics* 5, 686-701.
- Sleat DE, Wang Y, Sohar I, Lackland H, Li Y, Li H, Zheng H, Lobel P (2006b): Identification and validation of mannose 6-phosphate glycoproteins in human plasma reveal a wide range of lysosomal and non-lysosomal proteins. *Mol Cell Proteomics* 5, 1942-1956.
- Stein M, Zijderhand-Bleekemolen JE, Geuze H, Hasilik A, von Figura K (1987): Mr 46,000 mannose 6-phosphate specific receptor: its role in targeting of lysosomal enzymes. *EMBO J* 6, 2677-2681.

- Storch S, Braulke T: Transport of Lysosomal Enzymes. In: Lysosomes. hrsg. v. Saftig P, Landes Bioscience/Eurekah.com Springer Science+Business Media, Inc, Georgetown, Tex. New York, N.Y. 2005, 18.
- Sun-Wada GH, Wada Y, Futai M (2003): Lysosome and lysosome-related organelles responsible for specialized functions in higher organisms, with special emphasis on vacuolar-type proton ATPase. *Cell Struct Funct* 28, 455-463.
- Suzuki Y, Oshima A, Namba E: Beta-Galactosidase Deficiency (Beta-Galactosidosis): G_{M1} Gangliosidosis and Morquio B Disease. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, hrsg. v. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, 8th Edition, Vol. 3, McGraw-Hill, New York 2001, 3775-3809.
- Tarentino AL, Plummer TH, Jr. Maley F (1974): The release of intact oligosaccharides from specific glycoproteins by endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. *J Biol Chem* 249, 818-824.
- The QIAexpressionist – Handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. Qiagen, Hilden 2003.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.
- Tiede S, Storch S, Lubke T, Henrissat B, Bargal R, Raas-Rothschild A, Braulke T (2005): Mucopolidosis II is caused by mutations in GNPTA encoding the alpha/beta GlcNAc-1-phosphotransferase. *Nat Med* 11, 1109-1112.
- Tollersrud OK, Berg T: Lysosomal Storage Disorders. In: Lysosomes. hrsg. v. Saftig P, Landes Bioscience/Eurekah.com Springer Science+Business Media, Inc, Georgetown, Tex. New York, N.Y. 2005,60-74.
- Tuschl T (2001): RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBiochem* 2, 239-245.
- Van den Hout JM, Reuser AJ, de Klerk JB, Arts WF, Smeitink JA, Van der Ploeg AT (2001): Enzyme therapy for pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk. *J Inherit Metab Dis* 24, 266-274.

- van der Spoel A, Bonten E, d'Azzo A (1998): Transport of human lysosomal neuraminidase to mature lysosomes requires protective protein/cathepsin A. *EMBO J* 17, 1588-1597.
- Varki A, Kornfeld S (1980): Structural studies of phosphorylated high mannose-type oligosaccharides. *J Biol Chem* 255, 10847-10858.
- Varki A, Kornfeld S (1983): The spectrum of anionic oligosaccharides released by endo-beta-N-acetylglucosaminidase H from glycoproteins. Structural studies and interactions with the phosphomannosyl receptor. *J Biol Chem* 258, 2808-2818.
- Vellodi A (2005): Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol* 128, 413-431.
- von Figura K, Hasilik A (1986): Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu Rev Biochem* 55, 167-193.
- Waite M (1985): Approaches to the study of mammalian cellular phospholipases. *J Lipid Res* 26, 1379-1388.
- Wall DA, Grange DK, Goulding P, Daines M, Luisiri A, Kotagal S (1998): Bone marrow transplantation for the treatment of alpha-mannosidosis. *J Pediatr* 133, 282-285.
- Wattiaux R, Wibo M, Baudhuin P (1963): [Effect of the injection of Triton WR 1339 on the hepatic lysosomes of the rat.]. *Arch Int Physiol Biochim* 71, 140-142.
- Weber K, Osborn M (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244, 4406-4412.
- Weinreb NJ, Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, Kolodny EH, Mistry P, Pastores G, Rosenbloom BE, Scott CR, Wappner RS, et al. (2002): Effectiveness of enzyme replacement therapy in 1028 patients with type 1 Gaucher disease after 2 to 5 years of treatment: a report from the Gaucher Registry. *Am J Med* 113, 112-119.
- Whittington R, Goa KL (1992): Alglucerase. A review of its therapeutic use in Gaucher's disease. *Drugs* 44, 72-93.

- Winkel LP, Kamphoven JH, van den Hout HJ, Severijnen LA, van Doorn PA, Reuser AJ, van der Ploeg AT (2003): Morphological changes in muscle tissue of patients with infantile Pompe's disease receiving enzyme replacement therapy. *Muscle Nerve* 27, 743-751.
- Wraith JE, Clarke LA, Beck M, Kolodny EH, Pastores GM, Muenzer J, Rapoport DM, Berger KI, Swiedler SJ, Kakkis ED, et al. (2004): Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase). *J Pediatr* 144, 581-588.
- Ye XX, Lu H, Yu Y, Ding N, Zhang NL, Huo KK, Wan DF, Li YY, Gu JR (2005): P5644 interacts with phosphatidylinositol-4-phosphate adaptor protein-1 associated protein-1. *Mol Cell Biochem* 271, 151-158.
- York SJ, Arneson LS, Gregory WT, Dahms NM, Kornfeld S (1999): The rate of internalization of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is enhanced by multivalent ligand binding. *J Biol Chem* 274, 1164-1171.
- Zhou D, Li P, Lin Y, Lott JM, Hislop AD, Canaday DH, Brutkiewicz RR, Blum JS (2005): LAMP-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity* 22, 571-581.

Veröffentlichungen aus dieser Arbeit:

Publikation:

Deuschl F, Kollmann K, von Figura K, Lubke T (2006): Molecular characterization of the hypothetical 66.3-kDa-Protein in mouse: lysosomal targeting, glycosylation, processing and tissue distribution. FEBS Lett 580, 5747-5752.

Posterpräsentation:

Deuschl F, Kollmann K, von Figura K, Lubke T: Molecular characterization of the hypothetical 66.3-kDa protein in mouse, European Study Group on Lysosomal Diseases, 27.-30.9.2007, 16th ESGLD Workshop, Perugia, Italien.

Danksagung

Herrn JProf. Dr. Torben Lübke danke ich für die Vergabe des Themas, für seine ständige Diskussionsbereitschaft, für das große persönliche Engagement bei der Betreuung meiner Arbeit und das anregende Arbeitsklima in seiner Arbeitsgruppe.

Bei Herrn Prof. Dr. Kurt von Figura möchte ich mich für die konstruktiven Diskussionen bedanken.

Frau Dr. Katrin Kollmann, Frau Ellen Eckermann-Felkl, Frau Martina Balleininger und Herrn Markus Damme danke ich für die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und für die vielen schönen und lustigen gemeinsamen Stunden im Labor.

Besonderer Dank gilt Katrin.

Bei Herrn Dr. Bernhard Schmidt, Nicole Eiselt und Klaus Neifert möchte ich mich ganz herzlich für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen und der Proteinsequenzierung bedanken.

Herrn Dipl. Biologe Peter Braun danke ich für die Mithilfe bei den Yeast-two-Hybrid Versuchen.

Jenny, Jutta, Tanja, Karthik, Mals, Olaf und Peter danke ich für die fachliche Hilfe und das freundschaftliche Arbeitsklima, das mir mein Arbeiten am Institut so leicht gemacht hat.

Frau Diederich, Frau Engelmann, Frau Eplinius und allen anderen Mitarbeitern der Biochemie II danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die freundliche Unterstützung.

Katrin, Markus und Katie danke ich herzlichst für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Der DFG danke ich für das großzügige Reisestipendium, das es mir ermöglichte mein Poster auf dem ESLD in Perugia vorzustellen.

Ich danke meinen lieben Eltern, meinem lieben Bruder und meiner lieben Katie für die bedingungslose Unterstützung meiner Pläne und Ziele. Meinen Eltern danke ich zudem für ihre Großzügigkeit während meiner gesamten Studienzeit.

Meinen lieben Freunden Christian, Florian, Hinnerk, Lena, Norina, Peter, Sebastian, Sebastian, Sven, Vera und Wolfgang danke ich für ihre Freundschaft und die aktive Teilnahme an meiner Arbeit.

Lebenslauf

Am 23.6.1980 wurde ich als erstes Kind meiner Eltern Edelgard Deuschl-Jendrejewski und Günther Deuschl in Dachau/München geboren. Im Jahr 1982 zog meine Familie nach Freiburg im Breisgau. Die Grundschule schloss ich 1991 an der „Deutschen Schule Washington“ gegen Ende eines achtmonatigen Auslandsaufenthaltes meiner Familie in Washington D.C., USA, ab. Ich war Schüler der altsprachlichen Gymnasien „Kolleg St. Sebastian“ in Stegen/Freiburg im Breisgau, und ab 1995 der „Kieler Gelehrtenschule“ in Kiel, wo ich meine Schulausbildung im Jahre 2000 mit dem Abitur abschloss. Anschließend leistete ich meinen Zivildienst an der Körperbehindertenschule des „Bildungszentrums Mettenhof“ in Kiel. Im Oktober 2001 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität zu Göttingen, das ich voraussichtlich im Herbst 2008 mit der 2. Ärztlichen Prüfung abschließen werde. Von Januar 2005 bis Juni 2006 war ich als studentische Hilfskraft in der Abteilung Biochemie II der Georg-August-Universität zu Göttingen in der Arbeitsgruppe von JProf. Dr. Torben Lübke und Professor Dr. Kurt von Figura angestellt und begann ab Januar 2006 die experimentelle Arbeit meiner vorliegenden Dissertation mit dem Thema „Molekulare Charakterisierung des murinen 66.3-kDa-Proteins“ in der Arbeitsgruppe von JProf. Dr. Torben Lübke.