

**Prozessierung und Sortierung der
lysosomalen Ntn-Hydrolase Plbd2
und
Erzeugung von Plbd1- und Plbd2-defizienten
Mausmodellen**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie
der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Arne Linhorst
aus Werther (Westf.)

Bielefeld, Mai 2018

1. Gutachter: Apl. Prof. Dr. Torben Lübke
Biochemie I, Fakultät für Chemie
Universität Bielefeld

2. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Niemann
Biochemie IV, Fakultät für Chemie
Universität Bielefeld

Inhaltsverzeichnis

Abstract	1
Zusammenfassung	3
1 Einleitung	5
1.1 Lysosomen.....	5
1.1.1 Lysosomale Proteine.....	7
1.1.2 Synthese und Reifung lysosomaler Proteine.....	8
1.1.3 Transport lysosomaler Membranproteine.....	10
1.1.4 Transport lysosomaler Matrixproteine.....	11
1.1.5 Lysosomen-assoziierte Erkrankungen.....	12
1.2 Proteine der Ntn-Hydrolase-Superfamilie.....	13
1.2.1 Das lysosomale Protein Plbd2.....	14
1.2.2 Das lysosomale Protein Plbd1.....	15
1.3 Genveränderungen mittels CRISPR-Cas.....	16
1.3.1 CRISPR-Cas9 als molekulares Werkzeug.....	16
1.4 Zielsetzung.....	19
2 Material	21
2.1 Geräte.....	21
2.2 Verbrauchsmaterial.....	22
2.3 Chemikalien.....	23
2.4 Standardpuffer und Medien.....	25
2.5 Enzyme und Kits.....	26
2.6 Antikörper.....	27
2.7 Plasmide und Primer.....	28
2.7.1 Plasmide.....	28
2.7.2 Mutagenese- und Klonierungsprimer.....	29
2.7.3 Genotypisierungs- und Sequenzierprimer.....	29
2.7.4 Primer zur Genotypisierung von CRISPR- <i>offtarget</i> -Bindestellen (OTS).....	30
2.7.5 Einzelsträngige Oligodesoxynukleotide (ssODN) als HDR-Reparaturvorlage.....	31
2.7.6 Quantitative-Real-Time-PCR Primer.....	31
2.8 Eukaryotische Zelllinien.....	31
2.9 EDV.....	32

3	Methoden	33
3.1	Molekularbiologische Methoden	33
3.1.1	Isolierung und Reinigung von RNA	33
3.1.2	cDNA-Synthese	33
3.1.3	Isolierung von genomischer DNA.....	34
3.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
3.1.5	Trennung von DNA in Agarosegelen	39
3.1.6	Trennung von DNA in Polyacrylamidgelen.....	39
3.1.7	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	40
3.1.8	Restriktionsverdau und Dephosphorylierung.....	40
3.1.9	Ligation.....	42
3.1.10	TA-Klonierung.....	42
3.1.11	Herstellung kompetenter Bakterien	43
3.1.12	Transformation von Bakterien durch Hitzeschock.....	43
3.1.13	Transformation von Bakterien durch Elektroporation.....	43
3.1.14	Aufreinigung von Plasmid-DNA.....	44
3.1.15	Sequenzierung.....	44
3.1.16	Mutationsanalyse mit T7-Endonuklease I.....	45
3.2	Proteinbiochemische Methoden.....	46
3.2.1	Gewinnung von Zelllysaten aus Zellpellets	46
3.2.2	Anreicherung von Zellorganellen aus Zellhomogenaten	46
3.2.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	47
3.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
3.2.5	Western-Blot und Immundetektion von Proteinen.....	49
3.2.6	Reinigen, Trocknen und Reaktivieren von PVDF-Membranen	51
3.2.7	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	51
3.2.8	Deglykosylierung mit <i>N</i> -Glykosidase F.....	51
3.2.9	Percoll™-Dichtegradienten-Zentrifugation.....	52
3.2.10	Herstellung von Lysosomen-angereicherter Fraktion aus muriner Leber (Tritosomen).53	
3.2.11	Proteinaufreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA-Agarose	55
3.2.12	Umpuffern mittels Centricon	55
3.2.13	Aktivitätsassays lysosomaler Hydrolasen.....	56
3.3	Zellbiologische Methoden	58
3.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	58

3.3.2	Kryokonservierung und Revitalisierung	58
3.3.3	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen.....	58
3.3.4	Einzelzell-Klonierung durch serielle Verdünnung.....	59
3.3.5	Ernte von konditioniertem Medium mit sekretierten lysosomalen Proteinen	60
3.3.6	Beschichtung von Deckgläsern mit poly-L-Lysin.....	60
3.3.7	Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung von kultivierten Zellen	61
3.4	Tierexperimentelle und histologische Methoden.....	62
3.4.1	Erzeugung von <i>knockout</i> -Mäusen	62
3.4.2	Genotypisierung der erzeugten Mauslinien	63
3.4.3	Erzeugung von Gewebehomogenaten	64
3.4.4	Gewinnung und Immortalisierung von murinen embryonalen Fibroblasten.....	64
3.4.5	Gewinnung von Knochenmarkszellen und Differenzierung zu Makrophagen.....	65
3.4.6	Gewinnung von EDTA-Blut und Isolierung von Leukozyten	66
3.4.7	Perfusion mit Paraformaldehyd zur Fixierung.....	67
3.4.8	Herstellung von Gefrier-Gewebeschnitten.....	67
3.4.9	Herstellung von Paraffin-Gewebeschnitten	67
3.4.10	Indirekte Immunfluoreszenz-Färbungen auf Gewebeschnitten	68
3.4.11	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung von Gewebeschnitten.....	68
4	Ergebnisse.....	69
4.1	Autokatalytische Prozessierung des Plbd2.....	71
4.1.1	Spaltungsmuster des Plbd2 <i>in vivo</i>	72
4.1.2	Analyse der putativ autokatalytisch inaktiven Mutanten C249S und C249A.....	76
4.1.3	Autokatalytische Prozessierung <i>in vitro</i>	81
4.2	Proteolytische Spaltung des Plbd2 β -Fragments.....	85
4.2.1	Einfluss von Protease-Inhibitoren auf die Spaltung.....	87
4.2.2	Lokalisation der Spaltstelle durch Mutationsanalyse.....	89
4.2.3	Zeitabhängige Prozessierung von Plbd2 und Plbd2-N394Q	93
4.2.4	Klonierung und Aufreinigung von murinem CtsB, CtsL, AEP und Plbd2	95
4.2.5	Aktivierung von rekombinantem CtsB, CtsL und AEP	96
4.2.6	<i>In vitro</i> Umsatz von Plbd2 mit CtsB, CtsL oder Tritosomen.....	98
4.2.7	<i>In vitro</i> Prozessierung von Plbd2 durch CtsB, CtsL und AEP.....	101
4.3	Intrazelluläre Sortierung des Plbd2.....	105
4.3.1	Sortierung des Plbd2 bei Defekten im M6P-Transportweg	105

4.3.2	Lokalisation des Plbd2 in Zelllinien mit Sortierungsdefekten	109
4.3.3	Subzelluläre Fraktionierung durch Dichtegradienten-Zentrifugation.....	110
4.4	Erzeugung von Plbd1- und Plbd2- <i>knockout</i> - Mausmodellen	116
4.4.1	Klonierung und Validierung von Guide-RNAs in Zellkultur	116
4.4.2	Isolierung von putativ mutierten Zellklonen.....	122
4.4.3	Erzeugung von Plbd1- und Plbd2-defizienten Mausmodellen	124
4.4.4	Etablierung von Plbd1- und Plbd2-defizienten Inzuchtstämmen und Validierung der Mutationen auf genomischer Ebene	129
4.4.5	Validierung der <i>knockout</i> -Mausmodelle auf Transkript-Ebene	134
4.4.6	Validierung der <i>knockout</i> -Mausmodelle auf Protein-Ebene in angereicherten Lysosomen und Geweben.....	138
4.4.7	Analyse von Blutzellen aus der Plbd1 ^{-/-} -Mauslinie	143
4.4.8	Expression von Plbd1 und Plbd2 in Makrophagen und Knochenmarkszellen.....	145
4.4.9	Histologie und indirekte Immunfluoreszenz in Hoden aus Plbd1-KO-Mäusen	148
4.4.10	Indirekte Immunfluoreszenz in WT- und Plbd2-KO-Gewebe.....	150
5	Diskussion.....	155
5.1	Autokatalytische Prozessierung des Pro-Plbd2.....	156
5.1.1	Plbd2-WT, aber nicht die Mutante-C249S, wird <i>in vitro</i> autokatalytisch gespalten.....	156
5.1.2	Die Plbd2-C249S-Mutante wird intrazellulär proteolytisch gespalten	156
5.1.3	Das Pro- α -Fragment wird proteolytisch verkürzt	158
5.1.4	Die Inkubation mit Tritosomen verstärkt die autokatalytische Spaltung.....	159
5.2	Prozessierung des β -Fragments.....	159
5.2.1	Die Proteasen AEP, CtsB und CtsL sind an der Spaltung des β -Fragments beteiligt....	160
5.2.2	Die proteolytische Spaltung findet an Asn394 statt	161
5.2.3	Plbd2-Prozessierung mit rekombinanten Proteasen <i>in vitro</i>	162
5.3	M6P-abhängige Sortierung des Plbd2.....	166
5.4	Erzeugung von Plbd1- und Plbd2-defizienten Mausmodellen mittels CRISPR-Cas9.....	169
5.4.1	Etablierung von Guide-RNAs in Zellkultur	169
5.4.2	Erzeugung von <i>knockout</i> -Mausmodellen und Charakterisierung der Mutationen auf genomischer Ebene	171
5.4.3	Beurteilung der <i>knockout</i> -Mausmodelle auf Transkript- und Protein-Ebene	173
5.4.4	Untersuchung von phänotypischen Veränderungen	176
5.5	Potentielle Funktionen von Plbd1 und Plbd2.....	179

6	Ausblick	183
7	Literaturverzeichnis	187
	Anhang	205
	Genomische Sequenzen und Alignments.....	205
	Plasmide.....	208
	Sequenzierungen.....	211
	Weitere Ergebnisse.....	214
	Genotypisierung der Plbd2-KO-Tiere der F1-Generation.....	214
	Validierung der <i>knockout</i> -Mausmodelle auf Transkript-Ebene.....	216
	Western-Blots von Gewebehomogenaten aus Plbd2-HH- und Plbd2-mut-Tieren.....	217
	Blutanalyse von WT-und Plbd1-KO-Mäusen.....	218
	Abbildungsverzeichnis.....	219
	Tabellenverzeichnis.....	221
	Abkürzungsverzeichnis.....	222
	Veröffentlichungen.....	226
	Danksagung	227
	Selbstständigkeitserklärung	229

Abstract

The lysosomal matrixprotein Plbd2 (phospholipase B-domain containing 2) was initially identified in the proteomic analyses of mannose-6-phosphate (M6P)-modified proteins (Kollmann *et al.*, 2005; Sleat *et al.*, 2005). The lysosomal localisation was confirmed by indirect immunfluorescence in cultured cells (Kollmann *et al.*, 2005) and by cofractionation analyses of lysosome-enriched fraction from mouse liver (Deuschl *et al.*, 2006). Moreover, Plbd2 was assigned to the superfamily of N-terminal nucleophile (Ntn)-hydrolases by X-ray crystallography due to structural homology (Lakomek *et al.*, 2009). With the assignment to the Ntn-hydrolase family, we assume an amidase activity, while the physiological substrate is not yet identified.

In this study, the cleavage of the Pro-Plbd2 into an α - and a β -fragment was shown to occur autocatalytically at acidic conditions. While a mutation of the catalytic cystein in the active site inhibited autocatalysis *in vitro*, cleavage still took place intracellularly due to endoprotease activity, most probably by Cathepsin L, cleaving a linker region between the α - and β -fragment of Plbd2. Whether removal of the linker peptide is necessary for enzymatic activity, remains to be elucidated after the identification of the physiological substrate.

In contrast to other known Ntn-hydrolases, further processing of the β -fragment can be observed for Plbd2. This processing was shown to be related to the activities of Cathepsin B, Cathepsin L and AEP and most likely takes place at an asparaginy residue in position 394 of Plbd2. A direct activity of AEP at this position was ruled out, whereas an indirect effect of AEP by activation of Cathepsin B and Cathepsin L appears to be more likely. By incubation with cysteine protease inhibitors, the cleavage of the β -fragment was inhibited, which is consistent with the involvement of CtsB or CtsL. Further proteolytic truncations at the N- and C-termini of the recombinant Plbd2 were detected *in vitro*.

Plbd2 is predominantly sorted in a mannose-6-phosphate (M6P)-dependent manner which was also confirmed in this work. Furthermore, in cells with defects of the M6P-receptors the existence of an M6P-independent pathway for Plbd2 was postulated. However, the correct processing of Plbd2 did not occur in these cells.

In order to get access to the physiological role of Plbd2, knockout mouse models for Plbd2 and the homologous protein Plbd1 were generated using the CRISPR-Cas9 technology. In both mouse models strongly reduced transcript levels and virtually no residual protein could be detected for Plbd2 and Plbd1, respectively. In initial analyses the animals had no apparent phenotype that would suggest the function of the proteins. While Plbd2 was particularly detected in macrophages, Plbd1 appeared to be more present in dendritic cells and cells of the bone marrow. A function of the proteins in the hydrolysis of amid bonds to degrade pathogenic macromolecules or immunological relevant mediators of inflammation is postulated in this work.

Zusammenfassung

Das lysosomale Matrixprotein Plbd2 (Phospholipase B-Domain containing 2) konnte erstmals bei der Proteomanalyse Mannose-6-Phosphat (M6P)-modifizierter Proteine beschrieben werden (Kollmann *et al.*, 2005; Sleat *et al.*, 2005). Die lysosomale Lokalisation wurde über indirekte Immunfluoreszenz-Analyse in Zellkultur (Kollmann *et al.*, 2005) und in Lysosomen-angereicherten Fraktionen der Leber (Deuschl *et al.*, 2006) bestätigt. Anhand der Tertiärstruktur konnte das Plbd2 der Superfamilie der N-terminal nukleophilen (Ntn)-Hydrolasen zugeordnet werden (Lakomek *et al.*, 2009). Die Zuordnung zur Klasse der Ntn-Hydrolasen ließ eine Amidase-Aktivität des Plbd2 vermuten, wobei das physiologische Substrat bisher nicht identifiziert werden konnte.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Spaltung des Pro-Plbd2 in ein α - und ein β -Fragment bei saurem pH-Wert autokatalytisch abläuft und durch die Mutation des katalytisch relevanten Cysteins im aktiven Zentrum inhibiert werden kann. Intrazellulär fand die Prozessierung des Pro-Plbd2 in ein α - und ein β -Fragment jedoch auch bei Inhibition der Autokatalyse statt, wobei eine Endoprotease, vermutlich Cathepsin L, das Pro-Plbd2 im Bereich des Linkerpeptids spaltete. Ob die Abspaltung des Linkerpeptids für die Aktivität des Plbd2 erforderlich ist, muss nach Identifizierung eines geeigneten Substrats weiter untersucht werden. Im Gegensatz zu anderen Ntn-Hydrolasen kann bei Plbd2 eine weiterführende Prozessierung des β -Fragments beobachtet werden. Es konnte hier gezeigt werden, dass die Spaltung im Zusammenhang mit den Proteasen Cathepsin B, Cathepsin L und AEP steht und vermutlich im Bereich um Position Asn394 im Plbd2 stattfindet. Ein direkter Effekt der AEP an dieser Position konnte ausgeschlossen werden, während ein indirekter Einfluss der AEP durch die Aktivierung der Cathepsine B oder L dagegen möglich erscheint. Durch Inkubation mit Cystein-Protease-Inhibitoren konnte die Spaltung des β -Fragments inhibiert werden, was mit der Beteiligung von Cathepsin B oder L im Einklang steht. Weitere proteolytische Verkürzungen an N- und C-Termini des rekombinanten Plbd2 konnten *in vitro* nachgewiesen werden.

Die vorwiegend Mannose-6-Phosphat (M6P)-abhängige lysosomale Sortierung des Plbd2 konnte in dieser Arbeit grundsätzlich bestätigt werden, wobei jedoch in Zellen mit Defekten der M6P-Rezeptoren auch die Existenz eines M6P-unabhängigen Transportweges für Plbd2 postuliert wird. Die korrekte Prozessierung des Plbd2 blieb in diesen Zellen jedoch aus.

Um sich der physiologischen Funktion des Plbd2 zu nähern, wurden mit der CRISPR-Cas9-Methode *knockout*-Mausmodelle für Plbd2 und das homologe Protein Plbd1 hergestellt. In den erzeugten Mausmodellen konnten stark reduzierte Transkript-Level und keinerlei Restprotein für Plbd2 bzw. Plbd1 detektiert werden. Die Tiere wiesen in einer initialen Analyse keinen offensichtlichen Phänotyp auf, der auf die Funktion der Proteine schließen ließe. Während Plbd2 besonders in Makrophagen detektiert werden konnte, scheint Plbd1 eher in Dendritischen Zellen und Zellen des Knochenmarks vorzukommen. Es wurde ferner eine Funktion der Proteine beim Abbau pathogenen Materials oder dem Metabolismus von immunologisch relevanten Signalmolekülen postuliert.

1 Einleitung

1.1 Lysosomen

Ein zentrales Merkmal der eukaryotischen Zelle ist die funktionelle Kompartimentierung in membranumschlossene Zellorganellen. Das Konzept der intrazellulären Organellen ermöglicht die Schaffung von räumlich abgegrenzten Reaktionsräumen, was besonders für die Lysosomen von Bedeutung ist. Das Lysosom wurde erstmals in Abgrenzung zu Mikrosomen und Mitochondrien als Vesikel mit saurer Phosphatase-Aktivität beschrieben (Appelmans *et al.*, 1954) und nachdem weitere saure Hydrolasen identifiziert wurden als Lysosom bezeichnet (de Duve *et al.*, 1955). Das saure Milieu von pH 4,5 - 5 und ein negatives Redox-Potential sind kennzeichnend für die Reaktionsbedingungen in den Lysosomen. Durch Ansäuerung und Fusionsereignisse bilden sich aus Vesikeln des *trans*-Golgi-Netzwerkes frühe Endosomen, die über späte Endosomen zu Lysosomen reifen (Mellman, 1992). Die Unterteilung in frühe und späte Endosomen ist dabei vereinfachend und schließt mehrere Zwischenformen ein, die über Vesikeltransport untereinander, als auch mit der Plasmamembran und dem *trans*-Golgi-Netzwerk interagieren (Saftig, Klumperman, 2009).

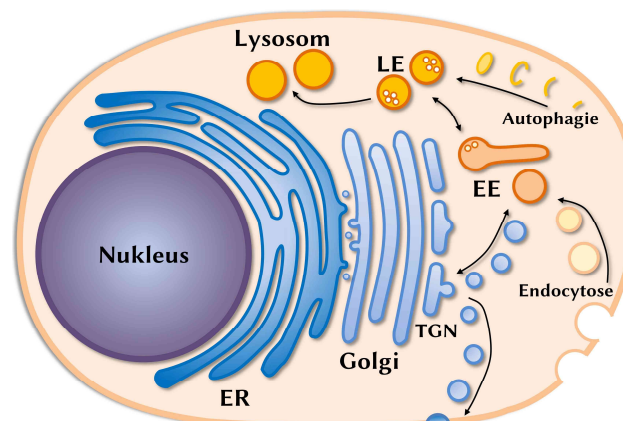


Abbildung 1: Schematische Darstellung des endo-lysosomalen Systems in der eukaryotischen Zelle.

Dargestellt ist die eukaryotische Zelle mit dem Nucleus und dem umgebenen endoplasmatischen Retikulum (ER). Der Golgi-Apparat (Golgi) geht in das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) über und bildet Transportvesikel (hellblau), über die das TGN mit der Plasmamembran und den frühen Endosomen (*early endosomes*, EE) in Kontakt steht. Durch Endocytose gelangt extrazelluläres Material und Bestandteile der Plasmamembran in die EE. Aus den EE entstehen durch Fusions- und Reifungsprozesse die späten Endosomen (*late endosomes*, LE) und Lysosomen. Über Autophagie können cytoplasmatische Bestandteile in die LE gelangen.

Die Lysosomen bilden das zentrale degradatorische Kompartiment der eukaryotischen Zelle und sind als solches an der Metabolisierung der meisten Makromoleküle der Zelle beteiligt (Sleat *et al.*, 2007). Zum Abbau bestimmtes Material kann dazu von der Plasmamembran und aus dem Extrazellularraum über Endocytose oder aus dem Cytoplasma über Autophagie in die Lysosomen gelangen.

Endocytotische Vesikel können an der Zelloberfläche Clathrin-vermittelt (*clathrin mediated endocytosis*, CME) oder Clathrin-unabhängig gebildet werden und treten durch Fusion mit frühen Endosomen in das endo-lysosomale-System ein (Doherty, McMahon, 2009). Zum Abbau bestimmte ubiquitinierte Membranproteine werden in den frühen Endosomen durch die ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*)-Proteine in intraluminale Vesikel (ILV) sortiert, die entstehenden multivesikulären Endosomen (*multivesicular bodies*, MVB) bilden eine direkte Vorstufe der späten Endosomen (Luzio *et al.*, 2009).

Bei der Aufnahme von cytoplasmatischen Bestandteilen werden drei Prozesse unterschieden: In der Makroautophagie bilden sich Membranflächen die cytosolisches Material umschließen und sogenannte Autophagosomen bilden. Durch Fusion mit späten Endosomen und Lysosomen entstehen Amphisomen und Autolysosomen (Eskelinen, Saftig, 2009). Bei der Mikroautophagie bildet die lysosomale Membran Einstülpungen, die als intraluminale Vesikel in das Lysosom aufgenommen werden (Ahlberg, Glaumann, 1985). Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie (*chaperon mediated autophagy*, CMA) werden cytosolische Proteine von Chaperonen erkannt, entfaltet und über das lysosomale Membranprotein Lamp2a in das lysosomale Lumen transloziert (Kaushik, Cuervo, 2012).

Besonders die Makroautophagie ist der Regulation durch Zellstress wie etwa Hungerbedingungen unterworfen. Auf der cytosolischen Seite der lysosomalen Membran ist der Kinasekomplex mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) lokalisiert, der bei hoher Nährstoffverfügbarkeit den Kinasekomplex ULK1-ATG13-FIP200 durch Phosphorylierung inaktiviert. Dieser wird wiederum für die Bildung von Autophagosomen benötigt. Nährstoffmangel und die resultierende Inaktivität von mTORC1 führt somit zur Aktivierung der Makroautophagie (Settembre *et al.*, 2013).

Der mTORC1-Kinasekomplex ist Teil eines größeren Komplexes der unter anderem die vakuoläre H⁺-ATPase (vATPase), einen Ragulator genannten Adapterkomplex und mehrere GTPasen einschließt (Zoncu *et al.*, 2011). Die Assemblierung des Komplexes und die Immobilisierung von mTORC1 auf der cytosolischen Seite der lysosomalen Membran bilden einen wichtigen Schritt bei der zellulären Reaktion auf Veränderungen der lysosomalen Aminosäure-Konzentration (Sancak *et al.*, 2010). Bei hohem Aminosäure-Spiegel phosphoryliert der mTORC1-Komplex an der lysosomalen Membran den Transkriptionsfaktor EB (TFEB), der daraufhin von 14-3-3-Proteinen gebunden wird, die dessen Relokalisation in den Nukleus verhindern (Laplante, Sabatini, 2013). Unter Hungerbedingungen kann der nicht-phosphorylierte TFEB in den Nukleus relokalisieren, wo er an

die Promotorbereiche der Gene lysosomaler Proteine bindet und deren Transkription stimuliert (Sardiello *et al.*, 2009). Die adressierten Genbereiche werden als CLEAR (*coordinated lysosomal expression and regulation*)-Elemente bezeichnet. Die durch TFEB aktivierten Gene sind vorwiegend dem lysosomalen Katabolismus zuzuordnen, es werden jedoch auch nicht-lysosomale Gene im Zusammenhang mit Endocytose, Protein-Transport oder Kohlenhydrat-Metabolismus angesprochen (Palmieri *et al.*, 2011).

Das Lysosom stellt als Recycling-Kompartiment nicht nur eine Sackgasse am Ende des endosomalen Wegs dar, sondern ist an physiologischen Prozessen wie Cholesterin-Homöostase, Plasmamembran-Reparatur, Knochen- und Gewebsmodellierung oder Pathogenabwehr beteiligt (Saftig, Klumperman, 2009). In einigen Zelltypen können sekretorische Lysosomen durch Fusion mit der Plasmamembran Hydrolasen in den Extrazellularraum sekretieren, was besonders bei Zellen der hämatopoetischen Entwicklungslinie wie Granulocyten oder Osteoclasten zu beobachten ist (Blott, Griffiths, 2002).

1.1.1 Lysosomale Proteine

Das lysosomale Proteom umfasst über 60 bekannte lösliche Matrixproteine (Lübke *et al.*, 2009) und mindestens 45 integrale und assoziierte Membranproteine (Chapel *et al.*, 2013). Die Anzahl der als lysosomal beschriebenen Proteine variiert in verschiedenen Studien, da eine Differenzierung von endo-lysosomalen Proteinen, zu Proteinen, die zum Abbau in die Lysosomen transportiert werden, schwierig ist. So konnten in Studien zu lysosomalen Proteinen über 1500 verschiedene Membranproteine in lysosomalen Fraktionen identifiziert werden, von denen jedoch nur 124 eine signifikante Anreicherung in Lysosomen zeigten (Schröder *et al.*, 2007).

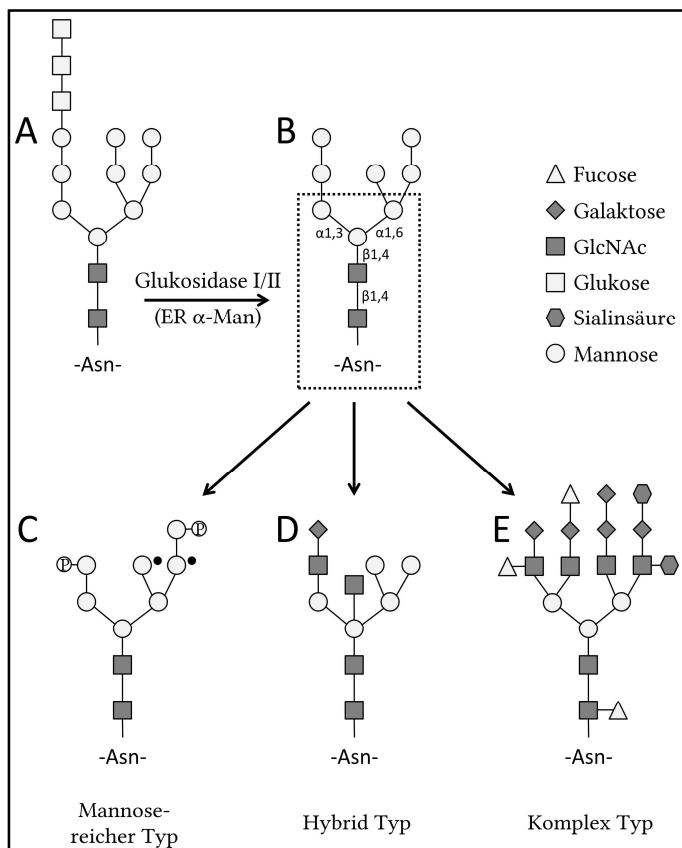
Der größte Teil der lysosomalen Matrixproteine wird den sauren Hydrolasen zugeordnet, die in Peptidasen, Phosphatasen, Nukleasen, Glykosidasen, Sulfatasen, Lipasen, Amidasen und weitere eingeteilt werden. Nur wenige lysosomale Matrixproteine weisen keine Hydrolase-Aktivität, sondern akzessorische Funktionen auf. Zu dieser Gruppe zählen die Sphingolipid-Aktivator-Proteine (Saposine; O'Brien, Kishimoto, 1991) oder das Gangliosid-Aktivator-Protein (GM2-Aktivator; Meier *et al.*, 1991), die Lipid-basierte Substrate für den enzymatischen Abbau durch Hydrolasen aus der lysosomalen Membran extrahieren. Die sauren Hydrolasen weisen mit Ausnahme einiger Peptidasen ein sehr spezifisches Substratspektrum auf. Defekte einzelner lysosomaler Enzyme führen deshalb in der Regel zu Störungen beim Abbau der jeweiligen spezifischen Substrate, die sich jedoch auf die gesamte Physiologie der Lysosomen auswirken können und als lysosomale Speichererkrankungen (*lysosomal storage disorders*, LSD) bezeichnet werden (Sleat *et al.*, 2007).

Die lysosomalen Membranproteine sind vor allem für die Aufrechterhaltung des lysosomalen Milieus verantwortlich und sind dabei an der Azidifizierung, dem Transport von Metaboliten und

Ionen über die lysosomale Membran, dem Transport von Hydrolasen oder Membranfusions-Ereignissen beteiligt (Schwake *et al.*, 2013). Mit einem Anteil von etwa 50 % machen die Proteine Lamp-1 und Lamp-2 (*lysosomal associated membrane protein*) einen großen Teil der lysosomalen Membranproteine aus. Neben Funktionen bei der Chaperon-vermittelten Autophagie und im Cholesterin-Transport (Eskelinen, 2006), bilden die beiden stark glykosylierten Proteine eine etwa 5 - 12 nm starke Glykokalix auf der luminalen Seite der lysosomalen Membran, die diese vor der Degradation durch lysosomale Hydrolasen schützt (Wilke *et al.*, 2012). Ein weiteres hochglykosyliertes Membranprotein LIMP-2 (*lysosomal integral membrane protein*) konnte als Transport-Rezeptor für die lysosomale Hydrolase β -Glukocerebrosidase beschrieben werden (Reczek *et al.*, 2007) und wurde kürzlich mit dem Transport von Cholesterin und Phospholipiden in Verbindung gebracht (Conrad *et al.*, 2017). Zur Aufrechterhaltung des lysosomalen pH-Wertes werden durch den Multikomponenten-Komplex der vakuolären H^+ -ATPase (vATPase) unter ATP-Verbrauch Protonen in die Lysosomen gepumpt (Forgacs, 1999). Das durch den Protonenfluss entstehende Membranpotential zwischen Cytosol und lysosomalem Lumen kann durch den Cl^-/H^+ -Antiporter CLC-7 oder Ionenkanäle neutralisiert werden (Ishida *et al.*, 2013). Durch die Messung lysosomaler Transportprozesse konnte die Existenz von mindestens 20 Transportproteinen in der lysosomalen Membran vorausgesagt werden (Pisoni, Thoene, 1991), wobei bisher jedoch nur ein geringer Teil davon beschrieben werden konnte (Sagné, Gasnier, 2008). Eine wichtige Rolle spielt beispielsweise der Cystin/ H^+ -Symporter Cystinosin, der das oxidierte Cystein-Dimer Cystin aus den Lysosomen exportiert (Kalatzis *et al.*, 2001), während reduziertes Cystein über einen Transporter in die Lysosomen importiert wird (Pisoni *et al.*, 1990), um das Reduktionspotential auch bei hoher Protonen-Konzentration aufrechtzuerhalten.

1.1.2 Synthese und Reifung lysosomaler Proteine

Die mRNA lysosomaler Proteine wird im Cytosol von Ribosomen translatiert und die naszierende Kette anhand eines durchschnittlich 23 Aminosäuren langen Signalpeptids durch ein SRP (*signal recognition particle*)-Protein in das raue Endoplasmatische Retikulum (rER) eingeführt. Nach der Translokation wird das Signalpeptid im ER durch Signal-Peptidasen gespalten (Paetzel *et al.*, 2002). Modifikationen des neusynthetisierten Proteins können ko- oder posttranslational durchgeführt werden. Nach der Translation findet die Faltung und Assemblierung von Untereinheiten zu Proteinkomplexen statt. Unterstützt wird die Faltung von teils ATP-abhängigen Chaperonen und Redox-Proteinen wie PDI (Protein-Disulfid-Isomerase), die Disulfidbrücken zwischen Cystein-Seitenketten modulieren, um intramolekular zur Stabilisierung der Tertiärstruktur beizutragen oder um multimere Komplexe intermolekular zu verbinden (Gidalevitz *et al.*, 2013).



Noch vor der Proteinfaltung kann post- oder kotranslational anhand der Erkennungssequenz Asn-X-Ser/Thr ($X =$ jede Aminosäure außer Pro und Asp) unter Ausbildung einer *N*-glykosidischen Bindung eine vorgefertigte Glykan-Struktur $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$ von einem Dolichol-Phosphat auf die Seitenkette des Asparagins übertragen werden (Ruiz-Canada *et al.*, 2009). Nach der Abspaltung von zwei terminalen Glukosen kann das *N*-Glykan von den Chaperon-Lectinen Calnexin und Calreticulin gebunden werden, die ungefaltete Proteine im ER zurückhalten. Nur von den *N*-Glykanen korrekt gefalteter Proteine wird die letzte Glukose und optional eine Mannose abgespalten, was den Transport in den Golgi-Apparat ermöglicht (Ruddock, Molinari, 2006). *N*-Glykane des Mannose-reichen Typs ($\text{GlcNAc}_2\text{Man}_8$) können im *cis*-Golgi bis auf einen konservierten Rumpfbereich $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ abgebaut werden, um durch das hinzufügen von *N*-Acetyl-Glukosamin (GlcNAc), Galaktose (Gal), Fucose (Fuc) oder Sialinsäure (Sia) Glykane des Komplex-Typs herzustellen (Abbildung 2). Eine Besonderheit findet sich bei einigen *N*-Glykanen von lysosomalen Proteinen, bei denen Glykane des Mannose-reichen Typs im *cis*-Golgi mit Phosphatresten modifiziert werden können, um das lysosomale Transportsignal Mannose-6-Phosphat zu erzeugen. Das Mannose-6-Phosphat kann an einem oder beiden Verzweigungen des Glykans erzeugt werden und verhindert die Abspaltung von Mannosyl-Resten durch die α -Mannosidase, sodass Mannose-6-phosphorylierte

N-Glykane mit 5 – 7 Mannosen entstehen (Varki, Kornfeld, 1983). Wird nur der α 1,6-Zweig durch Mannose-6-Phosphat Modifizierungen vor dem Abbau geschützt, können die Mannosyl-Reste am α 1,3-Zweig entfernt und neue Saccharide angefügt werden. Es wird von Hybrid-Typ-Glykanen gesprochen (Kornfeld, Kornfeld, 1985).

Neben den *N*-Glykanen an Asn-Seitenketten können auch Polysaccharide über *O*-glykosidische Bindungen an den Seitenketten von Ser, Thr und Tyr gebildet werden. Die *O*-Glykane sind im Vergleich zu *N*-Glykanen meist von geringerer Komplexität und werden im Golgi-Apparat durch die Übertragung einzelner Saccharide gebildet. Das erste Saccharid des entstehenden Glykans bildet dabei meistens ein GalNAc (Mucin-Typ *O*-Glykan), an das bis zu neun weitere Saccharide angefügt werden können (Van Den Steen *et al.*, 1998). Komplexe *O*-Glykane spielen eine wichtige Rolle bei Proteinen der extrazellulären Matrix, sind aber auch an lysosomalen Proteinen zu finden (Wilke *et al.*, 2012).

Für lysosomale Hydrolasen spielen Glykosylierungen zum einen eine Rolle beim Transport anhand der Mannose-6-Phosphorylierung, zum anderen schützen die Glykane vor dem Abbau durch Proteasen (Kundra, Kornfeld, 1999). Auch die lysosomale Membran wird durch glykosylierte Membranproteine in der Glykokalix vor Hydrolasen geschützt (Schwake *et al.*, 2013).

In den Lysosomen weisen viele Proteine durch die starke Glykosylierung somit eine gewisse Proteaseresistenz auf. Um jedoch einen zellschädigenden Effekt durch die lysosomalen Proteasen in anderen Organellen zu vermeiden, der während der Synthese (ER) und dem Transport (Golgi und Vesikel-System) auftreten könnte, muss die Aktivität lysosomaler Hydrolasen genau reguliert werden. Dies geschieht zum einen durch ein pH-Optimum der Enzyme, das dem sauren Milieu der Lysosomen entspricht, zum anderen durch den Transport als enzymatisch-inaktive Pro-Form (Erickson, 1989). Nach der Abspaltung des Signalpeptids von der Prä-Pro-Form werden viele lysosomale Hydrolasen als Pro-Protein (Zymogen) in das endo-lysosomale System transportiert, wo der niedrige pH-Wert zur autokatalytischen oder Protease-vermittelten Spaltung des Propeptids führt und die Hydrolasen aktiviert (Turk *et al.*, 2012).

1.1.3 Transport lysosomaler Membranproteine

Der Transport lysosomaler integraler Membranproteine zu den späten Endosomen und Lysosomen basiert auf der Bindung cytosolischer Signalsequenzen durch Adapterproteine, die das Abschnüren von Vesikeln des *trans*-Golgi und den Transport zu den endosomalen Strukturen vermitteln (Braulke, Bonifacio, 2009). Motive des Typs DxxLL (x = beliebige Aminosäure) können von GGA (*golgi localized γ -ear containing, ARF-binding*)-Proteinen gebunden werden, die als monomere Clathrin-Adapter die Bildung von Clathrin-umhüllten Transportvesikeln induzieren. Alternativ kann

deren Bildung durch heterotetramere Adapterprotein-Komplexe (AP-1 - AP-4) eingeleitet werden, die die Motive YxxØ (Ø = große hydrophobe Aminosäure) oder [D/E]xxxL[L/I] binden (Bonifacino, Traub, 2003). Nachdem das Clathrin von den Transportvesikeln entfernt ist, können diese unter Vermittlung von SNARE-Proteinen mit Endosomen fusionieren und die mitgeführten Proteine in das endo-lysosomale System freigegeben (Bonifacino, Glick, 2004).

1.1.4 Transport lysosomaler Matrixproteine

Für den Transport löslicher lysosomaler Proteine werden in der Regel integrale Membranproteine als Transportrezeptoren benötigt. Der häufigste Transportmechanismus beruht auf der Bildung des M6P-Rests an *N*-Glykanen (siehe Abschnitt 1.1.2), der durch M6P-Rezeptoren gebunden werden kann (Braulke, Bonifacino, 2009). Um das M6P-Signal zu erzeugen, wird durch die *N*-Acetylglucosamin-1-Phosphotransferase (GlcNAc-1-PT) ein GlcNAc-1-Phosphat auf ein Mannose-reiches *N*-Glykan übertragen. Die GlcNAc-1-PT ist ein heterohexamerer Komplex aus drei Untereinheiten $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, die durch zwei Gene codiert werden. Mutationen im Gen der α - und β -Untereinheit (GNPTAB), die zu einem Funktionsverlust des Proteins führen, rufen die Erkrankung Mucopolysaccharidose Typ II (MLII, *I-cell-disease*) hervor, bei dem ein Großteil der lysosomalen Matrixproteine fehlsortiert wird (Pohl *et al.*, 2009). Bleibt eine Restaktivität der α - und β -Untereinheit erhalten, entsteht der mildere Phänotyp der Mucopolysaccharidose Typ IIIA (MLIIIA). Mutationen im Gen der γ -Untereinheit (GNTPG) führen zu Mucopolysaccharidose Typ IIIC (MLIIIC). In den drei GlcNAc-1-PT-assoziierten Krankheitsbildern können jeweils bestimmte Enzyme nicht mehr korrekt in das Lysosom transportiert werden (Vogel *et al.*, 2009). Nachdem das GlcNAc-1-Phosphat an einen Mannosyl-Rest angehängt wurde, kann durch eine Glukosaminidase (*uncovering enzyme*, UCE) des GlcNAc abgespalten werden und das resultierende Mannose-6-Phosphat von Transportrezeptoren erkannt werden. Die Erkennung erfolgt durch einen von zwei M6P-Rezeptoren (MPR), den Kationen-unabhängigen 300 kDa großen Rezeptor CI-MPR300 oder den Kationen-abhängigen 46 kDa großen Rezeptor CD-MPR46. Die Rezeptoren binden die M6P-modifizierten Proteine im Golgi-Apparat und werden zu den späten Endosomen sortiert, wo der niedrige pH-Wert die Dissoziation des gebundenen M6P induziert. Bei Defekten beider M6P-Rezeptoren tritt ein Phänotyp ähnlich der *I-cell-disease* (MLII) auf (Braulke, Bonifacino, 2009; Pohlmann *et al.*, 1995). Auch unter physiologischen Bedingungen entgeht ein kleiner Teil der lysosomalen Proteine der Bindung durch die M6P-Rezeptoren im *trans*-Golgi und wird über den sekretorischen Weg sezerniert. An der Zelloberfläche kann dann eine M6P-abhängige Wiederaufnahme über den CI-MPR300 stattfinden (Kasper *et al.*, 1996).

Für einige lysosomale Matrixproteine konnte gezeigt werden, dass diese in einigen Zelltypen auch ohne das M6P-Signal die Lysosomen erreichen können, was alternative M6P-unabhängige Transportwege voraussetzt (Dittmer *et al.*, 1999). Beschrieben werden konnte der Transport der β -Glukocerebrosidase durch Limp2 (Reczek *et al.*, 2007) oder von Prosaposin durch Sortilin (Lefrancois *et al.*, 2003). Auch für die lysosomale Sortierung der sauren Sphingomyelinase (ASM) wurde Sortilin als Transportrezeptor postuliert (Ni, Morales, 2006), was jedoch umstritten bleibt (Markmann *et al.*, 2015). Einen weiteren Mechanismus für den Transport von Prosaposin bildet die Wiederaufnahme durch die Bindung an das extrazelluläre Rezeptorprotein LRP (*low-density-lipoprotein (LDL) receptor-related protein*) (Hiesberger *et al.*, 1998). In vergleichbarer Weise werden auch Cathepsin D und Cathepsin B anhand des LDL-Rezeptors und Lrp1 aufgenommen (Markmann *et al.*, 2015).

Eine besondere Form des lysosomalen Transports konnte für die Proteine Acp2 und Pld3 beschrieben werden, die als integrale Membranproteine anhand von cytosolischen Signalsequenzen in das endo-lysosomale Kompartiment sortiert werden, wo die Membrankomponente der Proteine abgespalten wird, um eine lösliche lysosomale Hydrolase zu bilden (Peters *et al.*, 1990; Gonzalez *et al.*, 2018).

Für weitere lysosomale Hydrolasen wie beispielsweise Cathepsin L konnte ein M6P-unabhängiger Transport beobachtet werden, ohne dass der alternative Transportweg bekannt ist (Markmann *et al.*, 2015).

1.1.5 Lysosomen-assoziierte Erkrankungen

Der Defekt lysosomaler Proteine führt in den meisten Fällen zu der Entstehung von pathologischen Veränderungen, die als lysosomale Speichererkrankungen (*lysosomal storage disorder, LSD*) bezeichnet werden (Platt *et al.*, 2012). Neben der Defizienz lysosomaler Hydrolasen können auch Defekte lysosomaler Membranproteine (Schwake *et al.*, 2013) und nicht-lysosomaler Proteine (Dierks *et al.*, 2009) einer LSD zugrunde liegen. Während die Inzidenz der einzelnen Erkrankungen gering ist (Fuller *et al.*, 2006), liegen die über 50 bekannten LSDs zusammen bei einer Inzidenz von etwa 1:5000 Geburten (Ballabio, Gieselmann, 2009). Aus dem ursächlichen Enzymdefekt resultiert in vielen Fällen die Akkumulation eines Makromoleküls im endo-lysosomalen System, was wiederum zu der Ansammlung von sekundärem Speichermaterial führt und somit einen Einfluss auf die Entstehung des Krankheitsbildes hat (Walkley, Vanier, 2009). Es konnten einige Krankheitsbilder beschrieben werden, die einer LSD ähneln, ohne dass der zugrunde liegende pathogenen Mechanismus bekannt ist (Sleat *et al.*, 2007). Diese Krankheiten gilt es in der Zukunft mit lysosomalen Proteinen, von denen einige bisher keine bekannte Funktion haben (Lübke *et al.*, 2009), in Verbindung zu bringen.

Die Lysosomen spielen als Teil des endozytotischen Apparats eine wichtige Rolle beim Abbau von phagozytierten Pathogenen und sind somit für die mikrobielle Abwehr der Zellen wichtig. Als solche sind lysosomale Proteine jedoch auch Ziele von Viren, die diese zum Eindringen in die Zelle binden. Gezeigt werden konnte dies für den Ebola-Virus mittels des NPC1-Proteins (Carette *et al.*, 2011), den Enterovirus 71 (EV71) über Limp2 (Yamayoshi, Koike, 2011) sowie Influenza A mittels Lamp1/2 (Ju *et al.*, 2015). Auch an der Pathogenität von Bakterien ist das endo-lysosomale System beteiligt, wie etwa bei *Mycobacterium tuberculosis*, das in speziellen frühen Endosomen persistieren kann (Vergne *et al.*, 2004).

1.2 Proteine der Ntn-Hydrolase-Superfamilie

Während Proteine üblicherweise aufgrund ihrer Sequenzhomologie oder gemeinsamen Subdomänen zu Protein-Superfamilien zusammengefasst werden, bildet die Klasse der N-terminal nukleophilen (Ntn)-Hydrolasen eine Superfamilie mit kaum vorhandener Sequenzhomologie. Die Zuordnung zur Ntn-Hydrolase Superfamilie erfolgt anhand einer konservierten Anordnung von Sekundärstrukturelementen, die in vier Lagen mit dem Muster $\alpha\beta\beta\alpha$ angeordnet sind (Oinonen, Rouvinen, 2000).

SCOP Familie	Referenz Sequenz	PDB
PVA	SSLSIRTTD---DKSLFARTMDF	3pvaA
Gln PRPP-AT	GIVGTAGVM[55]NMGIGHVRYPT	1ecfB
PGA	NMWVIGKSKAQDAKAIMVNGPQFG	1ajqB
Proteasom	TTVGIITLK----DAVIMATERVVT	1apyB
AGA	IGMVVIHKT---GHIAAGTSTNGI	1pmaP

Protein	Gene ID	Sequenz
PVA	Bs 129549	SSLSIRTTD---DKSLFARTMDF
CBH	Lm 16804106	TSITYTTK-----DHYFCRNFDE
INAT	Pc 112941	TTAYCQLPN----GALQGQNWDF
U34	Mm 14789764	DCFVSVPPASAIPAVIFAKNSDRP
AC	Mm 12843178	TSIVAQDSQ---GHLYHCRNLDYP
Plbd1	Mm 13385274	SALIKVLPG--FENLYFAHSSWYT
Plbd2	Mm 12836562	SALIKLLPG--GHDLIVAHNTWNS

Abbildung 3: Konservierte Elemente innerhalb der fünf Ntn-Hydrolase Familien.

Gezeigt sind repräsentative Sequenzen der fünf N-terminal nukleophilen (Ntn)-Hydrolase Familien mit bekannter Kristallstruktur und den PDB-Identifikationsnummern (A). In die Familie der PVA können diverse Proteine, unter anderem das Plbd1 und Plbd2 eingeordnet werden (B). Konservierte Elemente bilden die katalytischen Aminosäuren (Rot), konservierte hydrophobe Bereiche (Grün), Aminosäuren mit kleinen Seitenketten (Blau) und Aminosäuren mit polaren Seitenketten die Wasserstoff-Brückenbindungen ausbilden (Grau). Penicillin V Acylase (PVA), Glutamin-Phosphoribosyl-Aminotransferase (Gln PRPP-AT, Familie der Class II Glutamin Amidotransferasen), Penicillin G Acylase (PGA), Proteasome catalytic subunit (Proteasom), Aspartylglukosaminidase (AGA), Conjugated Bile Acid Hydrolase (CBH), Isopenicillin-N-Acyltransferase (INAT), U34-Dipeptidase (U34), *Bacillus Sphaericus* (Bs), *Listeria Monocytogenes* (Lm), *Penicillium Chrysogenum* (Pc). Abbildung verändert nach Pei, Grishin, 2003.

Die katalytische Aminosäure kann in diesen Hydrolasen durch ein Cystein, Serin oder Threonin gebildet werden und dient mit der umgeben Sequenz als konserviertes Element der Einteilung der Ntn-Hydrolasen in fünf Familien. Die für die Aktivität relevanten katalytischen Nukleophile (Lodola *et al.*, 2012) sind N-terminal des ersten β -Faltblattes positioniert und werden in der Regel von zwei Aminosäuren mit kleinen Seitenketten sowie drei hydrophoben Aminosäuren gefolgt (Abbildung 3). Ein weiteres Motiv wird aus drei hydrophoben und zwei polaren Aminosäuren gebildet, von denen die erste das β -Faltblatt durch Wasserstoff-Brückenbindungen stabilisiert, die zweite bildet eine

Wasserstoff-Brückenbindung mit dem freien Amino-Terminus des katalytischen Nucleophils aus, um dessen Orientierung zu stabilisieren (Pei, Grishin, 2003).

Die Proteine der Ntn-Hydrolase Superfamilie verbindet die Gemeinsamkeit einer autokatalytischen Aktivierung, bei der das Vorläuferpeptid durch die katalytische Aminosäure in ein α - und ein β -Fragment gespalten wird (Brannigan *et al.*, 1995). In diversen Fällen konnte zudem eine Abspaltung eines *spacers* aus der aktiven Tasche beschrieben werden, der auch als Propeptid bezeichnet wird (Ikonen *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2006; Schalk, Lavie, 2014). Alle bekannten Ntn-Hydrolasen spalten Amidbindungen über einen ähnlichen Reaktionsmechanismus, weisen dabei jedoch ein sehr breites Substratspektrum auf (Oinonen, Rouvinen, 2000). Von kommerziellen Interesse sind die Ntn-Hydrolasen besonders bei der Synthese der β -Laktam-Antibiotika Cephalosporin und Penicillin (Kim *et al.*, 2006).

1.2.1 Das lysosomale Protein Plbd2

Das Protein Plbd2 (Phospholipase B-Domain containing 2) wurde anhand seiner Kristallstruktur der Superfamilie der N-terminal nukleophilen Hydrolasen (Ntn-Hydrolasen) zugeordnet (Lakomek *et al.*, 2009). In der Superfamilie gehört das Plbd2 zur Familie PVA (Penicillin V Acylase), weist jedoch außer zu Plbd1 kaum Sequenzhomologie zu den übrigen Mitgliedern der Familie auf (Pei, Grishin, 2003). Die lysosomale Lokalisation des Plbd2 wurde anhand einer M6P-Modifizierung vorausgesagt (Kollmann *et al.*, 2005; Sleat *et al.*, 2005) und konnte in weiteren Analysen bestätigt werden (Deuschl *et al.*, 2006). Zudem enthält das Gen des Plbd2 in der Promotorregion eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor EB (TFEB), der zur Regulation vieler lysosomaler Gene dient (Palmieri *et al.*, 2011).

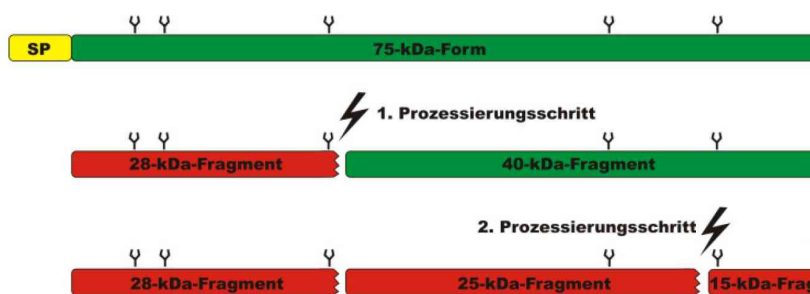


Abbildung 4: Veraltetes Prozessierungsschema des Plbd2.

Gezeigt ist die autokatalytische Prozessierung des murinen Pro-Plbd2 in ein α - und ein β -Fragment (1.Schritt) und eine weitere Spaltung des β -Fragments. Die Größen der Fragmente entsprechen nicht dem aktuellen Kenntnisstand. Aus Kettwig, 2010.

Wie bei den übrigen Ntn-Hydrolasen besteht die mature Form des humanen Plbd2 aus einem α - und einem β -Fragment, die durch die autokatalytische Spaltung am katalytischen Cystein-Nucleophil entstehen (Brannigan *et al.*, 1995). Zudem konnte für das murine Plbd2, jedoch nicht für das humane Ortholog, eine weitere Prozessierung des β -Fragments beobachtet werden (Jensen *et al.*, 2007). Bei der Untersuchung eines aufgereinigten murinen Plbd2 im Western-Blot, wurde ein C-terminales Fragment bei 15 kDa detektiert, dessen N-Terminus mittels Edman-Abbau auf das Ser514 bestimmt wurde (Deuschl *et al.*, 2006). Wenngleich das 15 kDa Fragment nur nach einem zweistufigen

Aufreinigungsprozess *in vitro* nachgewiesen werden konnte, wurde ein entsprechendes Prozessierungsschema (Abbildung 4) für die Reifung des Plbd2 *in vivo* entwickelt (Kettwig, 2010). In einer weiteren Studie, konnte für das murine Plbd2 ein größeres C-terminales Fragment nachgewiesen werden (Jensen *et al.*, 2007). Auch Vorversuche zu der vorliegenden Arbeit stehen im Widerspruch zu dem bisherigen Prozessierungsschema.

Eine Rolle scheint das Plbd2 im Gehirn zu spielen, wo es in dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* identifiziert werden konnte (Plum *et al.*, 2016). Zudem zählt das Gen des Plbd2 bei Patienten mit Parkinson zu den fünf am deutlichsten herabregulierten Genen der *Substantia nigra* (Diao *et al.*, 2013). Die Funktion des Proteins konnte bisher jedoch nicht beschrieben werden (Deuschl *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2007).

Interessanterweise konnte Plbd2 als verbreitete Verunreinigung bei der Produktion von glykosylierten rekombinanten Proteinen in CHO-Zellen nachgewiesen werden (Valente *et al.*, 2015) und führte als solches bereits zum vorzeitigen Ende einer klinischen Studie, bei der Testpersonen Antikörper gegen Plbd2 entwickelten (Mihara *et al.*, 2015). Die Interaktion des Plbd2 mit Glykoproteinen und Antikörpern wurde daher weiter charakterisiert (Vanderlaan *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2018) und die Immunreaktion der Patienten als vernachlässigbar eingestuft (Fischer *et al.*, 2016). In Präparaten mit aufgereinigtem Protein wurde Plbd2 als Verunreinigung eine Funktion bei der Spaltung des Tensids Polysorbat 20 zugeschrieben (Dixit *et al.*, 2016).

1.2.2 Das lysosomale Protein Plbd1

Nachdem die Kristallstruktur des Plbd2 gelöst wurde, konnte anhand dieser auch die Struktur des homologen Proteins Plbd1 (35 % Sequenzidentität, 51 % Homologie) aufgeklärt werden (Repo *et al.*, 2014). Das Protein wurde ebenfalls der Superfamilie der Ntn-Hydrolasen zugeordnet, ohne dass die Funktion des Plbd1 bekannt ist. Die lysosomale Lokalisation konnte gezeigt werden (Della Valle *et al.*, 2011; Repo *et al.*, 2014). Im Gen des Plbd1 liegt im Exon 1 vor dem Translationsstart eine palindromische Sequenz (CACGTG; Sequenzen siehe Anhang), die dem Kernbereich des TFEB-Bindemotivs entspricht (Palmieri *et al.*, 2011) und auf eine Regulation über das CLEAR-Netzwerk lysosomaler Gene hindeuten könnte.

Plbd1 konnte bei der Untersuchung von Proteinen der sekretorischen Granula aus neutrophilen Granulozyten (Xu *et al.*, 2009) und in antimikrobiellen Monozyten identifiziert werden (Zhao *et al.*, 2009). Des Weiteren wurde Plbd1 als Marker für interstitielle Makrophagen der Lunge beschrieben (Gibbins *et al.*, 2015). Für eine Funktion in zirkulierenden Leukozyten spricht die Korrelation von Plbd1 im Blut mit dem Schweregrad einer Malaria-Infektion (Sobota *et al.*, 2016) und der Verwendung als Markerprotein im Blut bei Schlaganfall (Moore *et al.*, 2005).

1.3 Genveränderungen mittels CRISPR-Cas

Die Entdeckung, dass ein Mechanismus des bakteriellen Immunsystems zur Genveränderung in eukaryotischen Zellen genutzt werden kann, hat die Gentechnologie in den vergangenen Jahren revolutioniert (Doudna, Charpentier, 2014). Die einfache Erzeugung von Deletionen und Insertionen durch das CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)-Cas9-System lässt zudem auf zukünftige klinische Anwendung in der Gentherapie hoffen (Barrangou *et al.*, 2015).

Die Grundlage der CRISPR-Cas9-Methode ist ein System, das die Integration von Fragmenten invasiver genetischer Elemente in hypervariable Bereiche des mikrobiellen Genoms ermöglicht und damit eine adaptive hereditäre Immunabwehr bildet (Barrangou *et al.*, 2007). Aus den integrierten genetischen Elementen können CRISPR-RNAs (crRNA) transkribiert werden, die über einen als tracrRNA bezeichneten Adapter an CRISPR-assoziierte (Cas)-Proteine binden und die gezielte Restriktion von komplementären DNA-Sequenzen vermitteln (Mali *et al.*, 2013). Durch die Verbindung der crRNA mit der tracrRNA konnte das molekulare Werkzeug der *single-guide* RNA (sgRNA) geschaffen werden, mit dem gezielt DNA-Sequenzen adressiert und von der Cas9-Endonuklease geschnitten werden können (Jinek *et al.*, 2012). Die Bindung der sgRNA an der Zielsequenz beruht auf der komplementären Basenpaarung eines Abschnittes von etwa 20 Nukleotiden (Protospacer) und setzt das Vorliegen eines PAM-Erkennungsmotivs (*protospacer adjacent motif*) voraus (Van Erp *et al.*, 2015). Die Cas-Proteine prüfen die genomische DNA auf PAM-Motive, die für die am weitesten verbreitete Cas9 aus *Streptococcus pyogenes* aus zwei Guanin-Nukleotiden besteht und ermöglichen die Basenpaarung des Protospacers. Die Basenpaarung beginnt am PAM-Motiv und verläuft schrittweise, wobei besonders Fehlpaarungen nahe am PAM-Motiv den Abbruch der Interaktion bewirken können. Erst bei einer vollständigen Bindung des Protospacers kommt es zum „Einrasten“ der Cas-Proteine und der Erzeugung des Doppelstrangbruchs (Rutkauskas *et al.*, 2015). Bei der Reparatur der Doppelstrangbrüche treten in einzelnen Fällen Insertionen oder Deletionen (InDels) auf, die in Protein-codierenden Bereichen der DNA zu Defekten der Translationsprodukte führen können. Bei einer korrekten Reparatur kann der Genabschnitt erneut durch den Protospacer gebunden und durch die Cas-Nuklease geschnitten werden.

1.3.1 CRISPR-Cas9 als molekulares Werkzeug

Das CRISPR-Cas9-System aus dem Bakterium *S. pyogenes* hat als molekulares Werkzeug weite Verbreitung erlangt und ermöglicht in verschiedenen Organismen eine effiziente Genmanipulation durch Injektion von Plasmiden, die für die Cas9-Endonuklease und eine sgRNA codieren (Singh *et al.*, 2015). Während mit der Cas9-Endonuklease Doppelstrangbrüche (DSB) in die Zielsequenz

eingeführt werden können, ermöglicht eine Variante des Enzyms (Cas9-„Nickase“) die Erzeugung von zwei versetzten Einzelstrangbrüchen, wodurch die Spezifität der eingeführten Mutation gesteigert werden kann (Ran *et al.*, 2013). Die resultierenden Doppelstrangbrüche können über den Mechanismus des *nonhomologous end-joining* (NHEJ) religiert werden, oder in der *homology-directed-repair* (HDR) anhand einer Vorlage, in der Regel das Schwester-Chromatid, repariert werden (Chapman *et al.*, 2012). Während bei der NHEJ-Reparatur zufällige Insertionen oder Deletionen entstehen können, ermöglicht die Reparatur über HDR das gezielte Einführen von Mutationen. Durch die Injektion von Cas9-mRNA mit verschiedenen sgRNAs und einzelsträngigen DNA-Reparaturvorlagen in befruchtete murine Eizellen konnten transgene Tiere erzeugt werden, in denen über HDR-Reparatur sogar Mutationen in mehrere Genen erzeugt werden konnten (Wang, Yang, Shivalila, Dawlaty, *et al.*, 2013). Um den vergleichsweise geringen Anteil der HDR an der DSB-Reparatur zu steigern, kann die die NHEJ-Reparatur zudem über NHEJ-Ligase-Inhibitoren reduziert werden (Maruyama *et al.*, 2015).

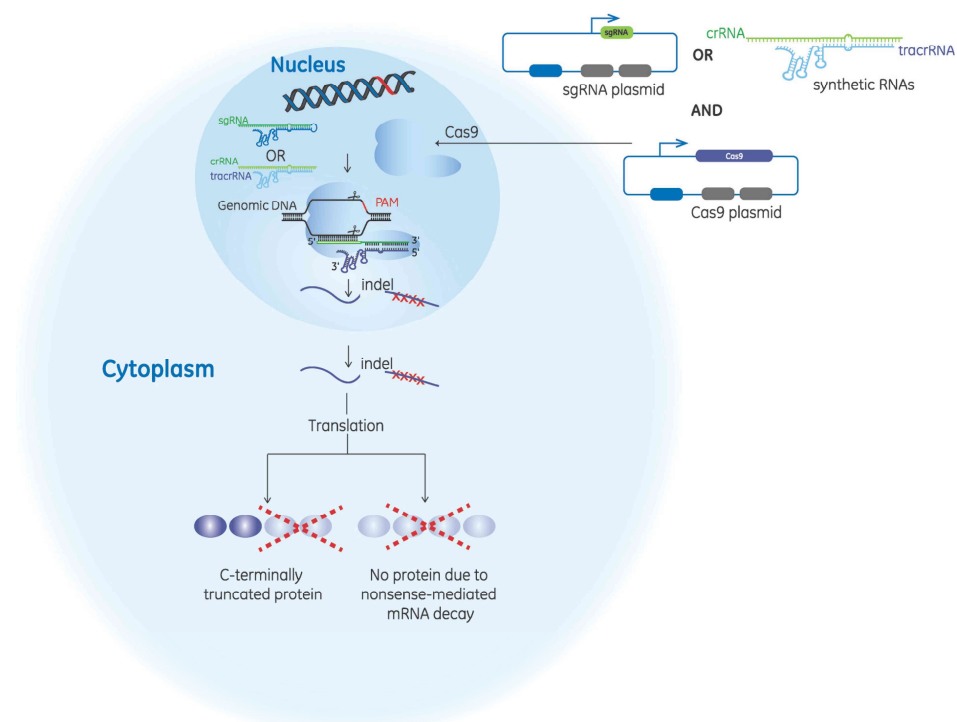


Abbildung 5: Genmanipulation mittels CRISPR-Cas9

Schematisch dargestellt ist der Mechanismus von CRISPR-Cas9 in der eukaryotischen Zelle. Expressionsplasmide von Cas9-Nuklease und sgRNA oder *in vitro* hergestellte mRNA und rekombinantes Protein werden in die Zelle transfiziert, im Nucleus assemblieren sgRNA und Cas9-Protein und binden an Zielsequenz. Durch die Cas9-Nuklease wird ein Doppelstrangbruch eingeführt, der in einigen Fällen fehlerhaft repariert wird und zu Insertionen oder Deletionen (InDels) führt. Bei einer Verschiebung des Leserasters wird die resultierende mutierte mRNA entweder abgebaut, oder resultiert in einem C-terminal verkürzten Protein. Abbildung aus Barrangou *et al.*, 2015.

Die Spezifität der Cas9-Endonuklease gegenüber einem Genabschnitt wird durch die Sequenzkomplementarität der *single-guide*-RNA (sgRNA) determiniert. Während die effizienteste Bindung bei einer vollständigen Sequenzkomplementarität stattfindet, können auch Zielsequenzen mit fehlerhafter Basenpaarung (*mismatches*, MM) von der sgRNA gebunden und der Cas9-Nuklease gespalten werden. Die Bindung hängt dabei sowohl von der Anzahl als auch von der Position der Fehlpaarungen ab (Rutkauskas *et al.*, 2015) und findet bevorzugt an aktiven Genabschnitten statt (Wu *et al.*, 2014). Über einen Algorithmus können die wahrscheinlichsten *off-target-sites* (OTS) jeder *guide*-RNA bestimmt werden, um etwaige unbeabsichtigte Mutationen zu identifizieren (Hsu *et al.*, 2013). Mit einer katalytisch inaktiven Cas9-Endonuklease konnte jedoch gezeigt werden, dass auch weitere unvorhergesehene Genabschnitte durch sgRNA und Cas9 gebunden werden (O'Geen *et al.*, 2015) und dort möglicherweise Mutationen entstehen (Schaefer *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2013). Wengleich die Relevanz der OTS-Mutationen umstritten bleibt, wird derzeit davon ausgegangen, dass OTS-Effekte bei der Erzeugung von Mausmodellen mit CRISPR-Cas9 keine Rolle spielen (Iyer *et al.*, 2018; Smith *et al.*, 2014; Veres *et al.*, 2014), sodass auf zeitaufwändige Rückkreuzungen in einen wildtypischen Hintergrund verzichtet werden kann (Markel *et al.*, 1997).

Die Möglichkeit mit CRISPR-Cas9 gezielte Mutationen in eukaryotischen Zellen zu erzeugen, hat neue Optionen im Bereich der Gentherapie eröffnet (Barrangou *et al.*, 2015). Nachdem in induziert-pluripotenten Stammzellen (iPSCs) bereits genetische Erkrankungen wie β -Thalassämie korrigiert werden konnten (Xie *et al.*, 2014), traten bei der erstmaligen Anwendung in humanen Zygoten jedoch Mosaik auf (Tang *et al.*, 2017), die einer Anwendung bei der humanen Gentherapie bis dato im Wege stehen. In neugeborenen Mäusen konnte durch die Injektion eines Cas9-sgRNA-Komplexes mit kationischen Lipiden in das Innenohr, ein autosomal-dominanter Hörverlust therapiert werden (Gao *et al.*, 2018). Für die Therapie im Gesamtorganismus stellt die geringe Verteilung des Komplexes über die Blutbahn jedoch eine Einschränkung dar, weshalb *in vivo* die Verwendung von AAV (adeno-assoziierten Viren)-Systemen bevorzugt wird (Yin *et al.*, 2017). Die virale Gentherapie erhöht jedoch das Risiko von unerwünschten *offtarget*-Effekten durch eine lange Persistenz der Cas-Nuklease in den Zellen (He *et al.*, 2017).

Um die Wahrscheinlichkeit von *offtarget*-Effekte zu reduzieren, wurden modifizierte Cas9-Endonukleasen mit verbesserter Spezifität entwickelt (Kleinstiver *et al.*, 2016), andere Enzyme wurden zur gezielten Veränderung von Basenpaaren ohne die Notwendigkeit eines Doppelstrangbruchs angepasst (Gaudelli *et al.*, 2017).

1.4 Zielsetzung

Für die lysosomale Hydrolase Plbd2 ist bisher weder ein physiologisches Substrat noch die molekulare Form, in der Plbd2-Aktivität erwartet werden kann, bekannt. In Vorarbeiten wurde aufgereinigtes Pro-Plbd2 nach Azidifizierung zum *in vitro*-Assay eingesetzt, ohne dass eine Aktivität gegen die getesteten putativen Substrate detektierbar war (Kettwig, 2010). Um Aktivitätsassays für potentielle Substrate mit physiologisch prozessiertem Plbd2 zu ermöglichen, sollte zunächst die Prozessierung des Plbd2 und die Entstehung der molekularen Formen aufgeklärt werden.

Die autokatalytische Spaltung des Pro-Plbd2 in ein α - und ein β -Fragment wurde in Vorarbeiten postuliert (Lakomek, 2009), jedoch bisher nicht systematisch untersucht. Diese Autokatalyse sollte *in vitro* nachvollzogen werden. Ferner sollte durch Mutation des katalytisch relevanten Cysteins die Autokatalyse und damit die Entstehung des enzymatisch aktiven Nukleophils unterbunden werden. Anhand dieser autokatalytisch-inaktiven Mutante könnten die weiteren Prozessierungsschritte untersucht werden.

Während die muren Formen der bisher charakterisierten lysosomalen Ntn-Hydrolasen aus einem α - und einem β -Fragment bestehen, konnte bei dem murinen Plbd2 eine weitere Spaltung des β -Fragments beobachtet werden. Die Position der Spaltstelle im β -Fragment des Plbd2 konnte bisher nicht eindeutig identifiziert werden, sodass zwei widersprüchliche Theorien zur Prozessierung postuliert wurden (Deuschl *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2007). Die Prozessierung sollte aufgeklärt und ein korrigiertes Prozessierungsschema erarbeitet werden.

Bereits in Vorarbeiten konnte eine Beteiligung der AEP an der Spaltung des β -Fragments postuliert werden (Peper, 2013), die im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte. Dazu sollten Expressionskonstrukte mit Punktmutationen an ausgewählten potentiellen Spaltstellen erzeugt werden, die eine direkte Spaltung durch die AEP inhibieren. Rekombinantes Plbd2 sollte zudem *in vitro* mit AEP inkubiert werden, um eine Spaltung an weiteren Positionen im Protein, zu untersuchen.

Als weitere Möglichkeit zur Identifizierung der physiologischen Funktion des Plbd2 sollte mittels der CRISPR-Cas9-Methode ein Plbd2-defizientes Mausmodell erzeugt werden. Aus möglichen phänotypischen Veränderungen der Plbd2-*knockout*-Mäuse könnte in einem revers-genetischen Ansatz auf die Funktion des Proteins geschlossen werden. Um eine Kompensation des Funktionsverlustes von Plbd2 durch das homologe Protein Plbd1 auszuschließen, sollten beide Gene in einem Doppel-*knockout*-Modell inaktiviert werden. Die Erzeugung dieser Mausmodelle sowie deren initiale Charakterisierung wird im Rahmen dieser Arbeit angestrebt. Mögliche pathologische Veränderungen oder die Akkumulation von nicht-abgebauten Metaboliten könnten dabei Hinweise auf die Funktion von Plbd2 und Plbd1 geben.

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoclav, Laboklav	SHP Steriltechnik
ECL-Kamera Luminescent Image Analyzer LAS 3000	Fuji Film Fuji Film
Eismaschine	Ziegra
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Technische Werkstatt der Fakultät
Elektrophoresekammer für Polyacrylamid-Gele	Technische Werkstatt der Fakultät
Elektrophoresekammer für Western-Blots	Technische Werkstatt der Fakultät
Elektrophoresekammer, Mini-Protean System	BIO-RAD
Elektrophorese Netzteil Consort E831/E835	Schütt Labortechnik
Filtrationsanlage MilliQ	Millipore
Gel Dokumentationsanlage LAS-1000	Fujifilm
Gefriertrocknungsanlage, Christ alpha 2-4 LSC mit SpeedVac RVC 2-18	Christ Christ
Gefrierschrank, -80 °C	Forma Scientific
Gefriertruhe, Ultra Low -80 °C	Sanyo
Gefriertruhe, Ultra Low -150 °C	Sanyo
Homogenisator, Potter S	B. Braun
Inkubator für Bakterienkulturen	Heraeus
Inkubator für Zellkultur, HERAcell	Heraeus
Inkubator, Schüttelinkubator Inova 4300	New Brunswick Scientific
Magnetrührer IKAMAG REO	IKA Labortechnik
Mikroliterpipetten	Gilson / Eppendorf
Mikroplatten Leser infinite M200	Tecan
Mikroskop, Leica DMIL	Leica
Mikroskop, Leica DM5000B mit Kamera DFC350FX	Leica
Mikrotom SM 2000R	Leica
Mikrowelle	Siemens
NanoDrop ND-1000	PeqLab
pH-Meter Seven Multi	Mettler Toledo

Gerät	Hersteller
Pipettierhilfe, Pipetaid	Drummond
Pipettierhilfe, pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Pipetten, Glas, 20 mL, 10 mL, 5 mL	Hirschmann Laborgeräte
Real-Time PCR cycler, Step One Plus	Applied Biosystems
Schüttelplattform	GFL / Heidolph
Sterilwerkbank, HERAsafe	Heraeus
Thermocycler PTC-200	MJ Research
Thermocycler peq STAR	PeqLab
Thermoschüttler, Thermomixer compact	Eppendorf
Transilluminator	PeqLab
Ultra-Turrax	IKA
Ultraschall Sonifier 450	Branson
Vortex-Genie 2	Bender & Hobein AG
Wasserbad	GFL
Zell-Zählkammer, Neubauer	Brand
Zentrifuge, Eppendorf 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge, Eppendorf 5804 R	Eppendorf
Zentrifuge, Eppendorf 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge, MIKRO 200R	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge, Optima MAX Ultrazentrifuge mit Rotor Sorvall® TLA-55	Beckmann Coulter Sorvall
Zentrifuge, Optima™ L-80 Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter
Zentrifuge, Sorvall® Ultra Pro 80 mit Rotor Sorvall® T-880	Thermo Scientific Sorvall
mit Rotor Sorvall® TH-641	Sorvall

2.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
10 ml (Mobicol) Columns with Bayonet Joint Lid	MoBiTec
96-well Mikrotiter-Platte, polystyrene, transparent	Greiner Bio-One
96-well Mikrotiter-Platte, CELLSTAR®, black	Greiner Bio-One
96-well qPCR-Platte, MicroAmp fast reaction plate	Applied Biosystems
Abdeckfolie für qPCR-Platten, Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems
Amicon® Ultra-4 Zentrifugenfilter, Ultracel®-30K/10K, 4 ml	Millipore
Blottingpapiere Rotilabo	Roth
Dialyseschlauch, MWCO 14 kDa	Roth
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Invitrogen

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Kanülen, diverse Größen	Braun
Ni ²⁺ -NTA-Agarose, Perfect Pro	5Prime GmbH
PCR-Reaktionsgefäße, 200 µL	Biozym / StarLab
Reaktionsgefäße, 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL	Sarstedt
Reaktionsgefäß für UZ, 1,5 mL, Microfuge [®] Tube Polyallomer	Beckman
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter	StarLab
Plastik-Röhrchen, 10 mL, 15 mL, 50 mL	Sarstedt
Roti-PVDF Membran 0,45 µm	Roth
Protease Inhibitor Cocktail P8340	Sigma
Spritze, 1 mL, 3 mL, 10 mL	Omnilab
Spritze U-100 Insulin	BD Medical
Spritzen-Vorsatzfilter, Filtropur S 0.2 µm	Sarstedt
Zellkultur Kryoröhrchen	Sarstedt
Zellkultur Flaschen T25 und T75 mit Filter	Sarstedt
Zellkultur Multiwell-Platten 96, 24, 12, 6 wells	Sarstedt
Zellkultur Platten 15 cm, 10 cm, 6 cm, 3 cm	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen, Ultra-Clear™ Tubes 14 x 89 mm	Beckman Coulter
Zentrifugenröhrchen für Rotor Ti75, 16 x 76 mm	DuPont Instruments

2.3 Chemikalien

Alle gebräuchlichen Standard-Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Invitrogen, Sigma-Aldrich oder Carl Roth bezogen.

Material	Hersteller
AEBSF	Sigma
Agarose, Universal-Agarose	Biobudget
Ammoniumpersulfat	Merck
Ampicillin Natriumsalz	Roth
BSA, Albumin Standard 2 mg/mL	Thermo Scientific
BSA, Album Fraktion V	Roth
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva
Desoxynukleosid triphosphate	Roche
Dabco	Roth
DAPI	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth

2 Material

Material	Hersteller
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), Pulver	Invitrogen
DNA Marker, 100 bp and 1 kb DNA-Marker	New England Biolabs
DMSO	VWR, Roth
E64d	Enzo Life Science
Ethidiumbromid, p.A., 1 % Lösung	Roth
Fötale Kälberserum (FKS)	PAN
L-Glutamin, 200 mM	Lonza
Goat-serum	Gibco, Invitrogen
Hämalaunlösung nach Mayer (Hämatoxyllin)	Roth
Hydrogen peroxide	Sigma
Hygromycin B	PAA, Roth
DNA-Ladepuffer, Gel Loading Dye Purple (6x)	NEB
Leupeptin	Biomol
Milchpulver, fettfrei	TSI
Mowiol	Roth
Natriumpyruvat-Lösung (100 mM)	PAA
OptiMEM Medium	Gibco, Invitrogen
<i>para</i> -formaldehyde	Roth
PEI MW 40 000	Polyscience Europe
Penicillin/Streptomycin, 10 U	Lonza
Pepstatin A	Sigma
Percoll	Amersham Bioscience
Poly-L-lysine	Alamanda Polymers
Roti [®] Histokitt	Roth
Rotiphorese [®] Gel 30 (30 % Acrylamid mit 0.8 % bis-Acrylamid (37,5: 1))	Roth
Proteinstandard, Precision Plus Protein Standards Dual Color	Bio-Rad
Puromycin	PAA
Saponin from Quillaja Bark	AppliChem
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Roth
SuperSignal West Chemiluminescent Substrate	Pierce
TEMED	Roth
Tyloxapol (Triton WR-1339), BioXtra	Sigma

2.4 Standardpuffer und Medien

Lösung	Zusammensetzung
DEPC-Wasser	0,2 % (v/v) DEPC in ddH ₂ O üN gerührt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	13,38 g/L DMEM Pulver 3,4 g/L NaHCO ₃ 10 ml/L 1 M HCl 0,1 g/L Phenolrot, pH 7,4 sterilfiltriert, 4 °C Lagertemperatur
DMEM Standardmedium	1 % (v/v) 100x penicillin (10000 U/mL) /streptomycin (10 mg/mL) 2 mM L-Glutamin-Lösung 10 % (v/v) fötales Kälberserum (FKS) in DMEM
LB (<i>lysogeny-broth</i>)-Medium	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl 0,1 % (w/v) Glukose in ddH ₂ O, pH 7,4
LB-Agar	1,5 % (w/v) Agar-Agar in LB-Medium
Mowiol/Dabco	8 g Mowiol 20 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5 20 ml Glycerin 2,5 % Dabco
Phosphatpuffer (PB)	19 % (v/v) 0,2 M NaH ₂ PO ₄ 81 % (v/v) 0,2 M Na ₂ HPO ₄ in ddH ₂ O
10x PBS (<i>Phosphate-buffered saline</i>)	1,4 M NaCl 27 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 18 mM KH ₂ PO ₄ in ddH ₂ O
SOC Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Trypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgSO ₄ 2 mM Glukose, in ddH ₂ O, pH 7.4
10x TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)	2 M Tris 50 mM EDTA mit Essigsäure auf pH 8,0
10x TBS (<i>Tris-buffered saline</i>)	100 mM Tris-HCl 1,5 M NaCl in ddH ₂ O, pH 7.4
TBS-T	0.1 % (v/v) Tween-20 in TBS

2.5 Enzyme und Kits

Enzym	Hersteller
AlwNI Endonuklease, 20 000 U/ml	New England Biolabs
Antarktische Phosphatase, 5 000 U/ml	New England Biolabs
BamHI	New England Biolabs
BsaHI, 10 000 U/ml	New England Biolabs
BIOTAQ DNA Polymerase	Bioline
DNase I	Applichem
DpnI Endonuklease, 20 000 U/ml	New England Biolabs
NheI-HF Endonuklease, 20 000 U/ml	New England Biolabs
NotI-HF Endonuklease, 20 000 U/ml	New England Biolabs
PNGase F	Promega
Proteinase K, ≥ 30 U/mg	Roth
T4 DNA Ligase 400 000 mU/ml	New England Biolabs
T7-Endonuklease I	NEB
Trypsin-EDTA	Lonza
XbaI-HF Endonuklease, 20 000 U/ml	New England Biolabs
XhoI-HF Endonuklease, 20 000 U/ml	New England Biolabs

Kit	Hersteller
DC™ Protein Assay Kit	Bio-Rad
innuPREP DOUBLEpure Kit	Analytik Jena
innuPREP Plasmid Mini Kit	Analytik Jena
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad
KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit	Kapa Biosystems (Roche)
KAPA2G Fast HotStart ReadyMix PCR Kit	Kapa Biosystems (Roche)
KAPA Mouse Genotyping Kit	Kapa Biosystems (Roche)
KAPA SYBR® FAST qPCR Kit	Kapa Biosystems (Roche)
Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit	Thermo Fischer
Pure Yield Plasmid Midiprep System	Promega
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
TA Cloning® Kit Dual Promotor (pCR® II)	Invitrogen

2.6 Antikörper

Spezies	Antikörper	Bezeichnung	WB	IF	Hersteller
Maus	α Actin	1E12	1:1000		Sigma-Aldrich
Kaninchen	α Cathepsin D	KIIS9	1:1500	1:500	Pohlmann et al., 1995
Kaninchen	α Cathepsin B	FL-339	1:300		Santa Cruz
Ratte	α F4/80			1:100	Austyn, Gordon, 1981
Kaninchen	α Gapdh	FL-335	1:400	1:250	Santa Cruz
Maus	α GFAP	GA5		1:500	Sigma
Ratte	α Lamp1 (Maus)	1D4B	1:1000	1:200	Santa Cruz
Maus	α Lamp1 (human)	H4A3	1:250	1:50	Santa Cruz
Maus	α Lamp2 (human)	H4B4	1:250	1:50	Santa Cruz
Kaninchen	α Limp2		1:1000	1:50	Pineda
Kaninchen	α Myeloperoxidase	MPO	1:500		Calbiochem
Kaninchen	α Plbd2	66G9	1:500	1:50	Deuschl et al., 2006
Kaninchen	α Plbd2	60H1		1:50	Deuschl et al., 2006
Kaninchen	α Plbd2	Crp76	1:500	1:50	Jensen et al., 2007
Kaninchen	α Plbd2	Irp76	1:500	1:50	Jensen et al., 2007
Kaninchen	α Plbd1 (Nat.)	P1N	1:500	1:50	Heikinheimo
Kaninchen	α Plbd1 (Denat.)	P1D	1:500	1:50	Heikinheimo
Maus	α PDI	RL90	1:5000		Abcam
Kaninchen	α Rab5a	621.3	1:250		Synaptic Systems
Maus	α RGS-His6	RGS-His	1:1500	1:100	Qiagen
Ziege	α rabbit-HRP	rab-HRP	1:5000		Jackson Imm.Res.

Spezies	Epitop	Kopplung	Verdünnung	Hersteller
Ziege	α Maus-IgG	HRP	1:5000	Invitrogen
Ziege	α Kaninchen-IgG	HRP	1:5000	Dianova
Ziege	α Ratte-IgG	HRP	1:5000	Dianova
Ziege	α Maus-IgG	Alexa Flour [®] 546	1:2000	Invitrogen
Ziege	α Maus-IgG	Alexa Flour [®] 633	1:2000	Invitrogen
Ziege	α Kaninchen-IgG	Alexa Flour [®] 488	1:2000	Invitrogen
Ziege	α Kaninchen-IgG	Alexa Flour [®] 546	1:2000	Invitrogen

2.7 Plasmide und Primer

2.7.1 Plasmide

Plasmid	Größe	Hersteller	Resistenz	Selektion
pEGFP-N3	4,7 kb	Clontech	Kana	Neo
pMS-SV40 LT	5,4 kb	Clontech	Amp	Puro
pGEM-T easy	5,4 kb	Promega	Amp	
pcDNA3.1/Hygro(+)-	5,6 kb	Invitrogen	Amp	Hygro
mPlbd2-RGS-His ₆	7,4 kb	Deuschl, 2008	- -	- -
mPlbd2-N375Q-RGS-His ₆	7,4 kb	Linhorst	- -	- -
mPlbd2-N380Q-RGS-His ₆	7,4 kb	Linhorst	- -	- -
mPlbd2-N380/381Q-RGS-His ₆	7,4 kb	Linhorst	- -	- -
mPlbd2-N394Q-RGS-His ₆	7,4 kb	Uffmann, 2014	- -	- -
mPlbd2-N432Q-RGS-His ₆	7,4 kb	Uffmann, 2014	- -	- -
mPlbd2-N441Q-RGS-His ₆	7,4 kb	Uffmann, 2014	- -	- -
mPlbd2-N487Q-RGS-His ₆	7,4 kb	Linhorst, 2014	- -	- -
mPlbd2-N501Q-RGS-His ₆	7,4 kb	Linhorst, 2014	- -	- -
mPlbd2-N505Q-RGS-His ₆	7,4 kb	Linhorst, 2014	- -	- -
mPlbd2-N508Q-RGS-His ₆	7,4 kb	Linhorst, 2014	- -	- -
mPlbd2-N517Q-RGS-His ₆	7,4 kb	Linhorst, 2014	- -	- -
mPlbd2-C249S-RGS-His ₆	7,4 kb	Kettwig, 2010	- -	- -
mPlbd2-C249A-RGS-His ₆	7,4 kb	Linhorst	- -	- -
mCathepsin_B	6,5 kb	B. Schröder, CAU Kiel	- -	- -
mCathepsin_B-RGS-His ₆	6,5 kb	Linhorst	- -	- -
mCathepsin_L	6,6 kb	B. Schröder, CAU Kiel	- -	- -
mCathepsin_L-RGS-His ₆	6,5 kb	Linhorst	- -	- -
mAEP-RGS-His ₆	6,9 kb	Linhorst	- -	- -
mPlbd1	7,2 kb	Linhorst	- -	- -
mPlbd1-RGS-His ₆	7,2 kb	Linhorst	- -	- -
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)-	9,2 kb	zur Verfügung gestellt	Amp	Puro
mPlbd1-Guide A	9,2 kb	von Feng Zhang	- -	- -
mPlbd1-Guide B	9,2 kb	(Addgene #48139)	- -	- -
mPlbd2-Guide A	9,2 kb		- -	- -
mPlbd2-Guide B	9,2 kb		- -	- -
mPlbd2-Guide C	9,2 kb		- -	- -
mPlbd2-Guide D	9,2 kb		- -	- -
mPlbd2-Guide E	9,2 kb		- -	- -
pUC57-sgRNA expression-Vector-	2,8 kb	zur Verfügung gestellt	Kana	
mPlbd1-Guide B	2,8 kb	von Xingxu Huang	- -	
mPlbd2-Guide B	2,8 kb	(Addgene #51132)	- -	
mPlbd2-Guide C	2,8 kb		- -	
mPlbd2-Guide D	2,8 kb		- -	
mPlbd2-Guide E	2,8 kb		- -	

2.7.2 Mutagenese- und Klonierungsprimer

Primer	Sequenz	GC	T _M -Basic
mPlbd2_N380Q_for	CAACAGCGGCACGTACCAGAACCAGTGGATGATTG	54 %	56,3 °C
mPlbd2_N380Q_rev	CAATCATCCACTGGTTCTGGTACGTGCCGCTGTTG	54 %	56,3 °C
mPlbd2_N380Q/N381Q_for	GTTCAACAGCGGCACGTACCAGCAGCAGTGGATGATTGTGGAC	56 %	60,5 °C
mPlbd2_N380Q/N381Q_rev	GTCCACAATCATCCACTGCTGCTGGTACGTGCCGCTGTTGAAC	56 %	60,5 °C
mPlbd2_N375Q_for	GACGTCCTCAAGCGGTTCCAGAGCGGCACGTACAATAAC	54 %	58,1 °C
mPlbd2_N375Q_rev	GTTATTGTACGTGCCGCTCTGGAACCGCTTGAAGACGTC	54 %	58,1 °C
mPlbd2_N358Q_for	GAAATGTCGTGGCCCAGCGCCTGGCCTTGG	67 %	58,1 °C
mPlbd2_N358Q_rev	CCAAGGCCAGGCGCTGGGCCACGACATTC	67 %	58,1 °C
mCtsB_HindIII_fwd	ACTTAAGCTTATGTGGTGGTCCTTG	44 %	44,3 °C
mCtsB_His6_XhoI_rev	TAGACTCGAGCTATCCGTGATGGTGATGGTGATGCGATCCTCT TCCGAATCTTCCCCAGTACTGG	52 %	64,4 °C
mCtsL_HindIII_fwd	ACTTAAGCTTATGAATCTTTTACTC	28 %	37,8 °C
mCtsL_His6_XhoI_rev	TAGACTCGAGCTATCCGTGATGGTGATGGTGATGCGATCCTCT TCCATTACGACAGGATAGCTGG	52 %	64,2 °C
mPlbd2_C249A_fwd	CTGGGCTCCGGTTCAGCCTCTGCCCTCATCAAG	64 %	58,9 °C
mPlbd2_C249A_rev	CTTGATGAGGGCAGAGGCTGAACCGGAGCCCAG	64 %	58,9 °C
mAEP-his6_HindIII_fwd	ACTTAAGCTTATGACCTGGAGAGTG	44 %	44,3 °C
mAEP-his6_XhoI_rev	TAGACTCGAGCTATCCGTGATGGTGATGGTGATGCGATCCTCT TCCGTAGTGACTAAGACACACTTTG	49 %	63,3 °C
mPlbd1_5-UTR	CCTAATCCAACCAGGCCGAG	60 %	44,1 °C
mPlbd1_3-UTR	AGCTAAGAGTGCCTTTGGTGT	48 %	40,7 °C
mPlbd1_HindIII_fwd	GTATAAGCTTGAGGAGCGATGTGCC	54 %	49,4 °C
mPlbd1_XbaI_rev	CGTGTCTAGACTATGACAAAATTGGTTTCATGG	39 %	49,0 °C
mPlbd1-his6_XbaI_rev	TAGATCTAGACTATCCGTGATGGTGATGGTGATGCGATCCTCTT CCTGACAAAATTGGTTTCATGG	44 %	61,1 °C

2.7.3 Genotypisierungs- und Sequenzierprimer

Primer	Sequenz	GC	T _M -Basic
mPlbd1_T7EN_Ex2_fwd (Intron 1/2)	GCTTGGCTGTTGATTGCACA	50 %	51,8 °C
mPlbd1_T7EN_Ex2_rev (Intron 2/3)	ACCTGCTTTCTACCCAACGG	55 %	53,8 °C
mPlbd2_T7EN_Ex1_fwd (5'-UTR)	ATCCCGGAAGCCCAAGCACAAG	59 %	58,6 °C
mPlbd2_T7EN_Ex1_rev (Intron 1/2)	GCTAGGGACAAATGGGCAGCAG	59 %	58,6 °C
mPlbd2_T7EN_Ex4_fwd (Intron 3/4)	AGGTCAGAGCCCCTGCTATTAT	50 %	54,8 °C
mPlbd2_T7EN_Ex4_rev (Intron 5/6)	AGGGGTAGATGGTGGTGGTA	55 %	53,8 °C
mPlbd2_T7EN_Ex5_fwd (Intron 4/5)	CCACTTCCTACTCCCAGAACC	57 %	56,3 °C
mPlbd2_T7EN_Ex5_rev (Intron 5/6)	GCCAAGTAAGAAATCCCCCAG	52 %	54,4 °C
mTet2_T7EN_fwd	CAGATGCTTAGGCCAATCAAG	48 %	52,4 °C
mTet2_T7EN_rev	AGAAGCAACACACATGAAGATG	41 %	51,1 °C
Cas9-SEQ-BCIII_fwd	GGGCCTATTTCCCATGATTCCT	50 %	54,8 °C
Cas9-SEQ-BCIII_rev	AGAGTGAAGCAGAACGTGGG	55 %	53,8 °C
mPlbd2_TL-66-F1 (5'-UTR)	GGGGACGCAGTCACGTGGCC	75 %	62,0 °C
mPlbd2_TL-66-F2 (5'-UTR)	CGTGGCCCCGGCTGCGGCTCG	85 %	66,1 °C

Primer	Sequenz	GC	T _M -Basic
mPlbd2_TL-66-F3 (Exon 2)	GCAGCTGGTGTGGTGGAGG	68 %	57,6 °C
mPlbd2_TL-66-F4 (Exon 5)	GCTGCTGCCTGGCGGGCATG	75 %	62,0 °C
mPlbd2_TL-66-F5 (Exon 8)	CCAGTGGATGATTGTGGACTAC	48 %	55,3 °C
mPlbd2_TL-66-F6 (Exon 11)	CTGACCTCAACCCCGCCAATG	62 %	58,3 °C
mPlbd2_TL-66-F7 (Exon 1)	GGGCGCTACGGCGGGCACTG	80 %	64,1 °C
mPlbd2_TL-66-F8 (Exon 1)	CTCGCGATGGCGGCCCCCGTG	81 %	66,1 °C
mPlbd2_TL-66-F9 (Exon 8)	CATTCCTCCCCAACGGACC	63 %	55,4 °C
mPlbd2_TL-66-F10 (Exon 2/3)	CCTCTGTGCTGAGGAGCTC	60 %	55,9 °C
mPlbd2_TL-66-F11 (Exon 3)	GTGGATGCAGAGGGAAATGG	55 %	53,8 °C
mPlbd2_TL-66-1R (3'-UTR)	GAAGGCAGCTAGGCGGAGGC	70 %	60,0 °C
mPlbd2_TL-66-2R (3'-UTR)	CAGGTGTATGACCCACTGGC	60 %	55,9 °C
mPlbd2_TL-66-R3 (Exon 5)	CATGCCCGCCAGGCAGCAGC	75 %	62,0 °C
mPlbd2_TL-66-R4 (Exon 7)	CCACTCCAGCACACAGCCC	68 %	57,6 °C
mPlbd2_TL-66-R5 (Exon 11)	CAGAGGGTCATGGAGGAAATC	52 %	54,4 °C
Human U6 Seq F_Insert	ACTATCATATGCTTACCGTAAC	36 %	49,2 °C
BGH_rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG	56 %	50,3 °C
T7BC_fwd	TAATACGACTCACTATAGGG	40 %	47,7 °C
pUC/M13_fwd	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG	52 %	57,1 °C
CMV_fwd	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	67 %	60,2 °C

2.7.4 Primer zur Genotypisierung von CRISPR-*offtarget*-Bindestellen (OTS)

Primer	Sequenz	GC	T _M -Basic
mPlbd1_GB_OTs1_fwd	GTCAACCCATGAGACCCAGG	60 %	55,9 °C
mPlbd1_GB_OTs1_rev	AGAATGAGCTGGTGTCTGGC	55 %	53,8 °C
mPlbd1_GB_OTs2_fwd	TTGCAGTGCCCCCTCCTTTTT	50 %	51,8 °C
mPlbd1_GB_OTs2_rev	AGAGGCCAATGCAGAGAAGG	55 %	53,8 °C
mPlbd2_GC_OTs1_fwd	TTTGCTATTGGGGGCTGTCT	50 %	51,8 °C
mPlbd2_GC_OTs1_rev	AGAGCCAGCTAATGCCAGTTT	48 %	52,4 °C
mPlbd2_GC_OTs2_fwd	GCCATGGGACAATAGAGGCA	55 %	53,8 °C
mPlbd2_GC_OTs2_rev	TTGTCCGACTGTGAGGCAAG	55 %	53,8 °C
mPlbd2_GD_OTs1_fwd	CAGCTTGCTTCCAGGGTTTC	55 %	53,8 °C
mPlbd2_GD_OTs1_rev	ATCAGAACGGCACATGCAC	50 %	51,8 °C
mPlbd2_GD_OTs2_fwd	CTTCCTCTCTGTCTTGAGCC	57 %	56,3 °C
mPlbd2_GD_OTs2_rev	TGACACGGGAGCCTTACT	55 %	53,8 °C
mPlbd2_GE_OTs1_fwd	GAGCAGTTGGTGTCCAGAGT	55 %	53,8 °C
mPlbd2_GE_OTs1_rev	CTGCGTCTCCTTCAGAACA	55 %	53,8 °C
mPlbd2_GE_OTs3_fwd	AGCAGAAGGCGGAATCACAG	55 %	53,8 °C
mPlbd2_GE_OTs3_rev	CTTTGGTATGGGAGCGTCCT	55 %	53,8 °C

2.7.5 Einzelsträngige Oligodesoxynukleotide (ssODN) als HDR-Reparaturvorlage

Die verwendeten ssODN Reparatur-Vorlagen wurden von Sigma-Aldrich bezogen (90mer, 0,0250 UMA, *desalted purification*).

Primer	Sequenz	Länge
mPlbd1_GuideB_Rep	AAGTGGAAATCAAGACGGTACTGGACAAGAATGGGGACGCCtgatctagaCC TACcGCTACTACAATGACTCCATTAATAAACACAGGCTG	90 nt
mPlbd2_GuideB_Rep	GCCGGTCTCCCGCACCCGCTCGCTGCTGCTGGACGCCGCGtgatctagaCGTC GcGCCAGCTGCGCCTGGAGGATGGCTTCCACCCCGAC	90 nt
mPlbd2_GuideD/E_Rep	CCTGAATAAGACCAACACCAAGCCTTCCCTGGGCTCgGGTTCAGCCTCTG CgCTCATCAAGCTGCTGCCTGGCGGGCATGACCTCCTGGT	90 nt

2.7.6 Quantitative-Real-Time-PCR Primer

Primer	Sequenz	GC	T _M -Basic
mPlbd1_qPCR_Ex5_fwd	TTTGGGAAATGGGCCACTGT	50 %	51,8 °C
mPlbd1_qPCR_Ex7_rev	TGCAGCAATATCAGGCCACT	50 %	51,8 °C
mPlbd2_qPCR_Ex5_fwd	AAGTACAGGCTGCAGTTCGG	55 %	53,8 °C
mPlbd2_qPCR_Ex7_rev	TATCCACTCCAGCACACAGC	55 %	53,8 °C
mPlbd2_qPCR_Ex8/9_fwd	TAGAACAGATCCCGGGCATGG	57 %	56,3 °C
mPlbd2_qPCR_Ex10_rev	GATCTTGGCTCGAGGGTTCT	55 %	53,8 °C
mGapdh_fwd	GCAGTGCCAGCCTCGTCCC	74 %	60,0 °C
mGapdh_rev	CAGGCGCCCAATACGGCCA	68 %	57,6 °C

2.8 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Defizienz	Referenz
MEF-AEP	Asparaginyl Endopeptidase ^{-/-}	Shirahama-Noda <i>et al.</i> , 2003
MEF-CtsB	Cathepsin B ^{-/-}	Halangk <i>et al.</i> , 2000
MEF-CtsL	Cathepsin L ^{-/-}	Roth <i>et al.</i> , 2000
MEF-CtsB/L	Cathepsin B ^{-/-} , Cathepsin L ^{-/-}	Felbor <i>et al.</i> , 2002
MEF-MLII	GNPTAB ^{-/-}	Kollmann <i>et al.</i> , 2012
MEF-MPR	CI-MPR300 ^{-/-} , CD-MPR46 ^{-/-} , Igf2 ^{-/-}	Pohlmann <i>et al.</i> , 1995
MEF-Plbd2-GeneTrap	Plbd2 knock-down	Kettwig, 2010

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
HeLa	Humane Zelllinie eines epitheloiden Zervixkarzinoms	Scherer <i>et al.</i> , 1953
HT1080	Humane Fibrosarcoma-Zelllinie	Rasheed <i>et al.</i> , 1974
HT1080-66	Stabil Plbd2-RGS-His ₆ -exprimierende HT1080-Zelllinie	Kettwig, 2010
MEF-WT	Murine embryonale Fibroblasten, Embryonaltag 12,5	Tadaro, Green, 1963
Neuro2a	Murine Neuroblastom-Zelllinie	Olmsted <i>et al.</i> , 1970
NIH-3T3	Immortalisierte murine Fibroblasten	Jainchill <i>et al.</i> , 1969

2.9 EDV

Software	Verwendung	Anbieter
Allen Brain Atlas	Referenzatlas des Maushirns	http://mouse.brain-map.org/static/atlas
BioGPS	Expressionsanalyse	Wu <i>et al.</i> , 2009 http://www.biogps.org/
BLAST+2.7.1	Sequenz alignment	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Chem Draw	Strukturformeln	Perkin Elmer
Compute pI/MW	Molekulargewichts-Bestimmung	https://web.expasy.org/compute_pi/ Gasteiger <i>et al.</i> , 2005
Ensembl Release 92	Genom-Analyse	http://www.ensembl.org/ Zerbino <i>et al.</i> , 2018
FinchTV v1.4.0	DNA-Sequenzanalyse	Geospiza Inc.
Gimp 2.8.22	Bildbearbeitung	Kimball, Mattis und Entwickler
ImageJ 1.51j8	Bildbearbeitung, Densitometrie	Wayne Rasband, NIH
Mendeley Desktop 1.17.13	Literaturverwaltung	Mendeley Ltd.
Microsoft Office	Bearbeitung von Text, Tabellen und Präsentationen	Microsoft Corporation
NEBCutter v2.0	Bestimmung von Restriktions-Schnittstellen	http://www.labtools.us/nebcutter-v2-0/ Vincze <i>et al.</i> , 2003
Protein Data Bank	Protein-Strukturen	http://www.rcsb.org/
PyMol 0.99rc6	Darstellung von Protein- Strukturen	Delano Scientific LLC
UniProt	Genom Sequenzen	http://www.uniprot.org/ The UniProt Consortium, 2016

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung und Reinigung von RNA

RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) aus Gewebehomogenaten oder Zellpellets isoliert. Für die Gewinnung von RNA aus Zellkultur wurden die Zellen einer konfluenten 10 cm Schale geerntet, durch Zentrifugation pelletiert und das Pellet zur Extraktion nach Angaben des Kits eingesetzt. Zur Gewinnung von RNA aus murinem Gewebe wurde das Versuchstier durch zervikale Dislokation getötet, die Organe entnommen und 50 mg der Gewebe in ein 10 mL Röhrchen eingewogen. 1 mL RLT-Puffer mit 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ β -Mercaptoethanol wurden zugegeben, das Gewebe am Ultra-Turrax (IKA) für etwa 15 s homogenisiert. Das Gerät wurde zuvor mit 2 M NaOH üN sterilisiert und zwischen den Geweben mit DEPC-Wasser gespült. Die RNA wurde aus den Homogenaten nach den Vorgaben des Kits isoliert, wobei über einen zusätzlichen Schritt die DNA auf der Säule verdaut wurde. Die Elution der RNA erfolgte mit 100 μL RNase-freiem Wasser. Die RNA-Konzentration wurde am NanoDrop ND-1000 Spektrometer (PeqLab) gemessen. Die RNA wurde zur cDNA-Synthese (Abschnitt 3.1.2) eingesetzt oder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.1.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte aus frisch gewonnener RNA (Abschnitt 3.1.1) nach den Angaben des iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). 1 μg RNA wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf 15 μL gebracht und mit 4 μL 5x iScript Reaktionsmix und 1 μL iScript Reverse Transkriptase zur cDNA-Synthese eingesetzt. Die cDNA wurde um Faktor 10 auf 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ verdünnt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.1.3 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA aus Zellpellets oder murinen Biopsien wurde mit dem KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit (Kapa Biosystems) isoliert. Das Material wurde mit 88 μL ddH₂O, 10 μL Extraktions-Puffer und 2 μL Extraktions-Enzym für 20 min bei 75 °C geschüttelt. Das Enzym wurde für 5 min bei 95 °C inaktiviert, Zellbestandteile durch Zentrifugation pelletiert, der Überstand abgenommen und zur PCR eingesetzt (Abschnitt 3.1.4.1).

3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt eine Standardmethode zur selektiven Amplifikation von DNA dar. Anhand einer DNA-Vorlage wird ausgehend von einem Primerpaar ein komplementärer DNA-Strang durch eine thermostabile DNA-Polymerase gebildet. Variationen der Methode entstehen beispielsweise durch die Verwendung spezieller Primer und Polymerasen oder der Quantifizierung der Amplifikation.

3.1.4.1 Genotypisierungs-PCR

Zur Genotypisierung der erstellten *knockout*-Mausmodelle wurden Primerpaare gewählt (NCBI Primerblast), mit denen in der PCR eine etwa 500 – 1500 bp große Sequenz um den gesuchten Genabschnitt amplifiziert wurde. Neben den Genabschnitten die mit den CRISPR-Cas9-sgRNAs adressiert wurden, wurden auch einige potentiellen *offtarget*-Stellen untersucht (vgl. Abschnitt 1.3.1). Die genomische DNA wurde extrahiert wie beschrieben (Abschnitt 3.1.3) und die relevanten Genabschnitte mit dem KAPA2G Fast HotStart ReadyMix PCR Kit (Kapa Biosystems) amplifiziert. Der Reaktionsansatz (Tabelle 1) und das PCR-Protokoll (Tabelle 2) wurde entsprechend der Herstellerangaben verwendet und die DNA im Thermocycler PTC-200 (MJ Research) amplifiziert.

Tabelle 1: Reaktionsansatz der Genotypisierungs-PCR.

Volumen	Reagenz
10 μL	2x KAPA2G Fast HotStart ReadyMix
1 μL	extrahierte DNA
1 μL (\cong 5 %)	DMSO
1 μL (\cong 0,5 μM)	fwd-Primer (10 μM)
1 μL (\cong 0,5 μM)	rev-Primer (10 μM)
6 μL	ddH ₂ O
20 μL	

Tabelle 2: PCR-Protokoll der Genotypisierungs-PCR.

Temp.	Zeit	Zyklen	Schritt
95 °C	3 min	x 1	Initiale Denaturierung
95 °C	15 s		Denaturierung
60 °C	15 s	x 40	Bindung
72 °C	30 s		Amplifikation
72 °C	5 min		Abschließende Amplifikation
4 °C	∞	x 1	Lagerung

Die PCR-Produkte wurden zur Genotypisierung eingesetzt (Abschnitt 3.4.2) oder mittels innuPREP DOUBLEpure Kit (Analytik Jena) gereinigt und zur Sequenzierung gegeben (Abschnitt 3.1.15).

3.1.4.2 Kolonie-PCR

Nach der Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA (Abschnitt 3.1.12 und 3.1.13) wurden diese auf LB-Antibiotika-Platten ausgestrichen und üN bei 37 °C inkubiert. Klone mit den gewünschten Plasmiden wurden über Kolonie-PCR identifiziert. Einzelne Kolonien wurden dazu mit einer Pipettenspitze aufgenommen, auf einer LB-Antibiotika-Masterplatte ausgestrichen und mit der Spitze in 20 µL Reaktions-Mastermix (Tabelle 3) pipettiert. Zur Amplifikation wurde ein Primer verwendet, der im Vektor-Rückgrat lag (T7BC-fwd, CMV-fwd, U6-fwd, M13-fwd, BGH-rev) und ein weiterer im Insert, das in den Vektor kloniert wurde. Eine Amplifikation konnte somit nur bei korrekter Integration stattfinden. Die PCR erfolgte im Thermocycler PTC-200 (MJ Research) nach dem Protokoll in Tabelle 4.

Zum Nachweis einer erfolgreichen Amplifikation, wurden 10 µL der PCR-Produkte mit 2 µL 6x Ladepuffer versetzt und über Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.1.5) untersucht.

Tabelle 3: Reaktionsansatz der Kolonie-PCR.

Volumen	Reagenz
2 µL	10x NH ₄ -Reaktionspuffer
1,2 µL (≅ 3 mM)	MgCl ₂ (50 mM)
0,4 µL (≅ 0,2 mM)	dNTPs (10 mM)
0,4 µL (≅ 0,2 µM)	Vektor-Primer (10 µM)
0,4 µL (≅ 0,2 µM)	Insert-Primer (10 µM)
0,2 µL	BioTaq DNA-Polymerase
15,4 µL	ddH ₂ O
20 µL	

Tabelle 4: PCR-Protokoll der Kolonie-PCR.

Temp.	Zeit	Zyklen	Schritt
95 °C	3 min	x 1	Initiale Denaturierung
95 °C	30 s		Denaturierung
55 °C	30 s	x 30	Bindung
68 °C	60 s		Amplifikation
72 °C	5 min		Abschließende Amplifikation
4 °C	∞	x 1	Lagerung

3.1.4.3 *add-on*-PCR

Um die cDNAs bestimmter Gene in den Vektor pcDNA3.1/Hygro+ klonieren zu können, wurden über *add-on*-PCR Schnittstellen für Restriktions-Endonukleasen an die Sequenz angefügt. Die verwendeten Primer wiesen dabei im 3'-Bereich eine Sequenzkomplementarität mit der Zielsequenz von 15 bp auf. Im 5'-Bereich wurde die Schnittstelle und vier Nukleotide als „Sockel“ für die Endonuklease angefügt. Für das Erstellen einer RGS-His₆-Modifikation am 3'-Ende der cDNA wurde die Sequenzkomplementarität auf etwa 20 bp erhöht. Die Länge der komplementären Bereiche wurde teilweise um einige Nukleotide variiert, um ein Primerpaar mit ähnlichen Schmelztemperaturen zu erhalten. Um die Entstehung von Punktmutationen zu vermeiden, wurde mit dem KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit (Kapa Biosystems) eine Polymerase mit Korrekturlesefunktion verwendet.

Tabelle 5: Reaktionsansatz der *add-on*-PCR.

Volumen	Reagenz
10 µL	2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix
1 µL	Plasmid-DNA (25 ng/µL)
1 µL (≅ 5 %)	DMSO
0,6 µL (≅ 0,3 µM)	fwd-Primer (10 µM)
0,6 µL (≅ 0,3 µM)	rev-Primer (10 µM)
6,8 µL	ddH ₂ O
20 µL	

Tabelle 6: PCR-Protokoll der *add-on*-PCR.

Temp.	Zeit	Zyklen	Schritt
95 °C	3 min	x 1	Initiale Denaturierung
98 °C	20 s		Denaturierung
60 ±10 °C	15 s	x 30	Bindung
72 °C	2 min		Amplifikation
72 °C	2 min		Abschließende Amplifikation
4 °C	∞	x 1	Lagerung

Der Reaktionsansatz wurde nach Vorgabe des Herstellers erstellt (Tabelle 5) und die Reaktion im Thermocycler peqSTAR (PeqLab) durchgeführt (Tabelle 6). Um die optimale Bindungstemperatur des Primerpaars zu erreichen, wurden mehrere Ansätze im Temperaturgradienten von 50 °C bis 70 °C erstellt. Die PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel gereinigt (Abschnitt 3.1.7), mit Restriktions-Endonukleasen verdaut (Abschnitt 3.1.8) und in den Zielvektor ligiert (Abschnitt 3.1.9).

3.1.4.4 Mutagenese-PCR

Zur Erzeugung von Mutationen in Plasmid-DNA wurde in der Mutagenese-PCR ein revers-komplementäres Primerpaar eingesetzt, das die gewünschte Mutation sowie etwa 30 flankierende Nukleotide trug. Um die Entstehung von unbeabsichtigten Punktmutationen zu vermeiden, wurde mit dem KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit (Kapa Biosystems) eine Polymerase mit Korrekturlesefunktion verwendet (Tabelle 7). Da in der Mutagenese-PCR nicht nur das Insert, sondern das gesamte Plasmid amplifiziert wurde, musste eine vergleichsweise lange Amplifikationszeit gewählt werden (Tabelle 8). Um die optimale Bindungstemperatur des Primerpaars zu erreichen, wurden mehrere Ansätze im Temperaturgradienten von 50 °C bis 70 °C im Thermocycler peqSTAR (PeqLab) erstellt.

Tabelle 7: Reaktionsansatz der Mutagenese-PCR.

Volumen	Reagenz
10 µL	2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix
1 µL	Plasmid-DNA (25 ng/µL)
1 µL (≅ 5 %)	DMSO
0,6 µL (≅ 0,3 µM)	fwd-Primer (10 µM)
0,6 µL (≅ 0,3 µM)	rev-Primer (10 µM)
6,8 µL	ddH ₂ O
20 µL	

Tabelle 8: PCR-Protokoll der Mutagenese-PCR.

Temp.	Zeit	Zyklen	Schritt
95 °C	3 min	x 1	Initiale Denaturierung
98 °C	20 s		Denaturierung
60 ±10 °C	15 s	x 25	Bindung
72 °C	10 min		Amplifikation
72 °C	10 min		Abschließende Amplifikation
4 °C	∞	x 1	Lagerung

Eine analytische Menge der PCR-Produkte wurde über Agarose-Gelelektrophorese untersucht (Abschnitt 3.1.5), um erfolgreiche Amplifikate zu identifizieren. Die entsprechenden Ansätze wurden mit DpnI verdaut, um die DNA des Ausgangsplasmids zu eliminieren und in chemisch kompetente *E. coli* DH5α transformiert (Abschnitt 3.1.12).

3.1.4.5 Quantitative-*real-time*-PCR

Zur Quantifizierung von DNA kann die Amplifikations-Reaktion in der quantitativen-*real-time*-PCR (qPCR) verfolgt werden. Verwendet wird die qPCR besonders zur Quantifizierung von Transkript-Mengen in Geweben nach vorangegangener reversen Transkription der mRNA in cDNA (Abschnitt 3.1.2). Bei dem verwendeten KAPA SYBR Fast Universal Kit (Kapa Biosystems) kann die Zunahme der Amplifikate anhand der Interkalation des Farbstoffes SYBR-green in doppelsträngige DNA verfolgt und aus der Amplifikationskurve auf die zugrundeliegende DNA-Menge geschlossen werden. Die Reaktionslösung wurde in 96-*well*-qPCR-Platten angesetzt, indem 10 μL eines Mastermix mit Template-DNA vorgelegt wurde und 2 μL eines Primermix zugegeben wurde (Tabelle 9). Die Reaktion wurde einschließlich einer Schmelzkurve im Step One Plus Real-Time PCR-Cycler (Applied Biosystems) durchgeführt (Tabelle 10).

Tabelle 9: Reaktionsansatz der qPCR.

Volumen	Reagenz
6 μL	2x KAPA SYBR FAST qPCR Mastermix
0,24 μL	ROX High
2 μL (\approx 10 ng)	cDNA (5 ng/ μL)
1,76 μL	ddH ₂ O
10 μL	
2 μL (\approx 0,2 μM)	fwd-/rev-Primermix (je 1,2 μM)
12 μL	

Tabelle 10: PCR-Protokoll der qPCR.

Temp.	Zeit	Zyklen	Schritt
95 °C	20 s	x 1	Initiale Denaturierung
95 °C	3 s	x 35	Denaturierung
60 °C	30 s		Bindung und Amplifikation
95 °C	15 s		Denaturierung
60 °C	1 min	x 1	Bindung
+0,3 °C alle 15 s			Schmelzkurve bis 95 °C
4 °C	∞	x 1	Lagerung

Aus den Amplifikationskurven wurden die Zyklen bestimmt, bei denen das Signal signifikant vom Hintergrundsignal abwich und die exponentielle Amplifikation der DNA detektierbar war (*threshold-cycle*, C_T -Wert). Die Absolute DNA-Menge konnte anhand der Amplifikation einer Standardreihe mit bekannter DNA-Konzentration bestimmt werden. Um die cDNA-Level in WT- und KO-Mäusen zu vergleichen, wurden die C_T -Werte auf die cDNA-Level von Gapdh als Referenzgen normiert (ΔC_T -Werte) und die Differenz zwischen WT- und KO-Werten gebildet ($\Delta\Delta C_T$ -Werte). Die relative Veränderung der Genexpression (RQ) in WT- und KO-Tieren konnte unter Berücksichtigung der Primereffizienz (E), durch $RQ = (E)^{-\Delta\Delta C_T}$ bestimmt werden (Pfaffl, 2001).

Die Primereffizienz wurde anhand einer DNA-Standardreihe mit bekannter Konzentration bestimmt, um die Amplifikation einer cDNA mit verschiedenen Primerpaaren vergleichen zu können. Dazu wurden die C_T -Werte gegen den dekadischen Logarithmus der DNA-Konzentration aufgetragen und aus der Steigung die Primereffizienz mit $E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$ bestimmt.

Die Spezifität der Amplifikation wurde anhand einer Schmelzkurve untersucht, wobei eine eindeutige Schmelztemperatur auf eine spezifische Amplifikation hindeutete, während mehrere Schmelzpunkte dagegen für die Amplifikation von Nebenprodukten sprachen. Die Amplifikate wurden über Agarose-Gelelektrophorese untersucht und nur Proben mit einer einzelnen PCR-Produktbande und C_T -Werten unterhalb des Leerwertes (*non template control*, NTC) zur Auswertung verwendet.

3.1.5 Trennung von DNA in Agarosegelen

DNA Fragmente können in Agarosegelen elektrophoretisch anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Dazu wurde, je nach Fragmentgröße, 1 %, 1,5 % oder 2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (Abschnitt 2.4) aufgekocht und nach kurzem Abkühlen 0,2 µL Ethidiumbromidlösung pro mL Puffer zugegeben. Die Lösung wurde in eine Gelkammer mit einem Kamm für die Ausformung von Taschen ausgehärtet. Das feste Gel wurde mit TAE-Puffer überschichtet, der Kamm entfernt und die Proben mit 6x DNA-Ladepuffer (NEB) in den Taschen aufgetragen. Zur Einordnung der DNA-Fragmentgrößen wurde zusätzlich ein DNA-Marker (NEB) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 80 mA für etwa 20 – 60 min. Die Trennung der Fragmente wurde im UV-Durchlicht (Transilluminator, PeqLab) nachgewiesen und dokumentiert (Consort E831/E835, Schütt Labortechnik).

3.1.6 Trennung von DNA in Polyacrylamidgelen

Anstelle von Agarosegelen (Abschnitt 3.1.5) können DNA-Fragmente auch in Polyacrylamid (PAA)-Gelen elektrophoretisch getrennt werden. Während die Trennung in der Agarose-Gelelektrophorese ausschließlich auf der Größe der DNA-Fragmente beruht, beeinflusst in der PAA-Gelelektrophorese (PAGE) auch die Sekundärstruktur die Laufeigenschaften der Fragmente. In der PAGE können deshalb DNA-Fragmente mit Fehlpaarungen im Doppelstrang von korrekt gepaarten Fragmenten unterschieden werden (Zhu *et al.*, 2014). Es wurde ein PAA-Gel mit 12,5 % Acrylamid angesetzt, in einem Protean Mini Gelsystem (Bio-Rad) zwischen Glasplatten gegossen und mit einem Kamm zur Ausformung von Taschen ausgehärtet. Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer mit TBE-Puffer eingebracht und die Elektrophorese für 2 h bei 150 V durchgeführt. Die Glasplatten wurden entfernt, das Gel für 10 min im Färbe-Bad (7,5 mg/L Ethidiumbromid) inkubiert und für 10 min im

Wasserbad entfärbt. Die Trennung der Fragmente wurde im UV-Durchlicht (Transilluminator, PeqLab) sichtbar gemacht und dokumentiert (Consort E831/E835, Schütt Labortechnik).

Tabelle 11: Ansatz für ein 12,5 % Polyacrylamid-TBE-Gel.

Volumen	Reagenz
6,1 mL	30,8 % Acrylamid-Lösung
3 mL	5x TBE-Puffer
125 µL	10 % APS in ddH ₂ O
12,5 µL	TEMED
5,8 mL	ddH ₂ O
15 mL	

Lösung	Zusammensetzung
5x TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer	0,45 M Tris 0,45 M Borsäure 10 mM EDTA in ddH ₂ O

3.1.7 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Banden aus Agarosegelen wurden diese nach der Elektrophorese (Abschnitt 3.1.5) unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mittels innuPREP DOUBLEpure Kit (Analytik Jena) aus den Gelstücken aufgereinigt. Die DNA wurde mit 30 µL ddH₂O eluiert, die Konzentration am NanoDrop ND-1000 (PeqLab) gemessen und die DNA-Konzentration gegebenenfalls durch Eindampfen in der SpeedVac RVC 2-18 (Christ) erhöht.

3.1.8 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten in Expressionsvektoren wurden die Vektoren mit Restriktions-Endonukleasen geschnitten, die einzelsträngige Nukleotid-Überhänge erzeugen und die DNA-Fragmente anhand komplementärer Nukleotid-Überhänge in die Vektoren ligiert (Abschnitt 3.1.9).

Zur Klonierung muriner cDNA in den Expressionsvektor pcDNA3.1/Hygro(+) wurde 1 µg des Vektors mit zwei TypII-Restriktions-Endonukleasen für 1 h bei 37 °C verdaut, um unterschiedliche 3'-Überhänge zu erzeugen und eine gerichtete Integration des DNA-Inserts zu ermöglichen. Um eine Religation des Vektors ohne DNA-Insert zu vermeiden, wurde der geschnittene Vektor mit der Antarktischen Phosphatase (NEB) dephosphoryliert, die bei Zusatz von ZnCl₂ im Puffer CutSmart (NEB) verwendet werden kann (Tabelle 12).

Tabelle 12: Reaktionsansatz des pcDNA3.1/Hygro(+)-Restriktions-Verdau.

Volumen	Reagenz
X μL	1 μg pcDNA3.1/Hygro(+) Vektor
0,5 μL	Restriktions-Endonukleasen A
0,5 μL	Restriktions-Endonukleasen B
1 μL	Antarktische Phosphatase (5 U/ μL)
1 μL	2 mM ZnCl_2
2 μL	10x CutSmart Puffer
15-X μL	ddH ₂ O
20 μL	

Der geschnittene, dephosphorylierte Vektor wurde in der Agarose-Gelelektrophorese von ungeschnittenem Vektor getrennt (Abschnitt 3.1.5) und die entsprechende Bande aus dem Gel isoliert (Abschnitt 3.1.7).

Die DNA-Inserts für die Ligation in den Vektor wurden in der *add-on*-PCR mit Restriktions-Schnittstellen versehen (Abschnitt 3.1.4.3), die den Schnittstellen im Vektor entsprechen. Nach der Aufreinigung der PCR-Produkte über ein Agarosegel wurden diese 1 h bei 37 °C mit den Restriktions-Endonukleasen inkubiert (Tabelle 13) und die Enzyme nach der Reaktion durch abkochen deaktiviert. Die DNA wurde über das innuPREP DOUBLEpure Kit (Analytik Jena) gereinigt (Abschnitt 3.1.7) und mit dem geschnittenen Vektor zur Ligation eingesetzt (Abschnitt 3.1.9).

Tabelle 13: Verdau von DNA-Inserts.

Volumen	Reagenz
26 μL	aufgereinigtes PCR-Produkt
0,5 μL	Restriktions-Endonuklease A
0,5 μL	Restriktions-Endonuklease B
3 μL	10x CutSmart Puffer
30 μL	

Tabelle 14: Reaktionsansatz des PX459-Restriktions-Verdau.

Volumen	Reagenz
X μL	1 μg PX459-Vektor
1 μL	BbsI (10 U/ μL)
1 μL	Antarktische Phosphatase (5 U/ μL)
1 μL	2 mM ZnCl_2
2 μL	10x CutSmart Puffer
15-X μL	ddH ₂ O
20 μL	

Für die Erzeugung von CRISPR-Cas9-sgRNA-Expressionsplasmiden wurde 1 μg des Vektors PX459 mit der TypIIS-Restriktions-Endonuklease BbsI für 1 h bei 37 °C verdaut und mit der Antarktischen Phosphatase (NEB) dephosphoryliert (Tabelle 14).

Der Vektor wurde über Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.1.5) und Gelextraktion (Abschnitt 3.1.7) aufgereinigt. Für die Ligation (Abschnitt 3.1.9) wurde ein doppelsträngiges DNA-Insert gebildet, indem komplementäre 20-Nukleotid-Primer mit 5'-Überhängen durch Erhitzen auf 95 °C und langsames Abkühlen einem *annealing* unterzogen wurden. Für die Klonierung der Guide-RNAs in den pUC57-sgRNA-Expressionsvektor wurde unter Verwendung der Endonuklease BsaI, entsprechend verfahren.

3.1.9 Ligation

Zur Ligation von Vektor und DNA-Insert wurden die Komponenten im molaren Verhältnis von $n_{\text{Vektor}}:n_{\text{Insert}} = 1:3$ gemischt und über Nacht bei 16 °C mit der T4-DNA-Ligase inkubiert (Tabelle 15). Die erzeugten Plasmide wurden in chemisch- (Abschnitt 3.1.12) oder elektro-kompetente (Abschnitt 3.1.13) Bakterien transformiert und positive Klone in der Kolonie-PCR identifiziert (Abschnitt 3.1.4.2).

Tabelle 15: Ligationsreaktion von Vektor und DNA-Insert.

Volumen	Reagenz
X μL	50 ng Vektor
Y μL	Insert ($n_{\text{Vektor}}:n_{\text{Insert}} = 1:3$)
1 μL	T4-DNA-Ligase
1 μL	10x T4-Ligasepuffer mit ATP
8-X-Y μL	ddH ₂ O
10 μL	

3.1.10 TA-Klonierung

Bei der PCR mit einer *Taq*-DNA-Polymerase wird unabhängig von der einzelsträngigen DNA-Vorlage am 3'-Ende des Amplifikats ein einzelnes Adenin-Nukleotid angefügt. PCR-Produkte dieser Polymerase können deshalb in Vektoren kloniert werden, die an der Restriktionsschnittstelle einen 3'-Überhang eines Thymins tragen. Zur Klonierung von cDNAs ohne Restriktionsschnittstellen wurden Transkripte über Primer in den jeweiligen 5'- und 3'-UTR-Bereichen mit dem KAPA2G Fast HotStart ReadyMix PCR Kit amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abschnitt 3.1.5), aus dem Gel extrahiert (Abschnitt 3.1.7) und mit dem TA Cloning[®] Kit Dual Promotor (Invitrogen) in einen pCR[®]II-TA-Vektor ligiert. Die Plasmide wurden in chemisch-kompetente Bakterien transformiert (Abschnitt 3.1.12) und Klone mit einer korrekten Insertion durch Amplifikation mit einem *fwd*-Primer im Insert und dem pUC/M13-*fwd*-Primer im Vektor durch Kolonie-PCR identifiziert (Abschnitt 3.1.4.2). Die Plasmide konnten zur *add-on*-PCR eingesetzt werden, um die Transkripte mit Restriktions-Schnittstellen zu versehen (Abschnitt 3.1.4.3).

3.1.11 Herstellung kompetenter Bakterien

Chemisch-kompetente *Escherichia coli* DH5 α wurden mit der CaCl₂-Methode nach Sambrook, Russell, 2006 hergestellt. 250 mL autoklaviertes antibiotikafreies LB-Medium wurde mit 10 mL frischer *E. coli* DH5 α Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,5 kultiviert. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis abgekühlt und bei 4000 xg und 4 °C für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde in 65 mL einer sterilen kalten 100 mM MgCl₂-Lösung aufgenommen, für 5 min inkubiert und erneut pelletiert. Das Pellet wurde in 13 mL einer kalten 100 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert und in 2,6 mL einer sterilen 85 mM CaCl₂-Lösung mit 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Aliquots zu 50 μ L wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Elektro-kompetente *Escherichia coli* DH5 α wurden durch Waschschrte mit kaltem ddH₂O hergestellt, um den Salzgehalt der Suspension für die Elektroporation zu reduzieren. 500 mL autoklaviertes antibiotikafreies LB-Medium wurde mit 2,5 mL einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5 α angeimpft und bis zu einer Dichte von OD₆₀₀ = 0,5 kultiviert. Die Suspension wurde auf Eis abgekühlt und bei 4000 xg und 4 °C für 20 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 250 mL kaltem sterilen ddH₂O resuspendiert und bei 4000 xg und 4 °C für 15 min erneut pelletiert. Das Pellet wurde in 125 mL kaltem sterilen ddH₂O resuspendiert und wie zuvor pelletiert. Das Pellet wurde mit 40 mL 10 % kaltem sterilen Glycerin resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 4600 xg und 4 °C für 15 min wurde das Pellet in 8 mL kaltem sterilen 10 % Glycerin aufgenommen und zu 40 μ L Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.12 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

Chemisch-kompetente *E. coli* DH5 α wurden auf Eis aufgetaut und 6 μ L Plasmid-DNA einer Ligationsreaktion (Abschnitt 3.1.9) oder Mutagenese-PCR (Abschnitt 3.1.4.4) wurden unter leichtem Rühren mit der Pipettenspitze hinzugegeben. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert, genau 1 min bei 42 °C erhitzt und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden mit 200 μ L vorgewärmten SOC-Medium versetzt und 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde auf LB-Agarplatten mit Ampicillin oder Kanamycin (100 μ g/mL) zur Selektion ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelklone mit erfolgreicher Transformation wurden durch Kolonie-PCR identifiziert (Abschnitt 3.1.4.2) und die Plasmid-DNA amplifiziert (Abschnitt 3.1.14).

3.1.13 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Elektro-kompetente *E. coli* DH5 α wurden auf Eis aufgetaut und, je nach Salzgehalt, 1 - 5 μ L Plasmid-DNA unter leichtem Rühren mit der Pipettenspitze zugegeben. Die Suspension wurde in eine

vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und durch leichtes Klopfen gleichmäßig verteilt. Die Elektroporation wurde im Electroporator 2510 (Eppendorf) bei 1800 V durchgeführt, wobei ein *time constant* Wert zwischen 4 und 5 eine erfolgreiche Elektroporation anzeigte. Mit einer Glaspipette wurde die Suspension mit 500 µL vorgewärmtem SOC-Medium aus der Küvette gespült und 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde auf LB-Agarplatten mit Ampicillin oder Kanamycin (100 µg/mL) zur Selektion ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelklone mit erfolgreicher Transformation wurden durch Kolonie-PCR identifiziert (Abschnitt 3.1.4.2) und die Plasmid-DNA amplifiziert (Abschnitt 3.1.14).

3.1.14 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Klone von *E. coli* DH5 α , mit erfolgreicher Transformation von korrekt ligierten Plasmiden, wurden über Kolonie-PCR identifiziert und auf einer LB-Antibiotika-Masterplatte ausgestrichen (Abschnitt 3.1.4.2). Von der Masterplatte wurden Übernachtskulturen der Bakterien angeimpft, um die Plasmid-DNA nach analytischer Präparation durch Sequenzierung zu überprüfen.

Für die analytische Präparation der Plasmid-DNA wurde 5 mL LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin oder Kanamycin mit den transformierten *E. coli* DH5 α angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die Zellen wurden bei 13000 xg für 10 min pelletiert und die Plasmid-DNA mit dem innuPREP Plasmid Mini Kit (Analytic Jena) isoliert. Nach der Elution mit 30 µL ddH₂O wurde die DNA-Konzentration gemessen (NanoDrop ND-1000, PeqLab) und die Konzentration durch Eindampfen (SpeedVac RVC 2-18, Christ) und Resuspendieren angepasst. Die DNA wurde zur Sequenzierung (Abschnitt 3.1.15) verwendet und konnte bei -20 °C gelagert werden.

Um Plasmid-DNA quantitativ aufzureinigen und eine höhere Reinheit zu erhalten, wurde das Volumen der Übernachtskultur auf 150 mL erhöht. Die Präparation erfolgte mit dem Pure Yield Plasmid Midiprep System (Promega), wobei die Elution mit 600 µL ddH₂O durchgeführt wurde. Die DNA-Konzentration wurde durch Eindampfen und Resuspendieren auf 0,5 µg/µL oder 1 µg/µL eingestellt.

3.1.15 Sequenzierung

Um DNA auf Mutationen zu überprüfen und Ligationsreaktionen zu validieren, wurden PCR-Produkte oder Plasmid-DNA aus analytischer Plasmid-Präparation (Abschnitt 3.1.14) sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch die *Sequencing Core Facility* (Universität Bielefeld) mit Abi Prism 377, 3100 und 3730xl Sequenzierautomaten (Applied Biosystems) unter Verwendung von BigDye-terminator v3.1 Chemie. Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde diese auf 250 ng/µL eingestellt

und 10 µL zur Sequenzierung abgegeben, PCR-Fragmente wurden, je nach Fragmentgröße, auf 10 ng/µL oder 50 ng/µL eingestellt und 5 - 10 µL abgegeben. Sequenzierprimer wurden mit 10 µM verwendet. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit der FinchTV-Software (Geospiza Inc.).

3.1.16 Mutationsanalyse mit T7-Endonuklease I

Die Restriktions-Endonuklease T7-Endonuklease I (T7En) spaltet fehlgepaarte Doppelsträngige DNA, was zur Mutationsanalyse in kultivierten Zellen und murinen Geweben genutzt werden konnte. Genomische DNA wurde mit dem KAPA Mouse Genotyping Kit (KAPA Biosystems) extrahiert (Abschnitt 3.1.3) und die relevanten Genbereiche in der Genotypisierungs-PCR amplifiziert (Abschnitt 3.1.4.1). Die PCR-Amplifikate wurden über das InnuPREP DOUBLEpure Kit (Analytik Jena) gereinigt und in 30 µL ddH₂O eluiert. Die Konzentration wurde am Nanodrop ND-1000 (PeqLab) bestimmt und 300 ng DNA mit ddH₂O auf 9 µL gebracht. Zu der Lösung wurde 1 µL NEB-Puffer 2 gegeben und der Ansatz im Thermocycler PeqSTAR (PeqLab) einem *reannealing* unterzogen (Tabelle 16).

Tabelle 16: PCR-Protokoll zum *reannealing* von DNA.

Temp.	Zeit	Schritt
95 °C	5 min	Denaturierung
95 °C - 85 °C	-2 °C/s	<i>reannealing</i>
85 °C - 25 °C	-0,1 °C/s	
4 °C	∞	Lagerung

Durch die Denaturierung und das *reannealing* werden homolog gepaarte DNA-Doppelstränge getrennt und neu assoziiert, sodass im Fall von Mutationen in heterozygotem Ausgangsmaterial auch heterologe DNA-Doppelstränge mit Fehlpaarungen entstehen können. Zu den Ansätzen wurde 2 µL T7En-Mastermix (Tabelle 17) oder ddH₂O als Kontrolle gegeben und die Proben 90 min bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 17: T7En-Mastermix.

Volumen	Reagenz
0,3 µL	T7-Endonuklease I
0,2 µL	10x NEB-Puffer 2
1,5 µL	ddH ₂ O

Die Proben wurden über Agarose-Gelelektrophorese getrennt (Abschnitt 3.1.5) und die Banden unter UV-Licht dokumentiert. Der Anteil der entstandenen Spaltprodukte (*fcut*) am Gesamtsignal wurde quantifiziert (ImageJ-Software) und daraus mit der Formel

$$\text{InDel} = 1 - \sqrt{1 - \text{fcut}}$$

die Mutationsrate (InDel-Rate) berechnet.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Gewinnung von Zelllysaten aus Zellpellets

Zur Gewinnung von Zelllysaten aus kultivierten Zellen wurden die Zellkulturschalen zweimal mit PBS gewaschen, der Puffer vollständig abgenommen und auf Eis 0,5 mL (6-well-Platte), 1 mL (10 cm Schale) oder 1,5 mL (15 cm Schale) PBS zugegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber gelöst und mit dem Puffer in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 500 xg und 4 °C für 5 min wurde der Überstand verworfen. Um das Pellet zu lagern, wurden die Zellen in 0,5 mL PBS mit 1x Proteinase Inhibitor Cocktail (Sigma) aufgenommen und erneut pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde bei -20 °C gelagert. Zum Zellaufschluss wurde das frische bzw. gelagerte Pellet je nach Größe mit 50 µL – 150 µL Lysepuffer resuspendiert. Die Suspension wurde durch Ultraschall am Sonifier 450 (Branson, 2x 20 s mit 40 s Unterbrechung, Output Control 7, Duty Cycle 40 %) lysiert. Die Proben wurden weitere 60 min auf Eis inkubiert, durch Vortexen gemischt und bei 13000 xg und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden zur Proteinbestimmung (Abschnitt 3.2.3) und weiteren Experimenten eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

Lösung	Zusammensetzung
Lysepuffer	0,5 % Triton X-100 1x Proteinase Inhibitor Cocktail (Sigma) in PBS

3.2.2 Anreicherung von Zellorganellen aus Zellhomogenaten

Zur Anreicherung von Proteinen aus Organellen des sekretorischen Wegs und des endo-lysosomalen Systems können die intrazellulären Organellen durch differentielle Zentrifugation von Cytoplasma, Zellkernen und großen Teilen der Zellmembran getrennt werden. Die Zellen wurden dazu auf einer 15 cm Zellkulturschale zweimal mit 10 mL PBS und einmal mit 10 mL Homogenisierungspuffer gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber in 1 mL Homogenisierungspuffer abgeschabt und bei 500 xg und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 300 µL Homogenisierungspuffer resuspendiert und zum Quellen der Zellen 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 24 Passagen durch eine 27 Gauge Kanüle homogenisiert und 10 min bei 1000 xg und 4 °C zentrifugiert, um ein Pellet mit Zellkernen und Membrantrümmern zu erhalten. Der Überstand (*post nuclear supernatant*, PNS) wurde abgenommen und bei 15000 xg und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand mit den cytosolischen Bestandteilen wurde abgenommen und aus den Zellorganellen im Pellet Lysate hergestellt (Abschnitt 3.2.1), in denen lysosomale Proteine angereichert wurden (*lysosomal enriched fraction*, LEF).

Lösung	Zusammensetzung
Homogenisierungspuffer	250 mM Sucrose 10 mM HEPES/NaOH 1mM EDTA in ddH ₂ O pH 7,4

3.2.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen aufgearbeiteter Lysate (Abschnitt 3.2.1) wurde das DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) verwendet. Die Konzentration der Proteine wurde anhand einer Standardreihe mit bekannter BSA-Konzentration zwischen 25 µg/mL und 2000 µg/mL bestimmt. Der Assay basiert auf der Methode zur Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951), bei der eine Komplexbildung von Cu(II)-Ionen durch die Amidbindung der Proteine stattfindet und nach der Reduktion des Kupfers ein Folinreagenz reduziert wird. Die Reduktion des Folinreagenz ist als Farbumschlag von Gelb zu Blau bei 750 nm zu verfolgen.

Während das DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) bis zu 1 % Triton X-100 toleriert, ist die Messung empfindlich für Imidazol. Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinen, die über Ni²⁺-NTA-Agarosebeads aufgereinigt wurden und aufgrund der Elution mit Imidazol nicht im DC Protein Assay eingesetzt werden konnten, wurde die Proteinkonzentration über das Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (Thermo Fischer) bestimmt. Der Bradford-Assay ist empfindlich für Triton X-100 Konzentrationen über 0,062 %, toleriert jedoch Imidazol bis 200 mM. Der Assay beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie G-250 an basische Aminosäure-Seitenketten und einem einhergehenden Farbumschlag von rötlich Braun zu Blau, der durch die Absorption bei 595 nm verfolgt werden kann (Bradford, 1976).

3.2.3.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Konzentrationsbestimmung von Lysaten wurde 10 µL der Standardreihe und eines Wasser-Leerwertes in Doppelbestimmung in eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. Ausgehend von Zelllysaten (Abschnitt 3.2.1) wurden 5 µL der Proben 1:5 oder 1:10 in ddH₂O verdünnt, bei Lysaten von Gewebehomogenaten (Abschnitt 3.4.3) wurde 5 µL Probe 1:15 oder 1:20 verdünnt. 10 µL der verdünnten Proben und eines entsprechend verdünnten Puffer-Leerwertes wurden ebenfalls in Doppelbestimmung in die 96-well Platte pipettiert und 25 µL Reagenz A' hinzugegeben. Mit einer Stepper-Pipette wurden 200 µL Reagenz B hinzugefügt und die Lösung 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Der Farbumschlag wurde am Mikroplattenleser infinite M200 (Tecan) bei 750 nm dokumentiert und aus der Standardreihe die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

Lösung	Zusammensetzung
Reagenz A	alkalisches Folinreagenz (Bio-Rad)
Reagenz A'	Reagenz A mit 2 % Reagenz S (Tensid-Lösung mit SDS, Bio-Rad)
Reagenz B	verdünntes Folinreagenz (Bio-Rad)

3.2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Konzentrationsbestimmung aufgereinigter Proteine wurden 10 μL einer Standardreihe und 10 μL der Elutionsfraktionen aus der Proteinaufreinigung (Abschnitt 3.2.11) in Doppelbestimmung in eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. Mit einer Stepper-Pipette wurde 200 μL Bradford-Reagenz zugegeben und die Lösung 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Der Farbumschlag wurde am Mikroplattenleser infinite M200 (Tecan) bei 595 nm dokumentiert und aus der Standardreihe die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden entsprechend ihrer Größe in der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt. Dazu wurde ein SDS-Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen (Tabelle 18) und mit Isopropanol überschichtet, um eine ebene Oberfläche zu bilden und das Gel vor dem Austrocknen zu schützen. Nach dem Aushärten wurde das Isopropanol mit dH_2O abgespült, die Geloberfläche von Flüssigkeitsrückständen befreit und darauf ein Sammelgel mit einem Kamm zur Ausbildung von Taschen gegossen. Nach dem Aushärten des Sammelgels wurde der Kamm unter fließendem dH_2O entfernt und das SDS-Gel in eine SDS-Gel-Elektrophoresekammer eingesetzt. Zum gießen der Gele wurde entweder das Mini-PROTEAN System (Bio-Rad) mit 1,5 mm dicken Stegen und eine Trennstrecke von etwa 5,5 cm verwendet oder selbsthergestellte Glasplatten mit 1,5 mm dicken Kunststoffstegen und einer Trennstrecke von etwa 8 cm eingesetzt. Durch verschiedene Acrylamid-Konzentrationen im Trenngel wurde das Laufverhalten der Proteine beeinflusst, wobei ein höherer Acrylamidgehalt zu einer stärkeren Trennung im niedrigen Molekulargewichtsbereich führte.

Tabelle 18: Trenn- und Sammelgele zur SDS-PAGE.

	Trenngel		Sammelgel
Acrylamid Konzentration	12,5 %	15 %	5 %
30,8 % Acrylamid-Lösung	4,1 mL	4,9 mL	1,3 mL
Sammelgelpuffer	-	-	2,5 mL
Trenngelpuffer	2,5 mL	2,5 mL	-
10 % APS in ddH_2O	83 μL	83 μL	100 μL
TEMED	8,5 μL	8,5 μL	10 μL
ddH_2O	3,4 mL	2,6 mL	6,1 mL
	10 mL	10 mL	10 mL

Die Gele wurden in den Elektrophoresekammern mit 1x SDS-Laufpuffer überschichtet, die Proteinproben mit 6x Lämmli-Puffer gemischt und durch Inkubation bei 95 °C für 5 min denaturiert. Die Proben wurden mit einer Mikroliterspritze (Hamilton) in die Taschen pipettiert und als Referenz ein Proteinstandard (Bio-Rad) in einer Tasche mitgeführt. Die Proben wurden bei 90 V für 30 min in das Gel eingetragen und bei 150 V für 2 h (5,5 cm Mini PROTEAN-Gele) oder 35 mA und etwa 3 – 4 h (8 cm große Gele) getrennt, bis die Laufmittelfront den unteren Gelrand erreichte. Große Gele wurden alternativ bei 40 V für 14,5 h über Nacht verwendet. Nach der Trennung im Gel wurden die Proteine mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 nachgewiesen (Abschnitt 3.2.7) oder im Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen (Abschnitt 3.2.5).

Lösung	Zusammensetzung
30,8 % Acrylamid-Lösung	Rotiphorese [®] Gel 30 (37,5:1): 30 % Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl 0,4 % SDS in ddH ₂ O pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl 0,4 % SDS in ddH ₂ O pH 6,8
6x Lämmli-Puffer	60 mM Tris/HCl, pH 6,8 12 % (w/v) SDS 47 % (v/v) Glycerol 0,06 % (w/v) Bromphenol Blau 12 % (v/v) β-Mercaptoethanol
10x SDS-Laufpuffer	1,92 M Glycin 0,5 M Tris/HCl 1 % (w/v) SDS in ddH ₂ O

3.2.5 Western-Blot und Immundetektion von Proteinen

Nach der Trennung in der SDS-PAGE (Abschnitt 3.2.4) wurden die Proteine im *semi-dry* Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen, um einen Nachweis mit spezifischen Antikörpern zu ermöglichen. Zwei Blottingpapiere (Rotilabo 0,35 mm und 1,5 mm; Roth) sowie das Trenngel wurden in Kathodenpuffer getränkt und mit viel Flüssigkeit auf die Kathodenplatte einer Western-Blot Elektrophoresekammer gestapelt. Eine PVDF-Membran wurde durch etwa 30 s Schwenken in Methanol aktiviert und ebenso in Kathodenpuffer inkubiert. Die Membran wurde auf das Gel gelegt und bei leichtem Druck angerollt. Zwei weitere Blottingpapiere (Rotilabo 0,35 mm und 1,5 mm; Roth) wurden in Anodenpuffer inkubiert, auf die Membran gelegt und mit leichtem Druck angerollt. Auf den Stapel wurde etwas Anodenpuffer gegossen, die Anodenplatte hinzugefügt und mit etwa

1 kg Gewicht beschwert. Die Übertragung der Proteine erfolgte bei 1,1 mA/cm² für 80 min, wobei die Übertragungszeit verlängert wurde, sofern die Spannung nach 80 min nicht über 10 V gestiegen war.

Nach dem Western-Blot wurde die Membran 1 h in Blotto geschwenkt, um Protein-Protein-Interaktionen abzusättigen. Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C in 5 mL Erstantikörper (Abschnitt 2.6) in Blotto in einem 50 mL Röhrchen auf einem Rollmischer inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit TBS-T gespült und 30 min in TBS-T geschwenkt. Anschließend wurde die Membran für 1 h in Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper in Blotto (1:5000) inkubiert, erneut dreimal mit TBS-T gewaschen und dreimal 20 min in TBS-T geschwenkt.

Die Detektion der gebundenen Zweitantikörper erfolgte an der Fujifilm LAS 3000 *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Kamera durch Überschichtung der Membran mit ECL-Reagenz. Zur gleichmäßigeren Verteilung des Reagenz wurde die Membran in eine Klarsichtfolie eingeschlagen. Das im ECL-Reagenz enthaltene Luminol wird durch die Antikörper-gekoppelte Peroxidase unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid gespalten, wobei angeregtes 3-Aminophthalat entsteht, das bei der Relaxation chemilumineszentes Licht abgibt. Die Emission wird in der ECL-Kamera Ortsauflösung detektiert und lässt auf die Position der jeweiligen Antikörper-gebundenen Proteine schließen.

Lösung	Zusammensetzung
Anodenpuffer	75 mM Tris-HCl 20 % (v/v) Methanol in ddH ₂ O, pH 7,5
Kathodenpuffer	40 mM 6-Aminocapronsäure 25 mM Tris-HCl 20 % (v/v) Methanol in ddH ₂ O, pH 9,0
Blotto	5 % Magermilchpulver in TBS-T
ECL-Reagenz	1 mL Lösung A 0,1 M Tris/HCl 0,25 mg/mL Luminol in ddH ₂ O pH 8,6 100 µL Lösung B 1,1 mg/mL p-Coumarinsäure in DMSO 100 µL Supersignal West Pico Stable Peroxide Solution 100 µL Supersignal West Pico Luminol/Enhancer Solution 3 µL H ₂ O ₂

3.2.6 Reinigen, Trocknen und Reaktivieren von PVDF-Membranen

Gebundene Antikörper können durch Inkubation bei stark basischem pH-Wert von einer PVDF-Membran gelöst werden, um eine Immundetektion mit weiteren Antikörpern zu ermöglichen. Die Membran wurde dazu 5 min in dH₂O und zweimal 5 min in 0,2 M NaOH geschwenkt. Die Membran wurde zweimal mit dH₂O, zweimal mit TBS-T gewaschen und 5 min in TBS-T geschwenkt. Nach Inkubation für 1 h in Blotto konnte die Membran neuem Erstantikörper behandelt werden.

Um PVDF-Membranen mit gebundenen Proteinen zu lagern wurden, diese mit dH₂O gewaschen und auf einem Papiertuch getrocknet. Zur Reaktivierung wurde die Membran 15 min in Anodenpuffer geschwenkt, dreimal mit TBS-T gespült und 5 min in TBS-T geschwenkt. Nach Inkubation in Blotto konnte die Membran mit frischem Zweitantikörper oder bei vorheriger Reinigung mit NaOH mit neuem Erstantikörper inkubiert werden.

3.2.7 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Zur Färbung der Proteine im SDS-Polyacrylamid (PAA)-Gel kann der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 verwendet werden. Die Coomassie-Färbung wurde besonders bei SDS-PAA-Gelen von aufgereinigten Proteinen (Abschnitt 3.2.11) verwendet. Das Gel wurde über Nacht in Coomassie-Färbelösung bei leichtem Schwenken inkubiert. Am Folgetag wurde das Gel zweimal mit dH₂O gewaschen und mit 25 % Methanol in dH₂O entfärbt. Nach Rehydrierung in dH₂O wurde das Gel an der Fujifilm LAS 3000 ECL-Kamera fotografiert.

Lösung	Zusammensetzung
Coomassie-Färbelösung	0.2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 45 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure in ddH ₂ O

3.2.8 Deglykosylierung mit *N*-Glykosidase F

Die Glykosylierungsmuster von Proteinfragmenten wurden durch Verdau mit der Peptid-*N*-Glykosidase F (PNGase F) untersucht. Die Deglykosylierung durch die PNGase F führte dabei zu einem geringeren apparenten Molekulargewicht der Fragmente in SDS-PAGE und Western-Blot.

Etwa 100 µg eines Zelllysates (Abschnitt 3.2.1) wurde mit PBS auf 20 µL gebracht und mit 5 µL 2 % SDS und 5 µL 1 M β-Mercaptoethanol 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Probe wurde auf Eis abgekühlt und 5 µL 1 M Tris/HCl pH 8,0 mit 100 mM EDTA und 5 µL 10 % CHAPS zugegeben. Die Probe wurde entweder mit 2 µL PNGase F oder mit 2 µL ddH₂O (Kontrolle) versetzt und 5 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Proben mit 6x Lämmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert wurden. Die Auswertung der Deglykosylierung erfolgte durch SDS-PAGE (Abschnitt 3.2.4) und Western-Blot (Abschnitt 3.2.5).

3.2.9 Percoll™-Dichtegradienten-Zentrifugation

Durch Zentrifugation in einem selbstformenden Percoll™-Dichtegradienten konnten Zellorganellen anhand ihrer Dichte getrennt werden. Als Ausgangsmaterial wurden fünf konfluente 15 cm Schalen mit Zellen verwendet, die mit 10 mL PBS gewaschen und mit einem Zellschaber in 1,5 mL PBS abgeschabt wurden. Die Zellsuspension wurde in einem 15 mL Röhrchen bei 250 und 4 °C für 10 min zentrifugiert und das Pellet zur Herstellung eines *postnuclear-supernatant* (PNS) verwendet.

Das Zellpellet wurde auf Eis in 600 µL Homogenisierungspuffer (H-Puffer) mit 1x Proteinase Inhibitor Cocktail (PI, Sigma) resuspendiert und mit 50 Passagen durch eine 26 Gauge Kanüle homogenisiert. Die Suspension wurde bei 2000 xg und 4 °C für 10 min pelletiert und der Überstand abgenommen (PNS1). Das Pellet wurde erneut in 500 µL H-Puffer mit PI aufgenommen und mit 50 Passagen durch eine 26 Gauge Kanüle homogenisiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 2000 xg und 4 °C für 10 min wurde der Überstand abgenommen (PNS2) und mit dem PNS1 vereinigt. Das Pellet wurde im gleichen Volumen (1100 µL) H-Puffer mit PI resuspendiert.

Für die Bildung des selbstformenden Percoll-Gradienten wurde die Percoll-Lösung zu 1:1 mit 2x H-Puffer verdünnt, um eine 50 % Percoll-Lösung in H-Puffer zu erhalten. Durch Verdünnung von 4 mL 50 % Percoll mit 6 mL H-Puffer mit PI wurde eine 20 %-Percoll-Gebrauchslösung hergestellt. In ein Ultrazentrifugen-Röhrchen (Ultra-Clear™ Tubes 14 x 89 mm) wurde als Basis 0,5 mL einer 65 % Sucroslösung in 10 mM HEPES gelegt. Auf die Sucrose wurde 8,5 mL 20 % Percoll und 1 mL des vereinigten PNS pipettiert. Die Proben wurden im Festwinkelrotor (Sorvall T1270) bei 40500 xg und 4 °C für 45 min in der Ultrazentrifuge Optima L80XP (Beckman Coulter) zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde 750 mL Fraktionen vorsichtig von der Oberfläche abgenommen, in 1,5 mL Ultrazentrifugen-Reaktionsgefäße (Microfuge Tube Polyallomer, Beckman) gegeben und mit 50 µL 16 % Triton X-100 versetzt. Vom vereinigten PNS und dem resuspendierten Pellet wurden 150 µL mit 10 µL 16 % Triton X-100 gemischt. Die Organellen wurden am Sonifier 450 (Branson, 2x 20 s mit 40 s Unterbrechung, Output Control 7, Duty Cycle 40 %) lysiert. Die Proben wurden weitere 60 min auf Eis inkubiert, durch Vortexen gemischt und im Festwinkelrotor (Beckman TLA55) bei 100.000 xg und 4 °C für 20 min in der Ultrazentrifuge Optima-MAX (Beckman Coulter) zentrifugiert. Der Überstand wurde ohne das Sucrose-Pellet oder die Zelltrümmer abgenommen.

Die Proteinkonzentration der Fraktionen wurde bestimmt (Abschnitt 3.2.3.1) und die Aktivität der β -Hexosaminidase als lysosomaler Marker bestimmt (Abschnitt 3.2.13.1). Die weitere Analyse der Fraktionen erfolgte nach SDS-PAGE (Abschnitt 3.2.4) und Western-Blot (Abschnitt 3.2.5) durch Proteinnachweis mit spezifischen Antikörpern im Immunoblot.

Lösung	Zusammensetzung
2x Homogenisierungspuffer (H-Puffer)	20 mM HEPES 300 mM NaCl 500 mM Sucrose in ddH ₂ O pH 7,4

3.2.10 Herstellung von Lysosomen-angereicherter Fraktion aus muriner Leber (Tritosomen)

Die Dichte der Lysosomen entspricht etwa der Dichte von Mitochondrien, weshalb beide Organelle weder in der differentiellen Zentrifugation (Abschnitt 3.2.2) noch im Percoll-Dichtegradienten (Abschnitt 3.2.9) getrennt werden können. Eine Veränderung der Dichte von Leber-Lysosomen kann in der Maus durch intraperitoneale Injektion des Lipase-Inhibitors Tyloxapol (Triton WR-1339) erreicht werden (Leighton *et al.*, 1968). Der Inhibitor hemmt die Lipoprotein-Lipase im Plasma, was zu einem starken Anstieg des LDL-Spiegels im Blut und einer erhöhten Aufnahme in die Leber führt. In den Hepatozyten werden die LDL-Partikel zu den Lysosomen transportiert und abgebaut, was zu einem erhöhten Lipidanteil und einer geringeren Dichte der Organellen führt (Hayashi *et al.*, 1982). Die dichterverschobenen Lysosomen aus der Leber können von Mitochondrien getrennt werden und werden nach dem Inhibitor Triton WT-1339 als Tritosomen bezeichnet.

Den Mäusen wurde pro Gramm Körpergewicht 4 μ L einer Tyloxapol-Lösung intraperitoneal injiziert. Die Präparation der Lysosomen konnte 3 - 4 Tage nach der Injektion stattfinden. Die Tiere wurden euthanasiert, die Leber entfernt und das Gewebe in 5 mL 0,25 M Sucrose durch etwa sechs Hübe bei 1500 rpm am Potter S Homogenisator (B. Braun) aufgeschlossen. Die folgende Präparation fand auf Eis statt. Das Homogenat wurde bei 1000 xg für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen (E1) und das Pellet in 3,5 mL 0,25 M Sucrose resuspendiert. Die Suspension wurde erneut durch einen Hub am Potter S Homogenisator aufgeschlossen, zentrifugiert und der Überstand abgenommen (E2). Das Pellet enthielt Zelltrümmer, Zellkerne und intakte Zellen (Pellet N). Die Überstände E wurden vereinigt und in einem Ti-75 Röhrchen im Festwinkelrotor (Sorvall T-880) bei 56000 xg für 7 min zentrifugiert (Sorvall Ultra Pro 80 Centrifuge). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen (PS1), das Pellet erneut in 8,5 mL 0,25 M Sucrose resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen (PS2) und mit dem Überstand PS1 vereinigt (PS, cytosolische Proteine und Mikrosomen). Das Pellet (ML) enthielt Mitochondrien und Lysosomen und wurde im diskontinuierlichen Sucrosegradienten weiter aufgetrennt.

Das ML-Pellet wurde in 2,5 mL Sucrose ($\rho = 1,21$) resuspendiert, durch einen Hub bei 200 rpm am Potter S Homogenisator (B. Braun) aufgeschlossen und in ein Zentrifugenröhrchen (Ultra-Clear™ Tubes 14x89 mm, Beckman Coulter) überführt. Die Probe wurde vorsichtig mit 2,25 mL Sucrose

$\rho = 1,15$, 2,25 mL Sucrose $\rho = 1,14$ und 1 mL Sucrose $\rho = 1,06$ überschichtet. Der Ansatz wurde im Ausschwingrotor (TH-641, Sorvall) bei 111.000 xg und 4 °C für 150 min zentrifugiert (Sorvall Ultra Pro 80). Die Tritosomen sammelten sich zwischen der ersten ($\rho = 1,06$) und der dritten Fraktion ($\rho = 1,14$) die Fraktion F2 und konnten vorsichtig abgenommen werden (Abbildung 6).

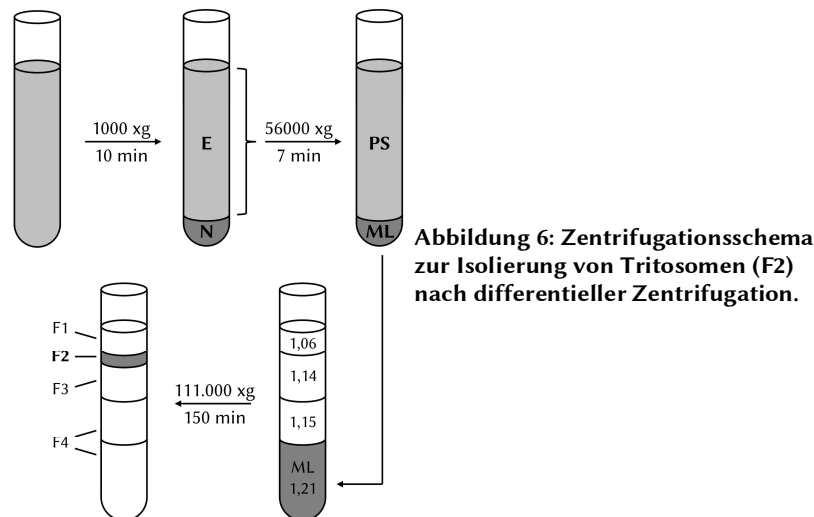


Abbildung 6: Zentrifugationsschema zur Isolierung von Tritosomen (F2) nach differentieller Zentrifugation.

Um die Konzentration der Tritosomen zu erhöhen und den Sucrose-reichen Puffer zu entfernen, wurden die Tritosomen 1:1 mit PBS verdünnt und in 1,5 mL Ultrazentrifugen-Reaktionsgefäßen (Microfuge Tube Polyallomer, Beckman) im Festwinkelrotor (Sorvall TLA-55) bei 100.000 xg und 4 °C für 20 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in etwa 150 μ L Lysepuffer resuspendiert. Die Suspension wurde durch Ultraschall am Sonifier 450 (Branson, 2x 20 s mit 40 s Unterbrechung, Output Control 7, Duty Cycle 40 %) lysiert. Die Proben wurden weitere 60 min auf Eis inkubiert, durch Vortexen gemischt und bei 13000 xg und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden zur Proteinbestimmung (Abschnitt 3.2.3.1) und weiteren Experimenten eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

Lösung	Zusammensetzung
Tyloxapol-Lösung	17 % Tyloxapol (Triton WR-1339) 0,9 % NaCl in ddH ₂ O, sterilfiltriert
Sucrose $\rho = 1,21$	46,5 % (w/v) Sucrose in ddH ₂ O
Sucrose $\rho = 1,15$	35 % (w/v) Sucrose in ddH ₂ O
Sucrose $\rho = 1,14$	33 % (w/v) Sucrose in ddH ₂ O
Sucrose $\rho = 1,06$	15 % (w/v) Sucrose in ddH ₂ O
Lysepuffer	0,5 % Triton X-100 1x Proteinase Inhibitor Cocktail (Sigma) in PBS

3.2.11 Proteinaufreinigung mittels Ni²⁺-NTA-Agarose

Zur Anreicherung RGS-His₆-markierter Protein wurden diese durch Bindung an Ni²⁺-NTA-Agarosebeads aus dem Zellkulturmedium aufgereinigt. Das konditionierte Medium mit sekretierten lysosomalen Proteinen wurde in drei Ernten zu 15 mL von überexprimierenden Zellen gewonnen (Abschnitt 3.3.5).

Vom Medium wurde 1 mL als Ladekontrolle zurückgestellt (*load*, LD), die übrigen 44 mL wurden mit 1 mL einer aufgeschwemmten Suspension von Perfect Pro Ni²⁺-NTA-Agarose (5Prime GmbH) versetzt, die zuvor dreimal mit Bindepuffer gewaschen wurde. Das Medium mit den Agarose-Beads wurde 2 h bei 4 °C gerollt. Die Suspension wurde durch *gravity-flow* auf eine Mobicol-Säule (10 mL, Filter mit 35 µm Porengröße, MoBiTec) aufgetragen und die Durchlaufraction aufgefangen (*flow-through*, FT). Die Beads wurden auf der Säule zehnmal mit 1 mL Bindepuffer gewaschen (*wash*, W) und dreimal mit 1 mL Elutionspuffer eluiert (E). Eine abschließende Elution erfolgte mit 1 mL 500 mM Imidazol in Bindepuffer. Die Agarosebeads wurden mit dH₂O und 20 % Ethanol gewaschen und in 20 % Ethanol bei 4 °C gelagert. Die Elutionsfraktionen sowie Ladekontrolle, Durchlaufraction und ausgewählte Waschfraktionen wurden über SDS-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.2.4) getrennt und im Western-Blot (Abschnitt 3.2.5) und durch Coomassie-Färbung (Abschnitt 3.2.7) analysiert. Die Elutionsfraktionen mit dem angereicherten Protein wurden vereinigt und im Centricon umgepuffert (Abschnitt 3.2.12).

Lösung	Zusammensetzung
Bindepuffer	50 mM Tris/HCl in ddH ₂ O pH 7,4
Elutionspuffer	50 mM Tris/HCl 100 mM Imidazol in ddH ₂ O pH 7,4

3.2.12 Umpuffern mittels Centricon

Um die Konzentration der aufgereinigten Proteine zu erhöhen und das Imidazol aus dem Puffer zu entfernen, wurden die Proben im Amicon[®] Ultra-4 Zentrifugenfilter (Centricon) Ultracel[®]-30K für Plbd2 oder Ultracel[®]-10K für CtsB, CtsL oder AEP umgepuffert. Die vereinigten Elutionsfraktionen der Proteinaufreinigung (Abschnitt 3.2.11) wurden in das Centricon gegeben und mit 25 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,4 auf 4 mL aufgefüllt. Die Probe wurde etwa 10 min bei 3000 xg zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Probe im Centricon mit 25 mM Tris/HCl-Puffer auf 4 mL aufgefüllt. Das Vorgehen wurde so lange wiederholt, bis die Konzentration an Imidazol rechnerisch unter 1 mM lag. Die Proteinkonzentration der eingegangenen Proben wurde bestimmt und Aliquots der Proben bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren.

3.2.13 Aktivitätsassays lysosomaler Hydrolasen

Die Aktivität lysosomaler Hydrolasen wurde anhand der Spaltung artifizierlicher Pseudosubstrate gemessen. Für die Messung der β -Hexosaminidase-Aktivität wurde ein *para*-Nitrophenyl (pNP)-gekoppeltes Substrat verwendet, die Aktivität der Cathepsine B und L sowie der AEP wurden mit 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC)-gekoppelten Substraten bestimmt.

3.2.13.1 β -Hexosaminidase-Aktivitätsassay

Die Aktivität der lysosomalen β -Hexosaminidase (β -Hex) wurde in Proben der Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation (Abschnitt 3.2.9) bestimmt, um die Fraktionen mit Lysosomen zu identifizieren. Zur Aktivitätsbestimmung wurde das Substrat pNP-*N*-Acetyl- β -D-Glukosaminid verwendet, wobei die Freisetzung des pNP anhand dessen Absorption bei 405 nm gemessen wurde. Mit dem molaren Extinktionskoeffizienten des pNP von $\epsilon_{405} = 18500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und der Schichtdicke der mit 300 μL gefüllten Mikrotiterplatte von $d = 0,85 \text{ cm}$ kann mit der folgenden Formel, die sich aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz herleitet, die Aktivität als Stoffmengenumsatz pro Zeit bestimmt werden.

$$\text{Aktivität} \left[\frac{mU}{mL} \right] = \frac{\Delta E \cdot 10^6}{\epsilon \left[\frac{L}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right] \cdot d [\text{cm}] \cdot t [\text{min}]} \cdot \frac{V_{\text{Assay}} [\mu\text{L}]}{V_{\text{Probe}} [\mu\text{L}]} \cdot F$$

Die Veränderung der Absorption ΔE ergibt sich dabei aus der Absorption der Probe abzüglich eines Substratleerwertes und eines Enzymleerwertes. Mit dem Faktor aus Assay- und Probenvolumen wird die Verdünnung der Probe durch Reaktionslösung und Stopppuffer berücksichtigt. Etwaige Verdünnungen des Ausgangsmaterials werden durch den Verdünnungsfaktor F dargestellt.

In drei Reaktionsgefäßen wurde je 50 μL der Probe auf Eis vorgelegt. In zwei Ansätze wurde je 200 μL Substratlösung zugegeben, zu dem dritten Ansatz wurde Reaktionspuffer ohne Substrat gegeben (Enzym-Leerwert, EL). Um den Beitrag des ungespaltenen Substrats an der Absorption zu bestimmen, wurde in einem Ansatz Lysepuffer statt der Probe verwendet (Substrat-Leerwert, SL). Alle Proben wurden für etwas 30 min bei 37 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 500 μL Stopppuffer auf Eis beendet. Die Proben wurden 10 min bei 13000 $\times g$ und 4 °C zentrifugiert und 300 μL in eine 96-well Mikrotiterplatte überführt. Die Messung der Absorption bei 405 nm erfolgte am Infinite 200 Mikroplattenleser (Tecan).

Lösung	Zusammensetzung
Reaktionspuffer	100 mM Natriumcitrat 0,2 % BSA 0,04 % Natriumazid in ddH ₂ O pH 4,6
Substratlösung	10 mM <i>para</i> -Nitrophenyl- <i>N</i> -Acetyl- β -D-Glukosaminid in Reaktionslösung
Stopppuffer	400 mM Glycin in ddH ₂ O pH 10,4

3.2.13.2 Cathepsin B-, Cathepsin L- und AEP-Aktivitätsassay

Die lysosomalen Hydrolasen Cathepsin B, Cathepsin L und AEP wurden aus Zellkulturmedium aufgereinigt (Abschnitt 3.2.11) und sollten *in vitro* aktiviert werden. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde der Umsatz von artifiziellen 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC)-gekoppelten Peptidsubstraten bestimmt. Für die Messung der Cathepsin B-Aktivität wurde das spezifische Substrat Z-Arg-Arg-AMC verwendet, das Substrat Z-Phe-Arg-AMC konnte von Cathepsin B und Cathepsin L gespalten werden. Für die Bestimmung der AEP-Aktivität wurde das Substrat Z-Ala-Ala-Asn-AMC genutzt. Die Abspaltung des AMC kann anhand der Fluoreszenz bei Absorption/Emission = 380 nm/460 nm verfolgt werden.

Die rekombinanten Enzyme wurden in 25 mM Tris/HCl-Puffer auf 50 ng/μL verdünnt und 1:1 mit 2x Aktivierungspuffer gemischt. Durch Inkubation im Wasserbad bei 37 °C für 120 min (CtsB), 15 min (CtsL) bzw. 60 min (AEP) wurden die Enzyme aktiviert. Die Ansätze wurden mit Assaypuffer 1:50 verdünnt, um eine Proteinkonzentration von 0,5 ng/μL zu erhalten (Enzymverdünnung).

Die jeweiligen AMC-gekoppelten Substrate (10 mM in DMSO) wurden in Assaypuffer 1:500 auf 20 μM verdünnt (Substratverdünnung). Als Substrat-Leerwert wurde nur DMSO 1:500 in Assaypuffer verdünnt.

Es wurden je 50 μL der Enzymverdünnung und der Substratverdünnung in einer schwarzen Maxisorp Platte gemischt und die Freisetzung des AMC am Infinite 200 Mikroplattenleser (Tecan) bei einer Anregung von 380 nm und einer Emission von 460 nm verfolgt. Es wurden zehn Werte im 60 s Intervall bei 25 °C in Doppelbestimmung aufgenommen. Von den gemittelten Messwerten wurde ein Leerwert aus Assaypuffer und Substratverdünnung abgezogen. Die Emission (*absorption units*, AU) wurde gegen die Zeit aufgetragen und die Steigung einer linearen Anpassung (AU/min) bestimmt. Anhand einer Standardreihe mit freiem AMC bekannter Konzentration konnte das Verhältnis von AU zu AMC-Stoffmenge bestimmt werden und daraus auf die spezifische Aktivität der Enzyme geschlossen werden.

Lösung	Zusammensetzung
2x Aktivierungspuffer	500 mM Natriumacetat 10 mM Dithiothreitol (DTT) in ddH ₂ O für CtsB: pH 5,0 für CtsL: pH 3,0 für AEP: pH 4,0
Assaypuffer	30 mM Natriumacetat 5 mM Dithiothreitol (DTT) in ddH ₂ O pH 5,5

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen wurden adhären in sterilen Zellkulturflaschen oder -schalen in DMEM-Standardmedium (Abschnitt 2.4) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 99 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach zwei bis drei Tagen erreichten die Zellen Konfluenz und wurden passagiert. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Es wurde 1 mL (T75-Flasche) oder 0,5 mL (T25-Flasche) Trypsin-EDTA auf die Zellen gegeben und 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit dem zehnfachen Volumen DMEM-Standardmedium abgespült, 80 – 90 % der Zellsuspension wurden verworfen und die verbliebenen Zellen mit DMEM-Standardmedium auf 10 ml bzw. 5 mL aufgefüllt.

3.3.2 Kryokonservierung und Revitalisierung

Zur Kryokonservierung wurden Zellen auf einer T75-Flasche bis zur Konfluenz kultiviert und wie beschrieben mit Trypsin-EDTA (Abschnitt 3.3.1) abgelöst. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 250 xg für 5 min pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 mL Kryomedium aufgenommen. Die Zellen wurden zu 1 mL Aliquots in Kryoröhrchen über Nacht bei -80 °C eingefroren und bei -150 °C gelagert.

Zur Revitalisierung eingefrorener Zellen wurden die gefrorenen Zellen mit 10 mL warmem DMEM-Standardmedium aus dem Kryoröhrchen gespült und bei 250 xg für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 5 mL DMEM-Standardmedium aufgenommen und in eine T25-Flasche pipettiert. Nach etwa 5 h wurde das Medium gewechselt, um abgestorbene Zellen zu entfernen.

Lösung	Zusammensetzung
Kryomedium	10 % (v/v) DMSO 10 % (v/v) fötales Kälberserum (FKS) in DMEM Standardmedium

3.3.3 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion von Zellen erfolgte mit den Lipid-basierten Transfektionsreagenzien Polyethylenimin (PEI) oder Lipofectamin[®] LTX (Thermo Fischer). Die Techniken basieren auf der Bindung der negativ geladenen DNA durch die kationischen Lipide und der Ausbildung von Liposomen, die mit der Zelloberfläche interagieren und zur Endocytose des DNA-Liposom-Komplexes führen. Nach der Endocytose kann die DNA in das Cytosol gelangen und bei einer mitotischen Zellteilung in den Zellkern aufgenommen werden. Im Zellkern kann die DNA entweder transient transkribiert oder in einzelnen Fällen stabil in das Genom integriert werden.

3.3.3.1 Lipofektion mit Polyethylenimin (PEI)

Das kationische Lipid Polyethylenimin (PEI) stellt ein kostengünstiges Transfektionsreagenz für eukaryotische Zellen dar. Am Vortag der Transfektion wurden Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst (Abschnitt 3.3.1), mit einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt und $2 \cdot 10^6$ Zellen auf einer 10 cm Schale ausgesät (345 Zellen/mm^2). Direkt vor der Transfektion wurde das Medium der Zellen gewechselt. Für eine 10 cm Schale wurden $3 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA in $300 \mu\text{L}$ OptiMEM pipettiert, $9 \mu\text{L}$ PEI ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) zugegeben und durch Vortexen gemischt. Die Mengen wurden für andere Zellkultur-Schalen entsprechend der Wachstumsfläche angepasst. Die PEI-DNA-Mischung wurde 15 min bei RT inkubiert und auf die Zellen getropft. Nach 5 h wurde das Medium gewechselt.

3.3.3.2 Lipofektion mit Lipofectamin[®] LTX & PLUS[™] Reagenz

Das Transfektionsreagenz Lipofectamin[®] LTX (Thermo Fischer) basiert ebenfalls auf der Bildung von Lipid-DNA-Komplexen, wobei jedoch in der Regel höhere Transfektionsraten als mit PEI erzielt werden. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben ausgesät. Die Plasmid-DNA ($3 \mu\text{g}$ für eine 10 cm Schale) und $3 \mu\text{L}$ PLUS[™] Reagenz wurde in $150 \mu\text{L}$ OptiMEM gelöst und ein weiterer Ansatz mit $15 \mu\text{L}$ Lipofectamin-Reagenz in $150 \mu\text{L}$ OptiMEM hergestellt. Die einzelnen Ansätze wurden durch Vortexen gemischt, vereint und für 5 min bei RT inkubiert. Die Mischung wurde auf die Zellen getropft und nach 5 h das Medium gewechselt.

3.3.4 Einzelzell-Klonierung durch serielle Verdünnung

Die serielle Verdünnung wurde angewendet, um Einzelklone aus einer Zellpopulation zu isolieren und klonal-identische Zelllinien zu etablieren.

Die Zellen wurden mit Trypsin-EDTA von der Zellkulturflasche gelöst wie beschrieben (Abschnitt 3.3.1) und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Eine 96-*well* Zellkulturplatte wurde mit Ausnahme von *well* A1 vollständig mit je $100 \mu\text{L}$ DMEM-Standardmedium befüllt. In *well* A1 wurden 3000 Zellen bei einer Zellkonzentration von $15 \text{ Zellen}/\mu\text{L}$ pipettiert und $100 \mu\text{L}$ in *well* B1 überführt. Die Zellsuspension wurde durch pipettieren gemischt und $100 \mu\text{L}$ in das darunter liegende *well* überführt. In dieser Weise wurde bis zu *well* H1 verfahren, wobei die dort entnommenen $100 \mu\text{L}$ verworfen wurden. Mit einer 8-Kanal-Pipette wurde in alle *wells* der ersten Spalte $100 \mu\text{L}$ DMEM-Standardmedium gegeben und durch pipettieren gemischt. Aus den *wells* wurde $100 \mu\text{L}$ aufgenommen, in die *wells* der zweiten Spalte übertragen und erneut gemischt. Bis zu den *wells* der letzten Spalte wurde entsprechend verfahren, wobei die dort entnommene $100 \mu\text{L}$ wiederum verworfen wurden. In der erstellten Platte sind somit in *well* A1 1500 Zellen zu finden, wobei sich die Zellzahl in horizontaler und vertikaler Richtung jeweils halbiert (Abbildung 7).

Die Zellen wurden für 7 Tage kultiviert und *wells* mit einzelnen Zellkolonien markiert. Nach weiteren 10 Tagen wurden die markierten Zellen zur weiteren Expansion auf eine 6-*well* Platte und schließlich eine T25-Zellkulturflasche überführt.

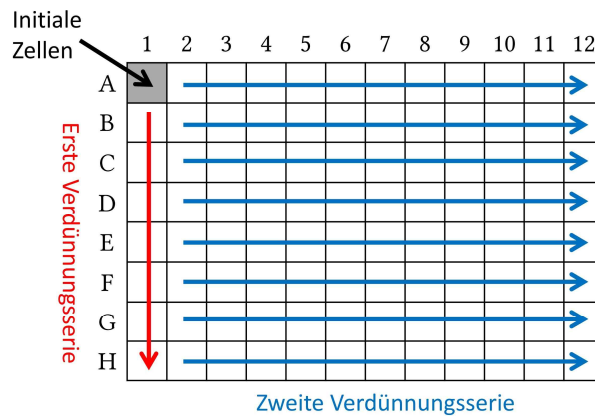


Abbildung 7: Schema der seriellen Verdünnung zur Isolierung von Einzelklonen aus eukaryotischer Zellkultur

3.3.5 Ernte von konditioniertem Medium mit sekretierten lysosomalen Proteinen

Zur Aufreinigung von lysosomalen Proteinen wurden diese in Zellkultur überexprimiert, wobei die Überlastung der lysosomalen Transportwege zur Sekretion in das Medium führte. Um Kontaminationen durch Proteine des Mediums bei der Aufreinigung zu vermeiden, wurde konditioniertes Medium ohne FKS verwendet. Zwei 15 cm Schalen 80 % konfluenten N2a-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für murines Cathepsin B, Cathepsin L oder AEP transfiziert (Abschnitt 3.3.3) und nach 24 h das Zellkulturmedium durch 15 mL konditioniertes Medium ersetzt. Für die Produktion von murinem Plbd2 wurden stabil Plbd2-exprimierende HT1080-66-Zellen verwendet, bei denen nach Erreichen der Konfluenz das Standardmedium durch 15 mL konditioniertes Medium ersetzt wurde. Das Medium wurde dreimal nach je 24 h erneuert und das abgenommene Medium bei 250 xg für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Proteinaufreinigung (Abschnitt 3.2.11) bei -20 °C gelagert.

3.3.6 Beschichtung von Deckgläsern mit poly-L-Lysin

Für indirekte Immunfluoreszenz-Färbung (Abschnitt 3.3.7) wurden Zellen auf Deckgläsern kultiviert, die mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet wurden, um ein adhärenes Wachstum der Zellen zu ermöglichen. Zur Beschichtung wurden die Deckgläser für 30 min in einem Röhrchen mit Aceton gerollt und dreimal mit dH₂O gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Deckgläser über Nacht in 0,01 % (w/v) PLL-Lösung bei 4 °C gerollt und erneut dreimal mit dH₂O gewaschen. Nach dem

Trocknen für 2 h unter einem sterilen Luftstrom wurden die Deckgläser für 10 min unter UV-Licht sterilisiert und konnten bis zur Verwendung bei RT gelagert werden.

3.3.7 Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung von kultivierten Zellen

Die indirekte Immunfluoreszenz-Färbung wurde zum Nachweis der subzellulären Lokalisation von Proteinen verwendet. Die Zellen wurden zu etwa 340 Zellen/cm² auf PLL-beschichteten Deckgläsern (Abschnitt 3.3.6) in 6-*well* Platten ausgesät. Nach dem Anwachsen wurden die Zellen am Folgetag entweder sofort weiterverwendet oder mit Expressionsplasmiden transfiziert (Abschnitt 3.3.3) und nach 48 h genutzt. Die Zellen wurden entweder mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert und mit Saponin permeabilisiert oder beide Schritte zusammen durch Inkubation in Methanol durchgeführt. Während die Fixierung mit PFA die schonendere Bedingung für den Erhalt zellulärer Strukturen darstellt, können aufgrund der teilweisen Denaturierung von Proteinen bei der Fixierung und Permeabilisierung mit Methanol auch Antikörper verwendet werden, die vorwiegend denaturiertes Protein erkennen. Bei der Verwendung des Plbd2-Antikörpers „60H1“ konnten ausschließlich Methanol-fixierte Zellen eingesetzt werden. Die Inkubation der Deckgläser erfolgte in einer 24-*well* Platte, für die Inkubation mit Antikörper- und Dapi-Lösungen wurden die Deckgläser dagegen auf einen 50 µL Tropfen der Lösungen in einer feuchten Kammer gelegt.

3.3.7.1 Fixierung mit Paraformaldehyd und Permeabilisierung mit Saponin

Zur Fixierung der Zellen mit PFA wurden die Deckgläser in einer 24-*well* Platte dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen für 20 min in einer 4 % Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Die Zellen wurden anschließend erneut dreimal mit PBS gewaschen und für 5 min mit 0,2 % Saponin in PBS (S-PBS) inkubiert. Die Zellen wurden 10 min mit 0,12 % Glycin in S-PBS inkubiert, um PFA-induzierte Autofluoreszenz zu löschen (*quenching*) und daraufhin mit S-PBS gewaschen. Durch Inkubation mit 10 % FKS in S-PBS wurden unspezifische Protein-Protein-Bindungen geblockt und die Deckgläser mit der Zellseite auf einen 50 µL Tropfen Erstantikörper in S-PBS mit 1 % Ziegen Serum gelegt. Die Proben wurden in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT inkubiert. Die Deckgläser wurden viermal mit S-PBS gewaschen und wie zuvor 1 h auf einem Tropfen mit Zweitantikörper (1:500 in S-PBS mit 1 % Ziegen Serum) inkubiert. Die Zellen wurden durch Tunken in Bechergläser fünfmal mit S-PBS gewaschen und für etwa 1 min auf einem Tropfen 1 µg/mL Dapi in S-PBS inkubiert. Die Deckgläser wurden erneut durch zweimaliges Tunken in Bechergläser mit dH₂O gewaschen und mit der Zellseite nach unten auf einem Tropfen Mowiol/Dabco eingebettet. Nach dem Aushärten wurden die Färbungen am Durchlicht-Fluoreszenz-Mikroskop DM5000B (Leica) ausgewertet.

3.3.7.2 Fixierung und Permeabilisierung mit Methanol

Für die gleichzeitige Fixierung und Permeabilisierung mit Methanol wurden die Deckgläser in einer 24-well Platte dreimal mit PBS gewaschen und für 20 min mit kaltem Methanol bei -20 °C inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und zweimal mit PBS für 5 min geschwenkt. Unspezifische Protein-Protein-Bindungen wurden durch Inkubation in 1 % BSA in PBS für 30 min blockiert. Die Inkubation mit Erst- und Zweitantikörper erfolgte analog zur Fixierung mit PFA (Abschnitt 3.3.7.1) auf einem Tropfen Antikörperlösung in einer feuchten Kammer. Auch die Waschschriffe und das Einbetten erfolgten wie beschrieben. Nach dem Aushärten wurden die Färbungen am Durchlicht-Fluoreszenz-Mikroskop DM5000B (Leica) ausgewertet.

3.4 Tierexperimentelle und histologische Methoden

Die Haltung von Versuchstieren erfolgte in der zentralen Tierhaltung der Universität Bielefeld unter standardisierten Bedingungen. Die Tiere wurden, sofern möglich, in Gruppen gehalten und hatten Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*. Zur Reduzierung der Tierzahlen wurden meist homozygote WT- und *knockout*-Tiere zur Verpaarung verwendet. Die Verteilung von Männchen und Weibchen sowie homozygoten und heterozygoten Tieren wich nicht signifikant von den Mendel'schen Regeln ab. Die Versuchstieranlage wurde unter spezifiziert Pathogen-freien (SPF)-Bedingungen geführt, wobei die Infektion einzelner Tiere mit Viren (murines Norovirus), Bakterien (*Pasteurella pneumotropica*, *Helicobacter typhlonius*) und Endoparasiten (Protozoen: *Trichomonas spp.*, *Chilomastix spp.*) nachgewiesen werden konnte. Während die Haltung der Tiere vorwiegend in offener Käfighaltung erfolgte, wurde eine Kernzucht in einzelbelüfteten Käfigen (*individual ventilated cages*, IVC) gehalten.

3.4.1 Erzeugung von *knockout*-Mäusen

Um Mäuse mit einem *knockout* der Gene von *Plbd1* und *Plbd2* zu erzeugen, wurde die neue molekulbiologische Methode CRISPR-Cas9 verwendet (Abschnitt 1.3.1). Es wurden sgRNAs mit einem *online-tool* erstellt (Zhang Lab, MIT; Hsu *et al.*, 2013) und in den pUC57-sgRNA-Expressionsvektor kloniert (Abschnitt 3.1.8 und 3.1.9). Die Injektion in befruchtete Eizellen wurde von PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer (ZMNH, UKE Hamburg) durchgeführt. Die Plasmide wurden mit der *DraI*-Endonuklease linearisiert, durch Phenol-Fällung gereinigt und die sgRNA *in vitro* mit einer T7-RNA-Polymerase transkribiert. Die sgRNA wurde mit *in vitro* transkribierter Cas9-mRNA

und den *repair-templates* bei jeweils 10 ng/ μ L in den Vorkern von befruchteten Oozyten aus C57Bl6/J-Mäusen (Jax Stock 000664) injiziert. Die Oozyten wurden in den Eileiter von scheinsschwangeren Ammentieren transplantiert und ausgetragen. Zur Genotypisierung (Abschnitt 3.4.2) wurden Schwanzspitzenbiopsien der Tiere nach Bielefeld übersandt

3.4.2 Genotypisierung der erzeugten Mauslinien

Zur Unterscheidung der Versuchstiere wurden diese anhand eines Nummernsystems mit Ohrstanzern versehen und das entfernte Gewebematerial wurde für die Genotypisierung der Tiere genutzt. Die genomische DNA aus den Gewebeproben wurde mit dem KAPA Mouse Genotyping Kit (KAPA Biosystems) extrahiert (Abschnitt 3.1.3) und die Genbereiche um Plbd1-Exon2 bzw. Plbd2-Exon5 in der Genotypisierungs-PCR amplifiziert (Abschnitt 3.1.4.1).

Zur Genotypisierung der Plbd1-KO-Mäuse wurden die PCR-Produkte (20 μ L) mit der Restriktions-Endonuklease BsaHI (10 U/ μ L NEB) versetzt und 90 min bei 37 °C inkubiert. Die verdauten PCR-Produkte wurden über Agarose-Gelelektrophorese getrennt (Abschnitt 3.1.5) und unter UV-Licht dokumentiert. Die Insertion in den Plbd1-KO-Allelen zerstörte die BsaHI-Schnittstelle und führte somit zu einem Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP), anhand dessen diese Allele von WT-Allelen unterschieden werden konnten (Abbildung 8A).

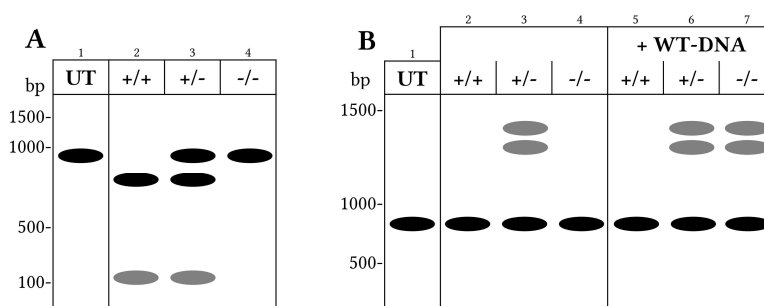


Abbildung 8:
Schematische Darstellung der Genotypisierung von Plbd1-knockout-Tieren durch BsaHI-Verdau (A) und der Plbd2-knockout-Tieren durch reannealing und Trennung im PAA-Gel (B).

Zur Genotypisierung der Mauslinien Plbd2-HH, Plbd2-mut und Plbd2-KO wurden die Reaktionslösungen (20 μ L) nach der PCR halbiert und eine Hälfte mit 10 μ L einer PCR-Amplifikation von WT-Tieren versetzt. Beide Ansätze wurden im Thermocycler PeqSTAR (PeqLab) einem *reannealing* unterzogen (Tabelle 19). Durch die Denaturierung und das *reannealing* werden homolog gepaarte DNA-Doppelstränge getrennt und neu assoziiert, sodass im Fall eines heterozygoten Tieres auch heterologe DNA-Doppelstränge mit Fehlpaarungen entstehen können.

Tabelle 19: PCR-Protokoll zum *reannealing* von DNA.

Temp.	Zeit	Schritt
95 °C	5 min	Denaturierung
95 °C - 85 °C	-2 °C/s	<i>reannealing</i>
85 °C - 25 °C	-0,1 °C/s	
4 °C	∞	Lagerung

Die Amplifikate wurden nach dem *reannealing* über ein PAA-Gel getrennt (Abschnitt 3.1.6), wobei heterozygotes genomisches Material neben der Bande des Homoduplex zwei weitere Banden der fehlgepaarten Heteroduplices aufwies (Abbildung 8B). Die Unterscheidung von homozygoten WT- und KO-Tieren wurde durch die Beimischung der WT-Amplifikate vor dem *reannealing* ermöglicht.

3.4.3 Erzeugung von Gewebekomogenaten

Für die Erzeugung von Gewebekomogenaten wurden die Mäuse euthanasiert, die Gewebe entnommen und entweder umgehend verarbeitet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Etwa 150 mg des Gewebes wurde im 20-fachen Volumen TBS (w/v) mit 0,5 % Triton X-100 und 1x Proteinase-Inhibitor-Cocktail (Sigma) aufgenommen und durch sechs Hübe bei 1500 rpm am Potter S Homogenisator (B. Braun) aufgeschlossen. Die resultierende Suspension wurde durch Ultraschall am Sonifier 450 (Branson, 2x 20 s mit 40 s Unterbrechung, Output Control 7, Duty Cycle 40 %) lysiert. Die Proben wurden weitere 60 min auf Eis inkubiert, durch Vortexen gemischt und bei 18000 xg und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die Überstände wurden zur Proteinbestimmung (Abschnitt 3.2.3) und weiteren Experimenten eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

3.4.4 Gewinnung und Immortalisierung von murinen embryonalen Fibroblasten

Primäre murine embryonale Fibroblasten (MEFs) wurden aus Embryonen an Embryonaltag E12,5 isoliert. Um homozygote *knockout*-MEFs zusammen mit wildtypischen Kontroll-MEFs zu erhalten, wurden heterozygote Mäuse mit Mutation in *Plbd1* bzw. *Plbd2* untereinander verpaart. Die Embryonen wurden isoliert und mit PBS gewaschen. Das viszerale Gewebe wurde entfernt und der Kopf zur Genotypisierung abgetrennt (Abschnitt 3.4.2). Das übrige Gewebe wurde in eine *24-well* Platte überführt, mit 500 µL Trypsin-EDTA überschichtet und mit einer Schere zerkleinert. Nach etwa 10 min bei 37 °C wurde das Gewebe durch pipettieren weiter homogenisiert. Die Suspension wurde mit 5 mL DMEM-Standardmedium aufgenommen und bei 250 xg für 5 min zentrifugiert. Das

Pellet wurde in 5 mL DMEM-Standardmedium resuspendiert und die Zellen auf einer T25-Zellkulturflasche ausplattiert. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, um tote Zellen und Geweberückstände zu entfernen. Nach etwa zwei Tagen wurden die Zellen geteilt (Passage 1) und eine Hälfte bei 80 °C eingefroren (Abschnitt 3.3.2). Die übrigen Zellen wurden zur Immortalisierung verwendet.

MEFs wurden durch die Transfektion eines Expressionsplasmids immortalisiert, das die Sequenz des SV40 large T-Antigen und eine Neomycin-Resistenzkassette trug. Die Zellen wurden in einer T25-Zellkulturflasche zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert, und 5 µg des Plasmids pMS-SV40LT mit PEI transfiziert (Abschnitt 3.3.3.1). Nach 24 h wurde Genitacin G418 (0,5 mg/mL) zum Medium gegeben, um auf transfizierte Zellklone zu selektionieren. Nach etwa 2 - 3 Wochen waren einzelne Zellkolonien erkennbar, die abtrypsiniert und in der Zellkulturflasche verteilt wurden. Die Zellen wurden für mehrere Wochen bei geringer Konfluenz gehalten, um Zellklone mit hoher Teilungsrate anzureichern. Die erzeugte immortalisierte MEF-Zelllinie wurde kryokonserviert (Abschnitt 3.3.2) und für die weitere Verwendung bei -150 °C gelagert.

3.4.5 Gewinnung von Knochenmarkszellen und Differenzierung zu Makrophagen

Zellen des Knochenmarks bilden die Vorläufer für diverse immunologisch-relevante Zelltypen. Aus isolierten Knochenmarkszellen können deshalb durch die Inkubation mit Wachstumsfaktoren definierte Zelltypen differenziert werden. Für die Erzeugung von Knochenmarks-Makrophagen (*bone marrow macrophages*, BMM) können die Knochenmarkszellen entweder mit rekombinantem Makrophagen-*colony-stimulating-factor* (M-CSF) inkubiert werden oder es wird konditioniertes Medium von L929-Bindegewebszellen verwendet, das neben anderen Faktoren auch M-CSF enthält.

Zur Herstellung von L929-konditioniertem Medium wurden die Zellen auf 15 cm Zellkulturschalen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Es wurde frisches DMEM-Standardmedium auf die Zellen gegeben, das nach 10 Tagen abgenommen und sterilfiltriert wurde. Bis zur Verwendung wurde das konditionierte Medium bei -20 °C gelagert. Für die Differenzierung der BMM wurde DMEM-Standardmedium, mit 30 % L929-konditioniertem Medium und 1 % Pyruvatlösung (100 mM) gemischt, um BMM-Medium (BMMM30) zu erhalten.

Zur Isolierung der Knochenmarkszellen wurden die Tiere euthanasiert, die Oberschenkelknochen (Femur) entfernt und von Muskelgewebe befreit. Nach fünfminütiger Inkubation der Knochen in PBS wurde das verbliebene Gewebe entfernt und die Knochen zur Desinfektion in 20 % Ethanol überführt. Die Knochen wurden unter einer Sterilwerkbank erneut mit PBS gewaschen und an

beiden Enden mit einer Schere geöffnet. Der Knochen wurde mit einer Pinzette fixiert und das Knochenmark mit DMEM-Standardmedium mittels einer Insulinspritze (30 Gauge) aus dem Knochen gespült. Die Knochenmarkszellen wurden durch Zentrifugation bei 250 xg für 5 min pelletiert und in 10 mL BMMM30 resuspendiert. Die Zellen wurden auf vier 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert (Tag 1) und an Tag 3 10 mL BMMM30 zugegeben. An Tag 6 konnten die BMM für Experimente verwendet oder in Kryomedium mit 10 % L929-Medium bei -150 °C für die spätere Verwendung eingefroren werden (Abschnitt 3.3.2).

3.4.6 Gewinnung von EDTA-Blut und Isolierung von Leukozyten

Die Entnahme von EDTA-Blut zur Isolierung von Leukozyten erfolgte postmortal aus dem Herzen von ausgewachsenen Mäusen. In eine 1 mL Spritze mit einer 25 Gauge Kanüle wurden 50 µL einer 0,5 M EDTA-Lösung aufgezogen und geschwenkt, um die Spritzeninnenfläche zu benetzen. Die Tiere wurden euthanasiert, der Brustkorb geöffnet und auf einer Wärmeplatte etwa 700 µL Blut aus dem Herzen in die EDTA-Lösung aufgezogen. Für die Untersuchung des Blutbildes wurde das EDTA-Blut gewogen, um den Verdünnungsfaktor durch die EDTA-Lösung zu bestimmen.

Zur Isolierung der Leukozyten wurden die Blutzellen bei 850 xg für 5 min pelletiert und das Blutserum abgenommen. Das Zellpellet wurde in 1 mL 1x RBC-Lysepuffer aufgenommen und für 5 min bei RT inkubiert. Die Lösung wurde bei 850 xg für 5 min zentrifugiert und die lysierten Erythrozyten mit dem Überstand abgenommen. Das Pellet wurde erneut in 1 mL RBC-Lysepuffer resuspendiert und nach 5 min bei Raumtemperatur wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µL PBS resuspendiert und zentrifugiert. Der rötliche Niederschlag der Thrombozyten wurde durch vorsichtiges Pipettieren gelöst, ohne das helle Pellet der Leukozyten zu resuspendieren. Der Überstand mit den Thrombozyten wurde abgenommen und durch Zentrifugation pelletiert. Das Leukozyten-Pellet sowie das Thrombozyten-Pellet wurden in 50 µL Lysepuffer aufgenommen und Zellysate hergestellt (Abschnitt 3.2.1). Die Proteinkonzentration der Fraktionen wurde bestimmt (Abschnitt 3.2.3) und jeweils 50 µg zur Analyse in SDS-PAGE (Abschnitt 3.2.4) und Western-Blot (Abschnitt 3.2.5) eingesetzt.

Lösung	Zusammensetzung
10x <i>red-blood-cell</i> (RBC)-Lysepuffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA in ddH ₂ O
Lysepuffer	0,5 % Triton X-100 1x Proteinase Inhibitor Cocktail (Sigma) in PBS

3.4.7 Perfusion mit Paraformaldehyd zur Fixierung

Die Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion von 0,13 mg Xylazin und 0,02 mg Acepromazin pro 10 g Körpergewicht narkotisiert und wiesen nach etwa 10 min keine Reaktion auf Schmerzreize auf. Der Thorax wurde geöffnet und eine Flügelkanüle in den linken Ventrikel des Herzens eingeführt. Mit einer Peristaltik-Pumpe wurde Phosphatpuffer (PB) mit 1 % Procain (Waschlösung) bei einer Flussrate von 10 mL/min injiziert, wobei mit Beginn der Injektion der rechte Ventrikel aufgeschnitten wurde. Nach der Injektion von 50 mL Waschlösung wurde das Gewebe durch Injektion von 50 mL Perfusionslösung aus PB mit 1 % Procain und 4 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die PFA-fixierten Gewebe wurden entnommen und über Nacht bei 4 °C in Perfusionslösung inkubiert. Die Gewebe wurden in 30 % (w/v) Sucroslösung überführt und bis zur Verwendung bei der Herstellung von Gefrierschnitten (Abschnitt 3.4.8) bei 4 °C gelagert.

3.4.8 Herstellung von Gefrier-Gewebeschnitten

Gefrier-Gewebeschnitte wurden aus PFA-fixierten murinen Geweben hergestellt, die in 30 % (w/v) Sucroslösung in Phosphatpuffer (PB) bei 4 °C gelagert wurden (Abschnitt 3.4.7). Die Gewebe wurden auf einer Schicht von 5 % Sucroslösung in PB auf dem Objekthalter eines Mikrotom SM 2000R (Leica) aufgefroren, das mit Trockeneis gekühlt wurde. Die Organe wurden mit 30 % Sucroslösung ummantelt und 20 µm dicke Schnitte erstellt. Die Schnitte wurden mit einem Pinsel in eine 24-well Platte überführt und in PB mit 0,02 % Natriumazid gelagert.

3.4.9 Herstellung von Paraffin-Gewebeschnitten

Paraffin-Gewebeschnitt wurden von murinen Hoden hergestellt, da die strukturelle Integrität des Gewebes die Herstellung von Gefrierschnitten nicht zuließ. Die Organe wurden entnommen und für 24 h bei 4 °C in Bouin-Fixans inkubiert. Das Fixans wurde über 24 – 48 h mit 50 % Ethanol ausgewaschen. Anschließend wurden die fixierten Organe entwässert, indem diese für je 24 – 48 h in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50/70/90/100 %), Isopropanol (100 %) und zweimal Xylol (100 %) inkubiert wurden. Die entwässerten Gewebe wurden üN bei 65 °C in flüssigem Paraffin inkubiert, am Folgetag in einer Gussform platziert und mit flüssigem Paraffin eingebettet. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Paraffin für 20 min bei -20 °C ausgehärtet. Am Mikrotom wurden 7 µm dicke Schnitte hergestellt, die auf Objektträger platziert wurden und nach Trocknung bei 37 °C üN im Dunkeln gelagert werden konnten.

Zur weiteren Verwendung in der indirekten Immunfluoreszenz (Abschnitt 3.4.10) oder der HE-Färbung (Abschnitt 3.4.11) mussten die Schnitte entparaffiniert werden. Dazu wurden die Schnitte je

10 min zweimal mit Xylol (100 %), einmal mit Isopropanol (100 %), mit einer absteigenden Ethanolreihe (100/90/70/50 %) und schließlich mit dH₂O inkubiert.

Lösung	Zusammensetzung
Bouin-Fixans	71,4 mL gesättigte, wässrige Pikrinsäure (~1.2 %) 24 mL Formalin (~40 %) 4,8 mL Eisessig

3.4.10 Indirekte Immunfluoreszenz-Färbungen auf Gewebeschnitten

Gefrierschnitte in 24-well Platten (Abschnitt 3.4.8) wurden dreimal mit Phosphatpuffer (PB) gewaschen, um das Natriumazid zu entfernen. Zur Permeabilisierung und der Sättigung unspezifischer Protein-Protein-Bindungen wurden die Schnitte für 2 h in PB-Puffer mit 0,5 % Triton X-100 und 4 % Ziegen Serum (Blockierlösung) bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit Erstantikörper in Blockierlösung üN bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die Schnitte dreimal mit Blockierlösung gewaschen und für 2 h bei RT mit Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Zweitantikörpern (Alexa Fluor, 1:2000) in Blockierlösung inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden mit Blockierlösung gewaschen und für 10 min in Blockierlösung mit 1 µg/mL DAPI inkubiert, um die Zellkerne anzufärben. Die Schnitte wurden mit PB gewaschen, mit einem Pinsel auf Objektträger überführt und mit Mowiol/Dabco unter einem Deckglas eingebettet. Die Analyse der Immunfluoreszenz-Färbung erfolgte am Durchlicht-Fluoreszenz-Mikroskop (DM5000B, Leica).

Die indirekte Immunfluoreszenz-Färbung von Paraffin-Gewebeschnitten erfolgte analog zur Färbung von Gefrier-Gewebeschnitten. Zur Vorbereitung der entparaffinierten Schnitte mussten diese jedoch zusätzlich in 10 mM Citratpuffer pH 6,0 für etwa 3 min in der Mikrowelle aufgekocht werden, um bei der folgenden langsamen Abkühlung die Epitope für die Antikörperbindung zu renaturieren.

3.4.11 Hämatoxilin-Eosin (HE)-Färbung von Gewebeschnitten

Die entparaffinierten Gewebeschnitte wurden 10 min in Hämatoxilin-Lösung (Roth) inkubiert und anschließend 20 min unter langsam fließendem Leitungswasser gewaschen. Die Proben wurden für weitere 10 min mit Eosin gefärbt und anschließend zur Entwässerung für je 2 – 3 min in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50/70/90/100 %), Isopropanol (100 %) und zweimal Xylol (100 %) inkubiert. Die Schnitte wurden mit Roti[®] Histokitt (Roth) eingedeckelt und dunkel gelagert.

4 Ergebnisse

Das lysosomale Matrixprotein Plbd2 (Phospholipase B-Domain containing 2) wurde erstmals bei der Identifizierung von Mannose-6-Phosphat (M6P)-modifizierten Proteinen beschrieben (Kollmann *et al.*, 2005; Sleat *et al.*, 2005). Die lysosomale Lokalisation konnte in Zellkultur über indirekte Immunfluoreszenz und in der Maus durch den Nachweis in Tyloxapol-behandelten Lysosomen (Tritosomen) bestätigt werden (Deuschl *et al.*, 2006). Anhand seiner Kristallstruktur wurde das Protein der Klasse der N-terminal nukleophilen Hydrolasen (Ntn-Hydrolasen) zugeordnet (Lakomek *et al.*, 2009). Alle Proteine der Ntn-Hydrolase-Superfamilie haben gemeinsam, dass die autokatalytische Spaltung des Pro-Proteins zur Aktivierung führt, sie eine N-terminale als Nukleophil fungierende Aminosäure im aktiven Zentrum enthalten und an der Spaltung von Amidbindungen beteiligt sind (Oinonen, Rouvinen, 2000). Für das Plbd2 wird daher ebenfalls eine autokatalytische Spaltung postuliert, in der sich das Vorläuferpeptid (Pro-Plbd2) in ein Pro- α - und ein β -Fragment spaltet. Durch die Spaltung wird N-terminal des β -Fragments das Cystein 249 als katalytisches Nukleophil gebildet. Es konnte zuvor gezeigt werden, dass das β -Fragment weiter prozessiert wird (Deuschl, 2008), sodass das reife Protein aus drei Fragmenten von etwa 26 kDa, 23 kDa und 15 kDa besteht (Kettwig, 2010). Der Nachweis der Fragmente im Western-Blot erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper α -Plbd2-„66G9“, dessen genaue Epitope im Protein nicht bekannt sind. Die Anordnung der drei Fragmente zueinander im Gesamtpeptid konnte mit diesem Antikörper bisher nicht aufgelöst werden. Nach Analyse eines C-terminal His₆-markierten Plbd2-Konstruktes wurde angenommen, dass das 25 kDa Fragment N-terminal mit dem Cystein 249 beginnt und im Zentrum der Polypeptidkette liegt, das 15 kDa Fragment würde somit den C-Terminus bilden (Deuschl *et al.*, 2006). Mit einem Antikörper gegen den C-Terminus des Plbd2 konnten von Jensen *et al.* (2007) widersprüchliche Ergebnisse erzielt werden, die ein etwa 27 kDa großes Fragment am C-Terminus nahelegen.

Zur Aufklärung der physiologischen Funktion des Plbd2 wurde in Vorarbeiten ein *genetrap*-Mausmodell generiert, in dem die Expression des Plbd2 unterbunden werden sollte. Im Mausmodell konnten gegenüber wildtypischen Tieren keine pathologischen Veränderungen festgestellt werden,

aus denen auf eine Funktion des Plbd2 hätte geschlossen werden können. Durch den erzeugten *genetrap* konnte die Expression von intaktem Plbd2 reduziert, jedoch nicht vollständig inhibiert werden (Kettwig, 2010). Die verbleibende Plbd2-Aktivität oder kompensatorische Effekte des homologen Proteins Plbd1 könnten einem pathologischen Phänotyp entgegen wirken.

Ziel dieser Arbeit war es, die Prozessierung des Plbd2 und die Anordnung der Fragmente im Gesamtpeptid aufzuklären. Zu diesem Zweck wurde ein Antikörper α -Plbd2-„Crp76“ spezifisch gegen ein C-terminales Peptid des Plbd2 verwendet (Jensen *et al.*, 2007), der in Vorarbeiten bereits erfolgreich getestet wurde (Uffmann, 2014). Durch die Mutation des katalytischen Cystein249 sollte die Autokatalyse untersucht werden (Abschnitt 4.1). Die postulierte proteolytische Spaltung wurde durch Mutationsanalyse und mit Protease-Inhibitoren *in vivo* analysiert. Das aufgereinigte Protein wurde *in vitro* mit rekombinanten Proteasen umgesetzt (Abschnitt 4.2). Die Sortierung des Plbd2 entlang des M6P-Weges wurde in Transport-defizienten Zellen untersucht (Abschnitt 4.3). Um die physiologische Funktion aufzuklären, wurden mittels CRISPR-Cas9 knockout-Mausmodelle von Plbd2 und dem homologen Protein Plbd1 erstellt (Abschnitt 4.4).

4.1 Autokatalytische Prozessierung des Plbd2

Die Reifung des Plbd2 erfolgt über mehrere Prozessierungsschritte, an deren Ende *in vivo* drei Fragmente von etwa 26 kDa, 23 kDa und 15 kDa stehen. In Vorarbeiten konnte die Entstehung dieser finalen Form durch zwei Spaltungen postuliert werden, die bis dato jedoch nicht weiter charakterisiert wurden. Im folgenden Abschnitt soll besonders die Spaltung des Pro-Plbd2 in ein α -Fragment und ein intermediäres β -Fragment thematisiert werden (Abbildung 9).

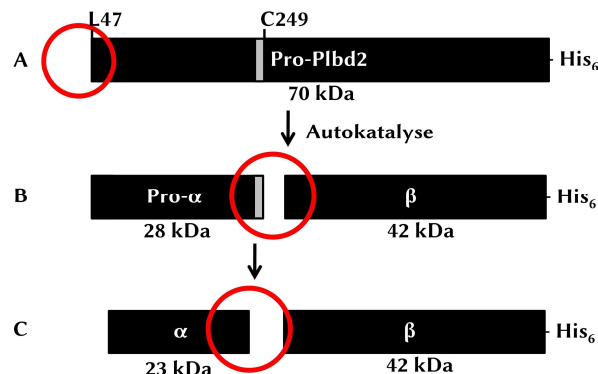


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Prozessierung des Pro-Plbd2 in ein α - und ein β -Fragment.

Dargestellt sind die postulierten Prozessierungsschritte am His₆-markierten Pro-Plbd2. Veränderungen sind mit roten Kreisen hervorgehoben. Das Pro-Plbd2 entsteht durch die Abspaltung des Signalpeptids und beginnt N-terminal mit Leu 47 (A). Durch eine putativ autokatalytische Prozessierung werden die Pro- α - und β -Fragmente generiert (B), durch Abspaltung des Propeptids entsteht das kleinere α -Fragment (C). Die Größen der Fragmente ergeben sich aus den apparenten Größen in der SDS-PAGE.

Die Synthese des Plbd2 erfolgt in Form eines Prä-Pro-Peptids, von dem das relativ lange Signalpeptid (Met1 - Ala46) als Prä-Fragment abgespalten wird (Deuschl, 2008)(Abbildung 9, Form A). Bei der Kristallisation des rekombinanten Proteins *in vitro* konnte eine Spaltung des Pro-Plbd2 in ein 28 kDa Pro- α - und ein 42 kDa β -Fragment beobachtet werden (Lakomek *et al.*, 2009)(Abbildung 9, Form B). Es wurde eine autokatalytische Aktivierung postuliert (Kettwig, 2010), wie sie auch bei anderen Ntn-Hydrolasen zu beobachten ist (vgl. Abschnitt 1.2). Es kann anhand der Kristallstruktur vermutet werden, dass durch Abspaltung des in der Struktur erkennbaren Pro-Peptids am C-Terminus des α -Fragments die aktive Tasche des Proteins freigegeben werden muss (Abbildung 9, Form C). Eine weitere proteolytische Spaltung des β -Fragments konnte beobachtet werden (Deuschl, 2008), mit der die Entstehung eines etwa 15 kDa großen C-terminalen Fragments postuliert wurde. Es konnten jedoch keine endgültigen Ergebnisse zur Position der Spaltstelle erbracht werden, zudem steht die postulierte Fragmentgröße im Konflikt zu einer Untersuchung in der ein etwa 27 kDa großes C-terminales Fragment gezeigt werden konnte (Jensen *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit wurde die autokatalytische Spaltung des Vorläuferpeptids in ein α - und ein β -Fragment überprüft und mit Hilfe einer spaltungs-inaktiven Mutante weiter untersucht. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch limitierte Proteolyse das β -Fragment in ein β 1- und ein β 2-Fragment gespalten wird.

4.1.1 Spaltungsmuster des Plbd2 *in vivo*

Zur Detektion des Plbd2 im Western-Blot wurde vorwiegend ein polyklonaler Antikörper α -Plbd2-„66G9“ verwendet, der durch Immunisierung von Kaninchen mit dem Gesamtprotein Pro-Plbd2 hergestellt wurde. Die Epitope des Antikörpers sind nicht bekannt und auch die Detektion anderer Proteine als Plbd2 ist aufgrund des komplexen Bandenmusters im Western-Blot (Abbildung 10A) als wahrscheinlich anzusehen. Die Spezifität des Antikörpers gegenüber Plbd2 sollte überprüft werden, indem die Signale im Western-Blot in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) und Lysosomenangereicherten Fraktionen aus Leber (Tritosomen) von Wildtyp- (WT) und Plbd2-*genetrap*- (Plbd2-gt) Mäusen miteinander verglichen wurden. Zur Detektion der C-terminalen Fragmente des Plbd2 wurde ein Antikörper Plbd2-„Crp76“ verwendet, der gegen ein Peptid des Plbd2 der Ratte gerichtet ist, das mit zwei Abweichungen den C-terminalen Aminosäuren (Gln580-Asp594) des murinen Proteins entspricht (Jensen *et al.*, 2007). Mit dem Plbd2-Crp76-Antikörper sollten die C-terminalen Fragmente des Plbd2 bestimmt werden.

Im Lysat der WT-MEFs (Abbildung 10A, Lane 1) konnten mit dem Plbd2-66G9-Antikörper die Banden des Pro-Plbd2 bei 70 kDa, des β -Intermediates bei 42 kDa und der reifen Fragmente β 2 bei 26 kDa und α bei 23 kDa detektiert werden. Die Banden bei etwa 52 kDa und 30 kDa fanden sich in gleicher Intensität in den Plbd2-*genetrap*-MEFs (Abbildung 10A, Lane 2) und waren somit sehr wahrscheinlich nicht spezifisch für das Plbd2. Auffällig war bei den Plbd2-*genetrap*-MEFs die Bande bei etwa 120 kDa, die vermutlich dem Fusionsprotein aus Plbd2 und der Neomycin-Phosphotransferase entspricht, das aus dem *genetrap* resultiert (Kettwig, 2010). In Abbildung 10B konnten mit dem Crp76-Antikörper das β -Intermediat (42 kDa) und das β 2-Fragment (26 kDa) detektiert werden, die somit die C-terminalen Fragmente des Plbd2 bilden. Die Signale waren in WT-MEFs deutlich (Lane 1) und in Plbd2-*genetrap*-MEFs schwach (Lane 2) erkennbar. Zusätzliche Banden, die nicht Plbd2 zugeordnet werden können, fanden sich bei etwa 18 kDa und wie auch für den 66G9-Antikörper bei 30 kDa. Um das Verhältnis von Plbd2-Signalen zu Nebensignalen zu verbessern, wurden Lysosomenangereicherte Fraktionen aus der Leber (Tritosomen) von WT- und Plbd2-*genetrap*-Mäusen verwendet. Wie an der Detektion des lysosomalen Markerproteins Limp2 in Abbildung 10C zu erkennen ist, war dessen Signalintensität in Tritosomen deutlich höher als in MEFs, obwohl nur 1/3 der Gesamt-Proteinmenge geladen wurde.

In den WT-Tritosomen (Abbildung 10, Lane 4) zeigte sich gegenüber den WT-MEF-Proben ein deutlicheres Signal der Plbd2-Fragmente (Pro-Plbd2 70 kDa, β -Intermediat 42 kDa, β 2-Fragment 26 kDa und α -Fragment 23 kDa). Die relativen Bandenintensitäten unterschieden sich in MEFs und Tritosomen, während das Pro-Plbd2 bei 70 kDa in den MEFs die höchste Intensität der detektierten Banden aufwies, war dessen relative Intensität in den Tritosomen gering. Konträr verhielt sich das

β 2-Fragment bei 26 kDa, das in Tritosomen hoch abundant war, in MEFs dagegen kaum zu detektieren war. Zudem war das β 1-Fragment bei etwa 15 kDa mit dem 66G9-Antikörper in Lane 4 schwach erkennbar. Die Banden bei etwa 52 kDa (Abbildung 10A) und 30 kDa (Abbildung 10A und B), die anderen Proteinen als Plbd2 zugeordnet werden können, waren in den Tritosomen deutlich schwächer vorhanden als in den MEFs. Die mit dem Crp76-Antikörper in den MEFs deutliche Bande bei 18 kDa (Abbildung 10B) war in den Tritosomen nicht detektierbar. Die Plbd2-Signale in den Plbd2-*genetrap*-Tritosomen (Lane 5) waren mit etwa 20 % der Signalstärke in den WT-Tritosomen (Lane 4) deutlich schwächer. Die mit dem 66G9-Antikörper in Lane 2 detektierbare Bande des Fusionsproteins aus Plbd2 und Neomycin-Phosphotransferase bei 120 kDa konnte in den Plbd2-*genetrap*-Tritosomen nicht detektiert werden.

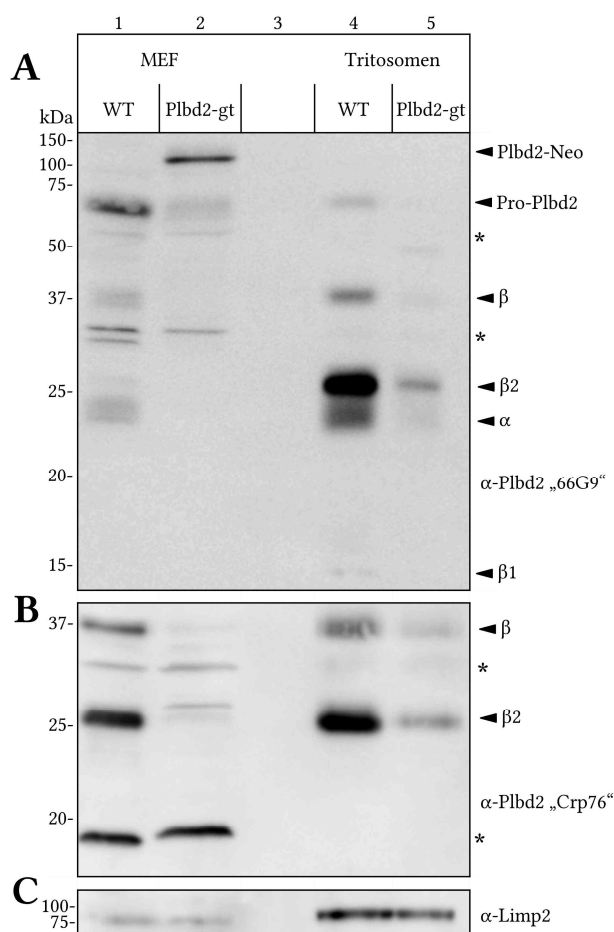


Abbildung 10: Western-Blot von WT- und Plbd2-*genetrap*-MEFs und Tritosomen.

60 μ g der aufgearbeiteten Lysate von murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) und 20 μ g Lysosomen-angereicherten Fraktionen (Tritosomen) wurden nach SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran auf die Expression von Plbd2 untersucht. Der Nachweis des Plbd2 erfolgte mit Plbd2-66G9- oder Plbd2-Crp76-Antikörpern. Um die Spezifität der Banden einzuordnen, wurden aufgearbeitete Lysate von Plbd2-*genetrap*-MEFs und -Tritosomen eingesetzt. Banden die in WT und Plbd2-gt mit gleicher Intensität detektiert werden, sind mit einem Stern gekennzeichnet. Limp2 dient als Ladekontrolle. Um Restsignale anderer Antikörper zu vermeiden, wurde der Plbd2-66G9-Antikörper (A) und der Limp2-Antikörper (C) auf einem Blot verwendet, für den Nachweis mit dem Crp76-Antikörper (B) wurde ein technisches Replikat genutzt.

Die Fragmente des Plbd2, die mit dem Plbd2-Crp76-Antikörper detektiert werden konnten, schließen den C-Terminus des Proteins ein und sind mit β -Intermediat (42 kDa) und β 2-Fragment (26 kDa) bezeichnet. Das Prozessierungsschema aus Abbildung 9 kann somit um eine Spaltung erweitert werden, die aus dem 42 kDa β -Fragment das C-terminale 26 kDa β 2-Fragment und ein zentrales β 1-Fragment entstehen lässt (Abbildung 11).

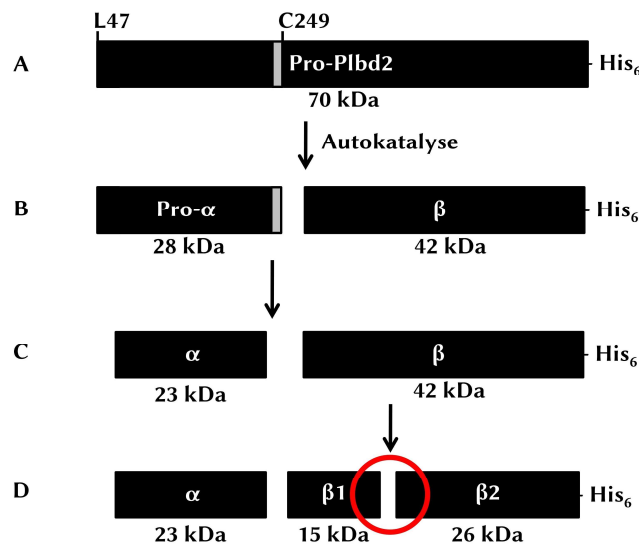


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Prozessierung des Pro-Plbd2 in die α -, β 1- und β 2-Fragmente.

Dargestellt sind die postulierten Prozessierungsschritte am His₆-markierten Pro-Plbd2. Veränderungen sind mit roten Kreisen hervorgehoben. Das Pro-Plbd2 entsteht durch die Abspaltung des Signalpeptids und beginnt N-terminal mit Leu 47 (A). Durch eine putativ autokatalytische Prozessierung werden die Pro- α - und β -Fragmente generiert (B), durch Abspaltung des Propeptids entsteht das kleinere α -Fragment (C). Das β -Fragment wird in die Fragmente β 1 und β 2 gespalten (D). Die Größen der Fragmente ergeben sich aus den apparenten Größen in der SDS-PAGE.

Da es sich bei MEFs um Fibroblasten handelt, die zur Immortalisierung uneinheitlich transformiert wurden, können Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien auftreten. Die Plbd2-Expression in verschiedenen MEF-Linien wurde deshalb mit einer etablierten murinen embryonalen Fibroblasten-Zelllinie (NIH-3T3) und einer Neuroblastoma-Zelllinie (N2a) verglichen. Wie in Abbildung 12A zu erkennen ist, wiesen alle Fibroblasten-Linien nicht jedoch die N2a-Zellen, die Bande bei etwa 30 kDa auf, die bereits als nicht Plbd2-spezifisch identifiziert wurde. Das Verhältnis des Pro-Plbd2 zu den murenen Fragmenten β 2 bei 26 kDa und α bei 23 kDa unterschied sich zwischen den Zelllinien stark. Bei der Linie „MEF-WT T.L.“ waren die Banden der murenen 26 kDa und 23 kDa Fragmente am deutlichsten zu erkennen, weshalb diese Linie im weiteren Verlauf verwendet wurde. Nach Transfektion mit dem Expressionskonstrukt Plbd2-His₆ wiesen die untersuchten MEF-Linien (Lane 5 und 7) sowie die NIH-3T3-Zellen (Lane 9) im Vergleich zu untransfizierten Zellen ein stärkeres Signal des Pro-Plbd2 auf, während die übrigen Banden unverändert blieben. Im Fall der transfizierten N2a-Zellen (Lane 11) verstärkte sich das Signal aller Fragmente aufgrund einer hohen Transfektionseffizienz so weit, dass die Banden bis auf das β 1-Fragment nicht mehr differenziert werden konnten.

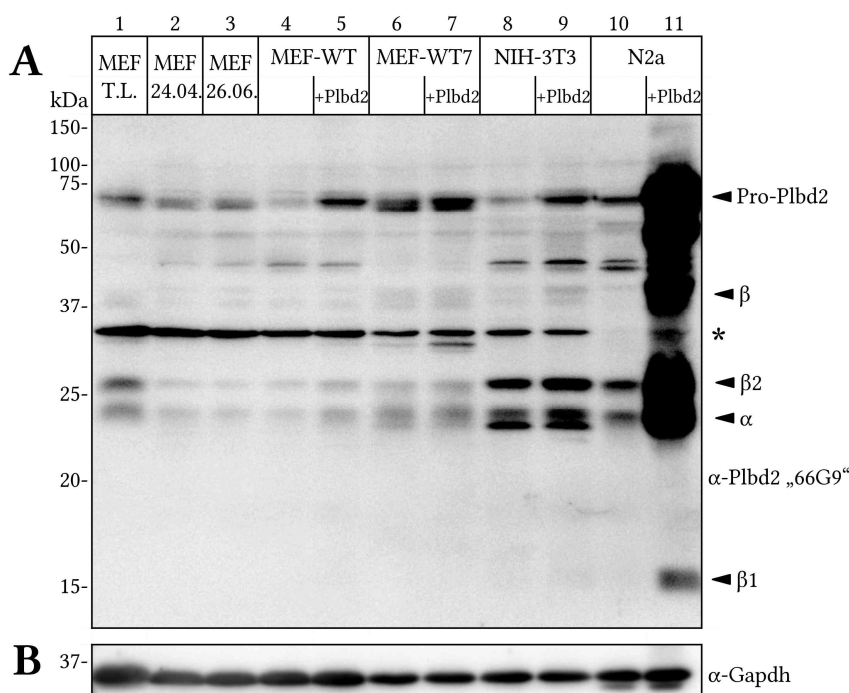


Abbildung 12: Western-Blot des Spaltungsmuster von Plbd2 in Fibroblasten und N2a-Zellen.

Fünf unabhängig präparierte murine embryonale Fibroblasten (MEF)-Zelllinien, sowie NIH-3T3-Fibroblasten und Neuroblastoma2a (N2a)-Zellen wurden lysiert und 100 µg der aufgearbeiteten Zellysate zu SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran eingesetzt. Die Zelllinien WT7, NIH-3T3 und N2a wurden zudem 24 h zuvor mit dem Expressionsplasmid Plbd2-His₆ transfiziert. Plbd2 wurde mit dem 66G9-Antikörper detektiert (A), Gapdh diente als Ladekontrolle (B).

Es konnte gezeigt werden, dass für Plbd2 aus Lysosomen-angereicherten Fraktionen im Western-Blot drei deutliche Banden bei 42 kDa, 26 kDa und 23 kDa nachzuweisen sind. Schwächere Plbd2-spezifische Banden lassen sich bei 70 kDa und 15 kDa detektieren. Mit dem Plbd2-Crp76-Antikörper kann das β-Intermediat bei 42 kDa und das β2-Fragment bei 26 kDa nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass diese Fragmente den C-Terminus des Proteins darstellen. Mit dem Plbd2-66G9-Antikörper können zudem die Fragmente α bei 23 kDa und β1 bei 15 kDa nachgewiesen werden. Das Pro-Plbd2 wird von beiden Antikörpern erkannt. Beide Antikörper Plbd2-66G9 und Plbd2-Crp76 erkennen in MEFs einige Banden die nicht dem Plbd2 zugeordnet werden können. Diese Banden sind in Lysosomen-angereicherten Fraktionen aus Leber deutlich abgereichert.

4.1.2 Analyse der putativ autokatalytisch inaktiven Mutanten C249S und C249A

In Vorarbeiten konnte durch Analyse der Kristallstruktur und dem Vergleich mit strukturhomologen Proteinen das Cystein249 als zentrale Aminosäure des aktiven Zentrums identifiziert werden. Es wurde postuliert, dass die autokatalytische Spaltung des Vorläuferpeptids durch den nukleophilen Angriff der Sulfhydryl-Seitenkette des Cysteins249 auf den Carbonyl-Kohlenstoff des Serin248 erfolgt (Lakomek *et al.*, 2009). Das Cystein249 bildet nach der Spaltung den N-Terminus des β -Fragments. Durch eine Mutation des Cysteins sollte die autokatalytische Spaltung unterbunden werden. Ein entsprechend mutiertes Expressionsplasmid Plbd2-C249S-His₆ wurde bereits in Vorarbeiten kloniert (Kettwig, 2010) und wurde hier durch Expression in HeLa-Zellen erstmalig detailliert untersucht.

Wie in Abbildung 13C zu erkennen ist, stellte sich nach Transfektion der HeLa-Zellen mit Plbd2-WT das typische Bandenmuster von Pro-Plbd2 (70 kDa), β -Intermediat (40 kDa) und den reifen Fragmenten α (23 kDa) und β 2 (26 kDa) dar. Nach Transfektion mit der Mutante C249S war zusätzlich eine Bande bei etwa 36 kDa zu erkennen, die nicht vom Crp76-Antikörper erkannt wurde (Abbildung 13B). Das Fragment beinhaltet demnach nicht den C-terminalen Teil des Proteins. Aus der Größe und Position im Gesamtpeptid kann vermutet werden, dass es sich um ein N-terminales Fragment des Pro-Plbd2 (α - β 1-Fusionsfragment) ohne den C-terminalen Teil β 2 handelt (siehe Abbildung 14 rechts).

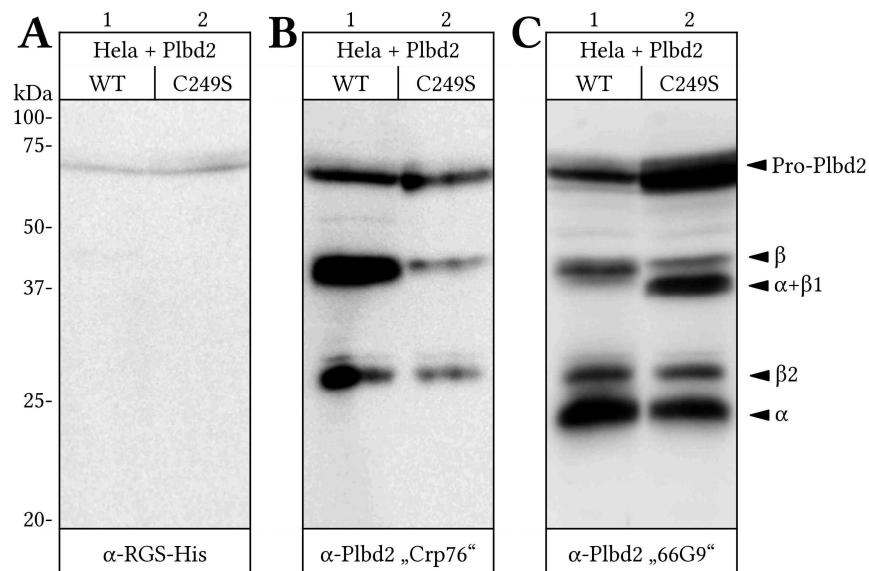


Abbildung 13: Western-Blot der Expression von Plbd2-His₆ und Plbd2-C249S-His₆ in HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für Plbd2-His₆ und Plbd2-C249S-His₆ transfiziert, die Zellen nach 96 h geerntet, lysiert und 100 μ g der aufgearbeiteten Zellysate zu SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit RGS-His- (A), Plbd2 „Crp76“- (B) und Plbd2 „66G9“- (C) Antikörpern.

Das Auftreten des neuen α - β 1-Fragments bei etwa 36 kDa konnte so erwartet werden, da die proteolytische Abspaltung des β 2-Fragments auch in dieser C249S-Mutante stattfinden kann. Das β -Intermediat bei 42 kDa war mit dem Plbd2-66G9- und Plbd2-Crp76-Antikörper in Abbildung 13B und C (Lane 2) jedoch ebenfalls nachweisbar, was darauf hindeutet, dass die Spaltung am aktiven Zentrum durch die C249S-Mutation nicht vollständig inhibiert wurde. Gründe dafür könnten entweder eine kompensatorische Spaltung durch eine intrazelluläre Protease oder eine nukleophile Aktivität der Hydroxyfunktion der Serin-Mutante sein. Um letzteres auszuschließen wurde eine weitere Mutante erzeugt, in der das Cystein249 durch ein Alanin substituiert wurde (Primer siehe Abschnitt 2.7.2).

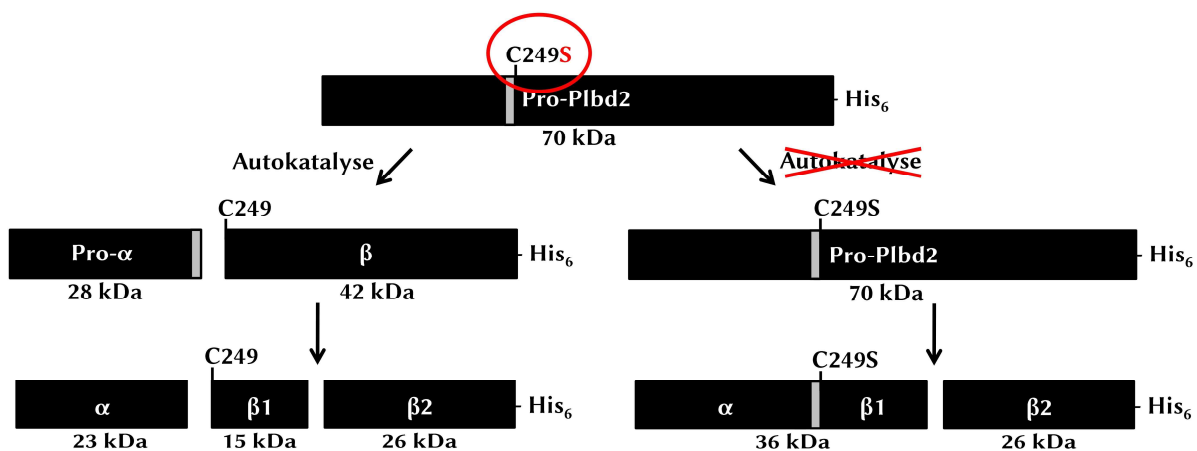


Abbildung 14: Schematische Darstellung der erwarteten Prozessierung von Plbd2 und der Mutante der Plbd2-C249S.

Dargestellt ist das Cystein249 auf dem His₆-markierten Pro-Plbd2 und die Spaltung in verschiedene Fragmente. Die Mutation Cys249 zu Ser und das Ausbleiben der Autokatalyse sind in Rot angedeutet. Durch die Mutation des Cystein249 zu Serin soll die autokatalytische Spaltung inhibiert werden, wodurch das α - und β -Fragment bei der Mutante (rechts) nicht wie bei WT-Plbd2 (links) getrennt würden. Durch den weiteren Prozessierungsschritt wird in beiden Fällen das β -Fragment abgespalten.

Die generierte Mutante Plbd2-C249A-His₆ wurde neben der C249S-Mutante und dem WT-Plbd2 exprimiert und die Zellysate im Western-Blot mit Plbd2-Crp76- und Plbd2-66G9-Antikörpern untersucht. Um proteolytische Effekte durch lysosomale Proteasen zu identifizieren, wurde zudem das Zellkulturmedium analysiert. Es wurden gut transfizierbare N2a-Zellen verwendet, um eine möglichst hohe Expression der Proteine zu erreichen. Aufgrund der Überexpression sollten das Plbd2 sowie die beiden Mutanten stark sezerniert werden, während die endogenen lysosomalen Proteasen nur geringfügig sezerniert werden. Auch die Reaktionsbedingungen im Überstand sollten die Aktivität einiger Proteasen einschränken, sodass eine Protease-vermittelte Spaltung, wenn überhaupt, nur in sehr geringem Maße stattfinden würde.

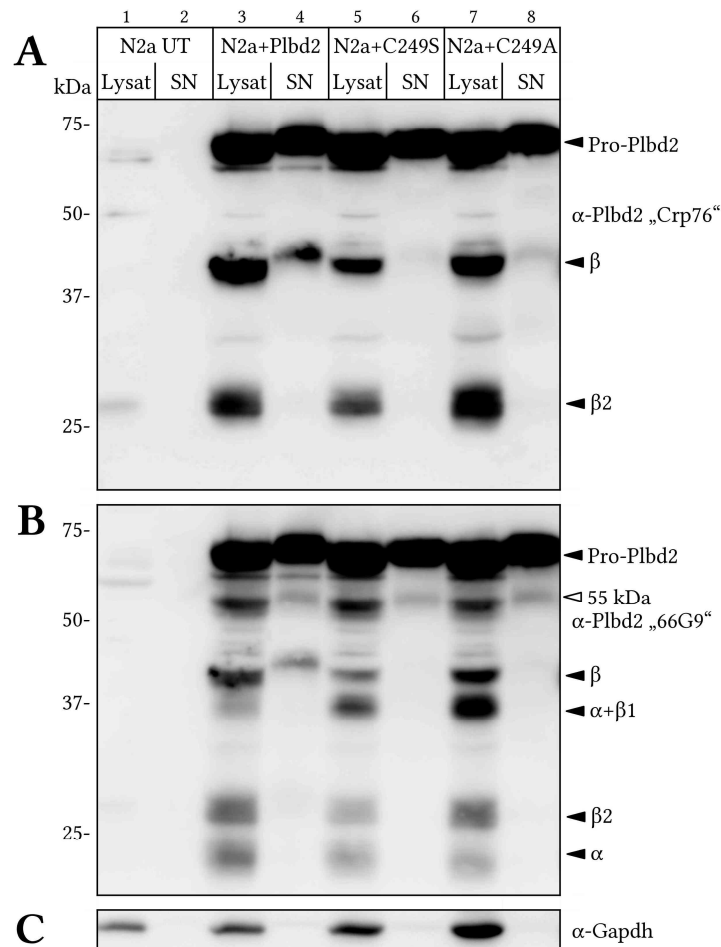


Abbildung 15: Western-Blot von N2a-Zellen transfiziert mit WT-Plbd2 und den Mutanten C249S und C294A. N2a-Zellen wurden mit den Expressionskonstrukten für Plbd2-His₆, Plbd2-C249S-His₆ und Plbd2-C294A-His₆ transfiziert, nach 24 h auf Hungermedium (0,1 % FCS) gesetzt, nach weiteren 24 h das Medium abgenommen und die Zellen geerntet. 40 μ g der aufgearbeiteten Zellysate und 1/15 des korrespondierenden Volumens der Zellkulturüberstände wurden zu SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit Plbd2 „Crp76“-Antikörper (A) und Plbd2 „66G9“-Antikörper (B). Gapdh (C) diente als Ladekontrolle.

In Abbildung 15A sind die Plbd2-Fragmente erkennbar, die durch den C-terminalen Plbd2-Crp76-Antikörper detektiert wurden. Zwischen dem Plbd2-WT-Lysat und den Lysaten der beiden Mutanten ist kein Unterschied der Bandenmuster erkennbar. In den Zellkulturüberständen (SN) lag dagegen deutlich weniger β -Fragment bei beiden Mutanten vor als bei der Expression des Plbd2-WT. Es fiel zudem ein Größenunterschied bei dem Pro-Plbd2 sowie dem β -Fragment zwischen den Lysaten und den Überständen (SN) auf. Da der N-Terminus des β -Fragments durch das Cystein249 definiert ist, könnte die geringere Größe im Lysat auf eine C-terminale Verkürzung hindeuten. Das β 2-Fragment konnte in den Lysaten, nicht jedoch im Überstand detektiert werden. Bei Detektion mittels des Plbd2-66G9-Antikörpers (Abbildung 15B) konnte die beschriebene α - β 1-Bande bei etwa 36 kDa in den Lysaten beider Mutanten, C249S und C294A, detektiert werden. Auf gleicher Höhe befand sich bei Expression des WT-Plbd2 ein wesentlich schwächeres Signal. In den

Zellkulturüberständen konnte das β -Fragment auch hier nur bei Expression des Plbd2-WT nachgewiesen werden (Abbildung 15B, Lane 4). Durch die autokatalytische Spaltung des Pro-Plbd2 entsteht neben dem β -Fragment auch das α -Fragment, welches aufgrund der Verhältnisse der Signalintensität im Überstand nicht zu detektieren war. Auf die Bande bei etwa 55 kDa, die in den Lysaten mit dem Plbd2-66G9-Antikörper in Abbildung 15B zu detektieren war, wird in späteren Abschnitten eingegangen.

Das Ausbleiben der autokatalytischen Spaltung der Mutanten C249S und C249A im Zellkulturmedium spricht dafür, dass das Cystein249 eine zentrale Rolle bei dieser Spaltung des Pro-Plbd2 hat. Die Spaltung der Mutanten im Lysat ist vermutlich auf intrazelluläre Endoproteasen zurückzuführen.

Während die C-terminalen Fragmente des Plbd2 mit dem „Crp76“-Antikörper zweifelsfrei identifizierbar sind, ist die Positionierung des 36 kDa-Fragments innerhalb des Gesamtproteins schwieriger nachzuweisen. Zur besseren Einordnung, wo sich das Fragment im Pro-Plbd2 befindet, sollten die Fragmente im Zusammenhang mit ihrer Glykosylierung untersucht werden. Dazu wurden Plbd2-WT und die Mutante Plbd2-C249A in Hela-Zellen exprimiert, die bei Detektion mit dem Plbd2-66G9-Antikörper als humane Zellen kein Hintergrundsignal durch endogenes Plbd2 aufweisen. Die Lysate der transfizierten Zellen wurden mit Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) behandelt und die partiell deglykosylierten Fragmente über SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Das Plbd2-Vorläuferpeptid verfügt über fünf potentielle N-Glykosylierungsstellen an den Asparaginen N93, N115, N236, N441 und N520. In Vorarbeiten wurde vermutet, dass alle fünf Glykosylierungsstellen genutzt werden (Deuschl *et al.*, 2006).

Hela-Zellen wurden mit Plbd2-WT oder der Mutante C249A transfiziert, die Lysate mit PNGase F (+) oder nur Puffer (-) behandelt und über SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Beim Nachweis mit Plbd2-„Crp-76“-Antikörper (Abbildung 16A) war bei den β - und β 2-Fragmenten von unbehandelten (-) Zellen zu PNGase F-behandelten (+) eine Größenveränderung in zwei Schritten erkennbar, was auf eine zweifache Glykosylierung schließen lässt. Bei Nachweis mit dem Plbd2-66G9-Antikörper (Abbildung 16B) war zudem auch das α -Fragment zu erkennen, dessen Größe nach Deglykosylierung um drei Stufen abnimmt. Aufgrund der geringen Auflösung und starken Bandenintensität im hohen Molekularbereich war der Glykosylierungsstatus des Pro-Plbd2 nicht abzuschätzen. Bei Plbd2-C249A transfizierten Zellen trat im unbehandelten Zustand (-) im Vergleich zum WT-Plbd2 die Bande bei 36 kDa auf, die nach PNGase F-Behandlung (+) in drei Stufen deglykosyliert wurde. Es ist deshalb anzunehmen, dass dieses Fragment auch das dreifach glykosylierte N-terminale α -Fragment einschließt.

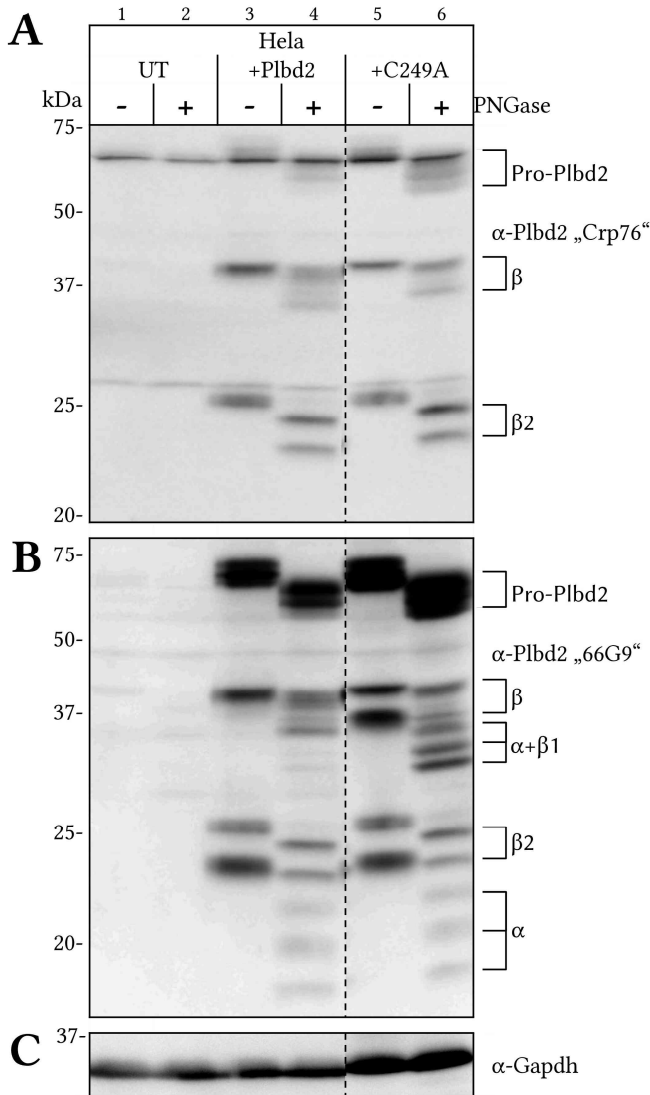
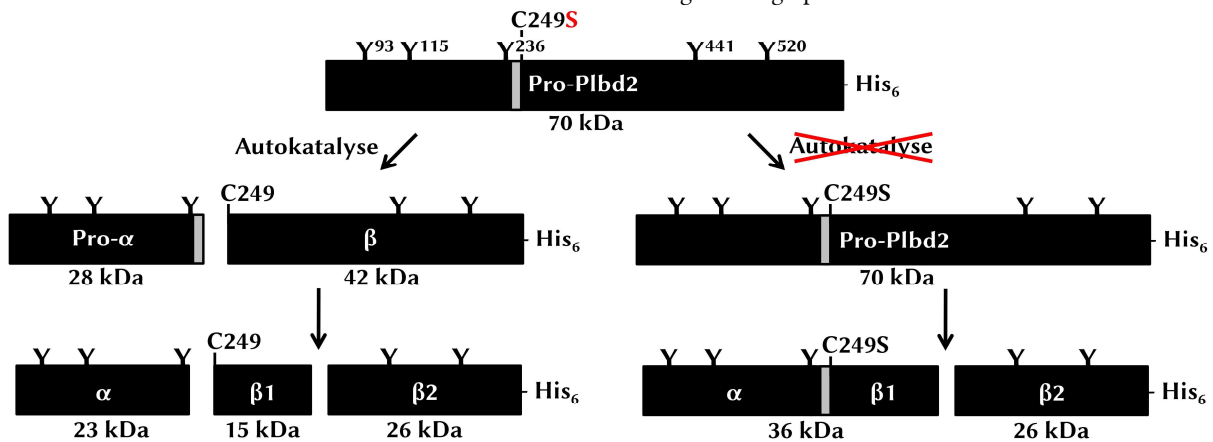


Abbildung 16: Western-Blot von HeLa-Zelllysaten nach Deglykosylierung mit PNGase F.

HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden Plbd2-His₆ oder Plbd2-C249A-His₆ transfiziert, nach 96 h geerntet und lysiert. 100 μ g der aufbereiteten Zellysate wurden mit PNGase F deglykosyliert (+) oder dem Protokoll ohne Enzym unterzogen (-). Die Proben wurden per SDS-PAGE getrennt und im Western-Blot auf PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte mit Plbd2 „Crp76“-Antikörper (A) oder Plbd2 „66G9“-Antikörper (B). Als Ladekontrolle diente Gapdh (C). Der Übersichtlichkeit halber wurden Bereiche der Abbildung geschnitten.

Abbildung 17: Schematische Darstellung der erwarteten Prozessierung von Plbd2 mit Glykanen.

Dargestellt ist das Cystein249 auf dem His₆-markierten Pro-Plbd2 sowie die N-Glykane nach Deuschl (2008). Die Mutation Cys249 zu Ser und das Ausbleiben der Autokatalyse sind in rot angedeutet. Durch die Mutation des Cystein249 zu Serin soll die autokatalytische Spaltung inhiert werden, wodurch das α - und β -Fragment bei der Mutante (rechts) nicht wie bei WT-Plbd2 (links) getrennt würden. Durch den weiteren Prozessierungsschritt wird in beiden Fällen das β 2-Fragment abgespalten.



Es konnte gezeigt werden, dass die Spaltung des Pro-Plbd2 in die Fragmente α und β vom Cystein249 abhängig ist und höchst wahrscheinlich autokatalytisch abläuft. In der Zelle scheint eine Endoprotease das Pro-Plbd2-C249A im Bereich des Pro-Peptids zu spalten, wodurch die α - und β -Fragmente gebildet werden. Das bei Expression der C249A-Mutante beschriebene Fragment bei 36 kDa ist dreifach glykosyliert (Abbildung 16C, Lane 6) und nicht am C-Terminus des Pro-Plbd2 gelegen (Abbildung 13B und C). Es handelt sich demnach um die Fragmente α und β_1 , die durch die Inhibition der Autokatalyse in der C249A-Mutante weniger effizient getrennt werden (α - β_1 -Fusionsfragment).

4.1.3 Autokatalytische Prozessierung *in vitro*

Die *in vivo* beobachtete autokatalytische Spaltung des Pro-Plbd2 sollte *in vitro* nachvollzogen werden. Dazu wurden Plbd2-His₆ überexprimierende HT1080-66-ÜE Zellen kultiviert und das Plbd2 über Ni²⁺-NTA Agarose-Beads im *batch*-Verfahren aus dem Zellkulturmedium aufgereinigt. Das rekombinante Protein wurde in 25 mM Tris/HCl pH 7,4 gelagert und zur Induktion der Autokatalyse in 250 mM NaAc auf den gewünschten pH umgepuffert. Der Anteil von Pro-Plbd2 und β -Intermediat wurde im Western-Blot über das Signal des Plbd2-Crp76-Antikörpers bestimmt.

In Abbildung 18A ist zu erkennen, dass die Inkubation des Proteins für 96 h in pH 4,5 zur partiellen Proteolyse des Vorläuferpeptids zugunsten des β -Intermediat führte (Lane 2 und 3). Während der Inkubation nahm der relative Anteil des Pro-Plbd2 von 72 % auf 36 % ab. Bei Inkubation im neutralen pH über die gleiche Zeit, lag der Anteil der Pro-Plbd2 bei 88 %, was eine pH-Abhängigkeit der Prozessierung nahelegt. Der ebenfalls untersuchte Einfluss eines Protease-Inhibitor-Cocktails konnte aufgrund der unsauberen Proteinübertragung im Western-Blot nicht quantifiziert werden. Bei Nachweis mit dem Plbd2-66G9-Antikörper war das Pro- α -Fragment bei etwa 28 kDa zu erkennen (Abbildung 18B, Lane 2-5). Die apparente Größe des α -Fragments lag *in vivo* bei etwa 23 kDa (vgl. Abbildung 10), was eine intrazelluläre Verkürzung des Fragments nahelegt. In der Lane 3 und 4 der Abbildung 18B ist ein Fragment bei etwa 23 kDa zu erkennen, das dem α -Fragment entsprechen könnte. Die Verkürzung des Pro- α -Fragments *in vitro* ist vermutlich nicht auf die autokatalytische Aktivität des Plbd2 zurückzuführen, so dass die Anwesenheit weiterer lysosomaler Proteasen notwendig wäre. Die Interaktion des Plbd2 mit anderen Proteinen wurde bereits mehrfach beschrieben (Kettwig, 2010; Fischer *et al.*, 2016), weshalb eine Ko-Aufreinigung anderer Proteine bei der Präparation des Plbd2 aus Zellkulturmedium im *batch*-Verfahren nicht verwunderlich wäre.

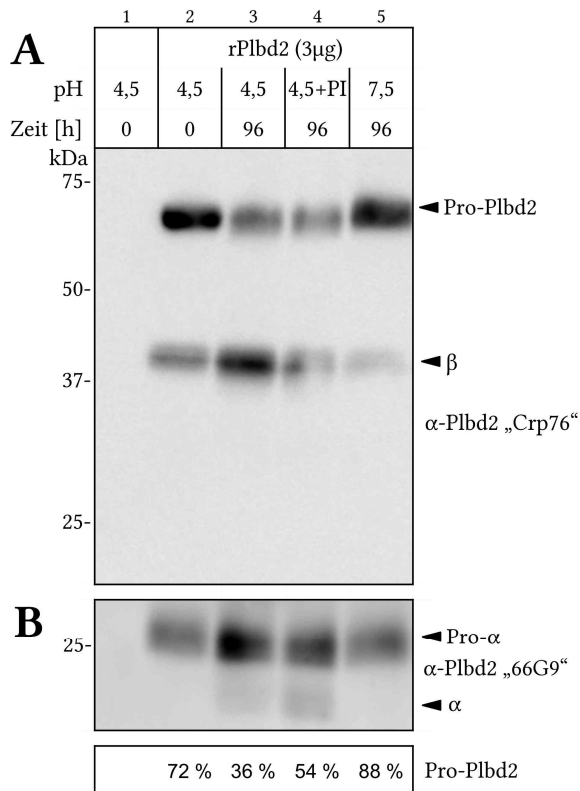


Abbildung 18: Western-Blot der autokatalytischen Prozessierung von rekombinantem Plbd2 *in vitro*.

3 µg rekombinantes Plbd2 wurden in 15 µL 25 mM Tris/HCl pH 7,4 gelöst und mit 15 µL 500 mM NaAc pH 4,5 oder pH 7,5 überpuffert. Zu einer Reaktionslösung wurde 1x Protease-Inhibitor-Cocktail gegeben. Die Proben wurden entweder auf -20 °C eingefroren (0 h) oder 96 h bei 37 °C inkubiert und über SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran analysiert. Der Nachweis erfolgte mit dem Plbd2-„Crp76“- (A) und dem Plbd2-„66G9“-Antikörper (B). Der Anteil des Pro-Plbd2 am Gesamtsignal wurde anhand des „Crp76“-Signals berechnet.

Um den Einfluss anderer lysosomaler Proteasen auf die Prozessierung zu untersuchen, wurde aufgereinigtes Plbd2 sowie die Mutante Plbd2-C249A mit Lysosomen-angereicherten Fraktionen aus Leber (Tritosomen) inkubiert. Bei dem Nachweis von Plbd2 mit dem Antikörper Plbd2-Crp76 machte nach 96 stündiger Inkubation ohne Tritosomen das Pro-Plbd2 noch 36 % des Gesamtsignals aus (Abbildung 19A, Lane 2). Bei Zugabe von 5 µg Tritosomen reduzierte sich der Anteil des Pro-Plbd2 von 56 % vor der Inkubation (Lane 3) auf 9 % nach 96 h (Lane 6). Die Prozessierung der C249A-Mutante blieb hingegen auch bei Inkubation mit Tritosomen aus. Die Mutante erwies sich somit, wie erwartet, als autokatalytisch inaktiv. Die vermutete kompensatorische Spaltung des Pro-Plbd2 durch eine lysosomale Endopeptidase, durch die *in vivo* das β-Fragment gebildet werden könnte (vgl. Abschnitt 4.1.2), kann unter den vorliegenden Reaktionsbedingungen *in vitro* jedoch nicht nachvollzogen werden.

Unter Verwendung des Plbd2-66G9-Antikörpers (Abbildung 19B, Lane 2) war nach 96-stündiger Inkubation des rekombinanten Pro-Plbd2 das Pro-α-Fragment bei etwa 28 kDa gut zu erkennen, das verkürzte α-Fragment bei 23 kDa war nur schwach nachzuweisen. Bei Inkubation mit Tritosomen in Lane 4-6 war das Signal des α-Fragments bei 23 kDa deutlich stärker und entsprach in der Intensität etwa dem Signal des Pro-α-Fragments bei 28 kDa. Dies spricht dafür, dass die Verkürzung des Pro-α-Fragments auf eine lysosomale Protease aus den zugegebenen Tritosomen zurückzuführen ist. Bei

der Zugabe von Tritosomen ohne Inkubation bei 37 °C waren bei Nachweis mit dem Plbd2-66G9-Antikörper in Abbildung 19B Lane 2 zwei weitere, deutliche Banden bei etwa 55 kDa und 32 kDa sowie eine schwächere bei etwa 37 kDa zu erkennen (\triangle). Die Banden waren nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C nicht mehr nachzuweisen (Lane 4).

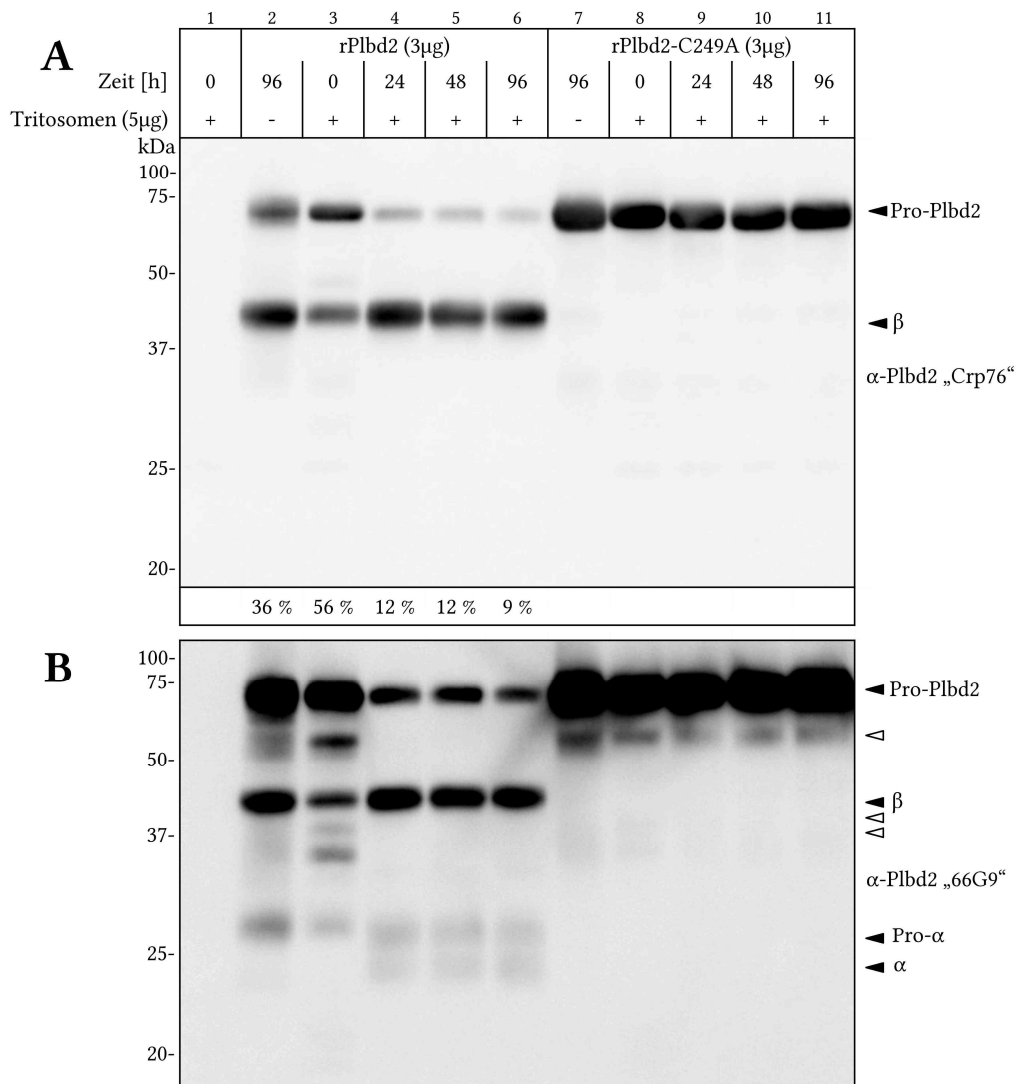


Abbildung 19: Western-Blot von rekombinatem Plbd2 und Plbd2-C249A nach Inkubation mit Tritosomen. Rekombinantes Plbd2 (3 µg) sowie die Mutante Plbd2-C249A wurden mit (+) oder ohne (-) 5 µg Tritosomen bei pH 4,5 und 37 °C inkubiert. Die Proben wurden zu drei Zeitpunkten gestoppt und über SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran analysiert. Der Nachweis erfolgte mit Plbd2-Crp76- (A) und Plbd2-66G9-Antikörper (B). Die relativen Bandenintensitäten des Pro-Plbd2 zum Gesamtsignal wurden über die Crp76-Signale quantifiziert.

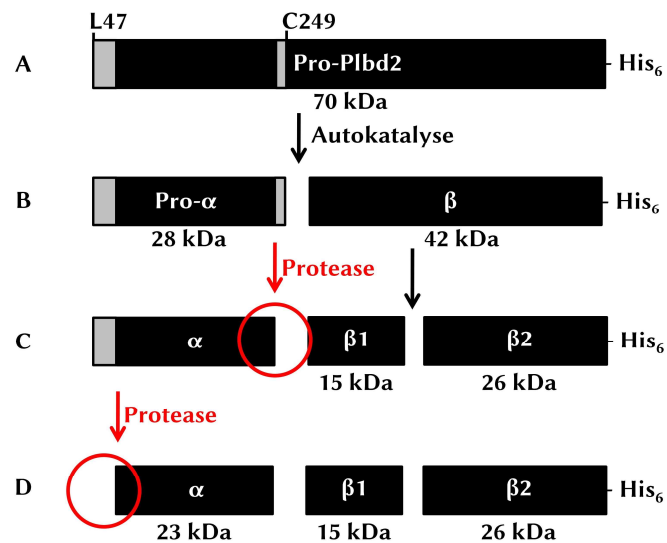


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Prozessierung des Pro-Plbd2.

Dargestellt ist die schematische Prozessierung des His₆-markierten Pro-Plbd2. Das Pro-Plbd2 (A) entsteht durch die Abspaltung des Signalpeptids (Met1-Ala46). Durch eine autokatalytische Prozessierung werden das Pro- α -Fragment und das β -Intermediat generiert (B). Das Pro-Peptid C-terminal des Pro- α -Fragments wird durch Proteasen abgespalten (C, Rot), das β -Intermediat wird in die β 1- und β 2-Fragmente gespalten (C). Durch N-terminale Verkürzung des α -Fragments (Rot) entsteht die mature 23 kDa große Form (D). Die Größen der Fragmente ergeben sich aus den apparenten Größen in der SDS-PAGE.

Die autokatalytische Spaltung des Pro-Plbd2 in das Pro- α - und β -Fragment konnte *in vitro* nachvollzogen werden (Abbildung 18, Lane 3). Ebenso konnte die Abhängigkeit der Spaltung von einem sauren pH-Wert gezeigt werden (Abbildung 18, Lane 3 und 5). Die Inkubation mit Lysosomenangereicherten Fraktionen aus Leber (Tritosomen) verstärkt die Spaltung des Pro-Plbd2 deutlich, ist aber nicht hinreichend um die autokatalytisch inaktive Mutante C249A zu spalten (Abbildung 19). Das aus der autokatalytischen Spaltung resultierende, etwa 28 kDa große Pro- α -Fragment (Abbildung 19B, Lane 2), unterscheidet sich in der apparenten Größe nach SDS-PAGE und Western-Blot vom *in vivo* zu beobachtenden α -Fragment mit etwa 23 kDa. Der Größenunterschied von etwa 4 - 5 kDa ist nicht allein durch die Abspaltung des Pro-Peptids zu erklären, dass C-terminal des α -Fragments in der aktiven Tasche des Proteins liegt und laut Kristallstrukturanalyse nur 10 - 12 Aminosäuren (0,9 - 1,2 kDa) umfasst (Lakomek *et al.*, 2009)(Abbildung 20C).

In den Analysen der Kristallstruktur des Pro-Plbd2 konnte der N-terminale Bereich Leu47-Pro62 (1,8 kDa) als sehr flexibel und exponiert beschrieben werden (Lakomek *et al.*, 2009). Es ist denkbar, dass lysosomale Proteasen Teile des N-Terminus des α -Fragments abspalten (Abbildung 20D).

4.2 Proteolytische Spaltung des Plbd2 β -Fragments

Neben der bei Ntn-Hydrolasen üblichen autokatalytischen Prozessierung des Vorläuferpeptids in ein α - und ein β -Fragment kann beim Plbd2 eine weitere Spaltung des β -Fragments beobachtet werden. Die resultierenden Fragmente werden mit $\beta 1$ und $\beta 2$ bezeichnet. Unter Verwendung eines Antikörpers spezifisch gegen ein C-terminales Peptid des Plbd2 (Jensen *et al.*, 2007) konnte für das C-terminale $\beta 2$ -Fragment im Western-Blot eine apparente Größe von etwa 26 kDa bestimmt werden (Uffmann, 2014). Da das $\beta 2$ -Fragment zweifach glykosyliert vorliegt (vgl. Abbildung 16), muss sich die Spaltstelle im β -Intermediärfragment zwischen dem N-terminalen Cys249 und der vorletzten Glykosylierung bei N441 befinden. Die Größe des zu beobachtenden $\beta 1$ -Fragments von etwa 15 kDa (Abbildung 12) schränkt die Position der Spaltstelle weiter ein. Wird eine Mindestgröße von etwa 13 kDa für das $\beta 1$ -Fragment angenommen, entspräche das etwa dem Proteinabschnitt von C249 bis D363. Die Spaltstelle kann also zwischen D363 und N441 erwartet werden.

Die Spaltung des β -Fragments kann *in vivo*, nicht aber *in vitro* beobachtet werden (Vergleiche Abbildung 18), weshalb der Einfluss einer intrazellulären Endopeptidase vermutet wird. Um die beteiligte Protease zu identifizieren, wurde das Prozessierungsmuster des Plbd2 in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) und Lysosomen-angereicherten Fraktionen aus der Leber (Tritosomen) von Mäusen überprüft, die defizient für verschiedene lysosomale Proteasen sind. Untersucht wurde Material aus WT-Mäusen sowie Tieren defizient für die Cystein-Protease AEP (Asparaginyl-Endopeptidase) oder verschiedene Cathepsine (Cystein-Cathepsine B, L, H, Z und Aspartat-Cathepsine D, E). Sollte eine der Proteasen für die Spaltung des β -Fragments benötigt werden, könnte in den entsprechenden defizienten MEFs im Western-Blot ein deutlich stärkeres Signal des β -Fragments bei 42 kDa erwartet werden. Die aus der Prozessierung resultierenden Fragmente $\beta 1$ bei etwa 15 kDa und $\beta 2$ bei etwa 26 kDa würden nicht mehr entstehen. Da das $\beta 1$ -Fragment bei 15 kDa mit dem 66G9-Antikörper auch in WT-Proben kaum detektierbar ist, wird die Signalstärke des 42 kDa β -Fragments und das $\beta 2$ -Fragment bei 26 kDa verglichen.

Wie in Abbildung 21A zu erkennen ist, unterschied sich das Prozessierungsmuster bei AEP-defizienten Tritosomen (Lane 5) auffällig von WT-Tritosomen (Lane 1). Das Signal des $\beta 2$ -Fragments war deutlich reduziert, das β -Intermediärfragment wies eine umso höhere Signalintensität auf. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei der Analyse von MEFs mit Defizienzen für einzelne Hydrolasen (KO-MEFs), wie in Abbildung 21 (rechts) gezeigt. Mit dem Plbd2-66G9-Antikörper konnte in Abbildung 21B das $\beta 2$ -Fragment in AEP-KO-MEFs (Lane 4) nicht detektiert werden. Die übrigen untersuchten

Cathepsin-KO-MEFs wiesen im Vergleich zum WT nur leichte Abweichungen in Größe und Signalintensitäten auf.

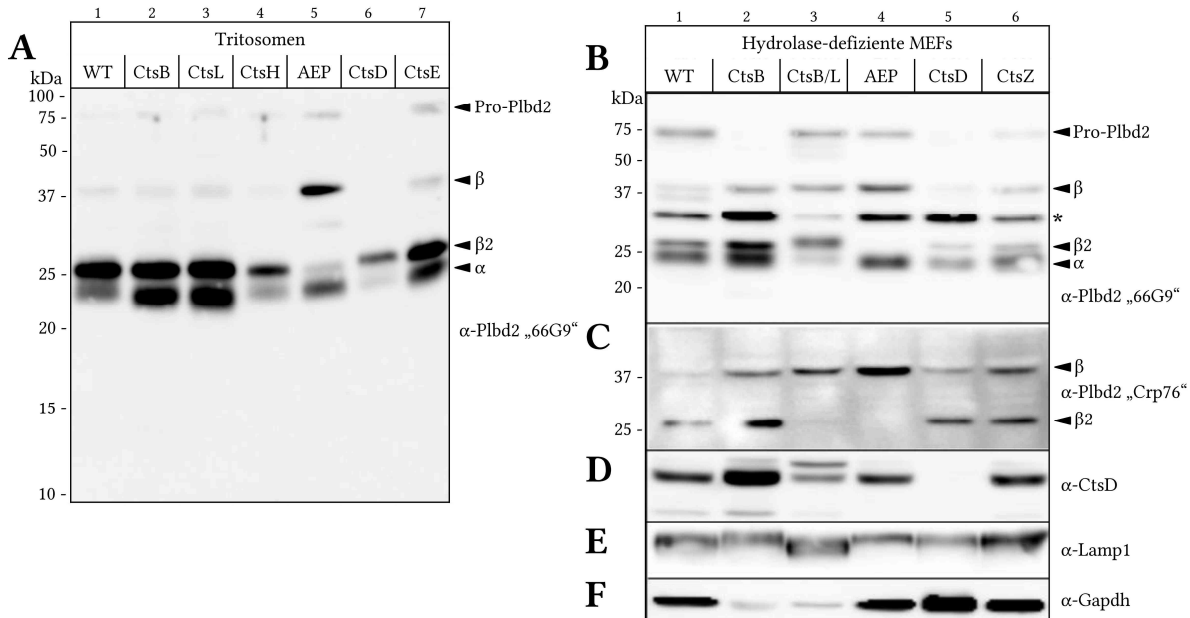


Abbildung 21: Western-Blots des Prozessierungsmuster von Plbd2 in MEFs und Tritosomen aus Mäusen defizient für verschiedene lysosomale Proteasen.

Lysosomen-angereicherte Fraktionen aus Leber (Tritosomen)(links) oder murine embryonale Fibroblasten (MEF)(rechts) aus Mäusen mit Defizienzen einzelner lysosomaler Cathepsine (Cts) oder der Asparaginy-Endopeptidase (AEP) wurden im Western-Blot auf die Prozessierung von Plbd2 untersucht. Der Nachweis des Proteins in Lysosomen-angereicherte Fraktionen aus Leber (Tritosomen) erfolgte mittels Plbd2-„66G9“-Antikörper (A). Der Nachweis in MEFs erfolgte mittels Plbd2-„66G9“ (B) und Plbd2-„Crp76“-Antikörper (C). CtsD- (D) Lamp1- (E) und Gapdh-Antikörper (F) dienen als Kontrollen.

Bei der Verwendung des Crp76-Antikörper (Abbildung 21C), der die C-terminalen Fragmente des Plbd2 erkennt, wurde zudem deutlich, dass das $\beta 2$ -Fragment in AEP-KO-MEFs (Lane 4) und in CtsB/L-KO-MEFs (Lane 3) nicht nachweisbar ist. Die Bande, die in CtsB/L-KO-MEFs mit dem 66G9-Antikörper bei etwa 28 kDa nachweisbar ist, entspricht also nicht dem $\beta 2$ -Fragment, sondern einem zu höheren Molekulargewichten verschobenem Pro- α -Fragment.

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass die Asparaginy-Endopeptidase (AEP), die Cathepsine B und L (CtsB/L), oder eine Kombination der Enzyme für die Prozessierung des β -Fragments verantwortlich sind. Die Erkennungssequenz der AEP setzt ein Asparagin in der Proteinsequenz voraus, an dem die endoproteolytische Spaltung stattfindet (Dall, Brandstetter, 2012). Aspartat kann statt des Asparagins in einzelnen Fällen ebenfalls an der Spaltstelle vorkommen (Dall, Brandstetter, 2013).

4.2.1 Einfluss von Protease-Inhibitoren auf die Spaltung

Um an der Prozessierung beteiligte lysosomale Proteasen zu identifizieren, wurde Plbd2 in HeLa-Zellen unter dem Einfluss von Protease-Inhibitoren exprimiert. Als unspezifischer Inhibitor lysosomaler Hydrolasen wurde Ammoniumchlorid (NH_4Cl) verwendet. Das Reagenz neutralisiert den lysosomalen pH-Wert, wodurch die Reaktionsbedingungen im Lysosom verändert werden und die Fusion von Lysosomen und Phagosomen unterbunden wird (Hart, Young, 1991). Zur spezifischen Inhibition der lysosomalen Protease-Familien wurde Leupeptin für Cystein- und Serin-Proteasen (Turk *et al.*, 2012), AEBSF für Serin-Proteasen (Markwardt *et al.*, 1974) und Pepstatin A zur Inhibition von Aspartat-Proteasen (Leung *et al.*, 2000) genutzt. Während Cystein-Proteasen wie CtsB und CtsL von Leupeptin beeinflusst werden, sollte AEP insensitive für die verwendeten, spezifischen Inhibitoren sein (Li *et al.*, 2003).

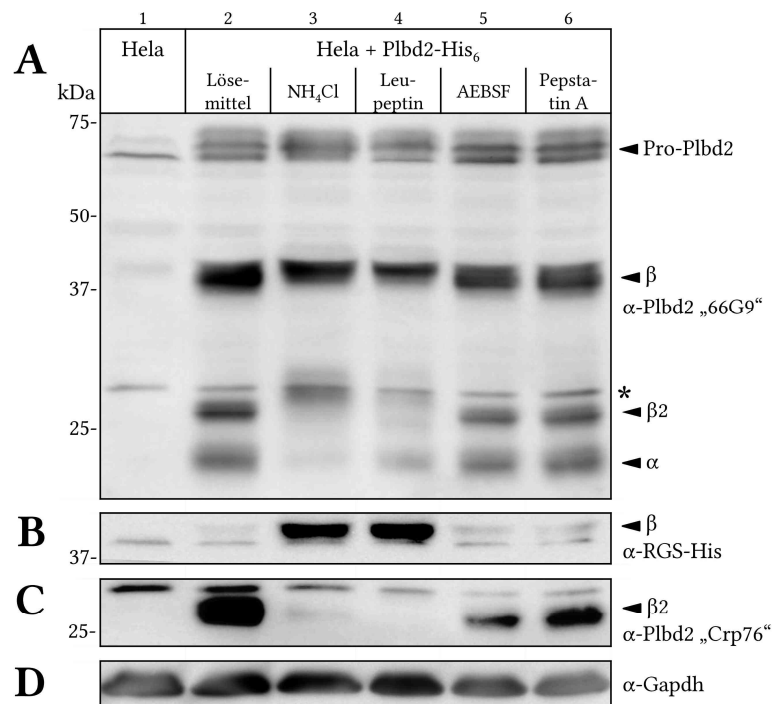


Abbildung 22: Western-Blot der Plbd2-Prozessierung unter Protease-Inhibitoren.

HeLa-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid Plbd2-His₆ transfiziert und nach 12 h auf Zellkulturmedium mit Protease-Inhibitor gesetzt. Verwendet wurden 0,2 % (v/v) DMSO (Lösungsmittel Kontrolle), 25 mM NH_4Cl , 100 μM Leupeptin, 100 μM AEBSF oder 100 μM Pepstatin A. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet und 100 μg der aufbereiteten Lysate zu SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit Plbd2-66G9- (A), Plbd2-Crp76- (B), RSG-His-Antikörper (C). Gapdh diente der Ladekontrolle (D).

In Abbildung 22B ist bei Nachweis mit dem RGS-His-Antikörper zu erkennen, dass der C-terminale His₆-tag unter NH_4Cl (Lane 3) und Leupeptin (Lane 4) nicht vom β -Intermediat bei 42 kDa abgespalten wurde. In Kontrollzellen (Lane 2) sowie AEBSF und Pepstatin A behandelten Zellen (Lane 5 und 6) war das Fragment mit dem His-Antikörper nicht nachweisbar. Mit dem Plbd2-Crp76-

Antikörper konnte das β 2-Fragment in Abbildung 22C unter NH_4Cl Einfluss nur sehr schwach nachgewiesen werden, mit Leupeptin war das Signal gar nicht mehr zu erkennen. Bei den übrigen Ansätzen war eine deutliche β 2-Bande nachweisbar. Bei Verwendung des Plbd2-66G9-Antikörpers (Abbildung 22A) ähnelten sich die Signale des Pro-Plbd2 bei 70 kDa und des β -Intermediats bei 42 kDa in allen Ansätzen. Das α -Fragment bei etwa 23 kDa war bei NH_4Cl -Behandlung in Lane 3 abgeschwächt, dafür trat eine unscharfe Bande bei etwa 28 kDa auf. Da diese Bande nicht vom „Cp76“-Antikörper erkannt wurde (Abbildung 22C), handelt es sich vermutlich um das zu höherem Molekulargewicht verschobene Pro- α -Fragment, wie es für die CtsB/L-KO-MEFs zuvor beobachtet wurde (Abbildung 21, rechts, Lane 3). Bei Überexpression unter Leupeptin-Einfluss ähnelten die Plbd2-Banden in Lane 4 mit allen verwendeten Antikörpern dem Muster mit NH_4Cl in Lane 3.

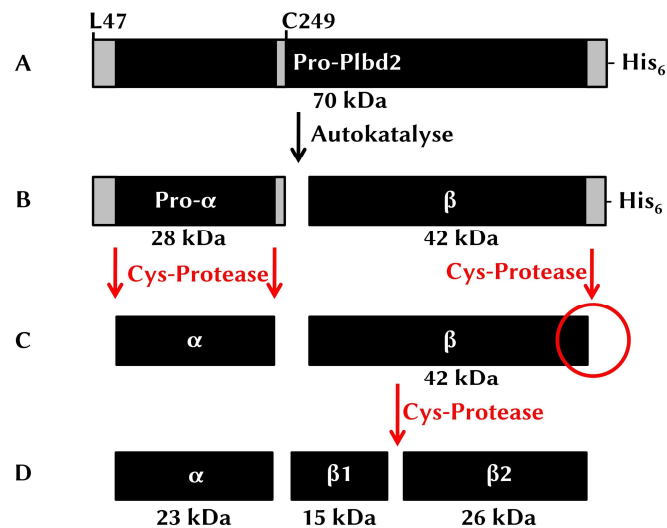


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Prozessierung des Pro-Plbd2.

Dargestellt ist die schematische Prozessierung des His₆-markierten Pro-Plbd2. Das Pro-Plbd2 (A) entsteht durch die Abspaltung des Signalpeptids (Met1 – Ala46). Durch eine autokatalytische Prozessierung wird das Pro- α -Fragment und das β -Intermediat generiert (B). Das Pro- α -Fragment wird durch Cystein-Proteasen C- und N-terminal verkürzt, der C-terminale His-tag des β -Fragment wird durch eine Cystein-Protease abgespalten (C). Das β -Intermediat wird ebenfalls durch eine Cystein-Protease in β 1- und β 2-Fragmente gespalten (D). Die Größen der Fragmente ergeben sich aus den apparenten Größen in der SDS-PAGE.

Aus den Daten kann geschlossen werden, dass die Spaltung des β -Intermediats in die Fragmente β 1 und β 2 von der Aktivität einer Cystein-Protease abhängig ist, da die Spaltung durch den Cystein-/Serin-Protease-Inhibitor Leupeptin, nicht aber durch den Serin-Protease-Inhibitor AEBSF unterdrückt werden kann. Es ist weiterhin zu erkennen, dass der C-terminale His-tag ebenso von einer Cystein-Protease abgespalten wird. Auch die Verkürzung des Pro- α -Fragments scheint in Zusammenhang mit einer Cystein-Protease zu stehen (Abbildung 23).

4.2.2 Lokalisation der Spaltstelle durch Mutationsanalyse

Es wurde gezeigt, dass die Spaltung des β -Intermediats durch die Zugabe des Cystein-/Serin-Protease-Inhibitors Leupeptin inhibiert werden kann. Auch wenn die Asparaginyl-Endopeptidase (AEP) nicht sensitiv für diesen Inhibitor ist, sollte eine direkte Beteiligung der AEP an der Spaltung des β -Intermediats *in vivo* untersucht werden. Die AEP setzt für die proteolytische Aktivität ein Asparagin in der Erkennungssequenz voraus (Dall, Brandstetter, 2012). Im Bereich der zu erwartenden Spaltstelle von D363 bis N441 im Plbd2 β -Fragment konnten fünf Asparagine identifiziert werden, die zu einer Spaltung durch AEP führen könnten (Abbildung 24).

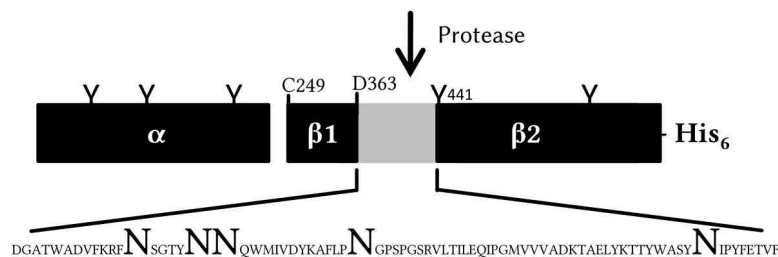


Abbildung 24: Schematische Darstellung der möglichen Spaltstelle im Plbd2 β -Fragment.

Dargestellt sind das α - und β -Fragment des Plbd2 mit dem Bereich der erwarteten Protease-Spaltstelle von D363 bis N441 in Grau hinterlegt. Der Ausschnitt zeigt die Proteinsequenz des grauen Bereichs mit hervorgehobenen Asparaginen N375, N380, N381, N394, N432.

Um den Einfluss der AEP auf die Prozessierung des Plbd2 nachzuweisen, wurden durch Mutagenese-PCR die codierenden Bereiche der relevanten Asparagine auf dem Plbd2- His_6 Expressionsplasmid zu Glutamin mutiert (Primer siehe Abschnitt 2.7.2). Die erzeugten Konstrukte wurden in Hela-Zellen exprimiert und das Prozessierungsmuster über Western-Blot analysiert.

Wie in Abbildung 25 zu erkennen, führte die Transfektion der mutierten Plbd2-Varianten in allen Fällen zur Expression des Pro-Plbd2. Bei Plbd2-WT (Lane 2) war die Prozessierung in das β -Intermediat (42 kDa), das β_2 - (26 kDa) und das α -Fragment (23 kDa) zu erkennen. Bei der Mutante N375Q (Lane 3) waren die Fragmentbanden vorhanden, jedoch deutlich schwächer als bei Plbd2-WT (Lane 2). Die N380Q- und N380/381Q-Mutanten (Lane 4 und 5) wiesen keine Prozessierung auf. Bei diesen drei Mutanten war die Gesamtmenge des Pro-Plbd2 zudem geringer als bei Expression der übrigen Konstrukte. Bei der N394Q-Mutante (Lane 6) waren alle Fragmentbanden erkennbar, wobei sich das Verhältnis von β -Intermediat zu β_2 -Fragment im Vergleich zum Plbd2-WT jedoch umkehrte. Die Bande des β -Intermediat bei 42 kDa war etwa 4-fach intensiver als die des β_2 -Fragments bei 26 kDa. Die N432Q-Mutante in Lane 7 wies alle Fragmentbanden auf, jedoch nur mit schwachem Signal. Die Glykosylierungsmutante N441Q (Lane 8) zeigte ein Prozessierungsmuster entsprechend dem Plbd2-WT. Die Banden des Pro-Plbd2, β -Intermediat und β_2 -Fragment waren um die Größe der fehlenden Glykosylierung (etwa 2 kDa) zu geringerem Molekulargewicht verschoben.

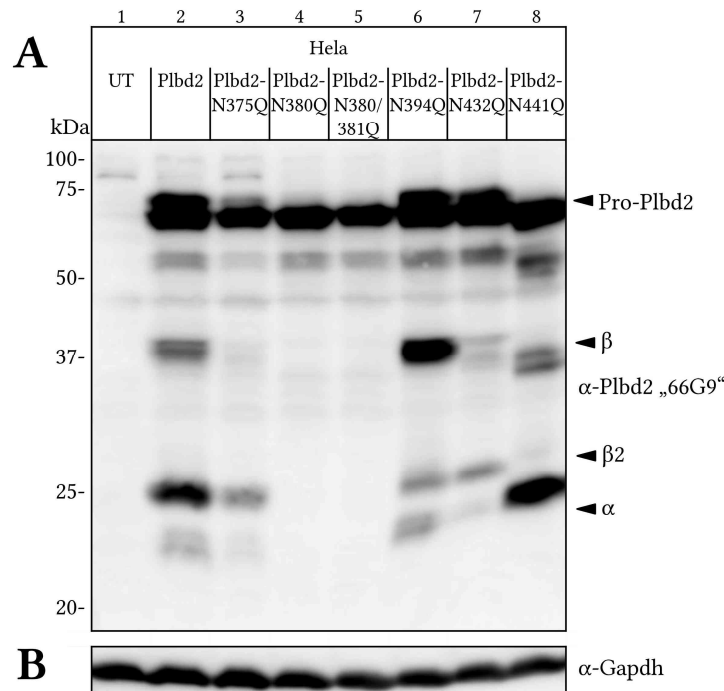


Abbildung 25: Western-Blot der Expression der Plbd2-Asparagin-Mutanten in HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für Plbd2-His₆ oder den Mutanten N375Q, N380Q, N380/381Q, N394Q, N432Q, N441Q transfiziert. Die Zellen wurden nach 96 h geerntet und 75 µg der aufgearbeiteten Zelllysate über SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran analysiert. Der Nachweis erfolgte mit dem Plbd2-66G9-Antikörper (A), Gapdh diente als Ladekontrolle (B).

Die Asparagine N375, N380 und N381 sind, wie aus der Tertiärstruktur in Abbildung 26 andeutungsweise zu erkennen, in das Zentrum des Proteins gerichtet. Diese Mutationen führen somit möglicherweise zu einer Fehlfaltung, die zur Degradation des Proteins im ER führen, was das verringerte Signal des Pro-Plbd2 erklären könnte. Gestützt wird diese Annahme von der Lokalisation dieser Mutanten bei Expression in HeLa-Zellen, wie sie in den indirekten Immunfluoreszenz-Aufnahmen in Abbildung 27 zu erkennen ist. Das Signal dieser Plbd2-Mutanten in Abbildung 27 (C, D, E, grün), wies ein breit verteiltes Signal auf, das einen großen Teil des Cytosols ausfüllte. Das Signal des lysosomalen Lamp1 (Rot) war als globuläre Struktur in der Zellperipherie zu erkennen, mit einer Ansammlung in der Zellmitte einseitig des Dapi-gefärbten Zellkerns (Blau). Das Signal der Plbd2-Mutanten und des lysosomalen Markerproteins Lamp1 überlagerten sich kaum.

Die Seitenkette des N432 reicht in die aktive Tasche des Proteins (Abbildung 26, links der Bildmitte), wo es vermutlich an der postulierten Amidase-Aktivität des Plbd2 beteiligt ist (Kettwig, 2010). Die N432Q-Mutante wies in Abbildung 27G eine gleichmäßige Verteilung im Cytosol und eine geringe Kolo-kalisation mit Lamp1 auf. Eine verringerte lysosomale Lokalisation könnte die geringe Prozessierung der Mutante erklären.

Die Seitenkette des N394 ist im Modell an exponierter Position nach außen gerichtet (Abbildung 26 unterer Bildrand). Die Mutante N394Q wies in der Immunfluoreszenz in Abbildung 27F, wie das WT-Plbd2 (Abbildung 27B) und Glykosylierungsmutante N441Q (Abbildung 27H) eine Kolokalisation mit Lamp1 auf, die auf eine lysosomale Lokalisation schließen lässt.

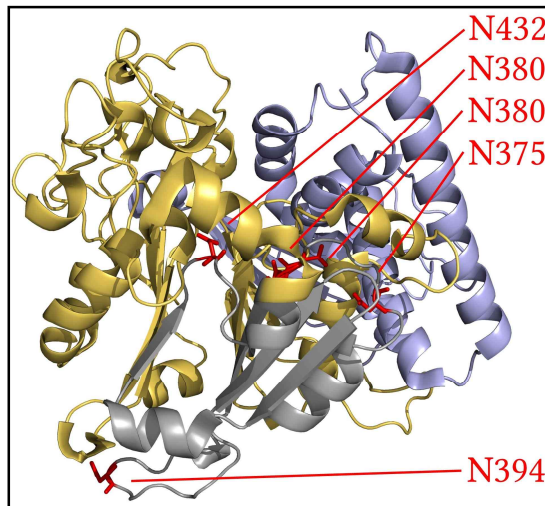
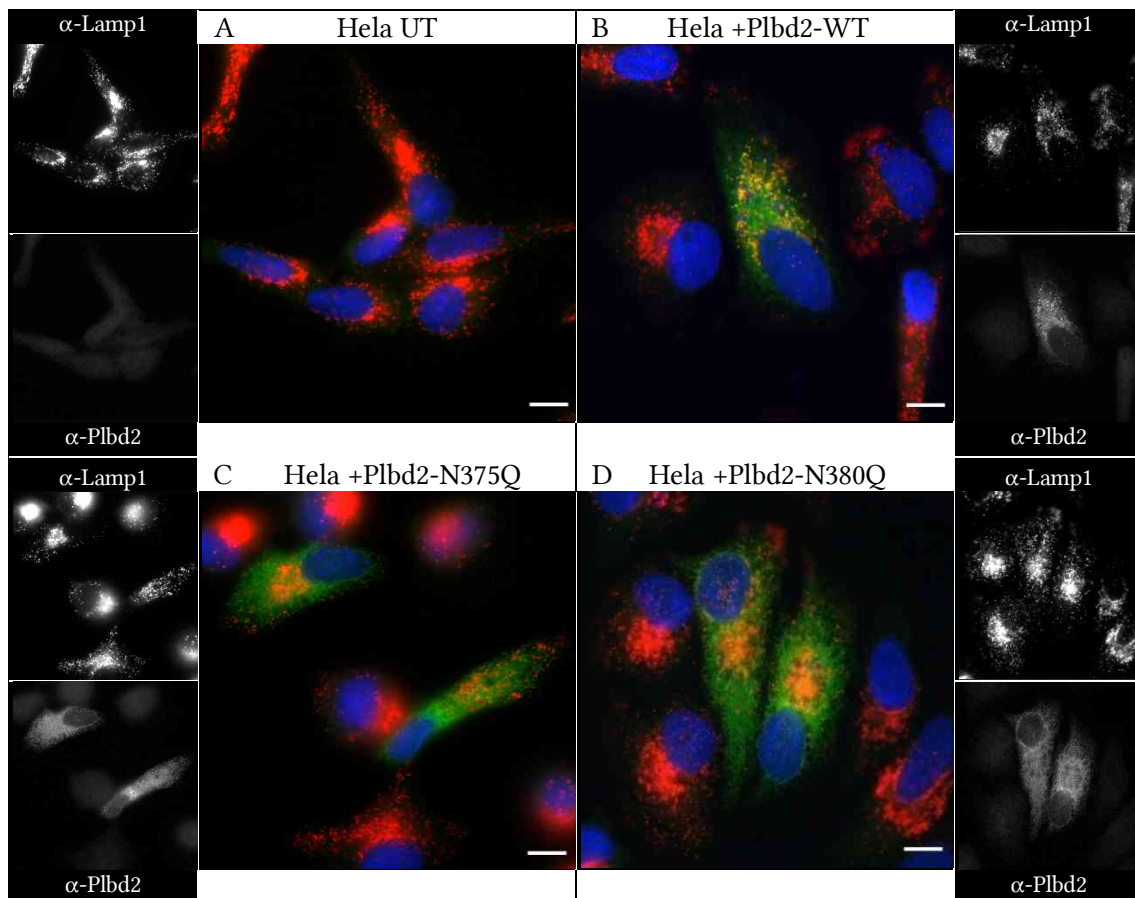


Abbildung 26: Tertiärstruktur des Plbd2.

Gezeigt ist die Tertiärstruktur des Plbd2 mit dem α -Fragment in Hellblau, dem β -Fragment in Gold und dem Bereich der möglichen Spaltstelle im β -Fragment in Grau. Die Seitenketten der relevanten Asparagine sind Rot hervorgehoben. N375 rechts der Bildmitte, N380 und N381 in der Bildmitte, N394 am unteren Bildrand, N432 links der Bildmitte.



4.2.3 Zeitabhängige Prozessierung von Plbd2 und Plbd2-N394Q

Die Mutante Plbd2-N394Q weist im Western-Blot im Vergleich zum WT-Plbd2 ein verändertes Prozessierungsmuster auf (Abbildung 25, Lane 6), das dem Muster in Lysosomen-angereicherten Fraktionen aus der Leber von AEP-defizienten Mäusen in ähnelt (Abbildung 21). Um die kinetischen Abläufe der Spaltungen einzuordnen, wurde die Prozessierung von WT-Plbd2 und der Mutante Plbd2-N394Q in Abhängigkeit der Zeit untersucht.

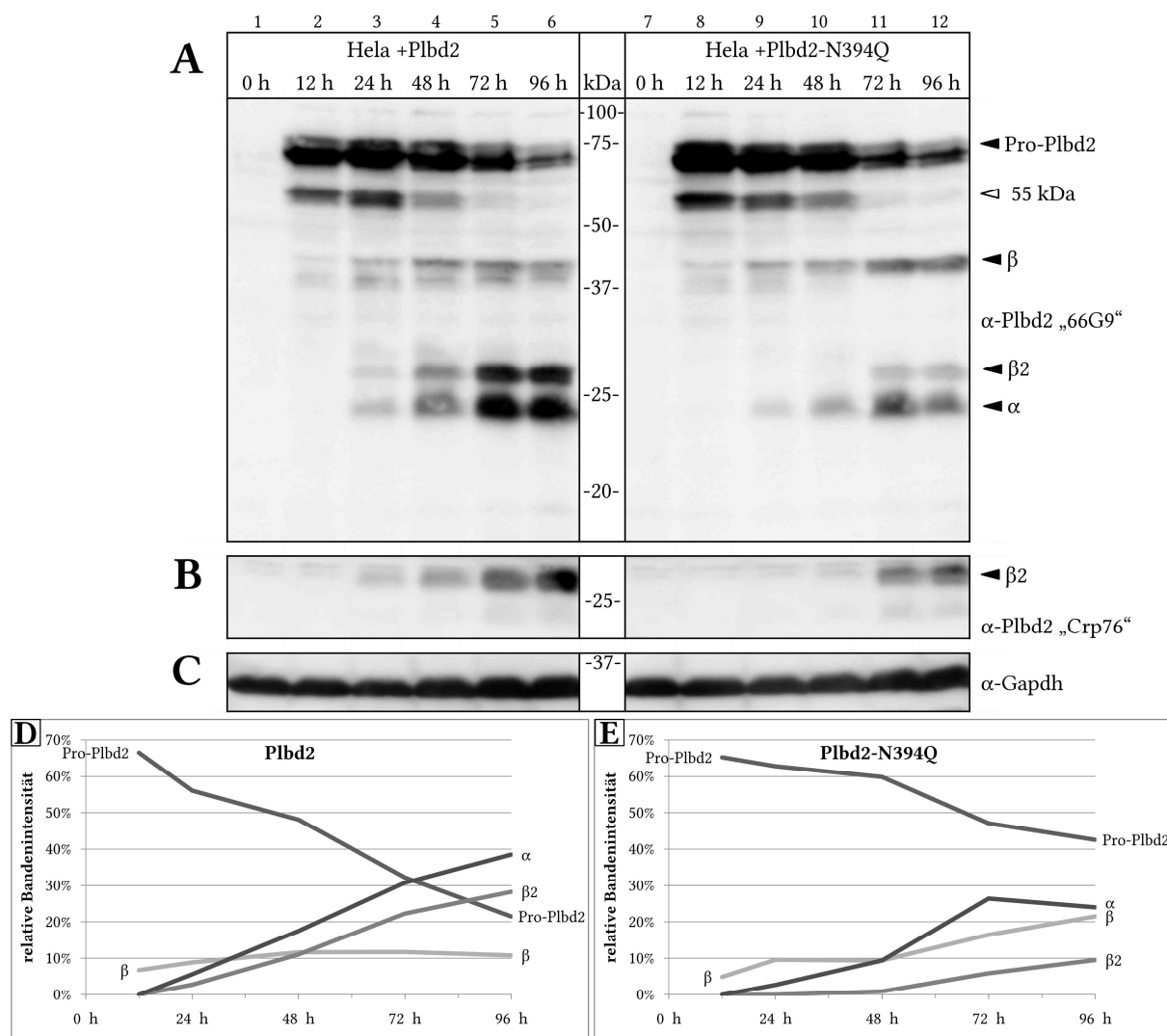


Abbildung 28: Western-Blot und Quantifizierung der Expression von Plbd2 und Plbd2-N394Q über 96 h.

HeLa-Zellen wurden mit den Expressionskonstrukten Plbd2-His₆ und Plbd2-N394Q-His₆ transfiziert und die Zellen zu mehreren Zeitpunkten nach der Transfektion geerntet. 100 μ g der aufgearbeiteten Zelllysate wurden zu SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit Plbd2-66G9-Antikörper (A) und Plbd2-Crp76-Antikörper (B), Gapdh diente als Ladekontrolle (C). Die Bandenintensitäten der Plbd2 und Plbd2-N394Q Expression wurden quantifiziert und die einzelnen Banden relativ zur gesamten Signalintensität gegen die Zeit aufgetragen (D und E). Das Fragment bei etwa 55 kDa wurde dabei der Übersichtlichkeit halber vernachlässigt.

Hela-Zellen wurden mit den Expressionskonstrukten Plbd2-His₆ und Plbd2-N394Q-His₆ transfiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion geerntet. Wie in Abbildung 28A zu erkennen ist, konnte mit dem Plbd2-66G9-Antikörper für Plbd2-WT und Plbd2-N394Q 12 h nach Transfektion das Pro-Plbd2 bei 70 kDa und das β -Intermediat bei 42 kDa nachgewiesen werden. Ebenfalls deutlich war eine zusätzliche Bande bei etwa 55 kDa erkennbar. Nach 24 h traten bei Plbd2-WT das α -Fragment bei 23 kDa und das β 2-Fragment bei 26 kDa auf, für die Mutante war nur das α -Fragment nachweisbar. Das Signal des β 2-Fragments war bei der Mutante N394Q mit Plbd2-Crp76- (Abbildung 28B) sowie Plbd2-66G9-Antikörper (Abbildung 28A) erst nach 72 h sichtbar. Durch Quantifizierung der Plbd2-Signale wurde deutlich, dass im WT-Plbd2 das β -Fragment mit konstant etwa 10 % des Gesamtsignals ein Zwischenprodukt darstellte (Abbildung 28D). Der Anteil des Pro-Plbd2 nahm im WT über die Zeit konstant ab, die α - und β 2-Fragmente nahmen anteilig entsprechend zu. Im Fall der Plbd2-N394Q-Mutante nahm der Anteil des Pro-Plbd2 deutlich langsamer ab (Abbildung 28E). Der Anteil des β -Fragments blieb nicht wie bei Plbd2-WT konstant, sondern stieg bis auf etwa 20 % an, das β 2-Fragment entstand dafür umso später und lag zu einem geringeren Anteil vor.

Es konnte gezeigt werden, dass in WT-Plbd2 das 42 kDa β -Fragment ein Intermediärprodukt bei der Spaltung des Plbd2 darstellt und nicht mehr als 10 % des gesamten Plbd2-Signals ausmacht. Bei Expression der Mutante N394Q liegt der Anteil des β -Intermediats nach 96 h bei 20 % des gesamten Plbd2-Signals, die Kinetik der Spaltung in das β 1- und β 2-Fragment findet verlangsamt statt.

4.2.4 Klonierung und Aufreinigung von murinem CtsB, CtsL, AEP und Plbd2

Um einen möglichen Einfluss der Proteasen Cathepsin B (CtsB), Cathepsin L (CtsL) oder der Asparaginyl-Endopeptidase (AEP) auf die Spaltung des Plbd2 nachzuweisen, sollte die Prozessierung *in vitro* nachvollzogen werden. Ausgehend von den pcDNA3.1-Hygro(+)-Konstrukten mCtsB, mCtsL und mAEP wurden durch Add-On-PCR RGS-His₆-markierte Varianten dieser lysosomalen Proteasen erzeugt (Primer im Abschnitt 2.7.2). Die Expressionskonstrukte wurden neben Plbd2-His₆ und Plbd2-C249A-His₆ in N2a-Zellen transfiziert, als His₆-markierte Enzyme exprimiert und anteilig ins Zellkulturmedium sekretiert (Abbildung 29).

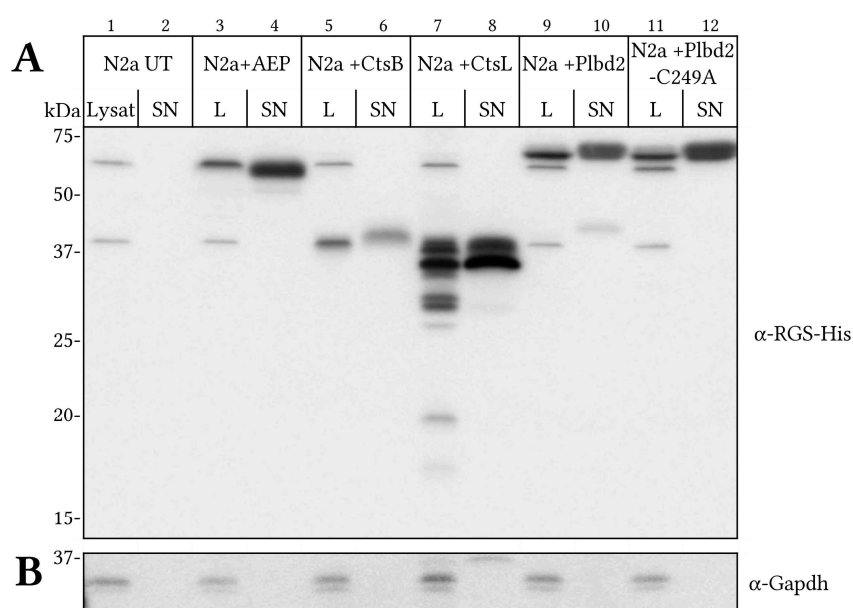


Abbildung 29: Western-Blot der Expression von AEP, CtsB, CtsL, Plbd2 und Plbd2-C249A in N2a-Zellen. N2a-Zellen wurden mit den Expressionskonstrukten AEP-His₆, CtsB-His₆, CtsL-His₆, Plbd2-His₆ und Plbd2-C249A-His₆ transfiziert. Nach 24 h wurde das Zellkulturmedium durch konditioniertes Medium (0,1 % FCS) ersetzt. Nach weiteren 24 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen geerntet und 50 µg der aufgearbeiteten Zellysate (L) und 7 % der entsprechenden Menge des Überstands (SN) in SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran eingesetzt. Der Nachweis erfolgte über den α-RGS-His-Antikörper (A), Gapdh diente als Ladekontrolle (B).

Aus dem Zellkulturüberstand wurden die einzelnen rekombinanten Proteine im *batch*-Verfahren aufgereinigt. Der Zellkulturüberstand einer 24-stündigen Expression von drei 15 cm Zellkulturschalen wurde mit Ni²⁺-NTA-Agarosebeads inkubiert und die Proteine mit 100 mM Imidazol eluiert. Ein Coomassie-Gel der Fraktionierung ist beispielhaft für Plbd2 und Plbd2-C249A in Abbildung 30 gezeigt. Die Elutionsfraktionen wurden im Centricon (4 mL, 30 k) gegen 25 mM Tris/HCl pH 7,4 umgepuffert, bis die Imidazol-Konzentration rechnerisch unter 1 mM lag. Die Ausbeuten lagen nach dem Umpuffern bei etwa 70 - 85 % der Elutionsfraktionen, was bei Plbd2 und Plbd2-C249A etwa 270 µg Protein entsprach.

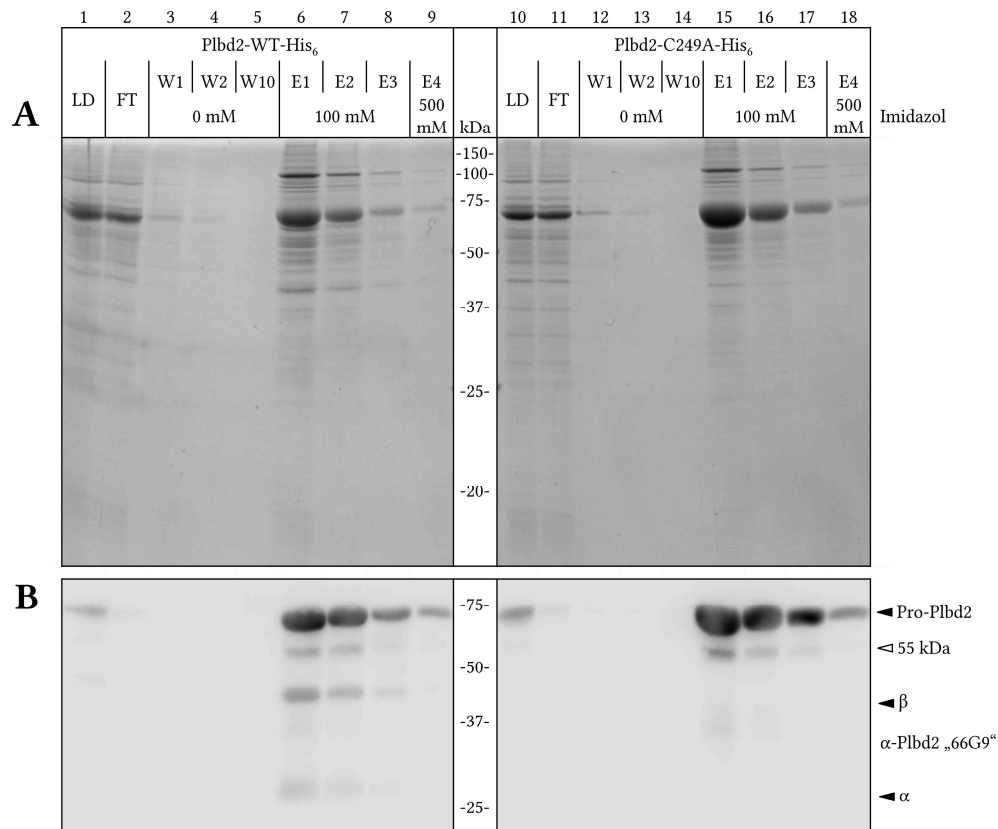


Abbildung 30: Coomassie-Gel und Western-Blot der Aufreinigung von Plbd2 und Plbd2-C249A

N2a-Zellen wurden mit den Expressionskonstrukten Plbd2-His₆ und Plbd2-C249A-His₆ transfiziert und die Proteine aus dem Überstand über Ni²⁺-NTA-Agarose-Beads aufgereinigt. 40 µL (4 %) der Wash- (W) und Elutionsfraktionen (E) sowie 40 µL (0,1 %) des eingesetzten Zellkulturüberstands (LD) und der Durchlaufraction (FT) wurden für den Nachweis in Coomassie-Gel (A) oder SDS-PAGE und Western-Bot auf PVDF-Membran verwendet. Der Nachweis im Blot erfolgte mittels Plbd2-66G9-Antikörper (B).

4.2.5 Aktivierung von rekombinantem CtsB, CtsL und AEP

Um eine ungezielte proteolytische Aktivität lysosomaler Hydrolasen zu vermeiden, wird die Aktivität vieler Hydrolasen in der Zelle streng reguliert. Dies geschieht zum Teil durch Kompartimentierung der Hydrolasen in den Lysosomen und Anhängigkeit von saurem pH-Wert, aber auch über die Synthese als inaktive PräPro-Form (Turk *et al.*, 2012). Bei den Cystein-Proteasen Cathepsin B und L wird das Signalpeptid als Prä-Fragment abgespalten, das Pro-Fragment wirkt als Zymogen und blockiert die aktive Tasche (Mach *et al.*, 1994; Ménard *et al.*, 1998). Erst im sauren Milieu der Lysosomen wird das Propeptid autokatalytisch abgespalten und die aktive *single-chain*-Form der Cathepsine wird gebildet. Durch proteolytische Spaltung kann eine *two-chain*-Form gebildet werden, deren Aktivität sich gegenüber kleinen artifiziellen Substraten (Z-FR-AMC für CtsB/L und Z-RR-AMC für CtsB) jedoch nicht von der *single-chain*-Form unterscheidet. Es wurde vermutet, dass die Asparaginyl-Endopeptidase (AEP) an der Spaltung in die *two-chain*-Form beteiligt

ist, wobei jedoch keine biologische Relevanz nachgewiesen werden konnte (Shirahama-Noda *et al.*, 2003; Maehr *et al.*, 2005). Die autokatalytische Aktivierung der AEP selbst wird durch zwei Spaltungen nach Absenkung des pH-Werts auf pH 5,5 und pH 4,5 induziert (Li *et al.*, 2003). Während das Pro-AEP in neutralem und leicht basischem pH stabil bleibt, wird die aktive Form in neutralem pH irreversibel inaktiviert (Dall, Brandstetter, 2012).

Die rekombinant hergestellten Proteine CtsB, CtsL und AEP sollten *in vitro* aktiviert werden und die Größenveränderung durch Coomassie Gele und Western-Blot nachverfolgt werden. Die spezifische Aktivität wurde mit AMC-markierten Substraten bestimmt.

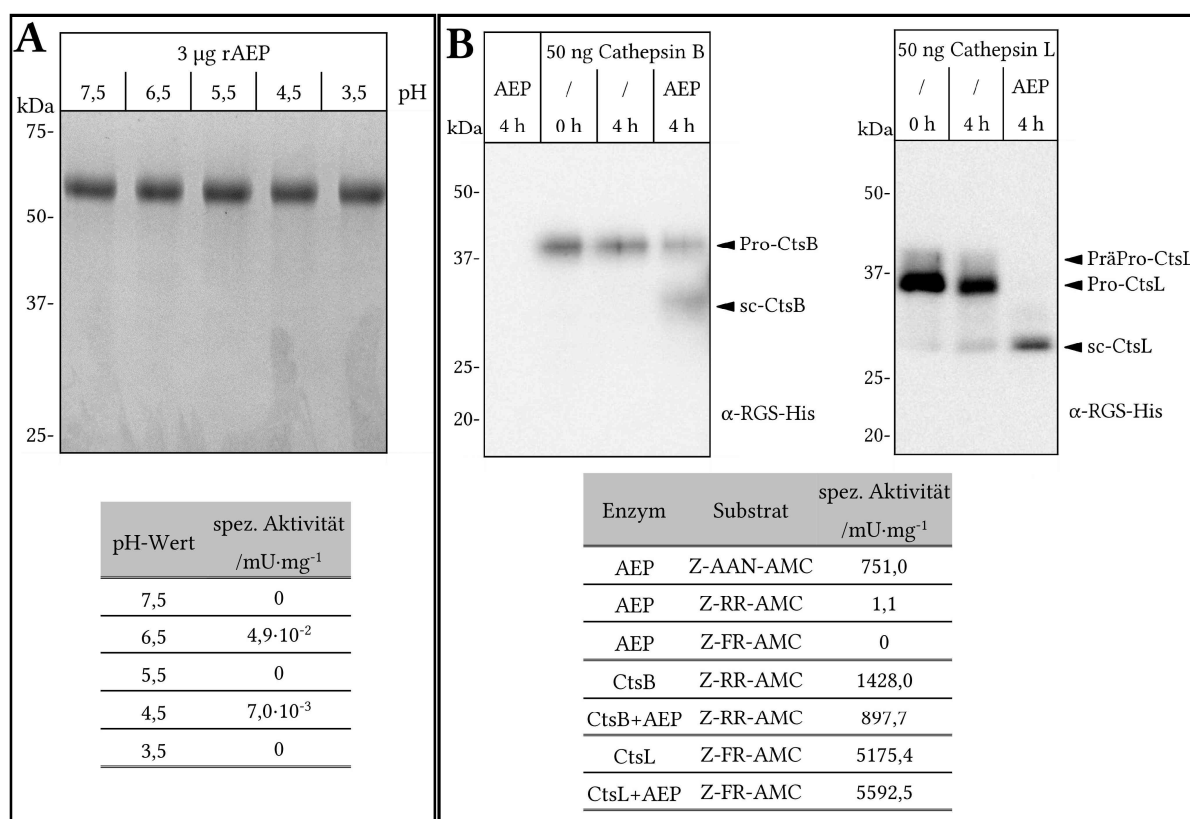


Abbildung 31: Aktivierung der rekombinanten AEP, Cathepsin B und Cathepsin L

Dargestellt sind die Größenveränderungen bei der Aktivierung der Asparaginyl-Endopeptidase (AEP), Cathepsin B (CtsB) und Cathepsin L (CtsL). (A) 3 µg aufgereinigte AEP wurden in 24 µL 250 mM NaAc bei unterschiedlichem pH und 37 °C für 20 h inkubiert. Ein Teil des Ansatzes wurde zur Aktivitätsbestimmung mit dem Substrat Z-AAN-AMC genutzt, der übrige Teil wurde über ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel untersucht. (B) 50 ng aufgereinigtes CtsB oder CtsL wurden mit oder ohne rekombinanter AEP (200 ng, R&D systems) für 4 h in 250 mM NaAc mit 5 mM DTT bei 37 °C inkubiert. Der Nachweis erfolgte nach SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran mit dem RGS-His-Antikörper. Die Messung der Aktivitäten erfolgte mit verschiedenen Substraten wie beschrieben.

Wie in Abbildung 31A zu erkennen ist, trat bei der Inkubation des rekombinanten 56 kDa AEP-Proenzym bei verschiedenen pH-Werten keine Größenveränderung auf. Die spezifische Aktivität gegen das Substrat Z-AAN-AMC lag kaum über den Leerwerten. Es lag demnach kein enzymatisch aktives AEP-Protein vor. Zur Aktivierung der Cathepsine B und L wurde daher aufgereinigte AEP

kommerziell erworben (R&D systems, Reinheit >95 %, spezifische Aktivität >350 mU/mg). Cathepsin B und L wurden als Proenzym aufgereinigt und in saurem Puffer aktiviert (Abbildung 31B). Die diffuse Bande über dem Signal des Pro-CtsL bei etwa 36 kDa entsprach dem Prä-Pro-Enzym (Nepal *et al.*, 2006). Die Inkubation über 4 h in saurem Puffer (pH 5,5) reduzierte bei beiden Cathepsinen das Signal des Pro-Enzyms leicht, eine deutliche Veränderung ergab sich erst bei Zugabe der AEP. Bei CtsB nahm der Anteil des Pro-CtsB bei etwa 40 kDa nach Inkubation mit AEP ab, während die Bande des *single-chain*-CtsB bei etwa 33 kDa zu erkennen war. Die erwartete Spaltung in eine etwa 25 kDa *heavy-chain* und eine 5 kDa *light-chain* war nicht zu beobachten. Das Pro-CtsL bei etwa 36 kDa war nach Zugabe von AEP nicht mehr detektierbar, das *single-chain*-CtsL bei 28 kDa bildete das stärkste Signal. Die *two-chain*-Form wird durch ein N-terminales 24 kDa Fragment und ein C-terminales 5 kDa Fragment gebildet, die mit dem C-terminalen His-tag bei dieser Auflösung nicht detektierbar waren.

Im unteren Teil der Abbildung 31B sind die Aktivitäten der aufgereinigten Cathepsine und der erworbenen AEP aufgeführt. Die AEP lag mit einer spezifischen Aktivität von 751 mU/mg gegen das Substrat Z-AAN-AMC über der Mindestangabe des Herstellers (>350 mU/mg) und wies keine nennenswerte Aktivität gegenüber den Substraten von CtsB (Z-RR-AMC) und CtsL (Z-FR-AMC) auf. Die beiden Cathepsine wiesen ihrerseits wie erwartet auch ohne Zugabe von AEP eine hydrolytische Aktivität gegen die jeweiligen Substrate auf. Verglichen mit kommerziell erhältlichen Enzymen war die Aktivität des CtsB (1428 mU/mg) etwas geringer als zu erwarten (R&D systems >2000 mU/mg) und die des CtsL (5175 mU/mg) ähnlich der Referenz (R&D systems >5000 mU/mg). Durch die Zugabe der AEP sank die Aktivität des CtsB auf 63 %, die CtsL Aktivität stieg auf 108 %.

Die Cathepsine B und L konnten aus Zellkulturüberstand aufgereinigt und durch Inkubation in saurem Puffer aktiviert werden. Die Asparaginyln-Endopeptidase konnte aufgereinigt werden, es wurde jedoch keine Aktivität gegenüber dem artifiziellen Substrat Z-AAN-AMC gemessen. Der Umsatz der Cathepsine mit kommerziell erhältlicher AEP hat keinen nennenswerten Effekt auf die Aktivität des Cathepsin L, wie aus der Literatur zu erwarten war (Shirahama-Noda *et al.*, 2003). Bei Umsatz des Cathepsin B mit AEP verringerte sich die Aktivität des Cathepsins auf 63 %.

4.2.6 *In vitro* Umsatz von Plbd2 mit CtsB, CtsL oder Tritosomen

Nachdem die aktiven Enzyme Asparaginyln-Endopeptidase (AEP), Cathepsin B (CtsB) und Cathepsin L (CtsL) vorlagen, sollte der Einfluss dieser Hydrolasen auf die Prozessierung des Plbd2 *in vitro* untersucht werden. Es sollte geprüft werden, ob die Prozessierung des β -Fragments in das β 1- und das β 2-Fragment mit einem der Enzyme, oder einer Kombination *in vitro* nachvollzogen werden kann.

Es wurde rekombinantes Plbd2 in saurem Acetat-Puffer mit DTT als Reduktionsmittel bei pH 5,5 für 96 Stunden inkubiert, wobei das Pro-Plbd2 autokatalytisch in das 28 kDa Pro- α - und 42 kDa β -Fragment gespalten wird. Zusätzlich wurden CtsB, CtsL oder Lysosomen-angereicherte Fraktion aus Leber (Tritosomen) zugegeben. Als Negativkontrolle wurde der Ansatz mit Protease-Inhibitor und ohne DTT mitgeführt. Die Mutante Plbd2-C249A wurde verwendet um Prozessierungen darzustellen, die unabhängig von der Autokatalyse stattfinden.

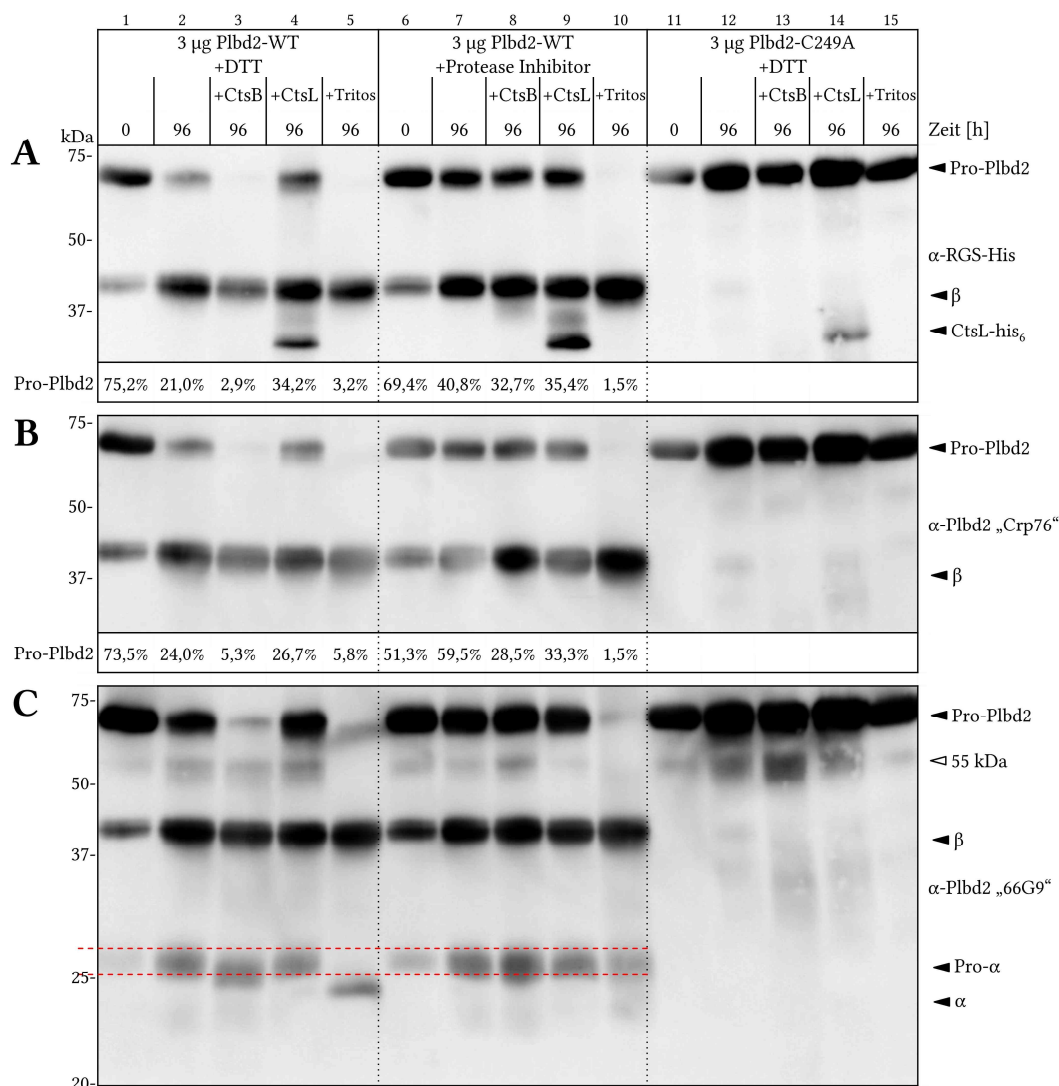


Abbildung 32: Western-Blot des *in vitro* Umsatz von Plbd2 und Plbd2-C249A mit CtsB, CtsL und Tritosomen. 3 μ g des rekombinanten Plbd2-His₆ oder der Mutante Plbd2-C249A-His₆ wurden in 30 μ L 250 mM NaAc pH 4,5 mit 5 mM DTT oder 1x Protease-Inhibitor inkubiert. Zum Ansatz wurden 250 ng rCtsB, 250 ng rCtsL oder 12,5 μ g Lysosomen-angereicherte Fraktion (Tritos.) gegeben. Die Reaktion wurde nach 0 h oder 96 h durch Abkochen mit Lämmli-Puffer gestoppt und die Proben nach SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran analysiert. Zum Nachweis dienten die Antikörper RGS-His (A), Plbd2-Crp76 (B) und Plbd2-66G9 (C). Für die Antikörper RGS-His und Plbd2-Crp76 wurden die Banden des β -Fragments relativ zum Pro-Plbd2 mit der Software ImageJ quantifiziert. Die gestrichelten Linien dienen der Übersichtlichkeit.

In den ersten beiden Spalten (Lane 1 und 2) der Abbildung 32 ist mit allen verwendeten Antikörpern zu erkennen, dass die Inkubation des WT-Plbd2 über 96 h in saurem Puffer mit pH 4,5 zur Abnahme des Pro-Plbd2 bei 70 kDa zugunsten des β -Fragments bei 42 kDa führte. Das Pro- α -Fragment war mit dem Plbd2-66G9-Antikörper (Abbildung 32C) zu erkennen und lag bei etwa 28 kDa. Die Quantifizierung der Signale der Antikörper RGS-His (Abbildung 32A) und Plbd2-Crp76 (Abbildung 32B), die gegen einzelne Peptide des His-tags oder des C-Terminus des Plbd2 gerichtet sind, zeigte eine Abnahme des Pro-Plbd2 auf etwa 1/3 des Signals vor der Inkubation. Bei Zugabe von Cathepsin L (CtsL) in Lane 4 zeigte sich gegenüber Lane 2 keine Veränderung im Plbd2-Signal. Die Bande des *single-chain*-CtsL bei etwa 30 kDa war mit dem RGS-His-Antikörper zu erkennen. Die relativen Signalintensitäten entsprachen etwa denen der Inkubation ohne Cathepsin, wobei die Abweichung mit dem RGS-His-Antikörper auf das Signal des CtsL zurückzuführen war. Bei Zugabe von CtsB (Abbildung 32C, Lane 3) oder Lysosomen-angereicherter Fraktion (Tritosomen, Abbildung 32C, Lane 5) unterschied sich das Bandenmuster deutlich vom einzeln inkubierten Plbd2. Der Anteil des Pro-Plbd2 lag nur noch bei etwa 3 – 6 % des Gesamtsignals und war somit kaum detektierbar. Das mit dem Plbd2-66G9-Antikörper nachweisbare Pro- α -Fragment wies eine Verschiebung zu geringerem Molekulargewicht auf. Die Verschiebung von Pro- α - zu α -Fragment fiel bei Zugabe von CtsB moderat aus, während die Inkubation mit lysosomaler Fraktion (Tritosomen) zu einer deutlicheren Verschiebung im Molekulargewicht führte. Der Größenunterschied ist möglicherweise auf die Abspaltung des Pro-Peptids am C-Terminus des Pro- α -Fragments oder dessen N-terminale Verkürzung zurückzuführen, sodass das verkleinerte Fragment dem murenen α -Fragment entsprechen könnte.

Durch Inkubation mit Protease-Inhibitor und ohne DTT konnte die Verschiebung der Pro- α -Bande durch CtsB (Abbildung 32C, Lane 8) und Tritosomen (Abbildung 32C, Lane 10) verhindert werden. Der Anteil des Pro-Plbd2 lag in Anwesenheit von CtsB fast auf dem Niveau der Inkubation ohne Cathepsin (Lane 7) oder mit CtsL (Lane 9). Bei der mit Tritosomen behandelten Probe blieb der Anteil mit 1,5 % sehr gering. Auffälligerweise konnten bei der Mutante Plbd2-C249A auch nach Inkubation mit CtsB (Lane 13) oder Tritosomen (Lane 15) neben dem Pro-Plbd2 keine Spaltprodukte beobachtet werden. Die bisher nicht eindeutig identifizierte Bande bei 55 kDa war mit dem Plbd2-66G9-Antikörper (Abbildung 32C) in allen Proben bis auf das mit Tritosomen-behandelte Plbd2-WT (Lane 5 und 10) zu detektieren. Am stärksten war das Signal der Bande bei Inkubation der Plbd2-C249A-Mutante mit CtsB (Lane 13).

Um eine Aussage über den Effekt der Protease-Inhibition zu erzielen, wurden die Aktivitäten der Cathepsine und der Tritosomen gegen das CtsB/L-Substrat Z-FR-AMC gemessen. Dabei wurden Ansätze mit und ohne DTT oder Protease-Inhibitoren verwendet. Wie in Abbildung 33 zu erkennen ist, erhöhte sich die Aktivität von CtsB und Tritosomen nach Zugabe von DTT deutlich (65-fach

bzw. 32-fach höher als ohne DTT), die Aktivität des CtsL blieb gering. Wurde statt DTT nur Protease-Inhibitor zugegeben, war keine CtsB und CtsL Aktivität mehr messbar, während die Aktivität der Tritosomen unverändert blieb. Bei Zugabe von DTT und Inhibitor lag die Aktivität des CtsB etwa im Bereich des CtsB ohne DTT. Im Ansatz mit Tritosomen wurde die Aktivität um Faktor 23 gegenüber der Probe ohne DTT und Inhibitor gesteigert.

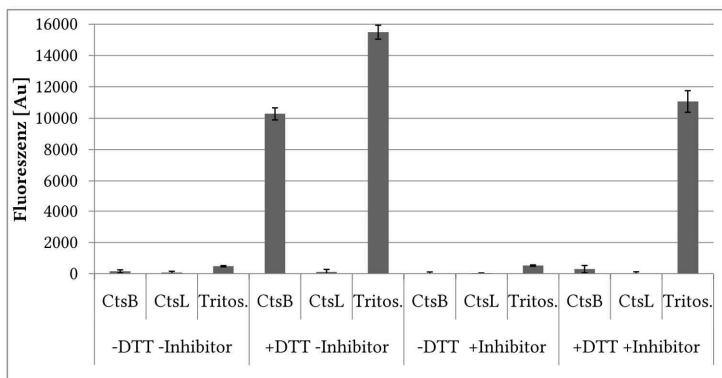


Abbildung 33: Aktivität von CtsB, CtsL und Tritosomen.

250 ng der Cathepsine B und L sowie 12,5 µg Lysosomen-angereicherte Fraktion aus Leber (Tritos.) wurden wie für das Experiment in Abbildung 32 in NaAc Puffer pH 4,5 inkubiert und nach 5 h die Aktivitäten gegen das CtsB/L-Substrat Z-FR-AMC gemessen. Die Inkubation und Messung erfolgte mit oder ohne 5 mM DTT und 1x Protease-Inhibitor-Cocktail.

In Abbildung 33 ist zu erkennen, dass auch bei Zugabe von Protease-Inhibitoren eine hohe Aktivität des Tritosomen-Ansatzes gegen das CtsB/L-Substrat bestehen blieb. Der Grund für den Abbau der Bande des Pro-Plbd2 in Abbildung 32, Lane 10 bei Inkubation mit Tritosomen und Protease-Inhibitor war somit vermutlich eine unvollständige Inhibition der relevanten lysosomalen Proteasen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von Plbd2 mit Cathepsin B *in vitro* einen Einfluss auf die Prozessierung des Pro-Plbd2 hat (Abbildung 32, Lane 3). Der für das Cathepsin L bestimmte Umsatz des Substrates Z-FR-AMC lag deutlich unterhalb des Umsatzes durch Cathepsin B (Abbildung 33). Die zuvor bestimmte spezifische Aktivität des aktivierten Cathepsin L lag mehr als 3-fach höher als die des Cathepsin B (Abbildung 31), das CtsL ist somit unter diesen experimentellen Bedingungen möglicherweise nicht aktiv, was bei der Beurteilung der Spaltung des Plbd2 in Abbildung 32 zu berücksichtigen ist.

4.2.7 *In vitro* Prozessierung von Plbd2 durch CtsB, CtsL und AEP

Es konnte gezeigt werden, dass die Asparaginyln-Endopeptidase (AEP) einen Einfluss auf die Prozessierung der Cathepsine B und L hat (Abbildung 31B). Nach der Spaltung durch AEP konnte nur eine geringe Veränderung der Aktivität der Cathepsine gegenüber den artifiziellen AMC-markierten Substraten gemessen werden. Es ist dennoch ein Einfluss der Spaltung auf die Aktivität gegenüber endogenen Substraten denkbar. Um einen möglichen Effekt der gespaltenen Cathepsine auf die Prozessierung des Plbd2 nachzuweisen, wurden rekombinantes Plbd2-WT und die Mutante

Plbd2-C249A partiell aufgereinigt und *in vitro* mit CtsB und CtsL einzeln oder in Kombination mit AEP inkubiert.

In Abbildung 34A ist bei Nachweis mit dem RGS-His-Antikörper zu erkennen, dass bei Inkubation des Plbd2-WT unter allen Bedingungen das β -Intermediat bei etwa 40 kDa zu detektieren war (Lane 1 - 7). Bei Inkubation der C249A-Mutante trat das β -Intermediat nicht auf (Lane 9 - 15). Das Pro-Plbd2 bei 70 kDa war für das Plbd2-WT nur ohne Cathepsine (Lane 1,2) und mit CtsB (Lane 3) nachzuweisen. Für das Plbd2-C249A war das Pro-Plbd2 mit CtsL oder AEP (Lane 12,13) nur schwach und mit CtsL und AEP (Lane 15) gar nicht zu erkennen. In den übrigen Fällen war bei 70 kDa eine deutliche Bande des Pro-Plbd2 zu detektieren. Die Banden unterhalb von 40 kDa waren auf die Signale der His₆-markierten Cathepsine zurückzuführen (vgl. Abbildung 31). Die Banden in den Lysosomen-angereicherten Fraktionen (Tritosomen) waren auf nicht-Plbd2 spezifische Interaktionen des Antikörpers zurückzuführen (Lane 8). Mit dem Antikörper Plbd2-Crp76 (Abbildung 34B), der gegen den C-Terminus des Plbd2 gerichtet ist, konnten für die C249A-Mutante die Banden des Pro-Plbd2 bei 70 kDa analog zu dem RGS-His-Antikörper detektiert werden. Für das Plbd2-WT konnten auch Banden des Pro-Plbd2 bei Inkubation mit CtsL, AEP und CtsB/AEP (Lane 4 - 6) nachgewiesen werden. Die Banden des β -Intermediats waren wie in Abbildung 34A unter allen Inkubationsbedingungen des Plbd2-WT detektierbar. In der Lysosomen-angereicherten Fraktion (Tritosomen, Lane 8) war zudem das β 2-Fragment nachweisbar. Auffällig war eine Verringerung der Größe des β -Intermediates in Tritosomen gegenüber der Inkubation *in vitro*.

In Abbildung 34C ist der Plbd2-Irp76-Antikörper verwendet worden, der gegen das Peptid N461-S472 im β -Fragment des Plbd2 gerichtet ist. Mit diesem Antikörper konnte demnach das Pro-Plbd2 (70 kDa) und das C-terminale β -Intermediat (42 kDa) detektiert werden. Zusätzlich traten gegenüber dem Plbd2-Crp76-Antikörper weitere Banden auf (\triangleleft), von denen die bei etwa 55 kDa das stärkste Signal aufwies. Besonders deutlich war die 55 kDa Bande bei Inkubation der Plbd2-C249A-Mutante mit AEP (Abbildung 34C, Lane 13) und AEP mit CtsB (Lane 14) zu erkennen. Bei Inkubation ohne die Hydrolasen oder mit CtsB oder CtsL allein (Lane 9 - 12) war die Bande nur sehr schwach zu detektieren. Nach Inkubation des Plbd2-WT mit AEP (Lane 5) oder mit AEP und CtsB (Lane 6) war die 55 kDa Bande ebenfalls deutlich zu erkennen. Zudem trat die Bande auch nach Inkubation des Plbd2-WT mit CtsB (Lane 3) deutlich auf. Bei Inkubation mit CtsL (Lane 4) oder in den Kontrollen ohne Cathepsine (Lane 1,2) war die Bande schwach zu erkennen. Eine weitere deutliche Bande bei etwa 25 kDa trat ausschließlich nach Inkubation des Plbd2-WT (Abbildung 34C, Lane 5) und der Mutante-C249A (Lane 13) mit AEP allein auf. Für das Plbd2-WT konnten zudem schwache Banden bei etwa 29 kDa und 27 kDa detektiert werden. In den Tritosomen in Lane 8 wurde neben einer Bande auf Höhe des β -Intermediates (42 kDa) eine starke Bande bei 25 kDa und eine schwächere bei etwa 27 kDa detektiert

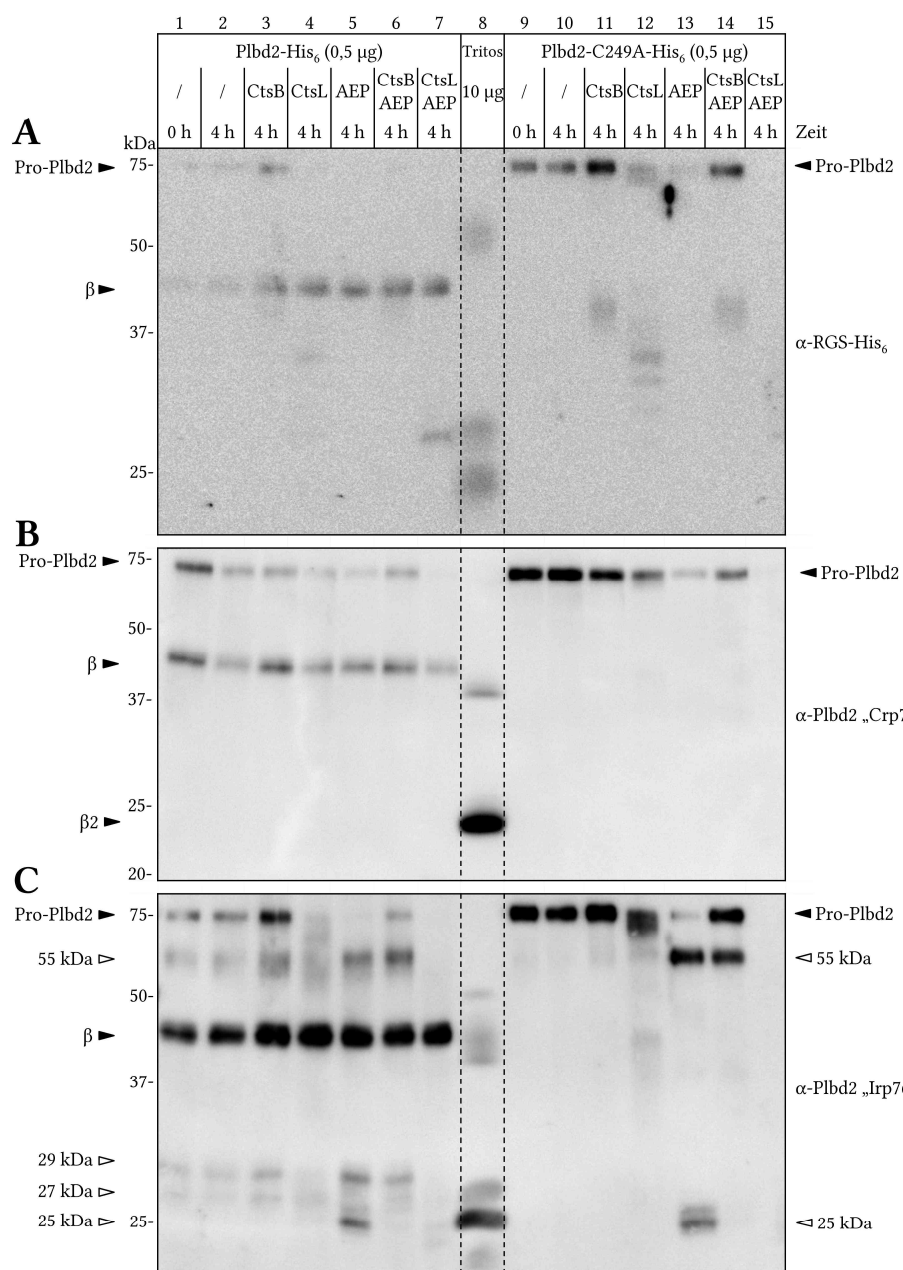


Abbildung 34: Western-Blot des *in vitro* Umsatz von Plbd2 und Plbd2-C249A mit CtsB, CtsL und AEP.

0,5 µg rekombinantes Plbd2-His₆ oder die Mutante Plbd2-C249A-His₆ wurden in 30 µL 250 mM NaAc pH 4,5 mit 5 mM DTT inkubiert. Zum Ansatz wurden 400 ng rCtsB (Reinheit c.a. 2,5 %), 40 ng rCtsL (Reinheit c.a. 25 %), 100 ng rAEP (Reinheit >99 %) oder eine Kombination der Enzyme gegeben. Die Reaktion wurde nach 0 h oder 4 h durch Abkochen mit Lämmli-Puffer gestoppt und die Proben nach SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran untersucht. Zum Abgleich mit der *in vivo* Prozessierung des Plbd2 wurden 10 µg Lysosomenangereicherte Fraktion (Tritos) aufgetragen. Zum Nachweis dienten die Antikörper RGS-His₆ (A), Plbd2-Crp76 (B) und Plbd2-Irp76 (C). Die gestrichelten Linien dienen der Übersichtlichkeit. Bisher nicht zugeordnete Banden des Plbd2 sind mit weißen Pfeilen markiert. Während für die Felder A, C und D derselbe Blot mit verschiedenen Antikörpern dekoriert wurde, ist der Blot in Feld B (Plbd2-Crp76-Antikörper) mit einem technischen Replikat angefertigt worden.

Das Fragment bei 55 kDa konnte mit dem Plbd2-Irp76-Antikörper (Abbildung 34C), nicht aber mit dem Plbd2-Crp76- oder RGS-His₆-Antikörper (Abbildung 34A und B) nachgewiesen werden. Das Pro-Plbd2 wurde somit durch die Asparaginyln-Endopeptidase zwischen den Epitopen des Irp76-Antikörper bei S472 und des Crp76-Antikörpers bei Gly579 in zwei etwa 55 kDa und 15 kDa große Fragmente gespalten. Ein entsprechendes etwa 15 kDa großes, His₆-markiertes Fragment konnte in aufgereinigtem Plbd2 bereits beobachtet werden. Diese Spaltstelle bei Ser514 wurde über Edman-Abbau bestimmt (Deuschl, 2008).

Das Auftreten des Fragments bei etwa 25 kDa nach Inkubation des Plbd2-WT (Abbildung 34C, Lane 5) und der Mutante-C249A (Lane 13) mit AEP, setzt eine weitere Spaltung durch die AEP voraus. Bei einer weiteren Spaltung etwa im Bereich des aktiven Zentrums des Plbd2 (Cys249), würde ein Fragment dieser Größe entstehen. Ein N-terminales Fragment, das aus dieser Spaltung resultieren muss (siehe Abbildung 35), konnte nicht detektiert werden.

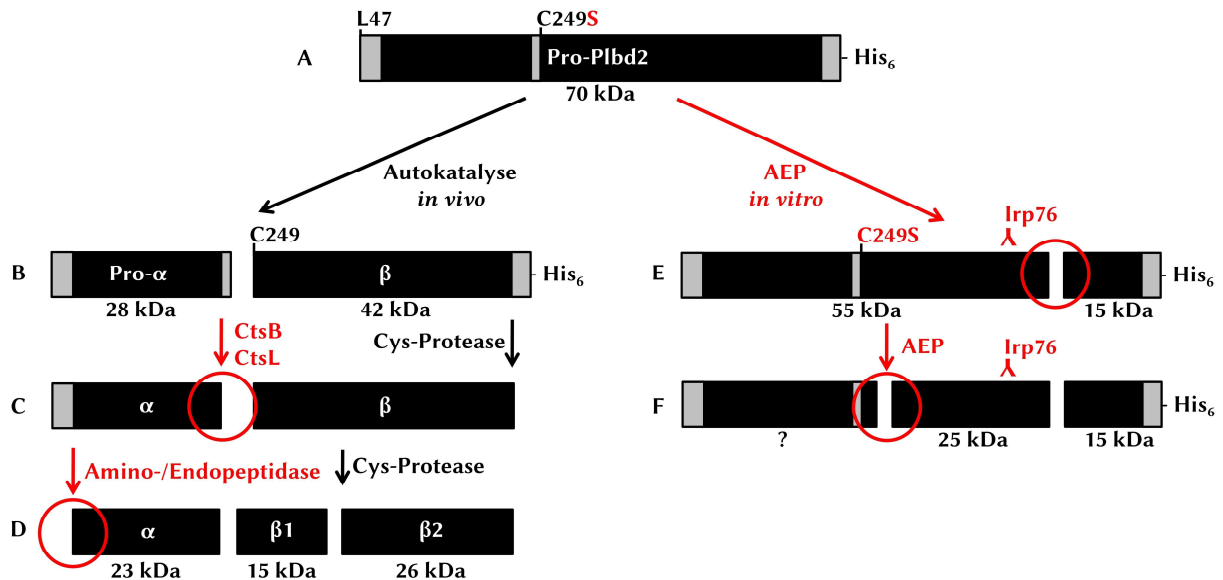


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Prozessierung des Pro-Plbd2 *in vivo* und durch die AEP *in vitro*. Dargestellt ist die schematische Prozessierung des His₆-markierten Pro-Plbd2. Das Pro-Plbd2 (A) entsteht durch die Abspaltung des Signalpeptids (Met1 – Ala46). Durch eine autokatalytische Prozessierung wird das Pro-α-Fragment und das β-Intermediat generiert (B). Von dem Pro-α-Fragment wird durch CtsB Carboxyproteolytisch oder CtsL Endoproteolytisch das Propeptid abgespalten (C). Die N-terminale Verkürzung findet durch eine Amino- oder Endopeptidase aus den Lysosomen statt (D). *In vitro* kann die AEP das Pro-Plbd2 C-terminal (E) und in der Mitte des Peptids (F) spalten. Die Bindestelle des Irp76-Antikörpers ist dargestellt. Die Größen der Fragmente ergeben sich aus den apparenten Größen in der SDS-PAGE.

4.3 Intrazelluläre Sortierung des Plbd2

Lysosomale Proteine werden nach der Synthese im Endoplasmatischen-Retikulum (ER) in den Golgi transportiert und von dort gezielt zu den Lysosomen sortiert. Die Erkennung von lysosomalen Membranproteinen erfolgt anhand konservierter Erkennungssequenzen im cytoplasmatischen Teil der Proteine. Lösliche lysosomale Proteine werden in der Regel anhand einer Mannose-6-Phosphat-Modifizierung (M6P) an N-Glykanstrukturen erkannt, die durch eine GlcNAc-1-Phosphotransferase (GNPT) erzeugt wird und den Transport zu den Lysosomen anhand von M6P-Rezeptoren (MPR) ermöglicht (Abschnitt 1.1.4). Defekte des GNPT resultieren in einer Fehlsortierung lysosomaler Proteine und der Erkrankung Mucopolysaccharidose Typ II (MLII, *I-cell-disease*). Ein ähnlicher Phänotyp tritt bei Defekten der M6P-Rezeptoren auf.

Um den Zusammenhang der M6P-Modifizierung des Plbd2 und dessen lysosomaler Sortierung zu untersuchen, wurde die Lokalisation des Plbd2 in MPR-defizienten-Fibroblasten und MLII-Fibroblasten untersucht.

4.3.1 Sortierung des Plbd2 bei Defekten im M6P-Transportweg

Plbd2 wurde initial in Studien von Mannose-6-Phosphat (M6P) modifizierten Proteinen identifiziert und als lysosomale Hydrolase beschrieben (Kollmann *et al.*, 2005, Sleat *et al.*, 2005). Es kann somit ein Transport des Proteins über den M6P-Transportweg zu dem Lysosom erwartet werden. Es sollte untersucht werden, ob Defekte des M6P-Transportweges die korrekte lysosomale Sortierung des Plbd2 unterbinden. Dazu wurde die Verteilung des Plbd2 in Zelllysaten, Zellkulturüberständen und Lysosomen-angereicherten Fraktionen in verschiedenen murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)-Zelllinien untersucht. Neben einer MEF-WT-Zelllinie und einer MEF-Linie aus *Plbd2-genetrap*-Tieren (*Plbd2-gt*), in denen die Expression des Plbd2 stark verringert ist, wurden zwei MEF-Linien mit Sortierungsdefekten eingesetzt. Die verwendeten MLII-MEFs tragen eine inaktivierende Insertion im GNPTAB-Gen, die zu einem Defekt der GlcNAc-1-Phosphotransferase führen (Kollmann *et al.*, 2012). In den MPR-MEFs wurden die Gene der Rezeptoren MPR300 und MPR46 sowie des Wachstumsfaktors IGF-II (*insulin-like growth factor II*) deaktiviert, wobei die IGF-II-Defizienz das Überleben der transgenen Mäuse bei gleichzeitiger MPR-Defizienz ermöglicht (Pohlmann *et al.*, 1995).

Bei der Analyse der Prozessierung des Plbd2 in WT-MEFs war mit dem Plbd2-66G9-Antikörper (Abbildung 36A, Lane 1) das typische Bandenmuster mit Pro-Plbd2 bei etwa 70 kDa, β -Intermediat bei 40 kDa, β 2-Fragment bei 26 kDa und α -Fragment bei 23 kDa zu detektieren. Die mit Stern gekennzeichnete Bande bei etwa 30 kDa trat in allen MEF-Linien einschließlich der *Plbd2-genetrap*-

MEFs in Lane 4 mit ähnlicher Intensität auf und ist somit höchst wahrscheinlich nicht spezifisch für das Plbd2. In den MPR-MEFs (Lane 2) war das Pro-Plbd2 schwach zu erkennen, während die Fragmentbanden nicht zu detektieren waren. Die MLII-MEFs (Lane 3) ähnelten im Bandenmuster den WT-MEFs, wobei die Banden auf der Höhe des β - und α -Fragments deutlich schwächer waren und eine weitere Bande bei etwa 22 kDa auftrat. In den Plbd2-*genetrap*-MEFs waren die Plbd2 β - und α -Fragmentbanden schwach zu erkennen, das Pro-Plbd2 war ebenfalls zu erkennen. Bei Nachweis mit dem Plbd2-Crp76-Antikörper war erneut die nicht-Plbd2 spezifische Bande bei 30 kDa zu erkennen (Abbildung 36B). Zusätzlich trat eine Bande bei etwa 20 kDa auf, die bereits als nicht-Plbd2 spezifisch identifiziert wurde (vgl. Abbildung 10). Das β -Intermediat war in WT-MEFs (Lane 5) gut zu erkennen, in MPR- (Lane 6) und Plbd2-gt-MEFs (Lane 8) nur schwach und in den MLII-MEFs (Lane 7) gar nicht zu detektieren. Im Gegensatz dazu war das Pro-Plbd2 in den WT-MEFs nicht nachweisbar, in den MPR- und MLII-MEFs jedoch deutlich sichtbar. In den Plbd2-gt-MEFs war die Bande des Pro-Plbd2 schwach zu detektieren. Das β -Fragment war bei etwa 26 kDa mit dem Crp76-Antikörper in WT-MEFs (Lane 5) deutlich zu erkennen. Bei entsprechendem Molekulargewicht war bei den MPR- und MLII-MEFs nur eine schwache Bande zu detektieren, ein stärkeres Signal lag bei etwas höherem Molekulargewicht von etwa 28 kDa vor. Auf dieser Höhe war in den WT-MEFs ebenfalls ein schwaches Signal zu erkennen. Die Bande könnte auf eine Veränderung der Glykosylierung oder Prozessierung des Plbd2 zurückzuführen sein.

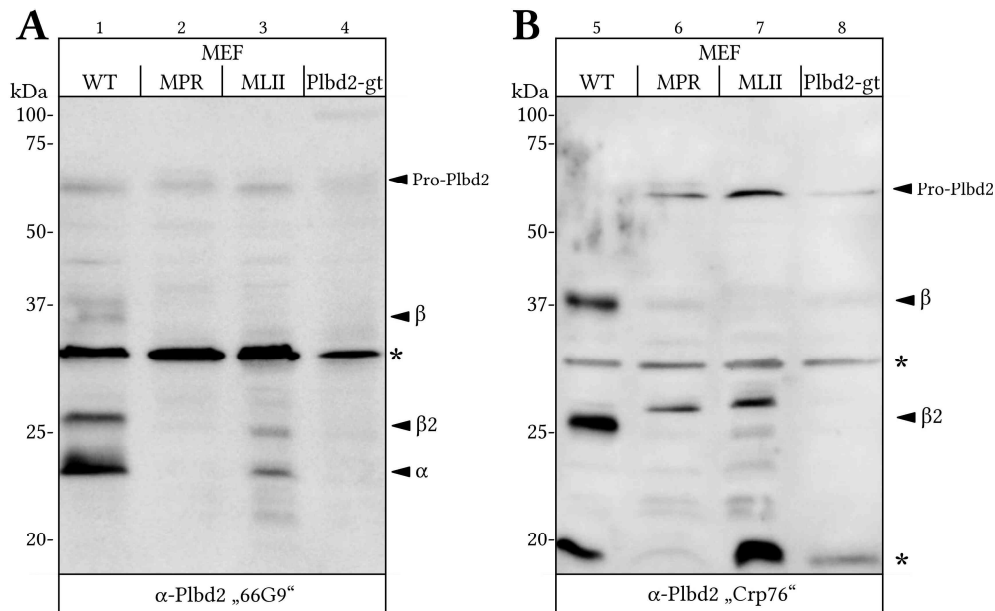


Abbildung 36: Western-Blot der Prozessierung von Plbd2 in WT-, MPR- und MLII-MEFs.

100 μ g der aufgearbeiteten Lysate von murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) wurden nach SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran auf die Expression von Plbd2 untersucht. Verwendet wurden neben MEF-WT und Plbd2-*genetrap*-MEFs (Plbd2-gt) Zellen mit Defekten der M6P-Rezeptoren (MEF-MPR) und der GlcNAc-1-Phosphotransferase (MEF-MLII). Der Nachweis des Plbd2 erfolgte mit Plbd2-66G9- (A) oder Plbd2-Crp76-Antikörpern (B). Banden die in WT und Plbd2-gt mit vergleichbarer Intensität detektiert werden, sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Ergebnisse in Abbildung 36 zeigen eine veränderte Prozessierung des Plbd2 bei Defekten des M6P-Transportweges. Es sollte überprüft werden, ob die von MEF-WT abweichende Prozessierung des Plbd2 durch eine Fehlsortierung des Proteins bedingt ist, oder ob das Plbd2 korrekt ins Lysosom transportiert wird, aber für die Prozessierung dort relevante Proteasen fehlen. Dazu wurden MEF-Homogenate hergestellt, die Zellmembran aufgeschlossen und durch differentielle Zentrifugation eine Fraktion isoliert, in der intrazelluläre Organellen angereichert wurden (P13). Das Plbd2-Signal in den so erzeugten P13-Fractionen wurde im Western-Blot mit dem Zellkulturüberstand und den Lysaten verglichen.

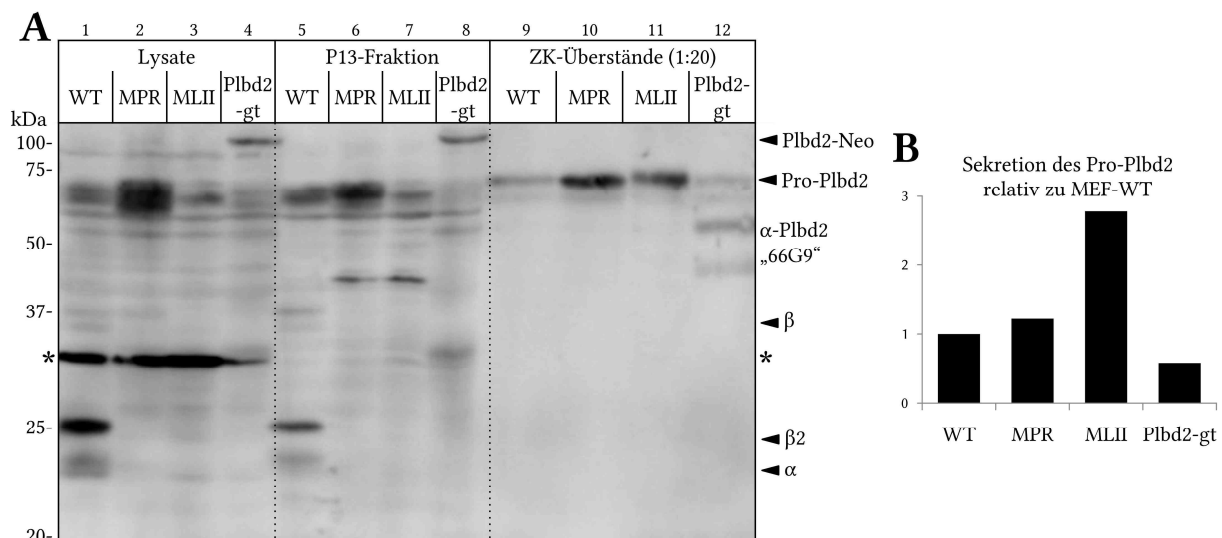


Abbildung 37: Western-Blot von Lysaten, angereicherten Lysosomen und Überständen verschiedener MEF-Zelllinien.

(A) Murine embryonale Fibroblasten (MEFs) wurden in konditioniertem Medium (0,1 % FCS) inkubiert, nach 24 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen geerntet. Verwendet wurden neben MEF-WT und Plbd2-*genetrap*-MEFs (Plbd2-gt) Zellen mit Defekten der M6P-Rezeptoren (MEF-MPR) und der GlcNAc-1-Phosphotransferase (MEF-MLII). 100 µg der aufgearbeiteten Lysate wurden nach SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran auf die Expression von Plbd2 untersucht (Lane 1-4). Um die P13-Fraktion zu erzeugen, wurden MEF-Homogenate mit einer 26 Gauge Kanüle aufgeschlossen und die Zellröhre 10 min bei 2000 xg zentrifugiert. Der Postnukleäre Überstand wurde bei 13.000 xg pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet lysiert und 50 µg zum Western-Blot eingesetzt (Lane 5-8). Von den Zellkultur-Überständen wurde 1/20 des Volumens eingesetzt das dem Anteil der Lysate entspricht (Lane 9-12). Der Nachweis des Plbd2 erfolgte mit dem Plbd2-66G9-Antikörper. Banden die in WT und Plbd2-gt mit vergleichbarer Intensität detektiert werden, sind mit einem Stern gekennzeichnet. (B) Die Banden des Pro-Plbd2 im Western-Blot wurden quantifiziert (ImageJ) und die Proteinsekretion als Verhältnis der Bande im Zellkulturüberstand zu der Bande im Zellysate bestimmt. Dargestellt ist die Sekretion des Pro-Plbd2 in den Zelllinien als Vielfaches der Sekretion in WT-Zellen.

Wie in Abbildung 37A zu erkennen, waren im Lysat der WT-MEF (Lane 1) bei Nachweis mit dem 66G9-Antikörper neben dem Pro-Plbd2 bei 70 kDa auch die Fragmente β2 bei 26 kDa und α bei 23 kDa zu detektieren. Die Bande des β-Intermediates bei 42 kDa war schwach nachzuweisen. Für die MPR- (Lane 2) und MLII-MEFs (Lane 3) konnte eine deutliche Bande des Pro-Plbd2 nachgewiesen werden, wobei das Signal in MPR-MEFs die höchste Intensität aufwies. Die Signale der Fragmentbanden waren nicht zu detektieren. In den Plbd2-*genetrap*-MEFs waren die Banden des Pro-Plbd2 bei 70 kDa und des Fusionsproteins Plbd2-Neomycin-Phosphotransferase (Plbd2-Neo) bei

etwa 120 kDa zu erkennen (vergleiche Abschnitt 4.1.1). Auffällig war das starke Signal der nicht-Plbd2 spezifischen Bande bei etwa 30 kDa in allen Lysaten (*). In der P13-Fraktion trat diese 30 kDa Bande nicht mehr auf. Die übrigen Banden der P13-Fraktion (Abbildung 37A, Lane 5 – 8) entsprachen weitgehend den MEF Lysaten. Sowohl in den MPR- (Lane 6) als auch in den MLII-MEF (Lane 7) trat zudem eine zusätzliche Bande bei etwa 45 kDa auf. Alle MEF-Linien sekretierten das 70 kDa Pro-Plbd2 in den Zellkultur-Überstand (Lane 9 – 12), wobei die Signale in den M6P-transportdefizienten Zellen MPR-MEF und MLII-MEF, relativ zu den Signalen in den entsprechenden Zelllysaten, stärker waren als die in WT-MEF und die Plbd2-*genetrap*-MEF (Abbildung 37B).

Es konnte somit gezeigt werden, dass die Prozessierung des Plbd2 in Zellen mit Defekten im M6P-Transportweg verändert ist. Die maturen Fragmente α und β 2 konnten in MPR- und MLII-MEFs nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 37A). In diesen Zellen konnte zudem eine deutlich stärkere Sekretion des Pro-Plbd2 beobachtet werden als bei den WT-MEFs. Nach Normierung auf die Bandenintensität im Lysat wurde das Pro-Plbd2 in MPR-MEF 1,2-fach stärker, in MLII-MEF 2,8-fach stärker als in WT-MEF in das Zellkulturmedium sekretiert. Trotz der höheren Sekretion kann eine vergleichsweise große Menge Pro-Plbd2 in den MPR- und MLII-MEFs nachgewiesen werden (Abbildung 37, Lane 6 und 7). Ob das Plbd2 in diesen Zellen in den Lysosomen oder anderen Zellkompartimenten wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder dem Golgi-Apparat lokalisiert ist, kann aus den Daten nicht geschlossen werden.

4.3.2 Lokalisation des Plbd2 in Zelllinien mit Sortierungsdefekten

Wie die Ergebnisse in Abschnitt 4.3.1 zeigen, fand in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) mit Defekten im M6P-Transportweg eine verstärkte Sekretion des Pro-Plbd2 statt. Trotz der starken Sekretion war ein deutliches Signal des Pro-Plbd2 in den Zellysaten zu detektieren. Es sollte untersucht werden, ob das intrazellulär vorliegende Pro-Plbd2 in den MEFs mit Sortierungsdefekten die Lysosomen erreicht. Dazu wurde das Plbd2 und das lysosomale Markerprotein Lamp1 über indirekte Immunfluoreszenz in den MEF-Zelllinien detektiert.

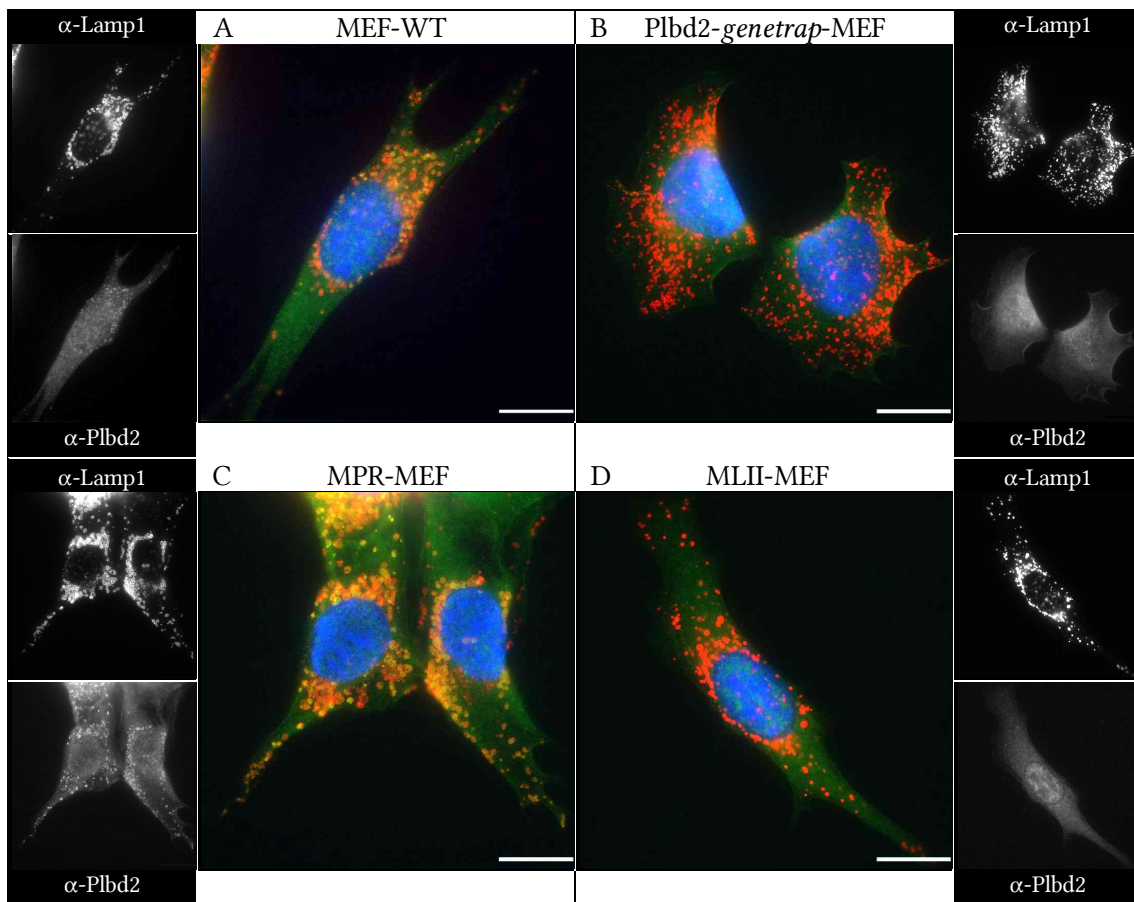


Abbildung 38: Immunfluoreszenzen der Lokalisation von Plbd2 in verschiedenen MEF-Zelllinien.

MEF-WT (A) Zellen und MEFs defizient für Plbd2 (Plbd2-*genetrap*-MEF, B), für die M6P-Rezeptoren (MPR-MEF, C) oder für die GlcNAc-1-Phosphotransferase (MLII-MEF, D) wurden auf PLL-beschichteten Deckgläsern ausgesät. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und mit den Antikörpern Kaninchen- α -Plbd2 „60H1“ (1:50) und Maus- α -Lamp1 „H4A3“ (1:500) inkubiert. Als Zweitantikörper wurden α -Kaninchen IgG Alexa Fluor 488 (Grün) und α -Maus IgG Alexa Fluor 546 (Rot) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Dapi angefärbt (Blau). Maßstabsbalken entspricht 15 μ m.

Bei der Detektion von Plbd2 (60H1-Antikörper, grün) und dem lysosomalen Markerprotein Lamp1 (1D4B-Antikörper, Rot) in der Ko-Immunfluoreszenz, konnte in WT-MEF eine Kolokalisation der beiden Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 38A). Bei der Detektion des Membranproteins Lamp1 war die ringförmige Struktur der lysosomalen Membran zu erkennen, das Signal des Plbd2

fand sich innerhalb dieser Strukturen im lysosomalen Lumen. In *Plbd2-genetrap*-MEF (Abbildung 38B) war eine vergleichsweise hohe Zahl von Lamp1-positiven Lysosomen zu erkennen, die im Vergleich mit WT-MEF eine geringere Größe aufwiesen. Für das Plbd2 konnte ein starkes Hintergrundsignal, jedoch keine distinkten vesikulären Strukturen detektiert werden, wie sie in WT-MEF zu erkennen waren. Das Hintergrundsignal bei der Detektion mit dem Plbd2-60H1-Antikörper resultierte vermutlich aus der Detektion anderer Proteine als Plbd2, wie sie auch mit den anderen polyklonalen Plbd2-Antikörpern „66G9“ und „Crp76“ im Western-Blot nachweisbar war (Abbildung 36). In M6P-Rezeptor-defizienten Zellen (MPR-MEF) konnte mit dem Lamp1-Antikörper eine große Zahl ringförmiger lysosomaler Strukturen detektiert werden (Abbildung 38C), die in ihrer Größe den lysosomalen Signalen der WT-MEF ähnelten. Das Signal des Plbd2 wies eine hohe Kolo­kalisierung mit dem Lamp1-Signal auf und lokalisierte innerhalb der durch Lamp1 markierten ringförmigen lysosomalen Membran. In MLII-Zellen (Abbildung 38C) konnte neben dem Hintergrundsignal in der gesamten Zelle kein distinktes Plbd2-Signal detektiert werden. Die Anzahl der durch Lamp1-angefärbten Lysosomen entsprach etwa der in WT-MEF, wobei die Größe der Lysosomen in MLII-MEF geringer war.

Es konnte gezeigt werden, dass das Plbd2 in WT-MEF im Lumen der durch Lamp1-markierten Lysosomen lokalisiert. Auch in MPR-MEF kann eine lysosomale Lokalisation des Plbd2 nachgewiesen werden, die Anzahl der detektierten Lysosomen war dabei deutlich größer als in WT-MEF. In MLII-MEF kann kein distinktes Plbd2-Signal nachgewiesen werden. Die mit dem Lamp1-Antikörper detektierten Lysosomen waren ähnlich zahlreich wie in MEF-WT. In *Plbd2-genetrap*-MEF konnte kein distinktes Plbd2-Signal nachgewiesen werden, während die detektierten Lamp1-positiven Strukturen kleiner und zahlreicher als in MEF-WT waren.

4.3.3 Subzelluläre Fraktionierung durch Dichtegradienten-Zentrifugation

Die lysosomale Lokalisation des Plbd2 in MEF-Zellen konnte durch Kolo­kalisierung mit dem lysosomalen Markerprotein Lamp1 in indirekter Immunfluoreszenz gezeigt werden (Abschnitt 4.3.2). Um zu untersuchen, wie sich die Fragmente des Plbd2 auf die Lysosomen und andere Organellen in MEFs verteilen, wurden die Zellen aufgeschlossen und die Organellen in einem selbstformenden Percoll™-Dichtegradienten durch Zentrifugation aufgetrennt (Abschnitt 3.2.9). Die gewonnenen Fraktionen wurden auf β -Hexosaminidase-Aktivität als lysosomalen Marker untersucht und die Proteinkonzentration bestimmt. Der Nachweis des Plbd2 erfolgte im Western-Blot mit dem Plbd2-66G9-Antikörper.

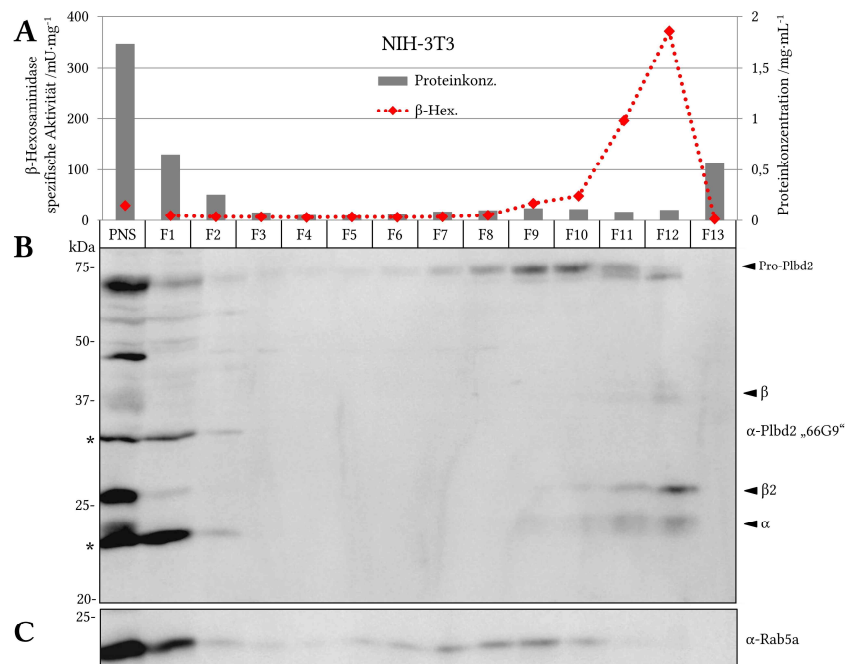


Abbildung 39: Western-Blot von NIH-3T3-Zellen nach Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation.

NIH-3T3 Fibroblasten wurden geerntet und mit einer 26 Gauge Kanüle aufgeschlossen. Durch differentielle Zentrifugation wurde ein Postnukleärer Überstand (PNS) hergestellt und 1 mL des PNS auf 8,5 mL 20 % Percoll™ geladen. Die Probe wurde 45 min bei 40.500 xg zentrifugiert und der selbstformende Gradient in Fraktionen von 750 μ L von oben abgenommen. Die Proben wurden mit 50 μ L 16 % Triton X-100 lysiert und das Percoll bei 100.000 xg für 50 min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die β -Hexosaminidase-Aktivität sowie die Proteinkonzentration bestimmt (A). 100 μ L der Fraktionen und des 1:2-verdünnten PNS wurden zur SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit dem Plbd2-66G9-Antikörper (B) und einem Rab5a-Antikörper (C) als Marker für frühe Endosomen.

Zur Etablierung der Methode wurden NIH-3T3-Fibroblasten verwendet, die mit dem Plbd2-66G9-Antikörper im Western-Blot ein deutliches Plbd2-Signal bei sehr geringem Hintergrundsignal aufweisen (Abschnitt 4.1.1). Im Percoll-Gradient konnte die höchste spezifische β -Hexosaminidase-Aktivität in den Fraktionen F12 (372 $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$) und F11 (196 $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$) gemessen werden (Abbildung 39A). Diese Fraktionen beinhalten damit vermutlich den Großteil der Lysosomen. Die höchste Proteinkonzentration konnte neben dem PNS in der F1- und der F13-Fraktion gemessen werden.

Bei Nachweis des Plbd2 mit dem 66G9-Antikörper (Abbildung 39A), war im PNS das übliche Bandenmuster des Plbd2 zu erkennen, mit dem Pro-Plbd2 bei 70 kDa, dem β -Intermediates bei 42 kDa und den Banden der maturen α - und β 2-Fragmente bei 23 kDa und 26 kDa. Die zuvor beschriebenen Banden bei 22 kDa, 30 kDa sowie bei etwa 45 kDa waren vermutlich nicht spezifisch für Plbd2 und wiesen im PNS eine hohe Intensität auf. Das Pro-Plbd2 war in den Fraktionen F7 – F12 deutlich nachzuweisen, auffällig war dabei eine Verringerung der apparenten Größe des Pro-Plbd2 in den Fraktionen F11 und F12. In diesen Fraktionen waren zudem die maturen α - und β 2-Fragmente deutlich nachweisbar. Das β -Intermediat war nur in Fraktion F11 und F12 zu detektieren. Bei Verwendung eines Rab5a-Antikörpers (Abbildung 39C), der Rab5a als Markerprotein für frühe

Endosomen erkennt, wiesen die Fraktionen F7 – F10 die stärksten Signale auf. Die Banden in F1 stellten vermutlich Proteine aus lysierten Zellorganellen dar.

Die Banden des Pro-Plbd2 traten in den Fraktionen F7 – F10 mit dem frühen Endosomen Marker Rab5a auf, in diesen Fraktionen waren keine Fragmentbanden des Plbd2 nachzuweisen. Die Fraktionen F11 und F12 konnten anhand der höchsten β -Hexosaminidase-Aktivität als lysosomal identifiziert werden. In diesen Fraktionen waren die murenen Fragmente α und β 2 nachweisbar, das Signal des Pro-Plbd2 nahm hier an Intensität ab und ist zu geringerem Molekulargewicht verschoben. Die Daten lassen den Schluss zu, dass das Plbd2 erst in den späten Endosomen oder Lysosomen autokatalytisch in das α - und β -Fragment gespalten wird, auch die proteolytische Spaltung scheint in diesen Organellen stattzufinden.

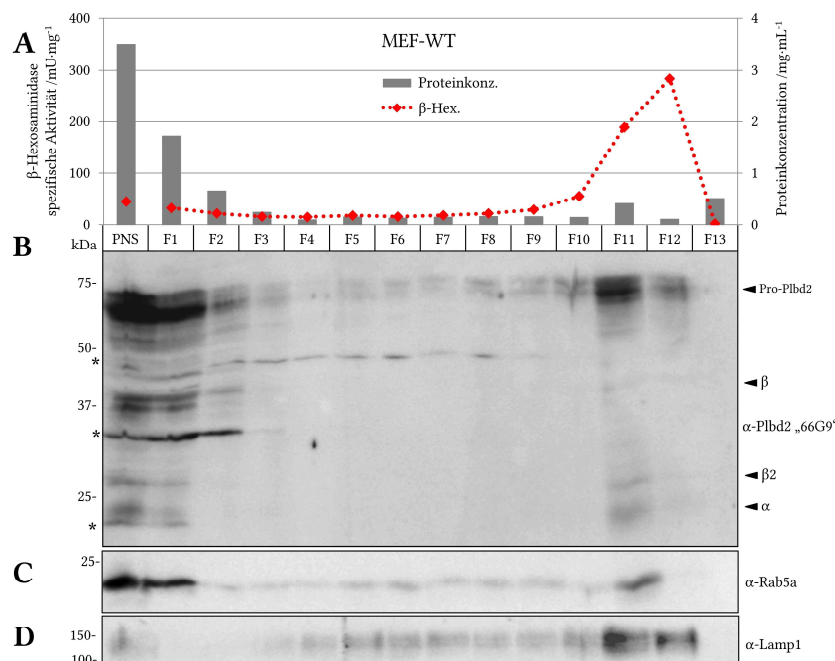


Abbildung 40: Western-Blot von MEF-WT-Zellen nach Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation.

WT-Fibroblasten (MEF-WT) wurden geerntet und mit einer 26 Gauge Kanüle aufgeschlossen. Durch differentielle Zentrifugation wurde ein Postnukleärer Überstand (PNS) hergestellt und 1 mL des PNS auf 8,5 mL 20 % Percoll™ geladen. Die Probe wurde 45 min bei 40.500 xg zentrifugiert und der selbstformende Gradient in Fraktionen von 750 μ L von oben abgenommen. Die Proben wurden mit 50 μ L 16 % Triton X-100 lysiert und das Percoll bei 100.000 xg für 50 min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die β -Hexosaminidase-Aktivität sowie die Proteinkonzentration bestimmt (A). 100 μ L der Fraktionen und des 1:2-verdünnten PNS wurden zur SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit dem Plbd2-66G9-Antikörper (B), einem Rab5a-Antikörper (C) als Marker für frühe Endosomen und einem Lamp1-Antikörper (D) als Marker für Lysosomen.

Im folgenden sollten WT-MEFs und MEFs mit Sortierungs-Defekten (MPR-defiziente MEFs und MLII-MEFs) hinsichtlich der Verteilung der Plbd2-Fragmente verglichen werden (Abbildung 40 - Abbildung 42). In WT-MEF waren (Abbildung 40B), im Gegensatz zu den NIH-3T3-Fibroblasten, die Signale des Pro-Plbd2 im PNS sowie in den Fraktionen F11 und F12 deutlich stärker als die α - und β 2-Fragmentbanden. In den Fraktionen der höchsten spezifischen β -Hexosaminidase (β -Hex)-

Aktivität (F11, $189 \text{ mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ und F12, $284 \text{ mU}\cdot\text{mg}^{-1}$) konnte auch das stärkste Signal des lysosomalen Membranproteins Lamp1 nachgewiesen werden (Abbildung 40D). Die murenen α - und β 2-Fragmentbanden konnten nur in diesen beiden Fraktionen detektiert werden. Mit dem Rab5a-Antikörper konnten die deutlichsten Banden in F1 und F11 detektiert werden. Das Auftreten des stärksten Rab5a-Signals und der hohen β -Hex-Aktivität in F11 könnte bedeuten, dass diese Fraktion sowohl Lysosomen als auch frühe Endosomen einschloss, was den hohen Anteil an Pro-Plbd2 gegenüber der Fraktion F12 in NIH-3T3-Fibroblasten (Abbildung 39B) erklären könnte.

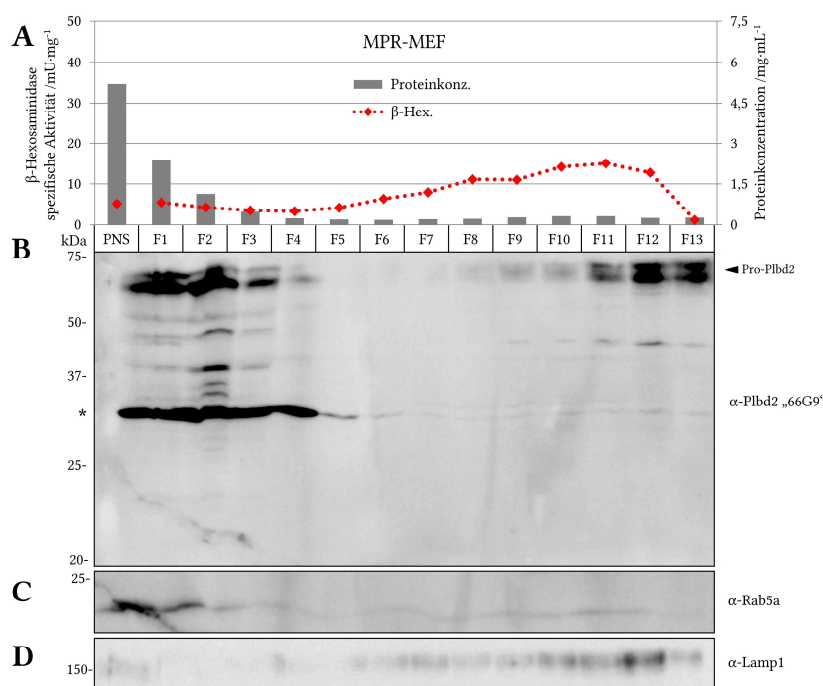


Abbildung 41: Western-Blot von MPR-MEF-Zellen nach Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation.

MPR-defiziente Fibroblasten (MPR-MEF) wurden geerntet und mit einer 26 Gauge Kanüle aufgeschlossen. Durch differentielle Zentrifugation wurde ein Postnukleärer Überstand (PNS) hergestellt und 1 mL des PNS auf 8,5 mL 20 % Percoll™ geladen. Die Probe wurde 45 min bei 40.500 xg zentrifugiert und der selbstformende Gradient in Fraktionen von $750 \mu\text{L}$ von oben abgenommen. Die Proben wurden mit $50 \mu\text{L}$ 16 % Triton X-100 lysiert und das Percoll bei 100.000 xg für 50 min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die β -Hexosaminidase-Aktivität sowie die Proteinkonzentration bestimmt (A). $100 \mu\text{L}$ der Fraktionen und des 1:2-verdünnten PNS wurden zur SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit dem Plbd2-66G9-Antikörper (B), einem Rab5a-Antikörper (C) als Marker für frühe Endosomen und einem Lamp1-Antikörper (D) als Marker für Lysosomen.

In den MPR-MEFs konnte nur eine geringe β -Hex-Aktivität gemessen werden, die sich im Percoll-Gradienten auf mehrere Fraktionen verteilte (Abbildung 41A) und etwa 20-fach geringer war als in MEF-WT. Es konnte gezeigt werden, dass die β -Hexosaminidase in MEFs zu großen Teilen M6P-abhängig transportiert wird (Markmann *et al.*, 2015), die Verteilung im Percoll-Gradienten spiegelt somit nicht die Position der Lysosomen wieder. Es wurde deshalb das Membranprotein Lamp1 als lysosomaler Marker verwendet, das besonders in F11 und F12 detektiert werden konnte (Abbildung 41D).

In den Lamp1-positiven Fraktionen war das Pro-Plbd2 als Doppelbande nachzuweisen, es konnten jedoch keine Fragmente der maturen Form detektiert werden (Abbildung 41B). Das Signal des Plbd2 in Abbildung 41B korrelierte in F11 – F13 deutlich besser mit dem Lamp1-Signal (Abbildung 41D) als mit der β -Hex-Aktivität die sich über mehrere Fraktionen verteilte. Das Plbd2 scheint somit trotz des Fehlens der M6P-Rezeptoren spezifischer in ein Lamp1-positives Endo-lysosomales Kompartiment sortiert zu werden als die β -Hexosaminidase. Eine Prozessierung des Plbd2 findet jedoch nicht statt.

Das Signal des Rab5a war in F1 und F2 deutlich zu erkennen, in den übrigen Fraktionen trat nur eine schwache Bande auf (Abbildung 41C). Die im Vergleich zu MEF-WT und NIH-3T3-Fibroblasten weniger eindeutige Lokalisation war möglicherweise auf eine veränderte Dichte der Organellen durch den MPR-Defekt zurückzuführen, bei dem Speichermaterial akkumuliert (Dittmer *et al.*, 1999).

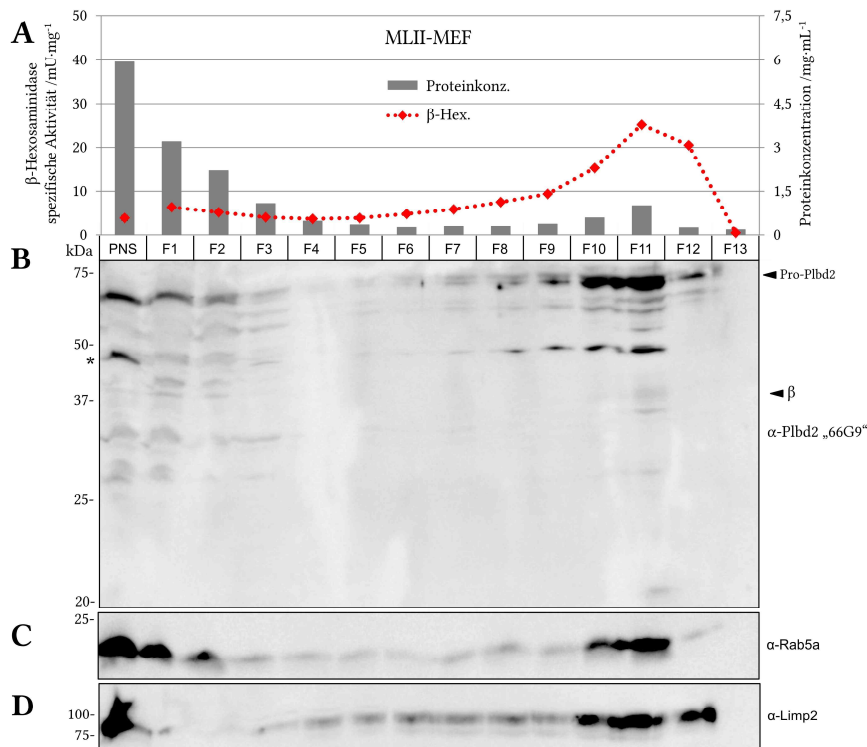


Abbildung 42: Western-Blot von MLII-MEF-Zellen nach Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation.

Fibroblasten defizient für die GlcNAc-1-Phosphotransferase (MLII-MEF) wurden geerntet und mit einer 26 Gauge Kanüle aufgeschlossen. Durch differentielle Zentrifugation wurde ein Postnukleärer Überstand (PNS) hergestellt 1 mL des PNS auf 8,5 mL 20 % Percoll™ geladen. Die Probe wurde 45 min bei 40.500 xg zentrifugiert und der selbstformende Gradient in Fraktionen von 750 μ L von oben abgenommen. Die Proben wurden mit 50 μ L 16 % Triton X-100 lysiert und das Percoll bei 100.000 xg für 50 min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die β -Hexosaminidase-Aktivität sowie die Proteinkonzentration bestimmt (A). 100 μ L der Fraktionen und des 1:2-verdünnten PNS wurden zur SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit dem Plbd2-66G9-Antikörper (B), einem Rab5a-Antikörper (C) als Marker für frühe Endosomen und einem Lamp1-Antikörper (D) als Marker für Lysosomen.

In den MLII-Zellen (Abbildung 42), die einen Defekt der GlcNAc-1-Phosphotransferase tragen, war die spezifische β -Hex-Aktivität vorwiegend in den Fraktionen F10 – F12 zu finden und weniger breit verteilt als in MPR-MEFs (Abbildung 41A). Im Vergleich zu MEF-WT war die spezifische Aktivität etwa um Faktor 10 geringer. Das lysosomale Membranprotein Limp2 (als Alternative zu Lamp1) war am stärksten in den Fraktionen F10 – F12 zu detektieren (Abbildung 42D). Das Signal des endosomalen Markerproteins Rab5a (Abbildung 42C) war in Fraktion F10 und F11 als auch F1 und F2 mit einer deutlichen Bande zu detektieren. Da die Verteilung von β -Hexosaminidase und Rab5a vergleichbar mit der Verteilung in MEF-WT war (Abbildung 40), scheint das endo-lysosomale System weniger stark verändert zu sein als in MPR-MEF. Das Signal des Pro-Plbd2 bei 70 kDa war am stärksten in Fraktion F10 und F11 zu detektieren (Abbildung 42B). In Fraktion F11 war die Bande des β -Intermediates schwach zu erkennen, die Banden der maturen α - und β 2-Fragmente waren nicht zu detektieren.

Mittels Dichtegradienten-Zentrifugation konnte gezeigt werden, dass das Pro-Plbd2 auch in Zellen mit Defekten im M6P-Transportweg in Fraktionen mit den lysosomalen Membranproteinen Lamp1 oder Limp2 nachgewiesen werden kann. Die β -Hex-Aktivität eignet sich in den MEFs mit M6P-Sortierungsdefekten nicht als lysosomaler Marker, da das Enzym M6P-abhängig transportiert wird. Plbd2 korreliert in MPR- und MLII-MEFs besser mit den lysosomalen Membranproteinen als die β -Hex-Aktivität, das Plbd2 scheint somit weniger abhängig vom M6P-Weg zu sein als die β -Hexosaminidase. Das vollständige (MPR-MEF) bzw. weitgehende (MLII-MEF) Ausbleiben der Prozessierung des Pro-Plbd2 liegt möglicherweise an veränderten physiologischen Bedingungen im Lysosom oder an der Fehlsortierung von Proteasen, die für die Prozessierung relevant sind.

In der indirekten Immunfluoreszenz konnte in MPR-MEFs, nicht jedoch in MLII-MEFs eine Kolokalisation von Plbd2 mit dem lysosomalen Membranprotein Lamp1 gezeigt werden. In der Dichtegradienten-Zentrifugation konnte die Lokalisation des Pro-Plbd2 in einer Lamp1-positiven Fraktion in beiden Zelllinien bestätigt werden, eine Prozessierung des Proteins in die maturen α - und β -Fragment konnte jedoch nicht gezeigt werden.

4.4 Erzeugung von Plbd1- und Plbd2-*knockout*-Mausmodellen

Die Expression des Plbd2 konnte in diversen Zelltypen und murinen Organen gezeigt werden (Hohensee, 2008), während eine physiologische Funktion wurde bisher nicht beschrieben werden konnte. Das Plbd2 konnte ebenso wie das homologe Protein Plbd1 (35 % Sequenzidentität, 51 % Homologie) anhand der Strukturhomologie zur Klasse der N-terminal nukleophilen (Ntn) Hydrolasen zugeordnet werden, zu denen auch die lysosomalen Hydrolasen Aspartyl-Glucosaminidase (Aga), saure Ceramidase (Ac) und die *N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase* (Naaa) gezählt werden. Defekte der Aga oder Ac führen im Mausmodell zu den lysosomalen Speichererkrankungen Aspartyl-Glukosaminurie (Ikonen *et al.*, 1993) bzw. Morbus Farber (Park, Schuchman, 2006), Mutationen der Naaa werden mit inflammatorischer Fehlregulation (Petrosino *et al.*, 2017) und Kolitis in Verbindung gebracht (Alhouayek *et al.*, 2015). Um die physiologischer Relevanz von Plbd2 und Plbd1 einzuordnen, sollten die entsprechenden Gene in einem *knockout*-Mausmodell inaktiviert werden. Aus etwaigen zellulären Veränderungen sollte in einem revers-genetischen Ansatz auf die Funktion der Proteine geschlossen werden.

Bereits in Vorarbeiten wurde durch virale Insertion in das Gen des Plbd2 ein *GeneTrap*-Mausmodell erzeugt, in dem statt der Plbd2-Exons 7 – 12 eine Neomycin-Phosphotransferase (NeoPT)-Insertionskassette transkribiert werden sollte. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Splice-Akzeptor-Stelle der NeoPT übersprungen werden kann und somit ein vollständiges Transkript des Plbd2-Gens hergestellt wurde (Hohensee, 2008). Im erzeugten *GeneTrap*-Mausmodell war weiterhin Plbd2 nachweisbar, eine phänotypische Veränderung konnte nicht festgestellt werden.

Um ein Mausmodell zu erzeugen, in dem die Expression des Plbd2 reprimiert wird, wurde das CRISPR-Cas9-System verwendet, bei der eine prokaryotische Endonuklease zum editieren von Genen eingesetzt wird. Es wurden geeignete Guide-RNAs (sgRNA) ausgewählt, in ein CRISPR-Cas9-Expressionsplasmid kloniert, die Mutationsrate in Zellkultur geprüft und Guide-RNAs zur Injektion in befruchtete, murine Eizellen ausgewählt.

4.4.1 Klonierung und Validierung von Guide-RNAs in Zellkultur

Um Guide-RNAs zu identifizieren, die an einem PAM-Motiv von Plbd1 und Plbd2 liegen und mit möglichst geringer Wahrscheinlichkeit andere Genabschnitte (*offtargets*) binden, wurde ein Online-Tool zur Bestimmung von Guide-RNAs verwendet (Zhang Lab, MIT; Hsu *et al.*, 2013). Die Sequenzen der ausgewählten 20 nt Guide-RNAs mit den PAM-Motiven sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Sequenzen der CRISPR-Guide-RNA Inserts Plbd1-A und -B sowie Plbd2-A, -B und -C.

Dargestellt sind die Sequenzen der CRISPR-Guide-RNA Inserts wie durch das Online-Tool des Zhang-Lab bestimmt. Die Qualität errechnet sich durch die Anzahl und Bindungswahrscheinlichkeit der Offtargets, wobei die Position und Anzahl der Fehlpaarungen berücksichtigt wird. Die Position der Schnittstelle im codierenden Bereich der mRNA ist angegeben sowie in Klammern die Position im Genom mit der Bindungsorientierung (+ = sense, - = antisense).

Plbd1-GuideA:	TTCCACTTTCTTCGATTCAG-GGG
Qualität:	81 %
Schnittstelle nach Startcodon:	148 (Exon 2, chr6:-136.651.980)
Offtargets (in Exons):	216 (15)
Plbd1-GuideB:	GACAAGAATGGGGACGCCTA-CGG
Qualität:	88 %
Schnittstelle nach Startcodon:	203 (Exon 2, chr6:+136.652.035)
Offtargets (in Exons):	110 (10)
Plbd2-GuideA:	AGACCGCGGGTCCGGATT-TGG
Qualität:	99 %
Schnittstelle nach Startcodon:	170 nt (Exon 1, chr5:-120.503.545)
Offtargets (in Exons):	10 (3)
Plbd2-GuideB:	CTGCTGCTGGACGCCGCGTC-GGG
Qualität:	95 %
Schnittstelle nach Startcodon:	224 nt (Exon 1, chr5:-120.503.599)
Offtargets (in Exons):	76 (30)
Plbd2-GuideC:	GGATGGCTTCCACCCGACG-CGG
Qualität:	93 %
Schnittstelle nach Startcodon:	262 nt (Exon 1, chr5:+120.503.637)
Offtargets (in Exons):	62 (23)

Zur Kontrolle der Mutationseffizienz in Zellkultur wurden die ausgewählten Guide-RNAs über eine BbsI-Restriktionsschnittstelle in den Vektor pSpCas9(BB)-2A-Puro (Addgene PX459, v1.0) kloniert. Bei Verdau mit der TypII-S-Restriktions-Endonuklease BbsI entstanden im Vektor 5'-Überhänge von vier Nukleotiden 5'-GTTT-3' im sense-Strang und 5'-GGTG-3' im antisense-Strang. Zur Klonierung wurde das Insert entsprechend mit komplementären 5'-Überhängen ausgestattet. Als Transkriptionsstart für den im Plasmid verwendeten U6-Promotor fungiert ein Guanin-Nukleotid, das eingefügt werden musste, sofern es nicht in der Sequenz des Inserts vorhanden war (Goemer, Kunkel, 1992). Das verwendete Insert und die Klonierungsstelle nach BbsI-Verdau ist beispielhaft für den Plbd1 Guide A in Abbildung 43 gezeigt.

<u>Vektor</u>	<u>20 nt Guide-Sequenz</u>	<u>Vektor</u>
...CGAAA-3'	5'-CACC G TTCCACTTTCTTCGATTCAG-3'	5'-GTTTTAGAG...
...GCTTTGTGG-5'	3'-CAAGGTGAAAGAAGCTAAGTCCAAA-5'	3'-ATCTC...

Abbildung 43: Sequenz des Plbd1-Guide A Inserts.

Schematisch dargestellt ist die Sequenz der Restriktionsschnittstelle im Vektor PX459 nach Verdau mit BbsI sowie die Sequenz des Inserts von Plbd1 Guide A. Neben der 20 nt Guidesequenz sind die 5'-Überhänge in Blau und das für den Transkriptionsstart benötigte Guanin in Rot dargestellt.

Als technische Kontrolle für die Erzeugung von Mutationen in Zellkultur wurde eine Guide-RNA verwendet, die bereits erfolgreich in Zellkultur verwendet wurde. Mit der in Tabelle 21 aufgeführten Guide-RNA die im Exon 1 des Tet2-Gens bindet, konnte in ES-Zellen eine Mutationsrate von 48 % erreicht werden (Wang, Yang, Shivalila, Cheng, *et al.*, 2013).

Tabelle 21: Sequenz des CRISPR-Guide-RNA Inserts Tet2.

Dargestellt ist die Sequenz des CRISPR-Guide-RNA Inserts gegen Tet2, das bereits in Zellkultur verwendet wurde (Yang *et al.*, 2013). Die Qualität wurde durch das Online-Tool des Zhang-Lab bestimmt. Die Qualität errechnet sich durch die Anzahl und Bindungswahrscheinlichkeit der Offtargets, wobei die Position und Anzahl der Fehlpaarungen berücksichtigt wird. Die Position der Schnittstelle im codierenden Bereich der mRNA ist angegeben sowie in Klammern die Position im Genom mit der Bindungsorientierung (+ = sense, - = antisense).

Tet2-GuideA:	GAAAGTGCCAACAGATATCC-AGG
Qualität:	69 %
Schnittstelle nach Startcodon:	3016 (Exon 1, chr3:+133.485.368)
Offtargets (in Exons):	212 (15)

Das Tet2-Insert wurde über die BbsI-Restriktionsschnittstelle in den Vektor PX459 kloniert, um das sgRNA-Cas9-Expressionskonstrukt PX459-Tet2 zu erzeugen. Das Plasmid wurde in N2a-Zellen transfiziert, die Zellen nach 24 Stunden geerntet und die genomische DNA extrahiert. Ein 466 bp großer Bereich um die Bindestelle der Tet2-Guide-RNA wurde über PCR amplifiziert und durch Erhitzen und langsames Abkühlen des PCR-Produkts ein *reannealing* durchgeführt. Die Amplifikate wurden mit T7-Endonuklease I (T7EN) verdaut und über ein Agarosegel analysiert. Die T7EN spaltet doppelsträngige DNA, in der nach dem *reannealing* eine Fehlpaarung der Basenpaare auftritt. Wie in Abbildung 44 zu erkennen ist, traten Spaltprodukte des PCR-Amplikons nach T7EN-Verdau (+) nur bei PX459-Tet2-transfizierten Zellen auf, während in WT-Zellen keine Spaltprodukte zu erkennen waren. Es konnten somit Mutationen im Gen des Tet2 erzeugt werden. Der Anteil der geschnittenen DNA betrug $f_{\text{cut}} = 24 \%$, unter Berücksichtigung der Transfektionseffizienz, die durch die Transfektion eines GFP-Expressionsplasmids bestimmt wurde, ergab sich damit eine Mutationsrate (InDel-Rate) von 21 %.

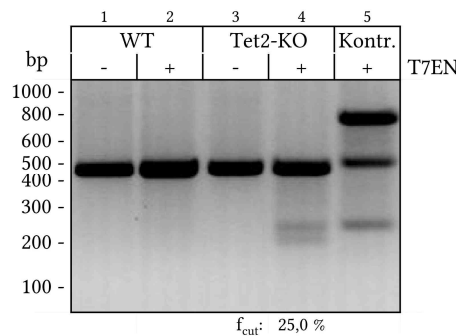


Abbildung 44: Agarosegel des T7EN-Verdau von PX459-Tet2 transfizierten N2a-Zellen.

N2a Zellen wurden mit dem Expressionskonstrukt PX459-Tet2 transfiziert, die Zellen nach 24 h geerntet, die genomische DNA extrahiert und ein 466 bp großer Abschnitt des Tet2-Gens amplifiziert. 300 ng des Amplifikats von untransfizierten und PX459-Tet2 transfizierten Zellen wurde 90 min bei 37 °C mit T7EN (+) oder nur Puffer (-) inkubiert. Die Proben wurden mit einer technischen Kontrolle für die Funktionalität der T7EN im Agarosegel analysiert. Unter Berücksichtigung einer Transfektionseffizienz von 62 % ergibt sich eine InDel-Rate der PX459-Tet2 transfizierten Zellen von 21 %.

Nachdem die Erzeugung von Mutationen durch CRISPR-Cas9 in Zellkultur technisch etabliert wurde, konnte die Effizienz der erstellten Plbd1- und Plbd2-Guide-RNAs untersucht werden. Dazu wurden N2a-Zellen mit den erzeugten CRISPR-Expressionskonstrukten transfiziert, die Zellen nach 24 h geerntet und die genomische DNA isoliert. Die relevanten Genabschnitte wurden über PCR amplifiziert, nach einem *reannealing* mit T7EN verdaut und über ein Agarosegel analysiert (Abbildung 45). Neben den Banden der PCR-Amplifikate waren in einigen Fraktionen nach Inkubation mit T7EN Spaltprodukte zu detektieren. Eine Spaltung war bei der Transfektion von Plbd1-GuideB (27,0 % InDel), Plbd2-GuideB (45,1 % InDel) und Plbd2-GuideC (20,9 % InDel) zu erkennen.

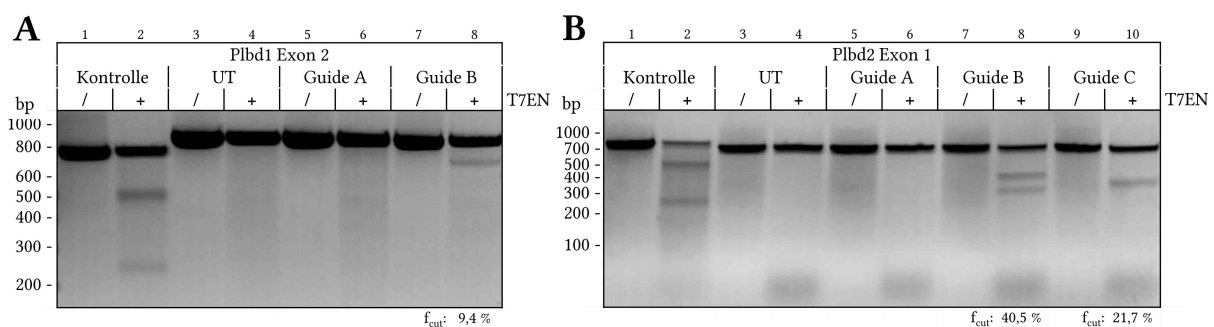


Abbildung 45: Agarosegel des T7EN-Verdau von N2a-Zellen nach Transfektion mit CRISPR-Expressionskonstrukten.

N2a-Zellen wurden mit den Expressionskonstrukten PX459-Plbd1-GuideA, PX459-Plbd1-GuideB, PX459-Plbd2-GuideA oder PX459-Plbd2-GuideB transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, die genomische DNA extrahiert und ein 866 bp (Plbd1, A) bzw. 693 bp (Plbd2, B) großer Abschnitt der Gene amplifiziert. 300 ng des Amplifikats von untransfizierten und transfizierten Zellen wurde 90 min bei 37 °C mit T7EN (+) oder nur Puffer (/) inkubiert. Die Proben wurden mit einer technischen Kontrolle für die Funktionalität der T7EN im Agarosegel analysiert. Unter Berücksichtigung einer Transfektionseffizienz von 26 % (Plbd1) bzw. 58 % (Plbd2) ergeben sich InDel-Raten von 27 % (Plbd1-GuideB), 45,1 % (Plbd2-Guide B) und 20,9 % (Plbd2-Guide C).

Für die Erstellung der Plbd1- und Plbd2-knockout Mausmodelle wurden die CRISPR-Konstrukte Plbd1-GuideB und Plbd2-GuideB ausgewählt. Während in den Vorversuchen in Zellkultur der NHEJ-Reparaturmechanismus adressiert wurde, sollte zur Anwendung in der Maus zudem die Doppelstrangbruch-Reparatur über HDR genutzt werden (Abschnitt 1.3). Anhand von *repair-templates* sollte ein artifizielles Stoppcodon und eine Restriktionsschnittstelle zur vereinfachten Genotypisierung der Maus-Linien eingeführt werden. Es wurden einzelsträngige Oligodesoxynukleotid (ssODN)-*repair-templates* verwendet, die an der vorausgesagten Schnittstelle vor dem PAM-Motiv das Stoppcodon TGA und die XbaI-Schnittstelle TCTAGA tragen. Um ein 90-Nukleotide ssODN zu erhalten (Wang, Yang, Shivalila, Cheng, *et al.*, 2013), wurden Homologie-Arme von 40 Nukleotiden und einer zusätzlichen Base an der XbaI-Schnittstelle verwendet (Sequenzen siehe Abschnitt 2.7.5). Damit ein über das *repair-template* korrigiertes Allel nicht erneut durch die Cas9-Endonuklease geschnitten werden konnte, wurde das PAM-Motiv in den ssODN zudem durch Mutationen der Guanin-Nukleotide verändert.

N2a-Zellen wurden mit den Expressionskonstrukten PX459-Plbd1-GuideB oder PX459-Plbd2-GuideB sowie dem zugehörigen *repair-template* transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die genomische DNA isoliert, die relevanten genomischen Abschnitte wurden über PCR amplifiziert und mit XbaI verdaut, um eine Integration der *repair-templates* nachzuweisen. Die Mutationsrate wurde nach einem *reannealing* über den Verdau mit T7EN und anschließender Agarose-Gelelektrophorese bestimmt (Abbildung 46).

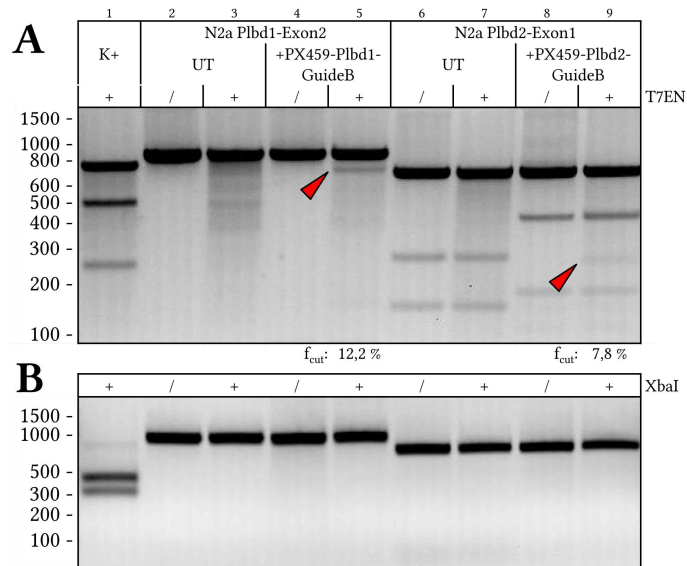


Abbildung 46: Agarosegel des XbaI- und T7EN-Verdau von N2a-Zellen nach Transfektion mit CRISPR-Expressionskonstrukten.

N2a-Zellen (300.000 Zellen) wurden mit 1 µg der Expressionskonstrukte PX459-Plbd1-GuideB oder PX459-Plbd2-GuideB sowie 0,5 nmol der jeweiligen *repair-templates* transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, die genomische DNA extrahiert und ein 866 bp (Plbd1) bzw. 693 bp (Plbd2) großer Abschnitt der Gene amplifiziert. 300 ng des Amplifikats wurde 90 min bei 37 °C mit XbaI oder T7EN (+) oder nur Puffer (/) inkubiert. Die Proben wurden mit einer technischen Kontrolle für die Funktionalität des XbaI (B) und der T7EN (A) im Agarosegel analysiert. Durch die T7EN erzeugte Fragmentbanden sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Unter Berücksichtigung einer Transfektionseffizienz von 25,9 % ergibt sich eine InDel-Rate von 27,2 % (Plbd1-GuideB) bzw. 16,5 % (Plbd2-GuideB) der transfizierten Zellen.

Nach dem Verdau von untransfizierten (UT) N2a-Zellen waren im Vergleich zu unbehandelten Zellen keine neuen distinkten Banden zu erkennen (Abbildung 46A, Lane 2, 3 und 6, 7). Das Muster schwacher Banden unterhalb der deutlichen Bande in Lane 3 und 7 war auf den Abbau der Amplifikate mit zufälligen Mutationen durch die T7EN zurückzuführen, die durch die fehlende Korrektur-Lesefunktion der verwendeten Taq-Polymerase entstanden waren. Nach T7EN-Verdau der Amplikons aus PX459-Plbd1-GuideB und PX459-Plbd2-GuideB transfizierten Zellen, konnten wie zuvor Spaltprodukte identifiziert werden, die auf Mutationen der genomischen DNA hindeuten. Bei Verdau der Amplikons mit XbaI traten keine Spaltprodukte auf (Abbildung 46B). Die eingesetzten *repair-templates* wurden demnach nicht, oder nur zu einem nicht detektierbaren Anteil zur Reparatur der induzierten Doppelstrangbrüche genutzt.

Als weitere Variante sollte mit einem CRISPR-Guide ein Doppelstrangbruch im Bereich des aktiven Zentrums des Plbd2 eingeführt werden, der mit einem *repair-template* zu einer Mutation des katalytischen Cystein249 führt. Die möglichen Guide-RNAs wurden wie zuvor mit einem Online-Tool bestimmt (Zhang Lab, MIT; Hsu *et al.*, 2013), die ausgewählten Plbd2-GuideD und -GuideE sind in Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 22: Sequenzen der CRISPR-Guide-RNA Inserts Plbd2-D und -E.

Dargestellt sind die Sequenzen der CRISPR-Guide-RNA Inserts wie durch das Online-Tool des Zhang-Lab bestimmt. Die Qualität errechnet sich durch die Anzahl und Bindungswahrscheinlichkeit der Offtargets, wobei die Position und Anzahl der Fehlpaarungen berücksichtigt wird. Die Position der Schnittstelle im codierenden Bereich der mRNA ist angegeben sowie in Klammern die Position im Genom mit der Bindungsorientierung (+ = sense, - = antisense).

Plbd1-GuideD:	CGCCAGGCAGCAGCTTGATG-AGG
Qualität:	71 %
Schnittstelle nach Startcodon:	755 (Exon 5, chr5:-120.492.783)
Offtargets (in Exons):	172 (28)
Plbd1-GuideE:	GATGAGGGCAGAGCATGAAC-CGG
Qualität:	57 %
Schnittstelle nach Startcodon:	739 (Exon 5, chr5:-120.492.767)
Offtargets (in Exons):	341 (32)

Es wurde ein *repair-template* erstellt, in dem die für das Cystein249 codierenden Nukleotide TGC durch GCC ersetzt wurden, wodurch ein Alanin codiert wird. Die PAM-Motive wurden durch stille Mutationen inaktiviert und Homologie-Arme von 43 bzw. 44 Nukleotiden gewählt, um ein 90-Nukleotid ssODN zu erhalten. Durch die eingeführten Mutationen entsteht eine Restriktionsschnittstelle für die Endonuklease AlwNI, die zur Genotypisierung genutzt werden sollte. Die Guide-RNAs wurden wie beschrieben über die BbsI-Schnittstelle in den Expressionsvektor PX459 kloniert und die Mutationsrate in Zellkultur bestimmt (Abbildung 47).

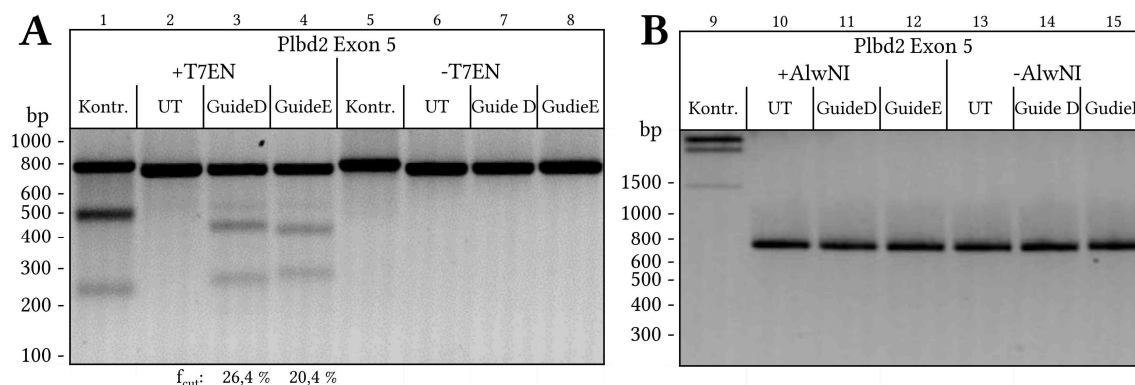


Abbildung 47: Agarosegel des AlwNI- und T7EN-Verdaus von N2a-Zellen nach Transfektion mit CRISPR-Expressionskonstrukten.

N2a-Zellen (300.000 Zellen) wurden mit 1 μ g der Expressionskonstrukte PX459-Plbd2-GuideD oder PX459-Plbd2-GuideE sowie 0,5 nmol des *repair-templates* transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, die genomische DNA extrahiert und ein 723 bp großer Abschnitt der Gene amplifiziert. 300 ng des Amplifikats von untransfizierten und transfizierten Zellen wurde 90 min bei 37 °C mit AlwNI oder T7EN (+) oder nur Puffer (-) inkubiert. Die Proben wurden mit einer technischen Kontrolle für die Funktionalität des AlwNI (B) und der T7EN (A) im Agarosegel analysiert. Unter Berücksichtigung einer Transfektionseffizienz von 26 % ergeben sich InDel-Raten von 28,2 % (Guide D) und 26,2 % (Guide E).

Nach der Transfektion von N2a-Zellen mit den Expressionskonstrukten PX459-Plbd2-GuideD und PX459-Plbd2-GuideE, wurde genomische DNA extrahiert, der relevante Genabschnitt des Exon 5 durch PCR amplifiziert und die PCR-Produkte nach *reannealing* mit T7EN verdaut (Abbildung 47A). Der Anteil geschnittener DNA lag bei $f_{\text{cut}} = 26,4\%$ bzw. $20,4\%$, was unter Berücksichtigung einer Transfektionseffizienz von 26% einer Mutationsrate von $28,2\%$ (Guide D) bzw. $26,2\%$ (Guide E) entspricht. Bei dem Verdau der PCR-Amplifikate mit AlwNI (Abbildung 47B) konnten keine Spaltprodukte detektiert werden. Die eingesetzten *repair-templates* wurden demnach nicht, oder nur zu geringem Teil genutzt.

Während mit zwei der erstellten Guide-RNAs keine Mutationen in N2a-Zellen erzeugt werden konnten (Plbd1-GuideA und Plbd2-GuideB), wiesen die übrigen untersuchten Guide-RNAs vergleichbare Mutationsraten (InDel-Raten) auf (Plbd1: GuideB 27% , Plbd2: GuideB: $45,1\%$, GuideC $20,9\%$, GuideD $28,2\%$, GuideE $26,2\%$). Die verwendeten *repair-templates* wurden in keinem der Ansätze effizient genutzt, was möglicherweise auf einen sehr geringen Anteil der HDR an der Doppelstrangbruch-Reparatur in N2a-Zellen zurückzuführen ist.

4.4.2 Isolierung von putativ mutierten Zellklonen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass mit den ausgewählten CRISPR-Guide-RNAs Mutationen in Zellkultur eingefügt werden können, sollten aus einer transfizierten Zellpopulation Einzelklone isoliert werden. Dabei sollte überprüft werden, ob die Mutation auf allen Allelen vorlag oder ob WT-Allele erhalten blieben.

N2a Zellen wurden mit den Expressionskonstrukten PX459-Plbd1-GuideB oder PX459-Plbd2-GuideB sowie dem zugehörigen *repair-template* transfiziert. Um den Anteil der untransfizierten Zellen zu reduzieren, wurden die Zellen mit $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin selektioniert. Nach dreitägiger Selektion wurden die transfizierten N2a-Zellen verdünnt und in 96-*well*-Platten ausgesät, sodass rechnerisch $0,5$ Zellen pro *well* erhalten wurden. Nach etwa 7 Tagen wurden *wells* mit einzelnen Klonen markiert und die Klone nach weiteren 10 Tagen expandiert. Etwa die Hälfte der Zellen wurde lysiert, die genomische DNA isoliert und die adressierten Genabschnitte über PCR amplifiziert. Durch Verdau mit XbaI wurde auf eine Integration des *repair-templates* getestet, die Mutationsrate wurde mittels T7EN-Verdau bestimmt. Die verdauten Amplifikate wurden über Agarose-Gelelektrophorese untersucht (Abbildung 48).

Aus den Plbd1-GuideB und Plbd2-GuideB transfizierten N2a-Zellen konnten 13 (Plbd1) bzw. 12 (Plbd2) Einzelklone isoliert und vermehrt werden. In Abbildung 48 ist die Analyse einiger Klone dargestellt. Von den 13 Plbd1-*knockout*-Klonen wiesen 7 nach dem Verdau der PCR-Amplifikate mit

T7EN eine Bande bei etwa 700 bp auf, die bei der Behandlung der WT-Zellen nicht entstand. Der Anteil der durch die T7EN-Spaltung entstandenen Bande an der Gesamtintensität lag zwischen $f_{\text{cut}} = 18\%$ und $f_{\text{cut}} = 39\%$. Die partielle Polyploidie der N2a-Zelllinie (American Type Culture Collection ATCC, Manassas, Virginia) erschwerte die Genotypisierung der isolierten Einzelklone und reduzierte die Wahrscheinlichkeit eines vollständigen *knockouts* der adressierten Gene. Die PCR-Amplikons der Klone 1, 4 und 6 wurden sequenziert, wobei Sequenzüberlagerungen von mindestens drei unterschiedlichen Allelen festgestellt wurden (siehe Anhang).

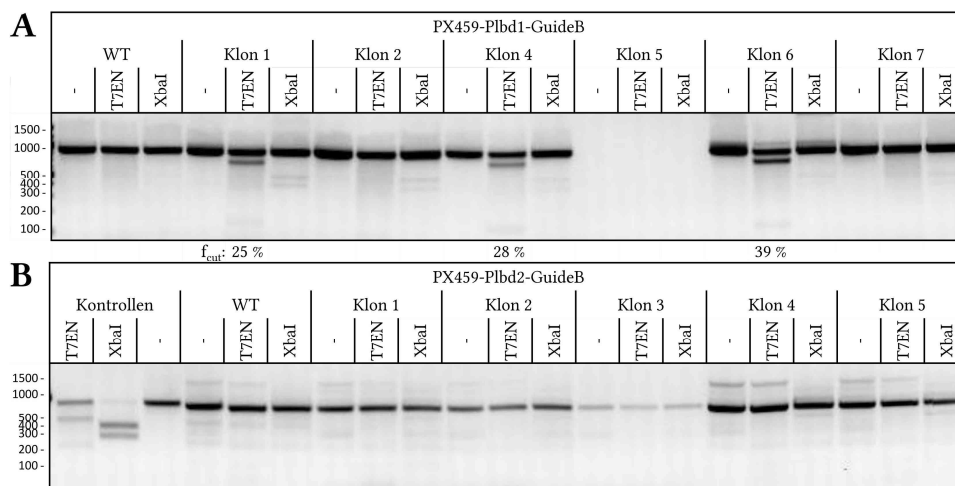


Abbildung 48: Agarosegele von N2a-Einzelklonen transfiziert mit CRISPR-Guides nach T7EN und XbaI Verdau. N2a-Zellen (300.000 Zellen) wurden mit $1\ \mu\text{g}$ der Expressionskonstrukte PX459-Plbd1-GuideB oder PX459-Plbd2-GuideB sowie $0,5\ \text{nmol}$ der jeweiligen *repair-templates* transfiziert. Die Zellen wurden in 96-well-Platten verdünnt und Einzelklone isoliert. Die Zellen wurden geerntet, die genomische DNA extrahiert und ein $866\ \text{bp}$ (Plbd1, A) bzw. $693\ \text{bp}$ (Plbd2, B) großer Abschnitt der Gene amplifiziert. $300\ \text{ng}$ des Amplifikats wurde $90\ \text{min}$ bei $37\ ^\circ\text{C}$ mit XbaI oder T7EN (+) oder nur Puffer (-) inkubiert. Die Proben wurden mit einer technischen Kontrolle für die Funktionalität des XbaI und der T7EN im Agarosegel analysiert.

Bei dem Verdau der PCR-Amplikons aus PX459-Plbd1-GuideB transfizierten N2a-Zellen mit XbaI (Abbildung 48A), waren bei einigen Klonen schwache Banden bei etwa $350\ \text{bp}$ und $450\ \text{bp}$ zu erkennen, die bei Verdau des WT-PCR-Amplikons nicht auftraten. Sollte das verwendete *repair-template* wie beabsichtigt im Zielbereich in die genomische DNA integriert worden sein, wären Fragmente von etwa $700\ \text{bp}$ und $170\ \text{bp}$ entstanden, wie diese auch bei dem Verdau mit T7EN auftraten. Bei dem Verdau der PCR-Amplikons aus Einzelklonen der mit PX459-Plbd2-GuideB transfizierten Zellen (Abbildung 48C und D) waren keine weiteren Fragmentbanden zu erkennen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Erzeugung von Plbd1-defizienten (*knockout*)-Zelllinien mit dem verwendeten Plbd1-GuideB möglich ist, während das eingesetzte *repair-template* in Zellkultur nicht effizient genutzt zu werden scheint. Um eine Plbd1-*knockout*-Zelllinie zu erzeugen, sollte eine Zelllinie mit stabilem Chromosomensatz und geringerer Polyploidie ausgewählt werden. Einzelklone mit Mutationen im Plbd2-Gen konnten mit dem verwendeten Plbd2-GuideB nicht isoliert werden.

4.4.3 Erzeugung von Plbd1- und Plbd2-defizienten Mausmodellen

Nachdem die Funktionalität der erstellten CRISPR-Guides in Zellkultur gezeigt werden konnte, wurden die Guide-RNAs Plbd1-GuideB und Plbd2-GuideB mit den zugehörigen *repair-templates* für die Erzeugung der *knockout*-Mausmodelle verwendet. Die Guide-RNAs wurden in einen Expressionsvektor kloniert und zur Injektion in murine Zygoten an PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer, ZMNH/UCHE Hamburg geschickt. Von den Tieren, die sich aus den behandelten Zygoten entwickelten, wurde Biopsiematerial entnommen und genotypisiert.

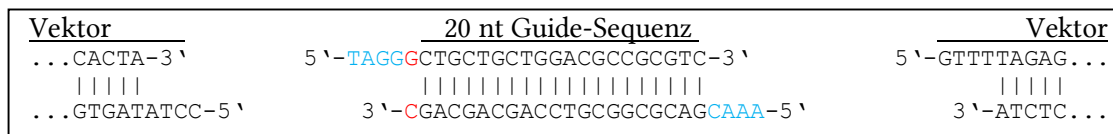


Abbildung 49: Sequenz des Plbd2-GuideB Inserts für den pUC57-Vektor.

Schematisch dargestellt ist die Sequenz der Restriktionsschnittstelle im Vektor pUC57 nach Verdau mit BsaI sowie die Sequenz des Inserts von Plbd2-GuideB. Neben der 20 nt Guidesequenz sind die 5'-Überhänge in Blau und das für den Transkriptionsstart benötigte Guanin in Rot dargestellt.

Während bei der Anwendung der CRISPR-Konstrukte in der Zellkultur ein Plasmid eingesetzt wurde, von dem die mRNA der Cas9-Endonuklease und die *single-guide* (sg)-RNA transkribiert werden konnte, wurde in die Zygote zur Erzeugung der *knockout*-Mausmodelle direkt die entsprechende RNA injiziert. Um die sgRNA *in vitro* zu transkribieren, wurden die ausgewählten Guide-RNAs in einen pUC57-Expressionsvektor (Shen *et al.*, 2014) kloniert, in dem 5' der Guide-RNA eine T7-Promotorsequenz lokalisiert ist. Die Insertion der Guide-RNA vor die tracrRNA im Vektor-Rückgrat erfolgte über BsaI-Schnittstellen, die wie das BbsI im Vektor PX459 5'-Überhänge erzeugte. Um die Guide-RNAs in die Schnittstelle zu klonieren, wurde ein *sense*-Strang mit einem 5'-TAGG-Überhang verwendet. Der *antisense*-Strang musste wie auch im PX459 mit einem 5'-AAAC-Überhang versehen werden. Der Transkriptionsstart des T7-Promotors liegt bei dem ersten Guanin nach der Promotorsequenz (Weston *et al.*, 1997), welches durch den 5'-Überhang im *sense*-Strang gegeben war. Das Anfügen eines zusätzlichen Guanin wäre für die Transkription aus dem pUC57-Vektor somit nicht nötig gewesen, wurde jedoch beibehalten, um die für den PX459-Vektor erstellten antisense-Stränge weiter verwenden zu können. Die Sequenz des geschnittenen pUC57-Vektors und des Inserts sind beispielhaft für Plbd2-GuideB in Abbildung 49 gezeigt.

Die erzeugten Vektoren wurden durch den Kooperationspartner mit DraI linearisiert und über Phenol-Behandlung und DNA-Fällung gereinigt. Die sgRNAs wurde *in vitro* transkribiert und mit *in vitro* transkribierter Cas9-mRNA und den *repair-templates* bei jeweils 10 ng/μL in den Vorkern von befruchteten Oozyten aus C57Bl6/J-Mäusen (Jax Stock 000664) injiziert. Die Oozyten wurden in den Eileiter von scheinsschwangeren Ammentieren transplantiert und ausgetragen. Zur Genotypisierung wurden Schwanzspitzenbiopsien der Tiere nach Bielefeld übersandt.

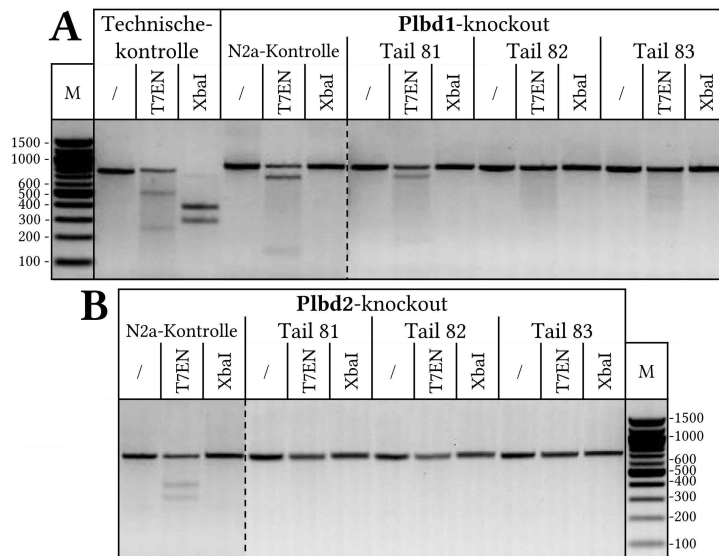


Abbildung 50: Agarosegel der Genotypisierung von putativen Plbd1- und Plbd2-knockout Tieren.

Die genomische DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien (Tail) von drei transgenen Mäusen wurde extrahiert und die relevanten Genbereiche über PCR amplifiziert. 150 ng der Amplifikate wurden mit XbaI oder nach *reannealing* mit T7EN verdaut und über Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Als biologische Kontrolle dienen Amplifikate aus N2a-Zellen, die wie in Abschnitt 4.4.2 beschrieben mit den PX459-Konstrukten transfiziert wurden. Die Abbildungen wurden an den gestrichelten Linien geschnitten.

Da das Auftreten zweier identischer Mutationen auf beiden Allelen bei der Reparatur der induzierten Doppelstrangbrüche durch NHEJ statistisch unwahrscheinlich ist, wurde die Analyse auf zufällige Mutationen durch PCR-Amplifikation der relevanten Genabschnitte und Verdau mit T7EN durchgeführt. Würde ein Allel oder beide Allele Mutationen aufweisen, so sollten sich nach *reannealing* der PCR-Amplifikate Fehlpaarungen bilden, die durch die T7EN geschnitten würden und im Agarosegel nachweisbar wären. Im Fall einer Reparatur anhand injizierter *repair-templates*, könnten über HDR auf beiden Allelen die gleiche Mutation erzeugt werden, die über die eingeführten XbaI-Schnittstellen jedoch ebenfalls identifizierbar wären.

Die Genotypisierung der Tiere Nr. 81, 82 und 83 ist beispielhaft in Abbildung 50 gezeigt. Bei dem Verdau der PCR-Amplifikate des Plbd1-Genabschnittes konnte nach Behandlung mit T7EN für Tail 81 eine Bande nachgewiesen werden (Abbildung 50A), die in unbehandelten Amplifikaten nicht auftrat. Die Bande lag etwa auf derselben Höhe im Agarosegel wie die Bande des Spaltproduktes der biologischen Kontrolle in N2a-Zellen und resultierte somit höchstwahrscheinlich aus einer Mutation in dem mit dem Plbd1-GuideB adressierten Genabschnitt. Wie in Abbildung 50B zu erkennen ist, traten bei dem Verdau der PCR-Amplifikate des Plbd2-Gens neben der ungeschnittenen Bande bei 690 bp keine zusätzlichen Fragmentbanden auf.

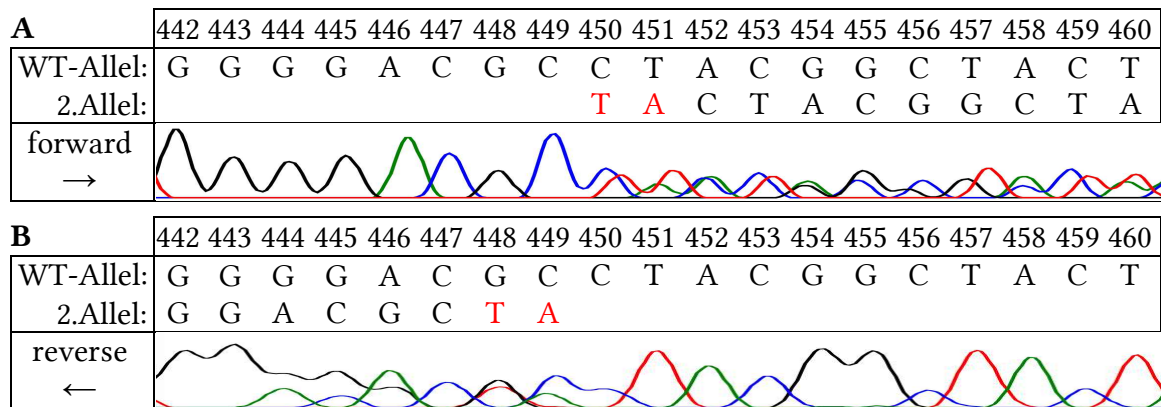


Abbildung 51: Pherogramm der Sequenzierung der Mutation im Plbd1-Tier 81.

Der genomische DNA-Abschnitt im Plbd1-Gen, der von dem erstellten Plbd1-GuideB adressiert wird, wurde aus der Schwanzspitzen-Biopsie des Plbd1-Tier 81 über PCR amplifiziert und mit Primern vom 5'-Ende (forward) oder dem 3'-Ende (reverse) sequenziert (Sequencing Core Facility, CeBiTec, Universität Bielefeld). Die Sequenz eines WT-Allels konnte annotiert werden, die Nummerierung entspricht der Position der Basen in der resultierenden mRNA. In der forward-Sequenz (A) treten ab Base 450 überlagernde Signale auf, in der reverse-Sequenz (B) ab Base 449.

Das PCR-Amplifikat des Plbd1-Genabschnitts von Tier 81 wurde mit Primern vom 5'-Ende (forward) oder dem 3'-Ende (reverse) sequenziert. Die resultierenden Pherogramme und die Zuordnung der Nukleotide sind in Abbildung 51 gezeigt. In den Pherogrammen war die Plbd1-WT-Sequenz zu erkennen, bis in der forward-Sequenzierung ab der Base 450 eine Überlagerung von zwei Signalen auftrat. In der reverse-Sequenzierung trat die Überlagerung ausgehend vom 3'-Ende dem entsprechend ab Base 449 auf. In der Sequenzüberlagerung war neben den Signalen eines WT-Allels die gleiche Sequenz mit einer Verschiebung von zwei Nukleotiden zu erkennen. Die Verschiebung im zweiten Allel resultierte somit aus einer Insertion von zwei Nukleotiden zwischen den Basen 449 und 450, die in der Sequenzierung als zusätzliche Thymin- und Adenin-Basen identifiziert werden konnten. Um die Sequenzierung der einzelnen Allele zu bestätigen, wurden die PCR-Amplifikate in einen pCRII-TOPO-Vektor kloniert, in *E.coli*-DH5 α transformiert und durch Sequenzierung der so isolierten einzelnen Allele die Insertion der TA-Nukleotide bestätigt. Die Insertion von zwei Nukleotiden in Exon 2 des Plbd1-Gens führt bei der Translation der resultierenden mRNA zu einer Verschiebung des Leserasters, die ab Aminosäure 68 nach dem Translationsstart zu *missense*-Mutationen führt und nach weiteren 65 Aminosäuren mit einem artifiziellen Stopcodon in Exon 3 endet.

Nach der Injektion des PX459-Plbd1-GuideB und des PX459-Plbd2-GuideB mit den entsprechenden *repair-templates* in murine Oozyten konnte nur in einem von 83 geborenen Tieren eine Mutation des Plbd1 festgestellt werden, keines der Tiere trug Mutationen im Gen des Plbd2. Um die geringe Effizienz des verwendeten Plbd2-Guides in den Oozyten zu umgehen, wurde auf die übrigen vorhandenen Plbd2-Guides C, D und E zurückgegriffen. Die Guide-RNAs wurden wie zuvor beschrieben in den pUC57-sgRNA-Expressionsvektor kloniert, *in vitro* transkribiert und mit Cas9-

mRNA und dem *repair-template* der Guides D und E in die Vorkerne von befruchteten Oozyten injiziert. Es wurden 13 Tiere geboren und auf Mutationen analysiert (Abbildung 52). Um heterozygote Mutationen nachzuweisen, wurden die PCR-Amplifikate der genomischen Bereiche mit T7EN verdaut. Damit auch homozygote Mutationen nachgewiesen werden können, die möglicherweise durch die Verwendung des *repair-templates* entstanden waren, wurden die Amplifikate mit 50 % WT-DNA-Amplifikaten zum *reannealing* eingesetzt und somit Fehlpaarungen für die Spaltung der T7EN erzeugt.

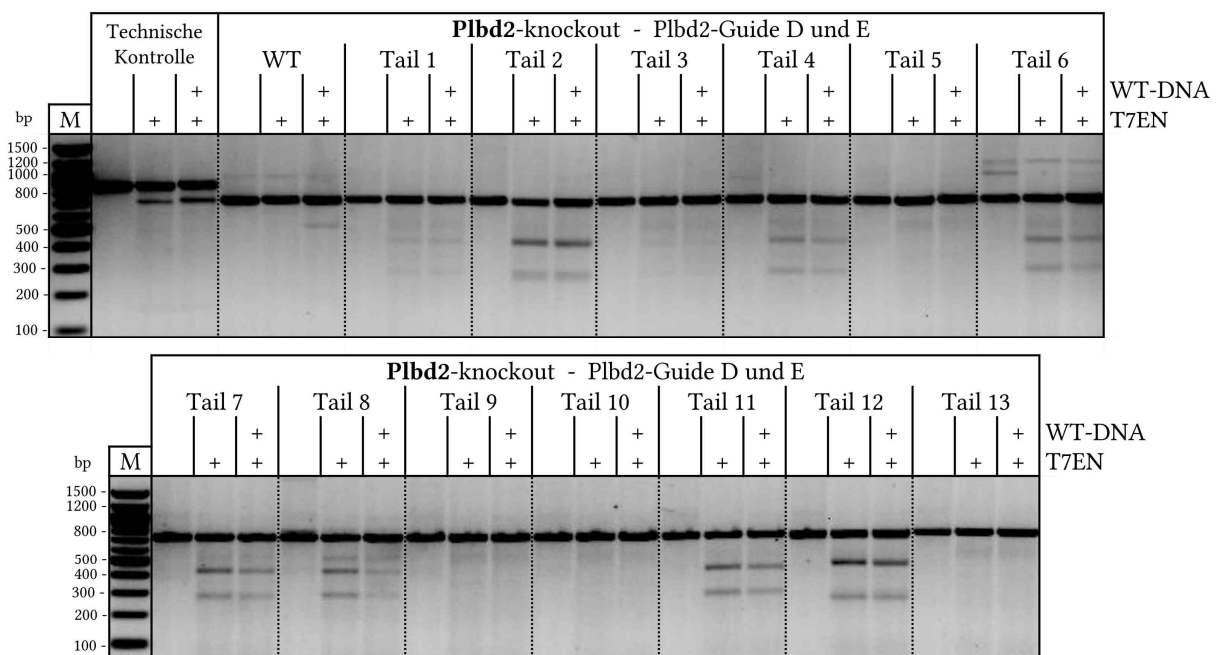


Abbildung 52: Agarosegel der Genotypisierung von putativen *Plbd2-knockout* Tieren.

Die genomische DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien (Tail) von putativen *Plbd2-knockout*-Mäusen wurde wie beschrieben extrahiert und die relevanten Genbereiche über PCR amplifiziert. 150 ng der PCR-Amplifikate oder 150 ng mit 50 % WT-DNA-Amplikon wurden nach *reannealing* mit T7EN verdaut und über Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die gestrichelten Linien dienen der Übersichtlichkeit.

Wie in Abbildung 52 zu sehen, unterschied sich das Bandenmuster der PCR-Amplifikate nach T7EN-Verdau bei Tail 5, 9, 10 und 13 nicht von dem der WT-Amplikons. Für alle übrigen Amplifikate waren nach T7EN-Behandlung Fragmentbanden zu detektieren, die auf das Vorliegen von Mutationen hindeuteten. Um die vorliegenden Mutationen zu charakterisieren, wurde sowohl der genomische Abschnitt um Exon 5, als auch um Exon 1 durch Sequenzierung untersucht. Der codierende Bereich für das aktive Zentrum des Proteins in Exon 5 wurde von den *Plbd2*-Guides D und E adressiert, der *Plbd2*-Guide C adressierte das Exon 1. Die Mutationen der genomischen DNA wurden analog zu der in Abbildung 51 dargestellten Methode identifiziert und sind in Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 23: Mutationen im Plbd2-Gen von *knockout*-Mäusen.

Die PCR-Amplifikate der 13 Tiere mit potentiellen Plbd2-Mutationen wurden durch Sequenzierung überprüft. Zwei Tiere trugen Deletionen im Exon 1, zehn Tiere trugen Mutationen im Bereich der für das aktive Zentrum um Cystein249 codiert, drei Tiere trugen keine Mutationen in den untersuchten Genabschnitten.

	Exon 1	Exon 5
Tier 1		- 8 nt Cys249 deletiert, Stopp nach 10 AS
Tier 2		- 9 nt Cys249 deletiert, " <i>knock-in</i> "-Mutation
Tier 3		- 4 nt Cys249 deletiert, Stopp nach 140 AS
Tier 4		- 12 nt Cys249 deletiert, S250 noch intakt
Tier 5		WT
Tier 6		- 8 nt Mosaike, Stopp nach 13 AS
Tier 7	- 3 nt Deletion Val, Mutation Asp zu Glu	- 17 nt Cys249 deletiert, Stopp nach 8 AS
Tier 8	- 16 nt Stoppcodon nach 17 AS	- 4 nt Stopp nach 140 AS
Tier 9		? Mutation, durch Mosaike nicht zu erkennen
Tier 10		WT
Tier 11		- 8 nt Cys249 deletiert, Stopp nach 140 AS
Tier 12		- 33 nt Cys249 intakt
Tier 13		WT

Wie in Tabelle 23 aufgeführt ist, konnte bei 2 der 13 untersuchten Tiere eine Mutation im Exon 1 des Plbd2-Gens identifiziert werden, was einer Mutationsrate von 15 % für den Guide C entspricht. Im Exon 5 wiesen 10 der 13 Tiere Deletionen auf, wobei die Deletion von 17 Nukleotiden bei Tier 7 an der vorausgesagten Spaltstelle des Guides D lag, die Deletion von 33 Nukleotiden bei Tier 12 schloss die Schnittstellen von Guide D und E ein. Die übrigen kleineren Mutationen (4 – 12 Nukleotide) lagen an der vorausgesagten Spaltstelle des Guide E. Die Effizienzen der Guides in Exon 5 lagen somit bei 2/13 (15 %) für Guide D und 9/13 (69 %) für Guide E. Zur Erhaltung der Zuchten wurde das Tier Nr. 81, das eine Insertion im Exon 2 des Plbd1-Gens trägt, sowie die Plbd2-Tiere Nr. 1, 2, 6, 7 und 8 in die zentrale Tierhaltung der Universität Bielefeld überführt.

Mittels CRISPR-Cas9 konnten Mausmodelle erzeugt werden, die Mutationen in den Genen für Plbd1 oder Plbd2 tragen. Während die verwendeten Guide-RNAs bei Vorversuchen in Zellkultur eine gute Mutationsrate aufwiesen, konnten bei der Verwendung in murinen Oozyten abweichende Effizienzen beobachtet werden. Die ursprünglich ausgewählten sgRNAs hatten in der Maus einen geringen (Plbd1-GuideB 1/83 Tieren, 1,2 %) oder keinen (Plbd2-GuideB 0/83 Tieren) Effekt. Durch die Injektion einer Kombination aus drei sgRNAs gegen das Plbd2-Exon 1 und Exon 5 konnte eine Mutationsrate von 77 % (10/13 Tieren) erzielt werden.

4.4.4 Etablierung von Plbd1- und Plbd2-defizienten Inzuchtstämmen und Validierung der Mutationen auf genomischer Ebene

Durch Injektion von CRISPR-Cas9-Konstrukten in die Vorkerne von befruchteten murinen C57Bl6/J-Oozyten wurden potentielle *knockout*-Mausmodelle für Plbd1 und Plbd2 hergestellt. Es sollte überprüft werden, ob die homozygoten Mutationen die Expression der Gene von Plbd1 bzw. Plbd2 inhibieren, um über einen revers-genetischen Ansatz auf die physiologische Relevanz der Proteine schließen zu können.

Die ausgewählten mutierten Mäuse der F0-Generation wurden mit wildtypischen (WT) C57Bl6/J Tieren verpaart. Die heterozygoten Tiere der F1-Generation wurden wiederum miteinander verpaart, um Tiere mit homozygot mutierten Allelen zu generieren. Im späteren Verlauf der Zucht wurden ausschließlich Tiere mit homozygoter Mutation zur Zucht eingesetzt, um die Tierzahlen gering zu halten. Es wurden dem Alter der Tiere entsprechende Kontrollverpaarungen mit C57Bl6/J-WT-Tieren angesetzt.

Um eine Genotypisierung ohne Verwendung der T7-Endonuklease I durchführen zu können, wurde eine Methode etabliert, die das von der Raumstruktur abhängige Laufverhalten von DNA-Fragmenten in Polyacrylamid (PAA)-Gelen ausnutzt (Zhu *et al.*, 2014). Wie für den T7EN-Assay werden PCR-Amplifikate des relevanten Genabschnitts hergestellt und durch Erhitzen und langsames Abkühlen einem *reannealing* unterzogen. Im Fall von heterogenem Ausgangsmaterial wie etwa einem WT-Allel und einem mutierten Allel, entstehen neben den korrekt gepaarten Homoduplices auch Heteroduplices mit Fehlpaarungen im Doppelstrang. Die Fehlpaarung führt zu einer veränderten Raumstruktur des Heteroduplex, die in einem vom Homoduplex abweichenden Laufverhalten im PAA-Gel resultiert. Das Laufverhalten ist abhängig von der Größe und Position der Fehlpaarung im Heteroduplex sowie von der Position auf dem *sense*- oder *antisense*-Strang. Da bei der Genotypisierung von heterozygoten Organismen eine Mutation auf dem *sense*- oder *antisense*-Strang des Heteroduplex vorliegen kann, entstehen zwei Doppelstränge mit nicht-identischer Raumstruktur. Neben der Bande des Homoduplex sind im PAA-Gel deshalb zwei weitere Banden für die Heteroduplices zu erwarten. Genomisches Material mit einer homozygoten Mutation kann im PAA-Gel nicht von WT-DNA unterschieden werden, da in beiden Fällen keine Heteroduplices entstehen. Wird das PCR-Produkt zur Hälfte durch Amplifikate von WT-DNA ersetzt, bilden sich beim *reannealing* mit mutierten Amplifikaten Heteroduplices die im PAA-Gel detektierbar sind, was die Unterscheidung von homozygoten WT- und mutierten Tieren ermöglicht.

4.4.4.1 Plbd1^{-/-}-Mausmodell

Das erzeugte Tier mit der Insertion von zwei Nukleotiden „TA“ im Exon 2 des Plbd1-Gens (vergleiche Abschnitt 4.4.3), wurde mit einem wildtypischen (WT) C57Bl6/J-Tier verpaart, um Nachkommen der F1-Generation zu erzeugen. Die Zuchtlinie wird im Weiteren als Plbd1-*knockout* (Plbd1-KO) bezeichnet. Das PAA-Gel einer Genotypisierung der F1-Generation ist exemplarisch für andere Genotypisierungen in Abbildung 53 dargestellt. Bei Verpaarung des Plbd1-KO-Tiers mit einem WT-Tier waren in der F1-Generation nur wildtypische und heterozygote Nachkommen zu erwarten, so dass eine Beimischung von WT-Amplifikaten zur Genotypisierung im PAA-Gel nicht erforderlich war. Die (+/+)-Kontrolle war dementsprechend nicht von der (-/-)-Kontrolle zu unterscheiden (Abbildung 53, Lane 1 und 3). Bei fünf Tieren und der (+/-)-Kontrolle waren Heteroduplices detektierbar, es handelte sich somit um heterozygot mutierte Nachkommen. Drei Tiere wiesen nur die Bande des Homoduplex auf und trugen demnach nicht die Mutation. Durch Verpaarung von Tieren der F1-Generation konnten in der F2-Generation homozygote Plbd1-KO-Tiere erhalten werden.

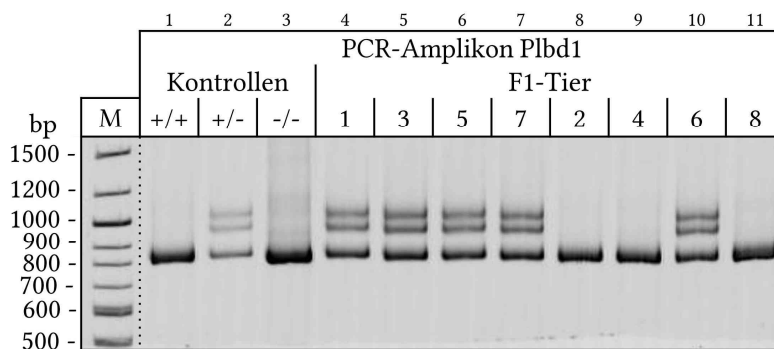


Abbildung 53: PAA-Gel der Genotypisierung von Plbd1-KO-Tieren.

Aus den Plbd1-KO-Tieren der F1-Generation wurde der genomische Bereich des Plbd1-Exon 2 durch PCR amplifiziert. 200 ng der PCR-Amplifikate wurden nach *reannealing* über ein Polyacrylamid (PAA)-Gel getrennt. Der Nachweis der DNA erfolgte nach Inkubation in Ethidiumbromid unter UV-Licht.

4.4.4.2 Plbd2^{-/-}- Mausmodelle

Von den in Abschnitt 4.4.3 beschriebenen 10 Tieren mit unterschiedlichen Mutationen im Plbd2-Gen wurden vorerst fünf ausgewählt und die Mutationen in Exon 1 und Exon 5 nach PCR-Amplifikation und *reannealing* im PAA-Gel untersucht. In den Amplifikaten des Exon 5 zeigte sich bei allen Tieren bis auf Tier 1 ein komplexes Bandenmuster, das über die Doppelbande der Heteroduplices und die Einzelbande des Homoduplex hinaus ging (Abbildung 54B). In Exon 1 wiesen die Tiere 7 und 8 heterozygote Mutationen auf (Abbildung 54A). Die fünf Tiere wurden mit wildtypischen (WT) C57Bl6/J-Tieren verpaart und die Nachkommen der F1-Generation ebenfalls durch Trennung der Amplifikate im PAA-Gel genotypisiert (Abbildung 84 im Anhang).

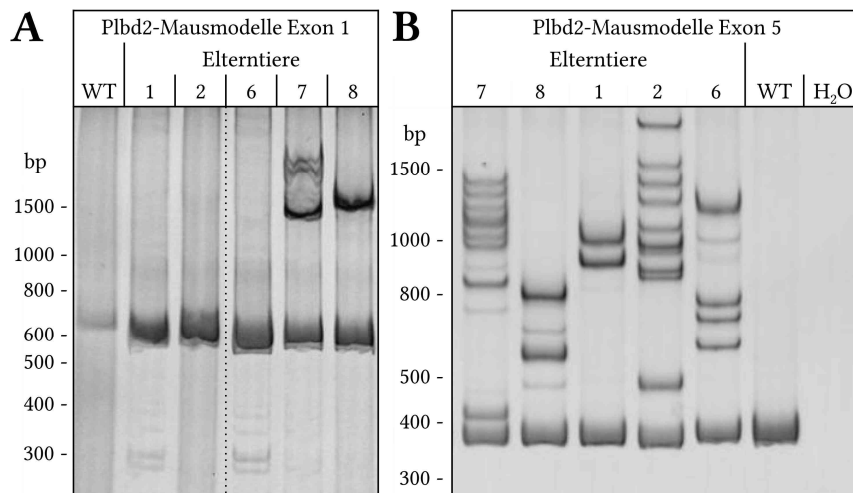


Abbildung 54: PAA-Gel der Genotypisierung von Plbd2-Tieren der F0-Generation.

Der genomische Bereich des Plbd2-Exon 5 der fünf ausgewählten Plbd2-Tiere wurde durch PCR amplifiziert. 200 ng der PCR-Amplifikate wurden nach *reannealing* über ein Polyacrylamid (PAA)-Gel getrennt. Der Nachweis der DNA erfolgte nach Inkubation in Ethidiumbromid unter UV-Licht. Die Abbildung wurde an der gestrichelten Linie geschnitten.

In den PAA-Gelen der Genotypisierung des Exon 5 traten für die Nachkommen der Elterntiere Nr. 2, 6, 7 und 8 jeweils drei verschiedene Bandenmuster auf, für die Nachkommen des Elterntier Nr. 1 waren nur zwei verschiedene Bandenmuster nachweisbar (Abbildung 84 im Anhang). Da unterschiedliche Mutationen zu verschiedenen Bandenmuster im PAA-Gel führen, schienen bei vier der fünf Elterntiere mehr als die zu erwartenden zwei Allele vererbt worden zu sein. Die Allele wurden anhand ähnlicher Bandenmuster mit den Buchstaben A, B und C bezeichnet. Die F1-Nachkommen des Elterntieres Nr. 7 wiesen in Allel B und C unterschiedliche Mutationen auf, Tiere mit dem Allel A entsprachen dem Bandenmuster des WT. Bei den F1-Nachkommen des Elterntiers Nr. 8, wiesen Tiere mit dem Allel A die Banden von Heteroduplices auf und trugen somit Mutationen. Bei den Tieren mit den Allelen B und C war wie im WT nur die Bande des Homoduplex zu detektieren.

Für jedes der Allele wurde ein F1-Tier ausgewählt um die vorliegenden Mutationen durch Sequenzierung zu charakterisieren (Tabelle 29 im Anhang). Die Daten der Sequenzierung bestätigten die Vererbung von bis zu drei verschiedenen Allelen von einem Elterntier, was auf einen Keimbahn-Mosaizismus zurückzuführen sein muss. Um einen unterschiedlichen Genotyp der Geschlechtsorgane dieser Tiere abzuklären, wurden die Tiere getötet, die Hoden oder Ovarien entfernt und der Genabschnitt des Plbd2-Exon 5 über PCR amplifiziert. Die Amplifikate wurden nach *reannealing* über ein PAA-Gel untersucht (Abbildung 55). Wie zu erkennen ist, unterschied sich das Bandenmuster bei den Amplifikaten der Schwanzspitzen-Biopsien in keinem Fall vom Muster der einzelnen Geschlechtsorgane. Der festgestellte Mosaizismus scheint sich somit in einem Entwicklungsstadium vor der Differenzierung der Keimblätter ausgebildet zu haben.

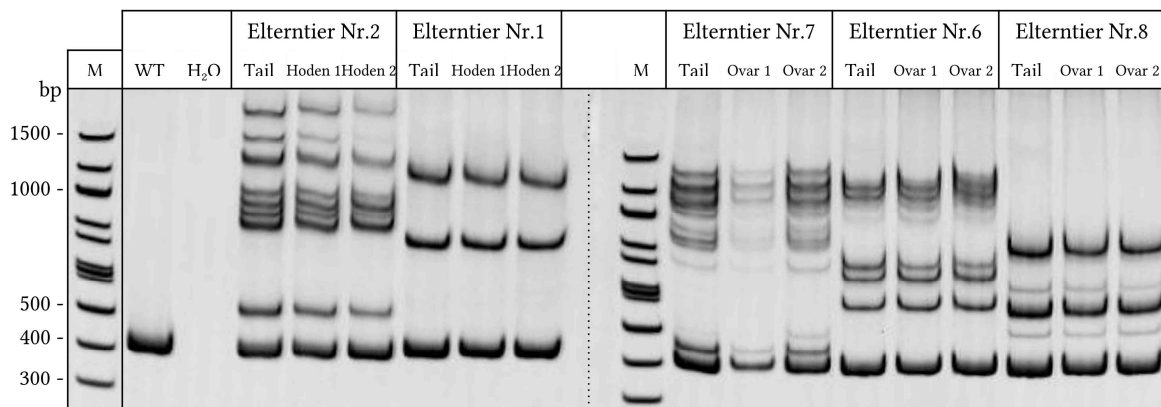


Abbildung 55: PAA-Gel der Genotypisierung der Geschlechtsorgane von Mäusen der Generation F0.

Aus den Elterntieren der Generation F0 wurden die Hoden oder Ovarien entfernt und die genomische DNA des Plbd2-Exon 5 über PCR amplifiziert. Die Hälfte des PCR-Produktes wurde nach einem *reannealing* über ein PAA-Gel getrennt. Als Vergleich wurden Amplifikate aus den Schwanzspitzen-Biopsien (Tail) aufgetragen. Der Nachweis der DNA erfolgte nach Inkubation in Ethidiumbromid unter UV-Licht. Die Abbildung wurde an der gestrichelten Linie geschnitten.

Für die weitere Zucht der Plbd2-*knockout*-Tiere wurden drei Tiere der F1-Generation ausgewählt, die im Folgenden als Plbd2-HH (Elterntier 7, Allel C, F1-Tier Nr.5), Plbd2-mut (Elterntier 8, Allel A, F1-Tier Nr.7) und Plbd2-KO (Elterntier 2, Allel C, F1-Tier Nr.22) bezeichnet werden.

Die Deletion von 17 nt im Exon 5 führt in der Linie Plbd2-HH zu einer Verschiebung des Leserasters ab Gly247 und einem Translationsstopp nach vier weiteren Aminosäuren. Zudem trägt die Linie eine Deletion von vier Aminosäuren im Exon 1.

In der Linie Plbd2-mut liegt eine Deletion von 3 nt im codierenden Bereich des aktiven Zentrums vor, die zu einer Deletion des Ser248 und Cys249 führt und an deren Stelle ein Phenylalanin einführt. Durch die Mutation des Cysteins im aktiven Zentrum ohne Verschiebung des Leserasters könnte sich die Mauslinie als *knock-in* Linie eignen, die über keine endogene Enzymaktivität verfügt, aber rekombinantes murines Protein in einer Enzym-Ersatz-Therapie tolerieren könnte. Neben der kleinen Mutation im aktiven Zentrum verfügt das Allel der Plbd2-mut-Linie zudem über eine Deletion von 18 nt im Exon 1, die zu dem Fehlen der Aminosäuren Asp87 bis Ala92 führt.

Für die Linie Plbd2-KO führt die Deletion von 26 nt im Exon 5 zu einer Verschiebung des Leserasters ab Gly247 und einem Translationsstopp nach vier weiteren Aminosäuren. Die Linie Plbd2-KO trägt keine Mutationen im Exon 1.

4.4.4.3 Untersuchung potentieller *offtarget-sites*

Die Spezifität der verwendeten Cas9-Endonuklease gegenüber einem bestimmten Genabschnitt wird durch die entsprechende sgRNA determiniert. Bereiche, an die eine sgRNA trotz unvollständiger

Sequenzkomplementarität binden kann, werden als *offtarget-sites* (OTS) bezeichnet und können zu der Entstehung unbeabsichtigter Mutationen führen.

Durch das *online-tool*, mit dem die Guide-RNAs erstellt wurden, wurde zu jedem Guide eine Liste der wahrscheinlichsten OTS angegeben. Die Wahrscheinlichkeit der Fehlpaarung wurde über ein Score-System beurteilt, das den OTS Werte zwischen 0 (keine Bindung) und 100 (optimale Bindung) zuordnet. Der verwendete Algorithmus berücksichtigt dabei primär die Anzahl der Fehlpaarungen (mismatches, #MM) und deren Position in der Guide-RNA, wobei Fehlpaarungen nah am PAM-Motiv den Score senken (Hsu *et al.*, 2013).

Für die erstellten *knockout*-Tiere wurden die Bereiche der zwei wahrscheinlichsten OTS aus der genomischen DNA über PCR amplifiziert (Primer siehe Abschnitt 2.7.3) und durch Sequenzierung auf Mutationen untersucht. Die Sequenzen der OTS sind in Tabelle 29 gezeigt. In den *knockout*-Tieren konnte für keine der Untersuchten OTS eine Abweichung von der WT-Sequenz nachgewiesen werden.

Tabelle 24: Offtarget-sites der verwendeten Guide-RNAs.

Zielsequenzen und vorausgesagte Offtarget-Bindestellen (OTS) der verwendeten CRSPR-Guide-RNAs. Fehlpaarungen (MM) der Zielsequenz mit der Guide-RNA sind in Rot dargestellt.

Plbd1-Guide B – 110 OTS (10 in Genen)		# MM	Score	Gen
Zielsequenz	GACAAGAATGGGGACGCCTA–CGG	0	100	NM_025806
OTS1	GGCTAGAAATGGGGACGCCTG–GGG	3	1,5	-
OTS2	GCCTAGAGAAGGGGACGCCTA–GGG	4	0,8	-
Plbd2-Guide C – 62 OTS (23 in Genen)		# MM	Score	Gen
Zielsequenz	GGATGGCTTCCACCCCGACG–CGG	0	100	NM_023625
OTS1	TGTTGGGGTCCACCCCGACG–CAG	4	0,9	NM_025350
OTS2	GGCTGGCTTCCATCCCGACA–CAG	3	0,6	-
Plbd2-Guide D - 172 OTS (28 in Genen)		# MM	Score	Gen
Zielsequenz	CGCCAGGCAGCAGCTTGATG–AGG	0	100	NM_023625
OTS1	ACCCAGCCAGCAGCTTGATG–GAG	3	1,7	-
OTS2	GACTGGGCAGCAGCTTGATG–GGG	4	1,3	-
Plbd2-Guide E – 341 OTS (32 in Genen)		# MM	Score	Gen
Zielsequenz	GATGAGGGCAGAGCATGAAC–CGG	0	100	NM_023625
OTS1	GAAGAGGGCAGAACATGAAC–TGG	2	3,3	-
OTS2	GATGAGGACAAAGCATGAAC–AAG	2	3,2	-

4.4.5 Validierung der *knockout*-Mausmodelle auf Transkript-Ebene

In der Zelle kann fehlerhafte mRNA, die zu einem vorzeitigen Translationsstopp führt, entfernt werden, um etwaige Zellschäden durch unvollständig synthetisierte Proteine zu vermeiden. Es sollte untersucht werden, ob in den erstellten *knockout*-Mausmodellen die Menge an Plbd1- bzw. Plbd2-mRNA reduziert ist. Dazu wurde die RNA aus verschiedenen Organen von *knockout*- und WT-Tieren extrahiert, in cDNA umgeschrieben und die Menge der Transkripte wurde durch Amplifikation in der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) bestimmt. Zur Normierung wurde zudem die Gapdh-cDNA in den jeweiligen Organen amplifiziert und die Plbd1 bzw. Plbd2 Amplifikation relativ zu Gapdh dargestellt (ΔC_T -Werte). Zur Veranschaulichung wurde eine zweite Normierung, entweder auf das Organ mit der höchsten Expression oder auf das jeweilige WT-Organ als Referenz durchgeführt ($\Delta\Delta C_T$ -Werte) und die Werte als Vielfaches der Referenz dargestellt (RQ-Werte = $(\text{Primereffizienz}+1)^{-\Delta\Delta C_T}$).

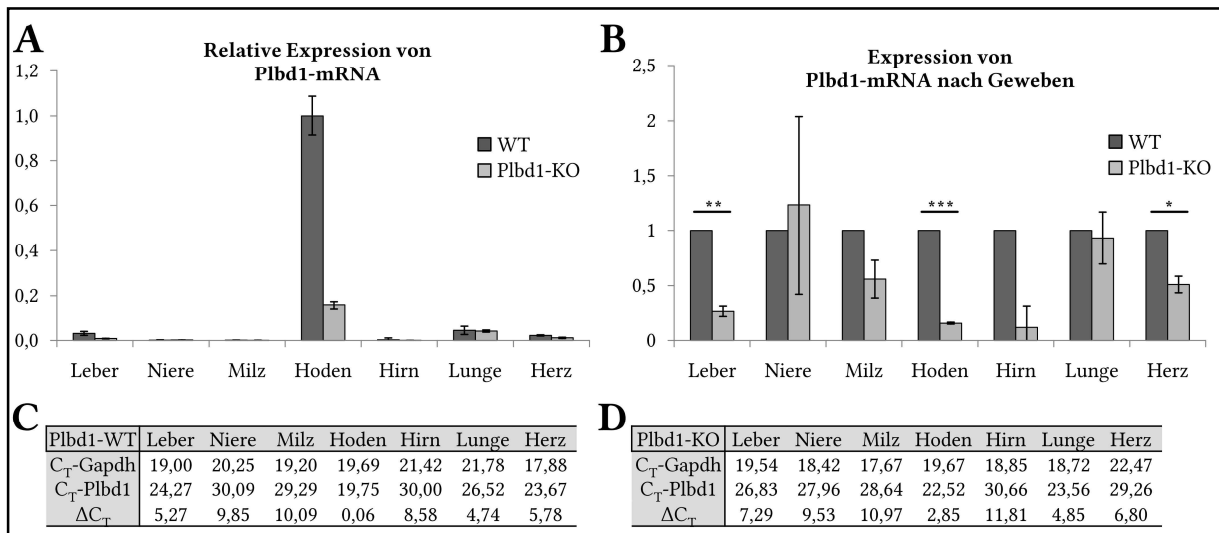


Abbildung 56: qPCR-Analyse der Plbd1-cDNA in WT- und Plbd1-KO-Mäusen.

Die RNA aus 50 mg Gewebe eines Plbd1-KO-Tieres (männlich, 28 Wochen) und eines WT-Tieres (männlich, 29 Wochen) wurde extrahiert und die mRNA revers transkribiert. Die cDNA wurde auf 5 ng/ μ L verdünnt und 2 μ L zur qPCR eingesetzt. Als Referenzwert wurde die Menge an Gapdh-cDNA bestimmt und die Plbd1-cDNA auf diese normiert (ΔC_T -Werte). (A) Dargestellt ist die cDNA-Menge des Plbd1-Transkripts relativ zum Organ der höchsten Expression (Hoden-WT). Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung. (B) Menge der Plbd1-cDNA in den KO-Geweben relativ zu den jeweiligen Werten im WT-Gewebe. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM) dar, anhand dessen die Signifikanz berechnet wurde. $n = 3$, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)). Die C_T - und ΔC_T -Werte sind in Feld C und D aufgeführt.

Die Quantifizierung der Plbd1-cDNA erfolgte über einen *forward*-Primer in Exon 5 und einen *revers*-Primer in Exon 7. Die Effizienz des Primerpaars wurde anhand einer Standardreihe mit Plbd1-DNA bekannter Konzentration auf 0,958 bestimmt. Bei der Quantifizierung des Plbd1-Transkripts in WT- und Plbd1-KO-Tieren ist in Abbildung 56A zu erkennen, dass das Organ mit der höchsten Plbd1-Expression die Hoden des WT-Tieres waren. In Lunge, Leber und Herz lag die Menge an cDNA nur

bei 4,4 %, 3,1 % bzw. 2,2 % des Wertes der Hoden. In Niere, Milz und Hirn des WT-Tieres war das Plbd1 mit 0,1 %, 0,1 % bzw. 0,3 % des Wertes in den Hoden kaum mehr nachzuweisen, was sich in C_T -Werten von annähernd 30 zeigte (Abbildung 56C). Der Wert in den Hoden des Plbd1-KO-Tieres lag bei 15,6 %, in der Lunge bei 4,1 % des Wertes in den WT-Hoden. Die übrigen KO-Gewebe lagen bei Werten unter 1 %.

In Abbildung 56B sind die ΔC_T -Werte der KO-Gewebe auf die Werte der entsprechenden WT-Gewebe normiert worden. Signifikant reduzierte Werte konnten in Hoden, Leber und Herz nachgewiesen werden. Die Werte in Niere, Milz und Hirn sind zu vernachlässigen, da die Plbd1-cDNA schon in den WT-Geweben kaum nachzuweisen war. In der KO-Lunge war die Plbd1-cDNA kaum reduziert, der vergleichsweise große Fehler (SEM = $\pm 23,5$ %) könnte jedoch auf ungenaue Messwerte hindeuten.

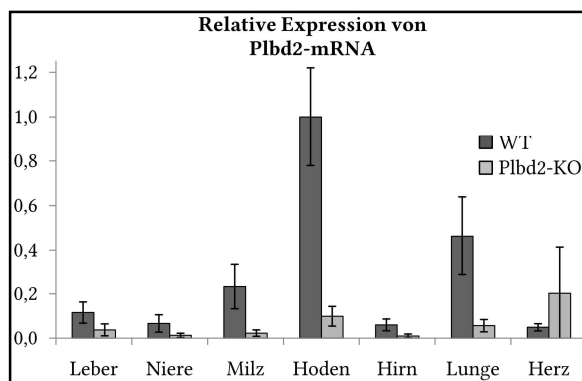


Abbildung 57: qPCR-Analyse der Plbd2-cDNA in WT- und Plbd2-KO-Mäusen.

Die RNA aus 50 mg Gewebe eines Plbd2-KO-Tieres (männlich, 19 Wochen) und eines WT-Tieres (männlich, 19 Wochen) wurde extrahiert und die mRNA revers transkribiert. Die cDNA wurde auf 5 ng/ μ L verdünnt und 2 μ L zur qPCR eingesetzt. Als Referenzwert wurde die Menge an Gapdh-cDNA bestimmt und die Plbd1-cDNA auf diese normiert (ΔC_T -Werte). Dargestellt ist die cDNA-Menge des Plbd1-Transkripts relativ zum Organ der höchsten Expression (Hoden-WT). Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung.

Zur Quantifizierung von Plbd2-cDNA wurde ein Primerpaar eingesetzt, das in Exon 5 und Exon 7 bindet und ein Produkt von 216 bp amplifiziert. Die Effizienz des Primerpaars wurde anhand einer Standardreihe mit Plbd2-DNA bekannter Konzentration auf 0,832 bestimmt. Die Menge der Plbd2-cDNA wurde in verschiedenen Organen von WT-Mäusen und den drei Linien Plbd2-HH, Plbd2-mut und Plbd2-KO bestimmt und auf die Menge an Gapdh-cDNA normiert. Bei dem Vergleich der WT- und *knockout*-Gewebe variiert die Expression der Plbd2-cDNA zwischen den *knockout*-Linien kaum, weshalb die Daten des Plbd2-KO-Mausmodells stellvertretend für die anderen Linien gezeigt sind (vollständige Daten mit C_T -Werten siehe Anhang). Das stärkste Signal der Plbd2-cDNA war wie auch für Plbd1 in den Hoden der WT-Tiere zu detektieren (Abbildung 57). In der WT-Lunge konnte mit etwa 38 % (35 % HH, 34 % mut, 46 % KO) des Wertes die zweithöchste Expression detektiert werden. In den weiteren untersuchten WT-Organen lag die cDNA Menge gegenüber den Hoden als Referenz bei 2 % bis 12 %.

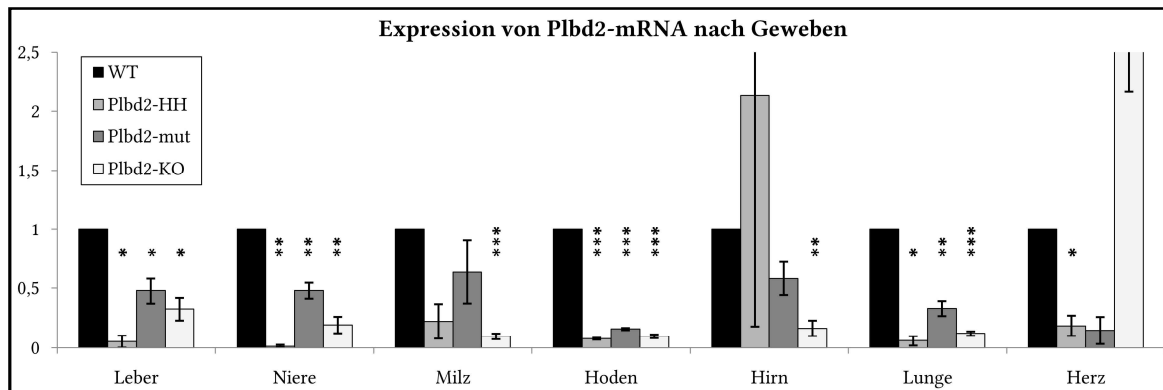


Abbildung 58: qPCR-Analyse der Plbd2-cDNA in Gewebe aus *knockout*-Mäusen relativ zu WT-Gewebe.

Die mRNA aus 50 mg Gewebe von Plbd2-HH- / Plbd2-mut- / Plbd2-KO-Tieren (männlich, 20/17/19 Wochen) und eines WT-Tieres (männlich, 19 Wochen) wurde extrahiert und die mRNA revers transkribiert. Die cDNA wurde auf 5 ng/ μ L verdünnt und 2 μ L zur qPCR eingesetzt. Als Referenzwert wurde die Menge an Gapdh-cDNA bestimmt und die Plbd1-cDNA auf diese normiert (ΔC_T -Werte). Dargestellt ist die Menge der Plbd2-cDNA in den KO-Geweben relativ zu den jeweiligen Werten im WT-Gewebe. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM) dar, anhand dessen die Signifikanz berechnet wurde. $n = 3$, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Für den Vergleich der Plbd2-cDNA-Menge in WT- und *knockout*-Tieren eignen sich besonders die Gewebe mit hoher Expression (Hoden und Lunge), da diese die höchste Reproduzierbarkeit der Daten ermöglichen. Organe mit geringer cDNA-Menge (C_T -Werte ~ 30) wiesen höhere Abweichungen der Einzelbestimmungen auf. In allen Plbd2-*knockout*-Linien wies die Plbd2-cDNA in den Hoden gegenüber dem WT-Gewebe eine höchst signifikante ($P < 0,001$) Reduktion auf (Abbildung 58). Die verbliebene cDNA-Menge lag bei 8 % für Plbd2-HH, 16 % für Plbd2-mut und 10 % für Plbd2-KO. In der Lunge lag die verbliebende cDNA-Menge in Plbd2-mut-Tieren mit 33 % deutlich höher als bei HH- (6 %) oder KO-Tieren (12 %). Auch die Werte in Leber, Niere und Milz der Plbd2-HH- (5%, 1%, 22 %) und Plbd2-KO-Tiere (32 %, 19 %, 10 %) waren höher als für die Plbd2-mut-Tiere (48 %, 48 %, 64 %). Die Daten aus Hirn und Herz waren aufgrund hoher C_T -Werte wenig aussagekräftig.

Während die Expression von Plbd1 und Plbd2 nur in einigen Organen der *knockout*- und WT-Tiere über qPCR untersucht wurde, sollte ein umfassendes Expressionsmuster in WT-Tieren mit Hilfe der cDNA-Datenbank eines Kooperationspartners (T. Schinke, Institut für Osteologie und Biomechanik, Univ.-Klinikum Hamburg-Eppendorf) erstellt werden. Die cDNA von diversen Organen eines 10 Wochen alten Tieres wurde über TaqMan-qPCR mit Sonden für Plbd1 und Plbd2 untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 59 als Vielfaches der Gapdh-cDNA als Referenz dargestellt. Die höchste relative Expression von Plbd1 konnte in Milz, subkutanem Fettgewebe und Lunge detektiert werden. Die höchste Expression von Plbd2 konnte in Visceralfett und Magen nachgewiesen werden, wobei beide Werte mit hohen Standardabweichungen behaftet waren. Bei dieser Untersuchung wurde keine cDNA aus Hoden eingesetzt, die sowohl für Plbd1 als auch für Plbd2 zuvor als Organ höchster Expression identifiziert wurden.

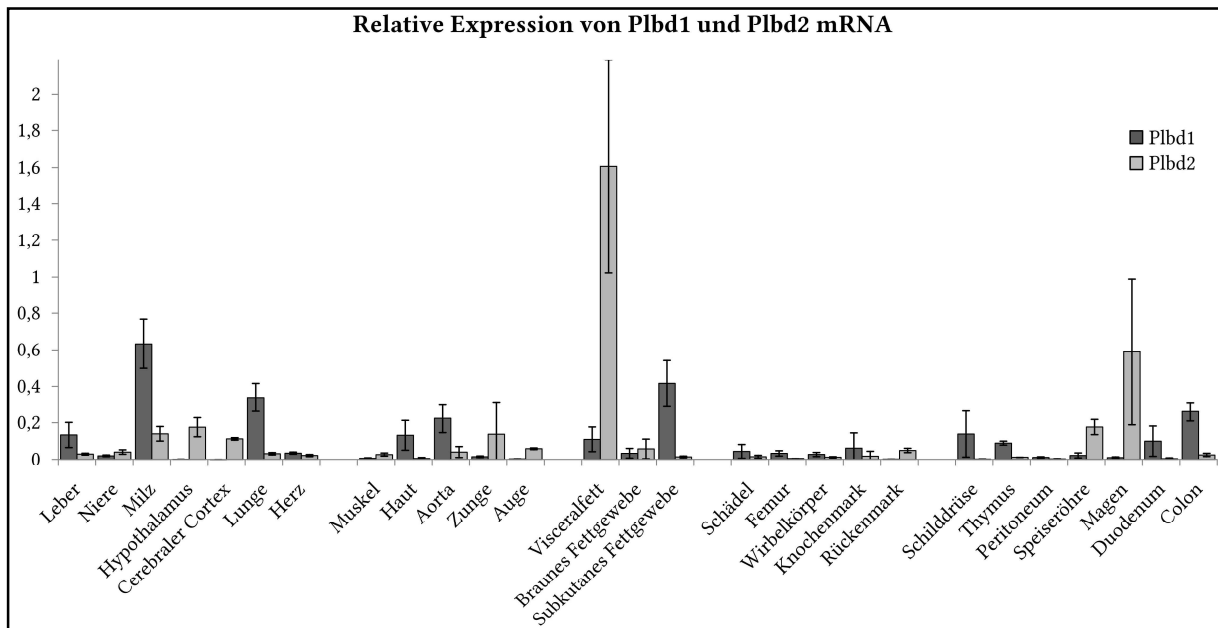


Abbildung 59: qPCR-Analyse der Plbd1- und Plbd2-Expression in verschiedenen Geweben.

Anhand einer cDNA-Datenbank mit diversen Organen einer 10 Wochen alten Maus wurde die mRNA-Expression von Plbd1 und Plbd2 über TaqMan-qPCR bestimmt. Die Expressionsniveaus sind als vielfaches der Gapdh-cDNA als Referenz dargestellt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Werte dar. Daten zur Verfügung gestellt von T. Schinke, Institut für Osteologie und Biomechanik, Univ.-Klinikum Hamburg-Eppendorf.

In den dargestellten qPCR-Analysen von *knockout*- und WT-Tieren konnte gezeigt werden, dass unter allen getesteten Organen besonders in den Hoden Plbd1 und Plbd2 exprimiert wird. Während in den übrigen Organen kaum Plbd1-cDNA nachgewiesen werden konnte, scheint sich die Plbd2-Expression breiter zu verteilen. In der Lunge konnte eine vergleichsweise große Menge an Plbd2-cDNA gemessen werden, die übrigen Organe wiesen dagegen eine geringe Expression auf. Die Daten aus der cDNA-Datenbank deuten auf eine hohe Expression von Plbd1 in Milz, subkutanem Fettgewebe und der Lunge hin, Plbd2-cDNA ist zudem besonders in Visceralfett und dem Magen nachzuweisen. Auffällig ist die Diskrepanz der Daten zur Plbd1-Expression in der Milz: während in der qPCR von WT- und Plbd1-KO-Tieren (Abbildung 56) nahezu keine Plbd1-cDNA in der Milz nachgewiesen werden kann, ist diese in den Daten des Kooperationspartners (Abbildung 59) als Organ der höchsten Plbd1-Expression ausgewiesen.

Die qPCR Analyse der Plbd1-KO-Tiere zeigt (Abbildung 56B), dass die Expression von Plbd1-mRNA in den Hoden, die als Organ der höchsten Expression die belastbarsten Daten liefern, auf 15,6 % der WT-Expression reduziert ist. Die auf genomischer Ebene eingeführte Mutation scheint somit zur Destabilisierung der Plbd1-mRNA zu führen. Bei der Plbd2-HH-Zuchtlinie ist die Menge an Plbd2-cDNA in den Hoden auf 8 % der WT-Werte reduziert, in den Plbd2-mut-Tieren auf 16 % und den Plbd2-KO-Tieren auf 12 %. Die eingeführten Mutationen scheinen somit in allen Fällen zur Destabilisierung der Plbd2-mRNA zu führen.

4.4.6 Validierung der *knockout*-Mausmodelle auf Protein-Ebene in angereicherten Lysosomen und Geweben

Nachdem die Mutationen im Gen von Plbd1 oder Plbd2 in den Mausmodellen auf DNA-Ebene nachgewiesen wurden (Abschnitt 4.4.4) und eine Reduzierung der resultierenden mRNAs auf Transkript-Ebene festgestellt werden konnte (Abschnitt 4.4.5), sollte der *knockout* von Plbd1 und Plbd2 auch auf Protein-Ebene gezeigt werden.

Aufgrund der unbekanntenen Funktion von Plbd1 und Plbd2 kann kein Aktivitätsassay verwendet werden, um etwaige Restaktivität der Proteine zu bestimmen. Die Beurteilung der *knockout*-Mausmodelle auf Proteinebene erfolgte deshalb anhand des Proteinsignals im Western-Blot. Um Plbd1 und Plbd2 möglichst sensitiv nachzuweisen, wurden Lysosomen-angereicherte Fraktionen aus Leberhomogenaten (Tritosomen) der WT- und *knockout*-Tiere hergestellt. Die Proteine der Tritosomen wurden im Western-Blot mit Antikörpern gegen Plbd1 oder Plbd2 untersucht (Abbildung 60 und Abbildung 61).

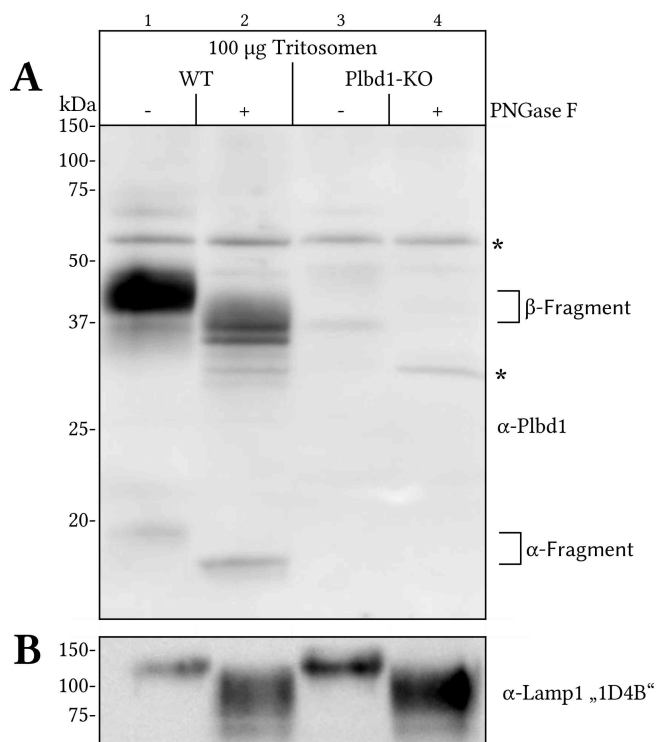


Abbildung 60: Western-Blot von Plbd1^{-/-} und WT-Tritosomen nach Deglykosylierung mit PNGase F.

Lysosomen-angereicherte Fraktion (Tritosomen, 100 µg) aus der Leber von WT- und Plbd1-KO-Tieren wurden mit PNGase F deglykosyliert (+) oder dem Protokoll ohne Enzym unterzogen (-). Die Proben wurden per SDS-PAGE getrennt und im Western-Blot auf PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte mit Plbd1 „Denat“-Antikörper (A) oder Lamp1-1D4B-Antikörper (B) als Ladekontrolle.

Wie das Plbd2 wird auch das homologe Protein Plbd1 durch eine putative autokatalytische Prozessierung in ein N-terminales α- und ein C-terminales β-Fragment gespalten (Xu *et al.*, 2009). Bei der Untersuchung von WT-Tritosomen mit einem Antikörper gegen Plbd1, waren die Banden des β-Fragments bei etwa 40 kDa und des α-Fragments bei etwa 20 kDa zu detektieren (Abbildung

60A, Lane 1). Um die schwache Bande bei etwa 60 kDa einzuordnen, wurde die Tritosomen-Fraktion mit PNGase F deglykosyliert. Die Größe der 60 kDa Bande änderte sich nach PNGase F Behandlung nicht (Lane 2), was gegen eine Glykosylierung dieses Peptids spricht. Die Banden des β -Fragments (40 kDa) und des α -Fragments (20 kDa) des Plbd1 werden dagegen zu geringerem Molekulargewicht verschoben und tragen folglich N-Glykane. In den Tritosomen aus Plbd1-KO-Tieren (Lane 3 und 4) konnten diese Banden des Plbd1 nicht detektiert werden, was für einen funktionellen *knockout* des Plbd1 in der Leber spricht. Das stark glykosylierte lysosomale Markerprotein Lamp1 wurde als Ladekontrolle nachgewiesen (Abbildung 60B).

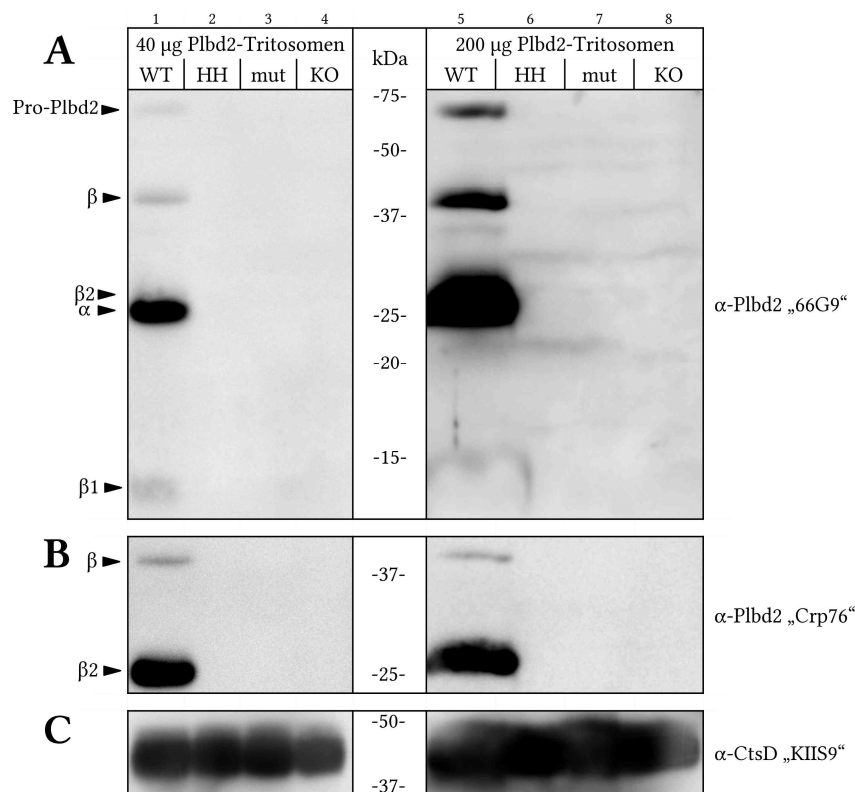


Abbildung 61: Western-Blot von Tritosomen aus WT- und Plbd2-defizienten Tieren.

Lysosomen-angereicherte Fraktion (Tritosomen) aus wildtypischen (WT) Tieren und den Zuchtlinien Plbd2-HH, Plbd2-mut und Plbd2-KO wurden auf die Expression von Plbd2 untersucht. 40 μ g oder 200 μ g der Tritosomen wurde über SDS-PAGE getrennt und im Western-Blot auf PVDF-Membran übertragen. Zur Detektion des Plbd2 diente der Plbd2-66G9- (A) oder Plbd2-Crp76-Antikörper (B). Als Ladekontrolle diente Cathepsin D, nachgewiesen über einen CtsD-KIIS9-Antikörper (C).

Um zu zeigen, dass die Synthese von intaktem Plbd2 in den erzeugten *knockout*-Mauslinien unterbunden ist, wurden Tritosomen aus WT- und Plbd2-defizienten Tieren im Western-Blot verglichen. Mit dem Plbd2-66G9-Antikörper ist in Abbildung 61A, Lane 1 das typische Bandenmuster des Plbd2 zu erkennen, mit dem Pro-Plbd2 bei 70 kDa und dem β -Intermediat bei 42 kDa. Die Fragmente $\beta 2$ (26 kDa) und α (23 kDa) waren aufgrund einer geringen Trennung im niedrigen Molekulargewichtsbereich nicht darzustellen, während die Bande des $\beta 1$ -Fragments bei

15 kDa zu detektieren war. Mit dem Plbd2-Crp76-Antikörper waren in Feld B für die WT-Tritosomen (Lane 1) das β - (26 kDa) und β 2-Fragment (42 kDa) nachzuweisen. Bei der Untersuchung der Plbd2-HH-, Plbd2-mut- und Plbd2-KO-Tritosomen in Lane 2 - 4 waren weder mit dem Plbd2-66G9- (Abbildung 61A) noch mit dem Plbd2-Crp76- (Abbildung 61B) Antikörper Banden zu detektieren. Bei maximaler Beladung mit 200 μ g Protein, waren mit dem Plbd2-66G9-Antikörper (Abbildung 61A) in Lane 6 - 8 Hintergrundsignale zu detektieren, die jedoch nicht den WT-Banden in Lane 5 entsprachen. Mit dem Plbd2-Crp76-Antikörper waren auch bei 200 μ g Tritosomen keine Signale zu detektieren. Cathepsin D diente als Ladekontrolle (Abbildung 61C).

Die vollständige Abwesenheit von Plbd2-Signalen in den lysosomalen Fraktionen von Plbd2-HH- und Plbd2-KO-Tieren deutet auf einen erfolgreichen *knockout* für das Plbd2 in der Leber hin. Im Fall der Plbd2-mut-Tiere sollte die eingeführte Mutation zur Expression eines Proteins mit einer Mutation im aktiven Zentrum führen. Dass in der lysosomalen Fraktion kein Protein nachzuweisen ist, könnte bedeuten, dass das Protein nicht korrekt sortiert oder abgebaut wird.

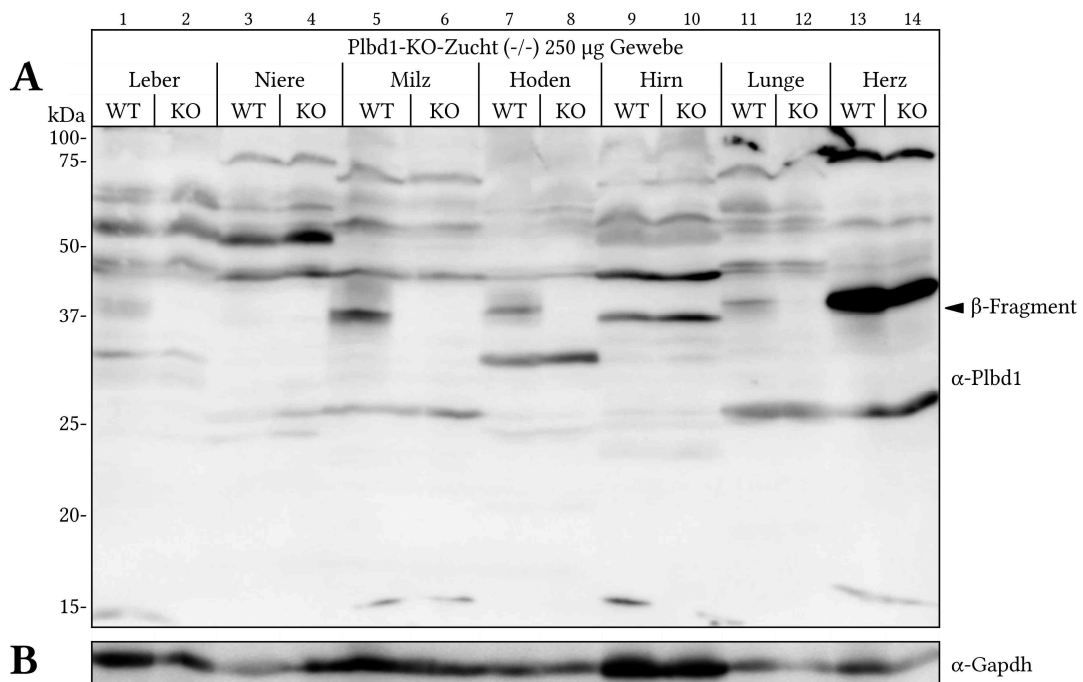


Abbildung 62: Western-Blot von Gewebehomogenaten aus WT- und Plbd1-KO-Mäusen.

Verschiedene Gewebe wurden aus WT- und Plbd1-KO-Mäusen entfernt, homogenisiert und lysiert. 250 μ g des Überstandes wurden zu SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran eingesetzt. Der Nachweis des Plbd1 erfolgte mit einem Plbd1-„Denat.“-Antikörper (A), Gapdh (Gapdh-FL335-Antikörper) dient als Ladekontrolle (B).

Um den *knockout* von Plbd1 und Plbd2 auf Protein-Ebene auch in anderen Geweben als der Leber zu belegen, wurden aufgearbeitete Homogenate von verschiedenen Geweben im Western-Blot untersucht.

Gewebehomogenate aus WT- und Plbd1-KO-Mäusen wurden im Western-Blot bei Detektion mit dem polyklonalen Plbd1-Antikörper verglichen (Abbildung 62A). Für alle untersuchten Gewebe war eine Reihe von Banden zu erkennen, die in den meisten Fällen in WT- und KO-Gewebe mit der gleichen Intensität auftraten und somit vermutlich nicht spezifisch für das Plbd1 waren. Eine Abweichung zwischen KO-Geweben und WT-Geweben bildete die Bande bei 40 kDa, die in der WT-Milz (Lane 5) deutlich und in WT-Hoden (Lane 7), -Lunge (Lane 11) und -Leber (Lane 1) schwächer zu erkennen war. In den korrespondierenden KO-Geweben trat die Bande nicht auf. Das apparente Molekulargewicht ließ vermuten, dass es sich um das β -Fragment des Plbd1 handelte, das auch in den Lysosomen-angereicherten Fraktionen der Leber (Tritosomen, Abbildung 60A) bei etwa 40 kDa detektiert werden konnte. In WT-Niere (Lane 3) und -Hirn (Lane 9) war die Bande nicht zu erkennen, in WT- und KO-Homogenaten aus Herz-Gewebe lag auf der Höhe des β -Fragments eine starke Bande, die vermutlich nicht Plbd1-spezifisch ist. Das α -Fragment, das in Tritosomen (Abbildung 60A) bei etwa 20 kDa auftrat, war aufgrund der vergleichsweise geringeren Konzentration lysosomaler Proteine in keinem Gewebe zu detektieren. Das Plbd1-Protein scheint somit in keinem untersuchten Gewebe der Plbd1-KO-Tiere gebildet zu werden.

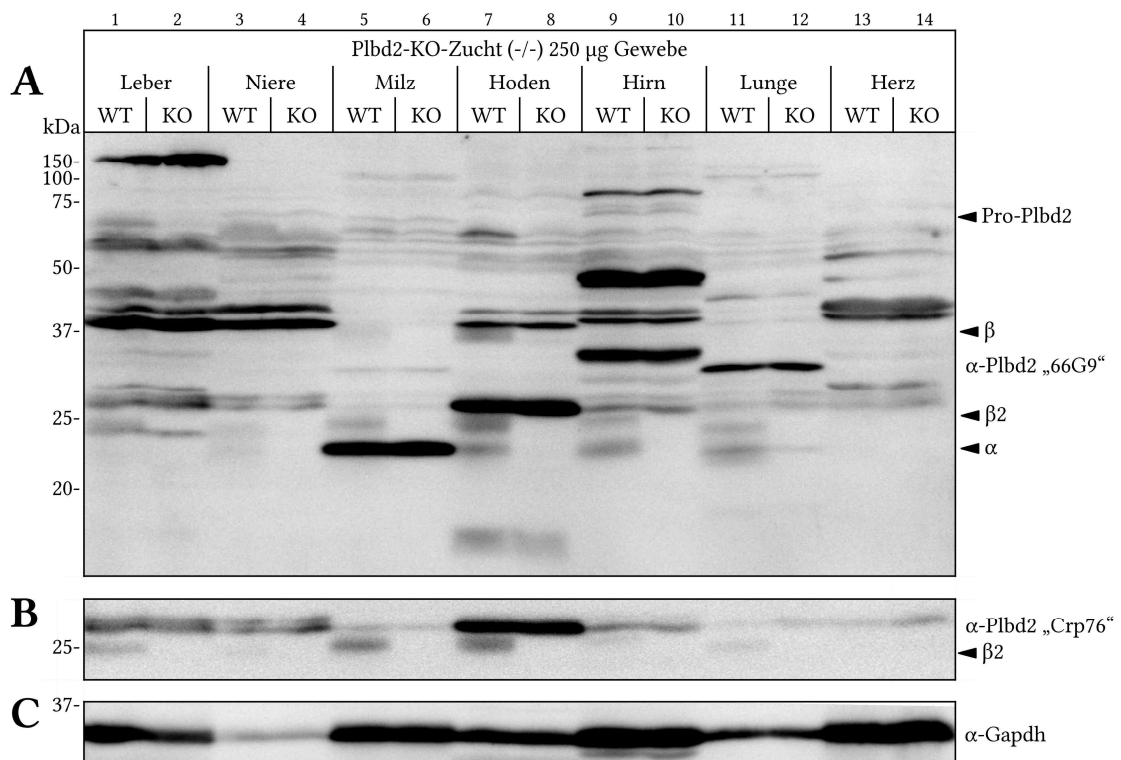


Abbildung 63: Western-Blot von Gewebekomplexen aus WT- und Plbd2-KO-Mäusen.

Verschiedene Gewebe wurden aus WT- und Plbd2-KO-Mäusen entfernt, homogenisiert und lysiert. 250 µg des Überstandes wurden zu SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran eingesetzt. Der Nachweis des Plbd2 erfolgte mit dem Plbd2-66G9- (A) oder Plbd2-Crp76-Antikörper (B), Gapdh (Gapdh-FL335-Antikörper) dient als Ladekontrolle (C).

Die Western-Blots der Gewebehomogenate aus Plbd2-defizienten Tieren im Vergleich mit WT-Homogenaten ähnelten sich für die Linien Plbd2-HH, Plbd2-mut und Plbd2-KO stark, weshalb nur der Western-Blot der Plbd2-KO-Homogenate beispielhaft dargestellt ist (Abbildung 63, weitere Daten siehe Anhang).

Bei Detektion mit dem Plbd2-66G9-Antikörper war für alle Organe ein komplexes Bandenmuster zu erkennen (Abbildung 63A). Die Banden die in WT- und *knockout*-Organen mit gleicher Intensität auftraten, sind als nicht spezifisch für das Plbd2 anzusehen. Die Doppelbanden der β 2- und α -Fragmente bei 26 kDa und 23 kDa waren deutlich zu erkennen, wobei die obere der Banden mit dem Plbd2-Crp76-Antikörper in Abbildung 63B als β 2-Fragment identifiziert werden konnte. Das deutlichste Signal war in WT-Hoden (Lane 7) zu detektieren, gefolgt von Hirn (Lane 9), Milz (Lane 5) und Lunge (Lane 11) sowie schwächeren Signalen in Leber (Lane 1) und Niere (Lane 3). In Homogenaten aus WT-Herzgewebe (Lane 13) waren diese Banden nicht zu erkennen. In den jeweiligen korrespondierenden *knockout*-Geweben war kein Signal auf der Höhe der α - und β 2-Fragmente zu erkennen. Die Banden bei etwa 25 kDa in Leber und etwa 24 kDa in Milz und Lunge waren vermutlich nicht spezifisch für Plbd2. Die Bande des β -Fragments bei 40 kDa war besonders in den WT-Hoden zu erkennen (Abbildung 63A, Lane 7) sowie schwächer in WT-Milz (Lane 5) und WT-Leber (Lane 1). Die Bande des Pro-Plbd2 war im Vergleich zu den jeweiligen *knockout*-Geweben in WT-Leber, -Niere und -Hoden schwach zu erkennen.

Als Ladekontrolle ist Gapdh nachgewiesen worden, dem als *housekeeping*-Protein eine ähnliche Expression in den meisten Geweben zugeschrieben wird (Kim *et al.*, 2014). Die Expression von Gapdh lag in allen untersuchten Geweben in einer ähnlichen Größenordnung, einzige Ausnahme bildete die Niere in der ein deutlich schwächeres Signal auftrat.

Die Befunde im Western-Blot, mit dem stärksten Plbd2-Proteinsignal in den Hoden und dem Schwächsten im Herz spiegeln gut die Daten aus der qPCR-Analyse in Abschnitt 4.4.5 wider. Während in der qPCR für die Hoden der *knockout*-Tiere eine Reduktion des Plbd2-Transkripts auf 8 – 16 % des WT-Wertes bestimmt wurde, konnten die Signale des Plbd2-Proteins im Western-Blot in keinem Gewebe der *knockout*-Tiere nachgewiesen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass in den untersuchten Geweben von Plbd1- und Plbd2-defizienten Mäusen kein matures Plbd2 mehr nachzuweisen ist. Es kann somit von einem erfolgreichen *knockout* des Proteins ausgegangen werden. Die Bandenintensität der Plbd2-Fragmente im Western-Blot deckt sich weitestgehend mit dem in der qPCR bestimmten Expressionsniveau der jeweiligen mRNA.

4.4.7 Analyse von Blutzellen aus der Plbd1^{-/-}-Mauslinie

Bei Untersuchungen des Proteoms sekretorischer Granula in neutrophilen Granulozyten konnte Plbd1 identifiziert und aufgereinigt werden (Xu *et al.*, 2009). Es wurde eine Phospholipase-Aktivität postuliert und im Zusammenhang damit eine Funktion bei der Abwehr von Mikroorganismen oder der Spaltung von Lipid-basierten Entzündungsfaktoren vorgeschlagen. Desweiteren konnte das Plbd1 bei dem Vergleich von humanen proinflammatorischen (CD14⁺/CD16⁺) Monozyten und humanen antimikrobiellen (CD14⁺/CD16⁻) Monozyten als spezifisch für die antimikrobielle (CD14⁺/CD16⁻) Subvariante beschrieben werden (Zhao *et al.*, 2009).

Es sollte untersucht werden, ob Plbd1 in den Leukozyten von WT-Tieren exprimiert wird und ob in den Leukozyten von Plbd1-KO-Mäusen eine Reduzierung der Plbd1-Expression nachweisbar ist. Dazu wurden die Leukozyten aus dem Blut der Mäuse durch differentielle Zentrifugation und Lyse der Erythrozyten mit Ammoniumchlorid angereichert und über Western-Blot analysiert. Neben einer Vielzahl anderer Banden war die Bande des Plbd1- β -Fragments bei etwa 40 kDa in der WT-Leukozyten-Fraktion (Abbildung 64, Lane 5) zu detektieren, während diese in den Plbd1-KO-Leukozyten (Lane 6) und in den übrigen Fraktionen nicht nachzuweisen war.

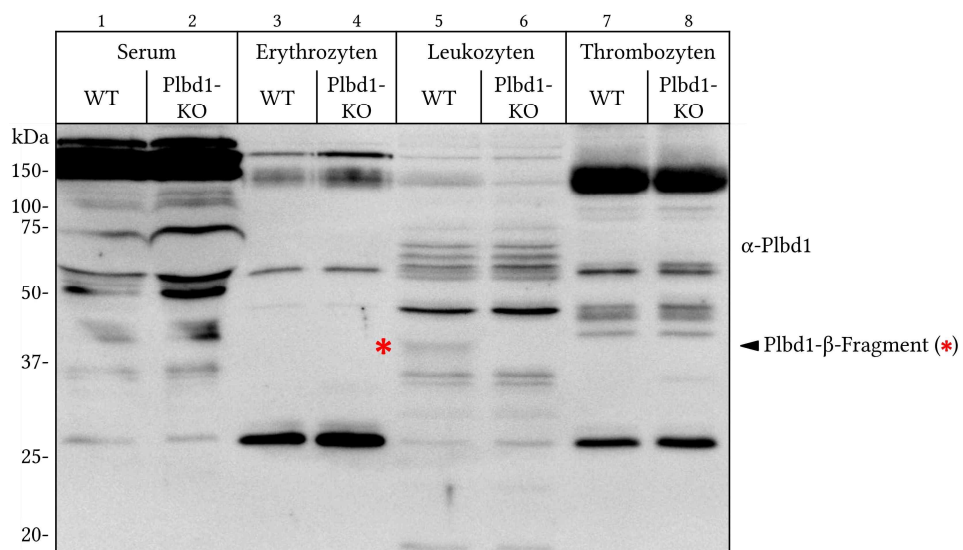


Abbildung 64: Western-Blot des Blutserums und der Hämatozyten aus WT- und Plbd1-KO-Mäusen.

WT- und Plbd1-KO-Tieren wurde postmortal etwa 700 μ L Blut entnommen und mit 50 μ L 0,5 M EDTA gerinnungsunfähig gemacht. Die Hämatozyten wurde pelletiert, das Serum abgenommen und die Zellen im gleichen Volumen in NH_4Cl -haltigem Lysepuffer aufgenommen. Die lysierten Erythrozyten wurden mit dem Überstand abgenommen, das lyseresistente Thrombozytenpellet ab gespült und die Leukozyten in Triton-haltigem Lysepuffer resuspendiert. 50 μ g aller Fraktionen wurden zu SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit Plbd2-„Denat.“-Antikörper.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Plbd1 in WT-Leukozyten nachzuweisen war und in Plbd1-KO-Leukozyten nicht mehr detektiert werden konnte, sollte überprüft werden, ob Abweichungen in den jeweiligen Leukozyten-Subpopulationen festzustellen sind. Dazu wurde postmortal aus WT-

und Plbd1-KO-Mäusen Blut entnommen, mit EDTA behandelt und ein Differentialblutbild erstellt (MVZ Diamedis Diagnostische Medizin Sennestadt GmbH).

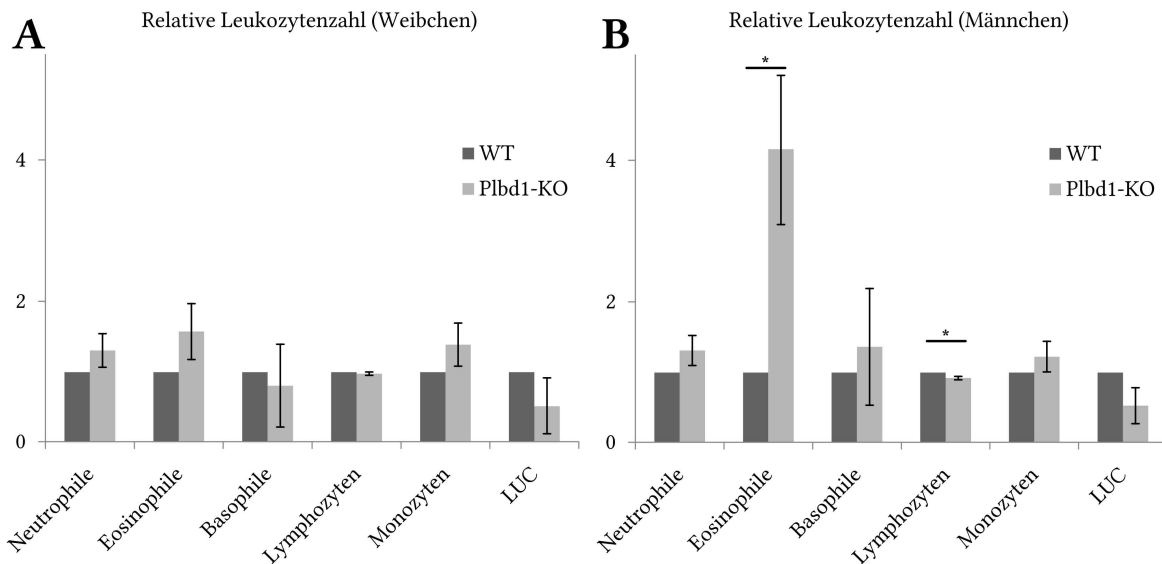


Abbildung 65: Leukozyten-Subpopulationen in WT- und Plbd1-KO-Mäusen.

Aus WT- und Plbd1-KO-Mäusen (jeweils 5 Weibchen (A) und 5 Männchen (B), 30 - 34 Wochen) wurde postmortal zwischen 270 μ L und 750 μ L Blut entnommen und mit 50 μ L 0,5 M EDTA gerinnungsunfähig gemacht. Die Erstellung des Differentialblutbildes wurde in einem veterinärmedizinischen Analyselabor in Auftrag gegeben. Aufgrund der unterschiedlichen Verdünnung durch EDTA sind die Werte der absoluten Leukozytenzahlen stark fehlerbehaftet, es können nur die relativen Leukozyten-Subpopulationen wiedergegeben werden. Dargestellt ist der Anteil der Granulozyten (neutrophile, eosinophile, basophile), Lymphozyten, Monozyten und nicht näher charakterisierten LUC (*large unstained cells*) als das Vielfache der WT-Werte. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler, anhand dessen die Signifikanzen berechnet wurden. $n = 5$, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Wie in Abbildung 65A dargestellt, wiesen die relativen Leukozytenzahlen bei den untersuchten Plbd1-KO-Weibchen im Vergleich mit WT-Kontrolltieren keine signifikanten Abweichungen auf. Lediglich eine Tendenz zu erhöhten Zahlen von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Monozyten deutete sich an. Bei der Analyse der fünf Plbd1-KO-Männchen stellte sich eine signifikant ($P = 0,017$) erhöhte Zahl von eosinophilen Granulozyten dar (Abbildung 65B). Der große Fehlerbalken resultierte dabei aus der hohen Schwankung der relativen Anteile, die bei dem 2,4 - 8-fachen der WT-Anteile lagen (Daten siehe Anhang). In den Blutproben der Plbd1-KO-Weibchen war nur eine Tendenz zu erhöhten Zahlen an Monozyten und neutrophilen Granulozyten zu beobachten. Der Anteil der Lymphozyten wies eine signifikante ($P = 0,012$) Verringerung auf, die möglicherweise aus der relativen Erhöhung der eosinophilen Granulozyten resultierte.

Das Plbd1 konnte im Western-Blot in den Leukozyten von WT-Tieren nachgewiesen werden und war in Plbd1-KO-Tieren nicht mehr detektierbar (Abbildung 64). Im Differentialblutbild wiesen eosinophile Granulozyten in Plbd1-KO-Männchen im Vergleich zu WT-Tieren eine signifikante Erhöhung auf (Abbildung 65).

4.4.8 Expression von Plbd1 und Plbd2 in Makrophagen und Knochenmarkszellen

Das Expressionsmuster von Genen im Gesamtorganismus kann über den Abgleich mit Microarray-Datenbanken erfolgen, in denen das Transkriptom unterschiedlicher Zelltypen und Gewebe quantifiziert wird. Die Verteilung des Plbd1 (Sonde 1448786_at) und des Plbd2 (Sonde 1423425_at) wurde im Datensatz „GeneAtlas MOE430, gcrma“ (Lattin *et al.*, 2008) mit 91 untersuchten Proben beurteilt (BioGPS; Wu *et al.*, 2009). Die Expression der jeweiligen Transkripte ist als Vielfaches der mittleren Expression aller untersuchten Gewebe in Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 25: Expression von Plbd1 und Plbd2 Transkripten in verschiedenen Geweben.

Aufgeführt ist die Expression von Plbd1 und Plbd2 Transkripten in ausgewählten Zelltypen nach „GeneAtlas MOE430, gcrma“ (Lattin *et al.*, 2008) als Vielfaches der mittleren Expression in allen untersuchten Zelltypen (Median). Gezeigt sind die Zelltypen der höchsten Expression für Plbd1 (Sonde 1448786_at) oder Plbd2 (Sonde 1423425_at) gemessen über Mikroarray-Analysen in 91 Zelltypen und Geweben. Grün hinterlegt sind Werte die mindestens 25-fach (Plbd1) oder 2,5-fach (Plbd2) über dem Median liegen.

Zelltyp	Plbd1	Plbd2
Dendritische Zellen (Myeloid, CD8 α ⁻)	342,6 \pm 31,8	1,0 \pm 0,1
Dendritische Zellen (Lymphoid, CD8 α ⁺)	340,4 \pm 8,5	0,7 \pm 0,0
Dendritische Zellen (Plasmazytoid, B220 ⁺)	46,0 \pm 0,8	1,2 \pm 0,2
Makrophagen (peritoneal)	5,9 \pm 0,0	15,1 \pm 0,1
Makrophagen (Knochenmark)	0,2 \pm 0,0	6,5 \pm 0,1
Mikroglia	0,3 \pm 0,0	13,5 \pm 3,3
Granulozyten (Mac1 ⁺ , gr1 ⁺)	104,5 \pm 29,5	0,5 \pm 0,1
Mast Zellen	0,2 \pm 0,0	4,4 \pm 0,5
Milz	104,0 \pm 14,0	1,1 \pm 0,1
Lymphknoten	128,3 \pm 10,8	1,8 \pm 0,0
Osteoblast (Tag 21)	0,4 \pm 0,0	7,8 \pm 0,3
Osteoclast	6,3 \pm 0,1	6,3 \pm 0,3
Knochenmark	110,7 \pm 7,4	0,7 \pm 0,1
Knochen	85,5 \pm 2,5	0,4 \pm 0,0
Braunes Fettgewebe	84,0 \pm 1,8	2,7 \pm 0,0
Hoden	18,6 \pm 0,7	8,1 \pm 0,8

Die höchste relative Expression des Plbd1 war in Dendritischen Zellen, Granulozyten, Milz, Lymphknoten und Knochenmark zu messen. Die Plbd2-Expression war besonders in Makrophagen, Mikroglia, Osteoblasten, Osteoclasten und Hoden hoch. Auffällig ist eine wechselweise Verteilung der Plbd1- und Plbd2-Expression: Zelltypen mit einer hohen Expression an Plbd1 wiesen eine nur geringe Expression des Plbd2 auf, gleiches galt entgegengesetzt für Zelltypen mit einer hohen relativen Plbd2-Expression. Dabei schienen die myeloiden, lymphoiden und plasmazytoiden Dendritischen Zellen, die über einen gemeinsamen Vorläufer (*common dendritic cell precursor*, CDP) aus myeloiden Vorläuferzellen (*macrophage-dendritic-cell-progenitor*, MDP) entstehen (Geissmann *et*

al., 2010), besonders Plbd1 zu exprimieren. Die untersuchten Zelltypen, die sich über den MDP-Vorläufer aus Monozyten entwickeln, also Makrophagen, Mikroglia und Osteoclasten, schienen besonders Plbd2 zu exprimieren.

Im Knochenmark konnte in der Microarray-Untersuchung eine starke Expression des Plbd1 detektiert werden, die möglicherweise auf die CDP- und MDP-Vorläuferzellen zurückzuführen ist. Es sollte untersucht werden, ob sich bei Differenzierung von Knochenmarks-Vorläuferzellen entlang der Monozytären-Entwicklungslinie die Expression der Proteine Plbd1 und Plbd2 verändert.

Zur Differenzierung von Knochenmarkszellen in Zellkultur kann das Kulturmedium mit Wachstumsfaktoren konditioniert werden, die zur Entwicklung verschiedener Zelltypen führen. Durch die Zugabe von Makrophagen-*colony-stimulating-factor* (M-CSF) entwickelt sich eine Zellpopulation mit Makrophagen-Eigenschaften (*bonemarrow derived macrophages*, BMMs). Zellen, die den natürlichen Dendritische Zellen ähneln (*bonemarrow derived dendritic cells*, BMDCs), können durch die Zugabe von Granulozyten/Makrophagen-*colony-stimulating-factor* (GM-CSF) erzeugt werden (Lacey *et al.*, 2012). Anstelle des rekombinanten M-CSF kann der Zellkulturüberstand von L929-Zellen verwendet werden, die unter anderem M-CSF und GM-CSF in das Medium sekretieren (Englen *et al.*, 1995) und die Differenzierung der Knochenmarkszellen zu einer homogenen Population von Makrophagen induzieren (Weischenfeldt, Porse, 2008).

Knochenmarkszellen aus den Oberschenkelknochen von WT- und Plbd1-KO- bzw. Plbd2-KO-Tieren wurden isoliert und mit L929-konditioniertem Medium kultiviert. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet, lysiert und die Expression von Plbd1 und Plbd2 im Western-Blot analysiert. Bei der Detektion mit dem Plbd1-Antikörper war zu erkennen, dass die Bande des Plbd1- β -Fragments bei 40 kDa in WT-Knochenmarkszellen an Tag 0 (Lane 2), also vor der Zugabe von Wachstumsfaktoren, als starkes Signal detektiert werden konnte (Abbildung 66A). Neben der spezifischen Bande bei 40 kDa traten diverse weitere Banden auf, die jedoch im Lysat der Plbd1-KO-Knochenmarkszellen (Lane 1) mit gleicher Intensität detektiert werden konnten und somit höchstwahrscheinlich nicht Plbd1-spezifisch sind. An Tag 1 und Tag 2 im konditionierten Medium nahm die Intensität der Plbd1-Bande deutlich ab, an Tag 3 war ein Minimalwert erreicht, der bis zum finalen Tag 6 erhalten blieb. Die schwache Bande der differenzierten WT-Zellen bei 40 kDa an Tag 6 (Lane 8) war in differenzierten Plbd1-KO-Zellen in Lane 9 nicht zu detektieren.

Mit dem Plbd2-66G9-Antikörper trat bei den WT-Zellen in Abbildung 66B Lane 2 eine schwache Bande bei etwa 26 kDa auf, die für die Plbd2-KO-Knochenmarkszellen in Lane 1 nicht detektiert werden konnte. An den Differenzierungstagen 1 und 2 nimmt die Intensität der Bande zunächst ab, steigt ab Tag 3 jedoch wieder an und bildet an Tag 6 ein deutliches Signal. Aufgrund der apparenten

Größe scheint es sich um das β 2-Fragment des Plbd2 zu handeln, das α -Fragment ist nicht zu detektieren, was möglicherweise auf die geringe Signalintensität zurückzuführen ist. Das Plbd2- β -Intermediat ist bei etwa 42 kDa von Tag 3 bis Tag 6 zu erkennen, die Bande bei etwa 70 kDa, die besonders an Tag 3 (Lane 5) deutlich zu erkennen ist, könnte dem Pro-Plbd2 entsprechen.

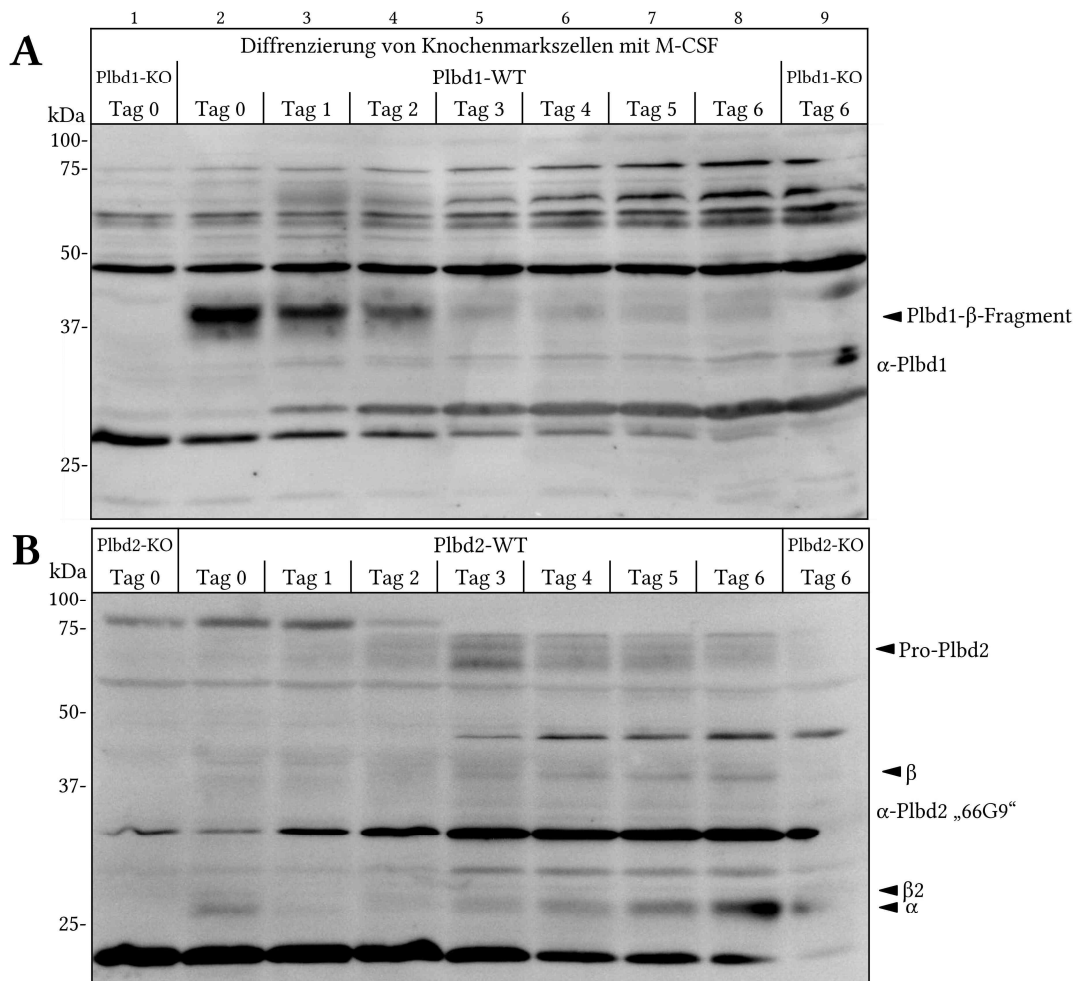


Abbildung 66: Western-Blot von Knochenmarkszellen differenziert mit L929-konditioniertem Medium.

Die Knochenmarkszellen aus den Oberschenkelknochen von WT- und Plbd1-KO- oder Plbd2-KO-Mäusen wurden isoliert und in Zellkultur mit 30 % L929-konditioniertem Medium für 6 Tage differenziert. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und lysiert. Von den aufgearbeiteten Lysaten wurden 75 μ g zur SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran eingesetzt. Neben den WT-Lysaten wurden Lysate von Knochenmark (Lane 1) oder ausdifferenzierten Zellen (Lane 9) von Plbd1-KO-Tieren (A) oder Plbd2-KO-Tieren (B) aufgetragen. Der Nachweis erfolgte mit dem Plbd1-„Denat“-Antikörper (A) oder dem Plbd2-66G9-Antikörper (B).

Während Plbd1 besonders im Knochenmark und in Dendritischen Zellen detektiert wird, liegt die höchste Expression des Plbd2 in Zellen der monozytären Entwicklungslinie vor. Im Western-Blot konnte in WT-Knochenmarkszellen ein starkes Signal für Plbd1 detektiert werden, dass bei der Differenzierung zu Makrophagen abnimmt. Das Signal des Plbd2 nimmt dagegen mit fortschreitender Differenzierung der Knochenmarkszellen zu.

4.4.9 Histologie und indirekte Immunfluoreszenz in Hoden aus Plbd1-KO-Mäusen

Innerhalb der untersuchten Gewebe konnte die höchste Plbd1-mRNA-Expression und ein starkes Proteinsignal im Western-Blot in den Hoden detektiert werden. Dieses Gewebe sollte deshalb histologisch auf etwaige Veränderungen untersucht werden. Aufgrund der hohen Brüchigkeit des Gewebes in Gefrierschnitten wurden die Hoden in Paraffin eingebettet, auf 7 μm geschnitten und für die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) oder die Immunfluoreszenz-Analysen auf einem Objektträger entparaffiniert.

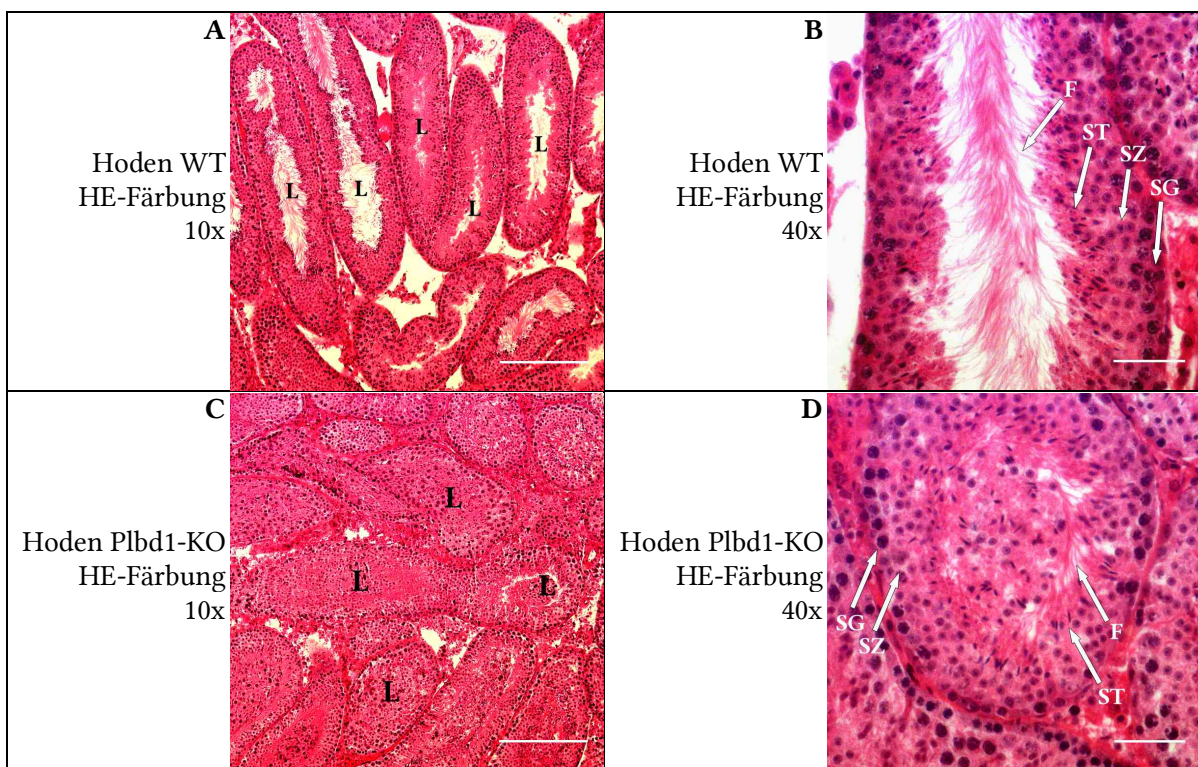


Abbildung 67: Gewebeschnitte von Hoden aus WT- und Plbd1-KO-Tieren.

Hoden aus WT- und Plbd1-KO-Tieren (15 Monate) wurden fixiert und in Paraffin eingebettet. 7 μm Schnitte wurden entparaffiniert und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. L Lumen, SG Spermatogone, SZ Spermatozyten, ST Spermatisden, F Flagellen. Maßstabsbalken entspricht 500 μm (A und C) bzw. 100 μm (B und D).

Das Gewebe der Hoden gliedert sich in Hodenläppchen, die jeweils ein oder mehrere stark geknäulte Hodenkanälchen (*tubuli seminiferi contorti*) enthalten, die in der Histologie im Anschnitt zu erkennen sind (Abbildung 67). Die Hodenkanälchen sind von einem Keimepithel ausgekleidet, das aus somatischen Sertoli-Zellen und den Keimzellen für die Spermatogenese gebildet wird. Im Lumen (L) der Hodenkanälchen sind im peripheren Bereich die Spermatogone (SG) und Spermatozyten (SZ) im Keimepithel von Sertoli-Zellen eingebettet. Im Zentrum sind die späten Spermatisden (ST) mit ihren Flagellen (F) erkennbar (Abbildung 67B). Die Sertoli-Zellen bilden die

Blut-Hoden-Schranke zwischen dem Lumen, in dem die Spermatogenese stattfindet, und dem Interstitium, einem stark durchbluteten Bindegewebe, in dem Makrophagen und Leydig-Zellen lokalisiert sind (Lüllmann-Rauch, 2015).

In den HE-gefärbten Schnitten der WT-Hoden war das Lumen (L) der Hodenkanälchen deutlich durch das Keimepithel vom Interstitium abgegrenzt (Abbildung 67A). Zudem waren bei 40facher Vergrößerung die Flagellen (F) der Spermatozoen (ST) im Lumen deutlich zu erkennen (Abbildung 67B). Im Hoden der Plbd1-KO-Tiere waren die Hodenkanälchen dicht mit Zellen besetzt, so dass nur ein sehr reduziertes Lumen erkennbar war (Abbildung 67C). In der Vergrößerung waren die Zellen als Spermatozyten und Spermatozoen erkennbar, deren Flagellen in das verbliebene Lumen reichten. Auch im Interstitium waren mehr Zellen im Plbd1-KO-Gewebe zu erkennen als im WT-Gewebe.

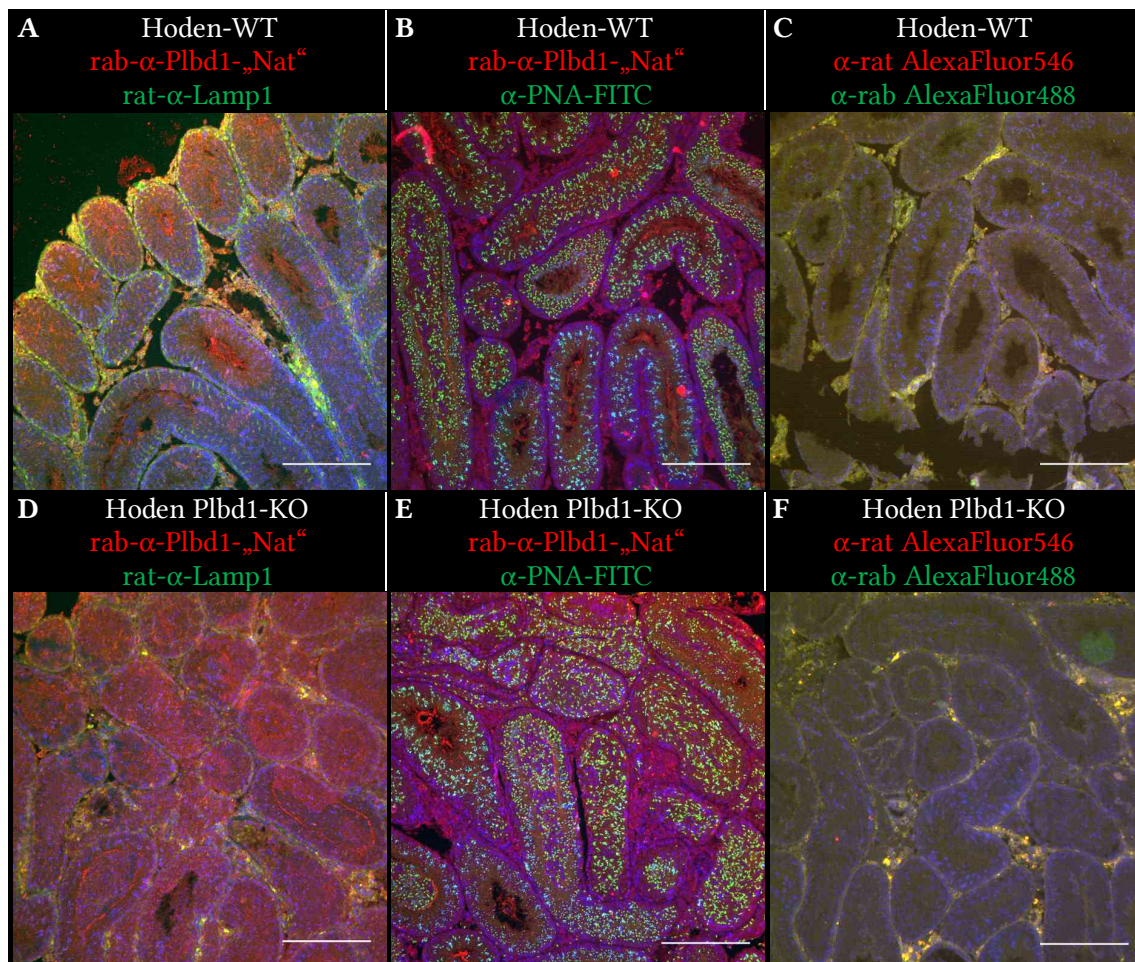


Abbildung 68: Indirekte Immunfluoreszenz auf Gewebeschnitten von Hoden aus WT- und Plbd1-KO-Tieren. Hoden aus WT- und Plbd1-KO-Tieren (15 Monate) wurden fixiert und in Paraffin eingebettet. 7 µm Schnitte wurden entparaffiniert, mit einem Antikörper gegen rab-α-Plbd1 „Nat“ (A, B, D, E) und entsprechendem AlexaFluor546-Zweitantikörper behandelt. Die Lysosomen wurden mit einem Antikörper rat-α-Lamp1 (A und D) und AlexaFluor488-Zweitantikörper markiert (A und D). Die Akrosomen in den Spermatozyten wurden mit einem FITC-gekoppelten *peanut*-Agglutinin-Lektin (PNA, B und E) markiert. Zweitantikörper-Kontrolle ohne primären Antikörper (C und F). Maßstabsbalken entspricht 500 µm.

Um Plbd1 in den Gewebeschnitten der Hoden zu lokalisieren, wurden die Schnitte mit dem Plbd1-Antikörper („Nat“) und Fluoreszenz-gekoppeltem Zweitantikörper gefärbt. Als Marker wurde ein Antikörper gegen das lysosomale Markerprotein Lamp1 verwendet. Alternativ wurde das Akrosom, das sich aus dem Golgi-Apparat entwickelt und in den Spermatischen einem Lysosom ähnelt, mit einem Fluoreszenz-gekoppelten *peanut*-Agglutinin-Lektin markiert, das die äußere akrosomale Membran bindet (Mortimer *et al.*, 1987).

Der polyklonale Antikörper gegen Plbd1 detektierte bei der Verwendung im Western-Blot mehrere Banden, die nicht spezifisch für das Plbd1 waren (Abschnitt 4.4.6). Nicht-spezifische Signale waren daher in der Immunfluoreszenz ebenfalls zu erwarten. Mit dem Antikörper wurden sowohl in Hoden-Schnitten aus WT-Tieren (Abbildung 68A und B) als auch aus Plbd1-KO-Tieren (D und E) die Flagellen der Spermatische im Lumen der Hodenkanälchen angefärbt. Im WT-Gewebe waren diese locker im Lumen angeordnet, im KO-Gewebe stellten sie sich teilweise als radiale Strukturen um die zentrale Zell-Ansammlung dar. Im WT-Gewebe schien die Färbung der Sertoli-Zellen mit dem Plbd1-Antikörper intensiver zu sein als im Plbd1-KO-Gewebe. Mit dem Lamp1-Antikörper konnte das Basal-Epithel (Myofibroblasten) um die Hodenkanälchen sowie Teile der Sertoli-Zellen gefärbt werden (Abbildung 68A und D). Die Färbung der Leydig-Zellen im Interstitium war auch in der Zweitantikörper-Kontrolle (C und F) zu detektieren und somit nicht spezifisch für Lamp1. Das verwendete Fluoreszenz-gekoppelte *peanut*-Agglutinin-Lektin (PNA) diente zum Nachweis des Akrosoms. Im WT-Gewebe (Abbildung 68B) konnten mit dem PNA die Akrosomen in den Spermatozyten und Spermatischen nachgewiesen werden. Die frühen Spermatische im peripheren Bereich der Hodenkanälchen verfügten noch nicht über ein Akrosom. Im Plbd1-KO-Gewebe (Abbildung 68E) ergab sich ein weniger strukturiertes Bild, da einige Hodenkanälchen in Gänze mit Spermatozyten gefüllt waren und zwischen den größeren Kanälchen weitere kleine, schmalere Hodenkanälchen zu liegen schienen.

Aufgrund der unspezifischen Färbung des Hintergrunds mit dem Plbd1-Antikörper, waren in den übrigen untersuchten Geweben (Leber, Milz, Lunge) in der Immunfluoreszenz keine eindeutigen Unterschiede zwischen WT und Plbd1-KO zu erkennen (nicht gezeigt).

4.4.10 Indirekte Immunfluoreszenz in WT- und Plbd2-KO-Gewebe

Eine hohe Plbd2-Expression konnte neben den Hoden auch in Hirn und Lunge von WT-Mäusen detektiert werden, während weniger Protein in Milz und Leber zu finden war (Abschnitt 4.4.6). Die Verteilung des Plbd2 in den Geweben sollte durch indirekte Immunfluoreszenz auf Gefrier-Gewebeschnitten analysiert werden. Aufgrund der geringen strukturellen Integrität des Hoden-Gewebes wurden keine Gefrierschnitte dieses Organs angefertigt. In den Schnitten von Lunge und

Milz war aufgrund des starken Hintergrundsignals bei Detektion mit dem Plbd2-60H1-Antikörper kein Unterschied zwischen WT- und Plbd2-KO zu erkennen (nicht gezeigt). Die Immunfluoreszenzen von WT- und Plbd2-KO-Leber wiesen hingegen Unterschiede auf und sind mit Kofärbung von Lamp1 bzw. dem Makrophagen-Marker F4/80 dargestellt (Abbildung 69). Während in der WT-Leber einige Zellen mit dem Plbd2-60H1-Antikörper angefärbt werden konnten und die Färbung sowohl mit Lamp1 als auch F4/80 kolokalisierte, konnte in der Plbd2-KO-Leber nur ein gleichmäßig schwaches Hintergrundsignal detektiert werden.

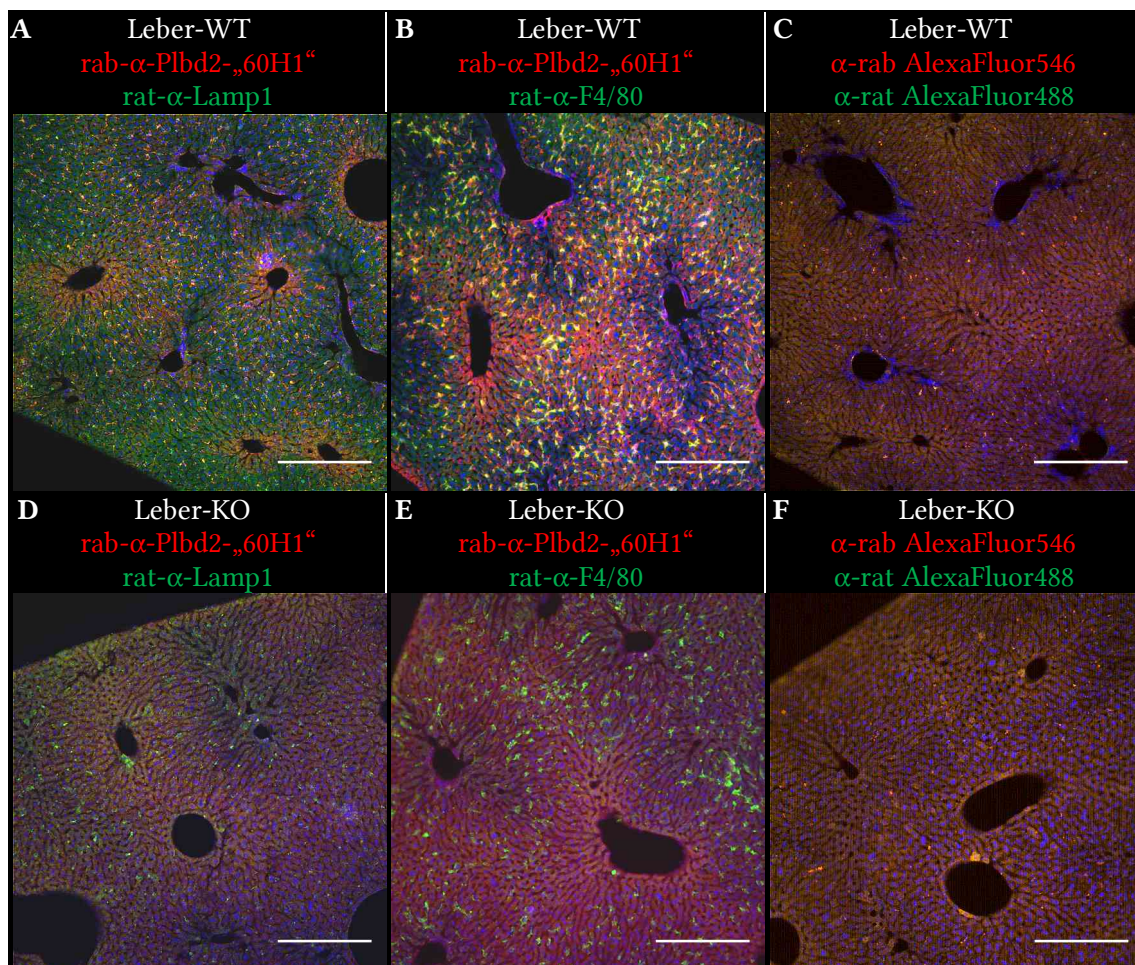


Abbildung 69: Indirekte Immunfluoreszenz auf Gewebeschnitten von Leber aus WT- und Plbd2-KO-Tieren. Die PFA-fixierte Leber von WT- und Plbd2-KO-Tieren (Männlich, 11 Monate) wurde zur Herstellung von 10 µm dicken Gewebeschnitten verwendet. Die Schnitte wurden mit Erstantikörpern gegen Plbd2 (60H1) und gegen das lysosomale Markerprotein Lamp1 (A/D) bzw. gegen den Makrophagen-Marker F4/80 (B/E) inkubiert. Als Zweitantikörper wurden ein AlexaFluor546- und ein AlexaFluor488-Antikörper verwendet (A-F). Die Zellkerne wurden mit Dapi gefärbt. Maßstabsbalken entsprechen 500 µm.

Um die Expression des Plbd2 im Hirn einzuordnen, wurde aus mehreren Immunfluoreszenz-Aufnahmen eines sagittalen Gefrier-Gewebeschnittes ein Übersichtsbild des WT-Hirns erstellt (Abbildung 70). Zur detaillierten Darstellung der Plbd2-Expression in einzelnen Hirnarealen wurden

Bereiche im Cerebellum, im Isocortex des Cerebrums und eines Plbd2-positiven Bereichs der Motorregion des Pons abgebildet (Abbildung 71).

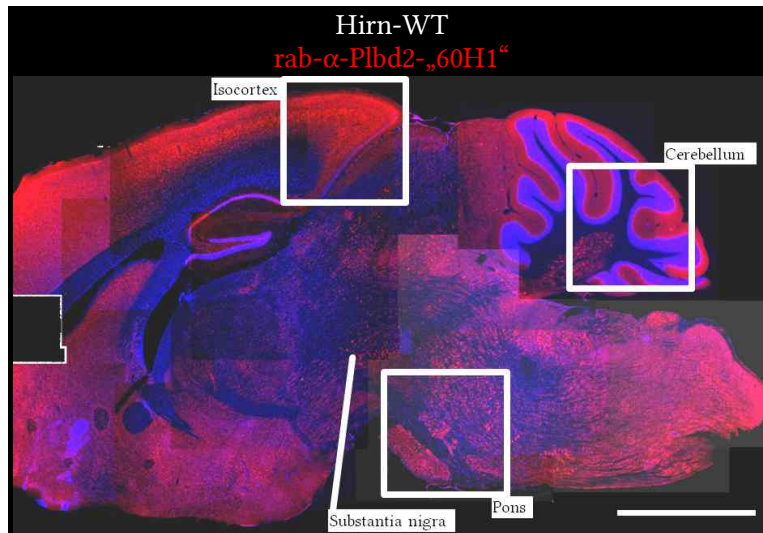


Abbildung 70: Verteilung des Plbd2-Signals in der indirekten Immunfluoreszenz im WT-Hirn.

PFA fixiertes WT-Hirn (Männlich, 11 Monate) ohne den olfaktorischen Bereich wurde zur Herstellung von 40 μm dicken Gewebeschnitten verwendet. Der Schnitt wurde mit einem Antikörper Plbd2-60H1 und einem entsprechenden Alexa546-Zweitantikörper gefärbt. Die Zellkerne wurden mit Dapi gefärbt. Übersichtsbild aus Einzelbildern zusammengesetzt. Maßstabsbalken entspricht 1 mm.

Während im Cerebellum von WT-Tieren mit dem Plbd2-60H1-Antikörper (Abbildung 71G) kein Signal zu detektieren war, das über die unspezifischen Signale im KO-Gewebe hinausging (Abbildung 71H), konnte im Isocortex eine Zellpopulation mit deutlichen Plbd2-spezifischen Signalen detektiert werden (Abbildung 71D). In der Motorregion des Pons war ein Bereich zu detektieren, in dem Zellen mit einem starken Plbd2-Signal nachzuweisen waren, die jedoch durch einen schmalen, vollständig Plbd2-negativen Bereich unterbrochen wurden (Abbildung 71D). In dem Plbd2-negativen Abschnitt waren die Dapi-gefärbten Zellkerne in Linien aufgereiht, während im umgebenen Bereich keine derartige Anordnung nachzuweisen war. Eine genaue Zuordnung der beschriebenen Region zu einem definierten Hirnareal konnte ohne Kolo-kalisation mit Zelltyp-spezifischen Markern nicht vorgenommen werden. Aufgrund der Lokalisation der Struktur scheint es sich jedoch um einen der Pons-Kerne (Nuclei pontis) zu handeln, die eine Verbindung zwischen dem primären motorischen Cortex der Großhirnrinde und dem Kleinhirn herstellen (Kalinovsky *et al.*, 2011).

Angrenzend an die Region des Pons im Hinterhirn (Metencephalon, *hindbrain*) sind im ventralen Bereich des Mittelhirns (Mesencephalon, *midbrain*) die dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* zu finden (Prediger *et al.*, 2014). Auch in diesem Bereich konnten Plbd2-positive Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 70).

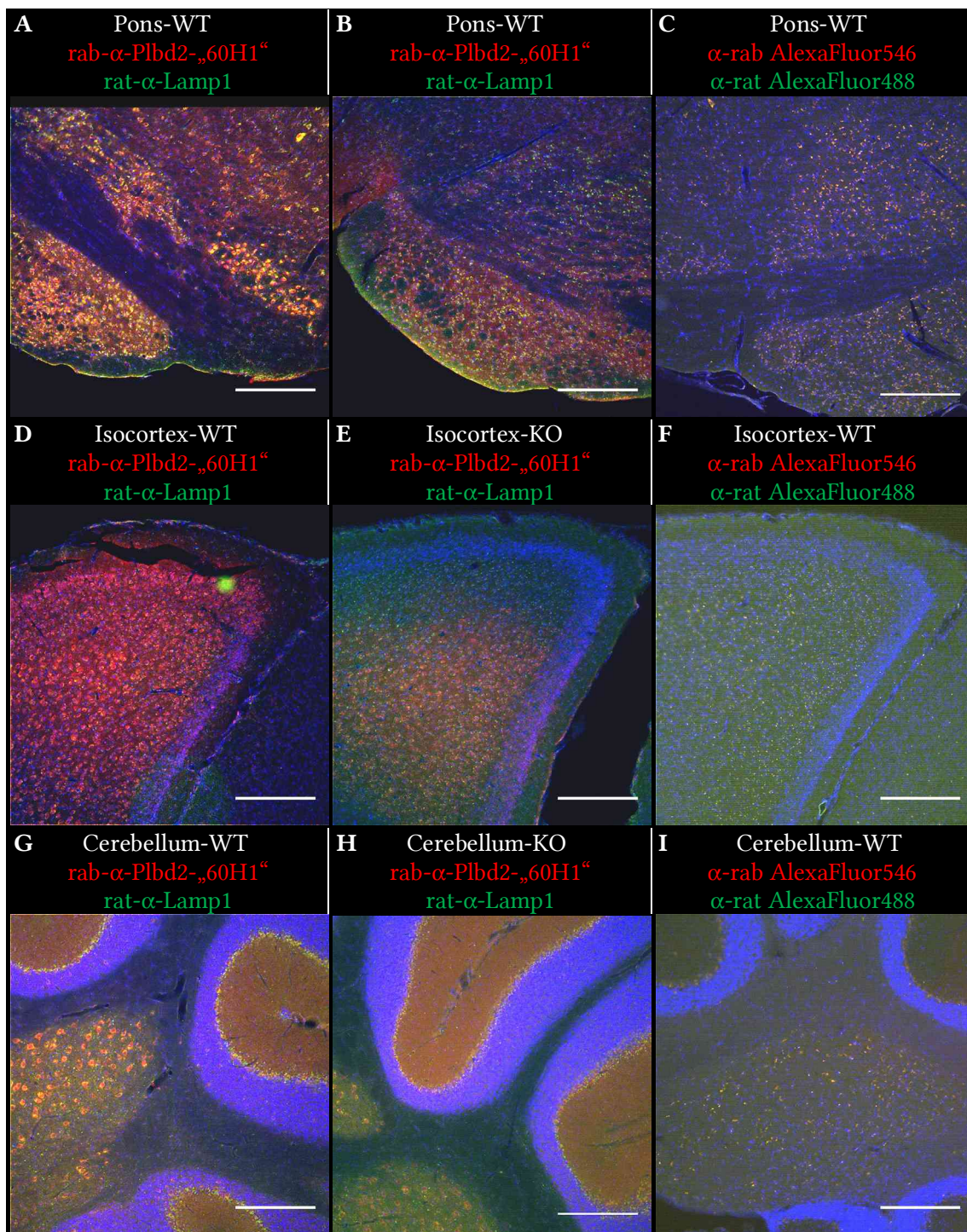


Abbildung 71: Indirekte Immunfluoreszenz auf Gewebeschnitten von Hirn aus WT- und Plbd2-KO-Tieren.

Das PFA-fixierte Hirn von WT- und Plbd2-KO-Tieren (Männlich, 11 Monate) wurde zur Herstellung von 40 μ m dicken Gewebeschnitten verwendet. Die Schnitte wurden mit Erstantikörpern gegen Plbd2 (60H1) und gegen das lysosomale Markerprotein Lamp1 bzw. als Negativkontrolle ausschließlich mit Zweitantikörper (C/F/I) inkubiert. Als Zweitantikörper wurden ein AlexaFluor546- und ein AlexaFluor488-Antikörper verwendet (A-F). Die Zellkerne wurden mit Dapi gefärbt. Maßstabsbalken entsprechen 500 μ m.

5 Diskussion

Das Protein Plbd2 (Phospholipase B-Domain containing 2) konnte erstmals in einer Proteomanalyse Mannose-6-Phosphat (M6P)-modifizierter lysosomaler Proteine beschrieben werden (Kollmann *et al.*, 2005; Sleat *et al.*, 2005). Die lysosomale Lokalisation, die durch die M6P-Modifikation impliziert wurde, konnte über indirekte Immunfluoreszenz-Analyse in Zellkultur (Kollmann *et al.*, 2005) und in Lysosomen-angereicherten Fraktionen der murinen Leber (Tritosomen; Deuschl *et al.*, 2006) bestätigt werden. Anhand seiner Kristallstruktur wurde das Plbd2 der Proteinfamilie der N-terminal nukleophilen Hydrolasen (Ntn-Hydrolasen) zugeordnet (Lakomek *et al.*, 2009). Die Plbd2-Strukturdaten ermöglichten auch die Kristallisation des homologen Proteins Plbd1 und dessen Zuordnung zur Familie der Ntn-Hydrolasen (Repo *et al.*, 2014). Wenngleich durch die Zuordnung zur Ntn-Hydrolase-Familie eine Amidase-Aktivität als wahrscheinlich anzusehen ist, konnten die Substrate von Plbd1 und Plbd2 bisher nicht identifiziert werden. Der Defekt einzelner lysosomaler Proteine führt in der Regel zur Entstehung einer lysosomalen Speichererkrankung (*lysosomal storage disorder*, LSD), von denen bisher etwa 50 bekannt sind (Ballabio, Gieselmann, 2009). Die Charakterisierung neuer lysosomaler Proteine wie Plbd1 und Plbd2 könnte demnach zum Verständnis neuer LSDs beitragen, bei denen die molekularen Ursachen bisher nicht identifiziert wurden (Sleat *et al.*, 2007).

An der Charakterisierung des Plbd2 besteht zudem kommerzielles Interesse, da das Protein als Kontaminante bei der Herstellung therapeutischer Glykoproteine auftrat (Valente *et al.*, 2015) und als solche in mehreren klinischen Studien eine Immunreaktion von Versuchsteilnehmern auslöste (Fischer *et al.*, 2016).

Gegenstand dieser Arbeit war die weitere Charakterisierung der homologen lysosomalen Proteine Plbd1 und Plbd2, deren physiologische Funktionen auch Jahre nach ihrer Identifizierung nicht bekannt sind. Besonders Plbd2 wurde im Hinblick auf dessen Prozessierung und lysosomale Sortierung untersucht, wobei in dieser Arbeit das bislang postulierte Prozessierungsschema des Plbd2 (Deuschl *et al.*, 2006) widerlegt werden konnte. Um sich der Funktion der Proteine durch einen revers-genetischen Ansatz zu nähern, wurden ferner *knockout*-Mausmodelle für die Gene von Plbd1 und Plbd2 erstellt.

5.1 Autokatalytische Prozessierung des Pro-Plbd2

Eine Gemeinsamkeit aller bekannten Ntn-Hydrolasen ist die autokatalytische Spaltung des Vorläuferproteins in ein N-terminales α - und ein C-terminales β -Fragment, wodurch das katalytische Nukleophil freigelegt wird (Oinonen, Rouvinen, 2000). Die katalytisch aktive Aminosäure kann dabei, wie bei Plbd2, durch ein Cystein oder alternativ durch ein Serin bzw. ein Threonin gebildet werden (Pei, Grishin, 2003). Durch eine weitere Spaltung kann ein Linkerpeptid entfernt und das aktive Zentrum für das Substrat zugänglich gemacht werden (Kim *et al.*, 2006). Eine proteolytische Prozessierung ist auch bei anderen lysosomalen Enzymen eine Bedingung für deren Aktivierung (Turk *et al.*, 2012) und sollte unter diesem Aspekt auch für das Plbd2 nachvollzogen werden, um einen *in vitro* Enzym-Assay mit rekombinant hergestelltem Protein und potentiellen Substraten zu ermöglichen.

5.1.1 Plbd2-WT, aber nicht die Mutante-C249S, wird *in vitro* autokatalytisch gespalten

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Azidifizierung eine Bedingung für die autokatalytische Spaltung des Pro-Plbd2 *in vitro* darstellt (Abschnitt 4.1.3), was auch für weitere Cystein-Ntn-Hydrolasen gezeigt werden konnte (Lodola *et al.*, 2012). Schon nach kurzer Inkubation des aufgereinigten Pro-Plbd2 in saurem Puffer, konnte eine deutliche Spaltung in ein Pro- α - und ein β -Fragment beobachtet werden. Die autokatalytische Spaltung schien somit mit schneller Kinetik abzulaufen, führte dabei, im Gegensatz zu anderen Ntn-Hydrolasen (Shtraizent *et al.*, 2008), jedoch auch nach mehrtägiger Inkubation nicht zur Spaltung des gesamten Pro-Plbd2 in die Fragmente Pro- α und β .

Das Cystein249 im aktiven Zentrum ist dabei zwingende Voraussetzung für die autokatalytische Spaltung *in vitro*, so konnte bei Inkubation der aufgereinigten Plbd2-Mutante C249S in saurem Acetatpuffer keine Spaltung des Pro-Plbd2 gezeigt werden. Während in anderen Ntn-Hydrolasen ein Serin die katalytische Aminosäure bilden kann (Hewitt *et al.*, 2000), scheint dieses im Plbd2 die Funktion des Cysteins nicht ersetzen zu können.

5.1.2 Die Plbd2-C249S-Mutante wird intrazellulär proteolytisch gespalten

Bei Expression der Mutante Plbd2-C249S in Hela-Zellen wäre aufgrund des fehlenden Cystein-Nukleophils zu erwarten, dass die autokatalytische Prozessierung ausbleibt und ausschließlich die proteolytische Spaltung im Bereich des β -Fragments auftritt, sodass ein N-terminales α + β 1-Fusionsfragment und das C-terminale β 2-Fragment nachweisbar wäre. Tatsächlich konnten jedoch auch das α -Fragment und das β -Intermediat detektiert werden (Abschnitt 4.1.2), die aus der Ntn-charakteristischen Spaltung im Bereich des aktiven Zentrums resultieren und mit ähnlicher

Intensität wie im WT-Plbd2 auftraten. Die Fragmente konnten dabei anhand des *N*-Glykan-Musters eindeutig identifiziert werden. Da diese Spaltung sowohl bei der Überexpression der C249S- als auch einer C249A-Mutante intrazellulär, jedoch nicht im Zellkulturüberstand beobachtet werden konnte, ist die Beteiligung einer intrazellulären lysosomalen Protease an diesem Schritt wahrscheinlich. Eine proteolytische Spaltung eines 10-Aminosäuren Linkerpeptids, die auch bei einer autokatalytisch inaktiven Mutante im Lysosom auftritt, konnte ebenfalls für die lysosomale Ntn-Hydrolase Aga (Aspartyl-Glukosaminidase) gezeigt werden (Ikonen *et al.*, 1993) und ist ferner für die lysosomale Ntn-Hydrolase Naaa (NAE-*hydrolyzing acid amidase*) wahrscheinlich (Tsuboi *et al.*, 2005).

Durch die Inkubation der aufgereinigten Mutante Plbd2-C249A mit Lysosomen-angereicherten Fraktionen aus muriner Leber (Tritosomen), sollte die proteolytische Spaltung des Pro-Plbd2 *in vitro* nachvollzogen werden (Abschnitt 4.1.3). Bei der Zugabe der Tritosomen wurde das WT-Plbd2 fast vollständig gespalten, wohingegen die Mutante Plbd2-C249A durch die Zugabe der Tritosomen nicht spaltbar war. Aus den Daten kann geschlossen werden, dass die Zugabe der Lysosomen-angereicherten Fraktion die Spaltung des Pro-Plbd2 verstärken kann, jedoch nicht ausreichend ist, den Defekt der autokatalytischen Prozessierung zu kompensieren. Anstelle der Autokatalyse müsste eine lysosomale Endoprotease wie etwa Cathepsin (Cts) L, CtsD oder die AEP (Asparaginyll Endopeptidase) die initiale Spaltung des Linkerpeptids übernehmen. Möglicherweise war die relevante Endoprotease, deren Aktivität an Plbd2 *in vivo* zu beobachten war, unter den vorliegenden pH- oder Redox-Bedingungen nicht aktiv (Jordans *et al.*, 2009).

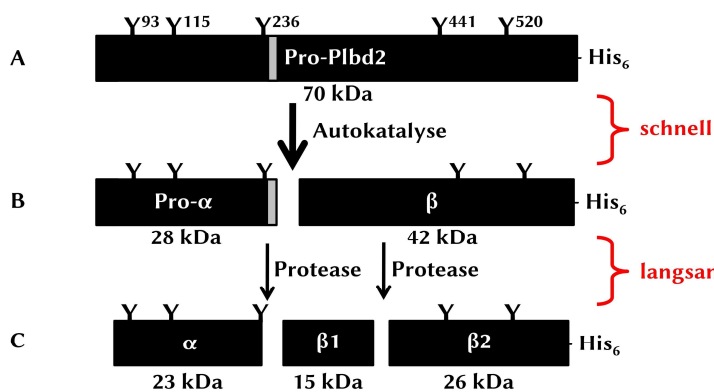


Abbildung 72: Schematische Darstellung der Prozessierung des Pro-Plbd2.

Dargestellt ist die schematische Anordnung der *N*-Glykane auf dem His₆-markierten Pro-Plbd2. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Autokatalyse überwiegt gegenüber den proteolytischen Prozessierungsschritten, weshalb bevorzugt die α- und β-Fragmente aus dem Pro-Plbd2 gebildet werden. Die Spaltung des β-Fragments und Abspaltung des Propeptids verlaufen langsamer.

Bei Überexpression der Mutante Plbd2-C249A wiesen die Banden des β-Fragments und des α+β1-Fusionsfragments im Western-Blot eine ähnliche Signalintensität auf (Abbildung 15), was eine ähnliche Kinetik der beiden zugrunde liegenden Prozessierungsschritte des Pro-Plbd2 vermuten lässt. Auch bei der Expression des Plbd2-WT waren beide Banden zu erkennen, wobei das Signal des β-Fragments deutlich stärker war als das des α+β1-Fusionsfragments. Für die Reaktionskinetik würde dies bedeuten, dass die autokatalytische Spaltung am aktiven Zentrum deutlich schneller abläuft als die proteolytische Spaltung im β-Fragment (Abbildung 72). Für mehrere Cathepsine

konnte gezeigt werden, dass die autokatalytische Prozessierung bereits kurz nach der Synthese in sauren prä-lysosomalen Kompartimenten stattfindet, während eine weitere proteolytische Spaltung erst deutlich später, vermutlich in den reifen Lysosomen, zu detektieren war (Mach, 2002). Wird die initiale autokatalytische Spaltung des Pro-Plbd2 durch die Mutation des Cys249 unterbunden, konkurrieren die proteolytischen Spaltungen mit ähnlicher Kinetik demnach im Lysosom um die Prozessierung des Pro-Plbd2, wobei entweder das β -Fragment oder das α + β 1-Fusionsfragment zuerst gebildet wird.

5.1.3 Das Pro- α -Fragment wird proteolytisch verkürzt

Die Aktivität einer lysosomalen Protease am Linkerpeptid nahe des aktiven Zentrums wurde bereits bei der Analyse der Kristallstruktur des Plbd2 postuliert, bei der ein Peptid von 10 - 12 Aminosäuren identifiziert werden konnte, das nach der autokatalytischen Spaltung am C-Terminus des α -Fragments in die aktive Tasche des Proteins reicht (Lakomek, 2009). Bei der Inkubation von rekombinantem Plbd2 mit Tritosomen *in vitro*, trat im Western-Blot eine zusätzliche Bande auf, die dem verkürzten α -Fragment ohne das Linkerpeptid entsprach. Die Abspaltung dieses Peptids setzt *in vitro* die Aktivität einer Carboxypeptidase voraus, die das Pro- α -Fragment nach der Autokatalyse verkürzen kann, aber nicht in der Lage wäre, die Plbd2-C249A-Mutante endoproteolytisch zu spalten. Neben den Cystein-Proteasen CtsZ und CtsB (Turk, Turk, 2008) kommen für den Abbau des Linkerpeptids auch die lysosomalen Serin-Carboxypeptidasen Scep1, CtsA und CtsG in Frage (Taylor, Tappel, 1974; Pan *et al.*, 2014).

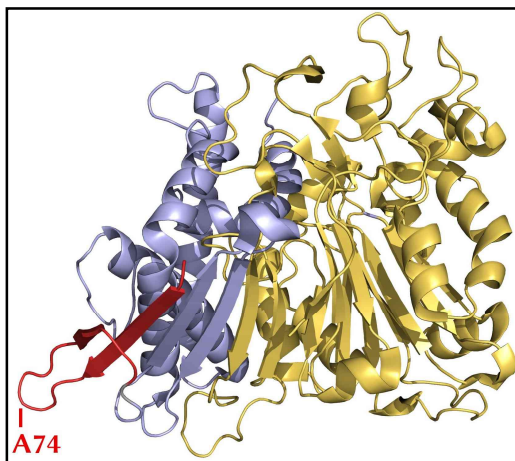


Abbildung 73: Tertiärstruktur des Plbd2.

Gezeigt ist die Tertiärstruktur des Plbd2 mit dem α -Fragment in Hellblau, dem β -Fragment in Gold und dem gering konservierten N-terminalen Bereich von L47 - F84 in Rot dargestellt, die Position des A74 ist in Rot hervorgehoben.

Um den Größenunterschied zwischen dem Pro- α -Fragment *in vitro* und dem α -Fragment *in vivo* zu begründen, ist die Abspaltung des 1,2 kDa-Linkerpeptids (Lakomek, 2009) nicht ausreichend. Da der C-Terminus des α -Fragments durch die Glykosylierung bei Asn236 definiert ist (Deuschl, 2008), ist eine N-terminale Verkürzung des Fragments wahrscheinlich. Der N-Terminus des Plbd2 ist erst ab His85 zwischen verschiedenen Spezies stark konserviert (Alignment siehe Anhang). Der weniger

konserverte Bereich zwischen Lys47 und Phe84 liegt in der Kristallstruktur des murinen Plbd2 jedoch an exponierter Position (Abbildung 73) und könnte besonders im Bereich der *loop*-Struktur um Ala74 Ziel einer Endopeptidase sein. Auch die sukzessive Verkürzung durch eine lysosomale Aminopeptidase (CtsH oder CtsC/DPPI) ist möglich und konnte beispielsweise für den N-Terminus von CtsB gezeigt werden (Rowan *et al.*, 1992).

5.1.4 Die Inkubation mit Tritosomen verstärkt die autokatalytische Spaltung

Die sukzessive Abspaltung des Linkerpeptids durch eine Carboxypeptidase erklärt nicht die verstärkte Spaltung des Pro-Plbd2 nach Zugabe der Tritosomen. Denkbar ist, dass die Autokatalyse des Plbd2 durch die Zugabe relevanter Kofaktoren aus den Tritosomen verstärkt wird. Für die Aktivierung des CtsD konnte gezeigt werden, dass eine Oligomerisierung des Pro-Enzyms mit Prosaposin bereits im Golgi-Apparat stattfindet und die autokatalytische Aktivierung in den Lysosomen stimuliert (Gopalakrishnan *et al.*, 2004). Auch für das Plbd2 wurde eine Interaktion mit CtsD postuliert (Kettwig, 2010), wobei ein Einfluss auf die autokatalytische Aktivierung durch eine Hetero-Oligomerisierung mit CtsD und Prosaposin möglich erscheint.

Ebenfalls möglich wäre ein kooperativer Effekt, bei dem matures Plbd2 die autokatalytische Prozessierung des Pro-Plbd2 verstärkt, so wie es für CtsB und Pro-CtsB gezeigt werden konnte (Rozman *et al.*, 1999). Ferner wurde für die Ntn-Hydrolase Aga nachgewiesen, dass die Dimerisierung des Proteins zu einer intramolekularen Spannung führt, die eine autokatalytische Spaltung am aktiven Zentrum begünstigt (Wang, Guo, 2003). Auch für das Plbd2 konnte eine Dimerisierung nachgewiesen werden (Kettwig, 2010), sodass ein ähnlicher, konzertierter Mechanismus bei der autokatalytischen Aktivierung denkbar ist.

5.2 Prozessierung des β -Fragments

Wie zuvor diskutiert, konnte eine autokatalytische Prozessierung in ein α - und ein β -Fragment für alle Proteine der N-terminal nukleophilen (Ntn)-Hydrolase Superfamilie beschrieben werden (Oinonen, Rouvinen, 2000). Die weitere Spaltung des β -Fragments in ein β_1 - und ein β_2 -Fragment konnte jedoch bislang ausschließlich für das murine Plbd2 beobachtet werden. Die Position der Spaltstelle im intermediären β -Fragment und die daraus resultierenden Größen des β_1 - und des β_2 -Fragments konnte bisher nicht zweifelsfrei aufgeklärt werden (Deuschl, 2008; Kettwig, 2010; Jensen *et al.*, 2007). Bei der Kristallisation des Plbd2 konnte ebenfalls nur die autokatalytische Spaltung an Cys249 beobachtet werden, da das eingesetzte rekombinante Protein aus Zellkulturüberstand aufgereinigt wurde (Lakomek *et al.*, 2009), wobei die proteolytische Prozessierung des β -Fragments ausschließlich intrazellulär stattfand (Abschnitt 4.1.2).

In vitro wurde ein C-terminales 15 kDa Plbd2-Fragment nachgewiesen (Deuschl *et al.*, 2006) und darauf aufbauend ein Prozessierungsschema entwickelt (Abschnitt 1.2.1). In dieser Arbeit konnte mit dem neu zur Verfügung stehenden Antikörper Plbd2-Crp76, der gegen die letzten 16 Aminosäuren des C-Terminus im Pro-Plbd2 gerichtet ist (Jensen *et al.*, 2007), das 15 kDa-Fragment überraschenderweise nicht detektiert werden. Stattdessen wurde ein etwa 26 kDa großes Peptid detektiert, das somit als β 2-Fragment den C-Terminus bildet. Es konnte gezeigt werden, dass dieses β 2-Fragment zweifach glykosyliert ist (Abbildung 16) und die N-Glykosylierung bei Asn441 einschließt (Abbildung 25). Entsteht durch die Spaltung des 42 kDa- β -Intermediates ein C-terminales 26 kDa β 2-Fragment, so muss das entsprechende N-terminale β 1-Fragment bei etwa 15 kDa liegen. Dieses β 1-Fragment *in vivo* scheint jedoch nicht identisch mit dem zuvor *in vitro* detektierten His₆-markierten 15 kDa-Fragment zu sein.

5.2.1 Die Proteasen AEP, CtsB und CtsL sind an der Spaltung des β -Fragments beteiligt

Die Spaltung des 42 kDa- β -Intermediates in ein β 1- und ein β 2-Fragment fand intrazellulär statt, konnte *in vitro* jedoch nicht nachvollzogen werden. Die Prozessierung läuft somit höchstwahrscheinlich nicht autokatalytisch ab, sondern ist zwingend von der Aktivität einer lysosomalen Protease abhängig. Wie hier gezeigt werden konnte, trat die proteolytische Spaltung des β -Intermediates bei Defizienz der Cystein-Cathepsine B und L oder der AEP in deutlich reduziertem Maße auf (Abschnitt 4.2). Die Defizienz von jeweils CtsB oder CtsL allein schien keine Auswirkung auf die Spaltung zu haben.

CtsL weist eine Endopeptidase-Aktivität auf (Turk *et al.*, 2012), während für CtsB eine Endo- und Carboxypeptidase-Aktivität gezeigt werden konnte (Musil *et al.*, 1991). Die Defizienz der Enzyme in der Maus führt für CtsL zu einem milden Phänotyp einer LSD mit periodischem Haarausfall (Roth *et al.*, 2000). CtsB-defiziente Mäuse sind phänotypisch unauffällig (Halangk *et al.*, 2000; Reinheckel *et al.*, 2001). Mäuse, die für beide Cathepsine B und L defizient sind, entwickeln hingegen eine lysosomale Speichererkrankung (LSD), die zwei bis vier Wochen nach der Geburt zum vorzeitigen Tod führt (Felbor *et al.*, 2002). Es wird somit davon ausgegangen, dass die Cathepsine B und L über ein überschneidendes Substratspektrum verfügen und Funktionsverluste wechselseitig kompensiert werden können (Stahl *et al.*, 2007). Eine Veränderung des Prozessierungsmusters von Plbd2 in CtsB/L-doppel-defizienten Zellen und eine unveränderte Plbd2-Prozessierung in den einzeldefizienten Tritosomen ist deshalb kein Widerspruch. Sollte die CtsB/L-vermittelte Spaltung des Plbd2 für dessen Aktivität relevant sein, trägt ein etwaiger Aktivitätsverlust des Plbd2 bei ausbleibender Prozessierung möglicherweise zur Pathophysiologie der CtsB/L-doppel-defizienten Mäuse bei.

Dass sowohl die Cathepsine B oder L als auch die AEP direkt an der Spaltung des Plbd2 beteiligt sind, ist unwahrscheinlich. Vielmehr wäre ein indirekter Effekt denkbar, bei dem sich die Aktivierung der Proteasen gegenseitig bedingt. Die Asparaginyl-Endopeptidase (AEP) ist eine Cystein-Protease, die Protein-Substrate hochspezifisch C-terminal von Asparaginyl-Resten spaltet (Chen *et al.*, 1998). In einigen Fällen kann auch ein Aspartyl-Rest an der Spaltstelle toleriert werden, der durch die Protonierung bei geringem pH-Wert in Größe und Ladung dem Asparagin ähnelt (Dall, Brandstetter, 2016). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung mehrerer Cathepsine in die mature *two-chain*-Form in AEP-defizienten Mäusen nicht stattfindet und es zur Akkumulation von lysosomalem Speichermaterial kommt (Shirahama-Noda *et al.*, 2003). Die Spaltstelle in der *single-chain* Form der murinen Cathepsine B und L liegt dabei direkt an einem Asparagin (Erickson, 1989), was eine Prozessierung durch die AEP wahrscheinlich macht. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Aktivität der Cathepsine B und L gegenüber artifiziellen Fluoreszenzsubstraten durch das Ausbleiben der Prozessierung in die *two-chain* Form nicht beeinträchtigt wird (Maehr *et al.*, 2005).

Bei der Überexpression von Plbd2 unter Protease-Inhibitor-Einfluss konnte gezeigt werden, dass die Spaltung des β -Intermediates von einer Cystein-Endoprotease abhängig ist (Abschnitt 4.2.1), zu denen auch CtsB und CtsL zählen (Turk, Turk, 2008). Auch die Abspaltung der C-terminalen RGS-His₆-Modifikation ist von einer Cystein-Protease abhängig, während die C- und N-terminalen Verkürzungen des α -Fragments nur teilweise auf Cystein-Proteasen zurückgehen. Eine C-terminale Verkürzung im Lysosom konnte analog auch für die Ntn-Hydrolase Aga beobachtet werden (Banning *et al.*, 2017).

5.2.2 Die proteolytische Spaltung findet an Asn394 statt

Um einen direkten Effekt der Asparaginyl-Endopeptidase (AEP) auf die Spaltung des Plbd2- β -Fragments in die Fragmente β 1 und β 2 zu untersuchen, wurden Plbd2-Mutanten erzeugt, in denen die AEP-relevanten Asparaginyl-Reste durch Glutamin substituiert wurden. Wird das Plbd2 anhand des entsprechenden Asparagins durch die AEP gespalten, sollte die Prozessierung des β -Fragments durch die Erzeugung der Glutamin-Mutante inhibiert werden (Sepulveda *et al.*, 2009).

Die Spaltstelle im β -Intermediat des Plbd2 wurde zuvor anhand des Spaltungsmusters auf einen Bereich zwischen Asp363 und Asn441 eingegrenzt, in dem fünf Asparagine als mögliche Spaltstellen liegen (Abschnitt 4.2.2). Die Mutante des Asn394 wies gegenüber dem WT-Plbd2 ein deutlich stärkeres Signal des β -Intermediates und ein vergleichsweise geringes Signal des β 2-Fragments auf. Wie bei der zeitabhängigen Expression der Plbd2-N394Q-Mutante zu erkennen war, wurde besonders das β 2-Fragment mit Verzögerung gebildet (Abschnitt 4.2.3). Ein vollständiges Ausbleiben

der Prozessierung konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die proteolytische Spaltung scheint somit nicht vollständig inhibiert worden zu sein, was bei einer direkten Aktivität durch die AEP an dieser Position jedoch zu erwarten gewesen wäre (Dall, Brandstetter, 2016). Eine direkte Spaltung des Plbd2 durch die AEP konnte an der Position N394 somit nicht festgestellt werden. Wahrscheinlicher ist ein indirekter Einfluss der AEP über die Aktivierung von Cathepsin B oder L, die wiederum direkt an der Prozessierung des Plbd2 beteiligt sein könnten.

Aufgrund des sehr heterogenen Substratspektrums von CtsB und CtsL (MEROPS Database; Rawlings *et al.*, 2014) ist eine Prozessierung nahe der Asn394-Position denkbar, die folglich in der N394Q-Mutante mit abweichender Kinetik ablaufen könnte. Für eine Prozessierung um das Asn394 spricht auch dessen exponierte Position in der Tertiärstruktur (Abbildung 26). Zudem liegt das untersuchte Asn394 in einer zwischen verschiedenen Säugetieren stark konservierten Sequenz und ist in Maus, Ratte oder Hamster zu finden. In den Orthologen aus Mensch, Rind oder Schwein ist das Asparagin jedoch durch ein Glycin substituiert (Alignment siehe Anhang). Interessanterweise konnte bei der Untersuchung des humanen Plbd2 zudem keine Spaltung des β -Fragments beobachtet werden (Jensen *et al.*, 2007).

5.2.3 Plbd2-Prozessierung mit rekombinanten Proteasen *in vitro*

Um die proteolytische Prozessierung des Plbd2 *in vitro* nachzuvollziehen, wurden die Cathepsine B und L rekombinant exprimiert und aus Zellkulturüberstand aufgereinigt. Die Cathepsine konnten, wie anderweitig beschrieben (Turk *et al.*, 2012), durch Azidifizierung autokatalytisch aktiviert werden (Abschnitt 4.2.5) und wurden ferner durch kommerziell erworbene, rekombinante AEP in die *two-chain*-Form gespalten. Auch die Cystein-Protease AEP wurde durch Inkubation in saurem Puffer aktiviert, wobei jedoch kein Bezug zu den lysosomalen Cystein-Proteasen der *papain-like* C1-Familie wie CtsB und CtsL besteht. Vielmehr weist die AEP Merkmale auf, die einen evolutionären Zusammenhang mit den Caspasen nahelegen (Li *et al.*, 2003).

Die spezifische Aktivität der Proteasen gegenüber artifiziellen Fluoreszenz-Substraten lag in der Größenordnung von kommerziell erhältlichen Enzymen (R&D Systems) und wurde bei Spaltung der Cathepsine durch AEP nicht nennenswert verstärkt (Shirahama-Noda *et al.*, 2003). Ein Unterschied zwischen *single-chain*- und *two-chain*-Form der Cathepsine ist hinsichtlich der Bindung und dem Umsatz physiologischer Substrate wie möglicherweise Plbd2 dennoch denkbar (Maehr *et al.*, 2005). Um einen Einfluss der AEP zu untersuchen, wurden die Cathepsine B und L sowohl einzeln mit Plbd2, als auch zusammen mit AEP und Plbd2 inkubiert.

5.2.3.1 Das Pro- α -Fragment wird von CtsL endoproteolytisch oder von CtsB carboxyterminal gespalten

Bei der Inkubation des Plbd2 in saurem Acetatpuffer mit dem Reduktionsmittel DTT (Abschnitt 4.2.6) wurde das Pro-Plbd2 stärker gespalten (~80 % gespalten) als bei der Inkubation ohne DTT (~60 %; siehe auch Abschnitt 4.1.3). Es scheint somit eine gewisse DTT-Abhängigkeit der autokatalytischen Spaltung vorzuliegen, was darauf hindeutet, dass reduzierende Bedingungen für eine Aktivität am Cys249 erforderlich sind. Eine erhöhte Aktivität durch DTT konnte auch für die Ntn-Hydrolase PVA (Penicillin V Acylase) gezeigt werden (Rathinaswamy *et al.*, 2012).

Die Inkubation mit rekombinantem CtsB reduzierte den Anteil des Pro-Plbd2 deutlich (3 % ungespalten gegenüber 20 % ohne CtsB). Der Effekt des CtsB konnte durch die Zugabe von Proteinase-Inhibitor (PI) anstelle des DTT fast vollständig aufgehoben werden und hing somit direkt von der proteolytischen Aktivität des CtsB ab. Die Prozessierung des Pro-Plbd2 durch das CtsB konnte nur im WT-Plbd2 beobachtet werden, während die Prozessierung der autokatalytisch inaktiven Mutante Plbd2-C249A bei der Zugabe von CtsB ausblieb. CtsB scheint somit über seine Carboxypeptidase-Aktivität und nicht endoproteolytisch auf das Plbd2 zu wirken. Für eine Carboxyterminale Verkürzung spricht auch die Molekulargewichts-Verschiebung des Pro- α -Fragments, die nach Inkubation mit CtsB im Western-Blot detektiert wurde (Abschnitt 4.2.6).

Bei der Inkubation von Plbd2-WT und der Mutante Plbd2-C249A mit CtsL war eine Prozessierung des Pro-Plbd2 nachzuweisen, wobei in beiden Fällen das β -Fragment detektiert werden konnte. CtsL ist somit möglicherweise die Endoprotease, die auch *in vivo* die Spaltung der Plbd2-C249A-Mutante am aktiven Zentrum katalysieren kann. Eine längere Inkubation des Plbd2 mit aktivem CtsL könnte diese Ergebnisse untermauern. Der Abbau des Linkerpeptids durch CtsB erfolgt somit vermutlich nach vorheriger autokatalytischer Spaltung an Cys249 oder im Fall der inaktiven Mutante C249A nach endoproteolytischer Spaltung durch CtsL.

Die Abspaltung eines Linkerpeptids aus der aktiven Tasche konnte für diverse Ntn-Hydrolasen gezeigt werden (Aga: Saarela *et al.*, 1998; CA: Kim *et al.*, 2006; ASNase3: Schalk, Lavie, 2014). Während die Abspaltung des Linkerpeptids nach der Autokatalyse keinen Einfluss auf die Aktivität der Aga hat (Ikonen *et al.*, 1993), muss das Linkerpeptid für die Aktivierung der bakteriellen Ntn-Hydrolasen CA (Cephalosporin Acylase), PGA (Penicillin G Acylase) und PvdQ (*acyl-homoserine lactone acylase*) aus der aktiven Tasche entfernt werden (Yin *et al.*, 2011). Am Beispiel der CA konnte jedoch ebenfalls gezeigt werden, dass ein „Herausschwenken“ des Linkerpeptids ausreicht, um die aktive Tasche für kleine artifizielle Substrate freizugeben (Kim *et al.*, 2002).

In lysosomalen Präparationen aus dem Hirn von Mäusen mit Defizienzen für CtsB und CtsL konnte gezeigt werden, dass die Proteinmenge des Plbd2 im Vergleich zu WT-Tieren um Faktor 7,7 erhöht

ist und Plbd2 damit zu den zehn am stärksten hochregulierten Proteinen gehört (Stahl *et al.*, 2007). Auch in CtsL-defizienten Fibroblasten konnte gegenüber WT-Zellen eine höhere Plbd2-Expression, etwa um den Faktor 1,5 gemessen werden (Tholen *et al.*, 2013). Auch wenn die veränderte Expression aus der generellen, eventuell TFEB-abhängigen Regulation lysosomaler Proteine resultieren könnte (Sardiello *et al.*, 2009), kann ein funktioneller Zusammenhang zwischen Plbd2 und den Cathepsinen B und L in Betracht gezogen werden.

5.2.3.2 AEP spaltet das Plbd2 *in vitro*

Die Inkubation mit AEP steigert die Prozessierung des Pro-Plbd2 sowohl für das Plbd2-WT als auch für die Mutante Plbd2-C249A deutlich, sodass also eine direkte Aktivität der AEP gegenüber dem Plbd2 vorlag. Eine besonders deutliche Bande bei etwa 55 kDa war mit dem Plbd2-66G9- und einem Plbd2-Irp76-Antikörper detektierbar, wurde vom His₆-Antikörper und dem C-terminalen Plbd2-Crp76-Antikörper nicht jedoch erkannt. Der Irp76-Antikörper ist gegen ein Plbd2-Peptid der Ratte gerichtet, das dem murinen Peptid von Pro462 bis Ser472 entspricht (Jensen *et al.*, 2007). Damit dieses Fragment detektiert wird, musste die Spaltstelle der AEP somit hinter dem Ser472 liegen und ein Fragment von etwa 15 kDa einschließlich des His₆-markierten C-Terminus abgespalten werden. Ein entsprechendes Fragment wurde bereits für das Plbd2 *in vitro* beschrieben und durch Edman-Abbau das Ser514 als dessen N-terminale Aminosäure bestimmt (Deuschl *et al.*, 2006). Vor dem Ser514 liegt in der Proteinsequenz jedoch weder ein Asparaginy- noch ein Aspartyl-Rest (Sequenz siehe Anhang), anhand derer die AEP das Protein endoproteolytisch spalten könnte. Das Ser514 ist zudem in der Tertiärstruktur schlecht zugänglich (Lakomek, 2009; Abbildung 74), sodass es wahrscheinlicher ist, dass die beobachtete Spaltung durch die AEP an einem der exponierten benachbarten Asparagine stattfindet. Besonders geeignet scheint das Asn501, das als Spaltstelle in einem C-terminalen Fragment von 12 kDa resultieren würde und mit der Masse des N-Glykans bei Asn520 bei etwa 15 kDa liegen würde. Klarheit dazu könnte eine Mutationsanalyse wie in Abschnitt 4.2.2 bringen.

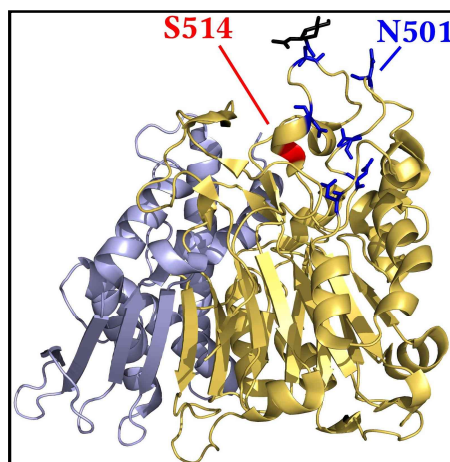


Abbildung 74: Tertiärstruktur des Plbd2.

Gezeigt ist die Tertiärstruktur des Plbd2 mit dem α -Fragment in Hellblau, dem β -Fragment in Gold. Das Serin S514 (Rot) und die Asparagine N487, N501, N505, N508, N517 und N520 sind mit ihren jeweiligen Seitenketten hervorgehoben (Blau). Das N-Glykan an N520 ist ebenfalls dargestellt (Schwarz).

Neben der Bande bei 55 kDa war nach Inkubation des Plbd2 mit AEP eine weitere Bande bei etwa 25 kDa ausschließlich mit dem Irp76-Antikörper zu detektieren. Aufgrund der apparenten Größe im Western-Blot musste das Fragment aus einer Spaltung der AEP etwa am aktiven Zentrum hervorgehen. Da die Intensität der 25 kDa Bande deutlich geringer war, als die der Bande bei 55 kDa, scheint diese Spaltung mit einer langsameren Kinetik abzulaufen. In den Ansätzen ohne AEP konnte die Bande bei 55 kDa ebenfalls schwach detektiert werden, möglicherweise kann diese auf ko-aufgeklärte AEP zurückgeführt werden, da das eingesetzte Plbd2 nur eine geringe Reinheit aufwies (Abschnitt 4.2.4).

Bei der Inkubation des Plbd2 mit AEP und CtsL war das Pro-Plbd2 im WT kaum detektierbar, während für die Plbd2-C249A-Mutante im entsprechenden Ansatz kein Protein nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise führte die Kombination der beiden Proteasen zum Abbau des Plbd2. Es konnte gezeigt werden, dass die AEP bei der Erzeugung von immunogenen Epitopen die initialen Spaltungen in Proteine einführt, die dann durch die Cathepsine S und L weiter abgebaut werden können (Hsing, Rudensky, 2005). Eine ähnliche Initialisierung der Degradation des Plbd2 durch die AEP ist auch bei der Inkubation *in vitro* denkbar. Die beobachtete Spaltung wäre demnach ein Artefakt des Abbaus des Plbd2, was erklären würde, warum die entsprechenden Banden endogen nicht zu beobachten sind (Abschnitt 4.4.6).

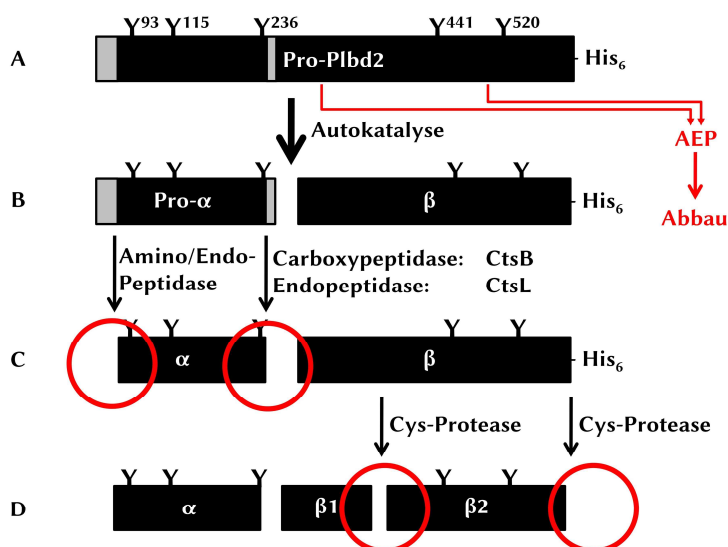


Abbildung 75: Schematische Darstellung der Prozessierung des Pro-Plbd2.

Dargestellt ist die schematische Anordnung der N-Glykane auf dem His₆-markierten Pro-Plbd2 sowie die postulierte Prozessierung. Das Pro-Plbd2 wird autokatalytisch in das Pro-α- und das β-Fragment gespalten (B). Das Linkerpeptid wird nach der Autokatalyse sukzessiv durch die Carboxypeptidase CtsB oder endoproteolytisch durch CtsL abgespalten (C). Das α-Fragment wird zudem durch eine unbekannte Protease N-terminal verkürzt. Die Spaltung des β-Fragments, vermutlich bei Asn394, ist wie die Abspaltung der His₆-Markierung auf eine unbekannte Cystein-Protease zurückzuführen (D). Die zwei Spaltungen durch die AEP leiten möglicherweise den Abbau des Proteins ein (A).

Nach der Analyse der proteolytischen Prozessierung des Plbd2 erscheint es sehr wahrscheinlich, dass die Cystein-Cathepsine B und L an der Spaltung des Plbd2 im Bereich des Linkerpeptids beteiligt sind (Abbildung 75B und C). Welche Bedeutung der Spaltung im C-terminalen Bereich des Plbd2 durch die AEP zukommt, bleibt zu untersuchen. Die Spaltung des β-Fragments in die β1- und β2-Fragmente der reifen Form ist vermutlich bei der Position des Asn394 zu erwarten, wobei die

daran beteiligte Cystein-Protease bisher nicht endgültig identifiziert werden konnte (Abbildung 75C und D). Die Beteiligung von CtsB und CtsL an dieser Spaltung ist aufgrund des Plbd2-Prozessierungsmusters in Fibroblasten mit Defizienzen einzelner Hydrolasen wahrscheinlich.

Es konnte gezeigt werden, dass die initiale Prozessierung des Pro-Plbd2 in ein Pro- α - und ein β -Fragment, wie für andere Ntn-Hydrolasen üblich (Oinonen, Rouvinen, 2000), autokatalytisch abläuft und ein Linkerpeptid proteolytisch abgespalten wird (Ikonen *et al.*, 1993). Die weitere proteolytische Prozessierung nach der autokatalytischen Spaltung tritt in anderen lysosomalen Hydrolasen in ähnlicher Weise auf (Mach, 2002), wurde für Ntn-Hydrolasen bisher jedoch nicht beschrieben.

5.3 M6P-abhängige Sortierung des Plbd2

Plbd2 wurde erstmals bei der Untersuchung von Mannose-6-Phosphat (M6P)-modifizierten Proteinen beschrieben (Kollmann *et al.*, 2005; Sleat *et al.*, 2005), sodass für das Protein eine lysosomale Sortierung entlang des M6P-Wegs erwartet werden kann. Bei der Inkubation von Fibroblasten mit rekombinantem, partiell M6P-modifiziertem, Plbd2 konnte eine Internalisierung und lysosomale Sortierung beobachtet werden. Die Plbd2-Internalisierung konnte durch die Zugabe freien Mannose-6-Phosphats kompetitiv reduziert werden, was ebenfalls für einen M6P-abhängigen Transport des Plbd2 spricht (Kollmann, 2007).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Pro-Plbd2 in Fibroblasten mit Defekten des M6P-Transportwegs stärker sezerniert wird als in Kontrollzellen, jedoch anteilig auch intrazellulär in Lysosomen nachzuweisen war (Abschnitt 4.3.1). Das Verhältnis von sezerniertem zu intrazellulärem Pro-Plbd2 war dabei bei Zellen mit einem Defekt der GlcNAc-1-Phosphotransferase (MLII-MEFs) fast dreimal höher als bei WT-Zellen. Bei Zellen mit Defekten der M6P-Rezeptoren (MPR-MEFs) war der Anteil von sezerniertem zu intrazellulärem Plbd2 nur leicht erhöht. Entsprechend konnte in der Immunfluoreszenz in MLII-MEFs kein Plbd2 nachgewiesen werden, während in MPR-MEFs das Plbd2-Signal noch eine deutliche Kolo-kalisation mit dem lysosomalen Marker Lamp1 aufwies (Abschnitt 4.3.2). Möglicherweise war die Menge von lysosomalem Plbd2 in MLII-MEF für einen Nachweise in der Immunfluoreszenz mit dem verwendeten Plbd2-60H1-Antikörper zu gering.

In der PercollTM-Dichtegradienten-Zentrifugation von Zellorganellen aus WT-, MPR-, und MLII-MEFs, konnte das Pro-Plbd2 in allen Zelllinien in Lamp1-positiven Fraktionen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu WT-MEFs, waren in MPR- und MLII-Zellen jedoch keine Fragmente des murenen Plbd2 zu detektieren. Das Plbd2 scheint somit zumindest teilweise unabhängig vom M6P-

Transportweg in die Lysosomen zu gelangen, wo es jedoch nicht wie üblich prozessiert wird. Eine enzymatische Aktivität ist für das Pro-Plbd2 nicht zu erwarten, sodass mit der Plbd2-Prozessierung auch dessen Aktivität ausbleibt, was möglicherweise zum Phänotyp bei MLII und MPR-Defizienz in der Maus beiträgt.

Das Ausbleiben der Prozessierung könnte mit veränderten lysosomalen Reaktionsbedingungen zusammenhängen, die aus der Akkumulation von Speichermaterial in den Zellen resultieren (Dittmer *et al.*, 1999; Vogel *et al.*, 2009). Auch die Fehlsortierung relevanter lysosomaler Hydrolasen ist denkbar, wobei jedoch gezeigt werden konnte, dass sowohl CtsB als auch CtsL, die als Kandidaten für eine Prozessierung des Plbd2 in Frage kommen, in Fibroblasten M6P-unabhängig transportiert werden (Markmann *et al.*, 2015). Klarheit könnte die subzelluläre Lokalisation von CtsB und CtsL in MPR- und MLII-MEFs im Percoll-Gradienten liefern. Bei einem MPR-unabhängigen Transport sollten die Cathepsine mit einem spezifischen Antikörper im Western-Blot in den Plbd2-positiven Fraktionen nachzuweisen sein.

Das lysosomale Markerprotein β -Hexosaminidase (β -Hex) eignete sich in diesem Experiment nicht zur Lokalisierung der Lysosomen im Percoll-Gradienten, da das Enzym selbst M6P-abhängig transportiert wird. Die Kofraktionierung der β -Hex-Aktivität mit dem lysosomalen Markerprotein Lamp1 war in MPR-defizienten MEFs sogar deutlich geringer als die des Plbd2. Das Plbd2 scheint somit weniger abhängig vom M6P-Transportweg zu sein als die β -Hex. Als alternativer lysosomaler Marker könnte die Aktivität der β -Glukocerebrosidase (β -GC) bestimmt werden, die MPR-unabhängig durch Limp2 in die Lysosomen transportiert wird (Reczek *et al.*, 2007).

Die starke Sekretion des Plbd2 in MLII-MEFs steht im Einklang mit einer massenspektrometrischen Analyse, in der in Lysosomen aus MLII-Zellen etwa 17 mal weniger Plbd2 detektiert werden konnte als in Lysosomen aus WT-Zellen (Markmann *et al.*, 2015). Besonders die γ -Untereinheit der GlcNAc-Phosphotransferase ist dabei von Bedeutung für den Transport des Plbd2 (Di Lorenzo *et al.*, 2018). Die vorliegenden Daten lassen jedoch in MEFs einen alternativen Transportweg für das Plbd2 vermuten, der unabhängig vom M6P-Signal stattfindet. Denkbar wäre entweder ein lysosomaler Transport über einen bis dato unbekanntem intrazellulären Transportweg oder eine, möglicherweise unspezifische, Reinternalisierung von sekretiertem Plbd2.

Für einen M6P-unabhängigen intrazellulären Transport spricht, dass die Defizienz der GlcNAc-1-Phosphotransferase in der Leber keinen signifikanten Einfluss auf den lysosomalen Transport des Plbd2 hat (Markmann *et al.*, 2015). Der Plbd2-Transport in der Leber und in kultivierten Fibroblasten verläuft somit anhand unterschiedlicher Mechanismen. Die Existenz von Zelltyp-spezifischen, MPR-unabhängigen lysosomalen Transportwegen ist bereits lange bekannt (Dittmer *et al.*, 1999), tatsächlich nachgewiesen wurden jedoch nur wenige Transportprozesse für einzelne lysosomale

Proteine (Abschnitt 1.1.4). Ein Beispiel ist der Transport von Prosaposin durch Sortilin (Lefrancois *et al.*, 2003). Interessanterweise konnte eine Interaktion von Prosaposin mit CtsD gezeigt werden (Gopalakrishnan *et al.*, 2004), mit dem auch das Plbd2 interagiert (Kettwig, 2010). Der Transport lysosomaler Proenzyme in Multienzym-Komplexen konnte beschrieben werden (Van Der Spoel *et al.*, 1998) und ist auch für das Plbd2 durch direkte oder indirekte Interaktion mit CtsD und möglicherweise Sortilin denkbar.

Eine alternative Möglichkeit für die Wiederaufnahme sekretierten Proteins an der Zelloberfläche stellt der Mannose-Rezeptor (MR) dar, der besonders von Makrophagen, Dendritischen Zellen und Endothelzellen exprimiert wird (Martinez-Pomares, 2012). Die Internalisierung durch den MR setzt jedoch *N*-Glykane des Mannose-reichen Typs oder des Hybrid-Typs voraus, da Komplex-Typ-Glykane nicht über terminale Mannosylreste verfügen, die durch den MR erkannt werden können (Varki, Kornfeld, 1983). Durch die M6P-Modifizierung werden die *N*-Glykane des Mannose-reichen Typs vor der Trimmung im Golgi und der Synthese von Komplex-Typ-Glykanen geschützt (Gieselmann, 2006). Werden diese M6P-modifizierten Glykane nicht im Golgi durch den M6P-Rezeptor (MPR) gebunden und somit in den extrazellulären Raum fehlsortiert, ist eine Re-Internalisierung in das endo-lysosomale System durch den MPR an der Zelloberfläche, aber auch den MR möglich (Kasper *et al.*, 1996). Bei einem Defekt der GlcNAc-Phosphotransferase (MLII-Zellen) werden die *N*-Glykane nicht durch die M6P-Modifizierung vor dem Abbau geschützt, sodass mehrheitlich Komplex-Typ-Glykane synthetisiert werden, die weder durch die M6P-Rezeptoren noch durch den Mannose-Rezeptor gebunden werden können (Hasilik, von Figura, 1981). Eine Wiederaufnahme von sekretiertem Protein kann in MLII-Zellen deshalb über diese Prozesse nicht stattfinden.

Ebenfalls möglich ist, dass die veränderte Glykosylierung des Plbd2 in MLII-Fibroblasten die Interaktion mit anderen Proteinen wie CtsD verhindert und damit den Ko-Transport von Plbd2 über Sortilin (Gopalakrishnan *et al.*, 2004) oder den LDL (*low density lipoprotein*)-Rezeptor und Lrp1 (*LDL-receptor-related protein 1*) (Markmann *et al.*, 2015) unterbindet.

Aus den Daten zur Proteinsortierung kann geschlossen werden, dass Plbd2 in Fibroblasten vorwiegend M6P-abhängig in die Lysosomen transportiert wird, anteilig jedoch auch alternative Transportwege existieren. Die unterschiedliche Sortierung in MPR-defizienten- und MLII-Zellen ist wahrscheinlich auf die veränderte Glykosylierung des Plbd2 zurückzuführen. In MPR-defizienten-Zellen konnte in Lamp1-positiven Kompartimenten Pro-Plbd2 detektiert werden, das jedoch nicht in die mature Form gespalten wurde. Es bleibt zu ermitteln, ob das Ausbleiben der Prozessierung aus der Fehlsortierung relevanter lysosomaler Proteasen oder den veränderten lysosomalen Reaktionsbedingungen resultiert und möglicherweise zum Phänotyp bei MLII und MPR-Defizienz beiträgt.

5.4 Erzeugung von Plbd1- und Plbd2-defizienten Mausmodellen mittels CRISPR-Cas9

Der Defekt lysosomaler Hydrolasen führt in vielen Fällen zu der Entstehung lysosomaler Speichererkrankungen (LSDs), die durch Inaktivierung der entsprechenden Genabschnitte im *knockout* (KO)-Mausmodell nachgebildet werden können (Thomas, Capecchi, 1987; Hall *et al.*, 2009). KO-Mausmodelle wurden für viele verschiedene LSDs beschrieben (Xu *et al.*, 2016) und auch für Plbd2 sollte zuvor bereits über einen *genetrap*-Ansatz ein KO-Mausmodell hergestellt werden (Kettwig, 2010). Im *genetrap*-Mausmodell konnten jedoch Restmengen an Plbd2-Transkript und -Protein nachgewiesen werden, sodass lediglich ein *knock-down*-Mausmodell erzielt wurde, das phänotypisch unauffällig blieb (Hohensee, 2008). In dieser Arbeit sollten mittels der neuen molekularbiologischen CRISPR-Cas9-Methode (Jinek *et al.*, 2012) Mutationen im Gen von Plbd1 und Plbd2 erzeugt werden, die zu einem vollständigen funktionellen *knockout* führen. Bei der Technik wird eine *single-guide*-RNA (sgRNA) erstellt, die eine Cas9-Endonuklease zur Spaltung selektiv an einen komplementären DNA-Strang lenkt (vgl. Abschnitt 1.3). Neben dem Plbd2 sollte das homologe Protein Plbd1 inaktiviert werden, um eine Kompensation des Plbd2-KO aufgrund einer funktionellen Redundanz auszuschließen, wie sie für andere lysosomale Hydrolasen zuvor gezeigt werden konnte (Nägler, Ménard, 2003).

5.4.1 Etablierung von Guide-RNAs in Zellkultur

Die erstellten Guide-RNAs zur Generierung von Plbd1- und Plbd2-*knockout*-Mausmodellen wurden vorab in Zellkultur-Vorversuchen getestet. In einem ersten Ansatz wurden frühe Exons der Gene von Plbd1 (Exon 2) und Plbd2 (Exon 1) adressiert, um vorzeitige Translations-Stopps einzuführen und die Synthese der beiden Proteine möglichst gänzlich zu unterbinden. In einem zweiten Ansatz wurden neu erstellte Guide-RNAs gegen die codierende Sequenz des Cys249 (Exon 5) im aktiven Zentrum des Plbd2 gerichtet. Auch bei einer eventuellen Synthese eines Restproteins sollte damit der funktionelle Defekt des Plbd2 sichergestellt werden.

Während mit zwei der erstellten Guide-RNAs keine Mutationen in N2a-Zellen erzeugt werden konnten, wiesen die übrigen vier Guide-RNAs effiziente Mutationsraten in den *Plbd*-Genen auf. Die Prozesse, die zu den Unterschieden in der Effizienz der Guide-RNAs führen, sind nicht vollständig verstanden. Eine Rolle spielt jedoch die Bildung von Sekundärstrukturen durch die Guide-RNAs und die Zugänglichkeit des Genabschnitts, die aus der Dichte des Chromatin resultiert (Jensen *et al.*, 2017). Die verwendeten *repair-templates* wurden in den N2a-Zellen in keinem der Ansätze zur

Reparatur der Doppelstrangbrüche genutzt, sodass der Anteil der unspezifischen NHEJ-Reparatur somit deutlich gegenüber der HDR überwog (vgl. Abschnitt 1.3.1). Die in der Regel weitaus geringere Effizienz der HDR gegenüber der NHEJ ist ein bekanntes Hindernis bei der Einführung gezielter Mutationen mit der CRISPR-Cas9-Methode und kann durch die Verwendung von NHEJ-Inhibitoren verbessert werden (Maruyama *et al.*, 2015). Es konnte zudem gezeigt werden, dass das Verhältnis von HDR zu NHEJ von der Position im Genom und dem verwendeten Zelltyp abhängig ist (Miyaoaka *et al.*, 2016), so dass bei der vorgesehenen Injektion in murine Oozyten die *repair-templates* möglicherweise dennoch hätten genutzt werden können.

Durch die Isolierung von Einzelklonen aus der CRISPR-Cas9-transfizierten Zellpopulation sollten stabile *knockout*-Zelllinien für Plbd1 und Plbd2 erzeugt werden. Es konnten nach Transfektion mit dem Plbd1-GuideB und Antibiotika-Selektion 13 Einzelklone isoliert und klonal expandiert werden, von denen bei sieben Zellklonen Mutationen nachgewiesen werden konnten. Die Plbd2-GuideB transfizierten Zellen wiesen keine Mutationen auf. Der Anteil der geschnittenen DNA variierte bei den Zelllinien mit Mutationen zwischen $f_{\text{cut}} = 18\%$ und $f_{\text{cut}} = 39\%$. Bei einem heterozygoten diploiden Organismus liegt die Wahrscheinlichkeit einer Fehlpaarung der DNA-Doppelstränge nach dem *reannealing* bei 50%, was bei einer Spaltungs-Effizienz der T7EN von 80% (Vouillot *et al.*, 2015) eine maximale Mutationsrate von $f_{\text{cut}} = 40\%$ ermöglicht. Während dieser Wert bei einer Einzelklon-Linie nahezu erreicht wurde, lagen bei den meisten analysierten Klonen jedoch niedrigere Mutationsraten vor. Werte unter $f_{\text{cut}} = 40\%$ mussten auf einen geringeren Anteil von mutierten Allelen zu WT-Allelen als 1:1 zurückgehen. Die mehrfach beobachtete Mutationsrate von etwa 25% entsteht rechnerisch bei einem Anteil von einem mutierten Allel auf fünf WT-Allele. In Arbeiten zur genomischen Struktur der N2a-Zelllinie konnte für die meisten Zellen ein Karyotyp von 95 Chromosomen nachgewiesen werden, wobei in der Gesamtzellpopulation Karyotypen im Bereich von 59 bis 193 Chromosomen zu detektieren waren (American Type Culture Collection ATCC, Manassas, Virginia). Durch die Sequenzierung der genomischen DNA einiger expandierter Einzelklone konnte die Polyploidie der Zellen bestätigt werden, indem in der Sanger-Sequenzanalyse die Überlagerung von mindestens drei Allelen nachgewiesen wurde (siehe Anhang).

Um eine stabile *knockout*-Zelllinien zu erschaffen, sollte von einer Zelllinie wie etwa murinen NIH-3T3-Fibroblasten ausgegangen werden, die über einen stabileren Chromosomensatz mit geringer Ploidie als viele andere etablierte immortale Zelllinien verfügt (Leibiger *et al.*, 2013). Die Verwendung einer anderen Zelllinie könnte möglicherweise auch den Anteil der HDR bei der Reparatur der Doppelstrangbrüche verbessern. Die Zellkultur-Experimente dienten jedoch primär der Überprüfung der Funktionalität der Guide-RNAs als Vorversuch für die Injektion in murine Blastocysten zur Generierung von *knockout*-Mausmodellen. Die Anwendung der Guide-RNAs in Zellkultur wurde deshalb nach dem Funktionsnachweis nicht weiter optimiert.

5.4.2 Erzeugung von *knockout*-Mausmodellen und Charakterisierung der Mutationen auf genomischer Ebene

Während in Zellkultur mit den Guide-RNAs Plbd1-GuideB und Plbd2-GuideB Mutationen (InDels) mit einer Effizienz von 27 % bzw. 45 % in die Gene von Plbd1 und Plbd2 eingeführt werden konnten, unterschieden sich die Effizienzen bei der Verwendung in murinen Oozyten drastisch. Bei 83 geborenen Tieren konnte nur in einem Allel des Plbd1-Gens eine Insertion detektiert werden (InDel-Rate 1,2 %), wobei das Plbd2-Gen in keinem Tier InDels aufwies. Bei der simultanen Injektion der Guide-RNAs Plbd2-GuideC, -GuideD und -GuideE wiesen hingegen 10 von 13 resultierenden Nachkommen Mutationen auf. Von diesen Mutationen lagen zwei an der Bindestelle des Plbd2-GuideC (InDel-Rate 15 %), zwei an der des Plbd2-GuideD (InDel-Rate 15 %) und neun an der Bindestelle des GuideE (InDel-Rate 69 %).

Die Guide-RNAs Plbd1-GuideB (Exon 2) und Plbd2-GuideB (Exon 1) waren somit in murinen Oozyten deutlich ineffizienter als in kultivierten N2a-Zellen. Plbd2-GuideC (Exon 1), Plbd2-GuideD (Exon 5) und Plbd2-GuideE (Exon 5) wiesen eine vergleichbare InDel-Rate wie in den N2a-Zellen auf. Die unterschiedliche Effizienz zwischen in den Embryoblasten der Blastocyste einerseits und den N2a-Zellen andererseits hing vermutlich mit der Transkriptionsrate der jeweiligen Gene zusammen, da an transkriptionell-inaktiven Genen eine hohe Kondensation des Chromatin vorliegt (Wu *et al.*, 2014). Die gleichen Prozesse, bei denen Nukleosomen im Chromatin eine Exposition von Promotorbereichen inaktiver Gene und die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindern, hemmen möglicherweise den Kontakt von Guide-RNA und Cas9-Endonuklease zu den entsprechenden Genbereichen (Jiang, Pugh, 2009; Bieberstein *et al.*, 2012). Die transkriptionelle Regulation wäre demnach in späteren Exons geringer und würde einen Zugang des Guide-RNA-Cas9-Komplexes ermöglichen, was die deutlich höhere Effizienz der Guide-RNAs in Exon 5 des Plbd2 erklären würde. Durch die Bindung der Guide-RNAs in Exon 5 wird die lokale Chromatin-Struktur gelockert (Perez-Pinera *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014), was vermutlich die Bindung des Plbd2-GuideC in Exon 1 ermöglicht. Bei der einzelnen Verwendung des GuideC kann somit eine InDel-Rate erwartet werden, die ähnlich gering ist wie die des Plbd2-GuideB in Exon 1.

Mittels des Plbd1-GuideB wurde ein Tier erzeugt, das nur auf einem Allel eine Mutation im Plbd1-Gen trug, was vermutlich auf die geringe InDel-Rate der Guide-RNA zurückzuführen ist. Das Tier wurde mit einem WT-Tier verpaart, um eine *knockout*-Inzuchtlinie zu etablieren.

Mit den Plbd2-Guides C, D und E, die zusammen eine hohe Mutationsrate aufwiesen, wurden Tiere mit komplexem Mutationsmuster erzeugt. Vier der fünf untersuchten Plbd2-*knockout*-Tiere der F0-Generation trugen mehr als zwei verschiedene Varianten des Plbd2-Gens, was in einem diploiden

Organismus nur durch genetische Mosaik zu erklären ist. Unter den Nachkommen dieser Tiere konnten in der F1-Generation ebenfalls bis zu drei verschiedene Allelvarianten trotz selber Elterntiere nachgewiesen werden, da das Mosaik offensichtlich auch in den Keimbahn-Zellen der Elterntiere auftrat. Die Bildung von Mosaiken bei der Injektion von Cas9-mRNA in Oozyten kann häufig beobachtet werden (Yen *et al.*, 2014) und resultiert aus Endonuklease-Aktivität in späten Entwicklungsstadien der Oozyte. Bleibt die Endonuklease-Aktivität auf die einzellige Zygote beschränkt, entwickelt sich ein genetisch homogener Organismus. Bei einer Aktivität bis in das zwei-Zell-Stadium und darüber hinaus kann sich jedoch ein Embryoblast mit uneinheitlichem Genotyp entwickeln. Der Mosaizismus kann sich bis in die Zellen der Keimbahn fortsetzen oder durch eine Endonuklease-Aktivität in den Keimbahn-Vorläuferzellen entstehen. Wenn die Aktivität der Cas9-Endonuklease bis zum Zeitpunkt der Entwicklung der Urkeimzellen (*primordial germ cells*, PGCs) erhalten bleibt, die in der Maus etwa an Embryonaltag E6,5 gebildet werden (Saitou *et al.*, 2012), können zudem unterschiedliche Genotypen der Geschlechtsorgane entstehen (Oliver *et al.*, 2015). Bei den *Plbd2*-Tieren der F0-Generation konnte jedoch kein Unterschied zwischen den Genotypen der einzelnen Geschlechtsorgane und Schwanzspitzen-Biopsien nachgewiesen werden. Das zugrundeliegende Mosaik entstand demnach vor Embryonaltag E6,5.

Um das Auftreten von Mosaiken durch anhaltende Cas9-Endonuklease-Aktivität zu vermeiden, wurde in mehreren Studien statt der Cas9-mRNA ein präassemblierter Komplex aus Cas9-Protein und sgRNA in den Pronukleus injiziert, der eine deutlich reduzierte Halbwertszeit in der Zygote aufweisen sollte (Chen *et al.*, 2016). In einem weiteren Ansatz wurde der Cas9/sgRNA-Komplex durch Elektroporation zu einem besonders frühen Zeitpunkt in die Zygote eingebracht (Hashimoto *et al.*, 2016). Beide Methoden führten jedoch nicht zum vollständigen Ausbleiben von Mosaiken (Teixeira *et al.*, 2018), sodass derzeit die Modifikation von Gameten vor der Befruchtung das größte Potential zur Vermeidung von Mosaiken verspricht (Committee on Human Gene Editing, 2017).

Aus der F1-Generation wurden drei *Plbd2-knockout*-Tiere (*Plbd2*-HH, *Plbd2*-mut, *Plbd2*-KO) anhand der individuellen Mutationen zur weiteren Zucht ausgewählt. Die *offtarget-sites* (OTS) der verwendeten CRISPR-Guide-RNAs wurden anhand eines Online-Tools bestimmt (Zhang Lab, MIT; Hsu *et al.*, 2013) und die zwei OTS-Genabschnitte mit den jeweils höchsten Bindungswahrscheinlichkeiten durch Sequenzierung in den Tieren der F0-Generation untersucht. Für keine der untersuchten OTS konnten Abweichungen von der WT-Sequenz nachgewiesen werden. Wie Eingangs beschrieben (Abschnitt 1.3.1), ist die Entstehung von Mutationen an nicht-voraussagbaren Genabschnitten möglich und nur über *whole-genome-sequencing* (WGS) zu identifizieren. Für die Erzeugung von Mausmodellen sind diese Effekte jedoch nicht relevant, sodass auf eine aufwändige Rückkreuzung der Mutationen in einen WT-Hintergrund verzichtet werden kann (Iyer *et al.*, 2018).

5.4.3 Beurteilung der *knockout*-Mausmodelle auf Transkript- und Protein-Ebene

5.4.3.1 Vergleich der Plbd1-Expression in WT- und *knockout*-Mäusen

Bei der Analyse der Plbd1-mRNA-Level in der qPCR konnte die stärkste Expression in den WT-Hoden nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu fand sich mit unter 5 % deutlich weniger Plbd1-mRNA in WT-Lunge, -Leber und -Herz. In WT-Niere, -Milz und -Hirn war die Plbd1-mRNA kaum zu detektieren, was sich in C_T -Werten von etwa $C_T = 30$ widerspiegelte, die im Bereich der Leerwerte (*non template control*, NTC) lagen. Um die Veränderung des Plbd1-Transkript-Levels zwischen WT- und Plbd1-KO-Mäusen zu beurteilen, eigneten sich diese Organe deshalb nicht. Mit C_T -Werten von unter $C_T = 20$ lieferte die Plbd1-Expressionsanalyse in WT-Hoden hingegen belastbare Daten in der qPCR. In den Plbd1-KO-Hoden war das mRNA-Level auf 16 % reduziert. Somit führte die InDel-Mutation zu einer starken Reduktion, jedoch nicht zum vollständigen Abbau der Plbd1-mRNA.

Bei der Untersuchung der Mutation des Plbd1-KO-Mausmodells auf genomischer Ebene konnte ein vorzeitiges Translations-Stoppcodon (*premature termination codon*, PTC) in der mRNA-Sequenz vorausgesagt werden. Über einen als *nonsense-mediated-decay* (NMD) bezeichneten Mechanismus kann mRNA mit PTCs nach dem Splice-Vorgang erkannt und abgebaut werden (Hug *et al.*, 2016), wobei eine Reduktion auf unter 20 % des WT-Niveaus erwartet werden kann (Chen *et al.*, 2008). Die Reduktion der Plbd1-mRNA im Plbd1-KO-Gewebe ist somit höchst wahrscheinlich auf einen Abbau durch NMD zurückzuführen.

Bei der Mutation der Plbd1-KO-Maus in Exon 2 besteht die theoretische Möglichkeit, dass durch ein alternatives *in-frame* Startcodon nach den Mutationen (Met100) ein N-terminal verkürztes Protein aus der mRNA gebildet werden kann (Bazykin, Kochetov, 2011). Zum einen ist die Wahrscheinlichkeit gering, somit funktionales Protein zu bilden (Müntener *et al.*, 2005), zum anderen würde dem Fragment das N-terminale Signalpeptid fehlen, das für den Zugang zum sekretorischen Weg und damit für die post-translationale Modifikation und lysosomale Sortierung notwendig wäre (Tholen *et al.*, 2014). Die Entstehung von funktionalem lysosomalen Protein aus der verbliebenen mRNA ist somit nicht wahrscheinlich.

Weder für das Plbd1, noch für das Plbd2 liegt ein enzymatischer Aktivitätsassay vor, da die physiologischen Substrate der Proteine unbekannt sind. Auch ein artifizielles Pseudosubstrat wie beispielsweise für Sulfatasen in Form der Arylsulfat-Substrate ist nicht bekannt (Hanson *et al.*, 2004). Die Beurteilung der *knockout*-Mausmodelle auf Proteinebene erfolgte deshalb nicht anhand der verbliebenen Enzymaktivität, sondern über den Nachweis von Restprotein im Western-Blot. Das Plbd1-Protein konnte im Western-Blot von Gewebehomogenaten in WT-Milz, -Hoden, -Lunge und -Leber nachgewiesen werden, während in keinem der korrespondierenden KO-Geweben Plbd1

detektiert werden konnte. Auch in Lysosomen-angereicherten Fraktionen aus der Leber der Plbd1-KO-Mäuse, in denen andere lysosomale Proteine etwa 40-fach angereichert vorliegen, wurde kein Plbd1-Protein detektiert. Plbd1 wurde somit auf Proteinebene durch den CRISPR-Cas9-vermittelten *knockout* erfolgreich deletiert. Aus dem in der qPCR detektierten Rest-Transkript wurde somit kein funktionelles Protein gebildet.

5.4.3.2 Diskrepanz zwischen Plbd1-Transkript und -Protein in der WT-Milz

Das deutliche Plbd1-Signal im Western-Blot der WT-Milz steht in starkem Widerspruch zu den Daten der qPCR-Analyse, bei der keine Plbd1-mRNA in der WT-Milz nachgewiesen werden konnte. Sowohl für die qPCR-Daten als auch für die Plbd1-Signale im Western-Blot ist das *housekeeping*-Gen *Gapdh* (Kim *et al.*, 2014) als Referenz verwendet worden, womit ein Fehler durch abweichende Referenzwerte oder Extraktionsmethoden unwahrscheinlich ist.

Möglicherweise spiegelt die Diskrepanz zwischen Transkript- und Protein-Level von Plbd1 auch die zeitliche Komponente der Genregulation wieder. Für das Plbd1 kann eine Funktion in Dendritischen Zellen (DCs) vermutet werden (Abschnitt 4.4.8), die im Blut und den peripheren Geweben zirkulieren, nach Aktivierung in lymphoide Organe einwandern und einer komplexen Regulation unterliegen (Dalod *et al.*, 2014). Die Aktivierung der DCs durch pathogenes Material führt zu einer funktionellen Veränderung, bei der die Kapazität zur Endocytose und dem Abbau von Pathogenen verringert wird, während MHC- und Chemokin-Rezeptoren zur Zelloberfläche sortiert werden (Théry, Amigorena, 2001). Die transkriptionelle Modifizierung befähigt die DCs zur Aktivierung von T-Zellen und führt zur Migration in lymphoide Organe (Geissmann *et al.*, 2010). Bei einer Funktion des Plbd1 bei dem Abbau von pathogenem Material (Abschnitt 5.5) würde bei der Migration der DCs in die Milz die Genexpression innerhalb von Stunden inhibiert (Hargrove *et al.*, 1991), während noch für mehrere Tage lysosomales Plbd1-Protein nachzuweisen wäre (Nissler *et al.*, 1999).

5.4.3.3 Vergleich der Plbd2-Expression in WT- und *knockout*-Mäusen

In der qPCR verteilte sich die Plbd2-mRNA auf mehrere WT-Gewebe, wobei das höchste mRNA-Level, wie auch für Plbd1, in den WT-Hoden zu detektieren war. In den *knockout*-Mausmodellen Plbd2-HH und Plbd2-KO konnten nach der Untersuchung der InDels auf genomischer Ebene PTCs in der mRNA vorausgesagt werden. Folglich wurde in der qPCR für beide Zuchtlinien eine Reduktion der Plbd2-mRNA auf unter 20 % des WT-Niveaus nachgewiesen, sodass ein Abbau der mRNA über NMD wahrscheinlich ist. Beurteilt wurden dabei nur Organe, für die bei WT-Tieren die C_T -Werte der Plbd2-Transkripte unter $C_T = 30$ lagen.

In der Plbd2-mut-Linie wurden zwei Deletionen, aber keine Verschiebung des Leserasters eingeführt, die zu einem PTC und dem Abbau über NMD führen würde. Ein Abbau von mRNA hätte in diesem Fall somit nicht zwangsläufig erwartet werden können (Belgrader, Maquat, 1994). In den

meisten Geweben der Plbd2-mut-Linie wurde in der qPCR dennoch eine Reduktion der Plbd2-mRNA festgestellt, die jedoch teilweise nur gering ausfiel und somit auf einen anderen Mechanismus als NMD zurückging. Eine ähnliche Reduktion von mRNA durch *missense*-Mutationen wurde bereits beschrieben (Nguyen *et al.*, 2011), wobei die Ursache des reduzierten mRNA-Levels nicht untersucht wurde. Denkbar wäre eine veränderte Affinität der mutierten mRNA für regulatorische microRNAs, die Einfluss auf die Halbwertszeit der Transkripte haben (Valencia-Sanchez *et al.*, 2006). Auch ein rückwirkender Effekt der *unfolded-protein-response* (UPR) auf die mRNA ist denkbar: Die UPR wird durch ER-Stress ausgelöst und führt zur Expression von Chaperonen und der Sekretion fehlgefalteter Proteine aus dem ER (Walter, Ron, 2011). Zudem wird jedoch auch ER-assoziierte mRNA entfernt (Reid *et al.*, 2014) und teilweise gezielt abgebaut um die Neusynthese fehlgefalteter Proteine zu reduzieren (Hollien *et al.*, 2009; Maurel *et al.*, 2014). In der Plbd2-mut-Linie liegt die Deletion in Exon 1 (Asp87-Ala92) direkt vor einer Glykosylierungsstelle (Asn93). Möglicherweise führte diese Deletion zu einer Fehlfaltung des Proteins, welches dann bei der Calnexin/Calretikulin-abhängigen Bindung der Glykosylierung in der ER-Qualitätskontrolle erkannt wird (Ruddock, Molinari, 2006). Der resultierende ER-Stress könnte neben dem Abbau des Proteins auch die beobachtete Reduktion der Plbd2-mRNA erklären.

Auch wenn in der qPCR-Analyse in den Plbd2-HH- und Plbd2-KO-Mausmodellen verbliebene mRNA nachgewiesen werden konnte, ist die Synthese von funktionellem Protein höchst unwahrscheinlich, da die Mutations-bedingten PTCs in Exon 5 die Translation inhibieren. Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass die Plbd2-mRNA in unterschiedlichen Splice-Varianten auftreten kann (Hohensee, 2008). Um die mutierten Exons aus der reifen mRNA herauszuspicen und dabei das Leseraster zu erhalten, müssten aufgrund der Start- und End-Phase der Exons im Plbd2-Transkript die Exons 5 - 7 entfernt werden. Derartige mRNAs würden höchstwahrscheinlich zu keinem funktionellen Protein translatiert.

Die Verteilung der Plbd2-Proteinsignale in WT-Geweben im Western-Blot entsprach der Verteilung in der qPCR. Weder in den korrespondierenden *knockout*-Geweben, noch in Lysosomen-angereicherten Fraktionen aus der Leber (Tritosomen) von *knockout*-Tieren konnte hingegen Plbd2-Protein detektiert werden. Das Plbd2 wurde somit in den erzeugten Mausmodellen auf Proteinebene entfernt. Für das Mausmodell Plbd2-mut hätte aufgrund der genomischen Deletion, die nicht zu einem vorzeitigen Translationsstopp führen sollte, die Expression eines inaktiven Pro-Plbd2 erwartet werden können. In Tritosomen war dieses inaktive Protein im Western-Blot nicht zu detektieren, was für dessen Fehlfaltung und Abbau im ER spricht. Inwiefern im Western-Blot in den Plbd2-mut-Geweben noch ER-ständiges Pro-Plbd2 vorhanden ist, kann aufgrund der starken Überlagerung durch Plbd2-fremde Signale nicht eindeutig geklärt werden. Das hohe verbleibende mRNA-Signal in der qPCR lässt jedoch die Expression von fehlgefaltetem Pro-Plbd2 und den Abbau im ER vermuten.

5.4.4 Untersuchung von phänotypischen Veränderungen

Plbd1 konnte in früheren Untersuchungen in neutrophilen Granulozyten und Monozyten nachgewiesen werden (Xu *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009). Beide Zelltypen wiesen im Differentialblutbild von Plbd1-KO-Tieren eine nicht-signifikante, moderate Erhöhung auf (Abschnitt 4.4.7). Im Vergleich zu WT-Tieren lagen dagegen eosinophile Granulozyten in Plbd1-KO-Männchen deutlich erhöht vor. Die Beteiligung von Eosinophilen bei der Abwehr von Parasiten könnte ein Hinweis auf die Funktion des Plbd1 sein.

Bei der Analyse einer Microarray-Datenbank konnte die Plbd1-Expression besonders in Dendritischen Zellen und Zellen des Knochenmarks gezeigt werden, während die höchste Plbd2-Expression in Makrophagen und Mikroglia vorlag (Abschnitt 4.4.8). Interessanterweise überschneidet sich die Expression der beiden Proteine im Bezug auf die Zelltypen dabei kaum, was eher eine Komplementarität als eine funktionelle Redundanz von Plbd1 und Plbd2 vermuten lässt. Im Western-Blot konnte zudem eine Expression des Plbd1 in Knochenmarkszellen gezeigt werden, die bei Differenzierung der Zellen zu Makrophagen zurückging. In den Makrophagen konnte hingegen deutlich mehr Plbd2 als Plbd1 detektiert werden.

Eine distinkte Verteilung homologer lysosomaler Enzyme zwischen verschiedenen Zelltypen konnte auch für die Cathepsine S und L gezeigt werden, die in Antigen-präsentierenden-Zellen des Immunsystems bzw. in Thymus-Epithelzellen die Invariante-Kette (Ii) des MHC-II-Rezeptors spalten (Beers *et al.*, 2005). Das humane CtsL2/CtsV wird spezifisch in Hoden, Thymus und Epidermis exprimiert, konnte jedoch bei Expression in anderen Geweben den Funktionsverlust des homologen Proteins CtsL kompensieren (Hagemann *et al.*, 2004). Auch eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung homologer Proteine konnte für die cytosolische Fettsäure-Amidase FAAH-1 und die luminalen FAAH-2 gezeigt werden (Wei *et al.*, 2006).

Eine differentielle Expression von Plbd1 vor allem in Dendritischen Zellen und Plbd2 in Makrophagen könnte die gewebsspezifische Verteilung in Western-Blot und qPCR erklären. Es konnte gezeigt werden, dass Dendritische Zellen im zentralen Nervensystem (ZNS) nur eine untergeordnete Rolle spielen und die primäre Immunzell-Population aus Mikroglia (Makrophagen des ZNS) gebildet wird (D'Agostino *et al.*, 2012). Entsprechend konnte auf Transkript- und Proteinlevel im murinen Gehirn zwar Plbd2, jedoch kein Plbd1 nachgewiesen werden. In Leber, Niere und Lunge liegen mehr Makrophagen vor, in der Milz überwiegen hingegen die Dendritischen Zellen (Guilliams *et al.*, 2016), was auch das starke Plbd1-Signal im Western-Blot erklären würde. Im Herz überwiegen die kardialen Makrophagen gegenüber den Dendritischen Zellen deutlich (Weisheit *et al.*, 2014), wobei hier jedoch ein Teil des detektierten Signals im Western-Blot auf zirkulierende Leukozyten aus dem Blut zurückgeht.

Die Hoden können immunologisch als Sonderfall betrachtet werden, da diese über die Blut-Hoden-Schranke (*blood testis barrier*, BTB) vom übrigen Immunsystem abgegrenzt sind. Neben der lokalen Immunantwort auf Pathogene spielt die Vermittlung von Toleranz gegenüber immunogenen Keimzellen eine wichtige Rolle, um die Bildung von Spermien-Autoantikörpern (ASA) zu vermeiden (Fijak, Meinhardt, 2006). In den Hoden liegen 10-fach mehr Makrophagen als Dendritische Zellen vor (Li *et al.*, 2012). Im Western-Blot konnte dagegen sowohl für Plbd1 als auch für Plbd2 ein deutliches Signal detektiert werden, sodass möglicherweise Plbd1 auch in anderen Zelltypen in den Hoden eine Rolle spielt. Auf den Testosteron-produzierenden Leydig-Zellen im Interstitium der Hoden und den Sertoli-Zellen, die die Blut-Hoden-Schranke bilden, konnten, wie auch auf Dendritischen Zellen, Oberflächenrezeptoren zur Erkennung von pathogenem Material wie Lipopolysaccharid (LPS) nachgewiesen werden (Zhao *et al.*, 2014). Die Sertoli-Zellen verfügen zudem über ein ausgeprägtes endo-lysosomales System, um degenerierte Spermatozyten abbauen zu können, die nur ein Lysosomen-ähnliches Kompartiment enthalten (Li *et al.*, 2012; Chemes, 1986). Eine Funktion des Plbd1 in diesen Zellen ist denkbar und sollte durch die Lokalisierung des Proteins über indirekte Immunfluoreszenz in Gewebeschnitten untersucht werden.

Mit dem Plbd1-Antikörper waren in Gewebeschnitten aus WT- und Plbd1-KO-Hoden in der Immunhistochemie (IHC) ausschließlich „unspezifische“ Signale zu erkennen. Auch im Western-Blot von Hoden-Gewebehomogenaten (Abschnitt 4.4.6) wurden mit diesem Antikörper diverse Banden detektiert, die nicht dem Plbd1 zuzuordnen waren. Unspezifische Signale waren deshalb auch in der Immunfluoreszenz wahrscheinlich. Mit dem PNA-Lektin konnten die Akrosomen in Spermatozyten und Spermatiden markiert werden (Mortimer *et al.*, 1987), die im WT-Gewebe um das Lumen der Hodenkanälchen angeordnet und im Plbd1-KO-Gewebe ungeordnet verteilt waren. Auch in der HE-Färbung der Schnitte war eine veränderte Struktur im Plbd1-KO-Gewebe zu erkennen, die im Interstitium deutlich kompakter und gefüllter erschien als in den Schnitten aus WT-Hoden. Die Zellen, die im Zentrum des Lumens der Hodenkanälchen von Plbd1-KO-Tieren vorlagen, waren mit dem PNA-Lektin als Spermatozyten identifizierbar und resultierten aus der Ablösung von Keimzellen von den basalen Sertoli-Zellen. Eine Exfoliation von Keimzellen weist auf eine Fehlfunktion der Sertoli-Zellen hin (Vidal, Whitney, 2014), kann jedoch auch auf Alterserscheinungen oder präparations-bedingte Artefakte zurückzuführen sein (Mills, 2007). Die vollständige Füllung der Hodenkanälchen mit Keimzellen im Plbd1-KO spricht jedoch gegen Artefakte aus der Präparation. Auch der Alterungs-Effekt scheint nur teilweise zum beobachteten Phänotyp beizutragen, da in Kontrolltieren gleichen Alters deutlich weniger Exfoliation auftrat.

Exfoliation kann auch bei einer Autoimmun-Orchitis beobachtet werden, bei der die Bildung von Spermien-Autoantikörpern (ASA) zur männlichen Infertilität führt (Silva *et al.*, 2014). Bei der

Entstehung der ASA spielen sowohl Makrophagen als auch Dendritische Zellen eine Rolle (Feng *et al.*, 1990), sodass eine Beteiligung des Plbd1 bei der Entstehung von Autoantikörpern denkbar ist. Interessanterweise konnte zudem eine Hochregulation von Plbd1 bei der intratubulären Keimzell-Neoplasie, die einem Hodentumor vorausgeht, gezeigt werden (Alagaratnam *et al.*, 2011). Eine Infertilität der Plbd1-KO-Männchen kann jedoch nicht beobachtet werden, sodass eine Rolle des Proteins im Akrosom eher unwahrscheinlich ist (Welker *et al.*, 1988).

In den Gewebeschnitten von WT- und Plbd2-KO-Tieren konnte mit dem Plbd2-60H1-Antikörper in den meisten Organen aufgrund eines hohen Hintergrundsignals kein spezifisches Plbd2-Signal nachgewiesen werden (nicht gezeigt). In der Leber war dagegen im WT-Gewebe eine deutliche Kolo-kalisation des Plbd2-Signals mit dem Signal des Makrophagen-Markers F4/80 nachzuweisen, zudem wiesen die Hepatozyten um die Zentralvenen eine Plbd2-Färbung auf (Abschnitt 4.4.10). In der KO-Leber war kein Plbd2-Signal zu detektieren. Die Lokalisation des Plbd2 in den Makrophagen der Leber (Kupffer-Zellen) steht im Einklang mit der zuvor gezeigten Expression des Plbd2 in Knochenmarks-Makrophagen (Abschnitt 4.4.8). Die Expression des Proteins in einer Hepatozyten-Subpopulation kann möglicherweise mit Immunzell-Charakteristika von Antigen-präsentierenden Hepatozyten erklärt werden (Crispe, 2011).

In der Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten des Gehirns konnte das Plbd2 in Zellen des Isocortex sowie in Zellen der Motorregion des Pons nachgewiesen werden. Der Isocortex ist mit einer hohen neuronalen Diversität an komplexen kognitiven Vorgängen wie sensorischer Wahrnehmung oder motorischer Kontrolle beteiligt (Lodato, Arlotta, 2015). Eine definitive räumliche Einordnung im Pons konnte ohne eine Kofärbung mit spezifischen Markern für einzelne Hirnareale nicht erfolgen. Die detektierte Region könnte jedoch den präcerebellaren Kernen des Pons (*pontine gray nucleus*, PGN und *reticulo tegmental nucleus*, RTN) entsprechen, die von einer Nervenbahn getrennt sind (Li *et al.*, 2004). Die Kerne werden aus einer heterogenen Population von Projektionsneuronen gebildet und verknüpfen den cerebralen Cortex mit dem Cerebellum (Kratochwil *et al.*, 2017). Dem Hirnareal kommt vermutlich eine Funktion beim motorischen Lernen zu (Wu *et al.*, 2017).

Auch im dorsalen Bereich des Mittelhirns, in dem die dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* zu finden sind, konnte das Signal des Plbd2 nachgewiesen werden. In anderen Untersuchungen konnte die Expression des Plbd2 in diesen Zelltypen bereits gezeigt werden (Plum *et al.*, 2016; Diao *et al.*, 2013). Die angefärbten Hirnareale sollten in weiteren Experimenten durch Kofärbung mit spezifischen Markern identifiziert werden. Für dopaminerge Neuronen würde sich dazu ein Antikörper gegen die Tyrosin-Hydroxylase (TH) eignen (Prediger *et al.*, 2014). Auch die Präparation einzelner Hirnbereiche würde weitergehende Untersuchungen zur physiologischen Relevanz des Plbd2 ermöglichen.

5.5 Potentielle Funktionen von Plbd1 und Plbd2

Plbd1 konnte sowohl in sekretorischen Granula von neutrophilen Granulozyten (Xu *et al.*, 2009), als auch in antimikrobiellen Monozyten nachgewiesen werden (Xu *et al.*, 2009). Aus den sekretorischen Granula konnte das Protein aufgereinigt und nach mehrwöchiger Lagerung bei 4 °C eine Phospholipase-Aktivität gegenüber dem Substrat Didecanoyl-Phosphatidyl-Cholin gezeigt werden. Eine Phospholipase-Aktivität steht allerdings im Widerspruch zu der Einordnung in die Superfamilie der Ntn-Hydrolasen und der erwarteten Amidase-Aktivität (Repo *et al.*, 2014).

Bei der Analyse einer Mikroarray-Datenbank konnte Plbd1 in Dendritischen Zellen und dem Knochenmark beschrieben werden und wurde in dieser Arbeit in Zellen des Knochenmarks und in Leukozyten im Blut nachgewiesen. Eine Funktion des Plbd1, die besonders in Immunzellen relevant wäre, könnte mit dem Abbau pathogenen Materials, der Antigen-Präsentation oder dem Metabolismus von Signalmolekülen zusammenhängen.

Eine Amidase-Aktivität von Plbd1 und Plbd2 könnte in Makrophagen und Dendritischen Zellen zum Abbau oder der Modifikation von Signalmolekülen beitragen. Als Substrate sind dabei Verbindungen der N-Acylamid-Stoffklasse wie etwa Anandamid (N-Arachidonyl-Ethanolamin; Abbildung 76) denkbar, die eine wichtige Rolle als lokale Entzündungsmediatoren spielen (Raboune *et al.*, 2014). Eine vergleichbare Spaltung von C14- und C16-N-Acyl-Ethanolaminen (NAE) konnte bereits für die lysosomale Ntn-Hydrolase *NAE-hydrolyzing acid amidase* (Naa) beschrieben werden (Tsuboi *et al.*, 2005). Für die Spaltung von C12:0-, C18:0- und einigen C20-NAEs ist bisher keine lysosomale Amidase bekannt, wobei für Plbd2 jedoch auch keine Aktivität gegen diese Substrate gezeigt werden konnte (Kettwig, 2010).

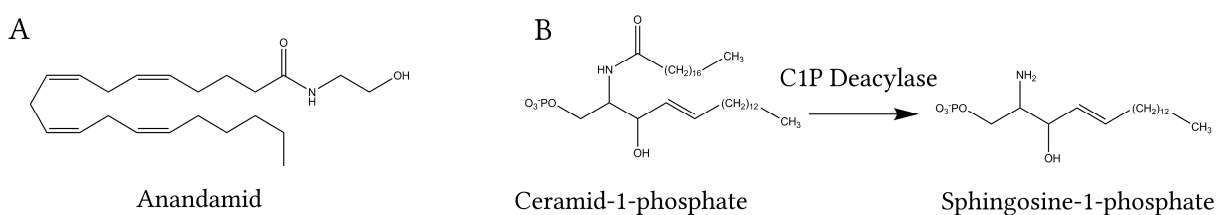


Abbildung 76: Botenstoffe als mögliche Substrate von Plbd1 und Plbd2.

Dargestellt sind Signalmoleküle mit Amid-Bindungen, die als Substrat für Plbd1 oder Plbd2 dienen könnten. (A) Das Anandamid (N-Arachidonyl-Ethanolamin, AEA) ist beispielhaft gezeigt und kann durch Austausch der Arachidonsäure gegen eine Fettsäure und des Ethanolamins gegen andere Amine wie Aminosäuren diverse Substrate der N-Acyl-Amid-Familie darstellen. (B) Die Deacylierung des Ceramid-1-Phosphats (C1P) zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P) wurde postuliert, eine entsprechende C1P-Deacylase konnte bisher jedoch nicht beschrieben werden.

Kürzlich konnte eine Interaktion von Plbd2 und Sphingosin gezeigt werden, welches ein Bestandteil des komplexen Lipids Ceramid ist und dessen Derivat Ceramid-1-Phosphat (C1P) einen Botenstoff mit antiapoptischen Eigenschaften bildet (Haberkant *et al.*, 2015). Wie das C1P bildet auch die deacylierte Form, Sphingosin-1-Phosphat (S1P) einen wichtigen Botenstoff, wobei bislang keine

Amidase bekannt ist, die eine entsprechende Spaltung ausgehend vom C1P vollziehen kann (Gómez-Muñoz, 2006). Die räumliche Struktur des C1P ähnelt stark der eines Phospholipids, wobei die Fettsäure über eine Amidbindung an das Sphingosin gebunden ist (Abbildung 76). Während das nicht-phosphorylierte Ceramid ein Substrat für die lysosomale Ntn-Hydrolase *acid ceramidase* (AC) bildet (Shtraizent *et al.*, 2008), wäre die Spaltung des C1P durch Plbd1 oder Plbd2 denkbar.

Als weiteres immunologisch-relevantes Makromolekül, das durch eine Amidase abgebaut werden könnte, kommt das Lipopolysaccharid (LPS) auf der äußeren Membran gram-negativer Bakterien in Frage. Der Lipidanteil des LPS besteht aus einem Hexaacylierten-, Bisphosphorylierten-Glukosamin-Disaccharid, das auf phagozytierenden Zellen von einem Rezeptor-Komplex aus TLR4, CD14 und MD2 erkannt wird und eine Immunantwort auslöst (Inagawa *et al.*, 2011). An die 2-N- bzw. 3-O-Position der Glukosamine sind Oxyacyl-Reste gebunden, die wiederum mit sekundären Acylgruppen verestert sein können (Abbildung 77). Während diese sekundären Acylgruppen von einer Acyl-Oxyacyl-Hydrolase (Aoah) abgebaut werden können (Erwin, Munford, 1990), ist in der Maus keine Amidase bekannt, die die 2-N-Acylgruppen abspalten könnte. Im Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* konnten dagegen zwei Amidasen beschrieben werden, die sequenziell und selektiv die Acylgruppen der Glukosamine abspalten (Rosner *et al.*, 1979).

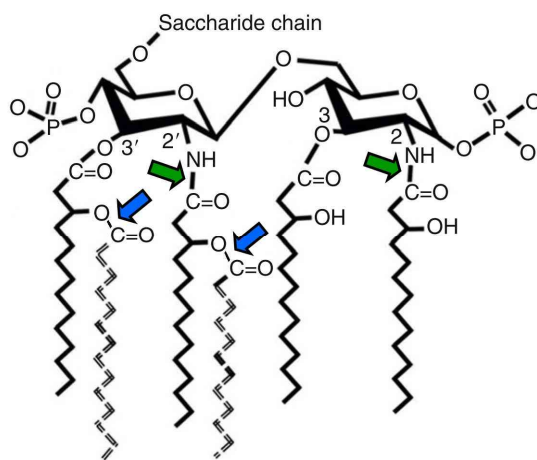


Abbildung 77: Bakteriellies Lipid A.

Gezeigt ist die Struktur des Lipid A aus *E. coli*. Die blauen Pfeile markieren die Spaltstellen der murinen Aoah, die grünen Pfeile zeigen die Spaltstellen der Amidase I und II aus *D. discoideum* an, zu denen keine äquivalenten Enzyme in der Maus bekannt sind. Abbildung nach Munford *et al.*, 2009.

Die Lipid A-Amidasen aus *D. discoideum* weisen nur eine geringe Sequenzhomologie zu Plbd1 und Plbd2 auf (Tabelle 26). Deutlich höher ist die Homologie von Plbd1 und Plbd2 mit einer putativen Phospholipase B (PlbA) aus demselben Organismus (Morgan *et al.*, 2004), die zudem namensgebend für die Phospholipase B-Domäne der beiden murinen Proteine ist. Interessanterweise weist das Plbd2 auch eine Sequenzhomologie zu der murinen Aoah auf (21 % Identität), die der PlbA aus *D. discoideum* wiederum nur schwach ähnelt. Bei Defizienz der Aoah im Mausmodell ist die Toleranz-Phase nach einer bakteriellen Infektion, die eine überschießende Immunreaktion vermeiden soll, signifikant verlängert, sodass bei Folge-Infektionen keine Immunantwort ausgelöst

wird (Lu *et al.*, 2008). Während die Toleranz üblicherweise 5 - 10 Tage nach der initialen Lipid A-Exposition abklingt, bleibt diese in Aoah-defizienten Tieren mindestens 4 Monate bestehen (Munford *et al.*, 2009). Bei einer hydrolytischen Funktion von Plbd1 oder Plbd2 gegenüber dem Lipid A, wäre ein Zusammenhang mit der Toleranz-Phase ebenfalls denkbar.

Um einen Einfluss von Plbd1 oder Plbd2 auf den Abbau von Lipid A und die resultierende Toleranz-Phase zu untersuchen, könnte, wie für die Aoah gezeigt (Lu *et al.*, 2008), die Abnahme der Interleukin-6-Level nach einer LPS-Injektion in WT- und *knockout*-Mäusen verglichen werden. Auch eine anhaltende Hepatomegalie würde auf einen verzögerten Abbau des LPS hindeuten (Shao *et al.*, 2011). An kultivierten Zellen *in vitro* konnte der Toleranz-Effekt durch Aoah jedoch bislang nicht nachvollzogen werden (Munford *et al.*, 2009).

Tabelle 26: Sequenzhomologien von Plbd1 und Plbd2.

Die Proteinsequenzen des murinen (Mm) Plbd1 und Plbd2 wurden mit der Sequenz der murinen Aoah (Uniprot O35298) sowie der *D. discoideum* (Dd) Proteine Phospholipase B-Like Protein A (PlbA, Uniprot Q550U9), Fatty Acid Amidase I (Faa1, Uniprot Q54L63) oder Fatty Acid Amidase II (Faa2, Uniprot Q8MMR8) verglichen. Die Sequenzidentität ergibt sich aus der Aminosäure-Identität und der Sequenzabdeckung. Sequenzen mit einer Homologie über 10 % sind in Grün hervorgehoben.

% Sequenz-identität		<i>Mus musculus</i>			<i>D. discoideum</i>		
		Plbd1	Plbd2	Aoah	PlbA	Faa1	Faa2
Mm	Plbd1		30,8	1,8	29,9	3,74	2,0
	Plbd2	30,8		21,1	33,7	0	3,5
	Aoah	1,8	21,1		11,2	3,7	2,0
Dd	PlbA	29,9	33,7	11,2		4,6	7,2
	Faa1	3,7	0	3,7	4,6		22,3
	Faa2	2,0	3,5	2,0	7,2	22,3	

Der Aminosucker N-Acetyl-Glukosamin (GlcNAc) spielt in der Zelle eine wichtige physiologische Rolle und ist dem N-acylierten Glukosamin im Lipid A strukturell ähnlich, sodass deren Abbau möglicherweise von derselben Hydrolase durchgeführt werden könnte. Der Metabolismus von GlcNAc setzt die Phosphorylierung durch eine GlcNAc-Kinase voraus, nach der eine GlcNAc-6-Phosphat Deacetylase (Amdhd2) die Acetylfunktion abspalten kann (Campbell *et al.*, 1990; Bergfeld *et al.*, 2012). Das resultierende Glucosamin-6-Phosphat wird nach Desaminierung in Form von Fructose-6-Phosphat der Glykolyse zugeführt (Weidanz *et al.*, 1996). Das bakterielle Homolog von Amdhd2 benötigt bivalente Kationen als Kofaktor und kann der Superfamilie der Amidohydrolasen zugeordnet werden (Hall *et al.*, 2007). Die Amidasen dieser Superfamilie spalten kleine Substrate, wie Acetylreste und Aminosäuren ab, während die Spaltung von langkettigen Acylresten wie an Lipid A bislang nicht beschrieben wurde (Seibert, Raushel, 2005). Die Abspaltung der N-Acyl-Reste des Lipid A durch Amdhd2 ist somit unwahrscheinlich und könnte möglicherweise von Plbd1 oder Plbd2 durchgeführt werden.

Bei den bisher durchgeführten Aktivitätstests für Plbd2 konnte gegenüber ausgewählten NAEs keine (Kettwig, 2010) und gegen das artifizielle Substrat Polysorbat 20 nur eine sehr geringe Aktivität gemessen werden (Dixit *et al.*, 2016). Aufgrund der Aktivität von Lipid-abbauenden Enzymen an der Grenzfläche zwischen wässriger Phase und Lipidmembran ist die Etablierung eines Aktivitätsassays für diese Enzyme *in vitro* komplex (Merkel *et al.*, 1999). Der Abbau setzt eine Bindung an die Lipidoberfläche (Lobo, Wilton, 1997) oder den akzessorischen Einfluss anderer Proteine wie den Saposinen voraus (Yoneshige *et al.*, 2015). Während für die Aktivität der lysosomalen Ntn-Hydrolase saure Ceramidase (AC) gegenüber Ceramid Saposin D als Kofaktor benötigt wird (Azuma *et al.*, 1994; Linke *et al.*, 2001), verfügt die ebenfalls lysosomale Aoah selbst über eine Saposin-ähnliche Domäne (Munford *et al.*, 1995). Für eine effiziente Hydrolyse von LPS benötigt jedoch auch Aoah LPS-bindende Kofaktoren wie den löslichen CD14-Rezeptor (Gioannini *et al.*, 2007). Für Plbd2 konnte keine Saposin-ähnliche Domäne beschrieben werden, sodass für den Abbau von Lipid-basierten Substraten möglicherweise ein Lipid-bindender Kofaktor benötigt wird.

6 Ausblick

Die Prozessierung des Plbd2 wurde detailliert untersucht, um eine Aktivierung des Proteins *in vitro* und die Verwendung in einem Aktivitätsassay zu ermöglichen. Wird das Protein *in vitro* bei niedrigem pH-Wert autokatalytisch gespalten, bleibt das Linkerpeptid in der aktiven Tasche erhalten, was möglicherweise die Substratbindung verhindert. Es konnte gezeigt werden, dass bei Inkubation mit CtsB das Linkerpeptid verkürzt wird und die aktive Tasche somit zugänglich war. In dieser Form entsprach das Plbd2 strukturell der aktiven Form anderer Ntn-Hydrolasen (Oinonen, Rouvinen, 2000) und vermutlich des humanen Plbd2 (Jensen *et al.*, 2007). Mit einem *in vitro* mit CtsB aktiviertem Plbd2 sollten somit erfolgsversprechende Aktivitätstests durchgeführt werden können. Als mögliches Substrat sollte neben N-Acyl-Ethanolaminen und Sphingosin-Verbindungen besonders das bakterielle Lipid A in Betracht gezogen werden.

Für die lysosomale Ntn-Hydrolase saure Ceramidase (*acid ceramidase*, AC) ist ein Aktivitätsassay bekannt, der auf der Hydrolyse des Substrates Ceramid in Liposomen und dem Nachweis der Spaltprodukte über Flüssigchromatographie beruht (Linke *et al.*, 2001). Da für Plbd2 *in vivo* eine mit der AC vergleichbare Aktivität bei der Hydrolyse komplexer Lipide erwartet wird, sind möglicherweise auch ähnliche Bedingungen *in vitro* erforderlich. Aufgrund der hohen Komplexität und Empfindlichkeit eignet sich ein derartiger Assay jedoch nur bedingt für die Untersuchung unterschiedlicher Substrate. Vielversprechender wäre möglicherweise die Bestimmung des Umsatzes von Fluoreszenz-gekoppelten oder Radioaktiv-markierten Lipidsubstraten *in vivo*, um die Funktion des Plbd2 einzugrenzen.

Bezüglich der Spaltung des β -Fragments könnte das humane Plbd2 zum Vergleich herangezogen werden. Für dieses wurde keine Spaltung im β -Fragment beschrieben (Jensen *et al.*, 2007), sodass die Erzeugung einer „humanisierten“ Variante durch Austausch einzelner Peptidabschnitte im murinen Plbd2 die Spaltung ebenfalls verhindern könnte. Nach Charakterisierung der Spaltstelle, könnte vermutlich auch die beteiligte Protease identifiziert werden. Ein Ansatz könnte dazu die Expression der Varianten in Zellen mit Defizienzen einzelner Hydrolasen (CtsB^{-/-}, CtsL^{-/-}, CtsB/L^{-/-}, AEP^{-/-}) sein. Die Bedeutung der Spaltung für die Aktivität des Plbd2 kann jedoch ausschließlich durch einen Vergleich der beiden Varianten im Aktivitätsassay beurteilt werden, der auch deshalb von besonderer Relevanz bleibt.

Bei den Experimenten zur Sortierung des Plbd2 in MLI- und MPR-Zellen konnte gezeigt werden, dass ein großer Teil des Plbd2 in das Medium sekretiert wird, jedoch in beiden Sortierungsdefizienten Zelltypen unprozessiertes Pro-Plbd2 in lysosomalen Kompartimenten vorliegt. Eine enzymatische Aktivität ist für das Pro-Plbd2 nicht zu erwarten, sodass das Ausbleiben der Plbd2-

Aktivität möglicherweise zum Phänotyp bei MLII und MPR-Defizienz in der Maus beiträgt. Ob die ausbleibende Prozessierung des Pro-Plbd2 durch das Fehlen relevanter Proteasen bedingt ist, könnte ein Immunoblot von Proben der Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation zeigen, in dem sowohl das Plbd2 als auch die in Frage kommenden Proteasen mit spezifischen Antikörpern detektiert werden könnten. Bei gleichfalls lysosomaler Kolo-kalisation der Proteasen mit Plbd2, wäre das Ausbleiben der Plbd2-Prozessierung eher auf veränderte lysosomale Reaktionsbedingungen bei diesen Speichererkrankungen (*lysosomal storage disorders*, LSDs) zurückzuführen. Ein ähnlicher Effekt wäre dann möglicherweise auch bei anderen LSDs zu erwarten und sollte weiter untersucht werden.

Die unterschiedliche Effizienz der lysosomalen Sortierung von Plbd2 in MLII- und MPR-Zellen ist möglicherweise auf eine veränderte Glykosylierung des Proteins zurückzuführen, die in einer reduzierten Wiederaufnahme von sekretiertem Protein resultiert. In diesem Fall sollte rekombinantes Plbd2, das zu den Zellen gegeben wird, in beiden Zelllinien gleichermaßen aufgenommen werden, während die M6P-Rezeptoren mit freiem M6P gesättigt werden. Um zu untersuchen, ob die lysosomale Sortierung in MPR-Zellen ausschließlich auf der Wiederaufnahme des Plbd2 beruht, könnte dieser Weg mit dem Endocytose-Inhibitor Chloroquin blockiert werden. Um die relevanten Transportwege zu identifizieren, könnten in den MPR-Zellen die in Frage kommenden Transportrezeptoren wie der Mannose-Rezeptor, Sortilin 1, Lrp1 oder der LDL-Rezeptor (Markmann *et al.*, 2015) durch siRNA-*knockdown* herunterreguliert oder über CRISPR-Cas9 inaktiviert werden.

In den erzeugten Mausmodellen konnte Plbd1- bzw. Plbd2-mRNA auf geringem Niveau detektiert werden, während das jeweilige Protein nicht nachgewiesen werden konnte. Um zu untersuchen, ob die mRNA trotz des vorzeitigen Stoppcodons (*premature termination codon*, PTC) stabil blieb oder ob eine verkürzte Splicevariante ohne das Exon mit dem PTC vorlag, sollte die mRNA kloniert und sequenziert werden. Eine Plbd2-mRNA ohne Exon 5 – 7 (Leu220 - Gly377) würde das Exon mit dem PTC ausschließen ohne das Leseraster zu verschieben. Durch Expression einer entsprechend verkürzten cDNA könnte untersucht werden, ob weiterhin Protein gebildet werden kann.

Aufgrund der Sequenzhomologie von Plbd2 zur Acyl-Oxyacyl-Hydrolase (Aoah), ist eine Funktion beim Abbau des Lipid A und damit bei der Ausbildung einer Lipid A-induzierten Immuntoleranzphase denkbar. Im Plbd2-defizienten Mausmodell wären in dem Fall gegenüber WT-Tieren bei wiederholter intraperitonealer Injektion von LPS veränderte IL-6-Level im Blutserum messbar (Lu *et al.*, 2008).

Plbd2 konnte in den Kupffer-Zellen der Leber nachgewiesen werden, die für weitere Experimente bezüglich der Funktion und dem Substrat des Proteins anhand etablierter Protokolle isoliert werden

können (Li *et al.*, 2014). Im Vergleich von WT- und Plbd2-*knockout*-Makrophagen könnte der Umsatz von Fluoreszenz-gekoppelten oder Radioaktiv-markierten Lipidsubstraten *in vivo* bestimmt werden, um die Funktion des Plbd2 zu untersuchen. Auch für den Vergleich der intrazellulären Lipidkomposition von WT- und Plbd2-*knockout*-Zellen in der Lipidomik, möglicherweise auch nach Inkubation mit potentiellen Substraten, würden sich isolierte Kupfferzellen gut eignen.

Die genaue Lokalisierung des Plbd2-Signals im Hirn könnte durch serielle histologische Schnitte erfolgen, anhand derer ein 3D-Bild des Hirnareals erstellt werden könnte (Pichat *et al.*, 2018). Das Plbd2 scheint sowohl im Isocortex als auch im Pons in Arealen vorzuliegen, die im Zusammenhang mit Motorik und Lernen stehen, sodass die Tiere in Verhaltenstests auf Auffälligkeiten untersucht werden sollten.

Die Verteilung des Plbd1 im Gewebe konnte aufgrund des hohen Hintergrundsignals nicht aufgeklärt werden. Mit einem alternativen, vorzugsweise monoklonalen Plbd1-Antikörper könnten möglicherweise Plbd1-positive Zelltypen identifiziert werden, um weitere Hinweise auf dessen Funktion zu erlangen.

In den Geweben sollten nach der erfolgten initialen Charakterisierung der KO-Mäuse zudem die Expressionsniveaus und Enzymaktivitäten weiterer lysosomaler Proteine überprüft werden, die einen Hinweis auf pathologische Veränderungen in den Lysosomen geben könnten.

Aufgrund der geringen Effizienz der Plbd1-Guide-RNA konnte nicht von Beginn an mit einem Plbd1-Plbd2-Doppelknockout-Mausmodell gearbeitet werden, weshalb deren Defizienzen in dieser Arbeit einzeln charakterisiert wurden. Eine wechselseitige Kompensation der Funktionsverluste von Plbd1 und Plbd2 ist weiterhin nicht ausgeschlossen, sodass die in Zukunft vorliegende Doppelknockout-Maus weiteren Aufschluss über die Proteinfunktionen geben könnte.

7 Literaturverzeichnis

- Ahlberg, J., Glaumann, H. (1985) Uptake-Microautophagy-and degradation of exogenous proteins by isolated rat liver lysosomes. Effects of pH, ATP, and inhibitors of proteolysis. *Experimental and Molecular Pathology*. 42(1), 78–88.
- Alagaratnam, S., Lind, G.E., Kraggerud, S.M., Lothe, R.A., Skotheim, R.I. (2011) The testicular germ cell tumour transcriptome. *International Journal of Andrology*. 34(4(2)), 133–151.
- Alhouayek, M., Botteman, P., Subramanian, K. V., Lambert, D.M., Makriyannis, A., Cani, P.D., Muccioli, G.G. (2015) N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase inhibition increases colon N-palmitoylethanolamine levels and counteracts murine colitis. *FASEB Journal*. 29(2), 650–661.
- Appelmans, F., Wattiaus, D., Duve, C. (1954) Tissue fractionation studies, The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. *Biochem J*. 59(1951), 604–617.
- Austyn, J.M., Gordon, S. (1981) F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *European Journal of Immunology*. 11(10), 805–815.
- Azuma, N., O'Brien, J.S., Moser, H.W., Kishimoto, Y. (1994) Stimulation of acid ceramidase activity by saposin D. *Archives of biochemistry and biophysics*. 311(2), 354–7.
- Ballabio, A., Gieselmann, V. (2009) Lysosomal disorders: From storage to cellular damage. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 1793(4), 684–696.
- Banning, A., König, J.F., Gray, S.J., Tikkanen, R. (2017) Functional analysis of the Ser149/Thr149 variants of human aspartylglucosaminidase and optimization of the coding sequence for protein production. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(4).
- Barrangou, R., Birmingham, A., Wiemann, S., Beijersbergen, R.L., Hornung, V., Smith, A.V.B. (2015) Advances in CRISPR-Cas9 genome engineering: Lessons learned from RNA interference. *Nucleic Acids Research*. 43(7), 3407–3419.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. a, Horvath, P. (2007) CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*. 315(5819), 1709–1712.
- Bazykin, G.A., Kochetov, A. V. (2011) Alternative translation start sites are conserved in eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*. 39(2), 567–577.
- Beers, C., Burich, A., Kleijmeer, M.J., Griffith, J.M., Wong, P., Rudensky, A.Y. (2005) Cathepsin S Controls MHC Class II-Mediated Antigen Presentation by Epithelial Cells In Vivo. *The Journal of Immunology*. 174(3), 1205–1212.
- Belgrader, P., Maquat, L.E. (1994) Nonsense but not missense mutations can decrease the abundance of nuclear mRNA for the mouse major urinary protein, while both types of mutations can facilitate exon skipping. *Molecular and cellular biology*. 14(9), 6326–36.
- Bergfeld, A.K., Pearce, O.M.T., Diaz, S.L., Pham, T., Varki, A. (2012) Metabolism of vertebrate amino sugars with N-glycolyl groups: Elucidating the intracellular fate of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid. *Journal of Biological Chemistry*. 287(34), 28865–28881.
- Bieberstein, N.I., Oesterreich, F.C., Straube, K., Neugebauer, K.M. (2012) First exon length controls active chromatin signatures and transcription. *Cell Reports*. 2(1), 62–68.
- Blott, E.J., Griffiths, G.M. (2002) Secretory lysosomes. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 3(2), 122–31.
- Bonifacino, J.S., Glick, B.S. (2004) The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell*. 116(2), 153–166.

- Bonifacino, J.S., Traub, L.M. (2003) Signals for Sorting of Transmembrane Proteins to Endosomes and Lysosomes. *Annual Review of Biochemistry*. 72(1), 395–447.
- Brannigan, J.A., Dodson, G., Duggleby, H.J., Moody, P.C.E., Smith, J.L., Tomchick, D.R., Murzin, A.G. (1995) A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature*. 378(6555), 413–416.
- Braulke, T., Bonifacino, J.S. (2009) Sorting of lysosomal proteins. *Biochimica et biophysica acta*. 1793(4), 605–14.
- Campbell, P., Thompson, J.N., Fraser, J.R., Laurent, T.C., Pertoft, H., Roden, L. (1990) N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase in hepatocytes, Kupffer cells and sinusoidal endothelial cells from rat liver. *Hepatology*. 11(2), 199–204.
- Carette, J.E., Raaben, M., Wong, A.C., Herbert, A.S., Obernosterer, G., Mulherkar, N., Kuehne, A.I., Kranzusch, P.J., Griffin, A.M., Ruthel, G., Cin, P.D., Dye, J.M., Whelan, S.P., Chandran, K., Brummelkamp, T.R. (2011) Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature*. 477(7364), 340–343.
- Chapel, A., Kieffer-Jaquinod, S., Sagné, C., Verdon, Q., Ivaldi, C., Mellal, M., Thirion, J., Jadot, M., Bruley, C., Garin, J., Gasnier, B., Journet, A. (2013) An extended proteome map of the lysosomal membrane reveals novel potential transporters. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. 12(6), 1572–88.
- Chapman, J.R., Taylor, M.R.G., Boulton, S.J. (2012) Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Molecular Cell*. 47(4), 497–510.
- Chemes, H. (1986) The phagocytic function of sertoli cells: A morphological, biochemical, and endocrinological study of lysosomes and acid phosphatase localization in the rat testis. *Endocrinology*. 119(4), 1673–1681.
- Chen, J.M., Dando, P.M., Stevens, R. a, Fortunato, M., Barrett, A.J. (1998) Cloning and expression of mouse legumain, a lysosomal endopeptidase. *The Biochemical journal*. 335 (Pt 1, 111–7.
- Chen, S., Lee, B., Lee, A.Y.F., Modzelewski, A.J., He, L. (2016) Highly efficient mouse genome editing by CRISPR ribonucleoprotein electroporation of zygotes. *Journal of Biological Chemistry*. 291(28), 14457–14467.
- Chen, Y.H., Su, L.H., Sun, C.H. (2008) Incomplete nonsense-mediated mRNA decay in *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology*. 38(11), 1305–1317.
- Committee on Human Gene Editing, U. (2017) *Human Genome Editing - Science, Ethics, and Governance*. Washington, D.C.: National Academies Press.
- Conrad, K.S., Cheng, T.W., Ysselstein, D., Heybrock, S., Hoth, L.R., Chrnyk, B.A., Am Ende, C.W., Krainc, D., Schwake, M., Saftig, P., Liu, S., Qiu, X., Ehlers, M.D. (2017) Lysosomal integral membrane protein-2 as a phospholipid receptor revealed by biophysical and cellular studies. *Nature Communications*. 8(1).
- Crispe, I.N. (2011) Liver Angitgen-Presenting Cells. *J. Hepatol*. 54(2), 357–365.
- D’Agostino, P.M., Gottfried-Blackmore, A., Anandasabapathy, N., Bulloch, K. (2012) Brain dendritic cells: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*. 124(5), 599–614.
- Dall, E., Brandstetter, H. (2012) Activation of legumain involves proteolytic and conformational events, resulting in a context-and substrate-dependent activity profile. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*. 68(1), 24–31.
- Dall, E., Brandstetter, H. (2013) Mechanistic and structural studies on legumain explain its zymogenicity, distinct activation pathways, and regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110(27), 10940–5.

- Dall, E., Brandstetter, H. (2016) Structure and function of legumain in health and disease. *Biochimie*. 122, 126–150.
- Dalod, M., Chelbi, R., Malissen, B., Lawrence, T. (2014) Dendritic cell maturation: Functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO Journal*. 33(10), 1104–1116.
- Deuschl, F., Kollmann, K., von Figura, K., Lübke, T. (2006) Molecular characterization of the hypothetical 66.3-kDa protein in mouse: lysosomal targeting, glycosylation, processing and tissue distribution. *FEBS letters*. 580, 5747–52.
- Deuschl, F.G. (2008) Molekulare Charakterisierung des murinen 66.3-kDa-Proteins. *Dissertation, Universität Göttingen*.
- Diao, H., Li, X., Hu, S. (2013) The identification of dysfunctional crosstalk of pathways in Parkinson disease. *Gene*. 515(1), 159–162.
- Dierks, T., Schlotawa, L., Frese, M.A., Radhakrishnan, K., von Figura, K., Schmidt, B. (2009) Molecular basis of multiple sulfatase deficiency, mucopolipidosis II/III and Niemann-Pick C1 disease - Lysosomal storage disorders caused by defects of non-lysosomal proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 1793(4), 710–725.
- Dittmer, F., Ulbrich, E.J., Hafner, a, Schmahl, W., Meister, T., Pohlmann, R., von Figura, K. (1999) Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient mice are cell type-specific. *Journal of cell science*. 112 (Pt 1(August 2016), 1591–1597.
- Dixit, N., Salamat-Miller, N., Salinas, P.A., Taylor, K.D., Basu, S.K. (2016) Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20 Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1–10.
- Doherty, G.J., McMahon, H.T. (2009) Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*. 78(1), 857–902.
- Doudna, J.A., Charpentier, E. (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 346(6213).
- de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmans, F. (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochemical Journal*. 60(4), 604–617.
- Englen, M.D., Valdez, Y.E., Lehnert, N.M., Lehnert, B.E. (1995) Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is expressed and secreted in cultures of murine L929 cells. *Journal of Immunological Methods*. 184(2), 281–283.
- Erickson, A.H. (1989) Biosynthesis of lysosomal endopeptidases. *Journal of Cellular Biochemistry*. 40(1), 31–41.
- Van Erp, P.B.G.G., Jackson, R.N., Carter, J., Golden, S.M., Bailey, S., Wiedenheft, B. (2015) Mechanism of CRISPR-RNA guided recognition of DNA targets in Escherichia coli. *Nucleic Acids Research*. 43(17), 8381–8391.
- Erwin, A.L., Munford, R.S. (1990) Deacylation of structurally diverse lipopolysaccharides by human acyloxyacyl hydrolase. *The Journal of biological chemistry*. 265(27), 16444–9.
- Eskelinen, E.-L., Saftig, P. (2009) Autophagy: A lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1793(4), 664–673.
- Eskelinen, E.L. (2006) Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular Aspects of Medicine*. 27(5–6), 495–502.

- Felbor, U., Kessler, B., Mothes, W., Goebel, H.H., Ploegh, H.L., Bronson, R.T., Olsen, B.R. (2002) Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99(12), 7883–7888.
- Feng, Z.Y., Ming, W., Li, L.D., Louis, J., Fei, W.Y. (1990) Adoptive transfer of murine autoimmune orchitis with sperm-specific t lymphoblasts. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 24(1), 51–59.
- Fijak, M., Meinhardt, A. (2006) Monika Fijak Andreas Meinhardt The testis in immune privilege. *Immunological Reviews*. 213, 66–81.
- Fischer, S.K., Cheu, M., Peng, K., Lowe, J., Araujo, J., Murray, E., McClintock, D., Matthews, J., Siguenza, P., Song, A. (2016) Specific Immune Response to Phospholipase B-Like 2 Protein, a Host Cell Impurity in Lebrikizumab Clinical Material. *The AAPS Journal*. 13(II), 254–263.
- Forgac, M. (1999) Structure and Properties of the Vacuolar (H⁺)-ATPases. *The Journal of biological chemistry*. 274(19), 12951–12954.
- Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., Maeder, M.L., Reyon, D., Joung, J.K., Sander, J.D. (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*. 31(9), 822–826.
- Fuller, M., Meikle P.J., Hopwood, J.J. (2006) Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview. In A. Mehta, M. Beck, & G. Sunder-Plassmann, eds. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford: Oxford PharmaGenesis, pp. 1–8.
- Gao, X., Tao, Y., Lamas, V., Huang, M., Yeh, W.H., Pan, B., Hu, Y.J., Hu, J.H., Thompson, D.B., Shu, Y., Li, Y., Wang, H., Yang, S., Xu, Q., Polley, D.B., Liberman, M.C., Kong, W.J., Holt, J.R., Chen, Z.Y., Liu, D.R. (2018) Treatment of autosomal dominant hearing loss by in vivo delivery of genome editing agents. *Nature*. 553(7687), 217–221.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook*. pp. 571–607.
- Gaudelli, N.M., Komor, A.C., Rees, H.A., Packer, M.S., Badran, A.H., Bryson, D.I., Liu, D.R. (2017) Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 1–27.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K. (2010) Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science*. 327(5966), 656–661.
- Gibbings, S.L., Goyal, R., Desch, A.N., Leach, S.M., Prabagar, M., Atif, S.M., Bratton, D.L., Janssen, W., Jakubzick, C. V. (2015) Transcriptome analysis highlights the conserved difference between embryonic and postnatal-derived alveolar macrophages. *Blood*. 126(11), 1357–1366.
- Gidalevitz, T., Stevens, F., Argon, Y. (2013) Orchestration of secretory protein folding by ER chaperones. *BBA - Molecular Cell Research*. 1833(11), 2410–2424.
- Gieselmann, V. (2006) Reversibility of cellular and organ pathology in enzyme replacement trials in animal models of lysosomal storage diseases. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*. 95, 93–99.
- Gioannini, T.L., Teghanemt, A., Zhang, D., Prohinar, P., Levis, E.N., Munford, R.S., Weiss, J.P. (2007) Endotoxin-binding proteins modulate the susceptibility of bacterial endotoxin to deacylation by acyloxyacyl hydrolase. *The Journal of biological chemistry*. 282(11), 7877–84.
- Gómez-Muñoz, A. (2006) Ceramide 1-phosphate/ceramide, a switch between life and death. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 1758(12), 2049–2056.

- Gonzalez, A.C., Schweizer, M., Jagdmann, S., Bernreuther, C., Reinheckel, T., Saftig, P., Damme, M. (2018) Unconventional Trafficking of Mammalian Phospholipase D3 to Lysosomes. *CellReports*. 22, 1–14.
- Gopalakrishnan, M.M., Grosch, H.-W., Locatelli-Hoops, S., Werth, N., Smolenová, E., Nettersheim, M., Sandhoff, K., Hasilik, A. (2004) Purified recombinant human prosaposin forms oligomers that bind procathepsin D and affect its autoactivation. *Biochemical Journal*. 383(3), 507–515.
- Guilliams, M., Dutertre, C.A., Scott, C.L., McGovern, N., Sichien, D., Chakarov, S., Van Gassen, S., Chen, J., Poidinger, M., De Prijck, S., Tavernier, S.J., Low, I., Irac, S.E., Mattar, C.N., Sumatoh, H.R., Low, G.H.L., Chung, T.J.K., Chan, D.K.H., Tan, K.K., Hon, T.L.K., Fossum, E., Bogen, B., Choolani, M., Chan, J.K.Y., Larbi, A., Luche, H., Henri, S., Saeys, Y., Newell, E.W., Lambrecht, B.N., Malissen, B., Ginhoux, F. (2016) Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity*. 45(3), 669–684.
- Haberkant, P., Stein, F., Höglinger, D., Gerl, M.J., Brügger, B., Van Veldhoven, P.P., Krijgsveld, J., Gavin, A.-C.C., Schultz, C. (2015) Bifunctional Sphingosine for Cell-Based Analysis of Protein-Sphingolipid Interactions. *ACS chemical biology*. 11(1), 222–230.
- Hagemann, S., Günther, T., Dennemärker, J., Luhmüller, T., Brömme, D., Schüle, R., Peters, C., Reinheckel, T. (2004) The human cysteine protease cathepsin V can compensate for murine cathepsin L in mouse epidermis and hair follicles. *European Journal of Cell Biology*. 83(11–12), 775–780.
- Halangk, W., Lerch, M.M., Brandt-Nedelev, B., Roth, W., Ruthenbuerger, M., Reinheckel, T., Domschke, W., Lippert, H., Peters, C., Deussing, J. (2000) Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *Journal of Clinical Investigation*. 106(6), 773–781.
- Hall, B., Limaye, A., Kulkarni, A.B. (2009) Overview: Generation of Gene Knockout Mice. In *Current Protocols in Cell Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 1–17.
- Hall, R.S., Dao, F.X., Xu, C., Rauschel, F.M. (2007) N-acetyl-D-glucosamine-6-phosphate deacetylase: Substrate activation via a single divalent metal ion. *Biochemistry*. 46(27), 7942–7952.
- Hanson, S.R., Best, M.D., Wong, C. (2004) Sulfatasen: Struktur, Mechanismus, biologische Aktivität, Inhibition, Anwendung in Synthesen. *Angewandte Chemie*. 116(43), 5858–5886.
- Hargrove, J.L., Hulsey, M.G., Beale, E.G. (1991) The kinetics of mammalian gene expression. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 13(12), 667–674.
- Hart, P.D., Young, M.R. (1991) Ammonium chloride, an inhibitor of phagosome-lysosome fusion in macrophages, concurrently induces phagosome-endosome fusion, and opens a novel pathway: studies of a pathogenic mycobacterium and a nonpathogenic yeast. *Journal of Experimental Medicine*. 174(4), 881–889.
- Hashimoto, M., Yamashita, Y., Takemoto, T. (2016) Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse. *Developmental Biology*. 418(1), 1–9.
- Hasilik, A., von Figura, K. (1981) Oligosaccharides in Lysosomal Enzymes: Distribution of High-Mannose and Complex Oligosaccharides in Cathepsin D and β -Hexosaminidase. *European Journal of Biochemistry*. 121(1), 125–129.
- Hayashi, H., Shitara, M., Yamasaki, F. (1982) The origin of lipid accumulated in liver lysosomes after administration of triton WR-1339. *Journal of Biochemistry*. 92(5), 1585–1590.
- He, Z.Y., Men, K., Qin, Z., Yang, Y., Xu, T., Wei, Y.Q. (2017) Non-viral and viral delivery systems for CRISPR-Cas9 technology in the biomedical field. *Science China Life Sciences*. 60(5), 458–467.

- Hewitt, L., Kasche, V., Lummer, K., Lewis, R.J., Murshudov, G.N., Verma, C.S., Dodson, G.G., Wilson, K.S. (2000) Structure of a slow processing precursor penicillin acylase from *Escherichia coli* reveals the linker peptide blocking the active-site cleft. *Journal of Molecular Biology*. 302(4), 887–898.
- Hiesberger, T., Hüttler, S., Rohlmann, A., Schneider, W., Sandhoff, K., Herz, J. (1998) Cellular uptake of saposin (SAP) precursor and lysosomal delivery by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *EMBO Journal*. 17(16), 4617–4625.
- Hohensee, I. (2008) Molekulare und biochemische Analyse des Gene Trap Mausmodells für das 66.3-kDa-Protein. *Diplomarbeit*.
- Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., Weissman, J.S. (2009) Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*. 186(3), 323–331.
- Hsing, L.C., Rudensky, A.Y. (2005) The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunological Reviews*. 207, 229–241.
- Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T.J., Marraffini, L.A., Bao, G., Zhang, F. (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*. 31(9), 827–832.
- Hug, N., Longman, D., Cáceres, J.F. (2016) Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Research*. 44(4), 1483–1495.
- Ikonen, E., Julkunen, I., Tollersrud, O.K., Kalkkinen, N., Peltonen, L. (1993) Lysosomal aspartylglucosaminidase is processed to the active subunit complex in the endoplasmic reticulum. *The EMBO journal*. 12(1), 295–302.
- Inagawa, H., Kohchi, C., Soma, G.I. (2011) Oral administration of lipopolysaccharides for the prevention of various diseases: Benefit and usefulness. *Anticancer Research*. 31(7), 2431–2436.
- Ishida, Y., Nayak, S., Mindell, J. a, Grabe, M. (2013) A model of lysosomal pH regulation. *The Journal of general physiology*. 141(6), 705–20.
- Iyer, V., Boroviak, K., Thomas, M., Doe, B., Ryder, E., Adams, D., Campus, W.G. (2018) No unexpected CRISPR-Cas9 off-target activity revealed by trio sequencing of gene-edited mice. *bioRxiv*. ahead of p, 1–25.
- Jainchill, J.L., Aaronson, S.A., Todaro, G.J. (1969) Murine Sarcoma and Leukemia Viruses: Assay Using Clonal Lines of Contact-Inhibited Mouse Cells. *Journal of Virology*. 4(5), 549–553.
- Jensen, A.G., 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). *The Biochemical journal*. 402(3), 449–58.
- Jensen, K.T., Fløe, L., Petersen, T.S., Huang, J., Xu, F., Bolund, L., Luo, Y., Lin, L. (2017) Chromatin accessibility and guide sequence secondary structure affect CRISPR-Cas9 gene editing efficiency. *FEBS Letters*. 591(13), 1892–1901.
- Jiang, C., Pugh, B.F. (2009) Nucleosome positioning and gene regulation: Advances through genomics. *Nature Reviews Genetics*. 10(3), 161–172.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337(6096), 816–821.
- Jordans, S., Jenko-Kokalj, S., Kühn, N.M., Tedelind, S., Sendt, W., Brömme, D., Turk, D., Brix, K. (2009) Monitoring compartment-specific substrate cleavage by cathepsins B, K, L, and S at physiological pH and redox conditions. *BMC Biochemistry*. 10(1), 23.

- Ju, X., Yan, Y., Liu, Q., Li, N., Sheng, M., Zhang, L., Li, X., Liang, Z., Huang, F., Liu, K., Zhao, Y., Zhang, Y., Zou, Z., Du, J., Zhong, Y., Zhou, H., Yang, P., Lu, H., Tian, M., Li, D., Zhang, J., Jin, N., Jiang, C. (2015) Neuraminidase of Influenza A Virus Binds Lysosome-Associated Membrane Proteins Directly and Induces Lysosome Rupture. *Journal of Virology*. 89(20), 10347–10358.
- Kalatzis, V., Cherqui, S., Antignac, C., Gasnier, B. (2001) Cystinosis, the protein defective in cystinosis, is a H(+)-driven lysosomal cystine transporter. *The EMBO journal*. 20(21), 5940–9.
- Kalinovsky, A., Boukhtouche, F., Blazeski, R., Bornmann, C., Suzuki, N., Mason, C.A., Scheiffele, P. (2011) Development of axon-target specificity of ponto-cerebellar afferents. *PLoS Biology*. 9(2).
- Kasper, D., Dittmer, F., Von Figura, K., Pohlmann, R. (1996) Neither type of mannose 6-phosphate receptor is sufficient for targeting of lysosomal enzymes along intracellular routes. *Journal of Cell Biology*. 134(3), 615–623.
- Kaushik, S., Cuervo, A.M. (2012) Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends in cell biology*. 22(8), 407–17.
- Kettwig, M. (2010) Funktionelle Analyse des murinen 66.3-kDa-Proteins. *Dissertation, Universität Göttingen*.
- Kim, H.J., Na, J.I., Min, B.W., Na, J.Y., Lee, J.H., Lee, Y.J., Kim, H.S., Park, J.T. (2014) Evaluation of protein expression in housekeeping genes across multiple tissues in rats. *Korean Journal of Pathology*. 48(3), 193–200.
- Kim, J.K., Yang, I.S., Shin, H.J., Cho, K.J., Ryu, E.K., Kim, S.H., Park, S.S., Kim, K.H. (2006) Insight into autoproteolytic activation from the structure of cephalosporin acylase: a protein with two proteolytic chemistries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(6), 1732–7.
- Kim, Y., Kim, S., Earnest, T.N., Hol, W.G.J. (2002) Precursor structure of cephalosporin acylase. Insights into autoproteolytic activation in a new N-terminal hydrolase family. *The Journal of biological chemistry*. 277(4), 2823–9.
- Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z., Joung, J.K. (2016) High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. 529(7587), 490–495.
- Kollmann, K. (2007) Identifizierung und molekulare Charakterisierung des lysosomalen Matrixproteins SCPEP. *Dissertation, Universität Göttingen*.
- Kollmann, K., Damme, M., Markmann, S., Morelle, W., Schweizer, M., Hermans-Borgmeyer, I., Röchert, A.K., Pohl, S., Lübke, T., Michalski, J.-C.C., Käkelä, R., Walkley, S.U., Braulke, T. (2012) Lysosomal dysfunction causes neurodegeneration in mucopolipidosis II ‘knock-in’ mice. *Brain: a journal of neurology*. 135(9), 2661–75.
- Kollmann, K., Mutenda, K.E., Balleininger, M., Eckermann, E., von Figura, K., Schmidt, B., Lübke, T. (2005) Identification of novel lysosomal matrix proteins by proteome analysis. *Proteomics*. 5(15), 3966–78.
- Kornfeld, R., Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual review of biochemistry*. 54, 631–64.
- Kratochwil, C.F., Maheshwari, U., Rijli, F.M. (2017) The Long Journey of Pontine Nuclei Neurons: From Rhombic Lip to Cortico-Ponto-Cerebellar Circuitry. *Frontiers in Neural Circuits*. 11(May), 1–19.
- Kundra, R., Kornfeld, S. (1999) Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*. 274(43), 31039–31046.

- Lacey, D.C., Achuthan, A., Fleetwood, A.J., Dinh, H., Roiniotis, J., Scholz, G.M., Chang, M.W., Beckman, S.K., Cook, A.D., Hamilton, J.A. (2012) Defining GM-CSF- and Macrophage-CSF-Dependent Macrophage Responses by In Vitro Models. *The Journal of Immunology*. 188(11), 5752–5765.
- Lakomek, K. (2009) Structural characterisation of the lysosomal 66.3 kDa protein and of the DNA repair enzyme MTH0212 by means of X-ray crystallography. *Dissertation, Universität Göttingen*.
- Lakomek, K., Dickmanns, A., Kettwig, M., Urlaub, H., Ficner, R., Lübke, T. (2009) Initial insight into the function of the lysosomal 66.3 kDa protein from mouse by means of X-ray crystallography. *BMC structural biology*. 9(56).
- Laplante, M., Sabatini, D.M. (2013) Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *Journal of cell science*. 126(Pt 8), 1713–9.
- Lattin, J.E., Schroder, K., Su, A.I., Walker, J.R., Zhang, J., Wiltshire, T., Saijo, K., Glass, C.K., Hume, D.A., Kellie, S., Sweet, M.J. (2008) Expression analysis of G Protein-Coupled Receptors in mouse macrophages. *Immunome Research*. 4(1), 1–13.
- Lefrancois, S., Zeng, J., Hassan, A.J., Canuel, M., Morales, C.R. (2003) The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *EMBO Journal*. 22(24), 6430–6437.
- Leibiger, C., Kosyakova, N., Mkrtchyan, H., Gleib, M., Trifonov, V., Liehr, T. (2013) First molecular cytogenetic high resolution characterization of the NIH 3T3 cell line by murine multicolor banding. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*. 61(4), 306–12.
- Leighton, F., Poole, B., Beaufay, H., Baudhuin, P., Coffey, J.W., 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. *Journal of Cell Biology*. 37(2), 482–513.
- Leung, D., Abbenante, G., Fairlie, D.P. (2000) Protease inhibitors: Current status and future prospects. *Journal of Medicinal Chemistry*. 43(3), 305–341.
- Li, D.N., Matthews, S.P., Antoniou, A.N., Mazzeo, D., Watts, C. (2003) Multistep autoactivation of asparaginyl endopeptidase in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 278(40), 38980–38990.
- Li, N., Wang, T., Han, D. (2012) Structural, cellular and molecular aspects of immune privilege in the testis. *Frontiers in Immunology*. 3(JUN), 1–12.
- Li, P. zhi, Li, J. zheng, Li, M., Gong, J. ping, He, K. (2014) An efficient method to isolate and culture mouse Kupffer cells. *Immunology Letters*. 158(1–2), 52–56.
- Li, S., Qiu, F., Xu, A., Price, S.M., Xiang, M. (2004) Barhl1 regulates migration and survival of cerebellar granule cells by controlling expression of the neurotrophin-3 gene. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 24(12), 3104–14.
- Lin, M., Krawitz, D., Callahan, M.D., Deperalta, G., Wecksler, A.T. (2018) Characterization of ELISA Antibody-Antigen Interaction using Footprinting-Mass Spectrometry and Negative Staining Transmission Electron Microscopy. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*. 29(5), 961–971.
- Linke, T., Wilkening, G., Sadeghlar, F., Mozcall, H., Bernardo, K., Schuchman, E., Sandhoff, K. (2001) Interfacial Regulation of Acid Ceramidase Activity: Stimulation of ceramide degradation by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 276(8), 5760–5768.

- Lobo, L.I., Wilton, D.C. (1997) Effect of lipid composition on lipoprotein lipase activity measured by a continuous fluorescence assay: effect of cholesterol supports an interfacial surface penetration model. *The Biochemical journal*. 321(3), 829–35.
- Lodato, S., Arlotta, P. (2015) Generating Neuronal Diversity in the Mammalian Cerebral Cortex. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 31(1), 699–720.
- Lodola, A., Branduardi, D., de Vivo, M., Capoferri, L., Mor, M., Piomelli, D., Cavalli, A. (2012) A catalytic mechanism for cysteine N-terminal nucleophile hydrolases, as revealed by free energy simulations. *PLoS ONE*. 7(2), 1–9.
- Di Lorenzo, G., Voltolini Velho, R., Winter, D., Thelen, M., Ahmadi, S., Schweizer, M., De Pace, R., Cornils, K., Yorgan, T.A., Grüb, S., Hermans-Borgmeyer, I., Schinke, T., Müller-Loennies, S., Braulke, T., Pohl, S. (2018) Lysosomal proteome and secretome analysis identifies missorted enzymes and their non-degraded substrates in mucopolidosis III mouse cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, ahead of print.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, L.A., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1), 265–275.
- Lu, M., Varley, A.W., Ohta, S., Hardwick, J., Munford, R.S. (2008) Host Inactivation of Bacterial Lipopolysaccharide Prevents Prolonged Tolerance Following Gram-Negative Bacterial Infection. *Cell Host and Microbe*. 4(3), 293–302.
- Lübke, T., Lobel, P., Sleat, D.E. (2009) Proteomics of the lysosome. *Biochimica et biophysica acta*. 1793(4), 625–35.
- Lüllmann-Rauch, R. (2015) *Taschenlehrbuch Histologie*. 5. Auflage. E. Asan, ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag KG.
- Luzio, J.P., Parkinson, M.D.J., Gray, S.R., Bright, N.A. (2009) The delivery of endocytosed cargo to lysosomes. *Biochemical Society Transactions*. 37(5), 1019–1021.
- Mach, L. (2002) Biosynthesis of lysosomal proteinases in health and disease. *Biological Chemistry*. 383(5), 751–756.
- Mach, L., Mort, J.S., Glossl, J. (1994) Maturation of human procathepsin B. *Journal of Biological Chemistry*. 269(17), 13030–13035.
- Maehr, R., Hang, H.C., Mintern, J.D., Kim, Y.-M., Cuvillier, A., Nishimura, M., Yamada, K., Shirahama-Noda, K., Hara-Nishimura, I., Ploegh, H.L. (2005) Asparagine endopeptidase is not essential for class II MHC antigen presentation but is required for processing of cathepsin L in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 174(11), 7066–7074.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., Church, G.M. (2013) RNA-Guided Human Genome Engineering. *Science*. 823.
- Markel, P., Shu, P., Ebeling, C., Carlson, G.A., Nagle, D.L., Smutko, J.S., Moore, K.J. (1997) Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nature Genetics*. 17(3), 280–284.
- Markmann, S., Thelen, M., Cornils, K., Schweizer, M., Brocke-Ahmadinejad, N., Willnow, T., Heeren, J., Gieselmann, V., Braulke, T., Kollmann, K. (2015) Lrp1/LDL Receptor Play Critical Roles in Mannose 6-Phosphate-Independent Lysosomal Enzyme Targeting. *Traffic*. 16(7), 743–759.
- Markwardt, F., Drawert, J., Walsmann, P. (1974) Synthetic low molecular weight inhibitors of serum kallikrein. *Biochemical pharmacology*. 23(16), 2247–56.
- Martinez-Pomares, L. (2012) The mannose receptor. *Journal of Leukocyte Biology*. 92(6), 1177–1186.

- Maruyama, T., Dougan, S.K., Truttmann, M.C., Bilate, A.M., Ingram, J.R., Ploegh, H.L. (2015) Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nature Biotechnology*. 33(5), 538–542.
- Maurel, M., Chevet, E., Tavernier, J., Gerlo, S. (2014) Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends in Biochemical Sciences*. 39(5), 245–254.
- Meier, E.M., Schwarzmann, G., Fürst, W., Sandhoff, K. (1991) The human GM2 activator protein: A substrate specific cofactor of β -hexosaminidase A. *Journal of Biological Chemistry*. 266(3), 1879–1887.
- Mellman, I. (1992) The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic. *The Journal of experimental biology*. 172, 39–45.
- Ménard, R., Carmona, E., Takebe, S., Dufour, E., Plouffe, C., Mason, P., Mort, J.S. (1998) Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin L. Contribution of both intermolecular and unimolecular events in the processing of procathepsin L in vitro. *The Journal of biological chemistry*. 273(8), 4478–84.
- Merkel, O., Fido, M., Mayr, J.A., Pruger, H., Raab, F., Zandonella, G., Kohlwein, S.D., Paltauf, F. (1999) Characterization and function in vivo of two novel phospholipases B/ lysophospholipases from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 274(40), 28121–28127.
- Mihara, K., Ito, Y., Hatano, Y., Komurasaki, Y., Sugimura, A., Jones, M., Liu, H., Mai, S., Lara-Velasco, O., Bai, L., Ketkar, A., Adams, M., Hirato, T., Ionescu, R. (2015) Host Cell Proteins: The Hidden Side of Biosimilarity Assessment. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 104(12), 3991–3996.
- Mills, S.E. (2007) *Histology for Pathologists*. 3rd Editio. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Miyaoka, Y., Berman, J.R., Cooper, S.B., Mayerl, S.J., Chan, A.H., Zhang, B., Karlin-Neumann, G.A., Conklin, B.R. (2016) Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing. *Scientific Reports*. 6(February), 1–12.
- Moore, D.F., Li, H., Jeffries, N., Wright, V., Cooper, R.A., Elkahloun, A., Gelderman, M.P., Zudaire, E., Blevins, G., Yu, H., Goldin, E., Baird, A.E. (2005) Using peripheral blood mononuclear cells to determine a gene expression profile of acute ischemic stroke: A pilot investigation. *Circulation*. 111(2), 212–221.
- Morgan, C.P., 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. *The Biochemical journal*. 382(Pt 2), 441–449.
- Mortimer, D., Curtis, E.F., Miller, R.G. (1987) Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *Journal of reproduction and fertility*. 81(1), 127–135.
- Munford, R., Lu, M., Varley, A. (2009) Kill the Bacteria...and Also Their Messengers? *Advances in Immunology*. 103(9), 29–48.
- Munford, R.S., Sheppard, P.O., O'Hara, P.J. (1995) Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure. *Journal of Lipid Research*. 36(8), 1653–1663.
- Müntener, K., Willmann, A., Zwicky, R., Svoboda, B., Mach, L., Baici, A. (2005) Folding competence of N-terminally truncated forms of human procathepsin B. *Journal of Biological Chemistry*. 280(12), 11973–11980.
- Musil, D., Zucic, D., Turk, D., Engh, R.A., Mayr, I., Huber, R., Popovic, T., Turk, V., Towatari, T., Katunuma, N. (1991) The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *The EMBO journal*. 10(9), 2321–30.

- Nägler, D.K., Ménard, R. (2003) Family C1 cysteine proteases: Biological diversity or redundancy? *Biological Chemistry*. 384(6), 837–843.
- Nepal, R.M., Mampe, S., Shaffer, B., Erickson, A.H., Bryant, P. (2006) Cathepsin L maturation and activity is impaired in macrophages harboring *M. avium* and *M. tuberculosis*. *International Immunology*. 18(6), 931–939.
- Nguyen, N.Y.N., Maxwell, M.J., Ooms, L.M., Davies, E.M., Hilton, A.A., Collinge, J.E., Hilton, D.J., Kile, B.T., Mitchell, C.A., Hibbs, M.L., Jane, S.M., Curtis, D.J. (2011) An ENU-induced mouse mutant of SHIP1 reveals a critical role of the stem cell isoform for suppression of macrophage activation. *Blood*. 117(20), 5362–5371.
- Ni, X., Morales, C.R. (2006) The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic*. 7(7), 889–902.
- Nissler, K., Strubel, W., Kreuzsch, S., Rommerskirch, W., Weber, E., Wiederanders, B. (1999) The half-life of human procathepsin S. *European Journal of Biochemistry*. 263(3), 717–725.
- O’Geen, H., Henry, I.M., Bhakta, M.S., Meckler, J.F., Segal, D.J. (2015) A genome-wide analysis of Cas9 binding specificity using ChIP-seq and targeted sequence capture. *Nucleic Acids Research*. 43(6), 3389–3404.
- O’Brien, J., Kishimoto, Y. (1991) Saposin Proteins: Structure, function and Role in Human Lysosomal Storage Disorders. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 5(3), 301–308.
- Oinonen, C., Rouvinen, J. (2000) Structural comparison of Ntn-hydrolases. *Protein science: a publication of the Protein Society*. 9(12), 2329–37.
- Oliver, D., Yuan, S., McSwiggin, H., Yan, W. (2015) Pervasive Genotypic Mosaicism in Founder Mice Derived from Genome Editing through Pronuclear Injection. *PLoS One*. 10(6).
- Olmsted, J.B., Carlson, K., Klebe, R., Ruddle, F., Rosenbaum, J. (1970) Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 65(1), 129–136.
- Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N.C.J., Dalbey, R.E. (2002) Signal peptidases. *Chemical Reviews*. 102(12), 4549–4579.
- Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., Ballabio, A. (2011) Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Human molecular genetics*. 20(19), 3852–66.
- Pan, X., Grigoryeva, L., Seyrantepe, V., Peng, J., Kollmann, K., Tremblay, J., Lavoie, J.L., Hinek, A., Lübke, T., Pshezhetsky, A. V (2014) Serine carboxypeptidase SCPEP1 and Cathepsin A play complementary roles in regulation of vasoconstriction via inactivation of endothelin-1. *PLoS genetics*. 10(2), e1004146.
- Park, J.H., Schuchman, E.H. (2006) Acid ceramidase and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 1758(12), 2133–2138.
- Pei, J., Grishin, N. V (2003) Peptidase family U34 belongs to the superfamily of N-terminal nucleophile hydrolases. *Protein science: a publication of the Protein Society*. 12(5), 1131–5.
- Peper, J. (2013) Prozessierung des murinen Plbd2. *Bachelorarbeit, Universität Bielefeld*.
- Perez-Pinera, P., Kocak, D.D., Vockley, C.M., Adler, A.F., Kabadi, A.M., Polstein, L.R., Thakore, P.I., Glass, K.A., Ousterout, D.G., Leong, K.W., Guilak, F., Crawford, G.E., Reddy, T.E., Gersbach, C.A. (2013) RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nature Methods*. 10(10), 973–976.

- Peters, C., Braun, M., Weber, B., Wendland, M., Schmidt, B., Pohlmann, R., Waheed, A., von Figura, K. (1990) Targeting of a lysosomal membrane protein: a tyrosine-containing endocytosis signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase is necessary and sufficient for targeting to lysosomes. *The EMBO journal*. 9(11), 3497–506.
- Petrosino, S., Campolo, M., Impellizzeri, D., Paterniti, I., Allarà, M., Gugliandolo, E., D’Amico, R., Siracusa, R., Cordaro, M., Esposito, E., Di Marzo, V., Cuzzocrea, S. (2017) 2-Pentadecyl-2-oxazoline, the oxazoline of PEA, modulates carrageenan-induced acute inflammation. *Frontiers in Pharmacology*. 8(May), 1–16.
- Pichat, J., Iglesias, J.E., Yousry, T., Ourselin, S., Modat, M. (2018) A Survey of Methods for 3D Histology Reconstruction. *Medical Image Analysis*. 46, 73–105.
- Pisoni, R.L., Acker, T.L., Lisowski, K.M., Lemons, R.M., Thoene, J.G. (1990) A cysteine-specific lysosomal transport system provides a major route for the delivery of thiol to human fibroblast lysosomes: Possible role in supporting lysosomal proteolysis. *Journal of Cell Biology*. 110(2), 327–335.
- Pisoni, R.L., Thoene, J.G. (1991) The transport systems of mammalian lysosomes. *Biochimica et biophysica acta*. 1071(4), 351–73.
- Platt, F.M., Boland, B., van der Spoel, A.C. (2012) The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *The Journal of cell biology*. 199(5), 723–34.
- Plum, S., Steinbach, S., Attems, J., Keers, S., Riederer, P., Gerlach, M., May, C., Marcus, K. (2016) Proteomic characterization of neuromelanin granules isolated from human substantia nigra by laser-microdissection. *Scientific Reports*. 6(30), 37139.
- Pohl, S., Marschner, K., Storch, S., Braulke, T. (2009) Glycosylation- and phosphorylation-dependent intracellular transport of lysosomal hydrolases. *Biological chemistry*. 390(7), 521–7.
- Pohlmann, R., Boeker, M.W.C., Von Figura, K. (1995) The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 270(45), 27311–27318.
- Prediger, R.D., Bortolanza, M., de Castro Issy, A.C., dos Santos, B.L., Del Bel, E., Raisman-Vozari, R. (2014) *Dopaminergic Neurons in Parkinson’s Disease*. R. M. Kostrzewa, ed. New York: Springer Science+Business Media.
- Raboune, S., Stuart, J.M., Leishman, E., Takacs, S.M., Rhodes, B., Basnet, A., Jameyfield, E., McHugh, D., Widlanski, T., Bradshaw, H.B. (2014) Novel endogenous N-acyl amides activate TRPV1-4 receptors, BV-2 microglia, and are regulated in brain in an acute model of inflammation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 8(August), 1–11.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., Zhang, F. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*. 8(11), 2281–308.
- Rasheed, S., Nelson-Rees, W.A., Toth, E.M., Arnstein, P., Gardner, M.B. (1974) Characterization of a Newly Derived Human Sarcoma Cell Line (HT-1080) Ermanent Cell Lines From Animal Tissues. *Cancer*. 33, 1027–1033.
- Rathinaswamy, P., Gaikwad, S.M., Suresh, C.G., Prabhune, A.A., Brannigan, J.A., Dodson, G.G., Pundle, A. V. (2012) Purification and characterization of YxeI, a penicillin acylase from *Bacillus subtilis*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 50(1), 25–30.
- Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J., Bateman, A. (2014) *MEROPS*: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*. 42(D1), D503–D509.

- Reczek, D., Schwake, M., Schröder, J., Hughes, H., Blanz, J., Jin, X., Brondyk, W., Van Patten, S., Edmunds, T., Saftig, P. (2007) LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell*. 131(4), 770–83.
- Reid, D.W., Chen, Q., Tay, A.S.-L., Shenolikar, S., Nicchitta, C.V. (2014) The Unfolded Protein Response Triggers Selective mRNA Release from the Endoplasmic Reticulum. *Cell*. 158(6), 1362–1374.
- Reinheckel, T., Deussing, J., Roth, W., Peters, C. (2001) Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: Phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L. *Biological Chemistry*. 382(5), 735–741.
- Repo, H., Kuokkanen, E., Oksanen, E., Goldman, A., Heikinheimo, P. (2014) Is the bovine lysosomal phospholipase B-like protein an amidase? *Proteins*. 82(2), 300–11.
- Rosner, M.R., Verret, R.C., Khorana, H.G. (1979) The structure of lipopolysaccharide from an *Escherichia coli* heptose-less mutant. III. Two fatty acyl amidases from *Dictyostelium discoideum* and their action on lipopolysaccharide derivatives. *The Journal of biological chemistry*. 254(13), 5926–33.
- Roth, W., Deussing, J., Botchkarev, V.A., Pauly-Evers, M., Saftig, P., Hafner, A., Schmidt, P., Schmahl, W., Scherer, J., Anton-Lamprecht, I., Von Figura, K., Paus, R., Peters, C. (2000) Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 14(13), 2075–86.
- Rowan, A.D., Mason, P., Mach, L., Mort, J.S. (1992) Rat procathepsin B: Proteolytic processing to the mature form in vitro. *Journal of Biological Chemistry*. 267(22), 15993–15999.
- Rozman, J., Stojan, J., Kuhelj, R., Turk, V., Turk, B. (1999) Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin B is a bimolecular process. *FEBS Letters*. 459(3), 358–362.
- Ruddock, L.W., Molinari, M. (2006) N-glycan processing in ER quality control. *Journal of Cell Science*. 119(21), 4373–4380.
- Ruiz-Canada, C., Kelleher, D.J., Gilmore, R. (2009) Cotranslational and Posttranslational N-Glycosylation of Polypeptides by Distinct Mammalian OST Isoforms. *Cell*. 136(2), 272–283.
- Rutkauskas, M., Sinkunas, T., Songailiene, I., Tikhomirova, M.S., Siksnys, V., Seidel, R. (2015) Directional R-loop formation by the CRISPR-cas surveillance complex cascade provides efficient off-target site rejection. *Cell Reports*. 10(9), 1534–1543.
- Saarela, J., Laine, M., Tikkanen, R., Oinonen, C., Jalanko, A., Rouvinen, J., Peltonen, L. (1998) Activation and oligomerization of aspartylglucosaminidase. *Journal of Biological Chemistry*. 273(39), 25320–25328.
- Saftig, P., Klumperman, J. (2009) Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10(9), 623–35.
- Sagné, C., Gasnier, B. (2008) Molecular physiology and pathophysiology of lysosomal membrane transporters. *Journal of inherited metabolic disease*. 31(2), 258–66.
- Saitou, M., Kagiwada, S., Kurimoto, K. (2012) Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development*. 139(1), 15–31.
- Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., Sabatini, D.M. (2010) Ragulator-rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*. 141(2), 290–303.

- Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., Banfi, S., Parenti, G., Cattaneo, E., Ballabio, A., Ronza, A. Di, Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Malta, C. Di, Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., Banfi, S., Parenti, G., Cattaneo, E., Ballabio, A. (2009) A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*. 325(5939), 473–477.
- Schaefer, K.A., Wu, W.-H.H., Colgan, D.F., Tsang, S.H., Bassuk, A.G., Mahajan, V.B. (2017) Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo. *Nature Methods*. 14(6), 547–548.
- Schalk, A.M., Lavie, A. (2014) Structural and kinetic characterization of guinea pig l-asparaginase type III. *Biochemistry*. 53(14), 2318–2328.
- Scherer, W.F., Syverton, J.T., Gey, G.O. (1953) Studies on the Propagation in Vitro of Poliomyelitis Viruses: Iv. Viral Multiplication in a Stable Strain of Human Malignant Epithelial Cells (Strain Hela) Derived From an Epidermoid Carcinoma of the Cervix. *Journal of Experimental Medicine*. 97(5), 695–710.
- Schröder, B., Wrocklage, C., Pan, C., Jäger, R., Kösters, B., Schäfer, H., Elsässer, H.-P.P., Mann, M., Hasilik, A. (2007) Integral and associated lysosomal membrane proteins. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 8(12), 1676–86.
- Schwake, M., Schröder, B., Saftig, P. (2013) Lysosomal membrane proteins and their central role in physiology. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 14(7), 739–48.
- Seibert, C.M., Raushel, F.M. (2005) Structural and catalytic diversity within the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry*. 44(17), 6383–6391.
- Sepulveda, F.E., Maschalidi, S., Colisson, R., Heslop, L., Ghirelli, C., Sakka, E., Lennon-Duménil, A.M., Amigorena, S., Cabanie, L., Manoury, B. (2009) Critical Role for Asparagine Endopeptidase in Endocytic Toll-like Receptor Signaling in Dendritic Cells. *Immunity*. 31(5), 737–748.
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., Ballabio, A. (2013) Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 14(5), 283–96.
- Shao, B., Kitchens, R.L., Munford, R.S., Rogers, T.E., Rockey, D.C., Varley, A.W. (2011) Prolonged hepatomegaly in mice that cannot inactivate bacterial endotoxin. *Hepatology*. 54(3), 1051–1062.
- Shen, B., Zhang, W., Zhang, J., Zhou, J., Wang, J., Chen, L., Wang, L., Hodgkins, A., Iyer, V., Huang, X., Skarnes, W.C. (2014) Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nature methods*. 11(4), 399–402.
- Shirahama-Noda, K., Yamamoto, A., Sugihara, K., Hashimoto, N., Asano, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2003) Biosynthetic processing of cathepsins and lysosomal degradation are abolished in asparaginyl endopeptidase-deficient mice. *The Journal of biological chemistry*. 278(35), 33194–9.
- Shtraizent, N., Eliyahu, E., Park, J., He, X., Shalgi, R., Schuchman, E.H. (2008) Autoproteolytic Cleavage and Activation of Human Acid Ceramidase. *Journal of Biological Chemistry*. 283(17), 11253–11259.
- Silva, C.A., Cocuzza, M., Carvalho, J.F., Bonfá, E. (2014) Diagnosis and classification of autoimmune orchitis. *Autoimmunity Reviews*. 13(4–5), 431–434.
- Singh, P., Schimenti, J.C., Bolcun-Filas, E. (2015) A Mouse Geneticist's Practical Guide to CRISPR Applications. *Genetics*. 199(1), 1–15.
- Sleat, D.E., Jadot, M., Lobel, P. (2007) Lysosomal proteomics and disease. *Proteomics - Clinical Applications*. 1(9), 1134–1146.

- Sleat, D.E., Lackland, H., Wang, Y., Sohar, I., Xiao, G., Li, H., Lobel, P. (2005) The human brain mannose 6-phosphate glycoproteome: A complex mixture composed of multiple isoforms of many soluble lysosomal proteins. *Proteomics*. 5(6), 1520–1532.
- Smith, C., Gore, A., Yan, W., Abalde-Atristain, L., Li, Z., He, C., Wang, Y., Brodsky, R.A., Zhang, K., Cheng, L., Ye, Z. (2014) Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell*. 15(1), 12–13.
- Sobota, R.S., Dara, A., Manning, J.E., Niangaly, A., Bailey, J.A., Kone, A.K., Thera, M.A., Djimdé, A.A., Vernet, G., Leissner, P., Williams, S.M., Plowe, C. V., Doumbo, O.K. (2016) Expression of complement and toll-like receptor pathway genes is associated with malaria severity in Mali: a pilot case control study. *Malaria Journal*. 15(1), 150.
- Van Der Spoel, A., Bonten, E., D’Azzo, A. (1998) Transport of human lysosomal neuraminidase to mature lysosomes requires protective protein/cathepsin A. *EMBO Journal*. 17(6), 1588–1597.
- Stahl, S., Reinders, Y., Asan, E., Mothes, W., Conzelmann, E., Sickmann, A., Felbor, U. (2007) Proteomic analysis of cathepsin B and L-deficient mouse brain lysosomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 1774(10), 1237–1246.
- Van Den Steen, P., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Opdenakker, G. (1998) Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 33(3), 151–208.
- Tadaro, G.J., Green, H. (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of cell biology*. 17(6), 299–313.
- Tang, L., Zeng, Y., Du, H., Gong, M., Peng, J., Zhang, B., Lei, M., Zhao, F., Wang, W., Li, X., Liu, J. (2017) CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Molecular Genetics and Genomics*. 292(3), 525–533.
- Taylor, S.L., Tappel, A.L. (1974) Identification and separation of lysosomal carboxypeptidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*. 341(1), 99–111.
- Teixeira, M., Py, B.F., Bosc, C., Laubreton, D., Moutin, M.J., Marvel, J., Flamant, F., Markossian, S. (2018) Electroporation of mice zygotes with dual guide RNA/Cas9 complexes for simple and efficient cloning-free genome editing. *Scientific Reports*. 8(1), 1–9.
- Théry, C., Amigorena, S. (2001) The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Current Opinion in Immunology*. 13(1), 45–51.
- Tholen, M., Hillebrand, L.E., Tholen, S., Sedelmeier, O., Arnold, S.J., Reinheckel, T. (2014) Out-of-frame start codons prevent translation of truncated nucleo-cytosolic cathepsin L in vivo. *Nature Communications*. 5, 1–12.
- Tholen, S., Biniossek, M.L., Gansz, M., Gomez-Auli, A., Bengsch, F., Noel, A., Kizhakkedathu, J.N., Boerries, M., Busch, H., Reinheckel, T., Schilling, O. (2013) Deletion of cysteine cathepsins B or L yields differential impacts on murine skin proteome and degradome. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. 12(3), 611–25.
- Thomas, K.R., Capecchi, M.R. (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 51(3), 503–512.
- Tsuboi, K., Sun, Y.X., Okamoto, Y., Araki, N., Tonai, T., Ueda, N. (2005) Molecular characterization of N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase, a novel member of the cholesteryl glycerol hydrolase family with structural and functional similarity to acid ceramidase. *Journal of Biological Chemistry*. 280(12), 11082–11092.
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., Turk, D. (2012) Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 1824(1), 68–88.

- Turk, V., Turk, B. (2008) Lysosomal Cysteine Proteases and Their Protein Inhibitors: Recent Developments. *Acta Chim. Slov.* 55, 727–738.
- Uffmann, G. (2014) Untersuchungen zur Prozessierung und Sortierung des murinen Plld2 in embryonalen Mausfibroblasten und lysosomalen Fraktionen. *Bachelorarbeit, Universität Bielefeld*.
- Valencia-Sanchez, M.A., Liu, J., Hannon, G.J., Parker, R. (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes and Development*. 20(5), 515–524.
- Valente, K.N., Lenhoff, A.M., Lee, K.H. (2015) Expression of difficult-to-remove host cell protein impurities during extended Chinese hamster ovary cell culture and their impact on continuous bioprocessing. *Biotechnology and Bioengineering*. 112(6), 1232–1242.
- Della Valle, M.C., Sleat, D.E., Zheng, H., Moore, D.F., Jadot, M., Lobel, P. (2011) Classification of subcellular location by comparative proteomic analysis of native and density-shifted lysosomes. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. 10(4), M110.006403.
- Vanderlaan, M., Sandoval, W., Liu, P., Nishihara, J., Tsui, G., Lin, M., Gunawan, F., Parker, S., Wong, R.M., Low, J., Wang, X., Yang, J., Veeravalli, K., Mckay, P., Yu, C., Connell, L.O., Tran, B., Vij, R., Francissen, K., Zhu-shimoni, J., Quarmby, V., Krawitz, D. (2015) Hamster Phospholipase B-Like 2 (PLBL2) - A Host-Cell Protein Impurity in Therapeutic Monoclonal Antibodies Derived from Chinese Hamster Ovary Cells. *BioProcess International*. 2(4).
- Varki, A., Kornfeld, S. (1983) The Spectrum of Anionic Oligosaccharides Released by Endo-Beta-N-acetylglucosaminidase H from Glycoproteins. *The Journal of biological chemistry*. 258(5), 2808–2818.
- Veres, A., Gosis, B.S., Ding, Q., Collins, R., Ragavendran, A., Brand, H., Erdin, S., Talkowski, M.E., Musunuru, K. (2014) Low incidence of Off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem Cell*. 15(1), 27–30.
- Vergne, I., Fratti, R.A., Hill, P.J., Chua, J., Belisle, J., Deretic, V. (2004) Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion. *Molecular biology of the cell*. 15(2), 751–60.
- Vidal, J.D., Whitney, K.M. (2014) Morphologic manifestations of testicular and epididymal toxicity. *Spermatogenesis*. 4(2), e979099.
- Vincze, T., Posfai, J., Roberts, R.J. (2003) NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*. 31(13), 3688–3691.
- Vogel, P., Payne, B.J., Read, R., Lee, W.-S.W.-S., Gelfman, C.M., Kornfeld, S. (2009) Comparative Pathology of Murine Mucopolidiosis Types II and IIIC. *Veterinary Pathology*. 46(2), 313–324.
- Vouillot, L., Thélie, A., Pollet, N. (2015) Comparison of T7E1 and Surveyor Mismatch Cleavage Assays to Detect Mutations Triggered by Engineered Nucleases. *Genes/Genomes/Genetics*. 5(3), 407–415.
- Walkley, S.U., Vanier, M.T. (2009) Secondary lipid accumulation in lysosomal disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 1793(4), 726–736.
- Walter, P., Ron, D. (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science (New York, N.Y.)*. 334(6059), 1081–6.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Cheng, A.W., Shi, L., Jaenisch, R. (2013) Resource One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR / Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell*. 154(6), 1370–1379.

- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., Jaenisch, R. (2013) One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell*. 153(4), 910–918.
- Wang, Y., Guo, H.C. (2003) Two-step dimerization for autoproteolysis to activate glycosylasparaginase. *Journal of Biological Chemistry*. 278(5), 3210–3219.
- Wei, B.Q., Mikkelsen, T.S., McKinney, M.K., Lander, E.S., Cravatt, B.F. (2006) A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *Journal of Biological Chemistry*. 281(48), 36569–36578.
- Weidanz, J. a, Campbell, P., Moore, D., DeLucas, L.J., Rodén, L., Thompson, J.N., Vezza, a C. (1996) N-acetylglucosamine kinase and N-acetylglucosamine 6-phosphate deacetylase in normal human erythrocytes and Plasmodium falciparum. *British journal of haematology*. 95(4), 645–653.
- Weischenfeldt, J., Porse, B. (2008) Bone marrow-derived macrophages (BMM): Isolation and applications. *Cold Spring Harbor Protocols*. 3(12), 1–7.
- Weisheit, C., Zhang, Y., Faron, A., Köpke, O., Weisheit, G., Steinsträsser, A., Frede, S., Meyer, R., Boehm, O., Hoefl, A., Kurts, C., Baumgarten, G. (2014) Ly6Clow and not Ly6Chigh macrophages accumulate first in the heart in a model of murine pressure-overload. *PLoS ONE*. 9(11).
- Welker, A., Diedrich, K., Krebs, D., Bernstein, G.S., Nakamura, R.M. (1988) Acrosomal proteinase activity of human spermatozoa and relation of results to semen quality. *Human Reproduction*. 3(April), 75–80.
- Weston, B.F., Kuzmine, I., Martin, C.T. (1997) Positioning of the start site in the initiation of transcription by bacteriophage T7 RNA polymerase. *Journal of molecular biology*. 272(1), 21–30.
- Wilke, S., Krausze, J., Büsow, K. (2012) Crystal structure of the conserved domain of the DC lysosomal associated membrane protein: Implications for the lysosomal glycoalyx. *BMC Biology*. 10.
- Wu, C., Orozco, C., Boyer, J., Leglise, M., Goodale, J., Batalov, S., Hodge, C.L., Haase, J., Janes, J., Huss, J.W., Su, A.I. (2009) BioGPS: An extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biology*. 10(11).
- Wu, G.-Y., Liu, S.-L., Yao, J., Sun, L., Wu, B., Yang, Y., Li, X., Sun, Q.-Q., Feng, H., Sui, J.-F. (2017) Medial Prefrontal Cortex–Pontine Nuclei Projections Modulate Suboptimal Cue-Induced Associative Motor Learning. *Cerebral Cortex*. (March 2018).
- Wu, X., Kriz, A.J., Sharp, P.A. (2014) Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quantitative Biology*. 2(2), 59–70.
- Xie, F., Ye, L., Chang, J.C., Beyer, A.I., Wang, J., Muench, M.O., Kan, Y.W. (2014) Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Research*. 24(9), 1526–1533.
- Xu, M., Motabar, O., Ferrer, M., Marugan, J.J., Zheng, W., Ottinger, E.A. (2016) Disease models for the development of therapies for lysosomal storage diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1371(1), 15–29.
- Xu, S., Zhao, L., Larsson, A., Venge, P. (2009) The identification of a phospholipase B precursor in human neutrophils. *The FEBS journal*. 276(1), 175–86.
- Yamayoshi, S., Koike, S. (2011) Identification of a Human SCARB2 Region That Is Important for Enterovirus 71 Binding and Infection. *Journal of Virology*. 85(10), 4937–4946.
- Yen, S.T., Zhang, M., Deng, J.M., Usman, S.J., Smith, C.N., Parker-Thornburg, J., Swinton, P.G.,

- Martin, J.F., Behringer, R.R. (2014) Somatic mosaicism and allele complexity induced by CRISPR/Cas9 RNA injections in mouse zygotes. *Developmental Biology*. 393(1), 3–9.
- Yin, H., Kauffman, K.J., Anderson, D.G. (2017) Delivery technologies for genome editing. *Nature Reviews Drug Discovery*. 16(6), 387–399.
- Yin, J., Deng, Z., Zhao, G., Huang, X. (2011) The N-terminal nucleophile serine of cephalosporin acylase executes the second autoproteolytic cleavage and acylpeptide hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*. 286(27), 24476–24486.
- Yoneshige, A., Muto, M., Watanabe, T., Hojo, H., Matsuda, J. (2015) The effects of chemically synthesized saposin C on glucosylceramide- β -glucosidase. *Clinical Biochemistry*. 48(16–17), 1177–1180.
- Zerbino, D.R., Achuthan, P., Akanni, W., Amode, M.R., Barrell, D., Bhai, J., Billis, K., Cummins, C., Gall, A., Girón, C.G., Gil, L., Gordon, L., Haggerty, L., Haskell, E., Hourlier, T., Izuogu, O.G., Janacek, S.H., Juettemann, T., To, J.K., Laird, M.R., Lavidas, I., Liu, Z., Loveland, J.E., Maurel, T., McLaren, W., Moore, B., Mudge, J., Murphy, D.N., Newman, V., Nuhn, M., Ogeh, D., Ong, C.K., Parker, A., Patricio, M., Riat, H.S., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Sparrow, H., Taylor, K., Thormann, A., Vullo, A., Walts, B., Zadissa, A., Frankish, A., Hunt, S.E., Kostadima, M., Langridge, N., Martin, F.J., Muffato, M., Perry, E., Ruffier, M., Staines, D.M., Trevanion, S.J., Aken, B.L., Cunningham, F., Yates, A., Flicek, P. (2018) Ensembl 2018. *Nucleic Acids Research*. 46(D1), D754–D761.
- Zhao, C., Zhang, H., Wong, W.C., Sem, X., Han, H., Ong, S.M., Tan, Y.C., Yeap, W.H., Gan, C.S., Ng, K.Q., Koh, M.B.C., Kourilsky, P., Sze, S.K., Wong, S.C. (2009) Identification of novel functional differences in monocyte subsets using proteomic and transcriptomic methods. *Journal of Proteome Research*. 8(8), 4028–4038.
- Zhao, S., Zhu, W., Xue, S., Han, D. (2014) Testicular defense systems: Immune privilege and innate immunity. *Cellular and Molecular Immunology*. 11(5), 428–437.
- Zhu, X., Xu, Y., Yu, S., Lu, L., Ding, M., Cheng, J., Song, G., Gao, X., Yao, L., Fan, D., Meng, S., Zhang, X., Hu, S., Tian, Y. (2014) An efficient genotyping method for genome-modified animals and human cells generated with CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*. 4, 6420.
- Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., Sabatini, D.M. (2011) mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science (New York, N.Y.)*. 334(6056), 678–83.

Anhang

Genomische Sequenzen und Alignments

Potentielle TFEB-Bindestellen in Exon 1 von Plbd1 und Plbd2

Im Gen des Plbd2 konnte ein Bindemotiv des Transkriptionsfaktors EB (TFEB) identifiziert werden (Palmieri *et al.*, 2011), das eine Regulation innerhalb des CLEAR-Gennetzwerks vermuten lässt. Auch im Gen des Plbd1 kann das konservierte Kernmotiv der palindromischen TFEB-Bindesequenz (GT)CACGTG(AC) nachgewiesen werden.

Plbd1-Exon 1 (Rot) ±100 nt, potentielles TFEB-Bindemotiv in Gelb, Translationsstart in Grün

```
CCTGAGCCCCACCCTCCAGGAGCGACCAGAGAAAGCAGCACAGCCCCGGCCTTCCCAAAGCGCGACAGAGAACTTTCCCGGCTGGCCAC
AGGTGGCTGGAGGGTCAGACCAGACGGAAAGGATCCGCCTCTCCTAGCCTGGGGCTCAGCAGGGCGAAGGTTGGTCCCAAGGCACGTGAGC
GCCAAGCAGGCAAGACTAATGTCAGAAAGTAAAGATCGGCCCGGCTCTGCAACGCAGCGCCCTGCTACCATCCTCAAGTGGGCTCTTG
CAACAGCTGCCACCGCCGGCCAGCGGACCTAATCCAACAGGCGGAGGTACAGCGGAGGAGCGTGGCCACCGCAGCCCTGGCAGGAGC
CTCAGGCCCATCGCCGCTGCTGCTGCTGCTGCCATTGCTGCTGCAGCCTCCCTGGGGGCTGGCGCTGCCAGCCAGAGCGACCCAACAGGTG
AGCAGAACGGCCGCCCGGACTAGGGCGTTGCCCTGTACCCCCACGCCGGCGGCTGGCCAGAGTCCCAACAGCTTTGCATCTAGGGCGCTCT
TGG
```

Plbd2-Exon 1 (Rot) ±100 nt, TFEB-Bindemotiv in Gelb, Translationsstart in Grün

```
GAGAGCGCAGTCCCTTTAAGGCAGGCCCGCCTCTCCAGGAACACAGACCACGCCATCCCGGAAGCCCAAGCACAAGCCCCGCCCCACCCCG
CCCTCGGGACGCAGTCCAGTGGCCCGGCTGCGCTCGCGTGGCGCCCGTGGATGGGAGCTCCGGCGGCTGGGCGGCCCGGGCGCTACGG
CGGGACTGGCGCTGACCTCCCTGACCACACTGGCCTTGCTGGCCTCGCTGACCGGGCTGTTGCTGAGCGGCCCGGGCGGCTCTCCCTACCC
TGGGGCCCGGCTGGCAGCGCCAAAATCCGGACCCCGGCTCTCCCGCACCCTCGCTGCTGCTGGACGCCGCTCGGGCCAGCTGCGCCTGGA
GGATGGCTTCCACCCGACGCGGTGGCCTGGGCCAACCTACCAACGCCATCCGCGAGACCGGTAAAGGTTAGCCATCCCGCCACGGCCTGG
CGGGTGACAGGGGCCCTGGACTGCCTCCCTGGGGAGTCCACAGCCAGGTCTGGCCAGGGCTGGTGGCT
```

Alignment von Plbd2-Sequenzen aus verschiedenen Spezies

Alignment von Plbd2-Proteinsequenzen aus *Homo sapiens* (Mensch, Uniprot:Q8NHP8), *Bos taurus* (Rind, Uniprot:Q2KIY5), *Rattus norvegicus* (Ratte, Uniprot:Q4QQW8), *Mus musculus* (Maus, Uniprot:Q3TCN2) und *Sus scrofa* (Schwein, Uniprot:F1RKC7). N-Glykosylierungsstellen sind in Gelb und das Cystein im aktiven Zentrum ist in Rot hervorgehoben, die potentielle Spaltstelle des N394 in der Sequenz von Maus und Ratte ist in Grün markiert.

Anhang

SP|Q8NHP8|PLBL2_HUMAN MVGQMYCYPGSHLALRALTRALALALV-----LALLVGFPLSGLAGAI PAPGGRWARDGQV 55
SP|Q2KIY5|PLBL2_BOVIN MVAPMYGSPGGRLARAVTRALALALV-----LALLVGLFSLGSLTGA IPTPRGQRGRMPV 55
TR|F1RKC7|F1RKC7_PIG MVAPMYGSPGGRLARALTRALALALV-----LALLVGLFSLGSLTSA IPTPKGYRGSRSV 55
SP|Q4QQW8|PLBL2_RAT MAAPMDRTHGGRAARALRRALALA-----SLAGLLSGLAGALPTLPGWRRQNP 51
SP|Q3TCN2|PLBL2_MOUSE MAAPVDGSSGGWAARALRRALALTSLTTLALLASLTGLLLSGPAGALPTLPGWQRQNP 60
*.. : * . *** : ***** : *. * :*** :. :.* :*

SP|Q8NHP8|PLBL2_HUMAN PPARSRVSLLDVVSAGQLLMVDGRHPDAVAVANLTNAIRETGWAFLELGTSGQYNDLSQA 115
SP|Q2KIY5|PLBL2_BOVIN PPARSRVSLLDVVSAGQLLMVDGRHPDAVAVANLTNAIRETGWAFLELHTNGRFNDLSQA 115
TR|F1RKC7|F1RKC7_PIG PPARSRVSLLDVVSAGQLLMVDGRHPDAVAVANLTNAIHENGWAFLELHTNGHYNDLSQA 115
SP|Q4QQW8|PLBL2_RAT PPARSRVSLLDVVSAGQLRLEYGDFHPDAVAVANLTNAIRETGWAYLDLGTNGSYNDLSQA 111
SP|Q3TCN2|PLBL2_MOUSE PPARSRVSLLDVVSAGQLRLEYGDFHPDAVAVANLTNAIRETGWAYLDLSTNGRYNDLSQA 120
.* ** :* : *** : * ***** :*.*** :* * . :*****

SP|Q8NHP8|PLBL2_HUMAN YAAGVVEAAVSEELIYMHWMNTVVNYCGPFYEYVGYCERLKS FLEANLEWMQEMESNP 175
SP|Q2KIY5|PLBL2_BOVIN YAAGVVEAAVSEELIYMYWMNTVVNYCGPFYEYVGYCERLKNFLEANLEWMQEMELNNG 175
TR|F1RKC7|F1RKC7_PIG YAAGVVEAAVSEELIYMHWMNTVVNYCGPFYEYVSYCERLKNFLEANLEWMQEMELNPD 175
SP|Q4QQW8|PLBL2_RAT YAAGVVEASVSEELIYMHWMNTVVNYCGPFYEYVGYCEKLS FLEANLEWMQREMLND 171
SP|Q3TCN2|PLBL2_MOUSE YAAGVVEASVSEELIYMHWMNTVVNYCGPFYEYVGYCEKLN FLEANLEWMQREMLNPD 180
***** :*.*** :***** :***** :*.*** :*.*** :***** :*.*** :*

SP|Q8NHP8|PLBL2_HUMAN SPYWHQVRLTLLQLKGLSEYGRVSPFAGKFTIKPLGFLLLQLSGDLEDLELALNKTKI 235
SP|Q2KIY5|PLBL2_BOVIN SAYWHQVRLTLLQLKGLSEYEGSVAFPTGKFTVKPLGFLLLQISGDLEDLEVALNKTKT 235
TR|F1RKC7|F1RKC7_PIG SAYWHQVRLTLLQLKGLSEYGGSVTFTGKFTIKPLGFLLLQISGDLEDLELALNKTKT 235
SP|Q4QQW8|PLBL2_RAT SPYWHQVRLTLLQLKGLSEYGRVSPFAGKFTIKPLGFLLLQISGDLEDLELALNKTKT 231
SP|Q3TCN2|PLBL2_MOUSE SPYWHQVRLTLLQLKGLSEYGRVSPFAGKFTIKPLGFLLLQISGDLEDLELALNKTKT 240
* ***** * :*.*** :* . :***** :***** ***** :

SP|Q8NHP8|PLBL2_HUMAN KPSLGSGLSALIKLLPGQSDLLVAHNTWNNYQHMLRVIKKYWLQFREGPWGDYPLVPGN 295
SP|Q2KIY5|PLBL2_BOVIN NHAMGSGSALIKLLPGQRDLLVAHNTWHSYQYMLRIMKKYWFQFREGPQAESTRAPGN 295
TR|F1RKC7|F1RKC7_PIG KHAMGSGSALIKLLPGHSDLLVAHNTWHSYQYMLRIKKYWFQFREGPHEDPI PAPGN 295
SP|Q4QQW8|PLBL2_RAT KPSVGSGLSALIKLLPGSHDLLVAHNTWNSYQNMRLRIKKYRLQFREGPQEEYPLIAGN 291
SP|Q3TCN2|PLBL2_MOUSE KPSLGSGLSALIKLLPGHSDLLVAHNTWNSYQNMRLRIKKYRLQFREGPQEEYPLVAGN 300
: :.*** :***** ***** :*.*** :*** :***** : ***** :

SP|Q8NHP8|PLBL2_HUMAN KLVFSSYPGTIFSCDDFYILGSLVLTLETTIGNKPNALWKYVPRGCVLEWVRNIVANRL 355
SP|Q2KIY5|PLBL2_BOVIN KVIFSSYPGTIFSCDDFYILGSLVLTLETTIGNKPNALWKYVQPTGCVLEWVRNIVANRL 355
TR|F1RKC7|F1RKC7_PIG RVIFSSYPGTIFSCDDFYILGSLVLTLETTIGNKPNALWKYVQPKGCVLEWVRNIVANRL 355
SP|Q4QQW8|PLBL2_RAT NLFSSYPGTIFSGDDFYILGSLVLTLETTIGNKPNALWKYVQPGCVLEWVRNIVANRL 351
SP|Q3TCN2|PLBL2_MOUSE NLFSSYPGTIFSGDDFYILGSLVLTLETTIGNKPNALWKYVQPGCVLEWVRNIVANRL 360
.: :***** ***** :* ***** :*.*** :*****

SP|Q8NHP8|PLBL2_HUMAN ASDGATWADIFKRFNSGTYNQWMIVDYKAFIPGGSPGSRVLTILEQIPGMVVVADKTS 415
SP|Q2KIY5|PLBL2_BOVIN ALDGDWADIFKRFNSGTYNQWMIVDYKAFVPGGSPGRRVLTIVLEQIPGMVVVADRTS 415
TR|F1RKC7|F1RKC7_PIG ALDGDWADIFKRFNSGTYNQWMIVDYKAFVPGGSPGRRVLTIVLEQIPGMVVVADKTS 415
SP|Q4QQW8|PLBL2_RAT ALDGDWADVFRFNSGTYNQWMIVDYKAFIPGGSPGSRVLTILEQIPGMVVVADKTA 411
SP|Q3TCN2|PLBL2_MOUSE ALDGDWADVFRFNSGTYNQWMIVDYKAFIPGGSPGSRVLTILEQIPGMVVVADKTA 420
* * * :*.*** :***** :* .***** ***** :***** :*.*** :

SP|Q8NHP8|PLBL2_HUMAN ELYQKTYWASYNIPSFETVFNASGLQALVAQYGDWFSYDGS PRAQIFRNQSLVQDMDSM 475
SP|Q2KIY5|PLBL2_BOVIN ELYQKTYWASYNIPSFESVFNASGLPALVARYGPWFSDYDGS PRAQIFRNHSLVHDLDSM 475
TR|F1RKC7|F1RKC7_PIG ELYQKTYWASYNIPSFESVFNASGLPALVAHYGDWFSYDGS PRAQIFRNQSLVHDLDSM 475
SP|Q4QQW8|PLBL2_RAT ELYKTTYWASYNIPYFESVFNASGLQALVAQYGDWFSYTRNPRAKIFQRDQSLVEDVDTM 471
SP|Q3TCN2|PLBL2_MOUSE ELYKTTYWASYNIPYFETVFNASGLQALVAQYGDWFSYTKNPRAKIFQRDQSLVEDMDAM 480
*** :.*** :***** * .*** :*** ***** :* * * * .*** :*.*** :*.*** :*.*** :

SP|Q8NHP8|PLBL2_HUMAN VRLMRYNDFLHDP LSLCKACNPQNGENAI SARSDLN PANGSYPFQALQRSHGGIDVKV 535
SP|Q2KIY5|PLBL2_BOVIN MRLMRYNDFLHDP LSLCKACTPKPGENAI SARSDLN PANGSYPFQALQRSHGGIDVKV 535
TR|F1RKC7|F1RKC7_PIG IRLMRYNDFLHDP LSLCKACKPQANGENAI SARSDLN PANGSYPFQALQRSHGGIDVKV 535
SP|Q4QQW8|PLBL2_RAT VRLMRYNDFLHDP LSLCEACSPKPAENAI SARSDLN PANGSYPFQALQRSHGGIDVKV 531
SP|Q3TCN2|PLBL2_MOUSE VRLMRYNDFLHDP LSLCEACPKPAENAI SARSDLN PANGSYPFQALQRSHGGIDVKV 540
: ***** :*.*** :* .***** :***** :*.*** :*****

SP|Q8NHP8|PLBL2_HUMAN TMSLARILSLLAASGPTWDQVPPFQWSTSPFSGLLHMGQPD LKWFAPVKVSWD 589
SP|Q2KIY5|PLBL2_BOVIN TSTALAKALRL LAVSGPTWDQLPPFQWSTSPFSGMLHMGQPD LKRFSPIEVSWD 589
TR|F1RKC7|F1RKC7_PIG TSMALARVFLAASGPTWDQLPPFQWSTSPFSGLLHMGQPD LKWFSPIEVSWD 589
SP|Q4QQW8|PLBL2_RAT TSVALAKYMSMLAASGPTWDQLPPFQWSTSPFSGMLHMGQPD LKWFSPVKKVPWD 585
SP|Q3TCN2|PLBL2_MOUSE TSFTLAKYMSMLAASGPTWDQVPPFQWSTSPFSGMLHMGQPD LKWFSPVKKVPWD 594
** :*.*** : :.*** :***** ***** :* * * * :***** :*.*** :* * *

Alignment der Proteinsequenzen von murinem Plbd1 und Plbd2

Die Sequenzen von murinem Plbd1 (Uniprot: Q8VCI0) und Plbd2 (Uniprot:Q3TCN2) wurden verglichen, das Cystein im aktiven Zentrum ist in Rot hervorgehoben.

Identities	Positives	Gaps		
189/540 (35%)	276/540 (51%)	47/540 (8%)		
Plbd1 37	DPTGVHCATAYWSPESKKVEIKTVLDKNGDAYGYNDSIKTTGWGILEIRAGYGSQVLSN	96		
Plbd2 60	DPPVSRTRSLLLDAASGQLRLEDGFHPDAVAVANLTNAIRETGWAYLDLST---NGRYND	116		
	DP + S ++ ++ + A+ ++I+ TGW L++ + ++			
Plbd1 97	EIIMFLAGYLEGYLTALHMYDHFTNL---YPQLFK-NPSIVKVKVQDFMEKQEMWTRQNIK	152		
Plbd2 117	SLQAYAAGVVEASVSEELIYMHMMNTVVNYCGPFYEYEVGYCEKLNFLLEANLEWMQREME	176		
	+ + AG +E ++ +Y H+ N Y F+ +K+++F+E W ++ ++			
Plbd1 153	AQKDDPFWRHTGYVVTQLDGLYLGAQKRAS----EEKIKPMTMFQIQFLNAVGDLLDLIP	208		
Plbd2 177	LNPDSPYWHQVRLTLLQLKGLEDSYEGRLTFPTGRFTIKPLGFLLLQI---SGDLEDLEP	233		
	D P+W + QL GL + R + IKP+ +Q GDL DL P			
Plbd1 209	SLSPTKSSMMKFKIWEMGH S ALIKVLPGFENIYFAHSSWYTYAAMLRIYKHWFDFNIKD	268		
Plbd2 234	ALNKTNTKPSLG-----SGS S ALIKLLPGGHDLVAHNTWNSYQNMLRIIKKYRLQFRE	288		
	+L+ T + + G S ALIK+LPG ++ AH++W +Y MLRI K + ++			
Plbd1 269	----KYTL--SKRLSFSSYPGFLESLLDFYILSSGLLILQTTNSVYNTLLKQVVPK-TL	321		
Plbd2 289	GPQEEYPLVAGNNLVFSSYPGTIFSGDDFYILGSLVLTLETTIGNKNPALWKYVQPQGCV	348		
	+Y L L FSSYPG + S DDFYIL SGL+ L+TT N L K V P+ +			
Plbd1 322	LAWQVRVANMMAEGGKEWAQIFSKHNSGTYNQYMLDLKKTIN-RSLDKGTLYIVEQ	380		
Plbd2 349	LEWIRNVVANRLALDGATWADVFKRFNSGTYNQWMIVDYKAFLPNGPSPGSRVLTILEQ	408		
	L W R VAN +A G WA +F + NSGTYNQ+M++D K N S L I+EQ			
Plbd1 381	IPTYVEYSQTNVLRKG-YWASYNIPFHKTIYNWSGYPLLVHKLGLDYSYDLAPRAKIFR	439		
Plbd2 409	IPGMVVVADKTAELYKTTYWASYNIPYFETVFNASGLQALVAQYGDWFSYTKNPRAKIFQ	468		
	IP V +D+T L K YWASYNIP+ +T++N SG LV + G +SY PRAKIF+			
Plbd1 440	RDQGNVTDMASMKYIMRYNNYKEDPYSKGDPC-----STICREDLNGASPS-----	486		
Plbd2 469	RDQSLVEDMDAMVRLMRYNDFLHDLPLSLCEACNPKPNAENAIARSDDLNPANGSYPFQAL	528		
	RDQ V DM +M +MRYN++ DP S + C + I R DLN A+ S			
Plbd1 487	---PGGCYDTKVADIFLASQYKAYAISGPTVQDGLPPFNWNR--FNDTLHRGMPEVDFDN	541		
Plbd2 529	HQRAHGGIDVKVTSFTLAKYMSMLAASGPT-WDQCPPFQWSKSPFHSMLHMGQPDLMWFS	587		
	G D KV LA A SGPT D PPF W++ F+ LH G P+++ F+			

pcDNA3.1/Hygro(+)-mPlbd1-RGS-His₆

cDNA des murinen Plbd1 (Schwarz) mit der RGS-His₆-Modifikation (Rot) in pcDNA3.1/Hygro(+)(Grün). Die Bindestellen der Sequenzierprimer T7-fwd und BGH-rev sind in Gelb und die codierende Sequenz des Cystein229 in Rot hervorgehoben.

TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGAGGAGCGATGTGCCACCGCAGCCCTGGCAGGAGCCTCA
GGCCGCCATCGCCGCTGCTGCTGCTGCTGCCATGCTGCTGCAGCCTCCCTGGGCGGCTGGCGCTGCCAGCCAGAGCGACCCAACAGGAGTCCA
CTGTGCAACAGCATACTGGTCCCCTGAATCGAAGAAATGGAAATCAAGACGGTACTGGACAAGAATGGGGACGCTACGGCTACTACAATGAC
TCCATTTAAAACACAGGCTGGGGCATCCTGGAGATCAGAGCTGGGTACGGCTCTCAGGTCCTGTCCAATGAGATCATCATGTTTTTGGCTGGCT
ACCTCGAGGGCTACCTACTGCTCTACACATGTACGACCACTTCACGAACTGTACCCACAGCTGTTCAAGAATCCTTCCATTGTGAAAAAAGT
GCAAGACTTCATGGAGAAGCAAGAAATGTGGACTAGGCAAAACATCAAAGCGCAGAAGGATGACCCATTCTGGAGACACACCGGCTATGTGGTG
ACCCAGCTCGACGGGCTGTATCTTGGAGCTCAGAAAAGGGCTTCAGAAGAGAAAAATAAGCCCATGACAATGTTCCAAATTCAGTTCCTGAACG
CCGTGGTGACCTGTTGGACCTTATCCCTCCCTATCTCCACAAAAAGCAGCAGCATGATGAAGTTTAAAGATTTGGGAAATGGGCCACCTC
TGCTCTTATTAAGGTCCTTCCTGGATTTGAAAAATCTATTTTTGCCACTCAAGTTGGTACACATATGCAGCCATGCTCAGGATCTATAAACAT
TGGGACTTCAACATCAAGGACAAATACACCCTCAGCAAACGGGTGCTTTTCAGAGTTATCCAGGGTTCCTGGAGTCTCTGGATGACTTTTATA
TTCTCAGCAGTGGCCTGATATTGCTGCAGACCACAAACAGTGTGTACAATAAAACCCTGCTGAAGCAGGTGGTGCCCAAGACTCTCCTGGCCTG
GCAAGAGTCCGTGTGGCCAACATGATGGCCGAGGGTGGTAAGGAGTGGGCACAGATATTTCAAAGCACAACCTGGTACCTACAACAACCAG
TACATGGTCCCTGGACCTGAAGAAGGTGACCATCAATAGGAGCCTGGACAAGGCACCTCTATATTTGGGAGCAAAATCCCTACATATGTAGAAT
ACTCCGATCAAACCAATGTCTTAAGAAAAGGATACTGGGCTTCTATAATATCCCTTTCCACAAAAAATCTACAACCTGGAGTGGCTACCCCTCT
GCTGGTTCACAAGCTGGGCTGGACTACTCTTATGACTTAGCTCCACGTGCCAAAATCTTCAGGCGTGACCAAGGAACTGACGGACATGGCC
TCCATGAAATATATCATGCGATAACAACATTAAGAGGAGCCCTACAGCAAGGGGATCCCTGCAGTACCATCTGCTGCTGCTGAGGACCTGA
ATGGAGCCAGTCCAAGCCCTGGAGGATGCTATGACACCAAGGTGGCAGACATCTTTCTTGCATCTCAGTATAAAGCCATGCCATAGTGGTCC
CACGGTACAAGATGGACTCCCGCCTTTTAACTGGAATCGGTTCAATGACACGCTCCATCGGGGGATGCCAGAAGTCTTTGACTTTAATTTTGT
ACCATGAAACCAATTTTGTGACGGAAGAGGATCGCATCACCATCACCGATAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGA
CTGTGCCTTCTA

pcDNA3.1/Hygro(+)-mPlbd2-RGS-His₆

cDNA des murinen Plbd2 (Schwarz) mit der RGS-His₆-Modifikation (Rot) in pcDNA3.1/Hygro(+)(Grün). Die Bindestellen der Sequenzierprimer T7-fwd und BGH-rev sind in Gelb und die codierende Sequenz des Cystein249 in Rot hervorgehoben.

TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAAT
CTGCAGATATCATGGCGCCCCCGTGGATGGGAGCTCCGGCGGTGGGCGGCCGGGCGCTACGGCGGGCACTGGCGCTGACCTCCCTGACCAC
ACTGGCCTTGCTGGCCTCGCTGACCGGGCTGTTGCTGAGCGGGCCGGCGGCGCTCTCCCTACCTGGGGCCCGGCTGGCAGCGCCAAAATCCG
GACCCGCGGCTCTCCCGACCCGCTCGCTGCTGCTGGACGCGCGCTCGGGCCAGCTGCGCCTGGAGGATGGCTTCCACCCCGACGCGGTGGCCT
GGGCCAACCTCACCAACGCCATCCGCGAGACCGGGTGGCCCTATCTGGACCTGAGCACAATGGCAGGTACAATGACAGCCTGCAGGCCATATGC
AGCTGGTGTGGTGGAGGCTCTGTGCTGAGGAGCTCATCTACATGCACTGGATGAACACGGTGGTCAACTACTGCGGGCCCTTCGAATACGAA
GTCGGCTACTGTGAGAAGCTTAAGAACTTCTGGAGGCCAACCTGGAGTGGATGCAGAGGGAAATGGAGCTTAACCCGGACTCTCCGTACTGGC
ACCAGGTGCGGCTGACCTCTCTGACGCTGAAAGGCTGGAGGACGCTATGAAGGCCGTTTAACTTCCCAACTGGGAGGTTACCATCAAACC
CTTGGGTTTCTCTCTGCTGCAGATCTCTGGAGACCTGGAAGACCTAGAGCCAGCCCTGAATAAGACCAACACCAAGCCTTCCCTGGGCTCCGGT
TCACTGCTGCCCTCATCAAGCTGCTGCTGGCGGCATGACCTCCTGGTGGCGCACAACACGTTGGAACCTCTACAGAACATGTTACGCATCA
TCAAGAAGTACAGGCTGCAGTTCGGGGAGGGCCGCAAGAGGAGTACCCCTGGTTGCTGGCAACAACCTGGTTTTCTCGTCTACCCGGGCAC
CATCTTCTCCGGAGATGACTTCTACATCTCTGGGAGTGGCCTGGTCAACCTGGAGACCACCATTTGGCAACAAGAACCCAGCCCTGTGGAAGTAC
GTGCAGCCCCAGGGCTGTGTCTGGAGTGGATACGAAATGTCTGGCCAACCCCTGGCCTGGACGGGGCCACCTGGGAGAGCTCTTCAAGC
GGTTCAACAGCGGCACGTACAATAACCAGTGGATGATTGTGGACTACAAGGCATTCCTCCCCAACGGACCCAGCCCTGGAGCCGGGTGCTCAC
TATCTAGAACAGATCCCGGCATGGTGGTGGTGGCTGACAAGACTGCAGAGCTCTACAAAACGACCTACTGGGCTAGCTACAACATCCCGTAC
TTTGAGACTGTATTAACGCTAGTGGGCTGACGGCCCTGGTGGCCAGTATGGAGATTGGTCTCTTACACTAAGAACCCTCGAGCCAAGATCT
TCCAGAGGGACAGTCACTGGTGGAGGACATGGACGCCATGGTCCGGCTCATGAGGTACAATGATTTCTCCATGACCCCTGTGATTTGTGTA
AGCCTGCAACCCAAAGCCTAATGCGGAGAATGCCATCTCTGCCGCTCTGACCTCAACCCCGCAATGGCTCTTACCCATTTTACGGCCCTGCAT
CAGCGCGCCATGGTGGCATTGATGTGAAGGTGACCAGCTTTACCCTGGCCAAGTACATGAGCATGCTGGCGGCCAGTGGCCCCAGTGGGACC
AGTGTCTCCGTTCCAGTGGAGCAAATGCCATTCACAGCATGCTGCATGGGCCAGCCGACCTCTGGATGTTCTCACCCATCAGGGTGC
ATGGGACGGAAGAGGATCGCATCACCATCACCGATAAGCGGCCGCTCGAGCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGAC
TGTGCCTTCTA

pcDNA3.1/Hygro(+)-mCtsB-RGS-His₆

cDNA des murinen Cathepsin B (Schwarz) mit der RGS-His₆-Modifikation (Rot) in pcDNA3.1/Hygro(+)(Grün). Die Bindestellen der Sequenzierprimer T7-fwd und BGH-rev sind in Gelb hervorgehoben.

TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTATGTGGTGGTCCCTTGATCCTTCTTTCTGCTGCTGGCAC
TGACCAGTGCCCATGACAAAGCCTTCCTTCCACCCGCTGTCGGATGACCTGATTAACATATCAACAAACAGAATACAACATGGCAGGCTGGACG
CAACTTCTACAATGTTGACATAAGCTATCTGAAGAAGCTGTGTGGCACTGTCCCTGGGTGGACCAAACTGCCAGGAAGGGTTGCGTTCCGGTGAG
GACATAGATCTACCTGAAACCTTTGATGCACGGGAACAATGGTCCAATGCCCGACCATTTGGACAGATTAGAGACCAGGGCTCCTGCGGCTCTT
GTTGGGCATTTGGGCGAGTGGAAAGCATTCTGACCGAACCTGCATTCACCCAATGGCCGAGTCAACGTGGAGGTGTCTGTGAAGACCTGCT
TACTTGTGTGGTATCCAGTGTGGGACGGCTGTAATGGTGGCTATCCCTCTGGAGCATGGAGCTTCTGGACAAAAAAGGCCTGGTTTTCAGGT
GGAGTCTACAATTTCTCATGTAGGCTGCTTACCATAACCATCCCTCCCTGCGAGCACCATGTCAATGGCTCCCGTCCCCATGCACTGGAGAAG
GAGATACTCCCAGGTGCAACAAGAGCTGTGAAGCTGGCTACTCCCATCTACAAAGAGGATAAGCACTTTGGGTACACTTCTTACAGCGTGTG
TAACAGTGTGAAGGAGATCATGGCAGAAATCTACAAAAATGGCCAGTGGAGGTGCCTTCACTGTGTTTTCTGACTTCTTGACTTACAATCA
GGAGTATACAAGCATGAAGCCGGTGATATGATGGGTGGCCACGCCATCCGCATCTGGGCTGGGGAGTAGAGAAATGGAGTTCCCTACTGGCTGG
CAGCCAACTCTTGAACCTTGACTGGGGTGATAATGGCTTCTTAAAAATCCTCAGAGGAGAGAACCCTGTGGCATTGAATCAGAAAATTTGGC
TGGAAATCCACGCACTGACCAGTACTGGGAAGATTCCGGAAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATAGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTT
TAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTA

pcDNA3.1/Hygro(+)-mCtsL-RGS-His₆

cDNA des murinen Cathepsin L (Schwarz) mit der RGS-His₆-Modifikation (Rot) in pcDNA3.1/Hygro(+)(Grün). Die Bindestellen der Sequenzierprimer T7-fwd und BGH-rev sind in Gelb hervorgehoben.

TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTATGAATCTTTTACTCCTTTTGGCTGTCTCTGCTTGGGAA
CAGCCTTAGCTACTCCAAAATTTGATCAAACTTTAGTGCAGAGTGGCACCAGTGGAAAGTCCACACACAGAAGACTGTATGGCAGCAATGAGGA
AGAGTGGAGGAGAGCGATATGGGAGAAGAACAATGAGAATGATCCAGCTACACAACGGGAATACAGCAACGGGCAGCAGCGCTTTTCCATGGAG
ATGAACGCCTTCGGTGACATGACCAATGAGGAATTCAGGCAGGTGGTGAATGGCTACCGCCACCAGAAGCACAAGAAGGGGAGGCTTTTTTCAGG
AACCCTGATGCTTAAGATCCCAAGTCTGTGGACTGGAGAGAAAAGGGTGTGTGACTCCTGTGAAGAACCAGGGCCAGTGCGGGTCTTGTGTG
GGCGTTTAGCGCATCCGGTTGCCTAGAAGGACAGATGTTCCCTTAAGACCAGCAAACTGATCTCACTGAGTGAACAGAACCCTTGTGGACTGTTCT
CACGCTCAAGGAATCAGGGCTGTAACGGAGGCTGATGGATTTTGTCTTCCAGTACATTAAGGAAAATGGAGGCTGGACTCGGAGGAGTCTT
ACCCCTATGAAGCGAAGGACGGATCTTGTAAATACAGAGCCGAGTTCGCTGTGGCTAATGACACAGGGTTCGTGGATATCCCTCAGCAAGAGAA
AGCCCTCATGAAGGCTGTGGCGACTGTGGGGCTATTTCTGTTGCTATGGACGAAGCCATCCGTCTCTCCAGTCTATAGTTACAGGCATCTAC
TATGAACCAACTGTAGCAGCAAGAACCCTCGACCATGGGGTCTGTTGGTGGGCTATGGCTATGAAGGAACAGATTCAAATAAGAATAAATATT
GGCTTGTCAAGAACAGCTGGGGAAGTGAATGGGGTATGGAAGGCTACATCAAAATAGCCAAAGACCGGGAACAACCCTGTGGACTTGGCACC
GGCCAGCTATCCTGTCGTTGAATGGAAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATAGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCA
GCTCGACTGTGCCTTCTA

pcDNA3.1/Hygro(+)-mAEP-RGS-His₆

cDNA der murinen AEP (Schwarz) mit der RGS-His₆-Modifikation (Rot) in pcDNA3.1/Hygro(+)(Grün). Die Bindestellen der Sequenzierprimer T7-fwd und BGH-rev sind in Gelb hervorgehoben.

TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCCACCATGACCTGGAGAGTGGCTGTGCTTCTCAGCCTGGTGTGGTGTGGTGGCCG
TTCCCGTCCGGTGTGGACGATCCCGAGGATGGAGGCAAGCACTGGTGGTGTGATTGTGGCGGGCTCCAATGGCTGGTATAAATACCAGACACCAGGC
AGACGCATGCCACGCCTACCAGATCATCCACCGAACGGGATTCTGACGAGCAGATCATAGTGTATGATGATGACGACATTGCCAACTGTGAA
GAAAACCTACCCAGGTGTTGTGATCAACCGACCTAACGGCACAGATGTATAAAGGGAGTCTGAAGGACTACACCGGAGAGGATGTGACTC
CAGAAATTTCTCGCGTGTGAGAGGTGACGCAAGAGCTGTGAAGGGCAAAGGTCTGGAAAAGTCTTGAAGAGTGGCCCCGAGATCATGT
CTTCATTTACTTACCGACCACGGAGCCACCGGATCCTGGTGTTCCTAATGATGATCTTCATGTCAAGGACCTGAATAAGACTATTTCGTAC
ATGTATGAACAAAAATGTACCAGAAGATGGTGTCTACATTGAAGCTGTGAGTCTGGCTCCATGATGAACCACCTGCCGACGACATCAACG
TTTATGCAACTACTGCGGCCAACCCCAAGGAGTCACTTATGCCTGCTACTACGACGAGGAGAGGGGCACTTACCTGGGTGACTGGTACAGCGT
CAACTGGATGGAAGACTCCGATGTGGAGACCTGACCAAGAGACCCTTACAAGCAGTACCACCTGGTCAAGTCCCACACCAACACCAGCCAT
GTCATGCAATATGGGAACAAATCTATCTTACCATGAAAGTGTGAGTTCAGGGAATGAAGCACAGAGCCAGTTCCTCCATCTCCCTGCCCTC
CGGTACACACCTTGACCTCACCCAGCCCTGACGTGCCCTGACCATCTTGAAGAGGAAGCTGCTGAGAACCAACGACGTGAAGGAATCCCA
GAATCTCATTGGGAGATCCAGCAATTTCTGGATGCCAGGACCGTCAATTGAGAAGTCTGTGCACAAGATCGTTTTCCCTGTGGCGGGATTTGGG
GAAACTGCTGAGAGACATCTGTACAGAGAGGACCATGTCCACAGCAGATGACTACCAGGAGGCTGTAAACCATCTCCGCACACACTGCTTTA
ACTGGCACTCTGTCACGTACGACATGCTTGGGTAATGTTGCTGTCGCAATCTGTGAGGACCCATATCCGATTGACAGGATAGAGAT
GGCCATGGACAAAGTGTGCTTAGTCACTACGGAAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATAGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAAC
CGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTA

Sequenzierungen

Sequenzierungen von N2a-Einzelklonen

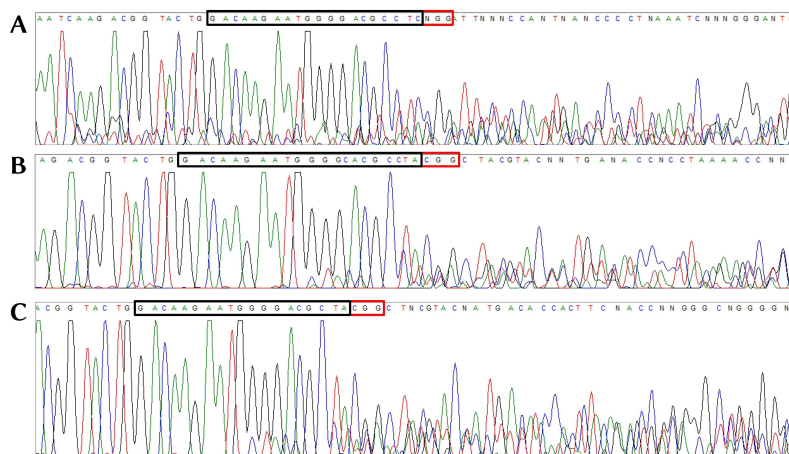


Abbildung 79: Sequenzierung des Plbd1-Exon 2 von N2a-Einzelklonen nach Transfektion mit PX459-Plbd1-GuideB.

Gezeigt sind die Sequenzierungen der N2a-Einzelklone Nr.1 (A), Nr.4 (B) und Nr.6 (C) nach Transfektion des Plasmids PX459-Plbd2-GuideB im Bereich der Bindestelle des Plbd1-Guide B im Exon 2. Die Bindesequenz des Guides ist in Schwarz, das PAM-Motiv in Rot hervorgehoben

Sequenzierungen von *offtarget*-Bindestellen (OTS)

Tabelle 27: Plbd1-Guide B und Sequenzen zweier *offtarget*-Bindestellen.

	Sequenz	Score	#MM	UCSC Gene	locus
Guide B	GACAAGAATGGGGACGCCTA CGG	100	-	NM_025806	chr6:+136.652.035
OTS 1	GGCTAGAATGGGGACGCCTGGGG	1,5	3	-	chr9:-29.009.884
OTS 2	GCCTAGAGAGGGGACGCCTAGGG	0,8	4	-	chr11:+17.529.483

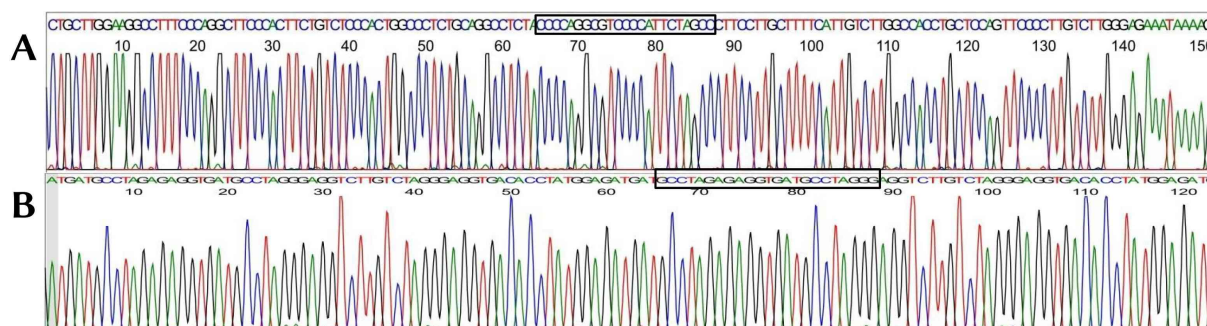


Abbildung 80: Sequenzierung der *offtarget*-Bindestellen im Genom des Plbd1 F0-Tier Nr.81.

Gezeigt sind die Pherogramme der Sequenzierung der *offtarget*-Bindestellen von Plbd1-GuideB an OTS1 (A) und OTS2 (B).

Tabelle 28: Sequenzen der Plbd2-Guides und jeweils zweier *offtarget*-Bindestellen.

	Sequenz	Score	#MM	UCSC Gene	locus
Guide C	GGATGGCTTCCACCCCGACG CGG	100	-	NM_023625	chr5:+120.503.637
OTS C1	TGTTGGGGTCCACCCCGACGCAG	0,9	4	NM_025350	chr6:-30.592.337
OTS C2	GGCTGGCTTCCATCCCGACACAG	0,6	3	-	chr17:+31.600.007
Guide D	GGATGGCTTCCACCCCGACG CGG	100	-	NM_023625	chr5:-120.492.783
OTS D1	ACCAGCCAGCAGCTTGATGGAG	1,7	3		chr8:-71.146.920
OTS D2	GACTGGGCAGCAGCTTGATGGGG	1,3	4		chr5:+122.750.012
Guide E	GGATGGCTTCCACCCCGACG CGG	100	-	NM_023625	chr5:-120.492.767
OTS E1	AACTCACCAAGCTGCTGCCAGG	2,6	3		chr12:-113.647.673
OTS E2	CTGCTCATCAAGCTGCTGCCCGG	2,3	3		chr17:-12.349.355

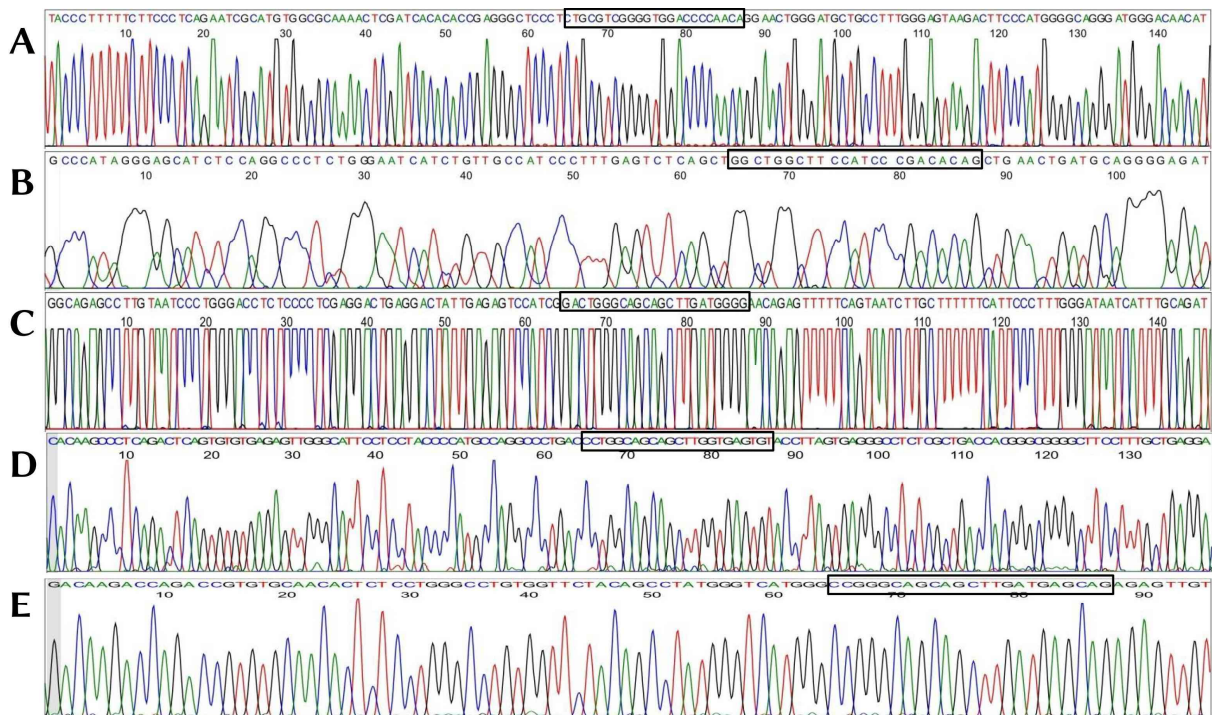


Abbildung 81: Sequenzierung der *offtarget*-Bindestellen im Genom des F0-Tier Nr.5.

Gezeigt sind die Pherogramme der Sequenzierung der *offtarget*-Bindestellen von Plbd2-GuideC (A/B), GuideD (C) und GuideE (D/E) im Genom des Plbd2 F0-Tier Nr. 5, aus dem die Plbd2-HH-Zuchtlinie hervorging.

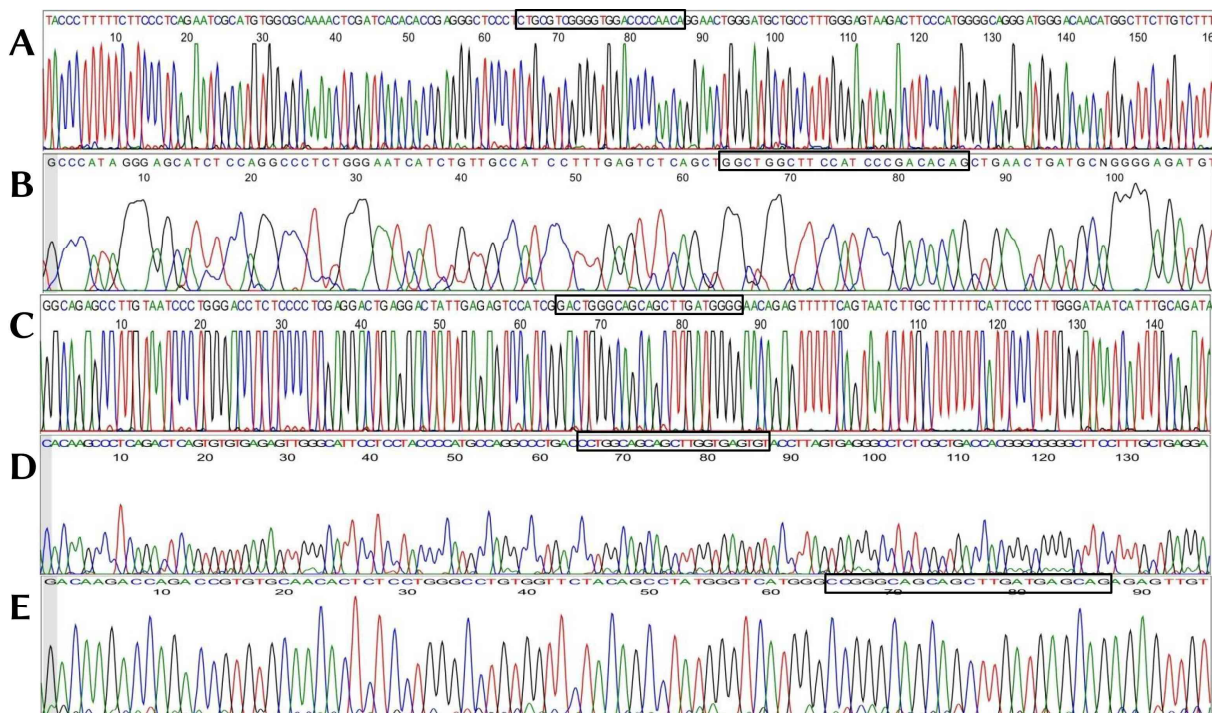


Abbildung 82: Sequenzierung der *offtarget*-Bindestellen im Genom des F0-Tier Nr.7.

Gezeigt sind die Pherogramme der Sequenzierung der *offtarget*-Bindestellen von Plbd2-GuideC (A/B), GuideD (C) und GuideE (D/E) im Genom des Plbd2 F0-Tier Nr. 7, aus dem die Plbd2-mut-Zuchtlinie hervorging.

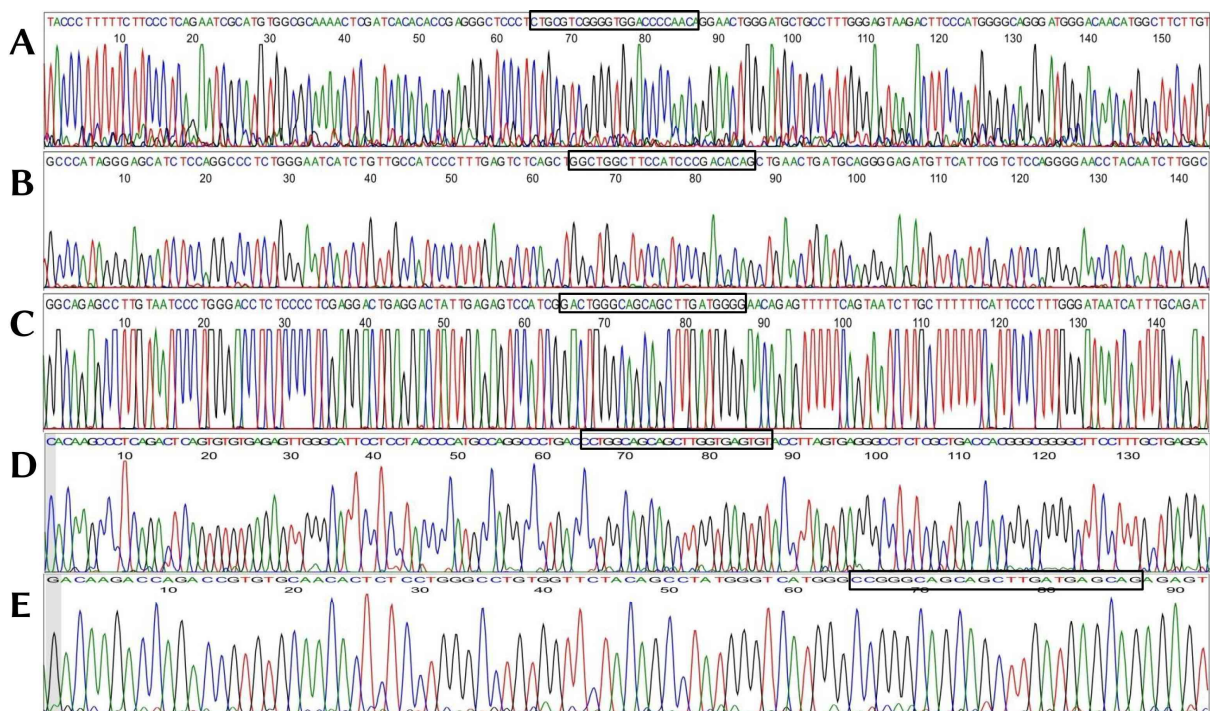


Abbildung 83: Sequenzierung der *offtarget*-Bindestellen im Genom des F0-Tier Nr.22.

Gezeigt sind die Pherogramme der Sequenzierung der *offtarget*-Bindestellen von Plbd2-GuideC (A/B), GuideD (C) und GuideE (D/E) im Genom des Plbd2 F0-Tier Nr. 22, aus dem die Plbd2-KO-Zuchtlinie hervorging.

Weitere Ergebnisse

Genotypisierung der Plbd2-KO-Tiere der F1-Generation

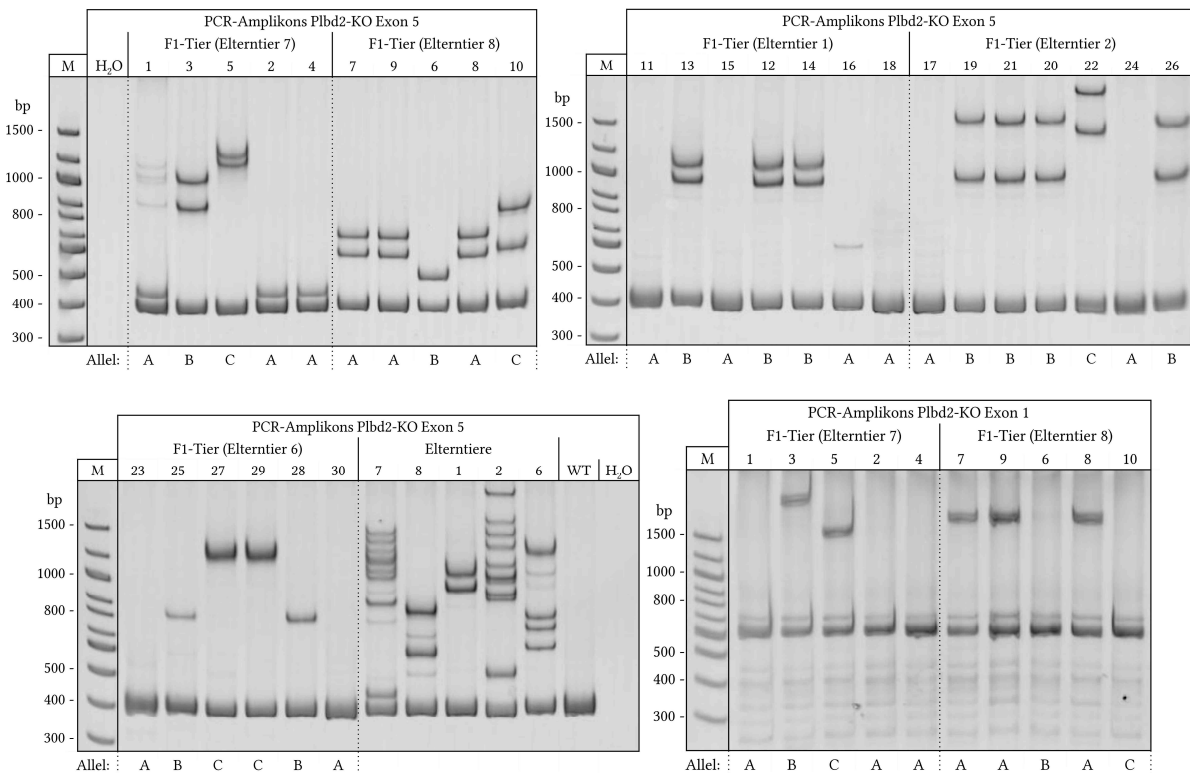


Abbildung 84: PAA-Gel der Genotypisierung von Plbd2-*knockout*-Tieren der F1-Generation.

Aus den F1-Nachkommen der Plbd2-Elterntiere sowie den Elterntieren selbst wurde der genomische Bereich des Plbd2-Exon 5 durch PCR amplifiziert. Für die Nachkommen der Tiere 7 und 8 wurde zudem ein Bereich des Exon 1 amplifiziert. 200 ng der PCR-Amplifikate wurden nach *reannealing* über ein Polyacrylamid (PAA)-Gel getrennt. Der Nachweis der DNA erfolgte nach Inkubation in Ethidiumbromid unter UV-Licht. Die gestrichelten Linien dienen der Übersichtlichkeit.

Tabelle 29: Sequenzierung der Mutationen im Plbd2-Gen der F1-Nachkommen von Plbd2-*knockout*-Tieren.

Der genomische Bereich des Plbd2-Exon 1 oder Exon 5 von F1-Nachkommen der Plbd2-*knockout*-Mäuse wurde über PCR amplifiziert und die PCR-Produkte sequenziert (Sequencing Core Facility, CeBiTec, Universität Bielefeld). In Rot dargestellt sind die PAM-Motive der verwendeten CRISPR-Guide-RNAs.

Elterntier 7 - Exon 1		
Allel A	WT	
Allel B	-6 nt	GAGGATGGCTTCCACCCCGACG CGG TGGCCTGGGCCAACCT------
Allel C	-12 nt	GAGGATGGCTTCCACCCCGACG CGG TGGCCTGGGCCAACCT------
Elterntier 7 - Exon 5		
Allel A	+1 nt	CCCTGGGCTC CGG -TTCAT TGCT TCTGCC CCT CATCAAGCTGCTGCCTGGCGT.....
Allel B	-4 nt	CCCTGGGCTC CGG TTCAT TGCT TCTGCC CCT CATCAAGCTGCTGCCTGGCG-TCCC.....
Allel C	-17 nt	CCCTGGGCTC CGG TTCAT TGCT TCTGCC CCT CATCAAGCTGCTGCCTGGCG------
Elterntier 8 - Exon 1		
Allel A	-18 nt	GAGGATGGCTTCCACCCCGACG CGG TGGCCTGGGCCAACCT------
Allel B	WT	
Allel C	WT	
Elterntier 8 - Exon 5		
Allel A	-3 nt	CCCTGGGCTC CGG TTCAT TGCT TCTGCC CCT CATCAAGCTGCTGCCTGGCG--T.....
Allel B	-117 nt	große Deletion und Inversion, Cys249 aber intakt
Allel C	-3 nt	CCCTGGGCTC CGG TTCAT TGCT TCTGCC CCT CATCAAGCTGCTGCCTGGCG-.....
Elterntier 1 - Exon 5		
Allel A	WT	
Allel B	-8 nt	CCCTGGGCTC CGG TTCAT TGCT TCTGCC CCT CATCAAGCTGCTGCCTGGCG-G-----
Elterntier 2 - Exon 5		
Allel A	WT	
Allel B	-14 nt	CCCTGGGCTC CGG TTCAT TGCT TCTGCC CCT CATCAAGCTGCTGCCTGGCG ...-----
Allel C	-26 nt	CCCTGGGCTC CGG TTCAT TGCT TCTGCC CCT CATCAAGCTGCTGCCTGGCG------
Elterntier 6 - Exon 5		
Allel A	WT	
Allel B	WT	
Allel C	-8 nt	CCCTGGGCTC CGG TTCAT TGCT TCTGCC CCT CATCAAGCTGCTGCCTGGCG------

Validierung der *knockout*-Mausmodelle auf Transkript-Ebene

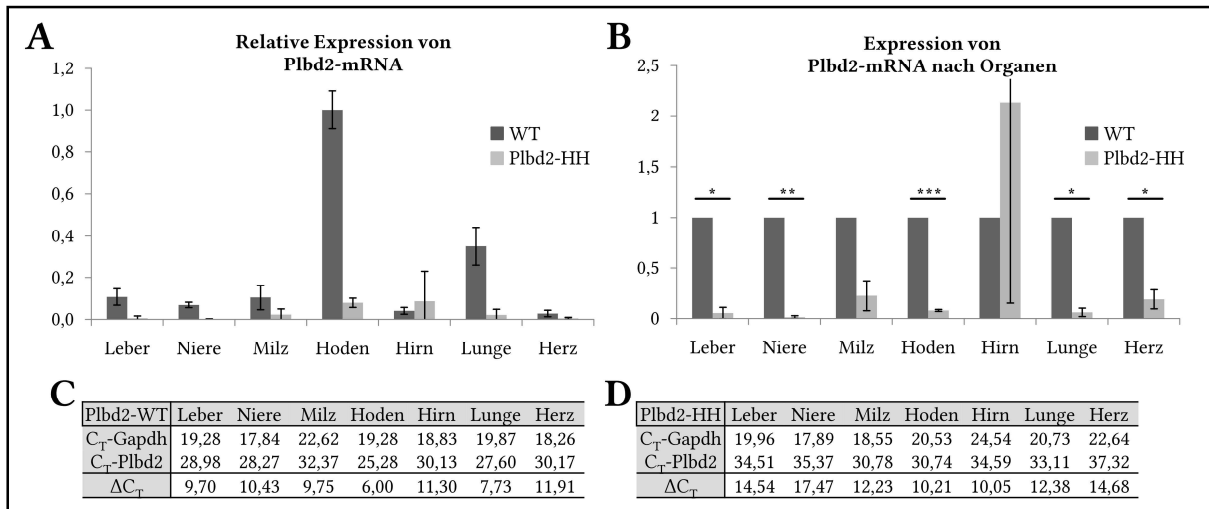


Abbildung 85: qPCR-Analyse der Plbd2-cDNA in WT- und Plbd2-HH-Mäusen.

Die RNA aus 50 mg Gewebe eines Plbd2-HH-Tieres (männlich, 20 Wochen) und eines WT-Tieres (männlich, 19 Wochen) wurde extrahiert und die mRNA in cDNA revers transkribiert. Die cDNA wurde auf 5 ng/μL verdünnt und 2 μL zur qPCR eingesetzt. Als Referenzwert wurde die Menge an Gapdh-cDNA bestimmt und die Plbd2-cDNA auf diese normiert (ΔC_T-Werte). In Feld A dargestellt ist die cDNA-Menge des Plbd2-Transkripts relativ zum Organ der höchsten Expression (Hoden-WT). Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichungen. In Feld B ist die Menge der Plbd1-cDNA in den KO-Geweben relativ zu den jeweiligen Werten im WT-Gewebe dargestellt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM) dar, anhand dessen die Signifikanz berechnet wurde. n = 3, p<0,05 (*), p<0,01 (**), p<0,001 (***). Die C_T und ΔC_T-Werte sind in Feld C und D aufgeführt.

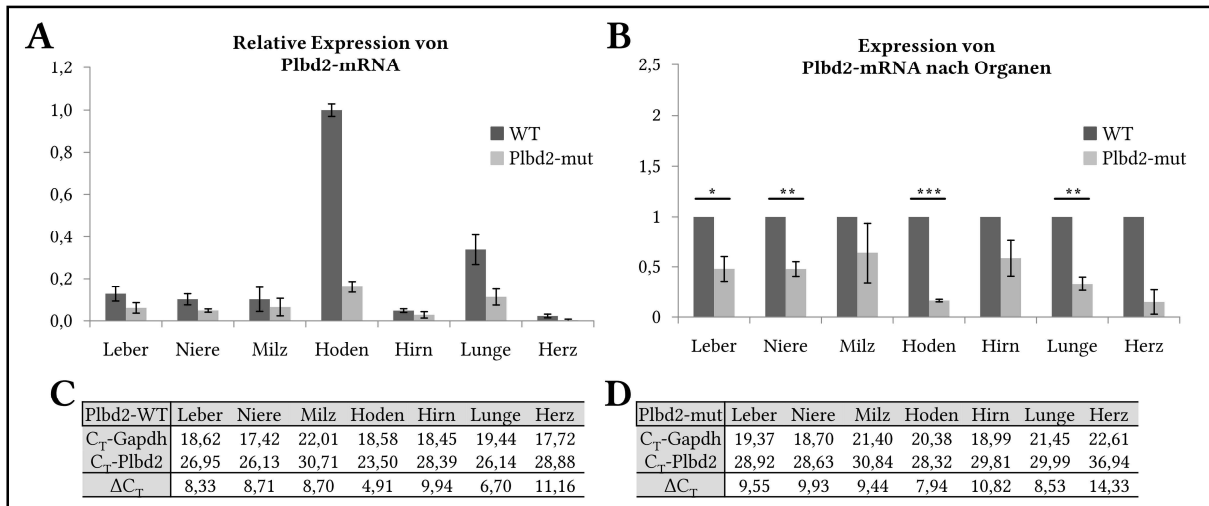


Abbildung 86: qPCR-Analyse der Plbd2-cDNA in WT- und Plbd2-mut-Mäusen.

Die RNA aus 50 mg Gewebe eines Plbd2-mut-Tieres (männlich, 17 Wochen) und eines WT-Tieres (männlich, 19 Wochen) wurde extrahiert und die mRNA in cDNA revers transkribiert. Die cDNA wurde auf 5 ng/μL verdünnt und 2 μL zur qPCR eingesetzt. Als Referenzwert wurde die Menge an Gapdh-cDNA bestimmt und die Plbd2-cDNA auf diese normiert (ΔC_T-Werte). In Feld A dargestellt ist die cDNA-Menge des Plbd2-Transkripts relativ zum Organ der höchsten Expression (Hoden-WT). Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichungen. In Feld B ist die Menge der Plbd1-cDNA in den KO-Geweben relativ zu den jeweiligen Werten im WT-Gewebe dargestellt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM) dar, anhand dessen die Signifikanz berechnet wurde. n = 3, p<0,05 (*), p<0,01 (**), p<0,001 (***). Die C_T und ΔC_T-Werte sind in Feld C und D aufgeführt.

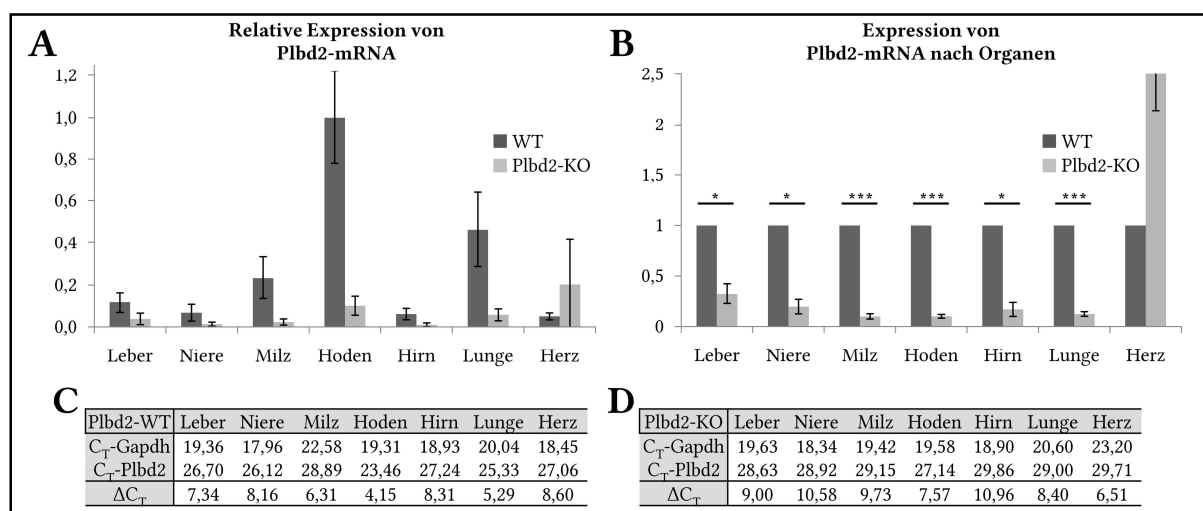


Abbildung 87: qPCR-Analyse der Plbd2-cDNA in WT- und Plbd2-KO-Mäusen.

Die RNA aus 50 mg Gewebe eines Plbd2-KO-Tieres (männlich, 19 Wochen) und eines WT-Tieres (männlich, 19 Wochen) wurde extrahiert und die mRNA in cDNA revers transkribiert. Die cDNA wurde auf 5 ng/μL verdünnt und 2 μL zur qPCR eingesetzt. Als Referenzwert wurde die Menge an Gapdh-cDNA bestimmt und die Plbd2-cDNA auf diese normiert (ΔC_T-Werte). In Feld A dargestellt ist die cDNA-Menge des Plbd2-Transkripts relativ zum Organ der höchsten Expression (Hoden-WT). Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichungen. In Feld B ist die Menge der Plbd2-cDNA in den KO-Geweben relativ zu den jeweiligen Werten im WT-Gewebe dargestellt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM) dar, anhand dessen die Signifikanz berechnet wurde. n = 3, p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***). Die C_T- und ΔC_T-Werte sind in Feld C und D aufgeführt.

Western-Blots von Gewebehomogenaten aus Plbd2-HH- und Plbd2-mut-Tieren

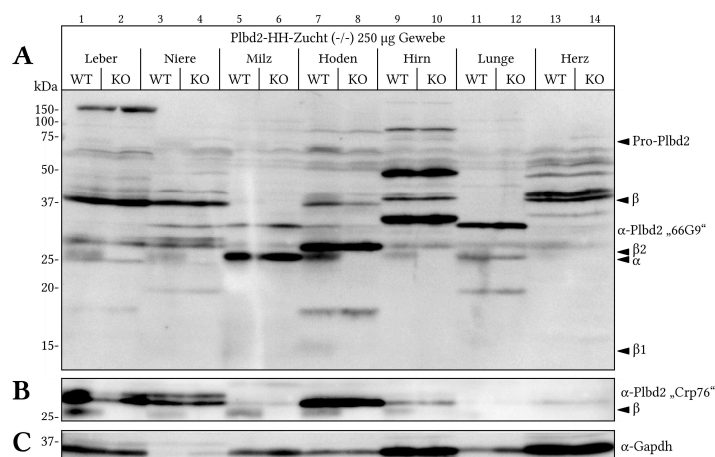


Abbildung 88: Western-Blot von Gewebehomogenaten aus WT- und Plbd2-HH-Mäusen.

Verschiedene Gewebe wurden aus WT- und Plbd2-HH-Mäusen entfernt, homogenisiert und lysiert. 250 μg des Überstandes wurden zu SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran eingesetzt. Der Nachweis des Plbd2 erfolgte mit dem Plbd2-66G9- (A) oder Plbd2-Crp76-Antikörper (B), Gapdh (Gapdh-FL335-Antikörper) dient als Ladekontrolle (C).

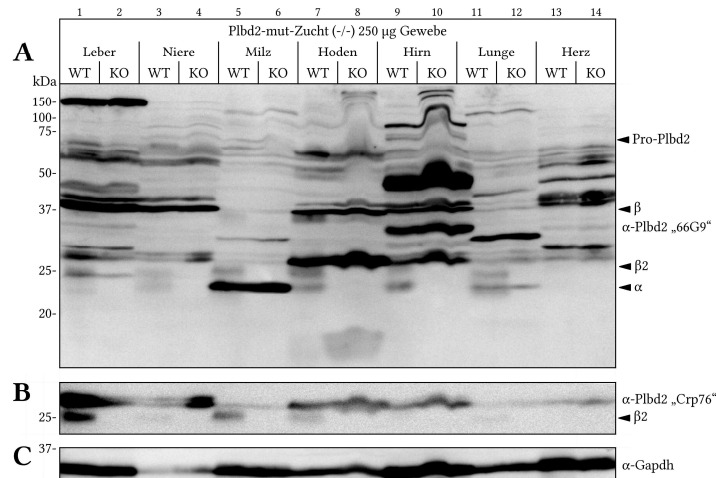


Abbildung 89: Western-Blot von Gewebehomogenaten aus WT- und Plbd2-mut-Mäusen.

Verschiedene Gewebe wurden aus WT- und Plbd2-KO-Mäusen entfernt, homogenisiert und lysiert. 250 µg des Überstandes wurden zu SDS-PAGE und Western-Blot auf PVDF-Membran eingesetzt. Der Nachweis des Plbd2 erfolgte mit dem Plbd2-66G9- (A) oder Plbd2-Crp76-Antikörper (B), Gapdh (Gapdh-FL335-Antikörper) dient als Ladekontrolle (C).

Blutanalyse von WT- und Plbd1-KO-Mäusen

Tabelle 30: Blutanalyse von WT- und Plbd1-KO-Mäusen.

WT- und Plbd1-KO-Tieren wurde postmortal Blut entnommen, die Probe mit EDTA gerinnungsunfähig gemacht und ein großes Blutbild angefertigt (n = 5). Aufgrund einer uneinheitlichen Verdünnung durch die Zugabe der EDTA-Lösung sind Volumen-abhängige Größen nur eingeschränkt aussagekräftig.

	WT-Männchen	Plbd1-KO-Männchen	WT-Weibchen	Plbd1-KO-Weibchen
Erythrozyten	8,6 /pL ±0,5 /pL	8,7 /pL ±1,0 /pL	8,3 /pL ±0,5 /pL	9,1 /pL ±1,1 /pL
Hämoglobin	13,0 g/dL ±0,8 g/dL	13,3 g/dL ±1,5 g/dL	12,4 g/dL ±1,0 g/dL	14,0 g/dL ±1,8 g/dL
Hämatokrit	44,6 % ±2,8	45,3 % ±7,31	41,1 % ±3,4	48,4 % ±7,8
MCV	52,1 fL ±1,0 fL	51,5 fL ±2,6 fL	49,7 fL ±1,4 fL	53,1 fL ±3,3 fL
MCH	15,2 pg ±0,5 pg	15,2 pg ±0,1 pg	15,1 pg ±0,5 pg	15,4 pg ±0,4 pg
MCHC	29,2 g/dL ±1,3 g/dL	29,6 g/dL ±1,5 g/dL	30,3 g/dL ±0,2 g/dL	29,1 g/dL ±1,6 g/dL
Thrombozyten	225,2 /nL ±232,2 /nL	367 /nL ±274 /nL	160,3 /nL ±260,1 /nL	620 /nL ±450,0 /nL
Leukozyten	3461 /µL ±1586 /µL	3481 /µL ±642 /µL	2538 /µL ±564 /µL	3618 /µL ±1034 /µL
Neutrophile	6,4% ±1,8%	8,4% ±2,4%	5,4% ±1,3%	7,0% ±2,6%
Lymphozyten	88,9% ±2,3%	82,1 %±4,2%	87,6% ±3,9%	85,6% ±2,6%
Eosinophile	1,6% ±0,4%	6,6 %±3,8%	1,8% ±0,8%	2,9% ±1,4%
Basophile	0,6% ±0,6%	0,9 %±1,0%	1,8% ±1,7%	1,4% ±1,5%
Monocyten	1,0% ±0,4%	1,3 %±0,3%	1,4% ±0,3%	1,9% ±0,9%
LUC	1,4% ±0,8%	0,7 %±0,2%	2,0% ±1,8%	1,0% ±0,2%

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des endo-lysosomalen Systems in der eukaryotischen Zelle.....	5
Abbildung 2: Aufbau von N-Glykanen.....	9
Abbildung 3: Konservierte Elemente innerhalb der fünf Ntn-Hydrolase Familien.....	13
Abbildung 4: Veraltetes Prozessierungsschema des Plbd2.....	14
Abbildung 5: Genmanipulation mittels CRISPR-Cas9.....	17
Abbildung 6: Zentrifugationsschema zur Isolierung von Tritosomen (F2) nach differentieller Zentrifugation.....	54
Abbildung 7: Schema der seriellen Verdünnung zur Isolierung von Einzelklonen aus eukaryotischer Zellkultur.....	60
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Genotypisierung von Plbd1- <i>knockout</i> -Tieren durch BsaHI-Verdau (A) und der Plbd2- <i>knockout</i> -Tieren durch <i>reannealing</i> und Trennung im PAA-Gel (B).....	63
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Prozessierung des Pro-Plbd2 in ein α - und ein β -Fragment.....	71
Abbildung 10: Western-Blot von WT- und Plbd2- <i>genetrap</i> -MEFs und Tritosomen.....	73
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Prozessierung des Pro-Plbd2 in die α -, β 1- und β 2-Fragmente.....	74
Abbildung 12: Western-Blot des Spaltungsmuster von Plbd2 in Fibroblasten und N2a-Zellen.....	75
Abbildung 13: Western-Blot der Expression von Plbd2-His ₆ und Plbd2-C249S-His ₆ in Hela-Zellen.....	76
Abbildung 14: Schematische Darstellung der erwarteten Prozessierung von Plbd2 und der Mutante der Plbd2-C249S.....	77
Abbildung 15: Western-Blot von N2a-Zellen transfiziert mit WT-Plbd2 und den Mutanten C249S und C294A.....	78
Abbildung 16: Western-Blot von Hela-Zellysaten nach Deglykosylierung mit PNGase F.....	80
Abbildung 17: Schematische Darstellung der erwarteten Prozessierung von Plbd2 mit Glykanen.....	80
Abbildung 18: Western-Blot der autokatalytischen Pro-zessierung von rekombinantem Plbd2 <i>in vitro</i>	82
Abbildung 19: Western-Blot der autokatalytischen Pro-zessierung von rekombinantem Plbd2 und Plbd2-C249A nach Inkubation mit Tritosomen.....	83
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Prozessierung des Pro-Plbd2.....	84
Abbildung 21: Western-Blots des Prozessierungsmuster von Plbd2 in MEFs und Tritosomen aus Mäusen defizient für verschiedene lysosomale Proteasen.....	86
Abbildung 22: Western-Blot der Plbd2-Prozessierung unter Protease-Inhibitoren.....	87
Abbildung 23: Schematische Darstellung der Prozessierung des Pro-Plbd2.....	88
Abbildung 24: Schematische Darstellung der möglichen Spaltstelle im Plbd2 β -Fragment.....	89
Abbildung 25: Western-Blot der Expression der Plbd2-Asparagin-Mutanten in Hela-Zellen.....	90
Abbildung 26: Tertiärstruktur des Plbd2.....	91
Abbildung 27: Immunfluoreszenzen von Hela-Zellen transfiziert mit Plbd2 und Asparagin-Mutanten.....	92
Abbildung 28: Western-Blot und Quantifizierung der Expression von Plbd2 und Plbd2-N394Q über 96 h.....	93
Abbildung 29: Western-Blot der Expression von AEP, CtsB, CtsL, Plbd2 und Plbd2-C249A in N2a-Zellen.....	95
Abbildung 30: Coomassie-Gel und Western-Blot der Aufreinigung von Plbd2 und Plbd2-C249A.....	96
Abbildung 31: Aktivierung der rekombinanten AEP, Cathepsin B und Cathepsin L.....	97
Abbildung 32: Western-Blot des <i>in vitro</i> Umsatz von Plbd2 und Plbd2-C249A mit CtsB, CtsL und Tritosomen.....	99
Abbildung 33: Aktivität von CtsB, CtsL und Tritosomen.....	101
Abbildung 34: Western-Blot des <i>in vitro</i> Umsatz von Plbd2 und Plbd2-C249A mit CtsB, CtsL und AEP.....	103
Abbildung 35: Schematische Darstellung der Prozessierung des Pro-Plbd2 <i>in vivo</i> und durch die AEP <i>in vitro</i>	104
Abbildung 36: Western-Blot der Prozessierung von Plbd2 in WT-, MPR- und MLII-MEFs.....	106
Abbildung 37: Western-Blot von Lysaten, angereicherten Lysosomen und Überständen verschiedener MEF-Zelllinien.....	107
Abbildung 38: Immunfluoreszenzen der Lokalisierung von Plbd2 in verschiedenen MEF-Zelllinien.....	109
Abbildung 39: Western-Blot von NIH-3T3-Zellen nach Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation.....	111
Abbildung 40: Western-Blot von MEF-WT-Zellen nach Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation.....	112
Abbildung 41: Western-Blot von MPR-MEF-Zellen nach Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation.....	113
Abbildung 42: Western-Blot von MLII-MEF-Zellen nach Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation.....	114
Abbildung 43: Sequenz des Plbd1-Guide A Inserts.....	117
Abbildung 44: Agarosegel des T7EN-Verdau von PX459-Tet2 transfizierten N2a-Zellen.....	118
Abbildung 45: Agarosegel des T7EN-Verdau von N2a-Zellen nach Transfektion mit CRISPR-Expressionskonstrukten.....	119
Abbildung 46: Agarosegel des XbaI- und T7EN-Verdau von N2a-Zellen nach Transfektion mit CRISPR-Expressionskonstrukten.....	120

Abbildung 47: Agarosegel des AlwNI- und T7EN-Verdau von N2a-Zellen nach Transfektion mit CRISPR-Expressionskonstrukten.	121
Abbildung 48: Agarosegele von N2a-Einzelklonen transfiziert mit CRISPR-Guides nach T7EN und XbaI Verdau.	123
Abbildung 49: Sequenz des Plbd2-GuideB Inserts für den pUC57-Vektor.	124
Abbildung 50: Agarosegel der Genotypisierung von putativen Plbd1- und Plbd2- <i>knockout</i> Tieren.	125
Abbildung 51: Pherogramm der Sequenzierung der Mutation im Plbd1-Tier 81.	126
Abbildung 52: Agarosegel der Genotypisierung von putativen Plbd2- <i>knockout</i> Tieren.	127
Abbildung 53: PAA-Gel der Genotypisierung von Plbd1-KO-Tieren.	130
Abbildung 54: PAA-Gel der Genotypisierung von Plbd2-Tieren der F0-Generation.	131
Abbildung 55: PAA-Gel der Genotypisierung der Geschlechtsorgane von Mäusen der Generation F0.	132
Abbildung 56: qPCR-Analyse der Plbd1-cDNA in WT- und Plbd1-KO-Mäusen.	134
Abbildung 57: qPCR-Analyse der Plbd2-cDNA in WT- und Plbd2-KO-Mäusen.	135
Abbildung 58: qPCR-Analyse der Plbd2-cDNA in Gewebe aus <i>knockout</i> -Mäusen relativ zu WT-Gewebe.	136
Abbildung 59: qPCR-Analyse der Plbd1- und Plbd2-Expression in verschiedenen Geweben.	137
Abbildung 60: Western-Blot von Plbd1 ^{-/-} - und WT-Tritosomen nach Deglykosylierung mit PNGase F.	138
Abbildung 61: Western-Blot von Tritosomen aus WT- und Plbd2-defizienten Tieren.	139
Abbildung 62: Western-Blot von Gewebehomogenaten aus WT- und Plbd1-KO-Mäusen.	140
Abbildung 63: Western-Blot von Gewebehomogenaten aus WT- und Plbd2-KO-Mäusen.	141
Abbildung 64: Western-Blot des Blutsersums und der Hämatocyten aus WT- und Plbd1-KO-Mäusen.	143
Abbildung 65: Leukozyten-Subpopulationen in WT- und Plbd1-KO-Mäusen.	144
Abbildung 66: Western-Blot von Knochenmarkszellen differenziert mit L929-konditioniertem Medium.	147
Abbildung 67: Gewebeschnitte von Hoden aus WT- und Plbd1-KO-Tieren.	148
Abbildung 68: Indirekte Immunfluoreszenz auf Gewebeschnitten von Hoden aus WT- und Plbd1-KO-Tieren.	149
Abbildung 69: Indirekte Immunfluoreszenz auf Gewebeschnitten von Leber aus WT- und Plbd2-KO-Tieren.	151
Abbildung 70: Verteilung des Plbd2-Signals in der indirekten Immunfluoreszenz im WT-Hirn.	152
Abbildung 71: Indirekte Immunfluoreszenz auf Gewebeschnitten von Hirn aus WT- und Plbd2-KO-Tieren.	153
Abbildung 72: Schematische Darstellung der Prozessierung des Pro-Plbd2.	157
Abbildung 73: Tertiärstruktur des Plbd2.	158
Abbildung 74: Tertiärstruktur des Plbd2.	164
Abbildung 75: Schematische Darstellung der Prozessierung des Pro-Plbd2.	165
Abbildung 76: Botenstoffe als mögliche Substrate von Plbd1 und Plbd2.	179
Abbildung 77: Bakteriell Lipid A.	180
Abbildung 78: Vektorkarten der häufig verwendeten Vektoren.	208
Abbildung 79: Sequenzierung des Plbd1-Exon 2 von N2a-Einzelklonen nach Transfektion mit PX459-Plbd1-GuideB.	211
Abbildung 80: Sequenzierung der <i>offtarget</i> -Bindestellen im Genom des Plbd1 F0-Tier Nr.81.	211
Abbildung 81: Sequenzierung der <i>offtarget</i> -Bindestellen im Genom des F0-Tier Nr.5.	212
Abbildung 82: Sequenzierung der <i>offtarget</i> -Bindestellen im Genom des F0-Tier Nr.7.	213
Abbildung 83: Sequenzierung der <i>offtarget</i> -Bindestellen im Genom des F0-Tier Nr.22.	213
Abbildung 84: PAA-Gel der Genotypisierung von Plbd2- <i>knockout</i> -Tieren der F1-Generation.	214
Abbildung 85: qPCR-Analyse der Plbd2-cDNA in WT- und Plbd2-HH-Mäusen.	216
Abbildung 86: qPCR-Analyse der Plbd2-cDNA in WT- und Plbd2-mut-Mäusen.	216
Abbildung 87: qPCR-Analyse der Plbd2-cDNA in WT- und Plbd2-KO-Mäusen.	217
Abbildung 88: Western-Blot von Gewebehomogenaten aus WT- und Plbd2-HH-Mäusen.	217
Abbildung 89: Western-Blot von Gewebehomogenaten aus WT- und Plbd2-mut-Mäusen.	218

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reaktionsansatz der Genotypisierungs-PCR.....	34
Tabelle 2: PCR-Protokoll der Genotypisierungs-PCR.....	35
Tabelle 3: Reaktionsansatz der Kolonie-PCR.....	35
Tabelle 4: PCR-Protokoll der Kolonie-PCR.....	36
Tabelle 5: Reaktionsansatz der <i>add-on</i> -PCR.....	36
Tabelle 6: PCR-Protokoll der <i>add-on</i> -PCR.....	36
Tabelle 7: Reaktionsansatz der Mutagenese-PCR.....	37
Tabelle 8: PCR-Protokoll der Mutagenese-PCR.....	37
Tabelle 9: Reaktionsansatz der qPCR.....	38
Tabelle 10: PCR-Protokoll der qPCR.....	38
Tabelle 11: Ansatz für ein 12,5 % Polyacrylamid-TBE-Gel.....	40
Tabelle 12: Reaktionsansatz des pcDNA3.1/Hygro(+)-Restriktions-Verdau.....	41
Tabelle 13: Verdau von DNA-Inserts.....	41
Tabelle 14: Reaktionsansatz des PX459-Restriktions-Verdau.....	41
Tabelle 15: Ligationsreaktion von Vektor und DNA-Insert.....	42
Tabelle 16: PCR-Protokoll zum <i>reannealing</i> von DNA.....	45
Tabelle 17: T7En-Mastermix.....	45
Tabelle 18: Trenn- und Sammelgele zur SDS-PAGE.....	48
Tabelle 19: PCR-Protokoll zum <i>reannealing</i> von DNA.....	64
Tabelle 20: Sequenzen der CRISPR-Guide-RNA Inserts Plbd1-A und -B sowie Plbd2-A, -B und -C.....	117
Tabelle 21: Sequenz des CRISPR-Guide-RNA Inserts Tet2.....	118
Tabelle 22: Sequenzen der CRISPR-Guide-RNA Inserts Plbd2-D und -E.....	121
Tabelle 23: Mutationen im Plbd2-Gen von <i>knockout</i> -Mäusen.....	128
Tabelle 24: <i>Offtarget-sites</i> der verwendeten Guide-RNAs.....	133
Tabelle 25: Expression von Plbd1 und Plbd2 Transkripten in verschiedenen Geweben.....	145
Tabelle 26: Sequenzhomologien von Plbd1 und Plbd2.....	181
Tabelle 27: Plbd1-Guide B und Sequenzen zweier <i>offtarget</i> -Bindestellen.....	211
Tabelle 28: Sequenzen der Plbd2-Guides und jeweils zweier <i>offtarget</i> -Bindestellen.....	212
Tabelle 29: Sequenzierung der Mutationen im Plbd2-Gen der F1-Nachkommen von Plbd2- <i>knockout</i> -Tieren.....	215
Tabelle 30: Blutanalyse von WT- und Plbd1-KO-Mäusen.....	218

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren		
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Aspartat	Asp	D
Asparagin	Asn	N
Cystein	Cys	C
Glutamat	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Nukleotide	
Adenin	A
Cytosin	C
Guanin	G
Thymin	T
Uracil	U

Gebräuchliche Abkürzungen	
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzonsulfonylfluorid
AEP	Asparaginyl Endopeptidase
Aga	Aspartyl Glucosaminidase
AMC	7-Amino-4-methylcoumarinsäure
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ASNase3	Asparaginase Typ III
β-Hex	β-Hexosaminidase
bp	Basenpaare
BSA	Rindeserum Albumin
BMM	Knochenmarks (<i>bone marrow</i>)-Makrophagen
CA	Cephalosporin Acylase
Cas	CRISPR assoziiertes Protein

cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHAPS	3-((3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propansulfonat
CLEAR	<i>coordinated lysosomal expression and regulation</i>
CMA	Chaperon vermittelte Autophagie
crRNA	CRISPR-RNA
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CSF	<i>colony stimulating factor</i>
C _T	<i>threshold cycle</i>
C-terminal	Carboxyterminal der Peptidkette
Cts	Cathepsin
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DC	Dendritische Zellen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	deionisiertes/vollentsalztes Wasser
ddH ₂ O	steriles Millipore-Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
E64d	(2S,3S)- <i>trans</i> -Epoxysuccinyl- <i>L</i> -leucylamido-3-methylbutanethylester
ECL	enhanced chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
Endo H	Endo-β- <i>N</i> -acetylglucosaminidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fötale Kälberserum
Fuc	Fucose
fwd	<i>forward</i>
Gal	Galaktose
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Glc	Glukose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GNPT	Golgi- <i>N</i> -acetylglucosamin-1-phosphotransferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	human
HDR	<i>homology dependent repair</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish</i> (Meerrettich)-Peroxidase
IAA	Iodacetamid
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
InDel	Insertions-Deletions-Mutationen
kb	Kilobasenpaare
KO	<i>knockout</i>
Lamp	lysosomal associated membrane protein

LB	<i>lysogeny broth</i>
Limp	lysosomal integral membrane protein
LSD	<i>lysosomal storage disorder</i> (lysosomale Speichererkrankung)
LPS	Lipopolysaccharid
m	murin
Man	Mannose
M6P	Mannose-6-Phosphat
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
ML	Mukolipidose
MM	Fehlpaarung (<i>mismatch</i>)
MPR	Mannose-6-phosphat-Rezeptor
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTORC1	<i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>
NEB	New England Biolabs
NHEJ	<i>non homologous end joining</i>
NMD	<i>nonsense mediated decay</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
Ntn	N-terminal nukleophil
N-terminal	Aminoterminal der Peptidkette
OD	optische Dichte
OTS	<i>offtarget site</i>
p.a.	<i>pro analysi</i>
PB	<i>phosphate buffer</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	PBS mit 0,1 % Tween-20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PDB	Protein Data Base
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PGA	Penicillin G Acylase
Plbd1/2	<i>Phospholipase B-domain containing 1/2</i>
PLL	Poly-L-Lysin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNGase F	Peptid-N-Glykosidase F
PNS	Postnukleärer Überstand
PTC	<i>premature termination codon</i>
PVA	Penicillin V Acylase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PvdQ	<i>acyl-homoserine lactone acylase</i>
qPCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
r	rekombinant
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwertes

sgRNA	<i>single guide</i> RNA aus crRNA und tracrRNA
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sia	Sialinsäure
SOC	<i>super optimal broth</i>
Sp	<i>Staphylococcus pyogenes</i>
S-PBS	PBS mit 0,2 % Saponin
ssODN	Einzelsträngige (<i>single stranded</i>) Oligodesoxynukleotide
SV40	<i>simian virus 40</i>
T7EN	T7-Endonuklease I
T _M	Schmelztemperatur
TAE	Tris/Acetat/EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA
TBS	tris buffered saline
TBS-T	TBS mit 0,1 % Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylendiamin
TFEB	Transkriptionsfaktor EB
tracrRNA	<i>trans activating</i> crRNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UVE	uncovering enzyme
WT	Wildtyp
U	Unit
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden als Posterbeitrag oder Fachvortrag öffentlich vorgestellt.

Posterbeitrag

Arne Linhorst, Torben Lübke, “*Processing and Sorting of Plbd2*”, 4th International Symposium: Protein Trafficking in Health and Disease, 07. - 09. Juli 2017, Hamburg, Deutschland.

Fachvortrag

Arne Linhorst, Torben Lübke, “*The lysosomal hydrolase Plbd2 - From knockout to functional role*”, 21st ESGLD Workshop and Graduate Course, 13. - 17. September 2017, Lyon, Frankreich.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2015 bis Mai 2018 in der Arbeitsgruppe Biochemie I der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld angefertigt. Für die Unterstützung in dieser Zeit möchte ich mich bei allen Weggefährten herzlich bedanken.

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Torben Lübke, der schon zu einem frühen Zeitpunkt in meiner wissenschaftlichen Laufbahn ein hohes Maß an Vertrauen in mich gesetzt hat. Nur deshalb war es mir möglich, Erfahrungen an einer anderen Universität zu sammeln, bevor ich die Promotionsstelle in Bielefeld antreten durfte. Während meiner Arbeit hat er mir alle wissenschaftlichen Freiheiten gelassen, jedoch nicht ohne meinen Fokus zu den entscheidenden Zeitpunkten zurück auf das Wesentliche zu lenken. Bei Fragen und Problemen stand er jederzeit zur Verfügung, was im stressigen Arbeitsalltag nicht selbstverständlich ist. Seine fachliche aber auch moralische Unterstützung in der Endphase meiner Promotion weiß ich sehr zu schätzen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Thomas Dierks für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und den unkomplizierten Umgang in sämtlichen organisatorischen Dingen. Unter seiner Leitung hat mir die Arbeitsgruppe Biochemie I ein hervorragendes Arbeitsumfeld geboten.

Prof. Dr. Hartmut Niemann danke ich für die Bereitschaft das Zweitgutachten zu übernehmen.

Für den fachlichen Austausch und die Unterstützung, die ich in meiner Laufbahn von ihm erhalten habe, möchte ich PD Dr. Markus Damme (CAU Kiel) danken.

Bei PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer (ZMNH, UKE Hamburg) möchte ich mich bedanken, die durch Pronukleus-Injektion die *knockout*-Mäuse erstellt und dabei große Geduld mit schlecht funktionierenden sgRNAs aufgebracht hat.

Mein Dank gebührt zudem den lieben Kollegen in der zentralen Tierhaltung der Universität Bielefeld, besonders Christiane Grebe, die aufmerksam und unermüdlich unsere Mäuse gepflegt hat. Dr. Axel Ziesenis danke ich für seine Unterstützung bei der Planung der Mauszuchten und der freundlichen Hilfe in organisatorischen Fragen, wie etwa Tiertransporten.

Kerstin Böker und Mai-Britt Ilse danke ich für die hervorragende Unterstützung im Labor, ohne sie würde der Laboralltag niemals so reibungslos ablaufen. Mai-Britt gebührt dabei ein besonderer Dank für die gute Atmosphäre in unserem Laborraum und das große Interesse, mit dem sie meine Forschung unterstützt hat.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kollegen der Arbeitsgruppe Biochemie I, die mir, jeder auf seine eigene Art, ein gutes Umfeld im Labor oder Büro, praktische Hilfe, fachliche Kontroversen oder Ablenkung in der Freizeit geboten haben. Vielen Dank an Dr. Sarfaraz Alam, Christian Bartz, Tobias Beuel, Mareile Boschanski, Kerstin Fentker, Marcel Freye, Lennart Korf, Dr. Björn Kowalewski, Tobias Krüger, Phillip Neuhaus, Andrea Nolting, Dr. Karthikeyan Radhakrishnan, Christof Trabszo, Michael Weber, Dr. Stefanie Weiland, Dr. Heike Wolf. Ein großer Dank geht auch an unsere „Nachbarn“ der Biochemie III, die mir im Labor durch den Blick aus einer anderen Perspektive oft geholfen haben und im Kaffeeraum ein Quell der Unterhaltung waren. Ein besonderer Dank an dieser Stelle an Dr. Christiane Wiegand für ihre Hilfe bei Gewebeschnitten und der Mikroskopie. Den Kollegen der Biochemie IV gilt mein Dank für den wissenschaftlichen Austausch im *joint-seminar*.

Bei meinen ehemaligen Kommilitonen der Erstis'09, die mittlerweile in diversen Fachrichtungen über das Land verstreut sind, bedanke ich mich herzlich für den fachlichen Austausch und die vielen Dinge darüber hinaus: Basti, Dagmar, Michi, Thorsten, Tobi, tobi, Robin.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei all denen, die sich zum Korrekturlesen der Arbeit bereit erklärt haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie. Was meine Eltern mir ermöglicht haben, ist nicht selbstverständlich. Vieles auf meinem Weg verdanke ich ihnen. Zu guter Letzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Freundin Maxie bedanken, die mit mir fröhlich war und mit mir gefühlt hat, wenn es mir schlecht ging, die viele Entbehrungen in Kauf genommen, mich aber stets bestärkt hat und trotz räumlicher Distanz immer an meiner Seite war. Danke.

Selbstständigkeitserklärung

Erklärung gemäß §8 Abs. 1 der Rahmenpromotionsordnung der Universität Bielefeld

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2015 bis Mai 2018 in der Arbeitsgruppe Biochemie I der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld unter der wissenschaftlichen Anleitung von Apl. Prof. Dr. Torben Lübke angefertigt.

Ich versichere, dass mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld vom 01. Juli 2011 bekannt ist.

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt habe, keine Textabschnitte wörtlich oder dem Sinn entsprechend ohne Kennzeichnung aus anderen Arbeiten übernommen und alle von mir benutzten Hilfsmittel und Quellen angegeben habe. Desweiteren versichere ich, dass niemand unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Vermittlungstätigkeiten oder Arbeiten erhalten hat, die im Zusammenhang mit dem Inhalt dieser Dissertation stehen.

Die vorliegende Arbeit wurde zuvor nicht als wissenschaftliche Prüfungsarbeit eingereicht. Weder eine ähnliche noch eine andere Abhandlung wurde an einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Bielefeld, 30. Mai 2018

Arne Linhorst