

Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Fachbereich Biologie

Der Verlust des Signaltransduktionsmoduls des Proteins p62 führt zu einem adipösen Phänotyp bei Mäusen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Anja Hillmann

aus Bielefeld

-2011-

Dekan:	Prof. Dr. Christian Klämbt
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Hermann Pavenstädt
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Wolfgang A. Linke
Tag der mündlichen Prüfung:	07. 10. 2011
Tag der Promotion:	21. 10. 2011

Inhalt

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung	6
2.1	Proteindegradation	6
2.1.1	Das Protein Ubiquitin und seine Aufgaben	7
2.1.2	Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	8
2.1.3	Die N-Ende-Regel	11
2.1.4	Die Autophagozytose	12
2.1.5	Sequestosomen und Aggresomen	15
2.2	Proteindegradation in Podozyten	15
2.3	Das Protein p62	17
2.3.1	Struktur des Proteins p62	18
2.3.2	Die Rolle von p62 in der Proteindegradation	19
2.3.3	Die Rolle von p62 im NF- κ B-Signalweg	21
2.3.4	P62 in der Tumorgenese	25
2.3.5	Die Rolle von p62 bei der Erkrankung Morbus Paget	26
2.3.6	Die Rolle von p62 bei neurodegenerativen Erkrankungen	26
2.4	Die p62- <i>knockout</i> -Mäuse	28
2.5	Ziel der Arbeit	30
3	Material	31
3.1	Geräte	31
3.2	Verbrauchsmaterialien	34
3.3	Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen	35
3.4	Kits	39
3.5	Puffer, Medien und Lösungen	40
3.6	Enzyme	45
3.7	Primer	45
3.8	Plasmide	46
3.9	Primäre Antikörper	48
3.10	Sekundäre Antikörper	49
3.11	Bakterienstämme	50
4	Methoden	51
4.1	Gentechnische Arbeiten mit Nukleinsäuren	51
4.1.1	Isolation von RNA und cDNA (<i>complementary DNA</i>)-Synthese	51

4.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	51
4.1.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	52
4.1.4	DNA-Restriktion.....	52
4.1.5	Agarose-Gelelektrophorese	52
4.1.6	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	53
4.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	53
4.1.8	Plasmidpräparation	53
4.1.9	Transformation von Bakterien	54
4.1.10	Chemisch kompetente Bakterien.....	54
4.2	Kultivierung und Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen	55
4.2.1	Stimulation von eukaryotischen Zellen.....	57
4.3	Proteinbiochemische Methoden	57
4.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	57
4.3.2	Proteingewinnung aus Organen	57
4.3.3	Proteingewinnung von eukaryotischen Zellsystemen	58
4.3.4	Rekombinante Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen.....	58
4.3.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	59
4.3.6	Western Blot	60
4.3.7	Färbung von SDS-Gelen.....	60
4.3.8	Proteinexpression und Proteingewinnung in prokaryotischen Zellen	61
4.3.9	<i>GST-Pulldown</i>	61
4.3.10	<i>3xFlag-Pulldown</i>	63
4.3.11	<i>Pulldown-Assay</i> mit Ubiquitin-Agarose.....	64
4.3.12	Immunfluoreszenz.....	64
4.4	Isolation primärer Zellen.....	65
4.4.1	Isolation adulter muriner Fibroblasten	65
4.4.2	Isolation von primären Glomeruli und Podozytendifferenzierung.....	65
4.4.3	Isolation mesenchymaler Stammzellen	67
4.4.4	Adipozyten-Differenzierung:.....	67
4.5	Autophagozytose-Assay.....	67
4.6	Messung der ROS-Aktivität in lebenden primären Fibroblasten	68
4.7	Haltung und Züchten von Mäusen.....	69
4.7.1	Verwendete Mauslinien	69
4.7.2	Haltung und Zucht der Mauslinien.....	70
4.7.3	Maus-Genotypisierung.....	71
4.8	Phänotypisierung der Mäuse	72

4.9	Statistische Auswertungen	74
5	Ergebnisse	75
5.1	Genetische Charakterisierung der p62 ^{Δ69-251} -Maus.....	75
5.2	Interaktionsstudien mit dem deletierten Protein p62 ^{Δ69-251}	78
5.2.1	Klonierung von p62 ^{wt} - und der p62 ^{Δ69-251} -Konstrukten	79
5.2.2	Proteindegradations-assoziierte Interaktionen	80
5.2.3	Signaltransduktions-assoziierte Interaktionen.....	86
5.2.4	Massenspektrometrische Analyse von Interaktionspartnern von p62 ^{wt} und p62 ^{Δ69-251}	93
5.3	Phänotypische Charakterisierung der p62 ^{Δ69-251} Maus	95
5.3.1	Bestimmung pathophysiologischer Parameter der p62 ^{Δ69-251} -Mauslinie	95
5.3.2	Organuntersuchungen der p62 ^{Δ69-251} -Mauslinie.....	98
5.4	Zellbiologische Untersuchungen des Proteins p62 ^{Δ69-251}	109
5.4.1	Lokalisationsstudien.....	109
5.4.2	ROS-Aktivität	110
5.4.3	Autophagozytoseaktivität	113
6	Diskussion	119
6.1	Genetische Charakterisierung der p62 ^{Δ69-251} -Mauslinie.....	119
6.2	Domänenstruktur und Interaktionspartner des trunkierten Proteins p62 ^{Δ69-251}	120
6.2.1	Proteindegradation-assoziierte Interaktionen.....	121
6.2.2	Signaltransduktion-assoziierte Interaktionen.....	123
6.2.3	Interaktion mit den MAP-Kinasen p38 und ERK1	124
6.2.4	Zusammenfassung der Interaktionsstudien und der Domänenstruktur von p62 ^{Δ69-251}	124
6.3	Der Verlust des Signaltransduktionsmoduls von p62 führt zur altersbedingten Fettleibigkeit von Mäusen	125
6.3.1	Nephrologische Aspekte de p62 ^{Δ69-251} -Maus.....	127
6.4	Die Entkopplung von Signaltransduktions- und Proteindegadationsfunktion von p62 führt zu ROS-Erhöhung und einer veränderter Autophagozytose	129
6.5	P62 ^{Δ69-251} und die MAP-Kinasen (Mitogen aktivierte Proteinkinasen).	132
6.6	Verbindung von ROS, MAP-Kinase-Aktivierung und der Ausprägung von Adipositas – p62 als „Missing Link“?.....	134
7	Zusammenfassung	138
8	Ausblick.....	140

9 Literaturverzeichnis	142
-------------------------------------	------------



1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
3-MA	3-Methyl-Adenein
Abb.	Abbildung
AID	Atypical PKC interaction domain
AK	Antikörper
aPKC	Atypische Proteinkinase C
AS, aa	Aminosäuren
Atg	<i>Autophagy target gene</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzw.	Beziehungsweise
Carboxy-DCF	Carboxy-Dichlorhydrofluorescein
Carboxy-H ₂ SCFDA	5-(und-6)-carboxy-2'7'-dichlorfluoresceindiacetat
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CMA	<i>Chaperone mediated autophagy</i>
COS	Fibroblastenzelllinie der grünen Meerkatze
CS/Fe	Kälberserum mit Eisen
C-terminal	Carboxy-terminal
CYLD	<i>Cylindromatosis (turban Tumor Syndrome)</i>
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol

Abkürzungsverzeichnis

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DUB	Deubiquitinierendes Enzym
EBI-3	EBV-induziertes Cytokin 3
EBIAP	<i>Eppstaein –Barr virus associated protein</i>
EBV	Eppstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamedintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Eri	Erythrozyten
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
Et al.	Und weitere
FCS	<i>Fetal calf medium</i>
Fl	<i>Fullength</i>
g	Gramm
GABARAP	<i>Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HIV	Humanes immundefizienz-Virus
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>Horseredishperoxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz
IKK	I κ B-Kinase
IL-1	Interleukin-1
IP	Immunpräzipitatuon
IκB	Inhibitor of NF- κ B
k	Kilo

Abkürzungsverzeichnis

K	Lysin
K8	Murine Podozytenzelllinie, Klon K8
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LC3	<i>Microtubule associated protein 1 light chain 3</i>
LIR	<i>LC3 interacting region</i>
LPS	Lipopolysaccharide
Lys	Lysin
m	Milli
M	Molar
m	Meter
MAPK	<i>Mitogen-activated kinase</i>
MDC	Monodansylcadaverin
MEKK3	<i>Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 3</i>
min	Minute
mRNA	Messenger RNA
MSC	Mesenchymale Stammzellen
n	Nano-
N	Anzahl der durchgeführten Experimente
NBR1	<i>Neighbor of BCR1 Gene</i>
NFT	<i>Neurofibrillary tangles</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa light chain' of activated B-cells</i>
NGF	<i>Normal growth factor</i>
NGS	<i>Normal goat serum</i>
N-terminal	Amino-terminal
OD	Optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit

p-	Phospho-
PAA	Polyacrylamid
PAS	<i>Pre autophagosomal structure</i> , Phagophor
PAS	<i>Periodic acid Schiff reaction</i>
PB1	<i>Phox and Bemp1p-1</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PDB	<i>Paget's Disease of Bones</i> , Morbus Paget
PEG	Polyethylenglycol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PEST	<i>Proline, glutamic acid, serine, threonine</i>
pH	<i>Potentium Hydrogenium</i>
PMSF	Phenylmethyldisulfonylfluorid
Pup	<i>Procaryotic ubiquitin-like protein</i>
RANK	<i>Receptor activator of NF-κB</i>
RANK-L	RANK-Ligand
RIP	<i>Receptor interaction protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive oxygene species</i> , freie Sauerstoffradikale
RPE	<i>Retinal pigment epithelial</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
Rpt	<i>Proteasome regulatory particle</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamisgelelektrophorese
sec	Sekunde
SLE	Systemische Lupus Erythematodes
SQSTM1	Sequestosom 1, p62

SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBHP	Tert-butyl-Hydroperoxid
TBS	Tris bufferd solution
TNF-α	<i>Tumor-Nekrose Faktor alpha</i>
TRADD	<i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein</i>
TRAF6	<i>TNF receptor activated factor 6</i>
Trk	<i>Tropomyosin-related kinase</i>
TYM	<i>Trypticase, yeast extract maltose</i>
U	Units
UBA	<i>Ubiquitin associated Region</i>
ubi	Ubiquitin
Ubl	<i>Ubiquitin like modifier</i>
UBR	<i>Ubiquitin-ligase E3 component n-regocnin</i>
UDP	<i>Ubiquitin domain protein</i>
UPS	Ubiquitin Proteasom System
UV	Ultraviolett
v/v	<i>Volume per volume, Volumenprozent</i>
VDAC1	<i>Voltage-dependent anion chanel</i>
Vgl.	Vergleiche
w/v	<i>Weight per volume, Gewichtsprozent</i>
wt	Wildtyp
xg	Fache Erdgeschwindigkeit
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZZ	Zinkfinger

2 Einleitung

2.1 Proteindegradation

Der Proteinhaushalt der Zelle steht in ständigem Wechsel von Proteinbiosynthese und Proteindegradation. Durch dieses dynamische Gleichgewicht, auch Proteostase genannt, ist die Zelle in der Lage, auf neue äußere Einflüsse durch Synthese von Proteinen und den Abbau nicht mehr benötigter Proteine zu reagieren. Darüber hinaus werden fehlerhafte und schädliche Proteine erkannt und degradiert. Die Qualitätskontrolle der Proteine spielt besonders im Zusammenhang mit Zellstress eine Rolle, durch den oft die intrazelluläre Menge fehlerhafter Proteine erhöht ist. Diese liegen dann in Form zytotoxischer Aggregate vor. Auslöser können beispielsweise oxidativer Stress oder Hitzeschock sein (Wong und Cuervo, 2010). Zusätzlich stellt die Proteindegradation den Energiehaushalt der Zelle sicher, da Einzelkomponenten der abgebauten Proteine in den Zellstoffwechsel zurückfließen.

Die Zelle verfügt über zwei Grundmechanismen der Proteindegradation: die enzymatische proteolytische Spaltung von Polypeptiden und die lysosomale Degradation. Zusätzlich können nicht mehr benötigte Proteine durch Aggregatbildung (Sequestosomen) in der Zelle inaktiviert werden.

Nicht erst seit der Verleihung des Nobel-Preises an die Entdecker des Ubiquitin-Systems im Jahr 2004 ist bekannt, dass der Mechanismus des geregelten Proteinabbaus auch bei humanen Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielt. Dieses betrifft neurodegenerative Erkrankungen (z.B. Parkinson oder Alzheimer), Erkrankungen des Herzens (wie Einschlusskörperchen bei Herzmuskelentzündung), virale Erkrankungen (z.B. HIV-, und Hepatitis B-Infektionen), Autoimmunerkrankungen (beispielsweise Sjogren's Syndrom) und Krebserkrankungen (z.B. Nierentumore) (Dahlmann, 2007). Den genannten Erkrankungen liegt eine Störung der Proteindegradation zugrunde, und es kommt zu einem gesteigerten oder verminderten Abbau von Proteinen. Die Regulation der Proteindegradation könnte demnach als therapeutisches Ziel dienen (Bedford et al., 2011).

2.1.1 Das Protein Ubiquitin und seine Aufgaben

Proteine, die intrazellulär degradiert werden sollen, werden mit einem kleinen Protein, dem Ubiquitin, markiert. Das Protein Ubiquitin ist über viele Spezies hinweg hoch konserviert und hat eine Größe von 76 Aminosäuren (etwa 8 kDa). Die kovalente Bindung von Ubiquitin an Lysinreste von Substratproteinen erfolgt durch eine dreistufige enzymatische Reaktion unter ATP-Verbrauch (Hershko und Ciechanover, 1992). Hierbei kann es sowohl zu einer Monoubiquitinierung (Hicke und Dunn, 2003) als auch zu einer Multiubiquitinierung (mehrere Monoubiquitine an einem Protein) (Haglund et al., 2003) von Substratproteinen kommen. Darüberhinaus verfügt das Protein Ubiquitin über sieben eigene Lysinreste (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48, Lys63), über die jeweils eine Polyubiquitinierung, also eine Bildung von Ubiquitinketten möglich ist (Hicke et al., 2005). Innerhalb der Ubiquitinketten ist zusätzlich eine Variation der Bindungsstellen möglich. Die am besten charakterisierten Polyubiquitinketten, und mutmaßlich auch diejenigen mit der häufigsten Präsenz im humanen System, sind Polyubiquitinketten mit einer Verknüpfung über den Lysinrest 48 (K48) und den Lysinrest 63 (K63) (Haglund und Dikic, 2005). Abhängig von der Art der Ubiquitinierung eines Proteins, folgt es einem anderen Signalweg, wird von anderen Adaptermolekülen erkannt oder ist in einem anderen Kompartiment der Zelle lokalisiert. Ubiquitinierung ist eine posttranslationale Modifikation, vergleichbar mit der Phosphorylierung von Proteinen, die als schnelle Antwort auf äußere Umstände ausgelöst wird und durch deubiquitinierende Enzyme (DUBs) reversibel ist (Wilkinson, 1997). Die Abbildung 1 zeigt eine Aufstellung verschiedener Ubiquitinierungsformen mit zugehöriger Funktion.

Neben Ubiquitin sind inzwischen weitere Ubiquitin-ähnliche Moleküle bekannt geworden. Man unterscheidet zwischen Proteinen mit einer Ubiquitin-ähnlichen Domäne (UDP, *ubiquitin domain proteins*) und Proteinen mit einer Ubiquitin-ähnlichen Funktion (Ubl, *ubiquitin-like modifiers*) (Sorokin et al., 2009). Die bekanntesten Vertreter der Ubl-Familie sind SUMO (*small ubiquitin-like modifiers*), welche unter anderem an der Lokalisation und der Stabilisierung von Proteinen beteiligt sind und das Atg12 (*autophagy target gene 12*), welches eine Rolle in der Autophagozytose spielt (Jentsch und Pyrowolakis, 2000).

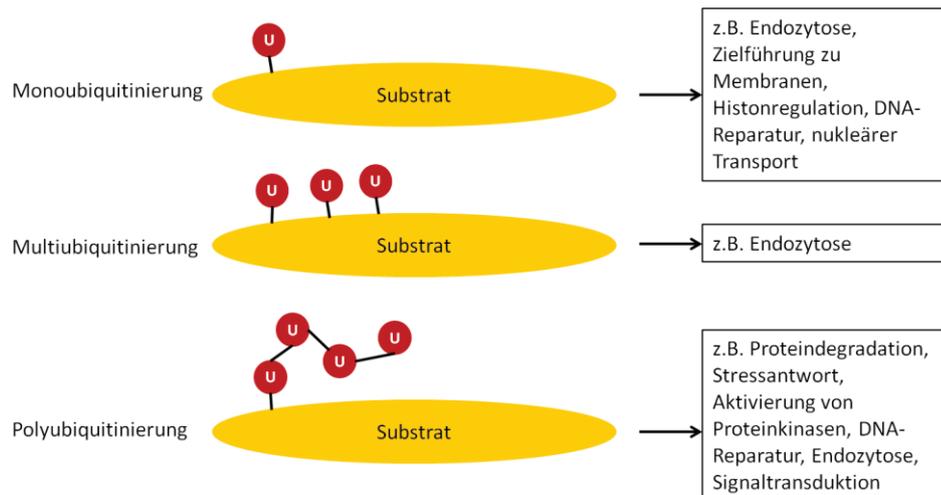


Abb. 1: Schematische Darstellung verschiedener Ubiquitinierungen (verändert nach (Jadhav und Wooten, 2009)). Das Protein Ubiquitin (rot) ist in der Lage über seinen C-terminalen Glycinrest eine Isopeptidbindung mit Lysinresten von Zielproteinen (gelb, Substrat) auszubilden und diese auf diesem Weg kovalent zu binden. Hierbei kann es neben der einfachen Monoubiquitinierung auch zu Ubiquitinbindungen an mehreren Stellen des Substratproteins kommen. Je nachdem an welcher Stelle die Ubiquitinierung stattfindet und mit welcher Anzahl von Ubiquitinen ein Protein versehen wird, erfüllt die Ubiquitinierung eine andere Funktion (z.B. Lokalisation des Proteins). Als Zielprotein kann auch ein weiteres Ubiquitin dienen, was zu einer Kettenbildung von mehreren Ubiquitinen an einem Substrat führt. Abhängig davon, an welchem Lysinrest des Ubiquitins eine Kette gebildet wird, ergibt sich ein unterschiedliches Signal für das Zielprotein. Die bekanntesten Polyubiquitinketten werden über das Lysin 48 vernetzt und dienen der Zielführung zum proteasomalen Abbau.

2.1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) dient der proteolytischen Spaltung von Proteinen. Substratproteine werden mit bestimmten Ketten des Proteins Ubiquitin markiert (verknüpft über den Lysinrest 43) und dem Abbau zugeleitet. Der Degradationsmechanismus von Proteinen durch das Proteasom ist über viele Spezies, von der Hefe bis zum Säugetier, hoch konserviert. Auch Pflanzen weisen proteasomalen Proteinabbau auf (Schliephacke et al., 1991). Eine vereinfachte Version des Proteasoms ist bei einigen Bakterien, wie *Mycobacterium tuberculosis* (Pearce et al., 2008), und nahezu allen Archae- und Eubakterien zu finden (Darwin, 2009). Sie verwenden an Stelle des eukaryotischen Ubiquitins eine bakterielle Version, das so genannte Pup (*procaryotic ubiquitin-like protein*).

Ein Schaubild des Prozesses der Degradation von Proteinen über das UPS ist in Abbildung 2 dargestellt. Zunächst wird im Zytosol frei vorliegendes Ubiquitin durch ein Ubiquitin-

Aktivierungsenzym (auch Ubiquitin-Ligase E1) unter ATP-Verbrauch über eine Thio-Ester-Bindung rekrutiert. Anschließend überträgt E1 das Ubiquitin auf ein Ubiquitin-Konjugationsenzym (auch Ubiquitin-Ligase E2). Darauf folgt die kovalente Bindung von Ubiquitin an einen Lysinrest des Substratproteins. Diese Bindung erfolgt unter der Kontrolle von substratspezifischen E3 Ubiquitinligasen. Nach mehrfacher Wiederholung dieses Prozesses entstehen Ubiquitinketten. Sobald diese Ketten eine Mindestlänge von vier Ubiquitineinheiten aufweisen, werden sie, zumeist vermittelt über Transporterproteine, von dem Proteasom erkannt. Innerhalb des zylinderförmigen Proteasoms befinden sich mehrere proteolytisch aktive Bereiche mit deren Hilfe das Substrat in kurze Peptide gespalten wird. Deubiquitinierende Enzyme (DUBs) spalten zuvor die Ubiquitineinheiten von dem Substratprotein, so dass sie wieder frei im Zytosol vorliegen und für weitere Ubiquitinierungen wiederverwendet werden können. Das humane Genom kodiert für drei E1 Ubiquitin-Aktivierungsenzyme, rund 100 E2 Ubiquitin-Konjugationsenzyme, etwa 600 Ubiquitin-Ligasen der Klasse E3 und rund 100 DUBs (Kaiser und Huang, 2005). Dieser Befund lässt darauf schließen, dass die Spezifität der Enzyme von E1 hin zu E3 zunimmt. Die Grundmaschinerie des UPS ist demnach ubiquitär, es existiert allerdings eine Feinregulation des Proteinabbaus über die Substratspezifität des E2-E3-Komplexes.

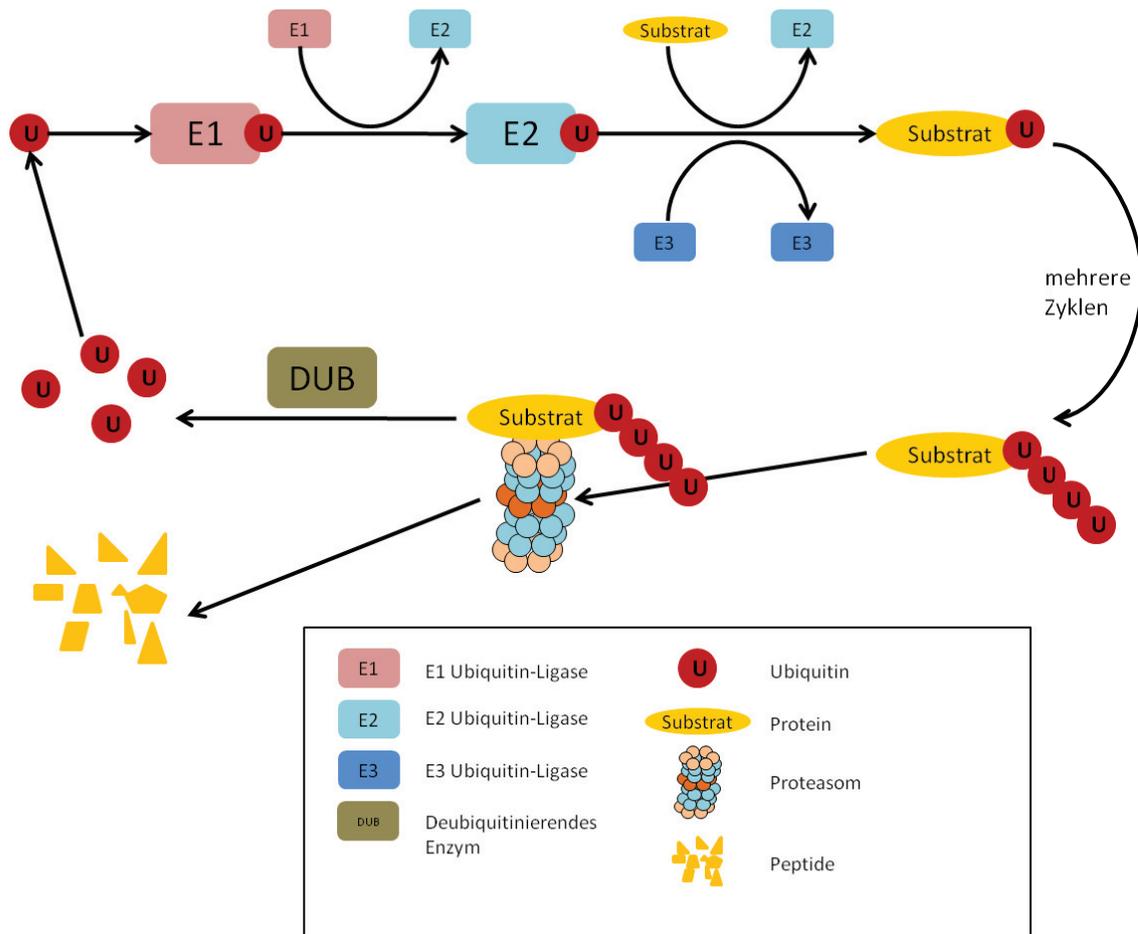


Abb. 2: Schematische Darstellung des Ubiquitin Proteasom Systems (UPS) (nach Cell Signaling Technology 2010 Ubiquitin/Proteasome Pathway. http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Ubiquitin_Proteasome.html). E1 Aktivierungsenzyme binden unter ATP-Verbrauch Ubiquitin und übertragen dieses auf E2 Konjugationsenzyme. Ubiquitin wird mit Hilfe einer E3-Ubiquitinligase von E2 auf ein Substrat übertragen. Im Weiteren werden mehrere Ubiquitine von den entsprechenden Enzymen zu einer Kette verknüpft, indem sie an den Lysinrest 48 des vorangehenden Ubiquitins binden. Besteht die Kette aus wenigstens 4 Ubiquitinuntereinheiten, wird diese direkt von dem Proteasom erkannt oder über ein Linkermolekül zu diesem Zielort transportiert. Das Substratprotein wird proteolytisch degradiert, während deubiquitinierende Enzyme die Ubiquitinketten von dem Substrat entfernen. Die einzelnen Ubiquitineinheiten stehen für erneute Ubiquitinierungen zur Verfügung.

Das Proteasom kann als molekularer „Schredder“ bezeichnet werden, der wie eine Röhre aufgebaut ist, in der sich drei Protease-aktive Untereinheiten ($\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$) unterschiedlicher Spezifität befinden. Hierbei handelt es sich um Proteasen des Chymotrypsin-, des Trypsin- und des Kaspase-Typs, die jeweils unterschiedliche Aminosäuresequenz-Erkennungsstellen aufweisen (Groll et al., 2009).

Zur der Hemmung des Proteasoms werden verschiedene Substanzklassen eingesetzt. Sie können entweder den Eingang von Proteinen in das Proteasom sterisch inhibieren oder reversibel/irreversibel an die aktiven β -Untereinheiten des Proteasoms binden, wobei abhängig von der inhibitorischen Substanz, die einzelnen Proteasen unterschiedlich stark funktionell beeinträchtigt werden (Meiners et al., 2008). Zu den bekanntesten Inhibitoren des Proteasoms zählt MG132 (Ac-Leu-Leu-Leu-H), ein Peptidaldehyd, welches reversibel den Eintritt von Proteinen in das Proteasom inhibiert, ohne die Proteasen des Proteasoms zu beeinflussen. Als Medikament zugelassen und bei dem multiplen Myelom eingesetzt, ist das Peptidborat Bortezomib (Chari et al., 2010). Diese Substanz bindet ebenfalls spezifisch und reversibel an den Proteasomeingang. Bortezomib könnte auch in anderen Therapien, wie der Behandlung von Systemischem Lupus Erythematodes (SLE), zum Einsatz kommen (Neubert et al., 2008).

2.1.3 Die N-Ende-Regel

Ein Sonderfall der Degradation, die über das UPS stattfindet, ist die N-Ende-Regel (*N-end rule*), welche die Halbwertszeit bestimmter Proteine reguliert. Das Signal zur Degradation wird nicht über die Menge an spezifischen E3-Ligasen bestimmt, sondern liegt in der Aminosäuresequenz des Substratproteins selbst. Der Zusammenhang von aminoterminaler Sequenz (N-Ende) und Halbwertszeit eines Proteins wurde für prokaryotische und eukaryotische Proteine gezeigt, dessen Lebensspanne zwischen 3 Minuten und 20 Stunden liegt (Bachmair et al., 1986). Die N-terminalen Reste werden in stabilisierende und destabilisierende Sequenzen klassifiziert. Die destabilisierenden Sequenzen werden als N-degrons bezeichnet. Sämtliche bisher bekannten N-degrons besitzen wenigstens einen Lysinrest und werden von bestimmten E3-Ubiquitinligasen erkannt, die sich eine etwa 76 Aminosäuren lange Sequenz teilen, die UBR-Box (Varshavsky, 1996). UBR1 (auch E3 α oder *ubiquitin-ligase E3 component n-recognin 1*) war das erste bekannte E3-Enzym, welches den N-Terminus eines Proteins als Zielsequenz erkennt und Teil der Ubiquitin-Übertragungskaskade ist (Bartel et al., 1990). Es wurden sieben Proteine (UBR1 bis UBR7), die über eine UBR-Box verfügen, im humanen Genom identifiziert (Tasaki et al., 2005). Bei vier (UBR1, UBR2, UBR4 und UBR5) dieser UBR-Box-Proteine ist bislang eine E3-Aktivität im Zusammenhang mit der N-Ende-Regel gezeigt worden (Sriram et al., 2009). Die

Proteine, die aufgrund der N-Ende-Regel ubiquitiniert wurden, werden proteasomal degradiert (Richter-Ruoff et al., 1992).

Mutationen in dem Gen für UBR1 sind Ursache für die humane Erkrankung Johanson Blizzard-Syndrom (JBS), deren Symptome unter anderem Minderbegabung, Deformationen im Kopfbereich und einer Dysfunktion des Pankreas sind (Zenker et al., 2005).

In welcher Weise der Prozess der N-Ende-Regel kontrolliert wird, ist aktuell nur rudimentär verstanden, da bislang nur wenige *in vivo* Substrate identifiziert werden konnten (Jadhav und Wooten, 2009).

2.1.4 Die Autophagozytose

Die Autophagozytose ist ein lysosomaler Prozess, welcher der Degradation von großen, unlöslichen Proteinen, Proteinaggregaten und ganzen Organellen dient. Im Vergleich zur Phagozytose (aus dem altgriechischen von *phagein* = fressen und *cýtos* = Zelle) werden nicht externe, sondern zelleigene (*auto* = selbst) Bestandteile verdaut. Der Hauptinduktor der Autophagozytose im natürlichen System ist das Hungern der Zellen. Bis vor kurzem wurde die Autophagozytose als unspezifischer Prozess zur Degradation von überschüssigen Zellorganellen und großen zytosolischen Aggregaten, die nicht über das Proteasom abgebaut werden können, beschrieben. Aktuell wird der Begriff der selektiven Autophagozytose diskutiert, da Autophagozytose durch Ubiquitinierung und durch *Cargo*-Proteine unterstützt wird und auf diese Weise ausgewählte Substrate degradiert werden können (Clague und Urbe, 2010).

Die Grundprinzipien der Autophagozytose wurden hauptsächlich in dem Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) untersucht, in dem auch die Autophagozytose relevanten Gene (ATG, *autophagy target genes*) und die entsprechenden Proteine identifiziert wurden. Diese geben den meisten Autophagozytose-assoziierten Proteinen ihren Namen und finden fast alle im Proteom höherer Organismen Homologe (Klionsky et al., 2003). Man kann einerseits Prozess-spezifisch zwischen Chaperon vermittelter Autophagozytose (CMA, *chaperone mediated autophagy*), Mikroautophagozytose und Makroautophagozytose unterscheiden. Auf der anderen Seite findet man auch die weniger häufig verwendeten Bezeichnungen nach Substrat, wie

beispielsweise Aggregophagozytose (Aufnahme von Aggregaten) oder Lipophagozytose (Aufnahme von Lipiden).

Bei der CMA handelt es sich um die Degradation fehlerhafter Proteine durch das direkte Einschleusen in lysosomale Vesikel, wobei Chaperone bestimmte Sequenzen des Proteins erkennen, das Protein binden und über die Interaktion mit membranständigen Proteinen (z.B. Lamp2a) in lysosomale Vesikel transportieren (Massey et al., 2004; Salvador et al., 2000). Die Mikroautophagozytose verläuft im Wesentlichen wie die CMA, jedoch ohne die Unterstützung durch Chaperone (Ahlberg und Glaumann, 1985; Kunz et al., 2004). Hierbei werden die Proteine und Organellen durch das Einstülpen und Abschnüren der Lysosomenmembran in das Vesikellumen gebracht (Tuttle und Dunn, Jr., 1995; Kiel, 2010). Im Säugetier-Genom wurden bisher keine Äquivalente zu den Proteinen der Mikroautophagozytose-ATGs der Hefe identifiziert, und hier ist dieser Mechanismus noch nicht tiefgehend verstanden (Wong und Cuervo, 2010). Bei der Makroautophagozytose werden im Zytosol *de novo* Membranen gebildet, welche Organellen, Proteine und Proteinaggregate umschließen und mit lysosomalen Vesikeln fusionieren. Die Makroautophagozytose ist die meist untersuchte und am besten beschriebene Form und wird im Weiteren als Autophagozytose bezeichnet.

Die Abbildung 3 zeigt den Ablauf der Autophagozytose und die Funktion einiger relevanter Proteine. Zunächst wird eine Doppelmembranstruktur gebildet (Phagophor oder PAS = *pre-autophagosomal structure*) an die, je nach Stadium und Größe der Struktur, unterschiedliche Proteine und Proteinkomplexe binden. Von besonderer Bedeutung ist hierbei ein Komplex aus Atg12, Atg5 und Atg16 (Mizushima et al., 1999), welcher als erstes an das Phagophor bindet und die Autophagozytose initiiert (Mizushima et al., 2003). Zusätzlich wird das zytoplasmatische Protein LC3I (*microtubule associated protein 1 light chain3*, entspricht dem Hefe-Protein Atg8) prozessiert, indem es kovalent an Phosphatidylethanolamin gebunden wird, so dass es als so genanntes LC3II in der Phagophormembran verankert werden kann (Ichimura et al., 2000). Im Weiteren wird die Membran vergrößert, und der Atg12-5-16-Komplex wird ausschließlich auf der späteren Außenseite des Phagophors gefunden (Mizushima et al., 2001). Nun werden unselektiv Proteine und Organellen umschlossen oder selektiv über Adaptermoleküle, welche einerseits die Substrate und andererseits LC3 binden, in das Phagophor gebracht (Yang

und Klionsky, 2009). Das Phagophor schließt sich zu einem intakten Vesikel, dem Autophagosom. Nun löst sich LC3 von der Außenseite des Autophagosoms in das Zellplasma und es kommt zur Fusion mit Lysosomen. Organellen und Proteine (auch das membranständige LC3 der Membranninnenseite) werden in dem entstandenen Autophagolysosom mittels lysosomaler Hydrolasen degradiert (Mizushima et al., 2001). Das Endprodukt der Lyse sind Di- und Tripeptide, die in das Zytosol freigesetzt werden und Grundbausteine für die Proteinbiosynthese werden können (Wong und Cuervo, 2010).

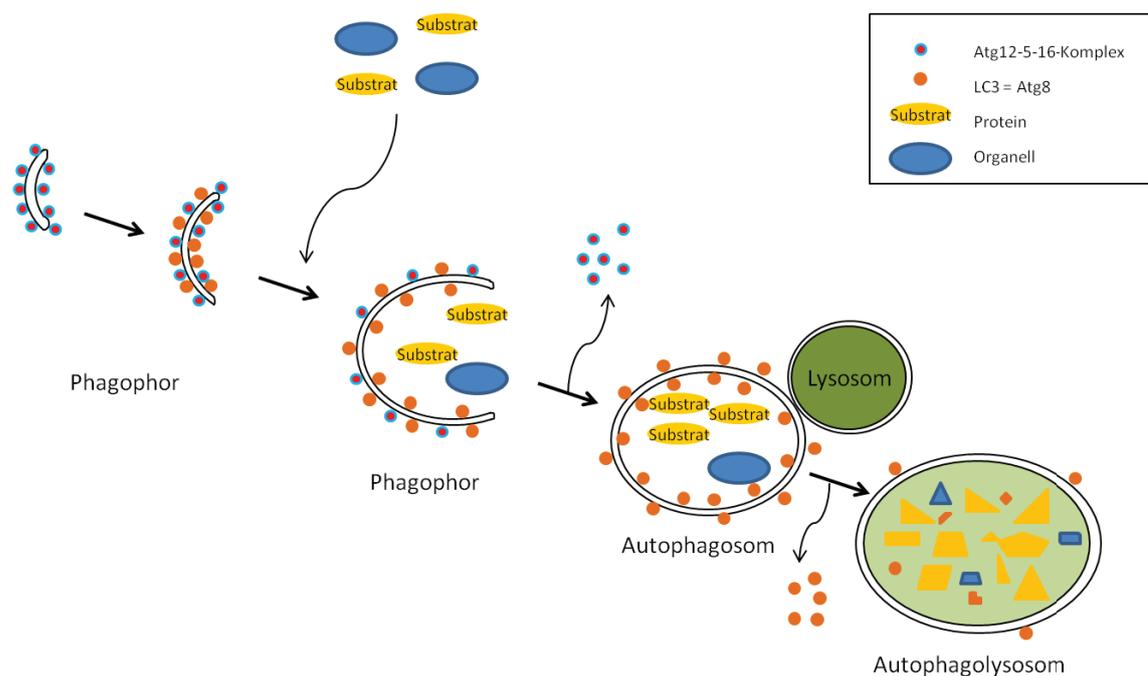


Abb. 3: Schematische Darstellung des Ablaufs der Autophagozytose (nach (Geng und Klionsky, 2008)). An eine kleine Doppelmembranstruktur bindet ein Komplex aus Atg12, 5 und 16. Während der Elongation der Membranstruktur bindet LC3 an das Phagophor, und der Atg12-5-16-Komplex wandert an die Vesikelaußenseite. Nun werden selektiv oder zufällig Proteine, Proteinaggregate und Organellen in das Phagophor aufgenommen, und der Vesikel schließt sich zum Autophagosom. LC3 löst sich von der Vesikelaußenseite, und es kommt zur Fusion mit Lysosomen. In dem entstandenen Autophagolysosom erfolgt die saure Degradation der Substrate und des innenliegenden LC3.

Die Inhibition der Autophagozytose kann an verschiedenen Stellen des Prozesses erfolgen. So inhibiert 3-Methyl-Adenin (3-MA) die Bildung des Phagophors, wohingegen Bafilomycin A die Fusion von Autophagosom und Lysosom inhibiert. In der Transplantationsmedizin werden z.B. mTor-Inhibitoren, wie Rapamycin, eingesetzt, die den Prozess der Autophagozytose induzieren (Apel et al., 2009).

2.1.5 Sequestosomen und Aggresomen

Unter Sequestosomen versteht man unlösliche Proteinaggregate. Diese Aggregate bilden sich in der Zelle durch fehlerhaft gefaltete Proteine, welche besonders in Stresssituationen (z.B. vermehrte ROS-Produktion) entstehen (Dobson, 2003). Weitere Induktoren für die Bildung von Proteinaggregaten sind Mutationen innerhalb bestimmter Proteine (z.B. bei den familiären Formen von Morbus Alzheimer und Parkinson, oder bei Morbus Huntington und Diabetes Mellitus Typ2), eine defekte Proteinbiosynthese und Zellalterung (Tyedmers et al., 2010). In Säugetierzellen werden die Sequestosomen auch Aggresomen genannt und enthalten nicht ausschließlich ubiquitinierte Proteine, so dass von einem weiteren Signal zur Aggregatbildung auszugehen ist (Kopito, 2000).

Prinzipiell ist die Bildung von Proteinaggregaten zunächst ein zellschützender Mechanismus, der vor unerwünschten und fehlerhaften Proteinen schützt. Eine sehr stark erhöhte Anzahl an Proteinaggregaten wirkt jedoch toxisch und kann zum Zelltod führen (Kopito, 2000). Aus diesem Grund werden die Aggregate entweder aufgelöst und proteasomal degradiert (eher selten) oder über die Autophagozytose abgebaut (Tyedmers et al., 2010).

2.2 Proteindegradation in Podozyten

In der Niere von Säugetieren verhindert die glomeruläre Filtrationsbarriere eine Ausscheidung von Proteinen in den Urin. Auf zellulärer Ebene besteht der Filtrationsapparat aus der glomerulären Basalmembran, den glomerulären Endothelzellen sowie aus Podozyten. Podozyten besitzen eine sehr komplexe Struktur. Sie weisen Fußfortsätze auf, die wie ineinandergreifende Finger zweier Hände die Oberfläche der glomerulären Basalmembran bedecken; ein großer Teil der Fußfortsätze liegt mit der apikalen Seite im Urinraum (Pavenstadt et al., 2003) (Abb. 4). Die Fußfortsätze berühren die extrazellulären Matrixproteine der glomerulären Basalmembran und bilden lateral die Schlitzmembran. Sie bildet den trennschärfsten größen- und ladungsselektiven Filter für Proteine. Ihre Schädigung führt zu einer Proteinurie. Die Schlitzmembran des Podozyten beinhaltet signaltransduktionsaktive Proteinkomplexe, deren molekulare Zusammensetzung in den letzten Jahren zum Teil aufgeklärt werden konnte (vgl. Abb. 4D). (Kerjaschki, 2001; Miner, 2003)

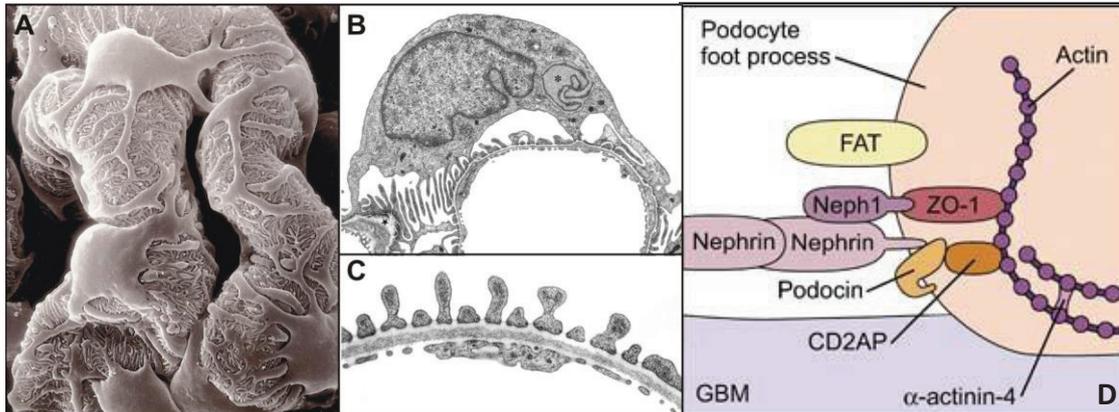


Abb. 4: Struktur der Podozyten (nach (Pavenstadt et al., 2003; Kwoh et al., 2006)). A: Rasterelektronenmikroskopisches Bild glomerulärer Podozyten auf der Außenseite der Kapillaren innerhalb eines Glomerulus. In der Seitenaufnahme (B) und der Vergrößerung (C) ist der Kontakt zur glomerulären Basalmembran sichtbar. D: Schematische Darstellung der Schlitzmembran, die zwischen den Fußfortsätzen der Podozyten ausgebildet wird. Die komplexe Form des Podozyten wird durch das Zytoskelett aufrechterhalten. Der Schlitzmembrankomplex (Nephrin, ZO-1, CD2AP) wird intrazellulär mit dem Zytoskelett verknüpft.

Die komplexe Struktur und die hohe Polarität der Zellen, sowie das Ausbilden von Zellausläufern, weisen Parallelen zu Neuronen auf (Simons et al., 2009; Kobayashi et al., 2004). Zudem zeigen Podozyten und Neuronen eine hohe Ähnlichkeit in Proteinen, die verstärkt oder ausschließlich in diesen Zelltypen exprimiert werden; hierzu gehören die Proteine Nephrin, Synaptopodin, Dendrin und Kibra (Weide und Huber, 2009).

Es wurde gezeigt, dass die Autophagozytose gerade in postmitotischen Zellen eine große Rolle spielt, da über diesen Prozess der Proteinhaushalt über einen langen Zeitraum stabilisiert wird (Mizushima und Kuma, 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die das Autophagozytose-Markerprotein LC3 als Fusionsprotein mit GFP (*green fluorescent protein*) überexprimieren, eine besonders starke Anreicherung der Fluoreszenz in den Nieren aufweisen (Hartleben et al., 2010). Diese und andere Studien demonstrieren, dass Podozyten ein sehr hohes Basallevel an Autophagozytose aufweisen (Weide und Huber, 2011; Hartleben et al., 2010). Das Podozyten-spezifische Ausschalten der Autophagozytose (Podozyten spezifische *Atg5^{-/-}*-Maus) führt zu einer beschleunigten Zellalterung einhergehend mit einer altersbedingten Proteinurie der Mäuse (Hartleben et al., 2010). Sato et al. konnten zudem eine gesteigerte Autophagosomenproduktion in histologischen Untersuchungen von Podozyten mit verschiedenen nephrologischen Erkrankungen korrelieren (Sato et al., 2009; Sato et al., 2006a; Sato et al., 2006b). Zudem konnte gezeigt

werden, dass mutiertes α -Aktinin 4 in Podozyten zu einer familiären FSGS (Fokal segmentalen Glomerulonephritis) führt und dieses Protein über das UPS abgebaut wird. Vermutlich führt die Massive Degradation von mutiertem α -Aktinin 4 zu einer Überlastung des Systems, welches somit nicht seinen zellprotektiven Aufgaben nachkommen kann (Cybulsky et al., 2009).

Podozyten und Neuronen ähneln sich in morphologischer und molekularbiologischer Hinsicht. Besonders für postmitotische Zellen ist ein gesunder Proteinhaushalt mit geregelter Proteindegradation von Bedeutung. Aufgrund der neurodegenerativen Folgen einer gestörten Proteindegradation (z.B. bei Morbus Alzheimer), liegt es nahe, dass ein Ungleichgewicht des Proteinabbaus auch in Podozyten klinisch relevante Folgen für diese Zellen und damit einhergehend für die Filtrationsfunktion der Niere hat.

2.3 Das Protein p62

Das Protein p62 nimmt eine Schlüsselrolle in allen drei Proteindegradationsmechanismen - der Sequestration, dem UPS und der Autophagozytose - ein. Die Erstbeschreibung von p62 wurde von vier Arbeitsgruppen parallel in unabhängigen Studien publiziert. 1. als Bindungspartner von der p56^{lck} SH2-Domäne, einer T-Zell-spezifischen Tyrosinkinase (Joung et al., 1996); 2. als Interaktionspartner der atypischen Proteinkinase C zeta (aPkc ζ) mit der Bezeichnung ZIP (Puls et al., 1997); 3. unter dem Namen A170, dessen Expression durch oxidativen Stress in Macrophagen hochreguliert wird (Ishii et al., 1996); und 4. als EBIAP (*Eppstein-Barr virus induced gene 3 associated protein*), welches nach der Infektion von B-Zellen mit dem Eppstein-Barr Virus (EBV) mit einem neuartigen EBV-induzierten Cytokinrezeptor (EBI-3) assoziiert ist (Devergne et al., 1996). Im Jahr 2002 wurde es als Sequestosom 1 (SQSTM1) im Zusammenhang mit Mutationen in der Ubiquitin-Binderegion (UBA, *ubiquitin associated region*) des SQSTM1 Gens beschrieben, die zu der autosomal-dominanten Form der Erkrankung Morbus Paget führen (Laurin et al., 2002).

Zunächst wurde vermutet, dass p62 ausschließlich als Gerüstprotein dient, welches vor allem Proteinkomplexe stabilisiert. Später wurde p62 in Zusammenhang mit der Proteindegradation über das Proteasom (Babu et al., 2005) und die Autophagozytose (Bjorkoy et al., 2005) gebracht.

2.3.1 Struktur des Proteins p62

Das Protein p62 ist ein Multidomänenprotein. Es besteht aus 442 Aminosäuren und ist über viele Spezies hinweg hoch konserviert. Eine schematische Darstellung des Proteins ist der Abbildung 5 zu entnehmen.

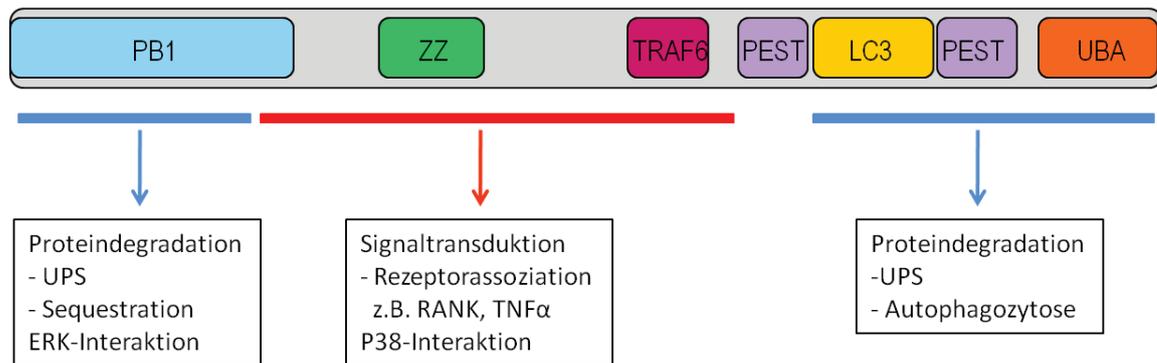


Abb. 5: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von p62. Das Protein p62 besteht aus 8 bekannten Domänen, wobei die ersten beiden Domänen gemeinsam eine PB1-Domäne bilden. Von links nach rechts: PB1-Domäne (*Phox and Bem1p-1*; Bindung weiterer PB1-Domänen-Proteinen, z.B. aPKC ζ (atypische Proteinkinase C zeta) und NBR1 (*neighbour of BRCA1 gene 1 protein*)), ZZ-Domäne (Zinkfinger; Bindung von CYLD (*Cylindromatosis (turban Tumor Syndrome)*) und RIP1 (*receptor interaction protein 1*)), TRAF6-Domäne (Bindung von TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*)), PEST-Sequenzen (*proline, glutamic acid, serine, threonine*; im Zusammenhang mit der Halbwertszeit von Proteinen, bei p62 nicht weiter charakterisiert), LC3-Bindedomäne (Bindung von LC3 (*microtubule associated protein 1 light chain3*)) und UBA-Domäne (*ubiquitin associated domain*; nicht-kovalente Bindung an Ubiquitin). Die Domänen können grob in zwei unterschiedliche funktionelle Einheiten unterteilt werden: rot: Signaltransduktionsmodul und blau: Proteindegradationsmodule.

N-terminal besitzt p62 eine PB1 (*Phox and Bem1p-1*)-Domäne, über die es mit der atypischen Proteinkinase C zeta (aPKC ζ) interagiert (Puls et al., 1997). Daran schließt sich ein ZZ-Finger Motiv an, über welches p62 mit dem Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α) Signaladapter RIP1 (*receptor interacting protein*) interagiert (Sanz et al., 1999). Über die TRAF6-Bindedomäne (auch TBS Sequenz) interagiert p62 mit TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*), der mit Osteoklastogenese und Endzündungsantworten assoziiert ist (Sanz et al., 2000). Die beiden PEST-Regionen (*proline, glutamic acid, serine, threonine*) von p62 sind proteinbiochemisch bislang unzureichend charakterisiert. Vermutlich wird das Protein an diesen Stellen phosphoryliert, wodurch, wie bei Proteinen mit ähnlichen PEST-Sequenzen (z.B. das Protein p53), die Halbwertszeit des Proteins verringert wird (Joung et al., 1996). Über die LC3-Bindedomäne (auch LIR, *LC3 interaction region*) kann p62 an das

Protein LC3, ein Säugetier-Homolog des Autophagosomenmembran-assoziierten Atg8 (*autophagy target gene 8*) der Hefe, binden (Pankiv et al., 2007). Die C-terminale UBA (*Ubiquitin associated*)-Region ist in der Lage Ubiquitin nicht-kovalent zu binden (Vadlamudi et al. 1996). Darüber hinaus ist eine direkte Interaktion mit den MAP-Kinasen (*mitogen activated kinase*) ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*) und p38 möglich (Rodriguez et al., 2006; Kawai et al., 2008).

2.3.2 Die Rolle von p62 in der Proteindegradation

P62 spielt eine Schlüsselrolle in der Proteindegradation. Es ist in der Lage ubiquitinierte Proteine zu binden und diese durch Selbstinteraktion in Aggregaten einzuschließen (Sequestration), sie durch Interaktion mit dem Proteasom der enzymatischen Spaltung, oder durch die Interaktion mit LC3 der lysosomalen Autophagozytose zuzuführen. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein p62 sowohl bei der Inhibition des Proteasoms, als auch bei der Inhibition der Autophagozytose in RPE- (*retinal pigment epithelial*) Zellen akkumuliert (Viiri et al., 2010).

Das Protein p62 hat eine C-terminale Ubiquitin Binderegion (UBA) über die Ubiquitin nicht-kovalent gebunden werden kann. N-terminal trägt p62 eine PB1 (*Phox and Bem1p-1*)-Domäne, die eine Interaktion mit der 26S Proteasom-Untereinheit Rpt1 (*Proteasome regulatory particle*) erlaubt (Seibenhener et al., 2004). Diese beiden Eigenschaften ermöglichen es p62 ubiquitinierte Proteine zu binden und sie dem Abbau über das Proteasom zuzuführen. Die UBA von p62 erkennt Ubiquitinketten mit einer Lysin48- oder einer Lysin63-Verknüpfung, *in vitro* wurde allerdings eine Präferenz für Lysin63-verknüpfte Ubiquitinmoleküle gezeigt (Seibenhener et al., 2007). Zusätzlich interagiert p62 mit der E3-Ubiquitinligase TRAF6, welche Lysin63-Ubiquitinketten an Substratproteine knüpft (Wooten et al., 2005). Das erste bekannte Substrat, welches p62 zur Degradation durch das Proteasom leitet, ist polyubiquitiniertes Tau. Das Protein Tau liegt im Hippocampus von Alzheimer-Patienten mit Ubiquitin und p62 co-lokalisiert vor (Kuusisto et al., 2001; Kuusisto et al., 2002).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass p62 in Aggregaten vorliegt, die über die Autophagozytose abgebaut werden. Erstmals wurde dieses für das Protein Huntingtin gezeigt. Dieses Protein liegt in mutierter Form aggregiert in den Neuronen von Patienten

mit der autosomal dominanten Erkrankung Chorea major vor und verursacht die Degeneration dieser Zellen. In der funktionellen Wildtypform wird Huntingtin über das Proteasom abgebaut. Die Aggregate der mutierten Variante sind p62-positiv und werden über den Prozess der Autophagozytose abgebaut (Bjorkoy et al., 2005). Zudem ist p62 in der Lage über die LC3-Interaktionsdomäne (LIR, *LC3 interaction domain*) das Autophagozytose-Markerprotein LC3 und andere Mitglieder der GABARAP-Familie (*gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein family*) zu binden, welche in Autophagosomenmembran verankert sind (Bjorkoy et al., 2009). P62 bindet somit ubiquitinierte Proteine und Proteinaggregate, und leitet diese ubiquitinierte Fracht durch die Interaktion über die LIR der Autophagozytose zu (Pankiv et al., 2007).

Die beschriebenen Befunde zeigen, dass p62 an dem Gleichgewicht von Autophagozytose und dem UPS als Mediator agiert und bei einem Ungleichgewicht der beiden Abbauewege einerseits überschüssige und fehlerhafte Proteine aggregiert und andererseits vermutlich die Zulieferung zu dem jeweils anderen Abbaueweg unterstützt. Die Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung von p62 in der Proteindegradation.

Das Protein p62 selbst wird ausschließlich über die selektive Autophagozytose degradiert (Ichimura et al., 2008). Für diesen Prozess ist die Bindung an LC3 essentiell.

Zusätzlich zu p62 existiert noch mindestens ein weiteres *Cargo*-Protein, das NBR1 (*Neighbour of BCR1 Gene*), welches Substrate der selektiven Autophagozytose zuführen kann (Johansen und Lamark, 2011). Ein Vergleich der Domänenstruktur zeigt, dass NBR1, wie p62, eine N-terminale PB1-Domäne aufweist, über die es mit p62 interagieren kann. C-terminal besitzt NBR1 eine LC3- und eine Ubiquitin-Bindedomäne. Zusätzlich kann auch NBR1 mit sich selbst interagieren und auf diesem Weg die Aggregatbildung induzieren (Lamark et al., 2009).

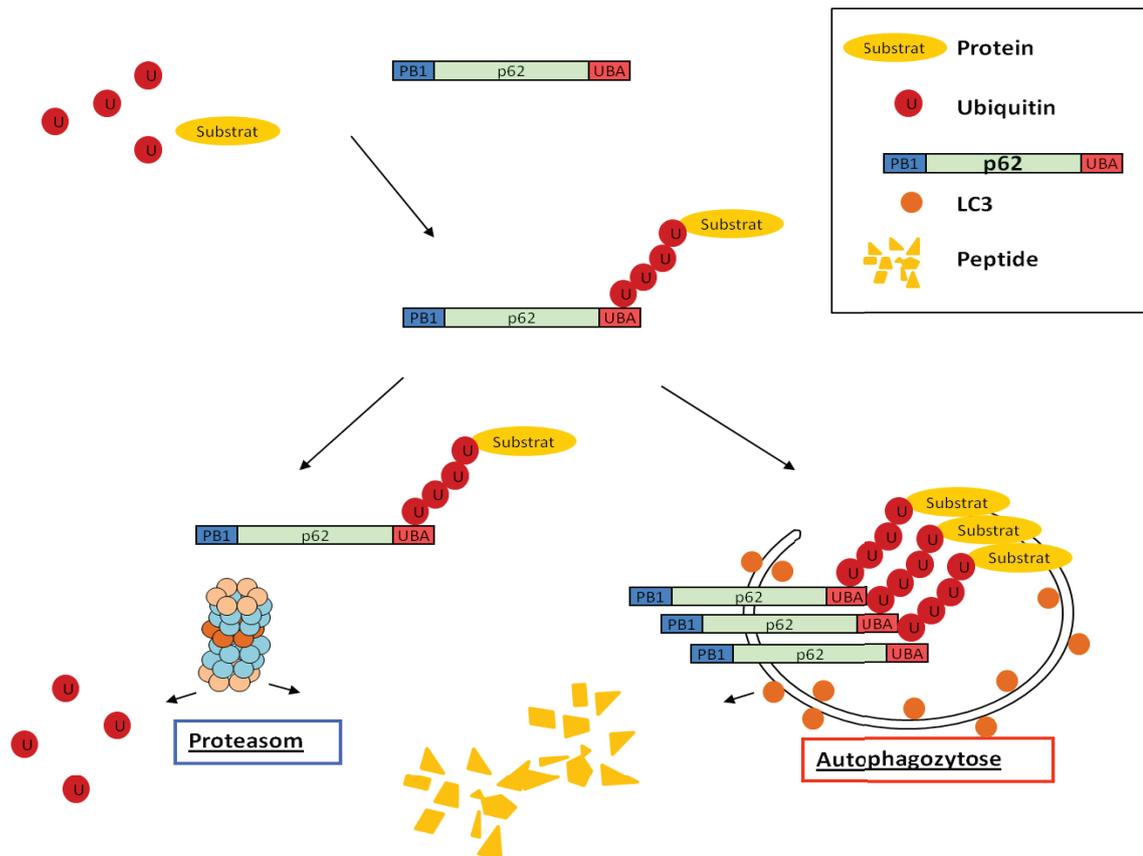


Abb. 6: p62 in der Proteindegradation. Das Protein p62 ist in der Lage über seine C-terminale UBA ubiquitinierte Proteine zu binden. N-terminal bindet p62 einerseits an das Proteasom, andererseits kann es mit sich selbst interagieren und auf diese Weise Aggregate ausbilden. Durch die Interaktion mit LC3 kann p62 als Adaptermolekül für die Autophagozytose fungieren. Indem es ubiquitinierte Proteine mit dem Autophagozytosemembran-ständigen LC3 verbindet, wird es mit dem Substrat und LC3 durch das Phagophor eingeschlossen und degradiert.

2.3.3 Die Rolle von p62 im NF- κ B-Signalweg

Bei NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) handelt es sich um einen Sammelbegriff für Transkriptionsfaktoren, die ein bestimmtes DNA-Motiv erkennen und binden. Diese Transkriptionsfaktoren liegen in der Regel aggregiert im Zytoplasma vor und werden durch die Interaktion mit inhibitorischen Proteinen ($I\kappa$ Bs, *inhibitors of κ B*) an dem Eintritt in den Zellkern gehindert. Durch den proteolytischen Abbau dieser Inhibitoren kann NF- κ B in den Zellkern eintreten und eine Kaskade unterschiedlicher Gene aktivieren (Karin und Ben-Neriah, 2000). Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt unter anderem als Antwort auf proinflammatorische Cytokine, wie TNF α (Tumornekrosefaktor- α) und Interleukin-1 (IL-1), bakterielle oder virale Infektionen, sowie physikalischen und chemischen Stress (Siebenlist 1994). Durch diese Induktion wird $I\kappa$ B

zunächst durch IKK (I κ B-Kinase-Komplex) phosphoryliert und in Folge dessen polyubiquitiniert, was zu einem schnellen und effektiven Abbau über das 26S-Proteasom führt (Karin und Ben-Neriah, 2000).

P62 spielt im Rahmen der Antwort auf neurotrophe Faktoren bei der Aktivierung von NF- κ B eine Rolle. So ist beispielsweise die NGF (*nerve growth factor*) induzierte Aktivierung von NF- κ B und die damit verbundene neuronale Differenzierung abhängig von dem Expressionslevel von p62 in Zusammenhang mit der Aktivität von IKKs welche I κ B inaktivieren und somit eine Aktivierung von NF- κ B auslösen (Wooten et al., 2001). Des Weiteren ist p62 wichtig für die Antwort auf die Induktion von NF- κ B durch inflammatorische Cytokine wie IL-1 (Sanz et al., 2000) oder TNF- α , wobei p62 einen Komplex mit RIP (*receptor interaction protein*) und aPKC bildet, der für die TNF- α -induzierte NF- κ B-Aktivierung notwendig ist (Sanz et al., 1999). Zudem wurde gezeigt, dass p62 in Autophagozytose-defizienten Tumorzellen vermehrt vorliegt und die Tumorgenese durch die Aktivierung von NF- κ B begünstigt (Mathew et al., 2009).

Das Protein p62 ist in der Lage mit der Ubiquitin E3 Ligase TRAF6 zu interagieren. TRAF6 ist unter anderem bekannt durch seine Rolle in der Osteoklastogenese. Osteoklasten sind Zellen, die am Knochenaufbau und -umbau beteiligt sind. Die Funktion von TRAF6 in der Osteoklastogenese wird über den Rezeptor RANK (*receptor activator of NF- κ B*), der durch RANK-L (RANK-Ligand) aktiviert wird, gesteuert. TRAF6 bindet den aktivierten Rezeptor und rekrutiert über die Bindung von p62 aPKC zu dem Rezeptor. Die Rolle von TRAF6 und RANK/RANK-L wurde in Studien mit entsprechenden *Knockout*-Mäusen gezeigt, bei denen es zu einer Störung des Knochenumbaus kommt (Boyle et al., 2003; Teitelbaum und Ross, 2003). Über dies ist p62 in der Lage, mit MEKK3 (*mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 3*) zu interagieren und sie in zytosolischen Aggregaten zu binden. P62 formt durch die gleichzeitige Bindung von TRAF6 und MEKK3 einen Komplex, der mit der Aktivierung von NF- κ B in Verbindung steht. Die IL-1 bedingte Induktion von NF- κ B durch MEKK3 und die MEKK3-TRAF6-Beziehung sind p62-abhängig (Nakamura et al., 2010).

Das Protein RIP kann durch die Stimulation von TNF α über das Brückenprotein TRADD (*TNF receptor type 1-associated death domain protein*) an den TNF-Rezeptor binden, was zu einer Aktivierung von NF- κ B führt. Dieses gilt nicht für die Aktivierung mit LPS

(Lipopolysacchariden) oder IL-1 (Kelliher et al., 1998). RIP bindet seinerseits TRAF2 und p62 unabhängig voneinander. Dieser Komplex führt im Weiteren zu einer Rekrutierung von aPKC. Hierdurch ist eine Phosphorylierung von IKK, damit die Degradation von I κ B und in Folge dessen die Aktivierung von NF- κ B möglich (Sanz et al., 1999).

Zusammenfassend lässt sich folgendes vereinfachtes Modell für die Rolle des Proteins p62 in der Regulation des NF- κ B-Signallings beschreiben (siehe auch Abbildung 7): p62 dient als Gerüstprotein und verbindet unterschiedliche Proteine, die eine essentielle Rolle in der Aktivierung des NF- κ B-Signalweges spielen. Die Aktivierung der Rezeptoren (z.B. RANK durch RANK-L und NGFR durch NGF) führt zur Bindung eines Komplexes von TRAF6, p62 und aPKC, was zur Phosphorylierung der IKK führt. Die phosphorylierte IKK phosphoryliert ihrerseits I κ B, was zu einer Ubiquitinierung von I κ B führt, wodurch I κ B proteasomal abgebaut wird. Dadurch wird NF- κ B freigesetzt, gelangt in den Kern, und aktiviert zelltypspezifisch verschiedene Gene. Das Prinzip der Aktivierung von NF- κ B durch TNF- α ist ähnlich, erfolgt aber unabhängig von TRAF6 über die Interaktion von p62 mit RIP1. Einige Rezeptorkomplexe stehen mit weiteren Proteinen, wie beispielsweise MEKK3, in Verbindung (in der Abbildung 7 nicht dargestellten).

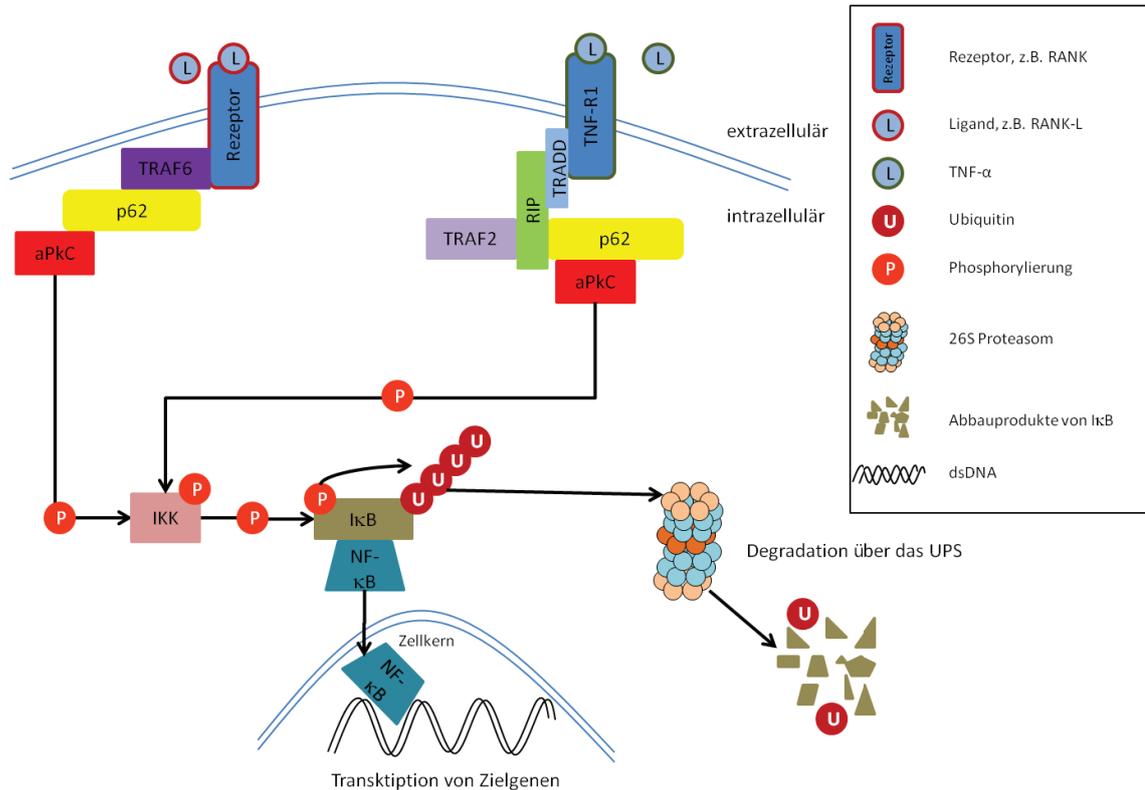


Abb. 7: p62 bei der NF-κB Aktivierung. P62 interagiert über TRAF6 oder RIP mit aktivierten Rezeptoren. Über p62 wird aPKC zu diesem Komplex rekrutiert. aPKC phosphoryliert als Antwort auf die Bindung eines Rezeptor-Liganden IKK. IKK kann dann wiederum IκB phosphorylieren, welcher NF-κB im Komplex inaktiviert. Die IκB-Phosphorylierung dient als Signal für die IκB Ubiquitinierung, was zum Abbau dieses Proteins führt. Dadurch liegt NF-κB frei vor, wandert in den Zellkern und aktiviert die Transkription spezieller Zielgene.

Im Rahmen der Osteoklastogenese ist die Rolle von TRAF6 und p62 besonders gut untersucht. Es wurde gezeigt, dass TRAF6 durch die Bindung des RANK-Liganden an RANK eine gesteigerte Ubiquitinierung von TRAF6 auslöst, die die Osteoklastogenese begünstigt. Das Protein CYLD ist ein deubiquitinierendes Enzym (Reiley et al., 2005), welches TRAF6 als Substrat erkennt (Wooten et al., 2008) und so eine Reduktion des RANK-Signals hervorruft. P62 und CYLD interagieren direkt miteinander, so dass ein regulatorischer Komplex mit TRAF6 gebildet werden kann, der die Osteoklastogenese steuert (Jin et al., 2008). Durch die starke Expression von CYLD in der RANKL-induzierten Osteoklastogenese handelt es sich hierbei vermutlich um ein NF-κB-Zielgen, welches als Feedback auf die Osteoklastogenese exprimiert wird und diese in späteren Stadien inhibiert (Jin et al., 2008).

2.3.4 P62 in der Tumorgenese

Während der Tumorgenese kommt es einerseits zu einer Hochregulation von Autophagozytose-assoziierten Genen, wie z.B. Beclin, was vermutlich auf Zellstress durch schnelles Wachstum und damit verbundene Hungerphasen zurückzuführen ist. Andererseits begünstigt die molekularbiologische Reduktion der Autophagozytose das Tumorwachstum (Mathew et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von p62 zu einer gesteigerten (Mathew et al., 2009) und die genetische Inaktivierung von p62 zu einer geminderten Tumorgenese führt (Duran et al., 2008). Durch die NF- κ B-Aktivierung in Tumorzellen werden unter anderem Gene aktiviert, die vor Sauerstoffradikalen (ROS, *reactive oxygen species*) schützen und so das Tumorwachstum unterstützen. Durch die Inaktivierung von p62 wird diese Kaskade unterbrochen und es fallen vermehrt ROS in Zelle an, die eine Zellschädigung auslösen (Moscat und Diaz-Meco, 2009). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Autophagozytose-inhibierte Zellen auf Stress mit einer gesteigerten p62-Expression reagieren, was die Wahrscheinlichkeit für Aneuploidie erhöht; der Mechanismus des Einflusses von p62 auf die Genominstabilität ist bislang ungeklärt (Mathew et al., 2009). Mathew et al. hat eine Korrelation von p62-Überexpression und Reduktion des NF- κ B gezeigt, wohingegen Duran et al. 2008 publiziert hat, dass der Verlust von p62 zu einer Reduktion im NF- κ B-Signalweges führt. Diese Diskrepanz kann in den unterschiedlichen Modellsystemen für die Tumorgenese begründet sein. In jedem Fall könnte p62 ein neues Zielprotein der Therapie bestimmter Krebsarten werden (Moscat und Diaz-Meco, 2009). Erste Studien zur Behandlung von Tumoren im Zusammenhang mit p62 wurden bereits publiziert. Beispielsweise können Tumorzellen von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie *in vitro* mit dem Mittel Reveratrol behandelt werden, welches zu einer Steigerung der Autophagozytose, zur Akkumulation von p62 und letzten Endes zum Tod der Tumorzelle führt (Puissant et al., 2010). Die genauen Mechanismen von Autophagozytose-Inhibitoren und -Induktoren auf die negative Regulation des Tumorwachstums sind bisher jedoch weitgehend ungeklärt.

2.3.5 Die Rolle von p62 bei der Erkrankung Morbus Paget

Morbus Paget (PDB, *Paget's disease of bones*), auch Osteodystrophia deformans genannt, ist eine Stoffwechselerkrankung des Knochens. Sie tritt meist in späteren Lebensabschnitten in einer spontanen und einer familiären Form auf und ist auf einige Teile des Skeletts beschränkt. Zunächst werden Osteoklasten aktiviert, die in hohem Maße Knochen abbauen. Im Weiteren wird wieder neuer Knochen durch Osteoblasten aufgebaut. Dieses geschieht jedoch unkontrolliert, in zu hohem Maße und in einer instabilen Architektur. Die gesteigerte Osteoklastogenese ist vermutlich auf eine erhöhte NF- κ B-Aktivität zurückzuführen. Es sind bislang 20 Mutationen der UBA-Region des p62 Gens bekannt, die mit PDB in Verbindung gebracht werden (Goode und Layfield, 2010). Jedoch sind bei PDB-Patienten zusätzlich Mutationen gefunden worden, die außerhalb der UBA-Region liegen, bei denen auch die Ubiquitin-Bindekapazität in *in vitro* Studien nicht beeinträchtigt ist (Rea et al., 2009). Unabhängig von der Region der Mutation ist jedoch bei allen Patienten die NF- κ B-Signaltransduktion gestört. Das Enzym CYLD deubiquitiniert TRAF6 abhängig von p62 und reguliert auf diese Weise den RANK-NF- κ B-Signalweg negativ (Jin et al., 2008) (siehe auch 2.3.3 Die Rolle von p62 im NF- κ B-Signalweg). Erste Studien zeigen, dass sich einige der PDB-assoziierten Mutationen von p62 auf das Bindeverhalten zu CYLD auswirken (Goode und Layfield, 2010).

2.3.6 Die Rolle von p62 bei neurodegenerativen Erkrankungen

Bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen kommt es zur Ablagerung von Proteinaggregaten in den Neuronen, was zum Absterben der Zellen führt. Hierzu gehören Morbus Parkinson und Morbus Huntington, bei denen ubiquitinierte Proteinaggregate und eine Störung der Autophagozytose Anlass zu der Vermutung geben, dass ein veränderter Abbau von defekten Organellen und ubiquitinierten Proteinen als Ursache für die Entstehung der Krankheit gelten (Rubinsztein, 2006; Rubinsztein et al., 2007). Altersbedingte Ablagerungen von Proteinaggregaten im Zentralen Nervensystem (ZNS) der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* konnten durch die Stimulation der Autophagozytose (Überexpression von LC3) verringert werden, wodurch sich die Lebenszeit der Fliegen um durchschnittlich 56 % verlängert (Simonsen et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass diese Proteinaggregate im ZNS der Fruchtfliege mit dem Drosophila-Homolog für p62 colokalisieren (Nezis et al., 2008). Bei Morbus Parkinson wurden p62-positive α -Synuclein-

Aggregate (Kuusisto et al., 2003), bei Morbus Huntington p62-positive Huntingtin-Aggregate (Filimonenko et al., 2007), bei Morbus Alzheimer p62-positive NFTs (*neurofibrillary tangles*) (Kuusisto et al., 2002) und bei der *Argyrophilic grain disease* (Demenz-Form) p62-positive *Argyrophilic grains* (tau-haltige Aggregate) (Scott und Lowe, 2007) gefunden. Die Möglichkeit Proteine mit Hilfe des Proteins p62 und Ubiquitin zu aggregieren dient der Zelle allerdings in der Regel als Hilfsmechanismus zur Inaktivierung schädlicher Proteinen. Fällt eine zu große Menge dieser Aggregate an, kann es jedoch zum Absterben der Zelle kommen. Der Abbau von p62-positiven Aggregaten erfolgt in der Regel über den Prozess der Autophagozytose. Die gezeigte Beteiligung von p62 bei neurodegenerativen Erkrankungen verdeutlicht, dass eine Stimulation der Autophagozytose als Ziel einer Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen denkbar wäre.

Zusätzlich spielt p62 eine Rolle bei der NF- κ B-Antwort auf NGF (siehe 2.3.3 Die Rolle von p62 im NF- κ B-Signalweg) und bei der Rezeptorinternalisierung der Neurotrophinrezeptorfamilie Trk (*tropomyosin-related kinase*). Das Protein p62 ist in der Lage, mit allen drei bekannten Trks (A, B und C) zu interagieren und diese als Antwort auf NGF zu internalisieren. Im Anschluss kommt es zu einer Signalkaskade, die ERK5 aktiviert, jedoch keinen Einfluss auf die MAP-Kinasen (*mitogen activated kinases*) ERK1 und ERK2 hat (siehe Abbildung 8). Die Internalisierung ist abhängig von der Interaktion von TRAF6 mit p62 (Geetha und Wooten, 2003).

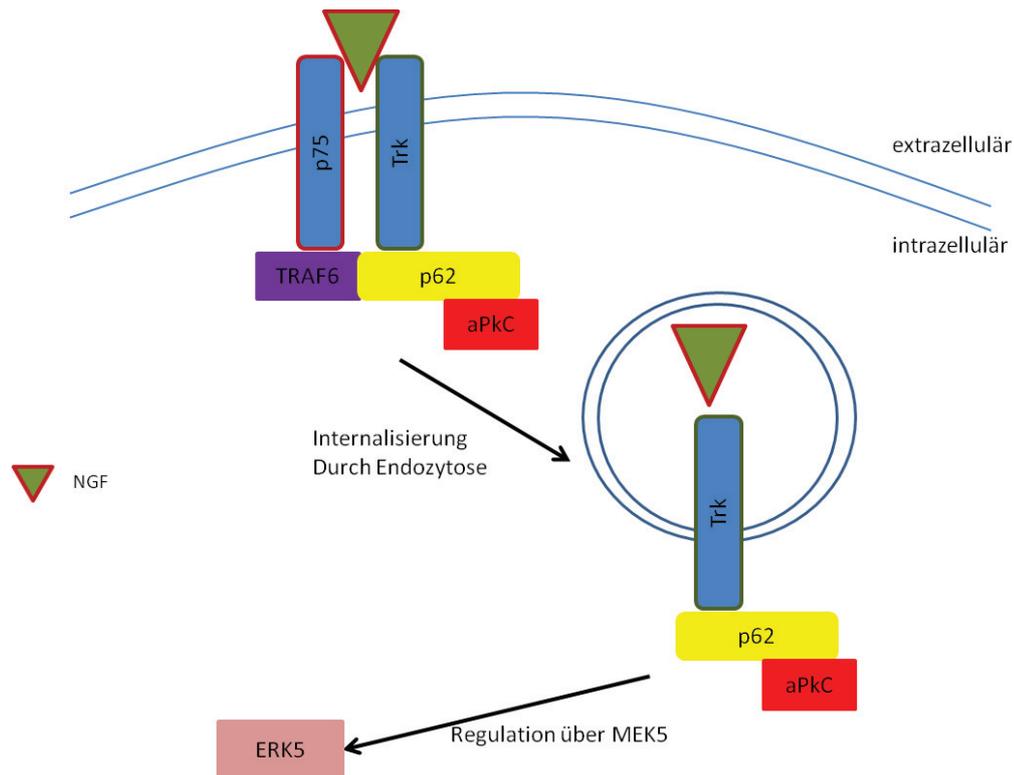


Abb. 8: p62 bei der Rezeptorinternalisierung nach NGF-Stimulation. (nach (Geetha und Wooten, 2003)) Bindet NGF an den Rezeptorkomplex aus p75 und Trk, bindet TRAF6 p75 und p62 Trk und wiederum TRAF6 p62. Zusätzlich wird aPKC über p62 zu dem Komplex rekrutiert und es kommt zur Rezeptorinternalisierung. Als Folge dessen wird ERK5 über MEK5 aktiviert.

2.4 Die p62-knockout-Mäuse

Die Erstveröffentlichungen von zwei verschiedenen Mauslinien, denen das komplette p62-Gen fehlt, wurden in den Jahren 2004 und 2007 publiziert.

Die eine Mauslinie wurde von der Arbeitsgruppe von Jorge Moscat hergestellt. Der Verlust des Proteins p62 wurde bei dieser Mauslinie durch das Einfügen einer Genkassette in das Exon 1 des p62-Gens hervorgerufen, und mittels Western- und Southern Blot konnte ein vollständiger *Knockout* gezeigt werden (Duran et al., 2004). Bei dieser p62^{-/-}-Mauslinie wurde zunächst die Osteoklastogenese untersucht. In *in vitro*-Studien wurde festgestellt, dass Zellen aus der p62^{-/-}-Maus eine gesteigerte Osteoklastogenese nach RANK-Stimulation aufweisen (Duran et al., 2004). Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die p62^{-/-}-Mauslinie einen adipösen Phänotyp, einhergehend mit einer gesteigerten Adipogenese, aufweist (Rodriguez et al., 2006). Der komplette Verlust von p62 führt zu einer gesteigerten Insulin- und Glukoseintoleranz. Als Mechanismus wird eine gesteigerte

ERK-Aktivität während der Adipogenese vermutet. Sie wird durch das Fehlen der ERK-p62-Interaktion induziert (Rodriguez et al., 2006). Diese Vermutung konnte durch das Kreuzen der p62^{-/-}-Maus mit einer ERK1-defizienten Mauslinie gestützt werden, die keinen adipösen Phänotyp und keine Insulinresistenz im Alter aufweist (Lee et al., 2010). Im Rahmen von *in vitro*-Studien mit Zellen der p62^{-/-}-Mauslinie konnte gezeigt werden, dass p62 einen Einfluss auf die späte T-Zell-Differenzierung hat, welche durch die Akkumulation des T-Zell-Rezeptors (TCR, *T-cell-receptor*) ausgelöst wird, ohne jedoch Einfluss auf das Expressions- und Aktivitätsniveau von ERK1 und AKT zu haben (Martin et al., 2006). In Gehirnen von 6 Monate alten p62^{-/-}-Mäusen wurden Ablagerung des K63-Ubiquitin positiven, hyperphosphorylierten Proteins Tau gefunden, da das Tau nicht durch p62 zu einem der Abbauege geleitet werden kann. Diese Aggregate führen zu einer verschlechterten Merkfähigkeit der Mäuse (Ramesh Babu 2008). Die p62^{-/-}-Maus zeigt zudem eine geringe Anfälligkeit für Lungentumore, die durch das Onkogen RAS-induziert (*Rat-Sarcoma*) werden. Begründet wird dieser Befund dadurch, dass die Ras-induzierte NF-κB Aktivierung durch das Fehlen des aPKC-Adapters p62 nicht erfolgt und die Tumorzellen nicht die überlebenswichtigen Zielgene aktivieren können (Duran et al., 2008).

Die zweite p62 defiziente Maus wurde von der Arbeitsgruppe um Tatsuro Ishii konstruiert. Diese japanische Gruppe entfernte die Exons 1 bis 4 des Proteins p62 um einen *Knockout* des Gens sicher zu stellen. Die Untersuchungen an dieser Mauslinie ergaben - im Gegensatz zu den Untersuchungen der Arbeitsgruppe Moscat - eine verringerte Anzahl an Ubiquitin-positiven Aggregaten in Leber und Gehirn. Im Vergleich hierzu wurden bei Tiere mit einem Defekt in der Autophagozytose eine signifikant erhöhte Anzahl dieser Aggregate gefunden (Komatsu et al., 2007). Für diese p62^{-/-}-Mauslinie wurde jedoch auch ein altersabhängiger adipöser Phänotyp mit Insulinresistenz und Leberverfettung beschrieben, der durch die Gabe von Acarbose, einem α-Glucosidase-Inhibitor mit präventiver Wirkung bei Diabetes Mellitus TYP 2, reduziert werden konnte (Okada et al., 2009). Anhand von MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) dieser p62^{-/-}- und einer NBR1^{-/-}-Maus konnte gezeigt werden, dass NBR1 und p62 unabhängig voneinander als Adaptermoleküle der Proteindegradation fungieren können (Kirkin et al., 2009). In Gefäßen der p62-defizienten Mäuse wurde eine gesteigerte Proliferation von *Smooth muscle cells* (glatte Muskel Zellen) nach vaskulärer Schädigung gezeigt (Sugimoto et al., 2010). Zudem ergaben

Untersuchungen der p62-defizienten Mauslinie, dass Gewebe und Härchen der Innenohrschnecke durch das Protein p62 vor den Folgen von akustischem Stress geschützt werden (Tabuchi et al., 2010).

Für die meisten phänotypischen Merkmale der p62-*knockout* Mäuse gibt es keine sicheren Aussagen über die molekularen Mechanismen, die dem Phänotyp zugrunde liegen. P62 spielt in verschiedenen Geweben bedeutende, aber divergierende Rollen, die jeweils einzeln untersucht werden müssen. Dieses liegt an der Komplexität der Mechanismen, die durch das Protein p62 beeinflusst werden und an der Fülle direkter und indirekter (z.B. über Ubiquitin) Interaktionspartner dieses Proteins.

2.5 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit wird eine bislang unpublizierte und nicht charakterisierte Variante der p62-*knockout*-Maus untersucht. Die Mauslinie wurde von der Arbeitsgruppe um André Gessner (Universitätsklinikum Erlangen, Abteilung für Infektionsbiologie) hergestellt. Aufgrund der Klonierungsstrategie fehlen dieser Maus lediglich die Aminosäuren 69 bis 251, der Rest des Proteins wird exprimiert (siehe 5. Ergebnisteil, im Weiteren p62^{Δ69-251}-Maus). Ziel dieser Arbeit ist die genetische und phänotypische Charakterisierung der p62^{Δ69-251}-Mauslinie. Zusätzlich soll das trunkierte Protein biochemisch analysiert werden. Zellbiologische Untersuchungen sollen Aufschluss über die Entkopplung der Proteindegradations- und der Signaltransduktionsfunktion des Proteins p62 geben.

3 Material

3.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller
Autoklav	Varioclav	H+P Labortechnik AG Oberschleißheim, Deutschland
Blutdruckmessung bei Mäusen	CODA™ non invasive Blood pressure	Kent Scientific cooperation Torrington, Connecticut, USA
Blutzucker Teststreifen	Accu Check Aviva Teststreifen	Roche Basel, Schweiz
Blutzucker-Messgerät	Accu Check Aviva	Roche Basel, Schweiz
Brutschränke	B5050	Heraeus Hanau, Deutschland
Edelstahl-Pistill	LLG-Mikropistill, Edelstahl	Behrens
Eismaschine	Ziegra ZBE 70-35	Ziegra Eismaschinen Isernhagen, Deutschland
Elektrophoresekammern, Agarose	Model B1	Peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen, Deutschland
Elektrophoresekammern, PAA-Gele	Novex Mini-Cell	Invitrogen Carlsbad, USA
ELISA-Reader Proteinbestimmung	Multiskan EX	Thermo Fisher Scientific Schwerte, Deutschland
ELISA-Reader	Infinite M200	Tecan Group Ltd.

Autophagozytose-Assay		Männedorf, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop	AXIOVERT 100	Carl Zeiss AG Jena, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop mit Apotomtechnik	Observer.Z1	Carl Zeiss AG Jena, Deutschland
Geldokumentationssystem, Ethidiumbromid	Lumi-Imager F1	Roche Basel, Schweiz
Gewebehomogenisator nach Dounce	432-1272	VWR
Inkubatorschränke, Zellkultur	Heracll 240	Heraeus Hanau, Deutschland
Mauskäfige	Tecniplast®	VWR
PCR-Gerät	GeneAmp PCR-System 2700	Applied Biosystems Foster City, USA
Phasenkontrastmikroskop	AXIOVERT 20	Carl Zeiss AG Jena, Deutschland
pH-Meter	Consort C864	Lab EX Orange Grove, Südafrika
Photometer	Smart Spec™	BioRad Berkeley, USA
Reinstwasseranlage	Ultra Clear	SG Wasseraufbereitung und Regeneration GmbH
Röntgenentwickler	Optimax X-Ray Film Processor	PROTEC Medizintechnik Stuttgart, Deutschland
Rotationsinkubator	PTR-30	Eppendorf Hamburg, Deutschland

Schüttelinkubator	Certomar IS	B. Braun Biotech International Melsungen, Deutschland
Spannungsquelle	Power Pac HC™	BioRad Laboratories, Inc. Berkeley, USA
Stahlrahmen zum Einspannen von Siebgewebe	Mesh No.270	RETSCH Haan, Deutschland
Sterilwerkbank	HERAsafe	Heraeus Hanau, Deutschland
Thermostat	Thermomixer comfort	Epperndorf Hamburg, Deutschland
UV-Tisch (Transilluminator)	IL-200-M	H. Saur Laborbedarf Reutlingen, Deutschland
Vortexer	VortexGenie2	Scientific Industries, Inc. New York, USA
Western Blot Apparatur Semi Dry	Semidry Transercell	BioRad Laboratories, Inc. Berkeley, USA
Western Blot Apparatur Tank	Mini Trans-Blot® Cell	BioRad Laboratories, Inc. Berkeley, USA
Western Blot-Dokumentationssystem	FluorChem® FC2	Alpha Innotech Santa Clara, CA, USA
Zentrifugen	Mikro 200 R Allegra™X-22R	Hettich Tuttlingen, Deutschland Beckmann Pasadena, USA

	Multifuge 3S-R	Heraeus Hanau, Deutschland
--	----------------	-------------------------------

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Blotting Papier	Whatman (Schleicher & Schüll)
Deckgläschen	Diagonal
ECL-Filme	FUJIFILM Super RX
Flexi-Strip Schaber	BiWeX
Gewebehomogenisator im Rundkolben	VWR
Glasperlen	Roth
Handschuhe	Hartmann
Ibidi μ -Dish ^{35mm,low}	Ibidi
Kanülen	BD Falcon
Kryo-Röhrchen	Nunc
Kulturröhrchen, Bakterien	Sarstedt
Küvetten	Sarstedt
Mikrotiterplatten (96 well)	Sarstedt
Objektträger	VWR
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Petrischalen für Mikrobiologie	Greiner
Pipettenspitzen	Sarstedt
Plastikwaren für die Zellkultur	BD Falcon
PVDF-Immobilon Membran (0,45 μ m)	Millipore
Reaktionsgefäße 0,5-2,0 ml	Eppendorf, Roth

Siebgewebe aus Polyester	Reichert Chemietechnik
Skalpelle	Feather
Spritzen	BD Falcon
Sterilfilter	Millipore
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Falcon

3.3 Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
1 kb DNA <i>ladder</i>	Promega
100 bp DNA <i>ladder</i>	Promega
2-Propanol	Roth
6 x Loading Dye Solution	MBI Fermentas
Agar	Roth
Agarose	Roth
Alexa Fluor 594 Phalloidin	Molecular Probes
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Roth
Ammoniumper(oxodi)sulfat (APS) ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Applichem
Bacto™-Trypton	Difco
Bafilomycin A	ALEXIS
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich
Chloroquin	Sigma-Aldrich
Collagenase A	Roche
Coomassie brilliant blue R-250	Sigma-Aldrich

DAPI	Invitrogen Molecular Porbes
D-Glucos Monohydrat ($C_6H_{12}O_6 \times H_2O$)	AppliChem
Dimethylsulfoxid (DMSO) (C_2H_6OS)	Sigma-Aldrich
Dispase II	Roche
Dithio-1,4-threitol (DTT) ($C_4H_{10}O_2S_2$)	Sigma-Aldrich
DMEM (+L-Glutamin, + high Glucose)	Gibco
dNTPs	Promega
Essigsäure ($C_2H_4O_2$)	Chemsolute, TH Geyer
Ethanol (C_2H_6O)	Roth
Ethidiumbromid ($C_{21}H_{20}BrN_3$)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)	Sigma-Aldrich
FCS	BioChrom AG
Formaldehyd, 37 % (CH_2O)	Sigma-Aldrich
Gelatine	Roth
Glasperlen	Roth
Glutar(di)aldehyd	Sigma-Aldrich
Glutharaldehyd	Merck
Gluthation Sepharose	GE Healthcare (Amersham Bioscience)
Glycerin (Glycerol) ($C_3H_8O_3$)	Roth
Glycin ($C_2H_5NO_2$)	AppliChem
Hämatoxylin	Merck
HEBS	Apotheke UKM
Hefeextrakt	Difco
HEPES (1M)	PAA
Insulin-Transferin-Natrium-Selenit	Roche
Isopropanol	TH Geyer

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich
Kanamycin	AppliChem
Ketamin	Ceva
Kollagen A (1mg/ml)	Biochrom
L-Arabinose	Sigma-Aldrich
LB-Broth	Sigma-Aldrich
LB-Broth Powder	Sigma-Aldrich
Lumi-Light	Roche
Magermilchpulver	Applichem
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Merck
MDC (Monodansylcadaverin)	Sigma-Aldrich
Methanol	Chemsolute, TH Geyer
Mg132	Enzo Lifesciences
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Na-MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Roche
Natriumacetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)	Merck
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Sigma-Aldrich
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich
Natriumthiosulfat-Pentahydrat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$)	Roth
Natrumchlorid (NaCl)	AppliChem
nicht essentielle Aminosäuren	Bio Whittaker
Normal goat serum	Dianova
Oil Red O	Roth
Oligo-dtPrimer	Promega

Page Ruler Plus	Fermentas
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
PBS, 1x, steril	PAA
PEG 4000	Roth
Penicillin/Streptomycin	PAA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich
PMSF	AppliChem
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Complete	Roche
Rapamycin	Sigma-Aldrich
RPMI 1640	PAA
Salzsäure (HCl)	Chemsolute, TH Geyer
Silbernitrat (AgNO ₃)	Roth
β-Mercaptoethanol	AppliChem
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Sucrose	Roth
TBHP	Invitrogen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-Base)	Roth
TritonX-100	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA	PAA
Tween 20	AppliChem
Ubiquitin-Agarose	Sigma-Aldrich
Wasser, RNase frei	AppliChem
Xylazin	Ceva
γ-Interferon	Roche

3.4 Kits

Tabelle 4: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
DNA-Isolation für Genotypisierung <i>DNeasy Blood and tissue</i>	QUIAGEN
Gelaufreinigung <i>Wizard SV Gel and PCR Clean up</i>	Promega
Plasmid Maxipräparation <i>PureLink™ HiPure Maxiprep</i>	Invitrogen
Plasmid Minipräparation <i>Zyppi™ Plasmid Miniprep</i>	Zymo Research
Proteinbestimmung <i>Pierce BCA™ (Bicinchoninic acid) Protein Assay</i>	Thermo Fisher Scientific
RNA-Isolation <i>Quick-RNA™ MiniPrep</i>	Zymo Research
ROS-Aktivität <i>Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Kit</i>	Invitrogen
<i>ViraPower™ Lentiviral Expression System</i>	Invitrogen

3.5 Puffer, Medien und Lösungen

Für die Herstellung von Lösungen und Medien wird Reinstwasser genutzt. Lösungen für Mikrobiologie und Zellkultur werden autoklaviert (121°C, 30 Minuten) oder steril filtriert (Porengröße: 22 µm).

Tabelle 5: Verwendete Puffer, Medien und Lösungen mit Rezeptur

Puffer	Zusammensetzung
10 x PBS	0,038 M NaH ₂ PO ₄ 0,162 M Na ₂ HPO ₄ 1,5 M NaCl ad H ₂ O pH 7,4
Antikörperlösung IF	98 % (v/v) Waschpuffer IF 2 % (v/v) Normal goat serum (NGS)
Blocking Lösung IF	90 % (v/v) Waschpuffer IF 10 % (v/v) Normal goat serum (NGS)
Coomassie-Lösung	0,6 % (w/v) Coomassie brilliant blue 10 % (v/v) Essigsäure ad H ₂ O
Entfärbelösung für Coomassie	7 % (v/v) Essigsäure 5 % (v/v) Ethanol ad H ₂ O
Eri-Lyse-Puffer	8,26 g Ammoniumchlorid 1 g Kaliumhydrogencarbonat 0,037 g Na ₂ EDTA x H ₂ O ad 1000 ml H ₂ O

Fett-Puffer	<p>50 mM Tris-HCl (Stammlösung 1 M, pH 7,4)</p> <p>0,2 % (w/v) SDS</p> <p>1 mM EDTA</p> <p>0,2 % (w/v) Natrium-Deoxycholat</p> <p>1 % (v/v) TritonX-100</p> <p>ad H₂O</p>
IP-Puffer	<p>20 mM Tris-HCl (Stammlösung 1 M, pH 7,4)</p> <p>20 mM NaCl</p> <p>1 mM EDTA</p> <p>50 mM NaF</p> <p>15 mM Na₄P₂O₇</p> <p>1 % (v/v) TritonX-100</p> <p>ad H₂O</p>
Laufpuffer (Western Blot)	<p>25 mM Tris</p> <p>0,05 % (w/v) SDS</p> <p>0,2 M Glycin</p> <p>ad H₂O</p>
LB-Agarplatten	<p>LB-Medium</p> <p>20 g/l Agar</p>
LB-Medium	<p>20 g/l LB-Broth</p> <p>ad H₂O</p>
Lysispuffer	<p>50 mM Tris</p> <p>100 mM NaCl</p> <p>1 mM EDTA</p>

	<p>1 % (v/v) Triton X-100</p> <p>pH 7,4</p>
Probenpuffer nach Lämmli	<p>20 % (v/v) Glycerol</p> <p>125 mM Tris-HCl pH6,8</p> <p>10 % (w/v) SDS</p> <p>0,2 % (w/v) Bromphenolblau</p> <p>5 % β-Mercaptoethanol</p> <p>ad H₂O</p>
RIPA-Puffer	<p>20 mM Tris-HCl (Stammlösung 1 M, pH 7,4)</p> <p>150 mM NaCl</p> <p>5 mM EDTA</p> <p>0,1 % (w/v) SDS</p> <p>0,1 % (w/v) Natrium-Deoxycholat</p> <p>1 % (v/v) TritonX-100</p> <p>ad H₂O</p>
Silberfärbung Fixierlösung	<p>10 % (v/v) Essigsäure</p> <p>30 % (v/v) Ethanol</p> <p>ad H₂O</p>
Silberfärbung Entwicklerlösung	<p>2,5 % Na₂CO₃</p> <p>0,0037 % CH₂O</p> <p>ad H₂O</p>
Silberfärbung Inkubationslösung	<p>0,2 % (w/v) Na₂S₂O₃ x 5 H₂O</p> <p>6,5 % (w/v) C₂H₃NaO₂</p> <p>0,5 % (v/v) Glutardialdehyd</p>

	<p>30 % (v/v) EtOH</p> <p>ad H₂O</p>
Silberfärbung Stopplösung	<p>1 % C₂H₅NO₂</p> <p>ad H₂O</p>
Silberfärbung Versilberung	<p>0,16 % AgNO₃</p> <p>0,0074 % CH₂O</p> <p>ad H₂O</p>
TAE-Puffer	<p>40 mM Tris-HCl</p> <p>1 mM EDTA-Na₂-Salz</p> <p>40 mM Essigsäure</p> <p>ad H₂O</p> <p>pH 8,2</p>
TBS	<p>50 mM Tris</p> <p>150 mM NaCl</p> <p>ad 800 ml H₂O</p> <p>pH 7,5</p>
TBST	<p>10 mM Tris-HCl (Stammlösung 1 M, pH 7,4)</p> <p>150 mM NaCl</p> <p>0,05 % (v/v) Tween 20</p> <p>ad H₂O</p>
TfB1	<p>15 % (v/v) Glycerin</p> <p>10 mM CaCl₂</p> <p>100 mM KCl</p> <p>50 mM MnCl₂</p>

	<p>30 mM KOAc</p> <p>ad H₂O</p>
TfB2	<p>15 % (v/v) Glycerin</p> <p>75 mM CaCl₂</p> <p>10 mM KCl</p> <p>100 mM Na-MOPS</p> <p>ad H₂O</p> <p>pH 7,0</p>
Transfer Puffer (Western Blot)	<p>25 mM Tris (1 M Stammlösung pH 8,3)</p> <p>192 mM Glycin</p> <p>20 % (v/v) Methanol</p> <p>ad H₂O</p>
TYM-Medium	<p>2 % (w/v) BactoTM-Trypton</p> <p>0,5 % (w/v) Hefeextrakt</p> <p>10 mM MgSO₄</p> <p>100 mM NaCl</p>
Waschpuffer IF	<p>10 % (v/v) 10 x PBS</p> <p>0,2 % (w/v) Gelatine</p> <p>0,2 % (v/v) TritonX-100</p> <p>ad H₂O</p>

3.6 Enzyme

Tabelle 6: Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Go Taq DNA Polymerase	Promega
M-MLV Reverse Transkriptase und Zusätze	Promega
Pfu Turbo DNA Polymerase	Startogene
Proteinase K	Qiagen
Restriktionsendonukleasen und Zusätze	New England Biolabs
RNAse A	AppliChem
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas

3.7 Primer

Tabelle 7: Verwendete Primer

Primername	Sequenz
Genotypisierungsprimer p62 ^{Δ69-251} FW	TCA GGA AAT TGA CAT TGG GAT CTT
Genotypisierungsprimer p62 ^{Δ69-251} RV	AAC AAC TTA GAT GGA GCC TGA ATG
Genotypisierungsprimer p62 ^{wt} FW	AAT CCG GGG CTT CCT TCC TG
Genotypisierungsprimer p62 ^{wr} RV	GCC CTT CCC CTC GCA CAC G
Klonierungsprimer p62 FW	TGT TTC GTC CGT ACC TAG ACC G
Klonierungsprimer p62 RV	CGT GAT GCA ACT ACA AGA CAA AGG

3.8 Plasmide

Tabelle 8: Verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz
V180	Leervektor zur eukaryotischen Expression von 3xFlag- <i>getaggten</i> Proteinen	Tony Pawson, Toronto, Kanada
V180 mp62 ^{wt}	Expressionsvektor für das eukaryotische System, Expression von murinem p62 ^{wt} mit 3xFlag- <i>Tag</i>	Anja Hillmann, AG Pavenstädt, Münster
V180 mp62 ^{Δ69-251}	Expressionsvektor für das eukaryotische System, Expression von murinem p62 ^{Δ69-251} mit 3xFlag- <i>Tag</i>	Anja Hillmann, AG Pavenstädt, Münster
V180 mp62 ^{-Ex7b}	Expressionsvektor für das eukaryotische System, Expression von murinem p62 ^{-Ex7b} mit 3xFlag- <i>Tag</i>	Anja Hillmann, AG Pavenstädt, Münster
V180 mp62 ^{Δ69-251-Ex7b}	Expressionsvektor für das eukaryotische System, Expression von murinem p62 ^{Δ69-251-Ex7b} mit 3xFlag- <i>Tag</i>	Anja Hillmann, AG Pavenstädt, Münster
ERK1-GFP	Expressionsvektor für das Eukaryotische System, Expression von humanem ERK1 mit GFP- <i>Tag</i> , Vektor: pEGFP-C1 der Firma Clontech	Rony Segers, Rehovot, Israel
pQXCIP mCherry hp62 ^{wt}	Expressionsvektor für das eukaryotische System, Expression von humanem p62 ^{wt} mit 3xFlag- <i>Tag</i>	Anja Hillmann, AG Pavenstädt, Münster
HBT-ubi-EGFP	Vektor zur stabilen Expression im eukaryotischen System von Ubiquitin mit GFP-, His- und Biotin- <i>Tag</i>	Joachim Kremerskothen, Anja Hillmann, AG Pavenstädt, Münster
pENTR	Leervektor als Basis für	Invitrogen

	Klonierungen über das LR-Clonase-System	
pENTR mp62 ^{wt}	Grundlagenvektor zur Weiterklonierung des Inserts in andere Vektoren über die LR-Clonase oder die Restriktionsstellen Ascl/Pacl, enthält murines p62 ^{wt}	Anja Hillmann, AG Pavenstädt, Münster
pENTR mp62 ^{Δ69-251}	Grundlagenvektor zur Weiterklonierung des Inserts in andere Vektoren über die LR-Clonase oder die Restriktionsstellen Ascl/Pacl, enthält murines p62 ^{Δ69-251}	Anja Hillmann, AG Pavenstädt, Münster
pENTR mp62 ^{-Ex7b}	Grundlagenvektor zur Weiterklonierung des Inserts in andere Vektoren über die LR-Clonase oder die Restriktionsstellen Ascl/Pacl, enthält murines p62 ^{-Ex7b}	Anja Hillmann, AG Pavenstädt, Münster
pENTR mp62 ^{Δ69-251-Ex7b}	Grundlagenvektor zur Weiterklonierung des Inserts in andere Vektoren über die LR-Clonase oder die Restriktionsstellen Ascl/Pacl, enthält murines p62 ^{Δ69-251-Ex7b}	Anja Hillmann, AG Pavenstädt, Münster
HA p38	pMT3-Vektor zur Expression von HA-getagtem p38 in eukaryotischen Zellen	John Kyriakis, Boston, USA

3.9 Primäre Antikörper

Tabelle 9: Verwendete primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung WB	Verdünnung IF	Hersteller
AKT	Kaninchen	1:1000	-	Cell Signalling
aPKCzeta	Maus	1:1000	1:100	Invitrogen
Atg5	Kaninchen	1:1000	-	Cell Signalling
Atg7	Kaninchen	1:1000	-	Cell Signalling
Beclin	Kaninchen	1:1000	-	Cell Signalling
CD2AP	Kaninchen	1:1000	-	Cell Signalling
ERK 1/2	Kaaninchen	1:1000	1:100	Cell Signalling
Flag M2	Maus	1:5000	-	Sigma-Aldrich
GSK 3 β	Kaninchen	1:1000	-	Cell Signalling
LC3	Maus	1:500	1:50	Nanotools
P38	Kaninchen	1:1000	1:100	Cell Signalling
P62 C-term	Meerschweinchen	1:1000	1:100	Progen
Phalloidin/Aktin Alexxa 488 gekoppelt	-	-	1:1000	Invitrogen
Phospho GSK 3 β	Kaninchen	1:1000	-	Cell Signalling
Phospho p38	Kaninchen	1:1000	1:100	Cell Signalling
Phospho-AKT	Kaninchen	1:1000	-	Cell Signalling
Phospho-ERK 1/2	Kaninchen	1:1000	1:100	Cell Signalling
Raptor	Kaninchen	1:1000	-	Cell Signalling
β -Tubulin	Maus	1:1000	-	Sigma-Aldrich
Traf6	Kaninchen	1:1000	1:100	Abcam
Ubiquitinierte	Maus	1:1000	1:100	Enzo Lifesciences

Proteine FK2				
ZO-1	Maus	1:750	1:75	ZymedLaboratories
α -Actinin 4	Kaninchen	1:1000	1:100	Alexxis
HA-Tag	Maus	1:500	-	Invitrogen

3.10 Sekundäre Antikörper

Tabelle 10: Verwendete sekundäre Antikörper

Antigen	Spezies	Konjugat	Verdünnung WB	Verdünnung IF	Hersteller
Kaninchen IgG	Ziege	HRP	1:3000	-	Dianova
Kaninchen IgG	Ziege	Alexa Fluor 488	-	1:1000	Invitrogen
Kaninchen IgG	Ziege	Alexa Fluor 594	-	1:1000	Invitrogen
Maus IgG	Ziege	HRP	1:3000	-	Dianova
Maus IgG	Ziege	Alexa Fluor 488	-	1:1000	Invitrogen
Maus IgG	Ziege	Alexa Fluor 594	-	1:1000	Invitrogen
Meerschweinchen IgG	Esel	HRP	1:2500	-	Dianova
Meerschweinchen IgG	Esel	Alexa Fluor 488	-	1:1000	Invitrogen

3.11 Bakterienstämme

Tabelle 11: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21	$F^- ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B^- m_B^-)$	Invitrogen
DH5 α	$F^- \Phi 80 lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r_k^-, m_k^+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 \lambda^-$	Invitrogen
TOP10	$F^- mcr A\Delta (mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80 lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 galU galK \Delta(ara-leu)7697 rpsL (Str^R)endA1 nuG$	Invitrogen

4 Methoden

Die molekularbiologischen und gentechnischen Methoden werden entsprechend den Lehrbüchern „Gentechnik für Einsteiger“, T.A. Brown und S. Vogel, Spektrum Akademischer Verlag, und „Der Experimentator: Proteinbiochemie und Proteomics“, H. Rehm und T. Letzel, Spektrum Akademischer Verlag, durchgeführt. Änderungen und weitere Quellen sind im Folgenden beschrieben.

4.1 Gentechnische Arbeiten mit Nukleinsäuren

4.1.1 Isolation von RNA und cDNA (*complementary DNA*)-Synthese

Zur Gewinnung einer bestimmten Gensequenz für Klonierungen und rekombinante Expression des entsprechenden Proteins werden cDNA-Sequenzen ohne Introns benötigt. Hierfür muss RNA aus Zellen gewonnen werden und in klonierbare cDNA umgeschrieben werden. Diese cDNA kann im Weiteren als Template für die Amplifikation mittels PCR dienen, bei der Primerpaare für das entsprechende Gen eingesetzt werden.

Zur Isolation von RNA aus Mausgewebe werden Gewebestücke (hier Leberstücke von jeweils 40 mg) frisch, oder aus einer Konservierung bei -80°C , mit Hilfe eines Edelstahl-Pistills homogenisiert. Die Isolation der RNA erfolgt nach Anleitung des *Quick-RNA™ MiniPrep*-Kits der Firma Zymo Research. Die Konzentration der isolierten RNA wird photometrisch bestimmt (siehe 4.1, Abschnitt Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren). Die RNA-Lösung wird bis zu der weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Synthese von cDNA wird 1 μg RNA mit 1 μg Oligo-dT-Primern versetzt, auf 16 μl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt, 5 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Für die Reaktion der reversen Transkriptase M-MLV werden im Folgenden 5 μl M-MLV-Puffer (5x), 1,25 μl dNTPs und 1 μl M-MLV-Enzym hinzugegeben, auf 25 μl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt und der Reaktionsansatz wird bei 40°C für 60 Minuten inkubiert. Die Lagerung der cDNA erfolgt bei -20°C .

4.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung des Nukleinsäuregehaltes wird die Probe in einem sinnvollen Verhältnis verdünnt, so dass die Konzentration im messbaren Bereich des Photometers liegt. Die Bestimmung erfolgt anhand der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wird der Quotient OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Er gibt an, inwieweit die Lösung mit Protein- und Phenolresten verunreinigt ist. Der Quotient sollte für eine DNA-Isolation bei 1,8 und für eine RNA-Isolation bei 2,0 liegen.

4.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) dient der Amplifikation von DNA. Hierfür werden DNA-Doppelhelices (Template) durch Erhitzen (Denaturierung) in Einzelstränge gespalten. An diese Einzelstränge binden temperaturabhängig spezifische, komplementäre Oligonucleotid-Primer und eine DNA-Polymerase vervollständigt den komplementären Strang mit einzelnen Nucleotiden (dNTPs). Durch mehrfaches Durchlaufen des Zyklus von Denaturierung, Primeranlagerung und Primerverlängerung steigt die Menge der amplifizierten DNA-Sequenz exponentiell an.

Zur Kontrolle der PCR kann eine Probe auf einem Agarosegel aufgetragen werden und die Größe des Amplifikats bestimmt werden. Zur Analyse der Basenabfolge des PCR-Produktes wird die DNA sequenziert. Die Sequenzierungsreaktion erfolgt im Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster. Die Analyse der Sequenzierung wird mit Hilfe des Programms Chromas durchgeführt.

4.1.4 DNA-Restriktion

DNA, z.B. Plasmide, kann mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen, welche an spezifischen DNA-Erkennungssequenzen enzymatisch schneiden, in Fragmente getrennt werden. Hierfür werden 250 ng bis 1 µg DNA mit 4 U des/der ausgewählten Restriktionsendonukleasen und Pufferzusätzen nach Herstellerangaben für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgt eine Deaktivierung der Enzyme für 10 Minuten bei 70°C. Bei einem enzymatischen Verdau von Plasmiden an vorher ausgewählten Erkennungssequenzen können die Größen der entstanden Fragmente berechnet werden und diese mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft werden.

4.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegele dienen zur Größenanalyse von DNA-Fragmenten. Die größenselektive Elektrophorese basiert darauf, dass DNA-Fragmente bei neutralem pH-Wert polyanionisch sind und in einem elektrischen Feld zur Anode wandern. Aufgrund der Porengröße der Gelmatrix wandern kleine DNA-Moleküle schneller als größere. Die Methode wurde nach

McDonnell et al. (McDonnell et al., 1977) durchgeführt. Es werden für größere DNA-Fragmente Agarosegele mit einer Konzentration von 1 % (w/v) und für kleinere Fragmente (unter 300 bp) Gele mit einer Konzentration von 2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer hergestellt. Zusätzlich enthalten die Gele 0,005 % (v/v) Ethidiumbromidlösung, um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen. Als Größenstandard wird eine DNA-Leiter parallel zu den Proben (DNA-Lösung in 6x Loadingdye) auf das Gel aufgetragen. Die Größenanalyse erfolgt in einem Transilluminator unter UV-Licht. Zum Ausschneiden der aufgetrennten Fragmente wird das Gel auf einem UV-Tisch belichtet.

4.1.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgt mit Hilfe des *Wizard SV Gel and PCR Clean up Kits* der Firma Promega nach Herstellerangaben. Hierzu werden DNA-Fragmente unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten, das Gel aufgelöst und die DNA aufgereinigt. Zur Kontrolle der Aufreinigung und der Konzentrationsabschätzung wird erneut ein Aliquot der DNA-Lösung auf ein Agarosegel aufgetragen.

4.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Neukombination von DNA-Fragmenten werden Teilsequenzen von Plasmiden oder PCR-Produkten neu kombiniert und miteinander ligiert. Meist handelt es sich hierbei um das Rückgrat des Plasmids, also den eigentlichen Vektor, und das entsprechende Insert, welches für das gewünschte Protein kodiert. Auch bei Modifikationen des Vektorsystems, z.B. einer Veränderung des *Tags* oder des Promotors, wird diese Technik eingesetzt. DNA-Fragmente, welche zuvor mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten wurden, werden gelelektrophoretisch aufgetrennt und aufgereinigt. Anschließend werden die Fragmente in einem Verhältnis 1:3 (Vektor:Insert) mit 2 U T4-Ligase und 4 µl 5xLigasepuffer in einem Volumen von 20 µl für einen Zeitraum von 2 h bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend wird der gesamte Ligationsansatz in *E. coli* transformiert.

4.1.8 Plasmidpräparation

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA und zur Überprüfung von Klonierungen werden Klone von transformierten Bakterien in Flüssigkultur in LB-Medium (*lysogeny broth medium*), inklusive des entsprechenden Antibiotikums, bei 37°C und 180 rpm über Nacht angezogen.

Die Kulturgröße beträgt für Minipräparationen 5 ml und für Maxipräparationen 400 ml. Die Aufreinigung der geringen Mengen erfolgt mit Hilfe des *ZyppiTM Plasmid Miniprep Kits* von Zymo Research nach Angaben des Herstellers. Maxipräparationen werden nach Herstellerangaben mit Hilfe des *PureLinkTM HiPure Maxiprep Kits* der Firma Invitrogen durchgeführt. Die Konzentration der Plasmidlösung wird photometrisch bestimmt. Für kürzere Zeiten werden die Plasmidlösungen bei 4°C, für Langzeitaufbewahrung bei -20°C gelagert.

4.1.9 Transformation von Bakterien

Nach einer erfolgten Klonierung oder zur prokaryotischen Proteingewinnung werden unterschiedliche *Escherichia coli*-Stämme mit Plasmid-DNA transformiert. Hierzu werden chemisch kompetente Bakterien verwendet. Die Zellen werden langsam auf Eis aufgetaut, es wird ein maximales Volumen von 20 µl der Plasmidlösung zugesetzt und vorsichtig vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis erfolgt ein 1 minütiger Hitzeschock bei 42°C. Im Anschluss wird das Gemisch wieder auf Eis gebracht, mit dem zweifachen Volumen des frischen Mediums versetzt und bei 37°C für 1 Stunde auf einem Schüttelinkubator (180 rpm) inkubiert. In dieser Zeit regenerieren sich die Bakterien und lesen die aufgenommene Plasmid-DNA erstmals ab. Dieses führt zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz, welche auf dem Plasmid kodiert ist. Im Weiteren werden die Bakterien auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aufgrund der Antibiotikaresistenz der Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, sollten nur diese auf dem Agar überleben und Kolonien bilden. Durch Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse/Sequenzierung kann der Transformationserfolg kontrolliert werden.

4.1.10 Chemisch kompetente Bakterien

Chemisch kompetente Bakterien weisen eine hohe Affinität auf, freie Plasmid-DNA aufzunehmen. Zur Produktion chemisch kompetenter Bakterien werden Einzelkolonien des jeweiligen *E. coli*-Stammes von LB-Agar-Platten in TYM-Medium (*trypticase, yeast extract, maltose*) bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ (optische Dichte bei 600 nm) von 0,5 bis 0,6 angezogen. Um zu gewährleisten, dass sich die Kultur in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase befindet, wird das Volumen um den Faktor 10 erweitert, und es erfolgt eine weitere Inkubation von etwa 1,5 h (erneut OD₆₀₀ von 0,5 -

0,6) und nach dem Erweitern des Kulturvolumens um den Faktor 4 und einer weiteren Stunde Inkubation bei 37°C, wird die Kultur für 10 min unter Schwenken im Eiswasser abgekühlt, um weiteres Wachstum zu stoppen. Nach der Zentrifugation bei 2500xg und 4°C werden die Bakterien in kaltem TfB1 resuspendiert. Im Anschluss werden die Zellen erneut sedimentiert und in kaltem TfB2 (20 % des Kulturvolumens) aufgenommen. Diese Suspension wird aliquotiert (300 µl) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Langzeitkonservierung werden die Aliquots mit chemisch kompetenten Zellen bei -80°C gelagert.

4.2 Kultivierung und Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen werden alle 2-3 Tage mit frischem Medium versorgt. Das jeweilige Medium und die Kultivierungstemperatur im Brutschrank (alle 5 % CO₂-Atmosphäre) sind der folgenden Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Verwendete eukaryotische Zellen, Kultivierungstemperatur und Medienzusammensetzungen

Zelltyp	Temperatur	Medium
COS-Zelllinie	37°C	DMEM + 10 % FCS + Pen/Strep
HEK 293T Zelllinie	37°C	DMEM + 10 % CS/Fe + Pen/Strep
HEK 293FT Zelllinie	37°C	DMEM + 10 % CS/Fe
Humane Podozytenzelllinie (AB8)	33°C, 37°C	RPMI 1640 + 10 % FCS + Supplemente + Pen/Strep
Murine Mesenchymale Stammzellen	37°C	DMEM + 10 % FCS + Pen/Strep
Murine Podozytenzelllinie (K8)	33°C	RPMI 1640 + 10 % FCS + γ -Interferon + Pen/Strep
Murine Podozytenzelllinie (K8)	37°C	RPMI 1640 + 10 % FCS + Pen/Strep
Primäre adulte murine Fibroblasten	37°C	DMEM + 20 % FCS + Pen/Strep

Primäre murine Podozyten	37°C	RPMI 1640 + 10 % FCS + Supplemente + Pen/Strep
Supplemente		0,1 % nicht essentielle Aminosäuren 100 µM Natriumpyruvat 10 µg/ml Insulin-Transferin- Natrium-Selenit 5 mM HEPES

Vor dem Erreichen der Konfluenz werden die Zellen auf neue Schalen gesplittet. Hierzu werden die Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen und anschließend wird eine Trypsin EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationsphase im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂, die je nach Zelltyp 3-15 Minuten andauert, wird das Ablösen der Zellen von der Kulturschale mikroskopisch überprüft und eventuell durch mechanische Einwirkungen unterstützt. Im Anschluss werden die suspendierten Zellen in Medium aufgenommen, bei 1200 rpm und RT für 5 Minuten pellettiert und in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen werden, dem jeweiligen Versuch entsprechend, in der gewünschten Verdünnung auf frische Kulturschalen verteilt.

Um eukaryotische Zellen über einen längeren Zeitraum zu konservieren, können diese in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Für diesen Zweck werden die Zellen zunächst bis zu einer Konfluenz von etwa 70 % herangezogen, anschließend mit Trypsin abgelöst und in PBS aufgenommen, bei 1200 rpm und RT zentrifugiert und in Medium resuspendiert. Nach erneuter Sedimentation werden die Zellen in einer Medienlösung, die 10 % (v/v) DMSO enthält, eingeeengt (etwa 20 % der ursprünglichen Medienmenge), in Kryoröhrchen aliquotiert und stufenweise (1. 4 h -20°C, 2. über Nacht -80°C, 3. flüssiger Stickstoff) eingefroren.

Zur Reaktivierung der Zellen werden diese dem Stickstoffbehälter entnommen, schnell aufgetaut und in Schalen mit frischem Medium gegeben. Nach dem Anheften der Zellen wird das Medium gewechselt, um DMSO-Reste zu entfernen.

4.2.1 Stimulation von eukaryotischen Zellen

Zur Stimulation mit verschiedenen Drogen (siehe Tabelle 13) werden Zellen, je nach Verwendungszweck, in Kulturschalen oder auf Deckgläschen ausgesät und kultiviert. Nach Erreichen einer Zelldichte von 50 bis 70 % wird frisches Medium und die jeweilige Droge in angegebener Konzentration hinzugegeben. Für die unbehandelten Kontrollzellen wird eine entsprechende Menge des Lösungsmittels der Droge eingesetzt.

Tabelle 13: Verwendete Drogen zur Stimulation von Zellen

Droge	Stammlösung	Endkonzentration	Inkubationsdauer
Bafilomycin A	5 mM	100 nM	9 h
Blasticidin	6 mg/ml	6 µg/ml	mehrere Tage
Chloroquin	100 mM	50 µM	9 h
MDC	50 mM in DMSO	25 µM	30 min
MG132	50 mM in DMSO	10 µM	9 h
Rapamycin	100 mg/ml	100 ng/ml	24 h
TBHP	100 mM	100 µM	60 min

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um zu gewährleisten, dass für Experimente vergleichbare Proteinmengen verschiedener Lysate eingesetzt werden, wird die Proteinkonzentrationen mit Hilfe des *Pierce BCATM (Bicinchoninic acid) Protein Assay-Kits* der Firma Thermo Fisher Scientific photometrisch bestimmt. Hierzu werden die Proben in je 6 Verdünnungsstufen als Doppelbestimmung untersucht und anhand einer Protein-Standardreihe die Eiweißkonzentration ermittelt.

4.3.2 Proteingewinnung aus Organen

Zur Gewinnung von Proteinen aus Organen werden etwa 0,3 cm³ große Organstücke in einem Gewebehomogenisator nach Dounce (Glas in Glas Homogenisator) in 0,5 bis 1 ml Lysispuffer auf Eis mechanisch aufgeschlossen. Anschließend wird das entstandene Lysat

in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer 30-minütigen Sedimentation bei 4°C und 14000xg wird der Überstand mit den löslichen Proteinen abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

4.3.3 Proteingewinnung von eukaryotischen Zellsystemen

Zur Gewinnung endogener oder überexprimierter Proteine aus der Zellkultur werden die Zellen zunächst ein- bis zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend auf Eis gelagert. Auf die gründlich abgesaugten Zellen wird der entsprechende Lysispuffer gegeben und die Zellen werden mit Hilfe eines Zellschabers von der Zellkulturschale gelöst. Nach der Überführung der Zellen in ein 1,5-ml Reaktionsgefäß werden diese mit Hilfe einer Spritze mit Kanüle (20G) mechanisch homogenisiert. Im Anschluss werden die Lysate zentrifugiert (14000xg, 30 Minuten), um unlösliche Zellkompartimente und Proteine zu pellettieren. Der Überstand wird abgenommen und bis kann bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert werden.

4.3.4 Rekombinante Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen

Transiente Transfektion: Zur Expression von Proteinen in einem eukaryotischen Zellsystem werden HEK 293T-Zellen verwendet. Die Transfektion der Zellen erfolgt mit Hilfe der Calcium-Phosphat Methode. Hierfür werden die Zellen so gesplittet, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 50-70 % aufweisen, sich somit in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Es werden 20 µg Plasmid-DNA pro 10 cm-Kulturschale in einem Reaktionsgefäß mit 0,5 ml einer 0,25 M CaCl₂-Lösung vermischt. Im Weiteren werden durch Luftzufuhr Verwirbelungen in dem Gefäß erzeugt und währenddessen 0,5 ml einer 2 x HEBS-Lösung hinzu getropft. Bei diesem Prozess bilden sich Calciumphosphatkristalle, an die DNA bindet. Die Emulsion wird tropfenweise auf die Zellen in Kulturmedium gegeben. Die Präzipitate werden von den Zellen durch Endozytose aufgenommen. Nach einer Inkubationsdauer von 6 bis 14 Stunden wird das Medium gewechselt. Die Gewinnung der exprimierten Proteine erfolgt 36 bis 48 Stunden nach Transfektion.

Virale Transduktion: Zur stabilen transduktion von eukaryotischen Zellen wird eine retrovirale Übertragung der kodierenden DNA genutzt. In dieser Arbeit werden murine Podozyten (K8) mit Hilfe des lentiviralen Transduktionssystems der Firma Invitrogen

(*ViraPowerTM Lentiviral Expression System*) nach Herstellerangaben gentechnisch verändert. Als Produktionszelllinie der Viren werden HEK 293FT-Zellen mit den einzelnen Komponenten der DNA zur Produktion der Viren mit Hilfe von Lipofektamin 2000® nach herstellerangaben transfiziert. 48 und 72 Stunden nach Transfektion wird der Viren-haltige Überstand geerntet. Nach der Zentrifugation zum Entfernen von Zelldebris wird der Überstand durch einen Sterilfilter der Porengröße 0,45 µm filtriert. Zur Transduktion der Podozyten wird 2/3 des viralen Überstandes mit 1/3 frischem Medium vermischt und auf die Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wird das Medium gewechselt. Die Selektion der transduzierten Zellen erfolgt 48 Stunden nach Beginn der Transduktion mit dem Antibiotikum Blasticidin in einer Konzentration von 6 µg/ml. Diese Selektion überleben nur solche Zellen, die das gewünschte genetische Material aufgenommen haben.

4.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe werden diese auf ein Polyacrylamid (PAA)-Gel aufgetragen. Die Gele werden in Gekassetten der Firma Invitrogen gegossen. Das Sammelgel hat stets eine PAA-Konzentration von 5 %. Die Porengröße des Trenngels wird durch eine veränderte PAA-Konzentration vorgegeben, so wird eine große Trennschärfe für Proteine bestimmter Größen erzielt. Die PAA-Konzentration der Gele variiert zwischen 6 und 15 %.

Die Proteinlösungen werden vor dem Auftragen mit Probenpuffer nach Laemmli versetzt und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Im Anschluss werden sie auf das Gel aufgetragen. Das maximale Auftragevolumen wird durch die Taschengöße des jeweiligen Gels limitiert. Nicht beladene Spuren werden mit Probenpuffer befüllt, um keinen pH-Gradienten zwischen den Spuren zu erzeugen. Zusätzlich wird ein Größenstandard mit definierten Bandengrößen aufgetragen.

Im Anschluss können die Proteine in dem Gel unspezifisch mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie oder mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht werden. Alternativ werden die Proteine mittels Western Blot auf eine Membran übertragen und bestimmte Proteine immunologisch nachgewiesen.

4.3.6 Western Blot

Der Western Blot dient dem immunologischen Nachweis von Proteinen. Hierzu wird das Gel auf eine PVDF-Membran gelegt. Über das Gel und unter die Membran werden Zellulosepads (Whatman Papier) und/oder Blotschwämmchen gelegt. Durch das Anlegen einer Spannung werden die Proteine aus dem Gel auf die Membran gebracht und dort immobilisiert. In dieser Arbeit wird für quantitative Western Blot Analysen das Tank-Blot- und für qualitative Analysen das Semi-Dry-Blot-Verfahren verwendet.

Zur immunologischen Detektion bestimmter Proteine werden im Anschluss die unbelegten Stellen der Membran 1 Stunde bei RT blockiert (Blocklösung: 5 % Magermilchpulver in TBST). Danach erfolgt die Inkubation (1-2 h, RT oder über Nacht, 4°C) mit dem ersten Antikörper, gelöst in Blocklösung, der spezifisch an das zu detektierende Protein bindet. Die Konzentrationen der jeweiligen Antikörper sind der Tabelle 9 zu entnehmen. Nach drei Waschschritten mit TBST (jeweils 10 min, RT) erfolgt die Inkubation mit dem Spezies-spezifischen, Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) gekoppelten Zweitantikörper (Konzentrationen in Tabelle 10), welcher den gebundenen Erstantikörper erkennt. Nach erneutem Waschen (3 x, 10 min, RT) mit TBST wird die Membran mit Lumi-Light® (Roche) für eine Minute inkubiert. Die HRP reagiert mit dem Lumi-Light®-Substrat und es entsteht ein chemilumineszierendes Produkt, welches mit Röntgenfilmen oder einem Lumineszenzimager detektierbar ist.

Die quantitativen, densitometrische Auswertungen der Bandengröße und -intensität erfolgen mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogrammes ImageJ.

4.3.7 Färbung von SDS-Gelen

Zur Darstellung von Proteinen können SDS-Gele nach der Elektrophorese, aber auch Membranen nach dem Western Blot, gefärbt werden. In dieser Arbeit werden Membranen und Gele unter anderem mit Coomassie Blue nach Anleitung des Herstellers (Roth) gefärbt. Wesentlich sensitiver ist die Detektion von Proteinen mit Silbernitrat. Sie wird nach (Rabilloud et al., 1988) durchgeführt. Die Gele werden zunächst 30 Minuten in Fixierlösung und weitere 30 Minuten in Inkubationslösung geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser (je 7 min) werden die Gele 20 Minuten mit Versilberungslösung inkubiert, einmal kurz mit Wasser gewaschen und im Anschluss in

Entwicklerlösung (Wechseln nach 1 min) entwickelt, bis die gewünschte Farbintensität sichtbar wird. In diesem Moment wird die Reaktion mit Stop-Lösung abgebrochen und es kommt zu keiner weiteren Verfärbung der Gele.

Auf diese Weise angefärbte Proteinbanden dienen der Visualisierung von unterschiedlichen Proteinzusammensetzungen der aufgetragenen Extrakte oder zur Kontrolle, inwieweit gleiche Mengen Protein auf das Gel aufgetragen wurden. Die visualisierten Banden können ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie identifiziert werden.

4.3.8 Proteinexpression und Proteingewinnung in prokaryotischen Zellen

Zur Expression von Proteinen in prokaryotischen Zellsystemen wird in dieser Arbeit der *E. coli*-Stamm BL21 benutzt, welcher sich durch gute Expressionsraten und eine geringe Anzahl von Einschlusskörperchen auszeichnet. Chemisch kompetente Bakterien werden transformiert und der Erfolg der Transformation wird mittels Restriktionsanalyse kontrolliert.

Ein erfolgreich exprimierender Klon wird auf ein größeres Volumen herangezogen und die Expression des gewünschten Proteins wird gelelektrophoretisch überprüft.

4.3.9 GST-Pulldown

Zur Aufreinigung bakteriell exprimierter Proteine kann man diese als Fusionsproteine mit einem *Tag* (Markierung oder Anker) klonieren. Die Isolation des Fusionsproteins erfolgt dann aufgrund besonderer Bindeeigenschaften des *Tags* an eine Matrix. In dieser Arbeit wird mit GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteinen gearbeitet. Durch die hohe Affinität von GST zu Glutathion kann man dieses an einer festen Matrix immobilisieren, über eine Affinitätschromatographie das Fusionsprotein (mit seinen Bindungspartnern) an die Matrix koppeln und auf diesem Weg aufreinigen. Es werden Glutathion-*Beads* aus Sepharose verwendet.

Um einen möglichst effektiv exprimierenden Bakterienklon zu verwenden werden mehrere Klone gepickt und über Nacht in LB-Medium angezogen. Am Folgetag werden 4 ml Medium mit 400 µl Inoculum angeimpft und 2,5 Stunden bei 30°C inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wird eine Probe jeder Kultur entnommen, pellettiert (1 min, 1400 rpm) und das

Pellett bei -20°C eingefroren. Die verbleibende Kultur wird nun mit L-Arabinose (finale Konzentration von 0,2 %) behandelt, um die Expression des Fusionsproteins zu induzieren. Nach einer erneuten Inkubation von 2 Stunden bei 30°C wird wieder ein Aliquot entnommen, pellettiert und eingefroren. Zur Überprüfung der gelungenen Expression des Fusionsproteins und der exprimierten Menge werden die Pelletts vor und nach Induktion in Probenpuffer nach Laemmli aufgenommen und neben aufgereinigtem GST und einem Proteinmarker gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach einer Coomassiefärbung ist das Fusionsprotein bei gelungener Expression nach Induktion deutlich zu erkennen.

Nach der Auswahl des maximal exprimierenden Klons wird dieser für die Produktion größerer Mengen des Fusionsproteins in einer Übernachtskultur mit einem Volumen von 20 ml angezogen und am Folgetag wird das Kulturvolumen auf das 10fache erhöht und 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Nun werden die Zellen pellettiert (4500 rpm, 12 min) und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Zum Aufschluss der Zellen wird das Pellett in 5 % des Ursprungsvolumens PBS mit Protease-Inhibitoren aufgenommen und mittels Ultraschall (3 x 9 Impulse auf Eis, 90 Sekunden) und anschließender Zugabe von 1 % TritonX-100 für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Zum Entfernen der Zelldebris werden diese bei 15000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand, welcher das exprimierte GST-Fusionsprotein enthält, wird bei -80°C gelagert.

Um ein optimales Verhältnis von Glutathion-*Beads* zu angebotenen Fusionsproteinen zu erhalten, erfolgt im Weiteren eine Probekopplung des Proteins an die *Beads*, indem unterschiedliche Volumina Zelllysate auf identische Beadmengen aufgetragen werden. Als Negativkontrolle dient aufgereinigtes GST. Der Erfolg der Probekopplung wird mit Hilfe eines Coomassiegels überprüft.

Im Weiteren erfolgt der eigentliche GST-*Pulldown*. Das bakterielle Lysat, welches das GST-Fusionsprotein enthält, wird für 1 bis 2 Stunden bei 4°C mit den Glutathion-*Beads* inkubiert und in dieser Zeit an die *Beads* gekoppelt. Parallel wird ein Ansatz, der lediglich GST enthält, mitgeführt. Die *Beads* werden dreimal mit dem entsprechenden Lysispuffer gewaschen (10faches invertieren der *Beads*, Zentrifugation bei 3000 rpm und 4°C , Überstand verwerfen). Im Anschluss wird ein Lysat mit potentiellen Interaktionspartnern, z.B. aus einer Zellkultur oder einem Organlysat, auf die beladenen *Beads* gegeben. Nach

weiteren 1 bis 2 Stunden Kopplung erfolgen wiederum 3 Waschschritte (Lysispuffer). Die gewaschenen *Beads* werden mit Probenpuffer nach Laemmli versetzt und für eine SDS-PAGE vorbereitet. Die SDS-Gele können im Weiteren mit Coomassie oder Silbernitrat gefärbt werden (siehe 4.3, Abschnitt: Färbung von SDS-Gelen).

4.3.10 3xFlag-Pulldown

Zur Aufreinigung von eukaryotisch exprimierten Fusionsproteinen werden in dieser Arbeit Proteine mit einem dreifachen *Flag-Tag* eingesetzt. Dieses Proteinmotiv hat die Aminosäuresequenz N-DYKDDDDK-C und dient der Aufreinigung oder Detektion des Fusionsproteins mit einem monoklonalen Antikörper (M2). Nach der Expression der Proteine in HEK-293T Zellen werden die Proteine in Lysispuffer aufgenommen und mit Hilfe einer Spritze mit Kanüle (20G) mechanisch homogenisiert. Im Anschluss werden die entstandenen Zelldebris bei 4°C und 14000 rpm für 30 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird gewonnen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Als Kontrolllysat werden HEK 293T-Zellen, welche mit dem 3xFlag-Leervektor V180 transfiziert wurden, eingesetzt.

Die Aufreinigung der Fusionsproteine erfolgt über spezifische M2-Flag-Antikörper, die an Sepharose-*Beads* gekoppelt sind. Die *M2-Beads* werden dreimal in TBS (*tris buffered solution*) gewaschen (Zentrifugation bei 3000 rpm und 4°C) und anschließend mit dem entsprechenden Zelllysat versetzt. Nun erfolgt eine zweistündige Inkubation der *M2-Beads* mit den Lysaten in einem Rotationsinkubator. Für die Untersuchung bestimmter Interaktionen muss die optimale Inkubationstemperatur (4°C oder Raumtemperatur) eruiert werden. Nach dieser Inkubation folgen zwei Waschschritte mit TBS. Danach werden die *M2-Beads* in Lysispuffer resuspendiert und weitere 15 Minuten bei der Kopplungstemperatur in dem Rotationsschüttler inkubiert. Nach diesem Waschschritt werden die *M2-Beads* erneut einmal mit TBS gewaschen und dann in einem kleinen Volumen TBS aufgenommen. Die resuspendierten *M2-Beads* werden in ein neues Reaktionsgefäß (Volumen 0,5 ml) überführt, erneut zentrifugiert und anschließend in Probenpuffer nach Laemmli aufgenommen und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Das Reaktionsgefäß wird in ein Reaktionsgefäß größeren Volumens (1,5 ml) eingehängt und die denaturierten Proteine werden nun durch das Durchstechen des Bodens des kleinen Gefäßes mit einer Kanüle und anschließende kurze Zentrifugation in das größere

Reaktionsgefäß überführt. Das Überführen der *Beads* in neue Reaktionsgefäße verhindert, dass Proteine, die unspezifisch an die Wand der Reaktionsgefäße binden, falsche Ergebnisse für einen *Pulldown* liefern.

Die Lysate in Probenpuffer können gelelektrophoretisch analysiert oder bei -20°C gelagert werden. Zur massenspektrometrischen Analyse des *Pulldowns* werden die gewaschenen M2-*Beads* nach der Kopplung bei -20°C gelagert und von der Arbeitsgruppe für Biomolekulare Massenspektrometrie der Ruhr-Universität Bochum aufgearbeitet.

4.3.11 *Pulldown-Assay* mit Ubiquitin-Agarose

Bei Ubiquitin-Agarose handelt es sich um Ubiquitin, welches an Agarose-*Beads* immobilisiert ist. Sie dient der Identifikation von Ubiquitin-Interaktionspartnern, wie Ubiquitin-Ligasen. Die *Beads* werden zunächst dreimal mit IP-Puffer (Immun-Präzipitations-Puffer) gewaschen (anschließende Zentrifugation: 1 min, 4°C, 1800 rpm) und anschließend mit Organlysaten für 2 Stunden im Rotationsinkubator bei 4°C inkubiert. Das Lysat wird abgenommen und es folgen 4 Waschschrte mit IP-Puffer. Im Anschluss werden die Lysate für eine SDS-PAGE vorbereitet und darauf folgend einem Western Blot mit immunologischem Nachweis bestimmter Proteine unterzogen.

4.3.12 Immunfluoreszenz

Für intrazelluläre Lokalisationsstudien werden verschiedene Proteine fixierter Zellen nach folgendem Protokoll angefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert. Die Konzentrationen der verschiedenen Antikörper sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

- | | |
|---------------------|---|
| 1) Waschen | mit kaltem PBS |
| 2) Fixieren | 20 min 4 % PFA, RT |
| 3) Waschen | 3 x in PBS, je 3-4 min |
| 4) Quenschen | 10 min mit 50mM NH ₄ Cl in PBS |
| 5) Waschen | 3 x in PBS, je 3-4 min |
| 6) Permeabilisieren | 5 min 0,2 % TritonX100 in PBS |
| 7) Waschen | 3 x in IF-Puffer je 3-4 min |
| 8) Blocken | 20 min in IF-Puffer + 10 % NGS |
| 9) 1. AK | 45-60 min in IF-Puffer + 2 % NGS + AK |
| 10) Waschen | 3 x in IF-Puffer je 5 min |

11) 2. AK	ca. 20 min in IF-Puffer + 2 % NGS + AK
12) Waschen	3 x in PBS, je 3-4 min
13) Wässern	ca. 20 Sekunden in destilliertem H ₂ O schwenken
14) Einbetten	pro DG 1 keiner Tropfen Mowiol, DG vorher trocken tupfen

4.4 Isolation primärer Zellen

4.4.1 Isolation adulter muriner Fibroblasten

Die Mausohren werden mit 70 % Ethanol desinfizieren und jedes Ohr mit einer Schere (desinfiziert) abgeschnitten, in feine Stückchen zerteilt und in PBS auf Eis gelagert.

Zur Lyse der Zellen aus dem Gewebeverband werden die Ohrstücke mit einem Teelöffel autoklavierter Glasperlen (1-2 ml) in einem 15 ml Reaktionsgefäß in 2,5 ml Dissoziationsmedium (DMEM, 20 % FCS, Pen/Strep, 0,175 U/ml Collagenase A, 0,3 U/ml Dispase II) in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 180-200 rpm für 3-4 Stunden inkubiert. Um die Scherkräfte zu erhöhen, wird der Ansatz alle 30 Minuten für 1 Minute auf einem Vortex-Schüttler bei maximaler Geschwindigkeit durchmischt.

Zur Entfernung der Proteasen werden die Reaktionsgefäße bei 2000 rpm zentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Im Anschluss werden die Glasperlen mit 3 ml Fibroblasten-Kulturmedium versetzt und geschüttelt. Der Überstand (enthält Zellen und Ohrstücke) wird auf Kulturschalen ausgesät. Nach etwa 5 Tagen können die Zellen passagiert werden. Die resuspendierten Zellen werden bei der ersten Passage durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 40 µm gegeben um mitgeführte Ohrenstücke und Glasperlen zu entfernen. Die Zellen können bis zu 20 Passagen lang verwendet werden. Frühe Passagen der Zellen können kryokonserviert werden.

4.4.2 Isolation von primären Glomeruli und Podozytendifferenzierung

Präparation der Nieren: Die Mäuse werden unter Vollnarkose (Xylazin: 7 mg pro kg Körpergewicht und Ketamin: 100 mg pro kg Körpergewicht) mit kaltem PBS über die linke Herzkammer perfundiert. Zum Austritt des Blutes wird die *Vena cava caudalis* durchtrennt. Der Erfolg der Perfusion kann anhand der Leberfärbung beurteilt werden. Die Nieren werden entnommen, die Kapsel entfernt und bis zur weiteren Verarbeitung in PBS auf Eis gelagert.

Präparation der Glomeruli: Die Nierenrinde wird mit einem Skalpell von dem Nierenmark getrennt und in kleine Stückchen zerschnitten. Diese werden mit Hilfe eines mit Eis befüllten Becherglases (10ml) durch verschiedene Siebe mit absteigender Porengröße (150 μm , 70 μm , 30 μm) gerieben und mit kaltem PBS gespült (siehe Abb. 9A). Die Glomeruli verbleiben auf dem 30 μm -Sieb und werden mit PBS in ein Zentrifugenröhrchen gespült.

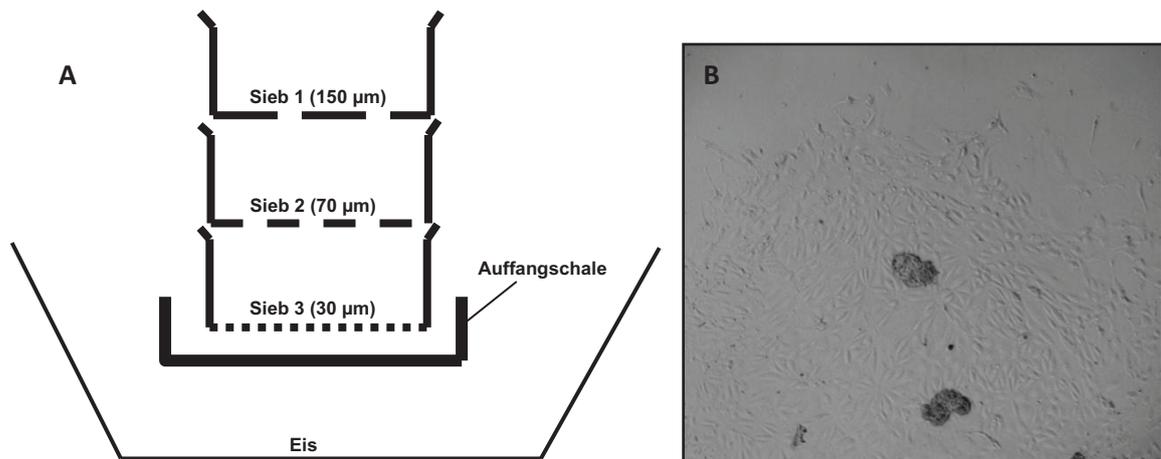


Abb. 9: Isolation primärer Mäuseglomeruli. A: Aufbau der Siebe (Siebgewebe aus PP, Reichelt-Chemietechnik) mit den Porengrößen 150 μm , 70 μm und 30 μm , Auffangschale aus Edelstahl und Eisbad. Die Nierenstücke werden von oben nach unten durch die jeweiligen Siebe gerieben. B: Fotografie isolierter Glomeruli nach 10 tägigem Auswachsen der Podozyten in der Zellkultur.

Aussähen der Glomeruli: Die Glomeruli werden bei 2000 rpm und 4°C für 20 min in einem Ausschwingrotor sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und die Glomeruli in Kulturmedium resuspendiert. Die Kultivierung erfolgt über einen Zeitraum von 10 Tagen, in denen die Podozyten auswachsen. Die Abbildung 9B zeigt exemplarisch ausgesäte Glomeruli (kugelige Strukturen) nach einer Kultivierungszeit von 10 Tagen. Es sind Podozyten ausgewachsen.

Passage der Zellen: Die ausgewachsenen Podozyten werden mit Hilfe von Trypsin-EDTA von der Zellkulturschale gelöst. Zur Isolation der Zellen von den Glomeruli werden sie durch ein 30 μm Zellsieb filtriert und im Anschluss, den geplanten Versuchen entsprechend, ausgesät.

4.4.3 Isolation mesenchymaler Stammzellen

Zur Isolation mesenchymaler Stammzellen (MSC) wird Knochenmark von 4 bis 6 Wochen alten Mäusen verwendet, welches nach der Präparation von Femur und Tibia mit Hilfe einer Spritze aus den Knochen heraus gespült wird. Die so gewonnenen Zellen werden in Medium gewaschen (1400 rpm, 5 min, RT). Bei der Isolation entstandene Knochensplitter werden mit Hilfe eines sterilen 30 µm Zellsiebes herausgefiltert. Zur Lyse der Erythrozyten werden die Zellen in Eri-Lyse-Puffer resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen werden erneut zweimal mit Medium gewaschen und im Anschluss in Zellkulturflaschen ausgesät. Die Passage der Zellen erfolgt mit Hilfe von Trypsin-EDTA (5fach konzentriert) und einem Zellschaber. Nach 3 bis 4 Passagen haben die mesenchymalen Stammzellen die anderen Zelltypen des Knochenmarks verdrängt.

4.4.4 Adipozyten-Differenzierung:

Zur Adipozyten-Differenzierung werden mesenchymale Stammzellen der Passage 4, je nach Versuchsansatz, in einer Dichte von $3 \times 10^4/6\text{-well}$, $0,5 \times 10^4/24\text{-well}$ oder $1 \times 10^6/10\text{cm-Schale}$ ausgesät. 2 Tage nach Erreichen der Konfluenz werden die Zellen 24 Tage in Adipozyten-Differenzierungsmedium gehalten, welches alle 2 Tage gewechselt wird. Um die Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien untersuchen zu können, werden Proben an Tag 0, 5, 10, 15 und 20 untersucht. Zu diesem Zweck werden parallel mehrere Kulturschalen angesetzt, von denen zu jedem Probenahmezeitpunkt drei Schalen bzw. *Wells* für Untersuchungen genutzt werden, während die anderen Schalen weiter kultiviert werden. Der Differenzierungsstatus wird mit Hilfe einer Oil Red O-Färbung (siehe 4.8, Abschnitte: Oil Red O-Färbung von Organschnitten) bestimmt.

4.5 Autophagozytose-Assay

Zur Bestimmung der Autophagozytoseaktivität von Zellen wird der Stoff Monodansylcadaverin (MDC, 10121-91-2 N-(5-aminopentyl)-5-dimethylamino-1-naphthalenesulfonamide) eingesetzt, welcher von lebenden Zellen aufgenommen wird und saure Kompartimente anfärbt. Es werden primäre Podozyten aus Nieren von Wildtyp- und p62^{Δ69-251} Mäusen isoliert und einmal passagiert. Die Zellen werden bis zu einer Konfluenz zwischen 50 und 80 % gezüchtet. Nach einmaligem Waschen mit warmem PBS wird MDC in einer Konzentration von 50 µM in PBS auf die Zellen gegeben und es erfolgt

eine Inkubation für 15 Minuten bei 37°C. Im Anschluss werden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin (10 min, 37°C) in Lösung gebracht, in 10 ml PBS suspendiert und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellett in Autophagozytose-Lysispuffer aufgenommen. Zur Vermessung der MDC-Aktivität werden die Lysate in 6 Verdünnungsstufen auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen und mit Hilfe des TECAN-Gerätes vermessen. Die Extinktion von MDC beträgt 335 nm, die Emission liegt bei einer Wellenlänge von 512 nm.

Da primäre Podozytenkulturen von Mäusen nicht immer identisch ergiebig sind, läuft man Gefahr eine Veränderung der Autophagozytoseaktivität auf eine veränderte MDC-Intensität zurückzuführen, wobei es sich lediglich um eine veränderte vermessene Zellzahl handelt. Um dieses zu umgehen, wird in dieser Arbeit zusätzlich zu dem Autophagozytosemarker MDC der Farbstoff Propidiumiodid (PI) eingesetzt, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert. In diesem Zustand kann er mit einer Wellenlänge von 536 nm angeregt werden, die Extinktion beträgt 617 nm. Anhand von Verdünnungsreihen kann gezeigt werden, dass die Extinktionsintensität direkt proportional zur Zellzahl ist. Durch die parallele Messung von der MDC- und der Propidiumiodid-Aktivität können diese Werte aufeinander bezogen werden, und anhand derer kann die relative Autophagozytoseaktivität der primären Podozytenzelllinien der verschiedenen Genotypen direkt miteinander verglichen werden.

Zur Etablierung des Assays werden Versuche mit COS und Ab8-Zellen durchgeführt, die mit MG132 und Bafilomycin A behandelt werden. Zusätzlich zu den photometrischen Messungen werden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

4.6 Messung der ROS-Aktivität in lebenden primären Fibroblasten

Zur Bestimmung der Aktivität freier Sauerstoffradikale in Zellen wird das *Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species (ROS) Detection*-Kit der Firma Invitrogen verwendet. Der Farbstoff 5-(und-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetat (Carboxy-H₂DCFDA) wird von Sauerstoffradikalen oxidativ zu dem Produkt Carboxy-DCF umgesetzt, welches mit einem Emissionsmaximum von 495 nm und einem Extinktionsmaximum von 529 nm mit einem Fluoreszenzmikroskop im grünen Bereich sichtbar wird (siehe Abb. 10).

Zur Bestimmung der Aktivität werden primäre Fibroblasten in Kulturschalen (Ibidi μ -Dish^{35mm, low}) ausgesät, die für direkte Mikroskopie geeignet sind. Bei Erreichen der Subkonfluenz werden sie mit warmem PBS gewaschen und mit 25 μ M Carboxy-H₂DCFDA und 1 μ M des Kernfarbstoffs Hoechst 33342 in PBS für 30 Minuten inkubiert. Nach erneuten drei Waschschrritten mit PBS werden über einen Zeitraum von 30 Minuten Einzelzellen zufällig ausgewählt und mit gleichbleibender Belichtungszeit und –intensität fotografiert. Die Fluoreszenzstärke, und damit die ROS-Aktivität, wird mit Hilfe des Programms ImageJ quantifiziert. Zur Überprüfung der Funktionalität des Assays werden Zellen vor der Inkubation mit Carboxy-H₂DCFDA mit Tert-butyl-Hydroperoxid (TBHP) (100 μ M, 1 h) behandelt, welches die Bildung freier Sauerstoffradikale induziert.

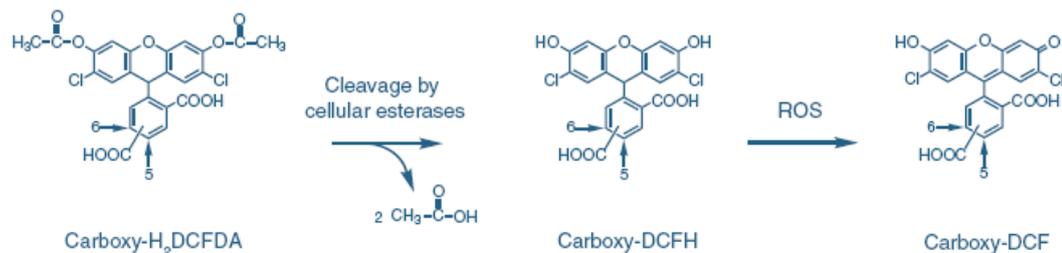


Abb. 10: Reaktionsschema der Umsetzung von Carboxy-H₂DCFDA zu Carboxy DCF (aus der Anleitung der Firma Invitrogen, 2006). Das nicht fluoreszierende Carboxy-H₂DCFDA gelangt in lebende Zellen und wird durch unspezifische intrazelluläre Esterasen deacetyliert. Durch die Präsenz intrazellulärer Sauerstoffradikale (ROS) wird das Fluoreszein der Verbindung oxidiert und es kommt zu einer Emission von grüner Fluoreszenz.

4.7 Haltung und Züchten von Mäusen

4.7.1 Verwendete Mauslinien

In dieser Arbeit wird eine Mauslinie mit einem Defekt des p62-Gens untersucht. Die Produktion dieser Mauslinie erfolgte durch S. Bürgis in der Arbeitsgruppe A. Gessner, Universitätsklinikum Erlangen, Abteilung für Infektionsbiologie. Die Generation der Mäuse erfolgte durch Einfügen einer Neomycinkassette an Stelle der Exone 2 bis 5 des p62 Gens. Weitere Informationen sind der Abbildung 11 und der Dissertation von S. Bürgis 2006 zu entnehmen.

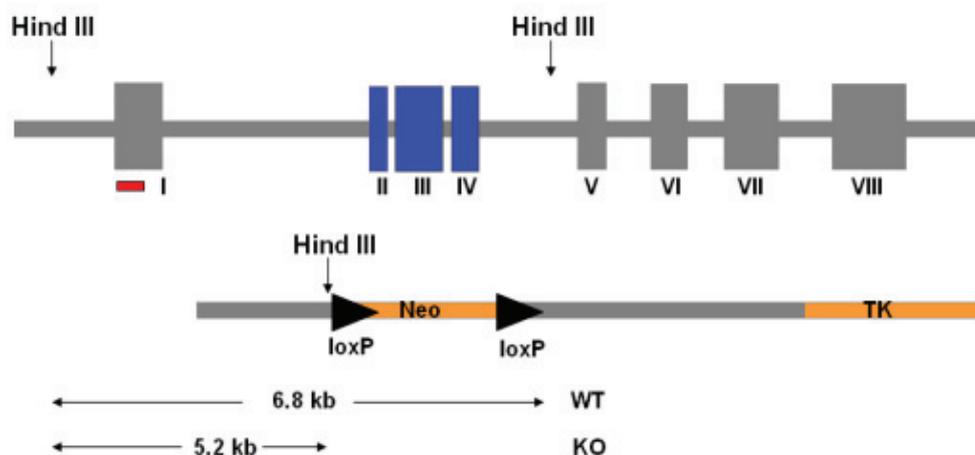


Abb. 11: Klonierungsstrategie zur Herstellung der p62^{Δ69-251}-Maus (Bürgis, 2006). Genomische Struktur des p62-Lokus. Der Zielvektor tauscht die Exons 2 bis 5 durch eine Neomycinkassette aus. Es entsteht ein 5,2 kb großes Produkt (im Vergleich mit dem 6,8 kb großen p62^{wt}-Gen). Dieser Verlust war auch im Southern Blot sichtbar (Daten nicht gezeigt).

Die Mäuse wurden auf einen C57/Black 6 Hintergrund gekreuzt und mit Wildtyptieren der Rasse C57/Black6 verglichen. Die reinen Wildtyptiere wurden ursprünglich von dem Konzern The Jackson Laboratory bezogen.

4.7.2 Haltung und Zucht der Mauslinien

Die Mäuse werden in Käfigen verschiedener Größen des Typs Tecniplast® der Firma VWR in kleine Gruppen gehalten. Die Zucht der Tiere erfolgt in der ZTE (Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung) des Universitätsklinikums Münster in der konventionellen, offenen Haltung. Die Tiere werden einmal pro Woche in frische Käfige umgesetzt und erhalten zweimal pro Woche frisches Wasser und Pellettfutter durch Tierpfleger der ZTE. Es erfolgt gezielte Zucht durch das Zusammensetzen bestimmter Tiere. Die Jungtiere werden 5 Wochen nach der Geburt abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt. In regelmäßigen Abständen werden Wildtyptiere in die p62^{Δ69-251}-Mauslinie eingekreuzt, um Inzucht innerhalb der Linie zu vermeiden. Die entstandenen heterozygoten Tiere werden miteinander verkreuzt um wieder homozygote p62^{Δ69-251}-Mäuse für Untersuchungen zu erhalten. Ein- bis zweimal pro Woche werden der Gesundheitszustand und der Zuchterfolg der Tiere kontrolliert.

4.7.3 Maus-Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Mäuse wird eine Schwanz- oder Ohrbiopsie 6 Wochen alter Mäuse entnommen und über Nacht lysiert. Die DNA wird mit Hilfe des *DNeasy Blood and tissue*-Kits der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben isoliert. Für die Genotypisierungs-PCR werden folgende Primer verwendet:

Wt3': AAT CCG GGG CTT CCT TCC TG

Wt5': GCC CTT CCC CTC GCA CAC G

p62Δ3': TCA GGA AAT TGA CAT TGG GAT CTT

p62Δ5': AAC AAC TTA GAT GGA GCC TGA ATG

Es wird für jedes Tier jeweils eine WT und eine Δ-PCR durchgeführt. Jeder PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Tabelle 14: Genotypisierungs-PCR-Ansatz

3'Primer	0,5 µl
5'Primer	0,5 µl
GoTaq-Puffer	2,5 µl
Taq-Polimerase	1 µl
0,5 µl dNTPs	0,5 µl
isolierte DNA	0,2 µl
Wasser	7,3 µl

Die Genotypisierungen werden mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

94°C 3 min

94°C 1 min

62,8°C 1 min 30 sec

72°C 2 min

72°C 5 min

Das PCR-Produkt wird mit Hilfe eines Agarosegels aufgetrennt und analysiert.

4.8 Phänotypisierung der Mäuse

Tiergewicht: Zur Bestimmung des Gewichtsverlaufs von Mäusen werden die Tiere über einen Zeitraum von 2 Jahren alle 1-2 Wochen mit einer Feinwaage gewogen.

Uringewinnung: Von Gruppen gleich alter und gleichgeschlechtlicher Tiere wird an 3 Tagen der Woche zu unterschiedlichen Tageszeiten Spontanurin gesammelt und vereint. Bis zur Analyse wird der Urin bei -20°C gelagert.

Analyse des Urins: Zur Bestimmung der Parameter Natrium-, Kalium-, Glucose, Harnstoff, Kreatinin- und Eiweißgehalt des Urins, werden verdünnte Urinproben der Mäuse im Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster im regulären Routinebereich analysiert. Zur Bestimmung des Albumingehaltes als Parameter für eine Proteinurie werden 10 µl Vollurin mit Probenpuffer nach Laemmli versetzt und mit Hilfe einer SDS-PAGE analysiert. Das Gel wird im Anschluss mit Coomassie gefärbt. Als Kontrolle wird aufgereinigtes Rinderalbumin aufgetragen.

Untersuchung einzelner Organe: Zur Untersuchung der Organgrößen wird das Tier nach erfolgter Vollnarkose mit PBS perfundiert und es werden die Organe (Hirn, Herz, Nieren, Milz, Leber und Pankreas) entnommen. Sie werden vermessen und das Gewicht mit Hilfe einer Feinwaage bestimmt.

Zur feingeweblichen Analyse der Nieren, werden narkotisierte Tiere mit Glutharaldehyd perfundiert und die Nieren werden entnommen. Nach der Entwässerung der Nieren in einem Sucrose-Gradienten werden die Organe in Formalin (4 % (v/v)) fixiert und auf Eis nach Erlangen verschickt. Die Nephropathologische Abteilung des Universitätsklinikums Erlangen fertigt Paraffinschnitte an und analysiert nach PAS-Färbung (*Periodic Acid Schiff*, färbt Zellkerne blau, den Rest der Zelle rot) Pünktelung, Anzahl der Glomeruli und das Volumen von Nierenmark und -rinde.

Zur Bestimmung des Fettgehalts der Organe werden 14 Monate alte Tiere untersucht. Die Organe werden nach der Entnahme nativ in *TissueTec* eingebettet und eingefroren. Es werden Schnitte mit einer Dicke von 12 µm angefertigt, die im Anschluss mit Oil Red O und Hämatoxylin gefärbt werden.

Oil Red O-Färbung von Organschnitten: die Oil Red O-Färbung dient der Visualisierung von fettigen Strukturen. Der Farbstoff bindet Lipide.

Stammlösung Oil Red O: 1 g Oil Red O in 200 ml Isopropanol

Gebrauchslösung Oil Red O: 6 Teile Stammlösung, 4 Teile Reinstwasser, 24 Stunden absetzen lassen, Filtrieren (22 µm)

Färbeprotokoll:

1. Wässern in Aqua dest.
2. 5 min 60 % (v/v) Isopropanol
3. 10 Minuten Oil Red O Gebrauchslösung
4. Kurz Aqua dest.
5. 5 min Hämatoxylin nach Mayer
6. Bläuen unter Leitungswasser
7. Eindeckeln in AquaTex

Bei der Lichtmikroskopischen Untersuchung der Organe sind Kerne blau und Lipide rot gefärbt.

Blutdruckmessung bei Mäusen: Der Blutdruck von Mäusen wird nicht invasiv mit dem CODATM *Non invasive Blood pressure von Kent Scientific cooperation* gemessen. Hierzu werden die Tiere in einer Röhre auf einem Heizmodul fixiert und es wird eine Schwanzmanschette angelegt. Diese wird mit Luft geweitet und es kann, wie bei einem Blutdruckmessgerät für Menschen mit Armmanschette, der Systolische und Diastolische Blutdruck und die Herzfrequenz aufgezeichnet werden. Zur Gewöhnung der Mäuse an das Experiment werden diese durch Röhren in ihrem Käfig an den Aufenthalt in engen Räumen gewöhnt. Im Anschluss werden die Tiere mehrfach in das Messgerät gesetzt und die Manschette wird für einige Minuten angelegt. Kennen die Mäuse diese Prozedur, sind sie nicht erheblich aufgeregt und es kann ein verlässlicher Blutdruckwert gemessen werden. Die Temperatur der Tiere wird mit einem Infrarotthermometer gemessen und kann mit Hilfe des Heizmoduls, auf dem die Röhren liegen variiert werden, damit die Tiere nicht auskühlen oder überhitzen. Pro Tier werden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen 15-20 Messungen aufgezeichnet. Die zusätzlichen Daten von Durchflussvolumen und –rate

geben, neben den Blutdruck- und Herzfrequenzwerten, Aufschluss über die Verlässlichkeit der jeweiligen Messung. Es wird ein Mittelwert der verlässlichen Daten jeder Maus gebildet und anschließend innerhalb einer Messgruppe gemittelt.

Messung des Glukosespiegels von Mäusen: Die Messung des Glukosespiegels von Mäusen erfolgt durch Blutentnahme aus der Schwanzvene. Zur besseren Visualisierung der Schwanzvene werden die Tiere unter einer Rotlichtlampe für 10 Minuten erwärmt und anschließend in einer Röhre mit Ausgang für den Schwanz immobilisiert. Durch Punktion der Schwanzvene mit einer Kanüle wird ein Tropfen Blut gewonnen und der Glukosespiegel durch Auftragen auf einen Teststreifen eines Blutzuckermessgerätes bestimmt und abgelesen. Es werden Tiere gleichen Alters der verschiedenen Genotypen untersucht.

4.9 Statistische Auswertungen

Im Rahmen der statistischen Auswertungen sind die ermittelten Daten als Mittelwert dargestellt. Die Fehlerindikatorbalken geben die Standardabweichung der Datenreihe an. Im Vergleich von $p62^{wt}$ und $p62^{\Delta 69-251}$ werden die Einzelwerte oftmals auf den Mittelwert des Wildtyps bezogen. Die Signifikanzen werden mit Hilfe des Students T-Tests ermittelt und sind als Irrtumswahrscheinlichkeit p angegeben. Im Rahmen der Berechnung, ob ein Ergebnis signifikant ist, wird eine Staffelung zur Hilfe genommen, die den Grad der Signifikanz von einem Stern bis hin zu drei Sternen vornimmt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit bei einem Stern liegt unter 0,05 (* = $p \leq 0,05$), bei zwei Sternen unter 0,005 (** = $p \leq 0,005$) und bei drei Sternen unter 0,0005 (***) = $p \leq 0,0005$).

5 Ergebnisse

5.1 Genetische Charakterisierung der p62^{Δ69-251}-Maus

Die in dieser Arbeit charakterisierte p62-Mauslinie (im Weiteren p62^{Δ69-251}-Maus) wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Gessner, Universitätsklinikum Erlangen, Abteilung für Infektionsbiologie, zur Verfügung gestellt. Im Rahmen der genetischen Untersuchungen der Maus sollte der Verlust des Proteins p62 gezeigt werden. Durch die Isolation von mRNA und DNA aus der Leber des Mausmodells und anschließender Sequenzierungen konnte gezeigt werden, dass -entgegen der Annahme der Arbeitsgruppe Gessner (Bürgis, 2006)- mRNA gebildet wird. Diese kodiert für ein verkürztes p62 Protein, welchem der Analyse nach die Aminosäuren 69 bis 251 fehlen (siehe Abb. 12A). Um festzustellen, ob die mRNA der Maus zu einem verkürzten, stabilen Protein translatiert wird, wurden Western Blot-Analysen verschiedener Organe der p62^{Δ69-251}-Mäuse und Wildtyp- (p62^{wt}-) Mäuse durchgeführt. Detektiert wurde das Protein mit einem Antikörper, der im C-terminalen, intakten Bereich von p62 bindet. Die Abbildung 12B zeigt, dass das verkürzte p62^{Δ69-251} in allen untersuchten Organen exprimiert wird. Die errechnete Größe des truncierten Proteins liegt aufgrund des Verlustes von 182 Aminosäuren rund 40 % unterhalb der Größe des 442 Aminosäuren großen Wildtypproteins. Damit kann eine Proteingröße von etwa 36 kDa erwartet werden. Das detektierte p62-Protein der p62^{Δ69-251}-Mäuse liegt, wie erwartet, auf einer Höhe von etwa 36 kDa. Dem Protein fehlen mit den Aminosäuren 69-251 die TRAF6-Bindedomäne, die ZZ-Domäne und ein Teil der PB1-Domäne (Abb. 12D). Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte mit Hilfe von zwei, bereits in der Arbeitsgruppe A. Gessner etablierten, Primerpaaren. Zur Überprüfung des Genotyps der gezüchteten Mäuse wurden eine Schwanz- oder Ohrbiopsie entnommen, DNA gewonnen und zwei PCRs durchgeführt. Die Primer wurden so ausgeführt, dass man bei der p62^{wt}-PCR nur eine Bande von 300 bp erhält, wenn das Tier das Wildtyp-p62-Gen trägt und bei der *Knockout*-PCR nur eine Bande von 700 bp, wenn das Tier Träger des verkürzten p62-Gens ist. Für ein heterozygotes Tier sind demnach in beiden Ansätzen PCR-Produkte zu erwarten. Die Abbildung 12C zeigt exemplarisch die PCR der Tiere 24L (homozygot p62^{Δ69-251}), 25X (homozygot Wildtyp) und 26RR (heterozygot).

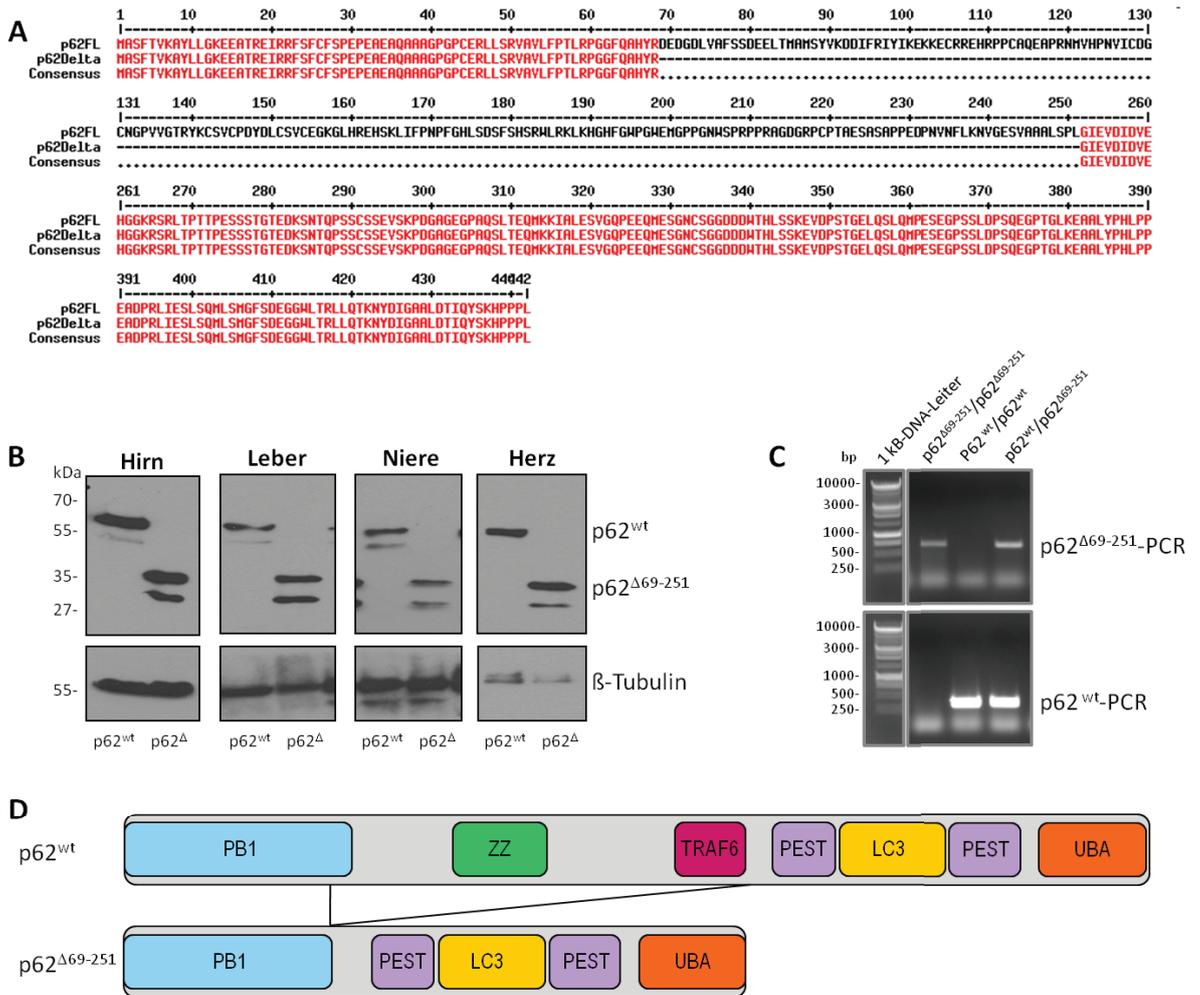


Abb. 12: Die p62^{Δ69-251}-Maus exprimiert ein verkürztes p62 Protein. **A:** Aminosäuresequenz von p62^{wt} (p62FL, fulllength) und p62^{Δ69-251} (p62Delta) nach mRNA-Sequenzierung und Umschreiben in Aminosäuren, im Alignment. Die Proteine sind, bis auf das Fehlen der Aminosäuren 69-251 bei den Delta-Tieren, identisch. **B:** Western Blot von Organlysaten der p62^{wt}- und der p62^{Δ69-251}-Mäuse. In den oberen Western Blots wurde das Protein p62 detektiert. Es konnte gezeigt werden, dass in allen untersuchten Organen p62 exprimiert wird, welches im Fall der p62^{Δ69-251}-Mäuse verkürzt ist und eine Größe von etwa 36 kDa aufweist. β-Tubulin dient als Ladekontrolle. **C:** Foto von zwei Agarosegelen nach erfolgter Genotypisierungs-PCR. In Spur 1 sind die PCR-Produkte einer homozygoten p62^{Δ69-251}-Maus, in Spur 2 einer p62^{wt}-Maus und in Spur 3 einer heterozygoten Maus aufgetragen. Das obere Gel zeigt die p62^{Δ69-251}-PCR, das untere die p62^{wt}-PCR. **D:** Domänenstruktur des p62^{wt}- und des p62^{Δ69-251}-Proteins im Vergleich. Die p62^{Δ69-251}-Maus exprimiert ein Protein, dem die TRAF6-, ZZ- und ein Teil der PB1-Bindedomäne fehlen.

Im Rahmen der genetischen Charakterisierung der Maus wurde bei der Analyse der murinen mRNA von p62^{wt} und p62^{Δ69-251} nicht nur die erwartete cDNA gefunden. Zusätzlich konnte sowohl bei der Wildtypform als auch bei der trunkeierten Form der p62^{Δ69-251}-Maus eine verkürzte p62-cDNA gefunden werden (vgl. Abb. 13A). Hierbei handelt es sich um eine

Spleißvariante, die nicht exakt dem Verlust eines Exons, sondern nur der zweiten Hälfte des Exons 7 entspricht (im Weiteren als Exon 7b bezeichnet). Sie ist bislang nicht weiter publiziert oder charakterisiert. Der berechnete Größenverlust, der durch das Fehlen von des Exon 7b verursacht wird, liegt bei etwa 6 kDa. Damit entspricht die Größe der Spleißvariante exakt der Bande, die sich im Western Blot unterhalb der eigentlichen p62-Bande befindet und durch den C-terminalen Antikörper erkannt wird. Die Expression der Spleißvariante scheint jedoch in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark zu sein (siehe Abb. 12B). Eine entsprechende Bande konnte auch in Geweben von Ratte und Mensch nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Vergleicht man die Sequenz des fehlenden Stücks des Proteins p62 über die verschiedenen Spezies hinweg, so kann man erkennen, dass diese Region des Gens, aber besonders des Proteins hoch konserviert ist. Eine Zusammenstellung der Analogien der Sequenzen verschiedener Spezies ist in der Tabelle der Abbildung 13B dargestellt. Der vordere, nicht herausgespleißte Teil des Exon 7 dient als LC3-Bindedomäne (Pankiv et al., 2007). Es ist somit von besonderem Interesse, die Bindungseigenschaften der Spleißvariante von p62 zu dem Autophagozytose Markerprotein LC3 zu untersuchen. Vorversuche in Form von 3xFlag-Pulldowns ergaben die Tendenz zu einer verringerten Bindekapazität zu endogenem LC3 von p62^{-Exon7b} im Vergleich zu dem Wildtypprotein (Daten nicht gezeigt).

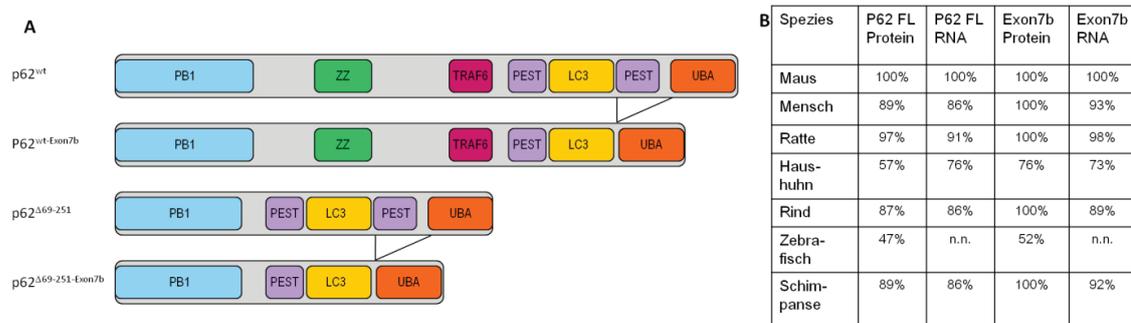


Abb. 13: Spleißvariante p62^{-Exon7b}. **A:** Domänenstruktur der beschriebenen p62-Varianten. Von oben nach unten: p62^{wt}, p62^{wt-Exon7b}, p62^{Δ69-251}, p62^{Δ69-251-Exon7b}. Erstellt anhand der mRNA-Isolation, PCR und Sequenzierung von angefertigter cDNA. Es liegt eine identische Spleißvariante für p62^{wt} und p62^{Δ69-251} vor, die sich durch den Verlust des hinteren Teils des Exons 7 darstellt. **B:** Die dargestellte Tabelle zeigt einen Vergleich der Aminosäure- und mRNA-Sequenzen von p62^{wt} und dem Exon 7b des Proteins der Maus mit verschiedenen anderen Spezies. P62^{wt} (p62 FL, fulllength) weist über die Spezies Homologien auf; das Exon 7b ist auf Proteinebene aller untersuchten Säugetiere sogar identisch.

5.2 Interaktionsstudien mit dem deletierten Protein p62^{Δ69-251}

Im Rahmen der genetischen Charakterisierung der p62^{Δ69-251}-Maus konnte gezeigt werden, dass ein verkürztes p62-Protein nicht nur gebildet und stabil exprimiert wird, sondern dass es sogar posttranslational gespleißt wird. Um zu untersuchen, welche Interaktionspartner von p62 an das trunkierte Protein p62^{Δ69-251} binden, wurden das murine p62^{wt} und das murine p62^{Δ69-251} nach mRNA-Isolation mittels PCR aus cDNA gewonnen. Im Weiteren wurden Konstrukte zur Herstellung von 3xFlag-Fusionsproteinen kloniert. Mit Hilfe des 3xFlag-Tags können die Fusionsproteine fest an eine immobile Phase (*Beads*), welche mit einem anti-Flag-Antikörper (*M2-Beads*) versehen sind, gekoppelt werden, und es können nach stringentem Waschen ganze Proteinkomplexe aufgereinigt werden (Colwill et al., 2006). Es wurden HEK 293T-Zellen parallel mit dem Leervektor V180 (nur 3xFlag), 3xFlag-p62^{wt} und 3xFlag-p62^{Δ69-251} transfiziert. Die Zellen wurden 2,5 Tage nach der Transfektion lysiert und es erfolgte ein 3xFlag-Pulldown. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit spezifischen Antikörpern immunologisch gefärbt. Dieses Experiment wurde für jeden der untersuchten Interaktionspartner in mindestens drei unabhängigen Ansätzen mit den jeweils drei unterschiedlich transfizierten HEK-Zelllysaten durchgeführt. Zusätzlich wurden Ansätze auf große SDS-Gele (20 x 20 cm) aufgetragen und nach der Elektrophorese mit Coomassie gefärbt (siehe Abb. 14). Nach der Optimierung wurden 3xFlag-Pulldown-Gesamtansätze und Einzelbanden an die Arbeitsgruppe für Biomolekulare Massenspektrometrie der Ruhr-Universität Bochum gesendet, welche diese Proben massenspektrometrisch analysierte.

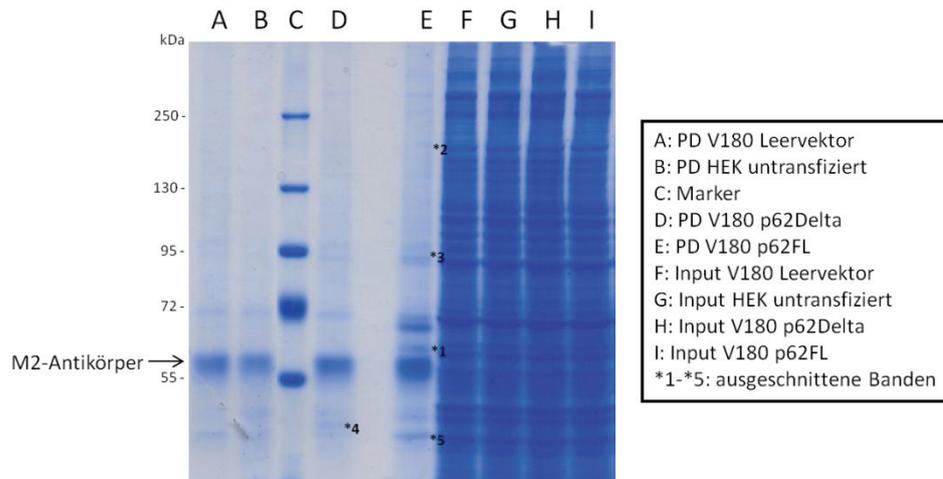


Abb. 14: 3xFlag-Pulldown-Assay mit 3xFlag-p62^{wt} und 3xFlag-p62^{Δ69-251} aus transfizierten HEK-Lysaten. Coomassie gefärbtes SDS-Gel mit Proben nach einem 3xFlag-Pulldown (PD). In den Spuren A und B sind *Pulldowns* mit Kontrolllysaten, in D und E die eigentlichen *Pulldowns* aufgetragen. Die Spuren F-I zeigen den *Input*. Die Sternchen und Zahlen geben Banden an, die nur bei dem 3xFlag-p62^{wt}-*Pulldown* oder nur bei dem 3xFlag-p62^{Δ69-251}-*Pulldown* auftraten.

Zudem erfolgten Lokalisationsstudien in primär isolierten Fibroblasten von p62^{wt} und p62^{Δ69-251}-Mäusen. Diese Zellen lassen sich relativ einfach isolieren und über einen längeren Zeitraum kultivieren. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzen lässt sich das endogene Protein färben. Man läuft durch die Nutzung primärer Zellen nicht Gefahr, Artefakte durch die Überexpression eines Proteins in einer Reporterzelllinie zu studieren. Hinzu kommt, dass durch die Bildung von Homo-Oligomeren das trunkierte p62 mit dem endogenen Wildtypprotein interagiert und auf diese Weise eventuell keine Unterschiede zwischen dem p62^{wt} und dem p62^{Δ69-251} im artifiziellen System sichtbar wären.

5.2.1 Klonierung von p62^{wt}- und der p62^{Δ69-251}-Konstrukten

Um die Bindungseigenschaften des verkürzten p62 im Vergleich zu der Wildtypform zu studieren, wurden DNA-Konstrukte der jeweiligen Proteine verwendet. Hierfür wurde aus Leberstücken von p62^{wt}- und p62^{Δ69-251}-Mäusen RNA gewonnen und in cDNA transkribiert. Mit einer Gradienten-PCR (Temperaturgradient von 45°C bis 65°C) konnte die jeweilige p62-cDNA amplifiziert werden. In Abbildung 15 ist exemplarisch ein Agarosegel der PCR mit cDNA der p62^{Δ69-251}-Maus dargestellt. Zusätzlich zu der vollständigen cDNA wurde bei

beiden p62-Konstrukten eine Spleißvariante, ohne das Exon 7b gefunden (vgl. 5.1, Genetische Charakterisierung der p62^{Δ69-251}-Maus).

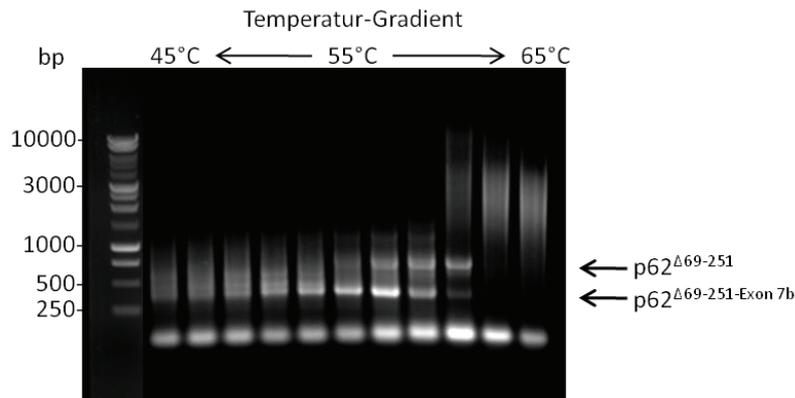


Abb. 15: Gradienten-PCR zur Klonierung von murinem p62. Agarosegel, auf das die Proben einer Gradienten-PCR aus cDNA der p62^{Δ69-251}-Mäuse zur Klonierung von p62^{Δ69-251} aufgetragen wurden. Besonders gute PCR-Bedingungen bestanden bei einer *Annealing*-Temperatur zwischen 52°C und 58°C. Die obere Bande zeigt die cDNA von p62^{Δ69-251}, die untere Bande zeigt die cDNA von der Spleißvariante p62^{Δ69-251}-Exon 7b. Die Gradienten-PCR des Wildtyps zeigte ein entsprechendes Bild.

5.2.2 Proteindegradations-assoziierte Interaktionen

P62 spielt eine Schlüsselrolle in der Proteindegradation, indem es ubiquitinierte Proteine bindet und sie einem Abbauweg zuleitet. Aufgrund der Sequenzanalysen des trunkierten p62^{Δ69-251} konnte gezeigt werden, dass die Domänen, die für die Proteindegradation notwendig sind, noch existieren. Die Funktionalität dieser Domänen wird im Folgenden beschrieben.

5.2.2.1 Interaktion von p62^{Δ69-251} und Ubiquitin

Die Bindung von ubiquitinierten Proteinen an die UBA von p62 ist essentiell für die Beteiligung des Proteins an der Proteindegradation. Zur Untersuchung der Interaktion von p62^{Δ69-251} mit Ubiquitin wurde zunächst ein Ubiquitin-*Pulldown* durchgeführt. Hierzu wurde Ubiquitin-Sepharose mit Leberlysaten von p62^{wt}- und p62^{Δ69-251}-Mäusen inkubiert, gewaschen und für die gelelektrophoretische Analyse vorbereitet. Zusätzlich zu den *Pulldown*-Proben wurden die Leberlysate (*Input*) aufgetragen, um sicher zu stellen, dass ursprünglich vergleichbare Mengen der Lysate eingesetzt wurden. Nach dem Blotting der SDS-Gele erfolgte die Detektion von p62. Die Abbildung 16A zeigt exemplarisch einen Western Blot der durchgeführten Ubiquitin-Sepharose-Interaktionsstudie. Sowohl das

Wildtyp-Protein, als auch das verkürzte p62^{Δ69-251} kann mit der Ubiquitin-Sepharose aus dem jeweiligen Leberlysate aufgereinigt werden, also an Ubiquitin binden. Darüber hinaus wurden HEK 293T-Zellen mit dem 3xFlag Leervektor V180, mit dem 3xFlag-p62^{wt}-Konstrukt oder dem 3xFlag-p62^{Δ69-251}-Konstrukt transfiziert und nach der Lyse einem 3xFlag-*Pulldown* unterzogen. Western Blots der Zelllysate und der aufgereinigten *Beads* aus den *Pulldown*-Experimenten wurden mit einem Antikörper gegen ubiquitinierte Proteine (FK2) gefärbt. Die Abbildung 16B zeigt exemplarisch die Detektion ubiquitiniertes Proteine bei den *Pulldowns* mit p62^{wt} und p62^{Δ69-251} und dem Leervektor. Das Signal der unspezifisch bindenden ubiquitinierten Proteine an die *Beads* (Spur 4) ist deutlich geringer als bei der Bindung an die beiden 3xFlag-markierten p62-Varianten (Spuren 5 und 6).

Bei den detektierten Doppelbanden von p62^{wt} bzw. p62^{Δ69-251} handelt es sich um das eigentliche Protein (obere Bande) und ein Abbauprodukt (untere Bande). Dieses konnte durch die Färbung der Membranen mit einem Antikörper gegen das Flag-*Tag* (M2) bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich zu dem Nachweis der Ubiquitin-p62^{Δ69-251}-Interaktion in *in vitro* Studien wurden Immunfluoreszenzaufnahmen von primär isolierten Fibroblasten der p62^{wt}- und der p62^{Δ69-251}-Mäuse angefertigt, um eine Co-Lokalisation ubiquitiniertes Proteine mit p62 zu zeigen. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen polyubiquitiniertes Proteine und gegen p62 gefärbt. Es wurden Zellen unter normalen Kultivierungsbedingungen und nach Zugabe der Drogen MG132 oder Bafilomycin gefärbt. MG132 ist ein Proteasom-Inhibitor, der zur Anreicherung ubiquitiniertes Proteine führt. Bafilomycin ist ein Inhibitor der Autophagozytose. Es wurde erwartet, dass die Inhibition eines Proteindegredations-Weges eine Anreicherung p62- und Ubiquitin-positiven Aggregaten nach sich zieht. In allen Fällen unterschieden sich die Färbungen von p62^{wt}- und p62^{Δ69-251}-Zellen nicht deutlich voneinander. Es war in keinem der Experimente eine großflächige Co-Lokalisation von p62 und ubiquitiniertes Proteinen zu verzeichnen. Dennoch sind vereinzelte punktierte Strukturen zu erkennen, die für beide Proteine positiv sind. Immunfluoreszenzaufnahmen unter Kontrollbedingungen sind in Abbildung 16C dargestellt.

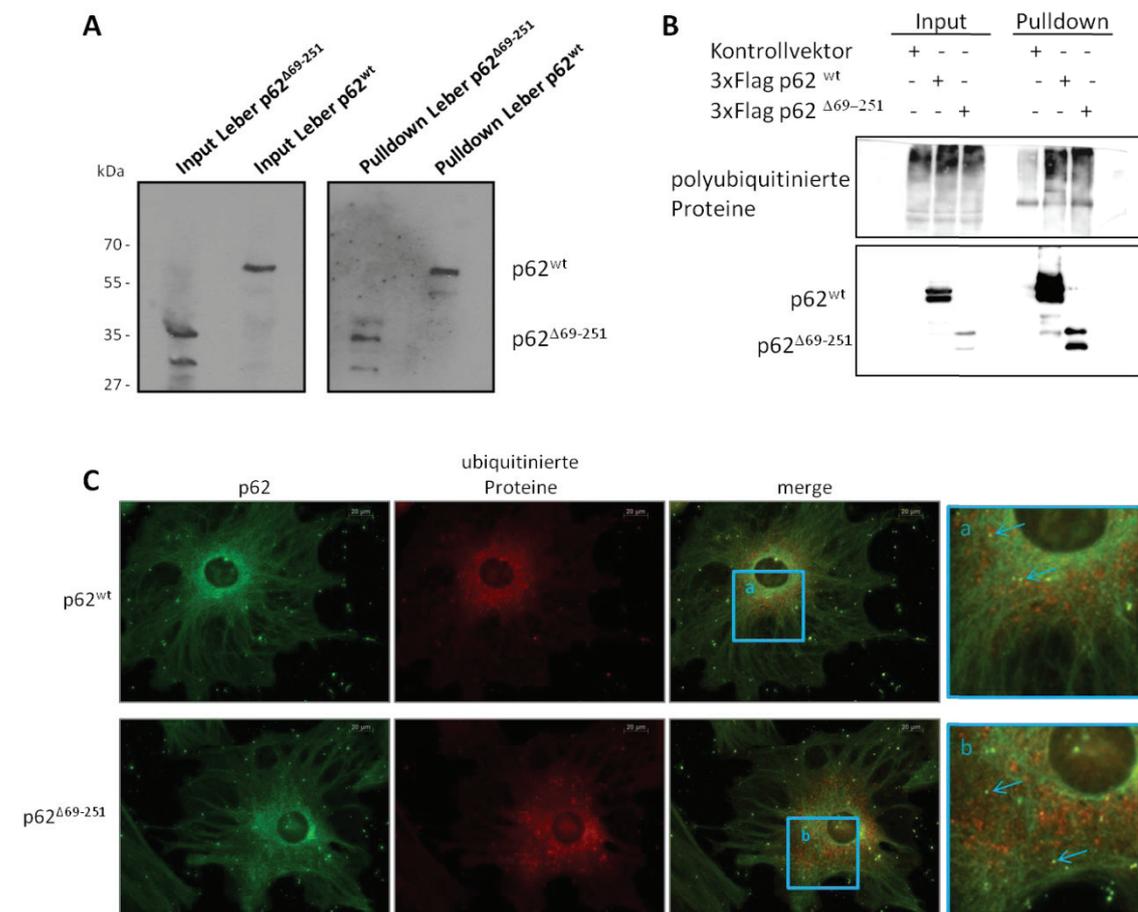


Abb. 16: p62^{Δ69-251} ist in der Lage, mit ubiquitinierten Proteinen zu interagieren. **A:** Western Blot eines *Pulldown*-Experiments mit Ubiquitin-Sepharose und Leberextrakten von Wildtyp (p62^{wt})- und p62^{Δ69-251}-Mäusen. Gefärbt wurde mit einem Antikörper gegen p62. Die jeweils linke Spur zeigt das trunkierte Protein p62^{Δ69-251}, die jeweils rechten Spur das Wildtypprotein p62^{wt}. Sowohl das trunkierte, als auch das Wildtypprotein konnten aus Leberextrakten von Mäusen mit Hilfe von Sepharose-gekoppeltem Ubiquitin aufgereinigt werden. N = 3 **B:** Western Blot eines 3xFlag-*Pulldowns* (Spuren 4-6). Mit aufgetragen wurde der *Input* der transfizierten Zellen (Spuren 1-3). In dem oberen Abbildungsabschnitt wurde mit einem Antikörper gegen ubiquitinierte Proteine, in dem unteren Abschnitt wurde mit einem Antikörper gegen p62, detektiert. P62^{wt} und p62^{Δ69-251} sind in der Lage, ubiquitinierte Proteine zu binden N = 5 **C:** Immunfluoreszenz primär isolierter, muriner Fibroblasten mit Antikörpern gegen ubiquitinierte Proteine (Mitte, rot) und p62 (links, grün). Rechts ist eine Abbildung des Mischbildes (*merge*) aus grün und rot dargestellt. **a** und **b** zeigen vergrößerte Ausschnitte der Mischbilder. Es sind Zellen der Wildtypmaus (obere Bilder, p62^{wt}) und der p62^{Δ69-251}-Maus dargestellt. Die Pfeile zeigen punktförmige Strukturen, die sowohl für p62, als auch für ubiquitinierte Proteine positiv sind.

Es konnte gezeigt werden, dass das trunkierte p62^{Δ69-251}, ebenso wie p62^{wt} in der Lage ist, ubiquitinierte Proteine zu binden. Es ist jedoch nicht bekannt, ob p62 selbst ubiquitiniert wird oder nur mit ubiquitinierten Proteinen interagiert. Zum Nachweis der Ubiquitinierung

von Proteinen wurde eine stabile, murine Podozytenzelllinie (K8) hergestellt, die ein dreifach *getagtes* Ubiquitin exprimiert (HBT-ubi-EGFP). Bei den drei *Tags* handelt es sich um ein EGFP-*Tag*, welches der Expressionskontrolle dient und intrazellulär von Ubiquitin abgetrennt wird, und um zwei *Tags* die zur Aufreinigung dienen. Einerseits ein HIS-*Tag*, welches an Ni-NTA-Agarose bindet, andererseits ein Biotin-*Tag*. So ist eine zweistufige, sehr saubere Auftrennung möglich.

Unter nativen Bedingungen können bei einem *Pulldown*, bei dem an dem transduzierten Ubiquitin „gezogen“ wird, sowohl Proteine die mit Ubiquitin interagieren, als auch Proteine, die ubiquitiniert werden an die immobile Phase (*Beads*) binden. Unter denaturierenden Bedingungen werden nur ubiquitinierte Proteine detektiert, da diese kovalent mit Ubiquitin verbunden sind. Zusätzlich zu dem Protein p62 wurde die Ubiquitinierung des Podozyten-Markerproteins α -Actinin 4 untersucht. Die Abbildung 17 zeigt Western Blots von *Pulldowns*, die unter nativen (A) und denaturierenden (B) Bedingungen durchgeführt wurden. Detektiert wurde mit Antikörpern gegen p62 und α -Actinin 4. Als Kontrolle wurden *Pulldown-Assays* mit der untransduzierten murinen Podozytenzelllinie K8 durchgeführt, um unspezifische Bindungen auszuschließen.

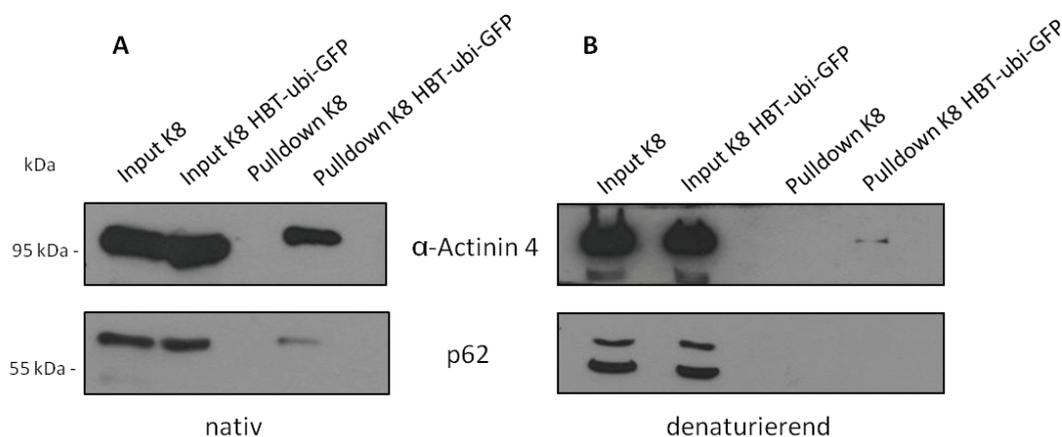


Abb. 17: p62 bindet Ubiquitin, wird selbst jedoch nicht ubiquitiniert. A: Western Blots mit *Pulldown*-Lysaten unter nativen Bedingungen mit HBT-ubi-EGFP-K8-Lysaten und Kontrollzelllysaten. Als Ladungskontrolle wurde der *Input* (Lysate vor *Pulldown*, Spuren 1 und 2) aufgetragen. Detektiert wurde mit Antikörpern gegen α -Actinin 4 und p62. **B:** Western Blots mit *Pulldown*-Lysaten unter denaturierenden Bedingungen mit HBT-ubi-EGFP-K8-Lysaten und Kontrollzelllysaten. Als Ladungskontrolle wurde der *Input* (Lysate vor *Pulldown*, Spuren 1 und 2) aufgetragen. Detektiert wurde mit Antikörpern gegen α -Actinin 4 und p62. N = 3

Die Ergebnisse der *Pulldown*-Versuche unter nativen und denaturierenden Bedingungen zeigen für das Protein α -Actinin 4 eine Bindung an Ubiquitin. Das Protein p62 konnte nur unter nativen Bedingungen mit Ubiquitin an der Matrix immobilisiert werden. Hieraus folgt, dass p62 zwar ubiquitinierte Proteine bindet, selbst jedoch nicht ubiquitiniert wird. Im Gegensatz hierzu wurde gezeigt, dass das Protein α -Actinin 4 ubiquitiniert wird, da es auch unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt werden konnte. Für das Wildtypprotein p62^{wt} konnte keine Ubiquitinierung festgestellt werden. Deswegen wurden die entsprechenden Untersuchungen nicht für das trunkierte Protein p62 ^{Δ 69-251} durchgeführt.

5.2.2.2 Interaktion von p62 ^{Δ 69-251} und LC3

LC3 ist ein Protein, welches in der Autophagozytosemembran verankert ist. Durch die Interaktion mit p62 können ubiquitinierte Proteine der selektiven Autophagozytose zugeleitet werden. Die LC3-Interaktionsdomäne von p62 (Aminosäuren 321 bis 342) liegt in dem hinteren Bereich von p62, der bei der Deletionsmutante p62 ^{Δ 69-251} noch intakt ist. Für die Interaktionsstudien von LC3 und p62 ^{Δ 69-251} wurden Immunfluoreszenzaufnahmen primär isolierter Fibroblasten und Podozyten von Wildtyp- und p62 ^{Δ 69-251}-Mäusen mit Antikörpern gegen p62 (grün) und LC3 (rot) angefertigt. Die Zellen wurden unter Kontrollbedingungen und nach der Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 und dem Autophagozytose-Inhibitor Bafilomycin gefärbt. Entsprechende Aufnahmen von p62^{wt}- und p62 ^{Δ 69-251}-Zellen wurden jeweils mit identischen Belichtungsstärken und -zeiten aufgenommen. Exemplarisch zeigt die Abbildung 18 gefärbte Fibroblasten-Zellen der Mäuse beider Genotypen nach einer Behandlung mit Bafilomycin. Dieser Stimulus verhindert die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen. Es kommt zu einer Anreicherung LC3-positiver Vesikel in punktierten Strukturen.

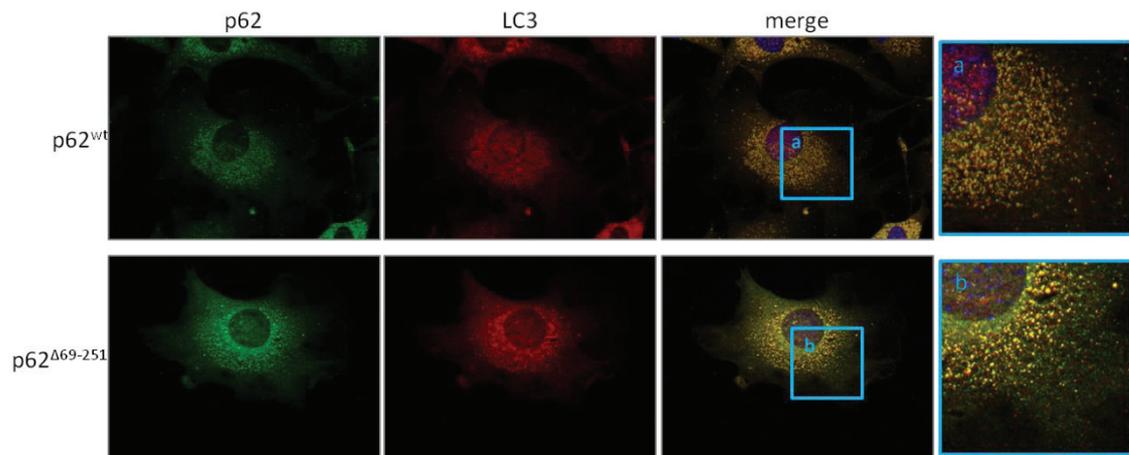


Abb. 18: $p62^{\Delta69-251}$ liegt nach Bafilomycin-Behandlung co-lokalisiert mit LC3 vor. Immunfluoreszenzaufnahmen primär isolierter Fibroblasten der Wildtypmaus (obere Bilder, $p62^{wt}$) und der $p62^{\Delta69-251}$ -Maus nach Bafilomycin-Behandlung. Gefärbt wurde mit einem Antikörper gegen p62 (links, grün) und gegen LC3 (Mitte, rot). Rechts ist eine Abbildung des Mischbildes (*merge*) aus grün und rot und dem Kernfarbstoff DAPI (blau) dargestellt. Die Bilder **a** und **b** zeigen vergrößerte Ausschnitte der Mischbilder, in denen eine deutliche Co-Lokalisation von LC3 und $p62^{wt}$ bzw. $p62^{\Delta69-251}$ in punktierten Strukturen zu erkennen ist.

Es ist deutlich eine Co-Lokalisation (Gelbfärbung) von $p62^{wt}$ bzw. $p62^{\Delta69-251}$ mit dem Protein LC3 zu erkennen. Auf weitere Interaktionsstudien wurde verzichtet, da aus der Literatur bekannt ist, dass selbst die isolierte LC3-Bindedomäne von $p62^{wt}$ mit LC3 interagiert (Pankiv et al., 2007). In dem Protein $p62^{\Delta69-251}$ liegt eine intakte LC3-Bindedomäne vor (vgl. Abb. 12) und es co-lokalisiert mit LC3. Daraus ist zu schließen, dass auch das trunkierte $p62^{\Delta69-251}$ mit LC3 interagieren kann.

5.2.2.3 Interaktion von $p62^{\Delta69-251}$ mit p62 (Homo-Oligomerisierung von p62)

Um Proteine in Form von Aggregaten zu deaktivieren (Sequestration) bildet p62 Homo-Oligomere. Zur Untersuchung, ob $p62^{\Delta69-251}$ eine intakte PB1-Domäne besitzt, über die es mit sich selbst bzw. $p62^{wt}$ interagieren kann, wurden HEK 293T-Zellen mit einem mCherry- $p62^{wt}$ -Konstrukt in drei unabhängigen Ansätzen entweder mit dem V180-3xFlag Leervektor, dem 3xFlag- $p62^{wt}$ - oder dem 3xFlag- $p62^{\Delta69-251}$ -Konstrukt co-transfiziert. Nach erfolgtem 3xFlag-Pulldown wurden die Proben und der *Input* auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend einer Western Blot-Analyse unterzogen. Im Rahmen der Detektion des Proteins p62 (siehe Abb. 19) war ein gleichmäßiger *Input* des mCherry- $p62^{wt}$ -Fusionsproteins in allen drei Ansätzen zu erkennen. Nach dem *Pulldown* konnte das

mCherry-p62^{wt} sowohl in dem Ansatz mit p62^{wt}, als auch in dem Ansatz mit p62^{Δ69-251} gefunden werden, jedoch nicht bei dem Kontrollexperiment mit dem Leervektor.

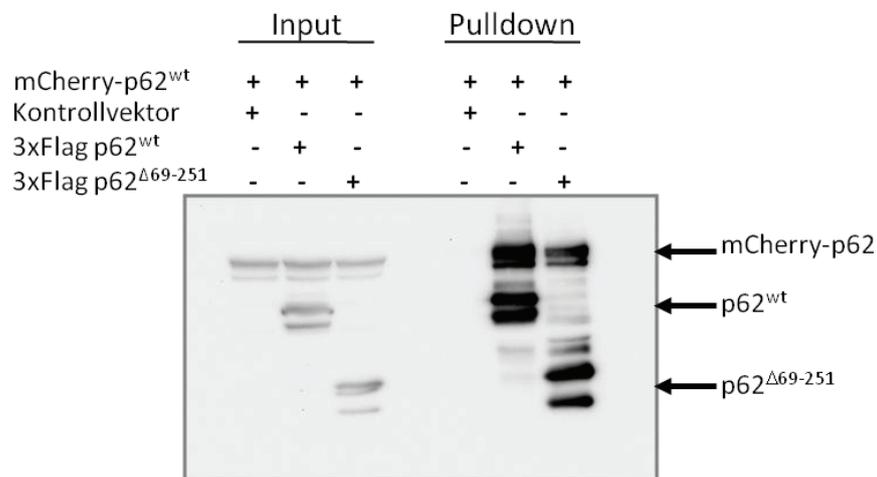


Abb. 19: p62^{Δ69-251} ist in der Lage, mit p62^{wt} zu interagieren. Western Blot eines 3xFlag-Pull-downs bei dem Lysate co-transfizierter HEK-Zellen eingesetzt wurden, die jeweils mCherry-p62^{wt} und den V180-3x-Flag-Leervektor (Kontrollvektor, Spur1), 3xFlag-p62^{wt} (Spur 2) oder 3xFlag-p62^{Δ69-251} (Spur 3) exprimierten. In den Spuren 4-6 sind die entsprechenden Pull-down-Extrakte aufgetragen. Es wurde mit einem Antikörper gegen p62 detektiert. N = 4

Die Aufreinigung von mCherry-p62^{wt} mit dem p62^{wt}- und dem p62^{Δ69-251}-Fusionsproteinen zeigt, dass p62^{Δ69-251} in der Lage ist, Homo-Oligomere zu bilden und auf diese Weise (ubiquitinierte) Proteine zu sequestrieren.

5.2.3 Signaltransduktions-assozierte Interaktionen

P62 spielt eine Rolle bei der Signaltransduktion als Adaptermolekül an Rezeptoren (u.a. über TRAF6) und bei der sich anschließenden NF-κB-Antwort, durch die Phosphorylierung von IKK über aPKC. Zusätzlich ist p62 an der Aktivierung von den MAP-Kinasen ERK1 und p38 beteiligt. Die Funktionalität einiger für die Signaltransduktion bedeutender Domänen von p62^{Δ69-251} wird im Folgenden beschrieben.

5.2.3.1 Interaktion von p62^{Δ69-251} und TRAF6

Die TRAF6-Bindedomäne von p62, die eine direkte Interaktion mit TRAF6 ermöglicht, liegt in dem Bereich, der bei dem trunkierten p62^{Δ69-251} fehlt. Das Protein TRAF6 wird selbst ubiquitiniert und kann in dieser Form zusätzlich indirekt an die Ubiquitin-Bindedomäne von p62 binden. Um zu untersuchen, inwieweit noch eine Bindung von p62 zu TRAF6 möglich ist, obwohl die Aminosäuren 69-251 fehlen, wurden 3xFlag-Pull-downs mit dem

V180-Leervektor, 3xFlag-p62^{wt} und 3xFlag-p62^{Δ69-251} durchgeführt. Hierzu wurden Lysate von HEK-Zellen eingesetzt, die das jeweilige 3xFlag-Protein exprimieren. Nach dem *Pulldown* wurden die Proben und der entsprechende *Input* auf ein SDS-Gel aufgetragen und geblottet. Anschließend wurde endogenes TRAF6 und überexprimiertes p62 mit Hilfe von Antikörpern detektiert. Die Abbildung 20A zeigt einen solchen Western Blot. Es ist bei gleichem *Input* eine deutliche Bindung von TRAF6 an p62^{wt} zu erkennen, jedoch nur eine sehr schwache bei der trunkierten Form des Proteins. Diese ist wahrscheinlich auf eine indirekte Interaktion zurückzuführen. Hinzu kommt, dass p62^{Δ69-251} mit dem endogenen p62^{wt} interagieren kann, welches seinerseits wiederum eine intakte TRAF6-Bindedomäne aufweist. In der Kontrollspur ist kein TRAF6 detektiert worden.

Zusätzlich zu den *Pulldown*-Experimenten wurden Immunfluoreszenzaufnahmen von primär isolierten p62^{wt}- und p62^{Δ69-251}-Fibroblasten mit Antikörpern gegen p62 (grün) und TRAF6 (rot) durchgeführt. Die Abbildung 20B zeigt die Zellen unter normalen Kultivierungsbedingungen. Es ist keine Co-Lokalisation von p62^{Δ69-251} und TRAF6 zu erkennen, wohingegen p62^{wt} partiell mit TRAF6 co-lokalisiert. Durch die Behandlung von Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 werden ubiquitinierte Proteine angereichert. Dieses führt dazu, dass vermutlich auch ubiquitiniertes TRAF6 vermehrt vorliegt. Die Abbildung 20C zeigt, dass p62^{wt} und p62^{Δ69-251} nach MG132-Behandlung ein ähnliches Bild bei der Co-Färbung mit TRAF6 aufweisen.

Im Rahmen der Immunfluoreszenzanalysen der primären Fibroblasten fällt zusätzlich eine veränderte Lokalisation von p62^{Δ69-251} im Vergleich mit p62^{wt} auf. Diese wird in Kapitel 5.4.1 näher beschrieben.

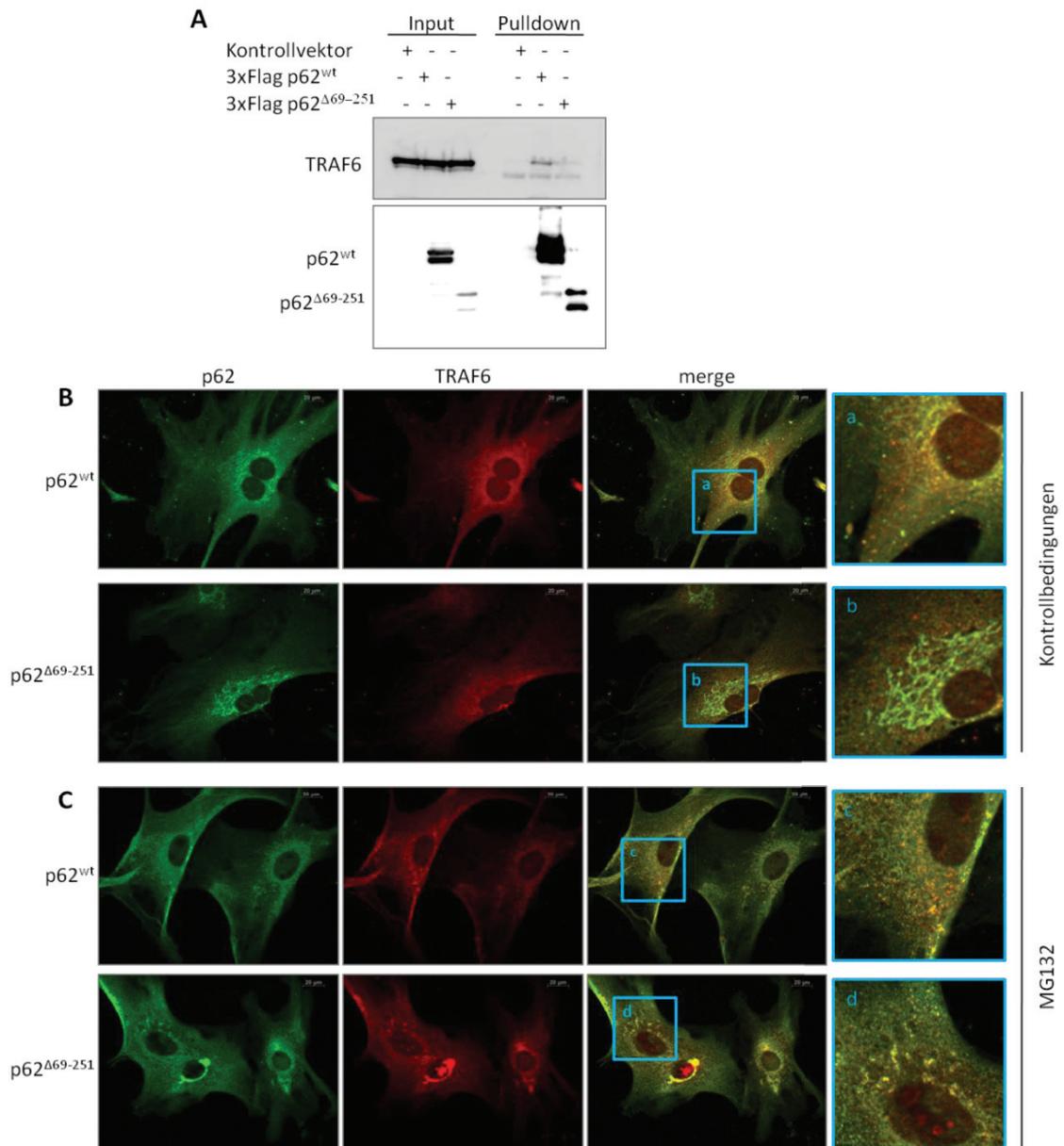


Abb. 20: p62^{Δ69-251} ist nicht in der Lage, direkt mit TRAF6 zu interagieren. **A:** Western Blot eines 3xFlag-Pulldowns (Spuren 4-6). Mit aufgetragen wurde der *Input* der transfizierten Zellen (Spuren 1-3). In dem oberen Blot wurde mit einem Antikörper gegen TRAF6, auf der unteren Membran mit einem Antikörper gegen p62 detektiert. Endogenes TRAF6 kann mit p62^{wt} aufgereinigt werden, jedoch nur sehr schwach mit p62^{Δ69-251}. In der Vektorkontrolle konnte kein TRAF6 detektiert werden. N = 4 **B** und **C**: Immunfluoreszenzaufnahmen primär isolierter Fibroblasten der Wildtypmaus (p62^{wt}) und der p62^{Δ69-251}-Maus mit Antikörpern gegen TRAF6 und p62. Die Zellen wurden unter normalen Bedingungen kultiviert (**B**) oder zuvor mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt (**C**). Gefärbt wurde mit einem Antikörper gegen p62 (links, grün) und gegen TRAF6 (Mitte, rot). Rechts ist eine Abbildung des Mischbildes (*merge*) aus grün und rot dargestellt. **a**, **b**, **c** und **d** zeigen vergrößerte Ausschnitte der Mischbilder. Unter normalen Kultivierungsbedingungen ist lediglich bei den Wildtypzellen eine Co-Lokalisation von p62 und TRAF6 zu erkennen, nicht jedoch bei den Zellen der p62^{Δ69-251}-Maus. Die partielle Co-Lokalisation nach MG132-Behandlung von der jeweiligen p62-Form und TRAF6 ist vermutlich auf eine verstärkte

Anreicherung von ubiquitiniertem TRAF6 zurückzuführen und durch eine hiermit einhergehende indirekte Interaktion über die p62-UBA zu erklären.

Wie zu erwarten, ist keine direkte Interaktion von p62^{Δ69-251} und TRAF6 nachweisbar, da dem trunkierten Protein die TRAF6-Bindedomäne fehlt. Eine indirekte Interaktion über die UBA mit einer ubiquitinierten Form von TRAF6 ist denkbar.

5.2.3.2 Interaktion von p62^{Δ69-251} aPKCζ

Die Interaktion von p62^{Δ69-251} mit der atypischen Proteinkinase C ζ (aPKCζ) spielt eine wichtige Rolle bei der Rezeptor-vermittelten NF-κB-Antwort. Hierbei rekrutiert p62 die aPKCζ an den Rezeptor und es kommt in Folge dessen zur aPKC-vermittelten Phosphorylierung von IKK. Über weitere Schritte wird NF-κB freigesetzt, was letzten Endes zur Expression bestimmter Zielproteine führt. Die aPKC-Bindestelle liegt im vorderen Bereich des p62-Proteins.

Da bei dem trunkierten p62^{Δ69-251} lediglich ein kleines Stück der Bindungsstelle von aPKC nicht vorhanden ist, wurde mit Hilfe von 3xFlag-Pulldowns untersucht, ob aPKCζ noch gebunden werden kann. Hierzu wurden HEK 293T-Zellen mit 3xFlag-p62^{wt}, 3xFlag-p62^{Δ69-251} oder dem Leervektor V180 transfiziert. Mit M2-Sepharose wurden die 3xFlag-Proteine aufgereinigt und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach erfolgtem Western Blot wurden die Membranen mit einem Antikörper gegen p62 und einem Antikörper gegen aPKCζ gefärbt.

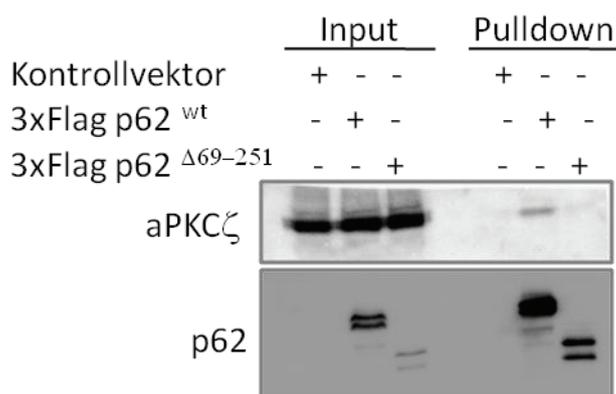


Abb. 21: p62^{Δ69-251} interagiert nicht mit der aPKCζ. Western Blot nach 3xFlag-Pulldown mit Lysaten von transfizierten HEK 293T-Zellen (V180-Leervektor, 3xFlag-p62^{wt} oder 3xFlagp62^{Δ69-251}). Detektiert wurde mit einem Antikörper gegen p62 (untere Membran) und mit einem Antikörper gegen die aPKCζ (obere Membran). *Input* in Spuren 1-3, *Pulldown* in Spuren 4-6. N = 3

Die Abbildung 21 zeigt exemplarisch ein solches Experiment. Bei gleichem *Input* konnte die endogene aPKC ζ mit dem 3xFlag-p62^{wt} aufgereinigt werden, nicht jedoch mit dem verkürzten Protein 3xFlag-p62 ^{Δ 69-251}. Daraus lässt sich schließen, dass p62 ^{Δ 69-251} nicht in der Lage ist, mit der atypischen Proteinkinase C zeta zu interagieren.

5.2.3.3 Interaktion von p62 ^{Δ 69-251} und ERK

Die Interaktion des Proteins p62 mit der MAP-Kinase ERK1 erfolgt im vorderen Bereich von p62. Mutationen der Aminosäure 7 führen zum Verlust der Interaktion. Auf funktioneller Ebene wird beschrieben, dass p62 das Protein ERK1 nach der Bindung aggregiert und auf diesem Weg deaktiviert. Ein Fehlen dieser Deaktivierung wird als Ursache für den adipösen Phänotyp der p62-*Knockout*-Maus aus der Arbeitsgruppe um J. Moscat postuliert (Lee et al., 2010; Rodriguez et al., 2006).

Zur Untersuchung, ob das trunkierte p62 ^{Δ 69-251} in der Lage ist ERK1 zu binden, wurden zunächst 3xFlag-*Pulldowns* durchgeführt, bei denen endogenes ERK aus transfizierten (Leervektor, 3xFlag-p62^{wt} bzw. 3xFlag-p62 ^{Δ 69-251}) HEK 293T-Zellen aufgereinigt wurde. Die Abbildung 22A zeigt exemplarisch einen Western Blot mit einem 3xFlag *Pulldown* zur Detektion von ERK1 und 2 (obere Bande ERK1, untere Bande ERK2). Bei gleichem *Input* kann eine deutliche ERK-Bande nach dem *Pulldown* bei 3xFlag-p62^{wt}- und 3xFlag-p62 ^{Δ 69-251} detektiert werden, nicht jedoch mit dem Kontrollvektor. Da in dem *Input* (Spuren 1-3) eine Doppelbande (ERK1 und ERK2) und nach dem *Pulldown* nur eine Einzelbande detektiert wurde, ist es wahrscheinlich, dass p62 nur an eine der beiden ERK-Formen stark bindet.

Aufgrund der sich anschließenden Frage, ob es sich bei der detektierten Form um ERK1 handelt, wurden zusätzliche 3xFlag-*Pulldown*-Experimente mit überexprimiertem ERK1 durchgeführt. Es wurden ein GFP-ERK1-Konstrukt gemeinsam mit dem Leervektor, dem 3xFlag-p62^{wt}- oder dem 3xFlag-p62 ^{Δ 69-251} in HEK 293T-Zellen co-transfiziert. Nach erfolgtem *Pulldown* ist eine deutliche Bindung des *getagten* ERK1 an die Wildtyp- und die trunkierte Form von p62 sichtbar (siehe Abb. 22B). In Immunfluoreszenzaufnahmen von primären Fibroblasten der p62^{wt}- und der p62 ^{Δ 69-251}-Maus zeigen sich nach der Färbung mit Antikörpern gegen p62 und ERK1/2 partielle Co-Lokalisationen der beiden Proteine unter normalen Kultivierungsbedingungen (siehe Abb. 22C). Diese Co-Lokalisationen waren nach einer Hemmung der Autophagozytose mit Bafilomycin deutlich verstärkt, was wahrscheinlich auf eine Anreicherung aggregierter Proteine durch mangelnden Abbau über die Autophagozytose zurückzuführen ist (siehe Abb. 22D). Das Protein p62 ^{Δ 69-251} ist

demnach in der Lage mit ERK1 zu interagieren. Die Immunfluoreszenzaufnahmen der primären Zellen zeigen - auch nach Behandlung mit Bafilomycin - eine Veränderung der Lokalisation der gefärbten Proteine im Vergleich von p62^{wt} und p62^{Δ69-251}. Dennoch liegen beide p62-Formen co-lokalisiert mit ERK in punktierten Strukturen der Zelle vor.

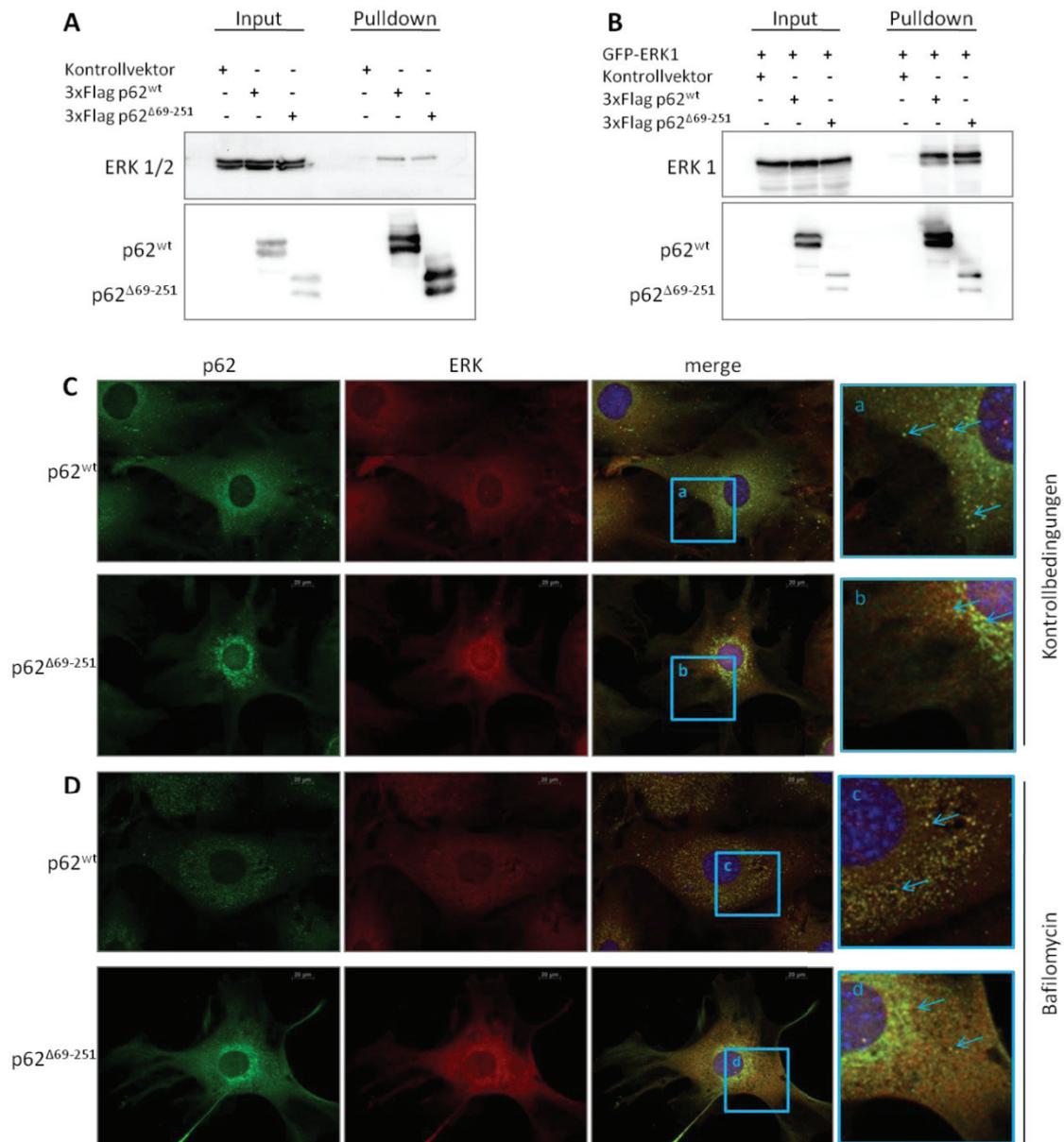


Abb. 22: p62^{Δ69-251} interagiert mit der MAP-Kinase ERK1. **A:** Western Blot eines 3xFlag-Pulldowns (Spuren 4-6). Mit aufgetragen wurde der *Input* der transfizierten Zellen (Spuren 1-3). Auf der oberen Membran wurde mit einem Antikörper gegen ERK1 und 2, in der unteren Hälfte mit einem Antikörper gegen p62 detektiert. Endogenes ERK konnte sowohl mit p62^{wt}, als auch mit p62^{Δ69-251} aufgereinigt werden. N = 5 **B:** Western Blot eines 3xFlag-Pulldowns bei dem Lysate co-transfizierter HEK 293T-Zellen eingesetzt wurden, die jeweils das GFP-ERK1 und den V180 Leervektor (Spur1), 3xFlag-p62^{wt} (Spur 2) oder 3xFlag-p62^{Δ69-251} (Spur 3) exprimierten. In den Spuren 4-6 sind die entsprechenden *Pulldown*-Extrakte aufgetragen. Es wurde mit einem Antikörper gegen ERK1/2 (oben) und einem Antikörper gegen

p62 (unten) detektiert. Bei gleichem *Input* konnte GFP-ERK1 mit 3xFlag-p62^{wt} und 3xFlag-p62^{Δ69-251} aufgereinigt werden, nicht jedoch in der Kontrolle mit dem Leervektor (Spur 4). N = 3 **C** und **D**: Immunfluoreszenzaufnahmen primär isolierter muriner Fibroblasten der Wildtypmaus (p62^{wt}) und der p62^{Δ69-251}-Maus mit Antikörpern gegen ERK1/2 (Mitte, rot) und p62 (links, grün). Die Zellen wurden unter normalen Bedingungen kultiviert (**C**) oder zuvor mit dem Autophagozytose-Inhibitor Bafilomycin behandelt (**D**). Rechts ist eine Abbildung des Mischbildes (*merge*) aus grün und rot dargestellt. **a**, **b**, **c** und **d** zeigen vergrößerte Ausschnitte der Mischbilder. Unter normalen Kultivierungsbedingungen ist sowohl bei den p62^{wt}-Zellen als auch bei den p62^{Δ69-251}-Zellen eine schwache partielle Co-Lokalisation zu erkennen (blaue Pfeile). Diese wird nach der Hemmung der Autophagozytose mit Bafilomycin verstärkt, was wahrscheinlich auf eine Anreicherung p62-positiver Aggregate zurückzuführen ist.

5.2.3.4 Interaktion von p62^{Δ69-251} und p38

Die MAP-Kinase p38 interagiert mit p62, was vermutlich zu einer Aktivierung des Proteins führt. Es wurde beschrieben, dass ein p62-p38-Komplex nach der Aktivierung der p38 MAP-Kinase in den Kern wandert. Für das Protein p62 sind zwei Bindestellen für p38 publiziert, wobei nur eine der beiden eine direkte Interaktion mit p38 vermittelt. Sie liegt in dem trunkierten Bereich von p62^{Δ69-251}. Um zu untersuchen, ob das trunkierte p62^{Δ69-251}, ebenso wie das Wildtypprotein p62^{wt} in der Lage sind p38 zu binden, wurden HEK 293T-Zellen mit HA-p38 und entweder 3xFlag-p62^{wt} oder 3xFlag-p62^{Δ69-251} co-transfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die neben dem p38-Konstrukt mit dem 3xFlag-Leervektor V180 transfiziert wurden. Nach erfolgtem 3xFlag-*Pulldown* wurden die Lysate als *Input*-Kontrolle und die *Pulldown*-Ansätze mit Hilfe von Western Blots analysiert. Hierbei wurden Antikörper gegen p62, p38 und das HA-Tag von p38 eingesetzt. Die Abbildung 23 zeigt, dass HA-p38 lediglich mit p62^{wt} aufgereinigt werden konnte. In der Kontrolle und mit dem trunkierten p62^{Δ69-251} konnte das Protein p38 nicht angereichert werden. Daraus lässt sich schließen, dass p62^{Δ69-251} nicht in der Lage ist, mit p38 zu interagieren.

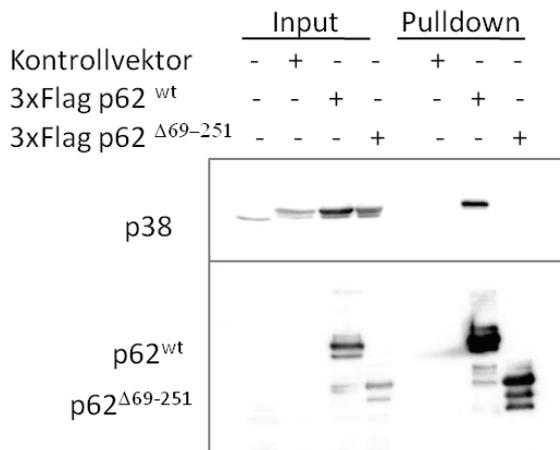


Abb. 23: p62^{Δ69-251} ist nicht in der Lage, mit der MAP-Kinase p38 zu interagieren. Western Blot nach 3xFlag-Pulldown mit Lysaten von co-transfizierten HEK 293T-Zellen mit HA-p38 und entweder dem V180-Leervektor, dem 3xFlag-p62^{wt} oder dem 3xFlag-p62^{Δ69-251}. Detektiert wurde mit einem Antikörper gegen p62 (untere Membran) und mit einem Antikörper gegen die p38 (obere Membran). *Input* in Spuren 2-4, *Pulldown* in Spuren 5-7. Als Transfektionskontrolle wurde in Spur 1 Lysat untransfizierter HEK 293T-Zellen aufgetragen. P38 bindet lediglich an 3xFlag-p62^{wt}. N = 3

5.2.4 Massenspektrometrische Analyse von Interaktionspartnern von p62^{wt} und p62^{Δ69-251}

Pulldown-Assays aus HEK 293T-Zellen wurden als Gesamtansätze mit dem 3xFlag-Leervektor, dem 3xFlag-p62^{wt} oder dem 3xFlag-p62^{Δ69-251} von der Arbeitsgruppe für Biomolekulare Massenspektrometrie der Ruhr-Universität Bochum massenspektrometrisch analysiert. Die Daten wurden dahingehend ausgewertet, dass die Anzahl der Peptide eines jeden identifizierten Proteins für die Glaubwürdigkeit eines Ergebnisses herangezogen wurden. Zusätzlich wurden alle Proteine, die in dem Kontrollansatz gefunden wurden, eliminiert. Eine Auswahl interessanter Interaktionspartner der einzelnen Ansätze ist in Tabelle 15 dargestellt.

Unter anderem sind in den Ansätzen mit dem Fusionsprotein 3xFlag-p62^{wt} und dem Fusionsprotein 3xFlag-p62^{Δ69-251} das Protein Ubiquitin und Untereinheiten des Proteasoms aufgereinigt worden. Diese Ergebnisse bestätigen die vorangegangenen Analysen im Zusammenhang mit der Funktionalität der Proteindegradations-assoziierten Interaktionen von p62^{Δ69-251}. Darüber hinaus konnte in beiden Ansätzen humanes p62 aufgereinigt werden. Hierbei handelt es sich nicht um die eingesetzten Fusionsproteine, da diese murinen Ursprungs sind. Demnach unterstützt die massenspektrometrische Analyse der *Pulldowns* den Befund, dass p62^{Δ69-251} in der Lage ist Homo-Oligomere zu bilden.

Zusätzlich konnte ein interessanter, potentieller, neuer Interaktionspartner von p62^{wt} identifiziert werden, der nicht in dem Ansatz mit p62^{Δ69-251} identifiziert werden konnte. Bei diesem Protein handelt es sich um die E3-Ubiquitinligase UBR1, einem Protein, dass an der N-Ende-Regel der proteasomalen Proteindegradation beteiligt ist.

Tabelle 15: Auswahl der massenspektrometrisch identifizierten Interaktionspartner der p62-Varianten.

Proteinnummer	Beschreibung
Proteine, die sowohl in Ansätzen mit p62 ^{wt} , als auch mit p62 ^{Δ69-251} identifiziert wurden, nicht jedoch in dem Kontrollansatz	
Q13501	p62 (human)
P62988	Ubiquitin
	Verschiedene Untereinheiten des Proteasoms
Proteine, die lediglich in dem Ansatz mit p62 ^{wt} identifiziert wurden	
Q8IWV7	E3 Ubiquitin-Protein-Ligase UBR1
Q9BUF5	Tubulin beta-6 Kette
Proteine, die lediglich in dem Ansatz mit p62 ^{Δ69-251} identifiziert wurden	
P68363	Tubulin alpha-1B Kette

5.3 Phänotypische Charakterisierung der $p62^{\Delta 69-251}$ Maus

In dieser Arbeit wurde eine Mauslinie mit dem beschriebenen Defekt der Aminosäuren 69 bis 251 des Proteins p62 untersucht ($p62^{\Delta 69-251}$). Im Weiteren werden pathophysiologische Parameter des Mausorganismus und verschiedene Organ-bezogene Befunde beschrieben.

5.3.1 Bestimmung pathophysiologischer Parameter der $p62^{\Delta 69-251}$ -Mauslinie

Die Mäuse mit dem beschriebenen Defekt des p62-Gens haben einen C57/Black6 Hintergrund. Sie weisen zunächst keinen offensichtlichen Phänotyp auf. Ihre Lebenserwartung und ihr Paarungsverhalten entsprechen dem von Wildtypmäusen mit gleichem Hintergrund und entsprechenden Haltungsbedingungen. Im Alter entwickeln die $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse jedoch einen adipösen Phänotyp.

5.3.1.1 Gewichtsanalyse

Die Abbildungen 24A und B zeigen Fotos von 14 Monate alten $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäusen. Sie weisen im Vergleich zu Tieren des Wildtyps (jeweils links auf den Bildern) eine offensichtliche Vermehrung des Körperrumfangs auf. Die Entwicklung des adipösen Phänotyps der $p62^{\Delta 69-251}$ Mäuse wurde im Verlauf von 19 Monaten dokumentiert und mit dem Gewicht entsprechend alter Wildtypmäuse verglichen. Eine statistische Auswertung des Gewichtsverlaufs von männlichen und weiblichen Tieren ist in Abbildung 24C und D dargestellt. Die untersuchten männlichen Tiere zeigen ab dem 5. Monat eine signifikante Gewichtszunahme. Die Gewichtszunahme weiblicher Tiere ist ab dem 11. Monat signifikant. Das Gewicht von Wildtyptieren ist nach dem 6. Monat konstant und liegt bei weiblichen Tieren bei rund 25 Gramm, bei männlichen Tieren bei 30 Gramm, wohingegen die homozygoten $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse kontinuierlich zunehmen und ein Maximalgewicht von gut 50 Gramm (Weibchen) bzw. 60 Gramm (Männchen) erreichen. Bei heterozygoten Tieren (nicht dokumentiert), war keine offensichtliche Gewichtszunahme zu beobachten.

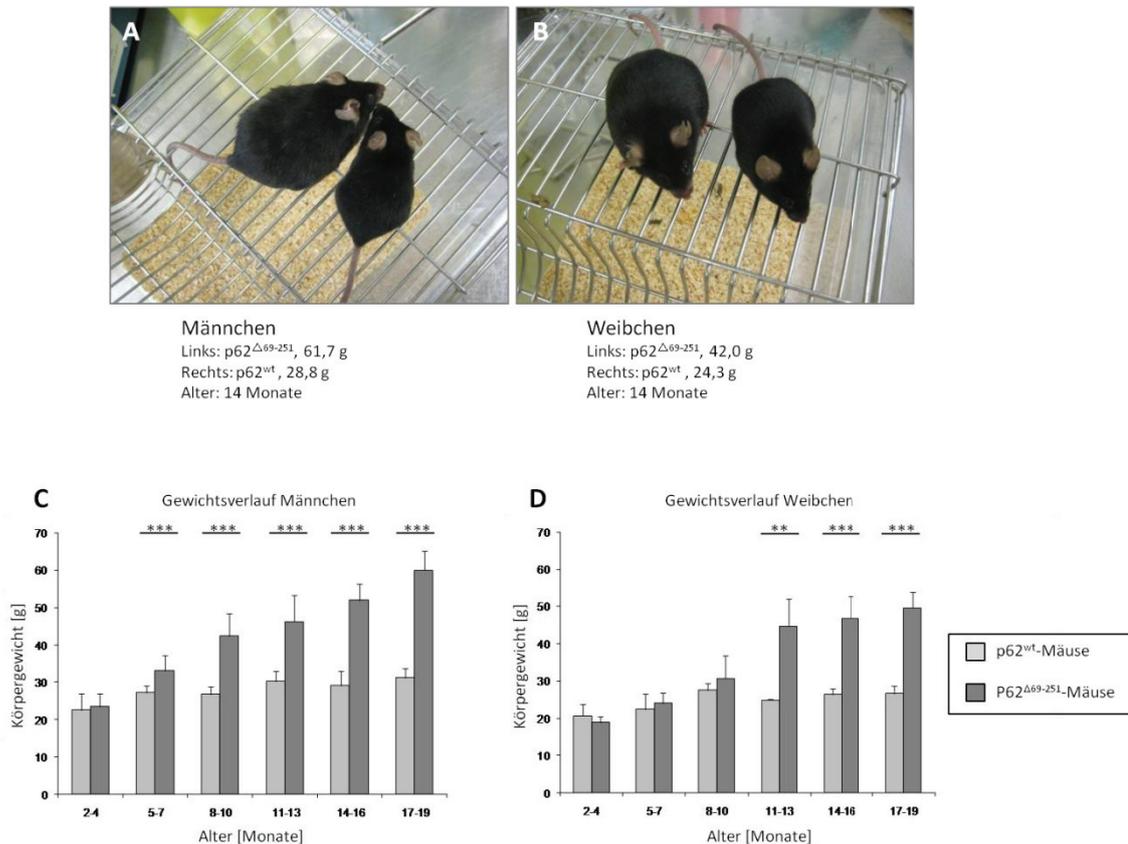


Abb. 24: Die p62^{Δ69-251} Mäuse entwickeln einen altersbedingten adipösen Phänotyp. A und B: Im Alter zeigen die p62^{Δ69-251} Mäuse im Vergleich zu Wildtyptieren eine deutlich erkennbare Volumenzunahme des Körpers. Es sind weibliche und männliche Tiere in einem Alter von 14 Monaten dargestellt. **C und D:** Statistische Auswertung des Körpergewichts im Zeitverlauf. **C** stellt den Gewichtsverlauf männlicher p62^{wt}- und p62^{Δ69-251}-Mäuse bis zu einem Alter von 19 Monaten grafisch dar. Die männlichen p62^{Δ69-251}-Mäuse weisen ab dem 5. Monat eine signifikante Zunahme des Körpergewichts auf. **D:** Die Grafik zeigt den Gewichtsverlauf weiblicher p62^{wt}- und p62^{Δ69-251}-Mäuse bis zu einem Alter von 19 Monaten. Die weiblichen p62^{Δ69-251}-Mäuse weisen ab dem 11. Monat eine signifikante Zunahme des Körpergewichts auf. ** = p ≤ 0,005; *** = p ≤ 0,0005

5.3.1.2 Blutdruck und Herzfrequenz

Zur Untersuchung, ob sich das Fehlen der Aminosäuren 69 bis 251 des Proteins p62 und die damit einhergehende Fettleibigkeit auf Blutdruck und Herzfrequenz auswirken, wurden bei Wildtyp- und p62^{Δ69-251}-Gruppen von je 4-5 Mäusen in zwei Altersstufen (10 Monate und 23 Monate alt) nicht invasive Blutdruckmessungen durchgeführt. Es wurden pro Tier 15-30 Einzelmessungen durchgeführt und ausgewertet. Die Anzahl der verwertbaren Einzelmessungen lag zwischen 12 und 20. Die Bildung der Mittelwerte erfolgte für jedes Einzeltier und wurde anschließend innerhalb der jeweiligen Gruppe auf einen Wert gemittelt und die zugehörige Standardabweichung berechnet. Der auf

Grundlage dieser Daten berechneten diastolischen und systolische Blutdruck, sowie der mittlere Arterielle Blutdruck jeder Tiergruppe ist in der Abbildung 25A grafisch dargestellt. Zusätzlich zu den Blutdruckdaten wurde die Herzfrequenz der Tiere aufgezeichnet. Die entsprechenden Daten sind in dem Grafen der Abbildung 25B dargestellt.

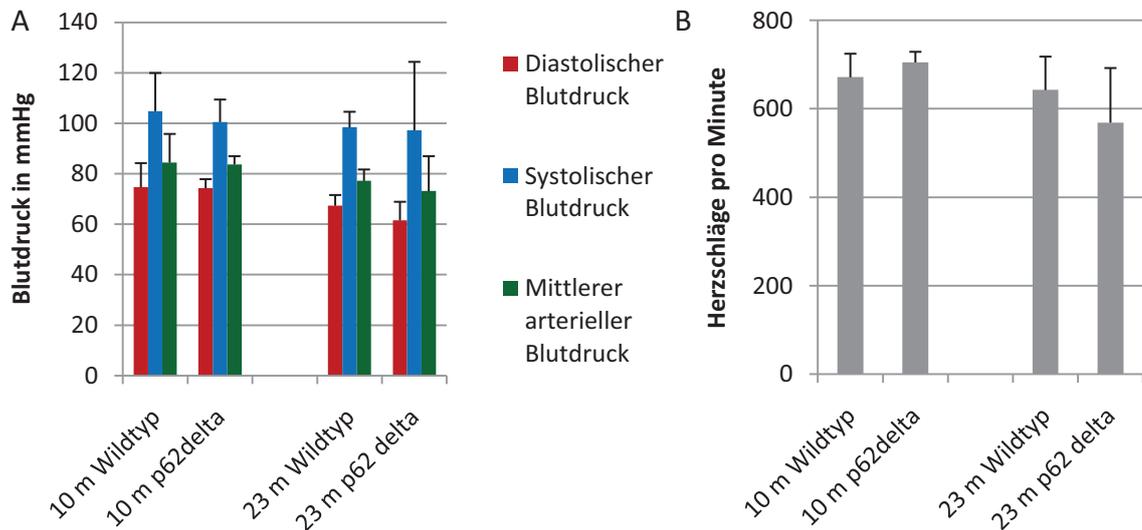


Abb. 25: Blutdruckwerte und Herzfrequenz von $p62^{wt}$ - im Vergleich zu $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäusen. Untersucht wurden Gruppen von 4-5 Mäusen. Die Gruppen bestanden aus 10 Monate alten $p62^{wt}$ - im Vergleich zu $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäusen bzw. 23 Monate alten $p62^{wt}$ - im Vergleich zu $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäusen. **A:** Dargestellt sind diastolischer (rot), systolischer (blau) und mittlerer arterieller (grün) Blutdruck im Mittel mit entsprechenden Standardabweichungen für die untersuchten Tiergruppen. Es treten keine signifikanten Unterschiede des Blutdrucks von $p62^{wt}$ - und $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäusen auf. **B:** Dargestellt ist die mittlere Herzfrequenz pro Minute mit entsprechenden Standardabweichungen für die untersuchten Tiergruppen. Es treten keine signifikanten Unterschiede in der Herzfrequenz auf.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen ermittelt werden. Blutdruck und Herzfrequenz von $p62^{wt}$ - und $p62^{\Delta 69-251}$ -Tieren gleichen Alters sind nahezu identisch. Der Blutdruck lag im Mittel bei einem Wert von 69 zu 100 mmHg, die Herzfrequenz bei 646 Schlägen pro Minute.

5.3.1.3 Blutzucker

Adipositas gilt als Vorerkrankung für Diabetes Mellitus Typ 2. Zur Untersuchung, ob die $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen eine Veränderung des Glukosespiegels im Blut zeigen, wurde die Schwanzvene von Mäusen unterschiedlicher Altersgruppen punktiert und der Glukosespiegel mit Hilfe eines herkömmlichen Blutzuckermessgerätes bestimmt. Die Abbildung 26 zeigt die statistische Auswertung des Blutzuckerspiegels der $p62^{wt}$ und der $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse im Vergleich. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mäusen gemessen werden. Es ist jedoch festzustellen, dass die $p62^{\Delta 69-251}$ -Tiere eine leichte Tendenz zu erhöhtem Blutzucker zeigen.

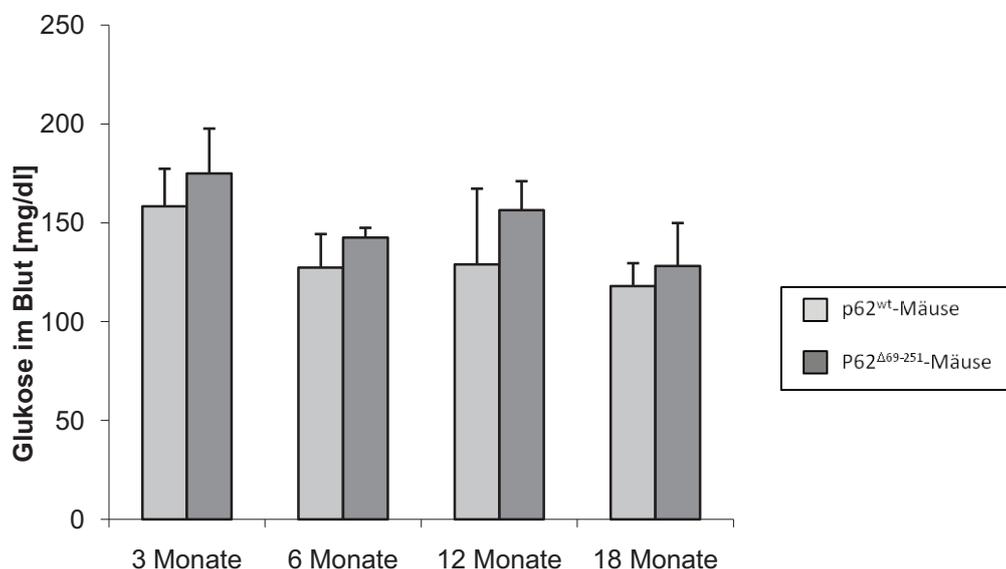


Abb. 26: Blutzucker der $p62^{wt}$ - und $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse. Dargestellt ist der Blutzucker in mg/dl von Mäusen verschiedener Altersgruppen. Die Blutzuckerwerte von $p62^{wt}$ - und $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse unterscheidet sich nicht signifikant. Es wurden jeweils 5 Tiere jeder Altersstufe und jeden Genotyps untersucht. Im Mittel lag der Blutzuckerwert der $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse immer leicht oberhalb desjenigen von gleichaltrigen $p62^{wt}$ -Mäusen. N = 5

5.3.2 Organuntersuchungen der $p62^{\Delta 69-251}$ -Mauslinie

Zur Weitergehenden Untersuchung wurden Organe und Organfunktionen der $p62^{\Delta 69-251}$ -Mauslinie untersucht um weitere Unterschiede zur $p62^{wt}$ -Mauslinie und eventuelle Fehlfunktionen zu analysieren.

5.3.2.1 Makroskopische Untersuchung von Organen

Zur Klärung der Fragestellung, ob die Gewichtszunahme der $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse ausschließlich auf eine Zunahme von Fettgewebe oder auch auf eine Zunahme der Organgewichte bzw. Größe zurückzuführen ist, wurden jeweils von vier 14 Monate alten männlichen $p62^{wt}$ - und $p62^{\Delta 69-251}$ -Tieren die Organe Herz, Leber, Hirn, Milz, Pankreas und Niere entnommen, gewogen und vermessen. In Abbildung 27 sind Fotos der entsprechenden Organe und eine statistische Auswertung der Organgewichte dargestellt. Zur besseren Übersicht wurde das Gewicht auf das durchschnittliche Organgewicht der Wildtypiere normiert. Zur Veranschaulichung der massiven Anreicherung weißen Fettgewebes sind $p62^{wt}$ - und $p62^{\Delta 69-251}$ -Tiere nach Eröffnung des Bauchraums abgebildet.

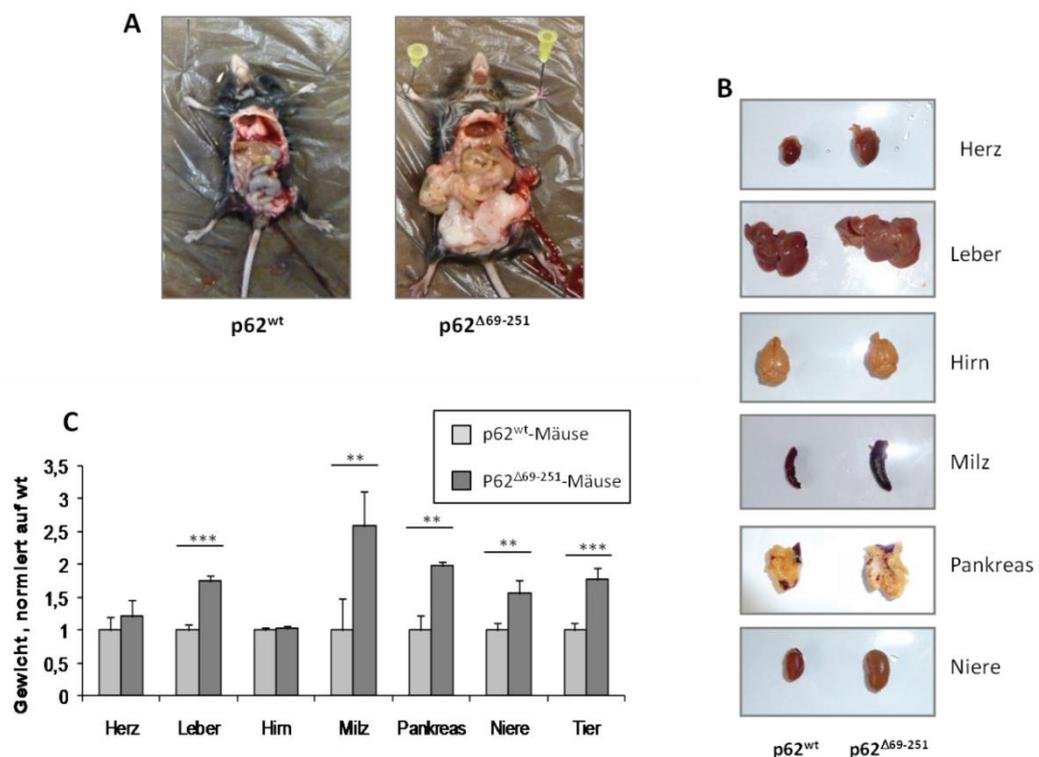


Abb. 27: Makroskopische Organanalyse im Vergleich von $p62^{wt}$ und $p62^{\Delta 69-251}$. **A:** Die Fotos zeigen männliche $p62^{wt}$ - und $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse nach der Eröffnung des Bauchraums. Es ist eine deutliche Zunahme an weißem Fettgewebe bei dem $p62^{\Delta 69-251}$ -Tier zu erkennen. **B:** Repräsentative Fotos von Organen männlicher $p62^{wt}$ - und $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse. Man erkennt eine Volumenzunahme aller untersuchten Organe der $p62^{\Delta 69-251}$ -Tiere, ausgenommen des Gehirns. **C:** Das Diagramm zeigt die statistische Auswertung der Organgewichte von jeweils vier 14 Monate alten männlichen Mäusen. Leber, Milz, Pankreas und Nieren sind signifikant schwerer als bei der Wildtypmaus. Das Gesamtgewicht des Tieres ist ebenfalls signifikant gesteigert. N = 4; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,0005$

Die Abbildung 27C zeigt, dass das Gewicht von Leber, Milz, Pankreas und Niere bei den $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäusen im Vergleich zu dem entsprechenden Wildtyporgan signifikant erhöht ist. Die Fotos der Organe in Abbildung 27B zeigen, dass auch die Größe der Organe, einschließlich der Herzgröße, gesteigert ist. Lediglich das Hirn der $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse ist in Gewicht und Größe unverändert. Die Gewichtssteigerung der $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse ist zudem auf den starken Anstieg von weißem Fettgewebe (Abb. 27A) zurückzuführen.

5.3.2.2 Histologische Untersuchung verschiedener Organe

Um zu untersuchen, ob es sich bei der Gewebeerweiterung der Organe um die Einlagerung von Fettzellen handelt, wurden Organe von 12 Monate alten Wildtyp- und $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäusen perfundiert, entnommen und kryokonserviert. Im Weiteren wurden Kryoschnitte mit einer Schnittdicke von 12 μm angefertigt und mit Oil Red O zur Visualisierung der Fettzellen gefärbt. Zusätzlich wurde eine Kernfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer gemacht um morphologische Besonderheiten erkennen zu können. Die Abbildung 28 zeigt exemplarisch Schnitte der untersuchten Organe.

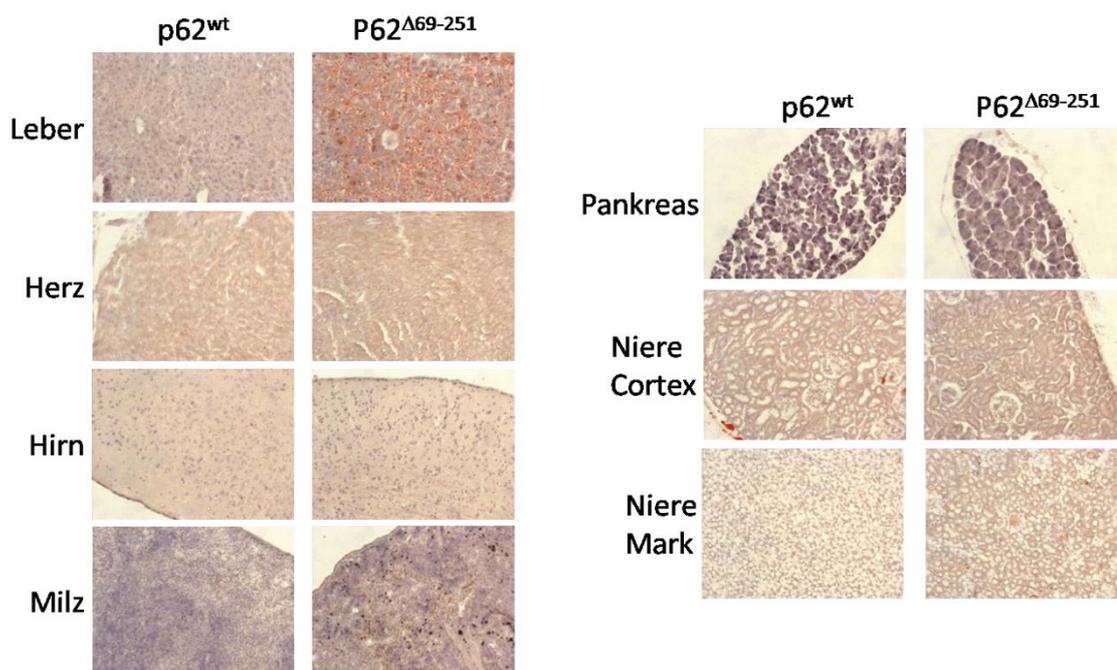


Abb. 28: Histologische Schnitte verschiedener Mausorgane nach Oil Red O-Färbung. Fotos von Organen gleichaltriger Mäuse nach Hämatoxylin- und Oil Red O- Färbung. Die Aufnahmen wurden mit einem Lichtmikroskop mit 20facher Vergrößerung aufgenommen. N = 3

Eine deutliche Anreicherung von Fettzellen im Gewebe ist bei der Leber zu sehen. Die anderen Gewebe zeigen keine so deutliche Zunahme an Fettzellen. Das Nierenmark zeigt morphologische Veränderungen.

5.3.2.2.1 Untersuchungen der Niere und der Nierenfunktion

Da sich bei der Untersuchung des Nierenmarks von Kryoschnitten der p62^{Δ69-251}-Mäuse histologische Veränderungen zeigten, wurden zusätzlich Paraffinschnitte der Niere angefertigt und einer PAS-Färbung (*Periodic Acid Schiff reaction*) unterzogen. Die Schnitte wurden mit freundlicher Unterstützung des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Erlangen, Abteilung für Nephropathologie angefertigt. Es wurde die Pünktelung nach PAS-Färbung ermittelt. Hierfür wird ein Gitterokular eingesetzt und gezählt wie viele Gitterpunkte auf den einzelnen Bereichen der Niere liegen (Plank et al., 2010).

Anhand der Pünktelung lassen sich die Volumenverhältnisse der Niere und die numerische Anzahl der Glomeruli pro Volumen Nierenmark berechnen. Die statistische Auswertung dieser Parameter ist in der Grafik 29 dargestellt. Nach PAS-Färbung ist die Pünktelung der p62^{Δ69-251}-Gesamtniere signifikant gesteigert, sie ist demnach vergrößert. Bei der Betrachtung der Pünktelung einzelner Nierenareale ist festzustellen, dass nur die Pünktelung des Nierenmarks signifikant erhöht ist, die Pünktelung von Nierenrinde und Glomeruli ist unverändert. Somit ergibt sich für die Analyse der Nieren eine signifikante Zunahme des Nierenvolumens und des Nierengewichts der p62^{Δ69-251}-Tiere. Im Verhältnis zu der Gesamtniere ist bei diesen Tieren das Nierenmarkvolumen signifikant erhöht und das Nierenrindenvolumen signifikant erniedrigt. Die Glomeruli-Anzahl ist nicht verändert. Zusätzliche morphologische Veränderungen der Nieren sind nicht zu erkennen.

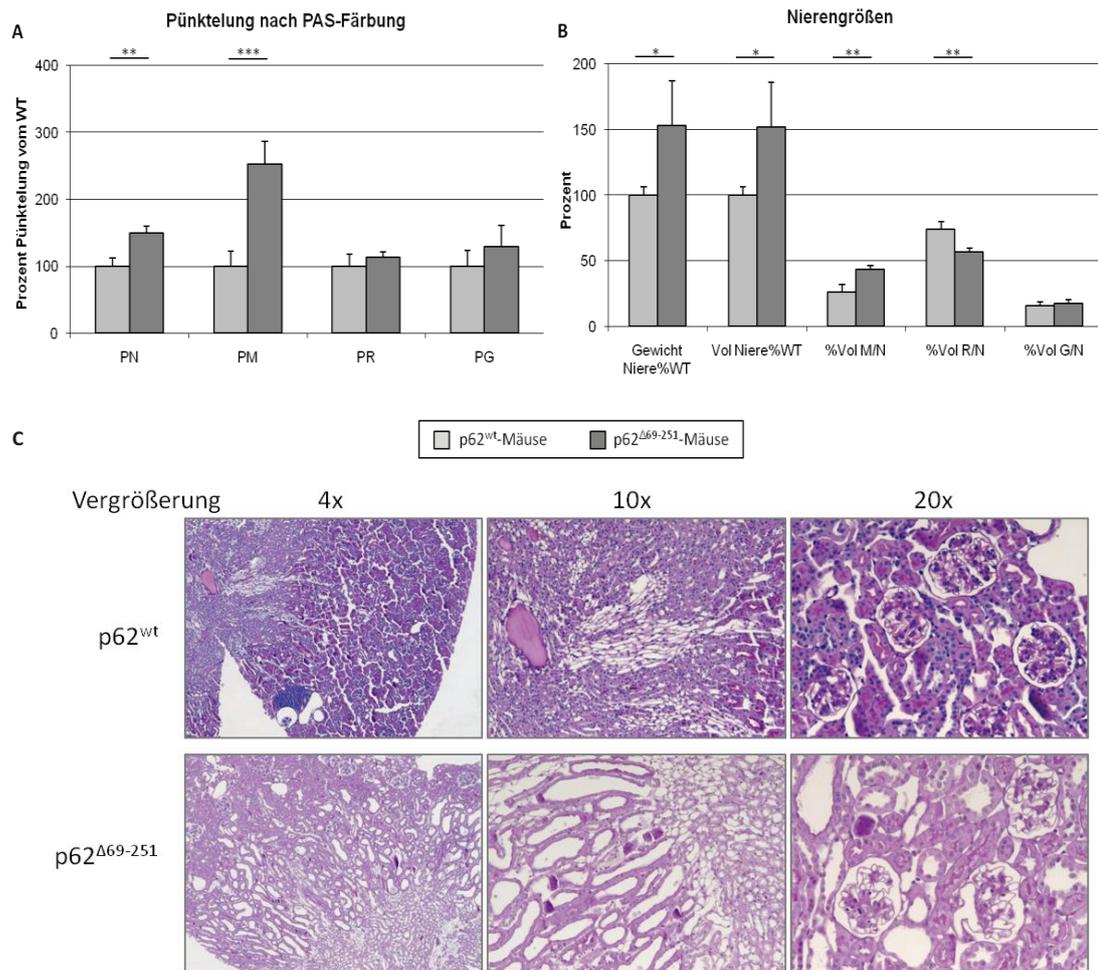


Abb. 29: Histologische Untersuchungen der Nieren von p62^{wt}- und p62^{Δ69-251}-Mäusen. **A:** PN: Pünktelung Gesamtniere; PM: Pünktelung Nierenmark; PR: Pünktelung Nierenrinde; PG: Pünktelung Glomeruli. **B:** „Gewicht Niere%WT“: Prozentuale Gewichtsveränderung im Vergleich zum Wildtyp; „Vol Niere%WT“: Prozentuale Volumenveränderung im Vergleich zum „Wildtyp; %Vol M/N“: Volumenverhältnis Nierenmark zu Gesamtniere; „%Vol R/N“: Volumenverhältnis Nierenrinde zu Gesamtniere; „%Vol G/N“: Volumenverhältnis Glomeruli zu Gesamtniere. **C:** Fotos der gefärbten Nieren mit verschiedenen mikroskopischen Vergrößerungen. Es sind keine morphologischen Unterschiede zu erkennen. N = 3; * = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,005; *** = p ≤ 0,0005

Untersuchung des Mausurins

Ein Nierenschaden geht oft mit einer Proteinurie einher. Das Auftreten des Proteins Albumin im Urin kann als Marker einer Störung der glomerulären Filtrationsbarriere untersucht werden. Für die Diagnose einer möglichen glomerulären Schädigung der p62^{Δ69-251}-Mäuse, wurde an mehreren Tagen Spontanurin gewonnen und vereinigt. Der Urin wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend Coomassie gefärbt, um zu untersuchen, ob vermehrt Proteine, vor allem Albumin, im Urin vorliegen. Als

Größenstandard wurde Rinderserumalbumin (BSA) aufgetragen. Urine junger Mäuse zeigen im Vergleich mit dem Urin von Wildtypmäusen keine Veränderung in der Albuminkonzentration. Mäuse entwickeln im Alter eine leichte Proteinurie. Diese war sowohl beim Wildtypurin, als auch bei dem Urin von $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäusen zu erkennen. Die Albuminkonzentration der Mäuse mit deletiertem p62-Protein ist im Vergleich mit dem Urin entsprechender Wildtypiere nicht signifikant verändert. Eine Abbildung von zwei Agarosegelen, auf dem der Urin von 4 weiblichen $p62^{wt}$ - und 4 weiblichen $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäusen bzw. von 4 männlichen $p62^{wt}$ - und 4 männlichen $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäusen aufgetragen wurde, ist in Abbildung 30 dargestellt.

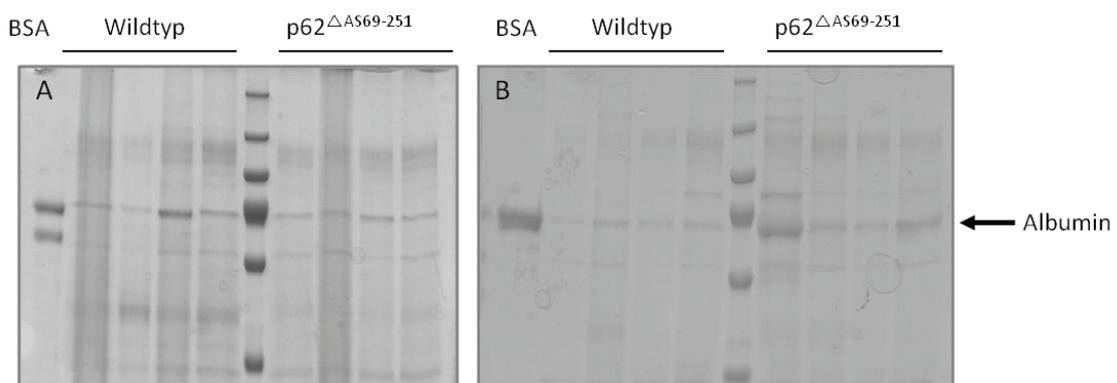


Abb. 30: SDS-Gele von Mausurin nach Coomassiefärbung. Aufgetragen wurde in Spur 1: BSA; Spur 2-5: Urin von Wildtypmäusen (12 Monate); Spur 6: Größenstandard; Spur 7-10: Urin von $p62^{\Delta 69-251}$ Mäusen (12 Monate). **A:** Urinuntersuchung von weiblichen Mäusen. **B:** Urinuntersuchung von männlichen Mäusen.

Zur weiteren Untersuchung der Nierenfunktion der Mäuse wurden Urinproben von $p62^{wt}$ - und $p62^{\Delta 69-251}$ -Tieren in zwei Altersgruppen gesammelt und im Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster analysiert. Die eine Altersgruppe bestand aus 5 Monate alten Mäusen, bevor sie eine deutliche Fettleibigkeit entwickeln. In der zweiten Altersgruppe wurden Mäuse in einem Alter von 15 Monaten untersucht, da diese Tiere bereits einen adipösen Phänotyp zeigen. Innerhalb der Genotypen und Altersklassen wurde zusätzlich nach Geschlecht unterschieden. Es wurden die Parameter Kreatinin, Harnstoff, Glukose, Natrium, Kalium und Gesamteiweiß bestimmt. Um einen Fehler durch unterschiedliche Konzentrationen des Urins auszuschließen, wurden alle gemessenen Parameter auf den zugehörigen Kreatininwert bezogen. Eine Darstellung der Ergebnisse ist der Abbildung 31 zu entnehmen.

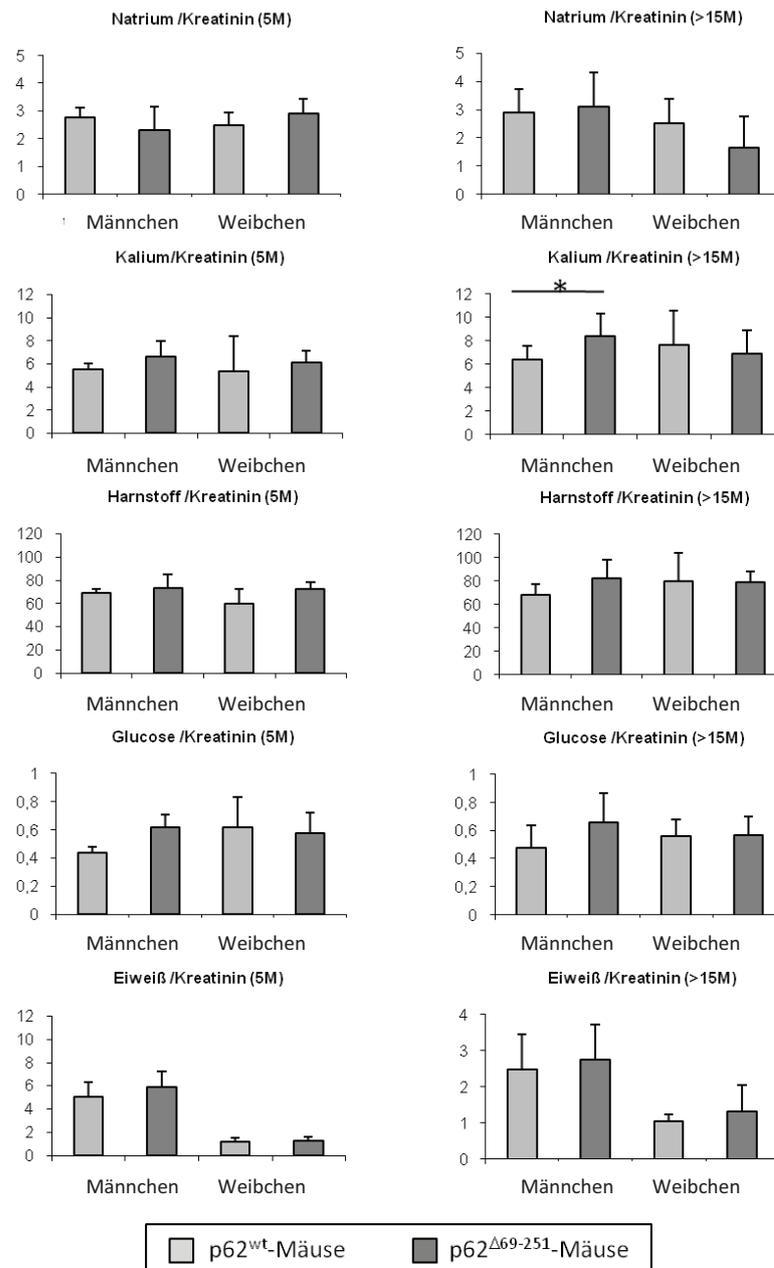


Abb. 31: Auswertung der Urinanalyse. Es wurde Urin von männlichen und weiblichen Tieren der beiden Genotypen analysiert. Alle Parameter wurden von Tieren mit einem Alter von 5 Monaten (links, 5M) und mindestens 15 Monaten (rechts, 15M) bestimmt. Der jeweilig untersuchte Wert wurde auf die Kreatininkonzentration im Urin bezogen. Aufgeführt sind von oben nach unten die Natrium-, Kalium-, Glukose-, Harnstoff- und Eiweißkonzentrationen. N = 5-8; * = $p \leq 0,05$

Die statistische Auswertung der Urinanalyse durch das Zentrallabor ergab lediglich bei männlichen Tieren im Alter von 15 Monaten eine geringe signifikante Änderung der Kaliumkonzentration im Urin zwischen den Tieren der beiden Genotypen. Alle weiteren Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf die genannten Parameter.

Es ist jedoch bei den männlichen Tieren bereits im Alter von 5 Monaten eine Tendenz zu sehen, nach der alle vermessenen Parameter, abgesehen von Natrium bei 5 Monate alten Tieren, eine leichte Erhöhung der Werte zeigen.

Untersuchung Autophagozytose-relevanter Proteine in der Niere von p62^{Δ69-251}-Mäusen

Um zu untersuchen inwieweit ausgewählte Proteine, die mit der Autophagozytose in Verbindung stehen, in der Niere der p62^{Δ69-251}-Maus auf Protein-Ebene fehlreguliert sind, wurden Nieren von acht Wildtyp- und neun p62^{Δ69-251}-Mäusen entnommen, lysiert und die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt. Diese Untersuchungen wurden an Mäusen in einem Balb/C-Hintergrund durchgeführt. Die Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach dem Tank-Blot-Verfahren mit spezifischen Antikörpern gefärbt und quantitativ ausgewertet. Die jeweilig erzielte Bandenintensität wurde auf die Signalstärke von β -Tubulin standardisiert, um Auffälligkeiten aufgrund unterschiedlich aufgetragener Proteinmengen auszugleichen. Eine statistische Auswertung der untersuchten Proteine mit repräsentativen Western Blots ist in Abbildung 32 dargestellt.

Die Proteine LC3 und TRAF6 sind im Nierenlysat der p62^{Δ69-251}-Mäuse signifikant erhöht. Es konnte in den Nierenlysaten mit dem verwendeten Antikörper jedoch nicht zwischen LC3I (zytosolische Form) und LC3II (gebunden an die Autophagosomenmembran) unterschieden werden. Um diesen Befund zu verifizieren, wurde von jeweils 3 Lysaten (p62^{wt} und p62^{Δ69-251}) ein Konzentrationsgradient von 15 bis 250 μ g Gesamtprotein auf ein SDS-Gel aufgetragen, geblottet und mit Antikörpern gegen LC3 und β -Tubulin gefärbt (siehe Abb. 33, exemplarisch). Dieses Experiment bestätigt das Ergebnis der vorangegangenen Untersuchung, dass LC3 in der Niere heraufreguliert ist. Auch bei hohen Konzentrationen konnte keine zweite Bande, und damit ein Unterschied zwischen LC3I und LC3II, erzielt werden

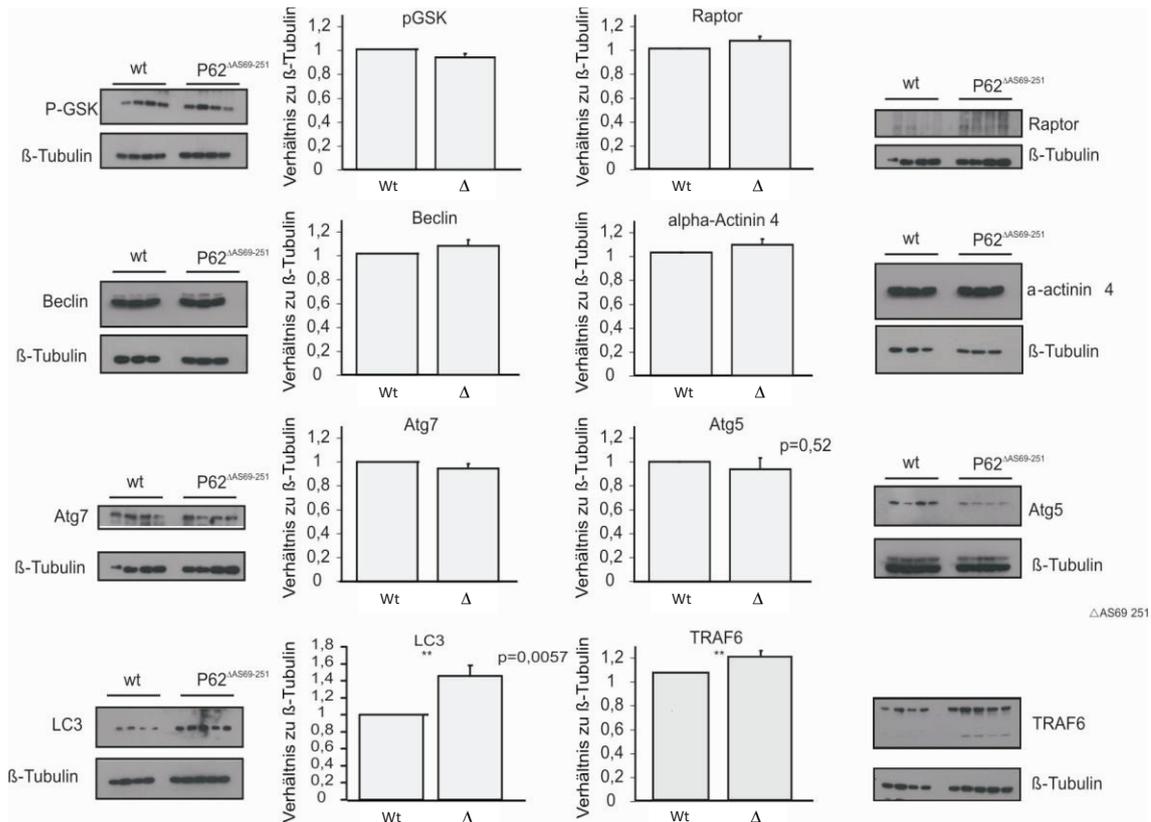


Abb. 32: Statistische Auswertung der quantitativen Western Blots aus Nierengewebe. Nierenlysate von 8 p62^{wt}- und 9 p62^{Δ69-251}-Mäusen wurde jeweils dreimal mittels Western Blot auf die Proteinmengen von phospho GSK3β, Raptor, Beclin, α-Actinin 4, Atg7, Atg5, LC3 und TRAF6 untersucht. Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung dieser Experimente mit zugehörigen repräsentativen Western Blots. Die Werte sind jeweils auf β-Tubulin standardisiert und auf den Wildtyp (Wert = 1) normiert. ** = p ≤ 0,005

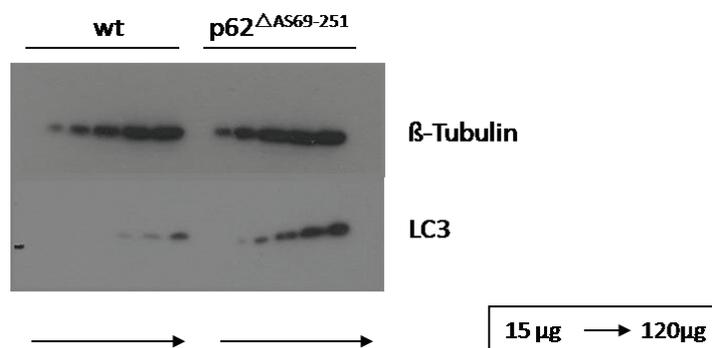


Abb. 33: Western Blot LC3 und β-Tubulin, Konzentrationsgradient von Nierenlysaten. Nierenlysate von einer p62^{wt}- (links) und einer p62^{Δ69-251}-Maus (rechts) wurden mit einem Konzentrationsgradienten von 15 bis 120 μg Gesamtprotein auf ein SDS-Gel aufgetragen und nach einem Tank-Blot mit Antikörpern gegen LC3 (unten) und β-Tubulin (Ladungskontrolle, oben) gefärbt. N = 3

Um zu untersuchen, inwieweit sich die signifikanten Veränderungen der LC3- und TRAF6-Konzentration in Nierenlysaten der $p62^{\Delta 69-251}$ -BALB/C-Mäuse auf den C57/Black6-Hintergrund übertragen lassen, wurden quantitative Western Blots mit primären Fibroblasten der Mäuse in einem C57/Black6-Hintergrund durchgeführt. Die Abbildung 34 zeigt exemplarische Western Blots und eine statistische Auswertung der densitometrischen Analysen der Bandenintensitäten. Mit Hilfe des verwendeten Antikörpers ließ sich in diesem Experiment zwischen LC3I und LC3II unterscheiden. Die gezeigten Ergebnisse bestätigen den beschriebenen Befund der Hochregulation von TRAF6 und LC3 und lassen eine Übertragung auf die $p62^{\Delta 69-251}$ -Mauslinie mit einem C57/Black6-Hintergrund zu.

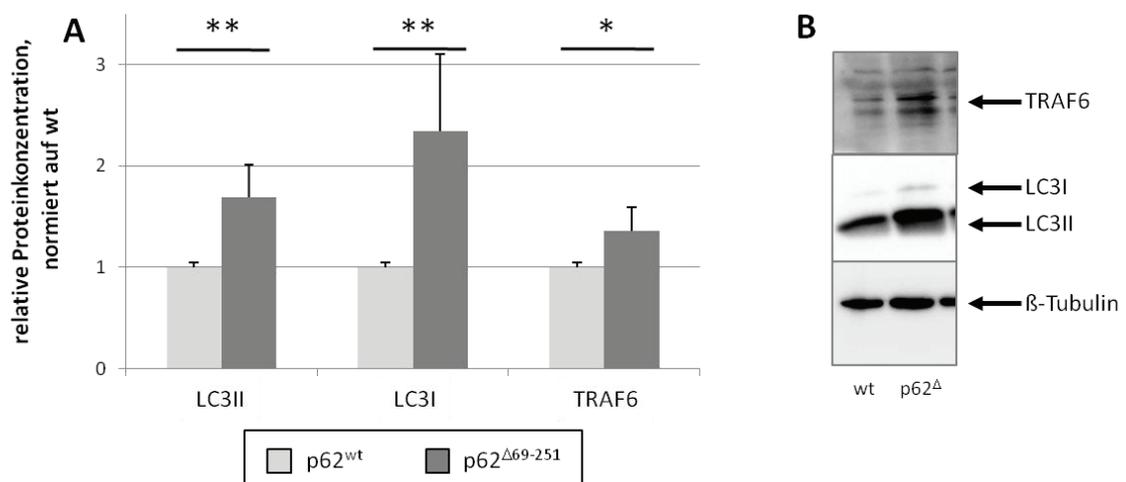


Abb. 34: Quantitative Analyse der LC3- und TRAF6-Level in Fibroblastenextrakten von $p62^{wt}$ - und $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäusen mit einem C57/Black6-Hintergrund. A: Statistische Auswertung von LC3I-, LC3II- und TRAF6-Menge in Fibroblastenlysaten der $p62^{\Delta 69-251}$ - und $p62^{wt}$ -Mäuse. Die Level der untersuchten Proteine sind in $p62^{\Delta 69-251}$ -Zellen signifikant erhöht. **B:** Exemplarische Darstellung von Western Blots mit Antikörpern gegen TRAF6, LC3I und LC3II und, als Ladungskontrolle, gegen β -Tubulin. N = 4; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$

5.3.2.2 Untersuchungen des Fettgewebes

Die $p62^{\Delta 69-251}$ -Maus zeigt im Vergleich zu der $p62^{wt}$ -Maus eine starke Anreicherung von weißem Fett. Aus diesem Grund wurden quantitative Western Blots mit Extrakten dieses Gewebes durchgeführt. Zusätzlich konnten mesenchymale Stammzellen der $p62^{wt}$ und der $p62^{\Delta 69-251}$ -Mauslinie zu Adipozyten differenziert werden (Daten nicht gezeigt).

Quantitative Western Blots mit Fettgewebe

Zur Untersuchung, ob eine veränderte Aktivität von MAP-Kinasen zu einer gesteigerten Adipogenese der $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse führt, wurde gleichaltrigen Wildtyp- und $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäusen weißes Fettgewebe entnommen, lysiert und die Proteinmenge der Lysate bestimmt. Es wurden Western Blots angefertigt und die Proteine p38, phospho-p38 (p-p38), ERK, phospho-ERK, JNK, phospho-JNK, TRAF6 und p62 mit spezifischen Antikörpern detektiert. Für die Proteine JNK, TRAF6 und p62 konnte kein Signal erzielt werden (ohne Abbildung). Die Abbildung 35A zeigt einen Western Blot auf den jeweils Lysate von drei $p62^{wt}$ - und drei $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäusen aufgetragen wurde und mit spezifischen Antikörpern gegen ERK1/2 und p38 und deren Phosphoformen ein Signal detektiert wurde. Diese Signale wurden densitometrisch quantifiziert, die Menge der Phosphoform auf die Menge des unphosphorylierten Proteins bezogen, auf die mittlere Signalstärke des Wildtyps normiert und statistisch ausgewertet (siehe Abb. 35B).

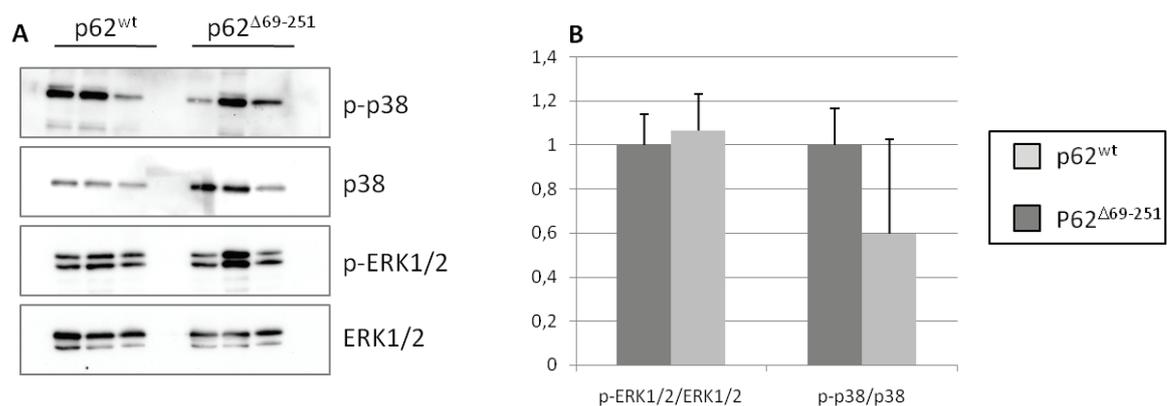


Abb. 35: Quantifizierung von phospho-p38/p38 und phospho-ERK/ERK in Fettgewebe. **A:** Western Blot mit Lysaten aus Fettgewebe von $p62^{wt}$ und $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäusen. Detektiert wurde mit Antikörpern gegen phospho-p38, p38, phospho-ERK1/2 und ERK1/2. **B:** Quantitative Auswertung des Verhältnisses der Phosphoform zur unphosphorylierten Form der Proteine p38 und ERK im Vergleich von Fettgewebe der $p62^{wt}$ und der $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse. N = 3

Es kommt zu großen Schwankungen innerhalb der einzelnen Gruppen. Es konnte keine signifikante Änderung des p-p38/p38- oder p-ERK/ERK-Quotienten gemessen werden. Die Phosphorylierung von ERK1 (obere Bande) und ERK2 (untere Bande) unterscheiden sich nicht deutlich. P38 liegt im Fettgewebe der $p62^{\Delta 69-251}$ -Maus tendenziell weniger phosphoryliert vor.

5.4 Zellbiologische Untersuchungen des Proteins p62^{Δ69-251}

Zusätzlich zu den phänotypischen Untersuchungen der p62^{Δ69-251}-Maus wurden Studien an primären Zellen durchgeführt. Für die Versuche wurden primär isolierte Zellen des jeweiligen Genotyps gewählt, um Artefakte aufgrund der Überexpression der zu untersuchenden Proteine und der Interaktion von p62^{Δ69-251} mit dem endogenen p62^{wt} zu verhindern.

Die primären Zellen beider Genotypen wurden für vergleichende Studien von Tieren jeweils gleichen Alters isoliert. Für die Untersuchung der Autophagozytose wurden primäre Podozyten isoliert, kultiviert und analysiert. Dieser Zelltyp wurde gewählt, da Podozyten, als postmitotische Zellen der Niere, eine hohe Autophagozytose-Basalaktivität aufweisen. Alle weiteren Untersuchungen wurden an primär isolierten Fibroblasten durchgeführt, da sich dieser Zelltyp relativ einfach aus den Ohren der Mäuse isolieren und über einen längeren Zeitraum kultivieren lässt. Für die Untersuchungen mit primären Fibroblasten wurden jeweils 3 Zelllinien der p62^{wt} und der p62^{Δ69-251}-Mäuse isoliert und im Laufe der Untersuchungen mehrfach auf die Stabilität der Expression des Proteins p62 in der Wildtypform bzw. in der trunkierten Form untersucht (siehe Abb. 38). Die Etablierung der Assays erfolgte mit herkömmlichen Zelllinien.

5.4.1 Lokalisationsstudien

Im Rahmen der Co-Lokalisationsstudien im Bezug auf die Bindeeigenschaften des Proteins p62^{Δ69-251} in primären Fibroblasten (siehe Kapitel 5.2 Interaktionsstudien mit dem deletierten Protein p62^{Δ69-251}) wurde festgestellt, dass p62^{Δ69-251} im Vergleich zu dem Wildtypprotein p62^{wt} eine veränderte Lokalisation zeigt.

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzen primärer Fibroblasten wurde ermittelt, inwieweit p62^{Δ69-251} im Vergleich zu p62^{wt} in der Zelle unterschiedlich lokalisiert vorliegt. Die Zellen wurden mit einem Antikörper gegen p62 und mit dem Kernfarbstoff DAPI gefärbt. Eine Auswertung von Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zufällig ausgewählter Einzelzellen (116 p62^{wt}- und 68 p62^{Δ96-251}-Zellen in drei unabhängigen Experimenten) erfolgte durch optische Kriterien. Es wurde die perinukleäre Lokalisation des Proteins beurteilt. Die statistische Auswertung dieser Studie und repräsentative Fluoreszenzaufnahmen sind in Abbildung 36 dargestellt.

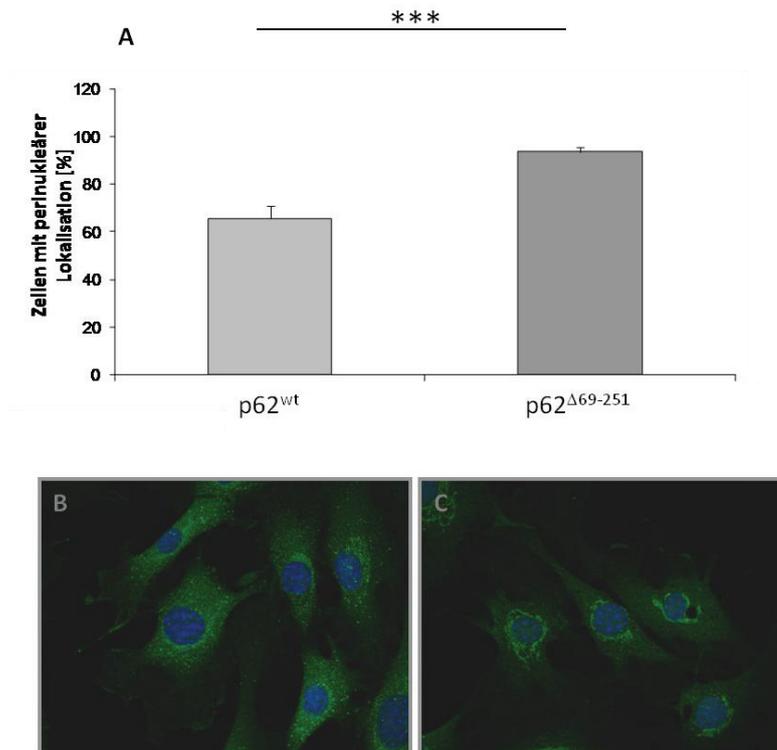


Abb. 36: Perinukleäre Lokalisation von p62^{Δ69-251}. **A:** Statistische Auswertung der perinukleären Lokalisation des Proteins p62^{wt} im Vergleich zu dem Protein p62^{Δ69-251} in primär isolierten Fibroblasten. *** = $p \leq 0,0005$ **B:** Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahme von Wildtypfibroblasten, grün: p62, blau: DAPI **C:** Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahme von p62^{Δ69-251}-Fibroblasten, grün: p62, blau: DAPI.

Die Auswertung der Lokalisation des trunkierten p62^{Δ69-251} im Vergleich zu dem p62^{wt}-Protein in primär isolierten Zellen ergab eine signifikante Steigerung der Anzahl der Zellen, bei denen das Protein rund um den Nukleus lokalisiert ist.

5.4.2 ROS-Aktivität

Zur Untersuchung, ob das Fehlen der Aminosäuren 69 bis 251 des Proteins p62 zu einer Veränderung der Aktivität freier Sauerstoffradikale (*Reactive Oxygen Species*, ROS) führt, wurde für primäre Zellen ein ROS-Assay etabliert. Hierzu wurden jeweils drei primäre Fibroblastenzelllinien aus p62^{wt} und p62^{Δ69-251} Mäusen isoliert. Zur Überprüfung, ob es sich um reine Zelllinien des korrekten Genotyps handelt, wurden in regelmäßigen Abständen Western Blots mit Lysaten dieser Zelllinien durchgeführt und mit einem Antikörper gegen murines p62 gefärbt. Exemplarisch ist ein Western Blot in Abbildung 37 dargestellt, der

zeigt, dass die primären Zelllinien p62 in der Wildtypform bzw. der verkürzten Form exprimieren.

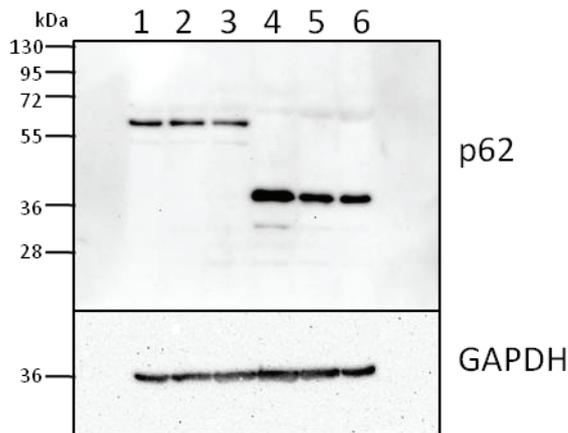


Abb. 37: Reinheit der kultivierten primären Fibroblastenzelllinien. Oben mit einem Antikörper gegen p62, unten als Ladungskontrolle mit einem Antikörper gegen GAPDH. Spur 1: Fibroblasten p62^{wt} 1; Spur 2: Fibroblasten p62^{wt} 2; Spur 3: Fibroblasten p62^{wt} 3; Spur 4: Fibroblasten p62^{Δ69-251} 1; Spur 5: Fibroblasten p62^{Δ69-251} 2; Spur 6: Fibroblasten p62^{Δ69-251} 3.

Für die Analyse der ROS-Aktivität wurde der Farbstoff 5-(und-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetat (Carboxy-H₂DCFDA) eingesetzt, der nach dem Umsatz durch zelluläre Esterasen und ROS zu dem grün fluoreszierenden Carboxy-Dichlorhydrofluorescein (Carboxy-DCF) umgewandelt wird. Die Fluoreszenzintensität lässt sich mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops mit konstanter Belichtungsstärke und -zeit fotografisch festhalten und anschließend densitometrisch auswerten. Zur Überprüfung der quantitativen Einsetzbarkeit des Assays wurden p62^{wt}- und der p62^{Δ69-251}-Zellen mit Tertbutylhydroperoxid (TBHP) behandelt, das zu einem Anstieg der intrazellulären ROS-Aktivität führt. Die Abbildung 38 zeigt die statistischen Auswertungen der ROS-Aktivität (normiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrollgruppe) vor und nach Behandlung mit TBHP von je 30 p62^{wt}- (A) und je 30 p62^{Δ69-251}-Zellen (B). Unterhalb der Balkendiagramme befinden sich exemplarische Fotos der entsprechenden Zellen (links unbehandelt, rechts behandelt), die unter identischen Bedingungen aufgenommen wurden, abgebildet. Die ROS-Aktivität stieg nach TBHP-Behandlung signifikant und ist somit mit dieser Methode messbar. Die Steigerung der ROS-Aktivität in den p62^{Δ69-251}-Zellen zeigt zudem, dass eine Reaktion der Zellen auf einen ROS-Stimulus möglich ist.

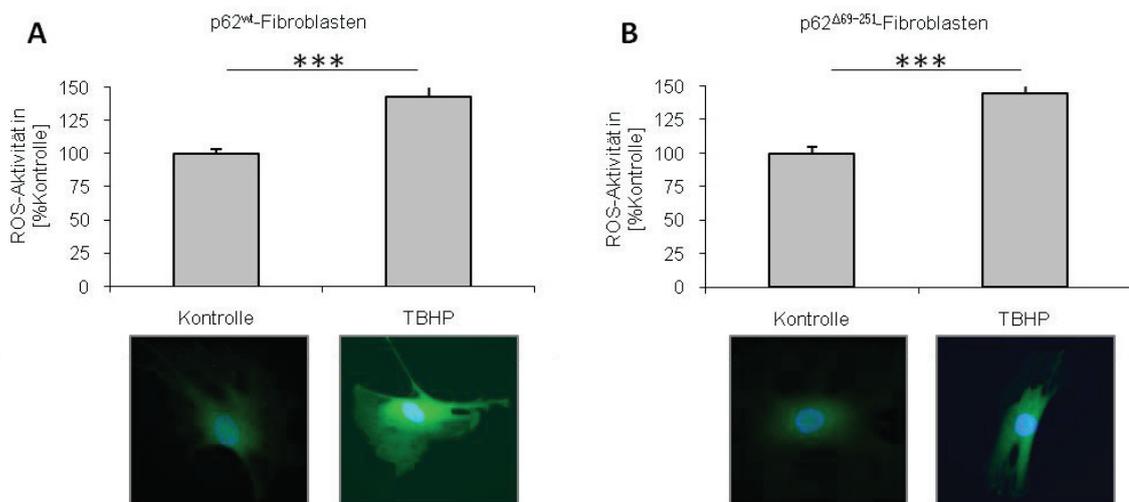


Abb. 38: Die ROS-Aktivität steigt nach TBHP-Behandlung signifikant. Statistische Auswertung der Wirkung von TBHP auf p62^{wt}-Zellen (A) und p62^{Δ69-251}-Zellen (B). Unterhalb der Diagramme sind exemplarische Fotos entsprechend behandelte primärer Fibroblasten gezeigt. N = 30; *** = p ≤ 0,0005

Im Weiteren wurden die primären p62^{wt}- und p62^{Δ69-251}-Zelllinien direkt miteinander verglichen. Es wurden jeweils 20-30 Einzelzellen von den jeweils drei Fibroblastenzelllinien fotografiert und die Fluoreszenzintensität densitometrisch ausgewertet. Die Werte wurden auf die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Wildtypzellen normiert. Die Abbildung 39 zeigt exemplarisch jeweils eine Wildtyp- und eine p62^{Δ69-251}-Zelle nach Carboxy-H₂DCFDA-Färbung und die statistische Auswertung der Experimente. Die intrazelluläre ROS-Aktivität der p62^{Δ69-251}-Zellen steigt im Vergleich zum Wildtyp signifikant an.

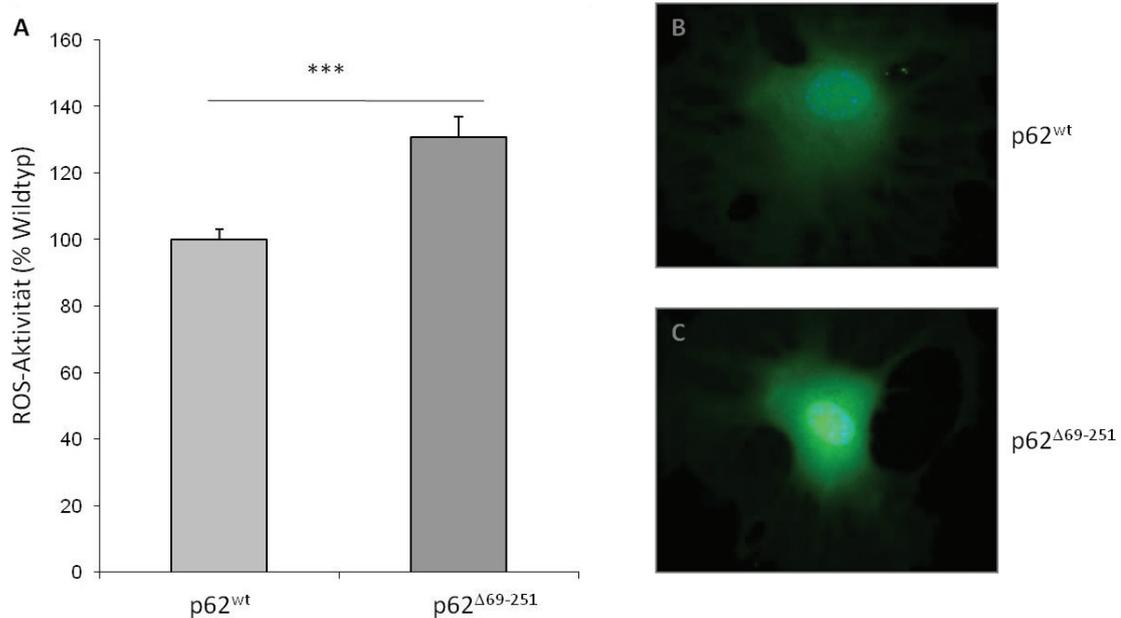


Abb. 39: ROS-Aktivität im direkten Vergleich von Wildtyp- und p62^{Δ69-251}-Zellen. **A:** Statistische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils 20 bis 30 primäre Fibroblasten ausgewertet wurden; Abbildungen von einer p62^{wt}- (**B**) und einer von einer p62^{Δ69-251}-Zelle (**C**) nach Carboxy-H₂DCFDA-Färbung bei identischer Belichtungszeit und -stärke. *** = $p \leq 0,00001$

5.4.3 Autophagozytoseaktivität

Das Protein p62 spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der selektiven Autophagozytose, indem es ubiquitinierte Proteine und Organellen diesem Abbauweg zuleitet. Zudem führt eine erhöhte ROS-Aktivität, wie sie in den Fibroblasten der p62^{Δ69-251}-Maus gemessen wurde (siehe Abschnitt 5.4.2, Abb. 39), zu einer vermehrten Anreicherung defekter Organellen und Proteine. Diese kann zu einer Steigerung der Autophagozytose-Aktivität führen.

Für die Messung der Autophagozytoseaktivität in Zellen sind verschiedene Methoden beschrieben. Der Farbstoff Monodansylcadaverin (MDC) färbt lysosomale Strukturen der Zellen an. Die Intensität der Färbung einer Zelle korreliert mit der Anzahl lysosomaler Strukturen, wie Autophagolysosomen (Biederbick et al., 1995). Dieser Farbstoff wurde ausgewählt, um die Autophagozytoseaktivität in Zellen der p62^{Δ69-251}-Maus mit Zellen der p62^{wt}-Maus zu vergleichen. Zur Untersuchung, ob es sich bei MDC um einen probaten Farbstoff zur Messung von Autophagozytoseaktivität handelt, wurden Untersuchungen an

COS-Zellen durchgeführt, bei denen die Autophagozytose indirekt durch MG132 aktiviert wurde, bzw. durch die Zugabe von Bafilomycin in einem späten Autophagozytose-Stadium inhibiert wurde. Die Abbildung 40A zeigt die statistische Auswertung der photometrischen Messung der MDC-Fluoreszenzintensität dieser Versuchsreihe. Das Balkendiagramm zeigt eine signifikante Steigerung der Fluoreszenzintensität der mit MG132 behandelten COS-Zellen. Bafilomycin verhindert die Ansäuerung von Autophagosomen und führt somit nicht zu einer Steigerung der MDC-Aktivität.

Zusätzlich zu der Messung der Fluoreszenzintensität lysierter Zellen wurden lebende Zellen nach der Behandlung mit MG132 und der Färbung mit MDC fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Abbildung 40C zeigt unbehandelte Kontrollzellen, die Abbildung 40D die COS-Zellen nach MG132-Behandlung. Beide Abbildungen wurden mit identischer Belichtungszeit und -intensität aufgenommen. Es ist eine deutliche Steigerung der Fluoreszenzintensität und eine Anreicherung gefärbter vesikulärer Strukturen zu erkennen. Die Abbildung 40B zeigt die Befunde von Munafo und Colombo (Munafo und Colombo, 2001), in dieser Arbeit wurden Zellen nach einer Hungerphase mit MDC gefärbt. Der Farbstoff MDC lässt sich demnach mit der hier etablierten Methode einsetzen, um die Autophagozytoseaktivität zu bestimmen.

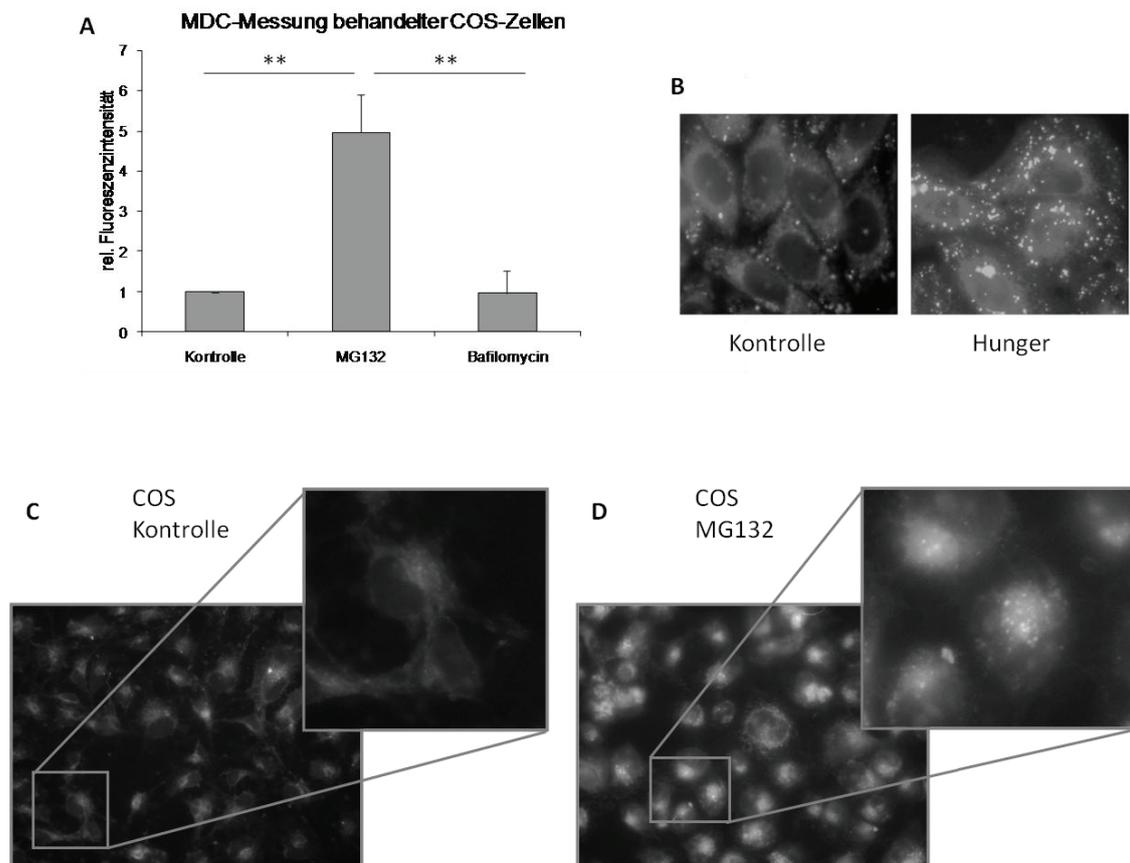


Abb. 40: Durchführbarkeitsstudien des etablierten Autophagozytose-Assays. **A:** Quantitative Auswertung der photometrischen MDC-Messung von lysierten COS-Zellen nach MG132- bzw. Bafilomycin-Behandlung. Die Fluoreszenzintensität wurde auf die unbehandelten Kontrollzellen normiert. $N = 3$, $** = p \leq 0,005$; **B:** Abbildung von unbehandelten (links, Kontrolle) und hungernden (rechts, Hunger) Zellen nach MDC-Behandlung. Modifiziert nach Munafó 2001; **C:** COS-Zellen nach MDC-Behandlung; **D:** MG132-behandelte COS-Zellen nach MDC-Färbung, Belichtungsstärke identisch mit C.

In dem durchgeführten Assay wurden keine Einzelzellen untersucht, sondern die Fluoreszenzintensität isolierter Vesikel einer Kultur in unterschiedlichen Verdünnungsstufen untersucht. Es wurden primäre Podozyten nach Passage 1 untersucht. Da die primären Zellkulturen nicht immer mit verlässlicher Geschwindigkeit wachsen und sich die Zellzahl nur schwierig einstellen lässt, musste ein Parameter zur Bestimmung der Zellzahl gefunden werden, der eine fluorometrische Bestimmung der Zelldichte zulässt, ohne jedoch mit dem Fluoreszenzspektrum von MDC zu korrelieren. Die Menge an DNA, die ein bestimmter Zelltyp einer Wachstumsphase beinhaltet, ist relativ identisch. Aus diesem Grund wurde der DNA-Farbstoff Propidiumiodid eingesetzt. In einer Messreihe mit

Lysaten aus einer definierten Anzahl an Zellen (gezählt in einer Thoma-Kammer), die in einer Verdünnungsreihe vermessen wurden ($N = 3$), sollte die Anwendbarkeit der Extinktion von Propidiumiodid als Maß für die vermessene Zelldichte gezeigt werden. Die Abbildung 41 zeigt das hieraus resultierende Diagramm.

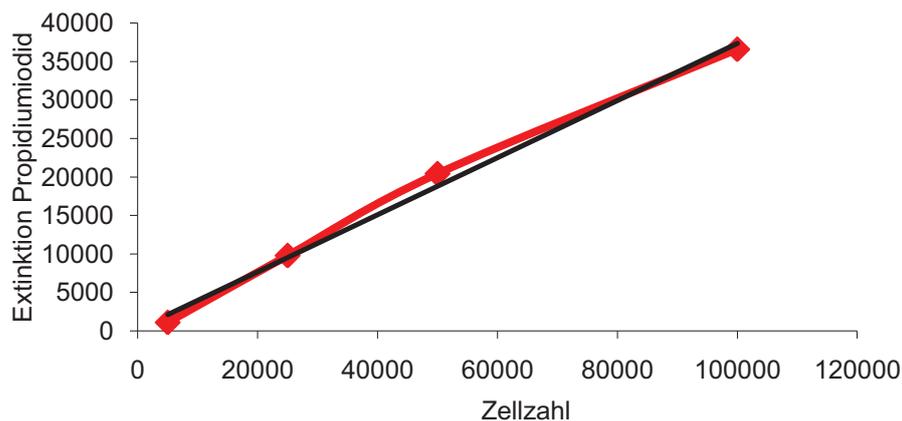


Abb. 41: Propidiumiodid als indirektes Mittel zur Zellzahlbestimmung. Die Grafik zeigt eine Messreihe, bei der eine bestimmte Zellzahl lysiert und mit Propidiumiodid gefärbt wurde. Die Extinktionsstärke steigt proportional zur Zellzahl. $N = 3$

Das dargestellte Diagramm zeigt, dass die Extinktion von Propidiumiodid direkt proportional zur Zellzahl steigt.

Zur Messung der Autophagozytoseaktivität in Podozyten der $p62^{\Delta 69-251}$ -Mauslinie im Vergleich zu Podozyten von Wildtypmäusen wurden perfundierte Nieren präpariert, Glomeruli isoliert und Podozyten herangezüchtet. Nach Passage 1 wurden die Zellen mit MDC inkubiert, lysiert und photometrisch vermessen. Dieser Versuch wurde viermal mit jeweils gleichaltrigen Tieren durchgeführt. Die statistische Auswertung dieser Experimente ist in Abbildung 42 als Balkendiagramm dargestellt. Die gemessene MDC-Aktivität in primären $p62^{\Delta 69-251}$ -Podozyten ist im Vergleich zu $p62^{wt}$ -Podozyten signifikant erhöht.

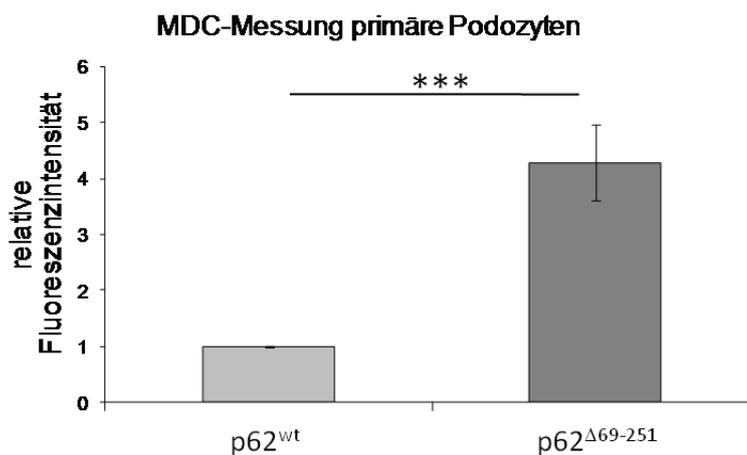


Abb. 42: Autophagozytoseaktivität primärer Podozyten. Quantitative Auswertung der photometrischen MDC-Messung primär isolierter p62^{Δ69-251}-Podozyten (rechter Balken), normiert auf Wildtyp-Podozyten (linker Balken). *** = $p \leq 0,0005$

Das Protein p62 akkumuliert nach der Hemmung der Autophagozytose oder des Proteasoms und es kommt zur Anreicherung punktierter, p62-positiver Strukturen innerhalb der Zellen. Um zu untersuchen, ob Zellen der p62^{Δ69-251}-Maus in der Lage sind, in ähnliche Weise auf einen Autophagozytose-assoziierten Stimulus zu reagieren, wurden Immunfluoreszenzaufnahmen von primären Fibroblasten unter Normalbedingungen und nach der Inhibition der Autophagozytose angefertigt. Es wurde mit einem Antikörper gegen p62 gefärbt. Die Abbildung 43A zeigt, dass es bei den Wildtypzellen (oben) nach Bafilomycin-Behandlung zu einer Anreicherung punktierter, p62-positiver Strukturen kommt. Der entsprechende Effekt kann auch bei den Zellen der p62^{Δ69-251}-Mäuse beobachtet werden (unten). Zusätzlich wurde untersucht, ob sich ein Stimulus der Autophagozytose durch MG132 oder eine Hemmung der Autophagozytose durch Bafilomycin auf die Menge des Proteins p62^{Δ69-251} in gleicher Weise auswirkt wie auf das Wildtypprotein. Hierzu wurden kultivierte primäre Fibroblasten mit MG132 und Bafilomycin inkubiert und nach einer Proteinbestimmung auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese und Western Blot wurden des Protein p62 und als Ladekontrolle das Protein β -Tubulin detektiert. Exemplarisch ist ein Western Blot mit aufgetragenen Wildtyp- und p62^{Δ69-251}-Lysaten in Abbildung 43B dargestellt.

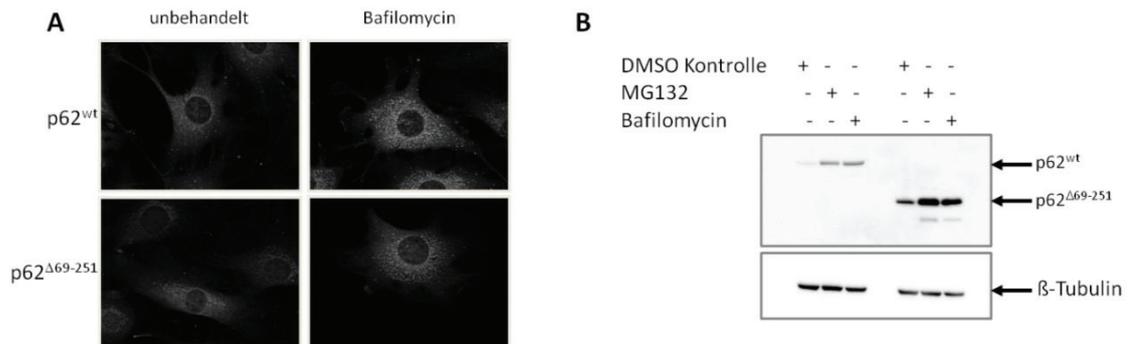


Abb. 43: Akkumulation von p62^{wt} und p62^{Δ69-251} nach der Behandlung mit MG132 und Bafilomycin. Western Blot primär isolierter Fibroblasten der p62^{wt}- und der p62^{Δ69-251}-Maus. Die Zellen wurden mit dem Lösungsmittel der Inhibitoren (DMSO-Kontrolle), MG132 oder Bafilomycin inkubiert. Aufgetragen wurden identische Proteinmengen. Im oberen Blot wurde mit einem Antikörper gegen p62 detektiert. Der untere Blot zeigt die Ladungskontrolle mit einem Antikörper gegen β -Tubulin. N = 3

Die Western Blot-Analyse der behandelten Fibroblasten zeigt, dass sowohl das p62^{wt}-Protein als auch das p62^{Δ69-251}-Protein nach der Behandlung mit MG132 und Bafilomycin angereichert werden. Der Grundlevel von p62^{Δ69-251} ist in den entsprechenden Zellen erhöht.

6 Diskussion

6.1 Genetische Charakterisierung der p62^{Δ69-251}-Mauslinie

Zum Nachweis des Verlustes des Proteins p62 (vergleiche Ergebnisse, Abb. 12) in der untersuchten Mauslinie wurde mit Hilfe von Gradienten-PCRs aus isolierter RNA von p62^{wt}- und p62^{Δ69-251}-Mäusen p62-cDNA gewonnen und sequenziert. Diese Sequenzen wurden in Aminosäuren translatiert und miteinander verglichen. Entgegen der Annahme der Arbeitsgruppe, die die Mauslinie produziert hat, wird eine stabile mRNA gebildet. Sie kodiert für ein verkürztes p62-Protein, dem die Aminosäuren 69 bis 251 fehlen. Ab der Aminosäure 251 ist die Sequenz wieder identisch mit derjenigen des Wildtypproteins; das Protein p62^{Δ69-251} wird also *in frame* abgelesen. In verschiedenen Organlysaten von p62^{Δ69-251}-Mäusen konnte das verkürzte Protein im Western Blot, ebenso wie das Wildtypprotein bei p62^{wt}-Mäusen, nachgewiesen werden. Demnach handelt es sich bei der untersuchten Mauslinie nicht um Tiere mit einem kompletten *knockout* des Proteins p62, sondern um eine trunkierte Variante des Proteins. Mit Hilfe einer Genotypisierungs-PCR lässt sich der Genotyp der Mäuse sicher und eindeutig bestimmen.

Im Rahmen der Sequenzierungsanalysen wurde zusätzlich eine Spleißvariante des Proteins p62 gefunden (vgl. Ergebnisse Abb. 13). Dieser Spleißvariante fehlen die Aminosäuren 353 bis 390. Sie werden durch den hinteren Teil des Exon 7 kodiert, und die Variante wurde als p62^{-Exon7b} bezeichnet. Bislang sind lediglich Spleißvarianten für das p62-Protein der Ratte (ZIP1, ZIP2 und ZIP2) beschrieben (Crocì et al., 2003; Gong et al., 1999), die jedoch nicht mit der gefundenen Spleißvariante identisch sind. Ein Abgleich von mRNA- und Aminosäuresequenz des Bereichs von p62, der die Spleißvariante enthält, zeigt eine sehr hohe Homologie der mRNA. Die Aminosäuresequenz des Exon 7b ist innerhalb der analysierten Säugetiere identisch. Es ist demnach naheliegend, dass eine entsprechende Spleißvariante auch im humanen Proteom zu finden ist.

Oftmals haben unterschiedliche Spleißvarianten eines Proteins verschiedene Funktionen. Ein prominentes Beispiel hierfür ist die Geschlechtsentwicklung der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Das alternative Spleißen eines Transkriptionsfaktors (*dsx*, *doublesex*) reguliert die gesamte Geschlechtsentwicklung in männlich oder weiblich (Salz und Erickson, 2010). Die fehlenden Aminosäuren der Spleißvariante des Proteins p62^{-Exon7b}

liegen in direkter Nachbarschaft zu der LC3-Binderegion des Proteins. Erste Voruntersuchungen geben Hinweis darauf, dass die LC3-Bindekapazität der Spleißvariante p62^{-Exon7b} im Vergleich zu der ungespleißten Form p62^{wt} reduziert ist. Somit wäre es denkbar, dass p62^{-Exon7b} nur in geringem Maße an der Autophagozytose beteiligt ist. Demnach könnte das Spleißen des Multiadapterproteins p62 eine regulatorische Funktion haben, bei der - je nach Verhältnis von p62^{wt} zu p62^{-Exon7b} - unterschiedliche Prozesse verstärkt ablaufen. Einerseits wäre eine Trennung von Autophagozytose und Degradation über das UPS denkbar, andererseits eine Trennung von der Signaltransduktion und Autophagozytose. Weitere Studien der Lokalisation und der Bindung müssten zeigen, ob die beschriebene Spleißvariante im Vergleich zu p62^{wt} eine andere Lokalisation zeigt und eine spezialisierte, Autophagozytose-unabhängige Funktion in der Zelle erfüllt. Zudem müssten weitere Experimente mit Geweben anderer Spezies durchgeführt werden, in denen gezeigt werden kann, ob die Spleißvariante von p62 über die Spezies hinweg gebildet wird. Erste Western Blots mit Geweben der Ratte und des Menschen deuten darauf hin (Daten nicht gezeigt).

Die beschriebene Spleißvariante konnte nicht nur bei dem p62^{wt}-Protein, sondern auch bei der trunkierten p62^{Δ69-251} Form isoliert werden (p62^{Δ69-251-Exon7b}). Demnach wird p62^{Δ69-251} nicht nur korrekt abgelesen und in allen untersuchten Geweben (Herz, Lunge, Leber, Niere, Pankreas und Hirn) exprimiert, es wird sogar alternativ gespleißt.

Das Mausmodell, welches homozygot das trunkierte Protein p62^{Δ69-251} exprimiert, ist besonders interessant, da es Aufschluss über die Funktion des Signaltransduktionsmoduls des Multiadapterproteins p62 geben kann und die funktionellen Bereiche des Proteins entkoppelt.

6.2 Domänenstruktur und Interaktionspartner des trunkierten Proteins p62^{Δ69-251}

Das Protein p62 ist an zwei wichtigen Feldern zellulärer Abläufe beteiligt, der Proteindegredation und der Signaltransduktion. Darüber hinaus ist p62 in der Lage mit den MAP-Kinasen ERK1 und p38 zu interagieren. Um die Funktionen des trunkierten Proteins p62^{Δ69-251} zu charakterisieren, ist es entscheidend, die potentiellen Bindungspartner und die mit ihnen verbundenen Funktionen zu identifizieren. Anhand verschiedener

Immunpräzipitationen und Immunfluoreszenzanalysen primärer Zellen wurden Interaktionsstudien durchgeführt.

6.2.1 Proteindegradation-assoziierte Interaktionen

p62 bindet ubiquitinierte Proteine über die C-terminale UBA (Yao, 2010; Vadlamudi et al., 1996). Mit Hilfe von 3xFlag-*Pulldowns* konnte gezeigt werden, dass auch p62^{Δ69-251} in der Lage ist ubiquitinierte Proteine zu binden. In Immunfluoreszenzaufnahmen primärer p62^{wt}- und p62^{Δ69-251}-Fibroblasten zeigt sich auch nach der Hemmung des Proteasoms oder der Autophagozytose keine deutliche co-Lokalisation von p62 und ubiquitinierten Proteinen. Als weitere Verifizierung der Interaktion wurden *Pulldown*-Experimente mit Ubiquitinsepharose und Leberextrakten der p62^{wt}- und p62^{Δ69-251}-Mäuse durchgeführt, die eine Bindung bestätigten. Gestützt werden diese Daten durch die massenspektrometrische Analyse nach einem *Pulldown-Assay*, bei der Ubiquitin als Interaktionspartner von p62^{wt} und p62^{Δ69-251} identifiziert werden konnte (siehe Abb. 16). Im Rahmen der Ubiquitin-bezogenen Experimente mit p62 wurde untersucht, ob das Protein p62 selbst ubiquitiniert wird. Hierzu wurde ein *Assay* genutzt, dem die kovalente Bindung von Ubiquitin an Substratproteinen zu Grunde liegt. Hierdurch kann der Ubiquitin-Substrat-Komplex auch unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt werden. Anhand dieses *Assays* konnte gezeigt werden, dass p62^{wt} zwar mit Ubiquitin interagiert, selbst jedoch nicht ubiquitiniert wird. Im Gegensatz hierzu wird das Protein α -Actinin 4 kovalent mit Ubiquitin verknüpft. Da p62^{wt} nicht ubiquitiniert wird, ist davon auszugehen, dass p62^{Δ69-251} ebenfalls nicht als Substrat der Ubiquitin-Ligasen fungiert.

Die Interaktion der isolierten LC3-Bindedomäne von p62 mit LC3 ist beschrieben (Pankiv et al., 2007). Anhand von Immunfluoreszenzaufnahmen primärer Zellen konnte die Co-Lokalisation, und damit die Interaktion von p62^{Δ69-251} mit LC3 bestätigt werden (siehe Abb. 18).

Proteine werden oft zunächst sequestriert, bevor es eventuell zu einer Degradation kommt. Die Sequestrierung erfolgt unter anderem über die Bildung von Homo-Oligomeren durch das Protein p62 (Lamark et al., 2003; Wilson et al., 2003). Die Interaktion von p62^{Δ69-251} mit p62^{wt} konnte durch die Co-Überexpression von GFP-p62^{wt} und 3xFlag *getagtem*

p62^{Δ69-251} in HEK-Zellen nachgewiesen werden. Diese Bindung wurde auch für das Wildtypprotein gezeigt (siehe Abb. 19).

P62 kann die ubiquitinierten Proteine als Alternative zu der Autophagozytose auch dem Proteasom zuführen, indem es als Cargo-Protein mit diesem interagiert (Seibenhener et al., 2004). Diese Funktion konnte anhand der massenspektrometrischen Analysen der 3xFlag-Pulldowns bestätigt werden, bei denen, sowohl für p62^{Δ69-251} als auch für p62^{wt} verschiedene proteasomale Untereinheiten identifiziert werden konnten.

Die Interaktionsstudien zeigen, dass p62^{Δ69-251} in der Lage ist, mit Ubiquitin, LC3, p62^{wt} und dem Proteasom zu interagieren. Somit hat das Protein p62^{Δ69-251} das Potential, alle Funktionen in Bezug auf die Proteindegradation zu erfüllen (siehe Abb. 44).

Die Inhibition von Autophagozytose oder UPS führt zur Anreicherung des Proteins p62 in der Zelle (Ishii et al., 1997; Klionsky et al., 2008). Da p62 im Rahmen der Autophagozytose abgebaut wird, liegt es bei einer defekten Autophagozytose vermehrt vor. Zusätzlich werden nicht abgebaute Proteine in Aggregaten inaktiviert, die durch Selbstinteraktion von p62-Molekülen zu Stande kommen. Als dritter Faktor könnte das Gleichgewicht von UPS und Autophagozytose eine Rolle spielen. Durch die Inhibition des einen Abbaueggs wird der andere hochreguliert. Da p62 bei beiden Prozessen eine Rolle spielt, könnte dieses der Grund für eine verstärkte Expression des Proteins bei der Inhibition der Abbaueggs sein (Zheng et al., 2009). Anhand von quantitativen Western Blots konnte gezeigt werden, dass der Level von p62^{Δ69-251}, ebenso wie der Level von p62^{wt}, nach der Inhibition mit MG132 (Proteasom-Inhibitor) oder Bafilomycin (Autophagozytose-Inhibitor) steigt. Zudem konnte nach Behandlung mit Bafilomycin die typische Anreicherung p62-positiver Aggregate in Zellen der p62^{wt}- und der p62^{Δ69-251}-Mäuse beobachtet werden. Diese Befunde machen deutlich, dass die Zellen der p62^{Δ69-251}-Mäuse in der Lage sind, in ähnlicher Weise auf einen Autophagozytose-assoziierten Stimulus zu reagieren, wie die Wildtypzellen (siehe Ergebnisse, Abb. 43).

6.2.2 Signaltransduktion-assoziierte Interaktionen

Dem trunkierten Protein $p62^{\Delta 69-251}$ fehlen die Aminosäuren 69-251 und mit ihnen die TRAF6-Bindedomäne, die p38-Bindedomäne und der ZZ-Finger. Zusätzlich schließen die fehlenden Aminosäuren einen Teil der PB1-Domäne ein.

Anhand von *Pulldown*-Assays konnte keine Interaktion von $p62^{\Delta 69-251}$ mit endogenem TRAF6 nachgewiesen werden. Unter normalen Kultivierungsbedingungen co-lokalisiert TRAF6 mit $p62^{wt}$, jedoch nicht mit $p62^{\Delta 69-251}$. Nach der Behandlung der Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 kommt es zu einer partiellen Co-Lokalisation von TRAF6 und $p62^{\Delta 69-251}$. Durch den Proteasom-Inhibitor werden ubiquitinierte Proteine angereichert. TRAF6 wird ubiquitiniert und kann in diesem modifizierten Zustand an die UBA von $p62$ binden (Wooten et al., 2005). Die beobachtete Co-Lokalisation der beiden Proteine ist auf diese indirekte Interaktion von TRAF6 und $p62^{\Delta 69-251}$ über Ubiquitinketten zurückzuführen (siehe Abb. 20).

Die $aPKC\zeta$ bindet $p62$ an dessen N-Terminus, der PB1-Domäne. Durch *3xFlag-Pulldowns* konnte gezeigt werden, dass $p62^{\Delta 69-251}$, im Gegensatz zu $p62^{wt}$, nicht in der Lage ist, mit der endogenen $aPKC\zeta$ zu interagieren, obwohl nur ein kleiner Bereich der PB1-Domäne von $p62$ fehlt (siehe Abb. 21). Der fehlende Anteil der Bindedomäne ist also essentiell für die Interaktion zwischen den beiden Proteinen. Die PB1-Domäne von $p62$ kann in zwei Unterbereiche unterteilt werden: die SH2-Domäne und die AID (*atypical PKC interaction domain*) (Hirano et al., 2004) (siehe Abb. 44). $aPKC$ bindet die AID-Domäne von $p62$ (Wilson et al., 2003), welche bei dem Protein $p62^{\Delta 69-251}$ trunkiert ist.

Durch das Fehlen der TRAF6- und $aPKC$ -Interaktion kann $p62^{\Delta 69-251}$ nicht mehr an der NF- κ B-Antwort teilhaben. Eine indirekte Bindung an Rezeptoren über TRAF6 und die Rekrutierung von $aPKC$ zu den Rezeptoren erfolgt nicht. Zusätzlich fehlt mit der ZZ-Domäne die Möglichkeit für die RIP1-Interaktion, einem weiteren Adaptermolekül an Rezeptoren, und CYLD, einem deubiquitinierenden Enzym, welches an der Rückkopplung der TRAF6- $p62$ -vermittelten Osteoklastogenese beteiligt ist.

6.2.3 Interaktion mit den MAP-Kinasen p38 und ERK1

Die Bindestelle von ERK1 liegt in der N-terminalen Region von p62, wobei die Aminosäure 7 essentiell für die Bindung ist (Rodriguez et al., 2006). Die Bindestelle für p38 wurde auf die Aminosäuren 173 bis 182 eingegrenzt (Kawai et al., 2008). Anhand von Co-Immunpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass p62 durch den Verlust der Aminosäuren 69 bis 251 die Bindekapazität für p38 verliert (siehe Abb. 23).

Im Gegensatz hierzu ist p62^{Δ69-251} in der Lage, mit ERK1 zu interagieren (siehe Abb. 22). Dieses konnte mit Hilfe von Immunpräzipitationen mit endogenem und überexprimiertem ERK1 gezeigt werden. Zusätzlich finden sich in primären Fibroblasten der p62^{wt}- und der p62^{Δ69-251}-Maus nach Autophagozytose-Inhibition ERK und p62 positive Aggregate.

6.2.4 Zusammenfassung der Interaktionsstudien und der Domänenstruktur von p62^{Δ69-251}

Durch das Fehlen der Aminosäuren 69 bis 251 des Proteins p62 wird die Proteindegradationsfunktion von der Signaltransduktionsfunktion entkoppelt. Die Abbildung 44 zeigt die Domänenstruktur von p62^{Δ69-251}, die Bindung der untersuchten Interaktionspartner und den damit verbundenen Funktionsverlust. Das Protein p62^{Δ69-251} ist in der Lage, mit den vorhandenen Domänen die bekannten Interaktionspartner zu binden. Dieser Befund zeigt, dass die Funktionalität der verbliebenen Domänen des trunkierten Proteins nicht durch eine fehlerhafte Tertiärstruktur beeinträchtigt wird.

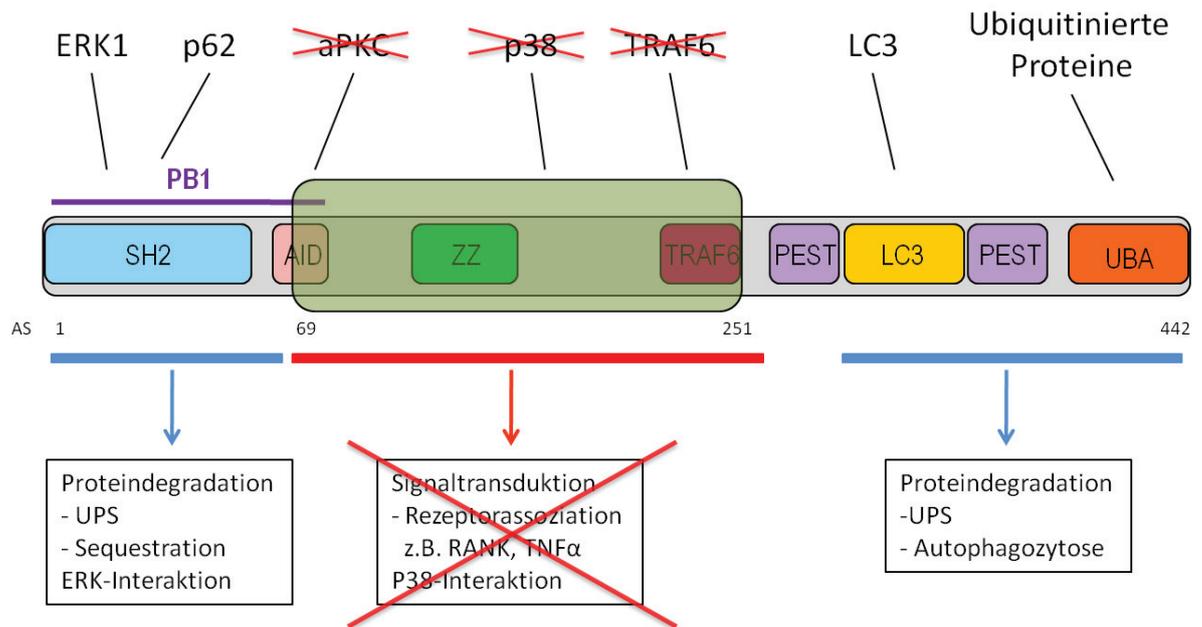


Abb. 44: Domänenstruktur von p62^{Δ69-251}. P62^{Δ69-251} verliert mit den Aminosäuren (AS) 69 bis 251 (grüner Kasten) die TRAF6-Bindedomäne, die ZZ-Bindedomäne und einen Teil der PB1-Domäne. Das Protein ist nicht mehr in der Lage, mit der aPKC ζ , TRAF6 und p38 zu interagieren und somit die Signaltransduktion-assoziierten Funktionen auszuüben. Die Bindungsstellen für Ubiquitin, LC3, p62 und ERK1 sind intakt und können ihrer Funktion nachkommen.

6.3 Der Verlust des Signaltransduktionsmoduls von p62 führt zur altersbedingten Fettleibigkeit von Mäusen

In dieser Arbeit wurde eine Mauslinie charakterisiert, der die Aminosäuren 69 bis 251 des Multiadapterproteins p62 fehlen. Die p62^{Δ69-251}-Mäuse zeigen im Vergleich zu den p62^{wt}-Mäusen keine Auffälligkeiten im Bezug auf ihre Lebenserwartung. Der Verlust der Aminosäuren 69 bis 251 des Proteins p62 reicht jedoch aus, um eine altersbedingte Fettleibigkeit auszulösen. Im Rahmen der Gewichtsanalyse von Mäusen bis zu einem Alter von 2 Jahren (vgl. Abb. 24) konnte eine signifikante Gewichtszunahme von männlichen p62^{Δ69-251}-Tieren ab dem 5. Monat verzeichnet werden. Weibliche p62^{Δ69-251} erreichen erst ab einem Alter von 11 Monaten ein signifikant höheres Gewicht als die p62^{wt}-Weibchen. Ein Grund für die verspätete Gewichtszunahme weiblicher p62^{Δ69-251}-Mäuse könnte allerdings auch darin liegen, dass diese Tiere in einem Alter von 3 bis 9 Monat an der Zucht beteiligt waren. In der Schwangerschaft und während der Aufzucht der Jungtiere haben die weiblichen Mäuse einen erhöhten Energieaufwand. Zudem verringerte sich aufgrund

der Trächtigkeit die Gruppengröße, da das Gewicht dieser Tiere nicht mit einbezogen werden konnte. Beide Geschlechter nehmen allerdings an Gewicht zu, wobei anhand der Statistik zu erkennen ist, dass kein Plateau mit einem Maximalgewicht ab einem bestimmten Alter erreicht wird. Im Vergleich hierzu bleibt das Gewicht der $p62^{wt}$ -Tiere ab einem Alter von etwa 6 Monaten relativ konstant. Anhand von Organgewichten und Fettmenge wurde gezeigt, dass die Gewichtszunahme der $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse hauptsächlich von einer Vermehrung des weißen Fettgewebes herrührt. Zusätzlich sind bei dieser Mauslinie alle untersuchten inneren Organe (Herz, Nieren, Milz, Pankreas und Leber) bis auf das Gehirn vergrößert. Fettfärbungen von Organen mit Oil Red O konnten zeigen, dass die $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse eine Fettleber entwickeln. Der Größenzuwachs der anderen Organe ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sie einen größeren Körper versorgen müssen. Dieses Phänomen ist von Patienten mit Adipositas bekannt (Sethi und Vidal-Puig, 2007).

Adipositas ist ein Risikofaktor für Herz-Kreislauf-erkrankungen, wie Bluthochdruck (Galassi et al., 2006). Aus diesem Grund wurden Blutdruck und Herzfrequenz von $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäusen im Vergleich mit Wildtypmäusen gemessen (vgl. Abb. 25). Der Blutdruck wurde für männliche Tiere zweier Altersgruppen bestimmt: 10 Monate alte Tiere, mit nur einer geringen Fettleibigkeit und 23 Monate alte Tiere mit einem Körpergewicht von rund 60 Gramm (im Vergleich hierzu wiegen die entsprechenden Wildtypmäuse knapp 30 Gramm). Blutdruck und Herzfrequenz der untersuchten Tiere einer Altersstufe aber unterschiedlichen Genotyps sind identisch. Das metabolische Syndrom gilt als Vorerkrankung für kardiovaskuläre Erkrankungen. Nicht jeder Patient mit Adipositas entwickelt Bluthochdruck. Ungesunde Ernährung unterstützt diesen Prozess allerdings (James et al., 2006). So führt ein zu hohes Salzangebot unter anderem zur Aktivierung von TonEBP (*tonicity-responsive enhancer binding protein*), welches eine vermehrte VEGF-C (*vascular endothelial growth factor-C*) Sekretion auslöst und damit zu Bluthochdruck führt (Machnik et al., 2009). Es ist möglich, dass die $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse nach Gabe einer Hochsalzdiät eine stärkere Blutdruckzunahme zeigen, als der entsprechende Wildtyp.

Oftmals ist Fettleibigkeit mitverantwortlich für die Entwicklung eines Diabetes Mellitus Typ 2 (Eckel et al., 2005; Deng und Scherer, 2010). Anhand von Blutzuckermessungen verschieden alter $p62^{wt}$ - und $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse konnten keine signifikanten Unterschiede

zwischen den Genotypen einer Altersgruppe verzeichnet werden (vgl. Abb. 26). Allerdings zeigt sich eine Tendenz, nach der der mittlere Blutzuckerspiegel der $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse immer höher liegt als derjenige der $p62^{wt}$ -Mäuse. Es ist zu vermuten, dass sich die $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse auf der Schwelle zur Entwicklung einer Glukose-Intoleranz und daraus folgend eines Diabetes Mellitus Typ 2 befinden, der durch einen Zusatzschaden ausgelöst werden würde.

Bei Fettleibigkeit von Tiermodellen sind meist extrazelluläre Faktoren, wie eine Hochfettdiät (Hariri und Thibault, 2010) oder eine Störung des hormonellen Fettstoffwechsels durch Leptin- oder Leptinrezeptordefekte (Kennedy et al., 2010; Alexandre de und Miguel, 2009) für die Ausprägung eines adipösen Phänotyps verantwortlich. Das Signaltransduktionsmodul von p62 ist ein intrazellulärer anti-Adipositas Faktor, dessen Verlust zu altersbedingter Fettleibigkeit führt. Die $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse entwickeln einen massiven adipösen Phänotyp, bei dem ihr Körpergewicht in etwa verdoppelt wird. Sie bleiben allerdings von weiteren Folgeerkrankungen der Adipositas - wie Diabetes Typ 2 und Bluthochdruck - verschont. Diese Mauslinie kann als Modell für das metabolische Syndrom dienen, und anhand von zusätzlichen Schäden im Tiermodell könnte die Auswirkung von exogenen Faktoren auf einen adipösen Körper untersucht werden. Ein solches Modell ist gesellschaftlich von besonderer Bedeutung, da in Deutschland, laut statistischem Bundesamt 2010 mehr als 50 % der erwachsenen Bevölkerung übergewichtig ist; Tendenz steigend (Statistisches Bundesamt, Pressemitteilung Nr. 194 vom 02.06.2010).

6.3.1 Nephrologische Aspekte de $p62^{\Delta 69-251}$ -Maus

Proteindegradation spielt in postmitotischen Zellen wie Podozyten eine entscheidende Rolle (Weide und Huber, 2009). Zur Untersuchung, ob verschiedene Autophagozytose-assoziierte Proteine in den Nieren der $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse fehlreguliert sind, wurden quantitative Western Blots mit Nierenextrakten der Genotypen $p62^{wt}$ und $p62^{\Delta 69-251}$ durchgeführt (vgl. Abb. 32). Es ergaben sich keine signifikanten Änderungen für die Proteine Beclin, phospho-GSK3 β , Raptor, Atg5 und Atg7. Die p62-Interaktionspartner LC3 und TRAF6 liegen signifikant erhöht vor. Die Untersuchungen der Gewebe wurden an Nieren von Mäusen in einem Balb/C Hintergrund durchgeführt. Die signifikanten Steigerungen der TRAF6 und LC3-Level konnten auch in primären Zellen der Mäuse in

einem C57/Black6-Hintergrund bestätigt werde (vgl. Abb. 34). Die Erhöhung des LC3-Levels, besonders von LC3II, weist auf eine gesteigerte Autophagozytose hin (Klionsky et al., 2008). Eine Störung der Autophagozytose könnte Auswirkungen auf die Podozytenfunktion haben, da Proteindegradation in diesen postmitotischen Zellen eine wichtige Rolle spielt.

Oftmals entwickeln Patienten mit dem metabolischen Syndrom auch eine Nierenerkrankung, wie die diabetische Nephropathie, einhergehend mit einer Albuminurie (Palmer, 2011). Um die Frage nach einer eventuellen Nierenbeteiligung bei dem Phänotyp der $p62^{\Delta 69-251}$ -Maus zu adressieren, wurden Paraffinschnitte von Nieren 20 Monate alter Tiere gefärbt, histologisch ausgewertet und mit Nieren entsprechender Wildtypiere verglichen (vgl. Abb. 29). Im Rahmen dieser morphometrischen Analyse konnte festgestellt werden, dass das Gesamtnierenvolumen, ebenso wie das Gesamtgewicht der Nieren von $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäusen im Vergleich zu Wildtypnieren signifikant erhöht ist. Diese Vergrößerung ist durch eine Zunahme des Nierenmarks zu erklären. Die numerische Dichte der Glomeruli in der Nierenrinde ist nicht verändert. Außer der veränderten Volumenverhältnisse der Nieren konnten keine weiteren morphologischen Auffälligkeiten festgestellt werden.

Um zu untersuchen, ob sich der Verlust des Signaltransduktionsmoduls von p62 auf die Nierenfunktion auswirkt, wurde Urin verschieden alter Mäuse analysiert. Hierbei wurde einerseits nach Geschlecht, andererseits nach Alter der Tiere unterschieden. Es wurden Tiere mit einem Alter von 5 Monaten untersucht, bei denen noch keine deutliche Gewichtszunahme zu verzeichnen war, und adipöse Tiere mit einem Alter von mehr als 15 Monaten. Die Parameter Harnstoff, Glukose, Natrium, Kalium und Gesamtprotein wurden bestimmt (vgl. Abb. 31). Im Vergleich mit Urin von Wildtyptieren gleichen Geschlechts und gleichen Alters ergab sich lediglich ein signifikanter Unterschied der Kaliumkonzentration bei alten männlichen Tieren. Die Kaliumkonzentration im Urin der $p62^{\Delta 69-251}$ -Tiere ist signifikant erhöht. Dieses hängt eventuell mit einer beginnenden Diabetes Mellitus-Erkrankung zusammenhängen, da sowohl Insulinmangel als auch eine diabetische Ketoazidose (Störung des Säure-Base-Haushaltes) zu diesem Befund führen können (Kitabchi et al., 2009). Bei den alten männlichen Tieren ist eine leichte Erhöhung aller

Parameter festgestellt worden. Diese Tendenz weist darauf hin, dass ein Zusatzschaden einen nephrologischen Phänotyp hervorrufen könnte.

Zusätzlich zu dem Gesamtproteingehalt des Urins wurde der Albumingehalt des Urins bestimmt. Dieser Parameter wird oft für einen Verlust der Filtrationsfunktion der Niere herangezogen, da eine intakte Schlitzmembran der Podozyten dieses Protein im Blut zurückhält (Guh, 2010). Die $p62^{\Delta 69-251}$ -Mäuse weisen in keinem Alter eine deutlich stärkere Albuminurie auf, als die entsprechenden $p62^{wt}$ -Tiere.

Der Verlust des Signaltransduktionsmoduls von p62 führt somit nicht zu einem Filtrationsverlust der Niere. Es ist allerdings denkbar, dass ein Zusatzschaden durch einen Modellversuch, wie die Induktion einer diabetischen Nephropathie durch Streptozotocin (Daneshgari et al., 2009) oder ein Proteinüberladungsmodell stärkere Auswirkungen auf die vorgeschädigte Niere der $p62^{\Delta 69-251}$ -Mauslinie hat, als auf die $p62^{wt}$ -Tiere. Aus der Literatur ist bekannt, dass oftmals ein Krankheitsmodell genutzt werden muss, damit eine genetische Prädisposition zum Ausbruch einer Erkrankung führt (Dai et al., 2009; Zhang et al., 2008; Shevalye et al., 2010).

6.4 Die Entkopplung von Signaltransduktions- und Proteindegradationsfunktion von p62 führt zu ROS-Erhöhung und einer veränderter Autophagozytose

Ein aerobes Milieu führt unausweichlich zur Produktion von ROS (z.B. Hydroxylradikale und Wasserstoffperoxid). Diese wird z.B. aufgrund hormoneller, proinflammatorischer oder Nährstoff-assoziiertes Signale hervorgerufen, woraufhin zelluläre Antworten, wie die Aktivierung von MAP-Kinasen oder Proteinmodifikationen, erfolgen (Bashan et al., 2009). Die Menge an ROS in Zellen ist ein Parameter für Zellstress. Zur Untersuchung von ROS in primären Zellen der $p62^{\Delta 69-251}$ -Mauslinie wurde ein Farbstoff eingesetzt, der durch ROS zu einem fluoreszierenden Produkt umgesetzt wird. Durch den Einsatz einer ROS-induzierenden Droge (TBHP) konnte die Möglichkeit zur densitometrischen Messung von Unterschieden in der ROS-Produktion gezeigt werden. Die quantitative Auswertung kann durch die Messung der Fluoreszenzintensität von Einzelzellen erfolgen (vgl. Abb. 38). Mit Hilfe dieses etablierten Assays konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten der $p62^{\Delta 69-251}$ -Maus signifikant mehr ROS produzieren als entsprechende $p62^{wt}$ -Zellen (vgl. Abb. 39).

Durch eine Erhöhung der ROS-Aktivität kommt es zur oxidativen Zerstörung von Proteinen, DNA, Organellen und Lipiden. Um dieser Schädigung entgegen zu wirken, existieren verschiedene enzymatische und nicht-enzymatische antioxidative Mechanismen in der Zelle (Elahi et al., 2009). Ein weiterer Schutzmechanismus der Zelle ist die Autophagozytose, durch die fehlerhafte Zellbestandteile degradiert werden. Sie wird durch ROS aktiviert (Moore, 2008). Da p62 eine Schlüsselrolle in der Autophagozytose spielt, ROS und Autophagozytose in direktem Zusammenhang stehen und die Erhöhung des LC3II-Levels in der p62^{Δ69-251}-Maus einen Hinweis auf eine Erhöhung der Autophagozytose gibt, wurde ein Autophagozytose-Assay an primären Podozyten durchgeführt. Diese Zellen haben einen besonders hohen Autophagozytose-Level und eignen sich aus diesem Grund besonders für diese Messungen. Grundlage des Assays ist die Anfärbung saurer vesikulärer Strukturen mit dem Farbstoff MDC (Biederbick et al., 1995). Der Assay wurde durch Messungen an COS-Zellen etabliert (vgl. Abb. 40), um dann auf das primäre Zellsystem übertragen zu werden. Im Vergleich zu den Podozyten der p62^{wt}-Mäuse, weisen die p62^{Δ69-251}-Podozyten eine signifikante Anreicherung (etwa um den Faktor 4) saurer vesikulärer Strukturen auf (vgl. Abb. 42). Dieser Befund lässt, gemeinsam mit dem Befund des erhöhten LC3II-Levels, auf eine gesteigerte Autophagozytoseaktivität schließen. Es könnte sich allerdings auch um eine gestörte Autophagozytose handeln, die nicht korrekt abgeschlossen wird. Diese Störung müsste aber zu einem Zeitpunkt nach der Fusion mit Lysosomen liegen und ist eher unwahrscheinlich.

Zudem führt vermehrte ROS-Produktion zu ER (Endoplasmatisches Retikulum)-Stress (Guo et al., 2009). P62^{Δ69-251} ist im Vergleich zu p62^{wt} verstärkt perinukleär lokalisiert (vgl. Abb. 37). Durch den ER-Stress fallen vermehrt fehlerhafte Proteine an. Eventuell wird p62^{Δ69-251} aufgrund der hohen Menge fehlerhafter Proteine direkt in die Region des ERs (perinukleär) rekrutiert, um sie zu binden und dem Abbau zuzuleiten. Ein weiterer, ROS-unabhängiger, Erklärungsansatz ist das Unvermögen von p62^{Δ69-251} an Rezeptorkomplexe zu binden (z.B. über TRAF6). Dadurch ist das Protein auch nicht in der Peripherie der Zellen lokalisiert.

Die Rolle der Autophagozytose im Zusammenhang mit ROS besteht nicht nur in der Reduktion der ROS-Folgen durch die Degradation von fehlerhaften Proteinen. Die ROS-Produktion findet in vorgeschädigten Mitochondrien statt. Diese verlieren aufgrund

dessen ihr Membranpotential und es kommt zur selektiven Autophagozytose von Mitochondrien über das Cargo-Proteine NIX (Schweers et al., 2007). Ein zweiter Mechanismus zur Degradation von Mitochondrien wird über die Ubiquitinierung des mitochondrialen Anionenkanals VDAC1 (*voltage-dependent anion channel*) vermittelt, der dann durch p62 erkannt und über die Adaptation an LC3 der Autophagozytose zugeleitet wird (Geisler et al., 2010). Aufgrund dessen kann die Autophagozytose als Überlebensmechanismus der Zelle dienen, indem sie einerseits die geschädigten Proteine abbaut und auf der anderen Seite die Neuproduktion von ROS durch die Eliminierung ROS-produzierender Mitochondrien verhindert (Scherz-Shouval und Elazar, 2011). Aus diesem Grund wäre es interessant zu untersuchen, welche Folgen die erhöhte ROS-Produktion der $p62^{\Delta 69-251}$ -Maus im Zusammenhang mit einer fehlenden Autophagozytose hätte. Eine Kreuzung der $p62^{\Delta 69-251}$ -Maus mit organspezifischen $Atg5^{-/-}$ -Mäusen oder ein *knockdown* von essentiellen Genen der Autophagozytose in primären Zellen der $p62^{\Delta 69-251}$ -Maus wären denkbar.

Eine Störung der Autophagozytose der $p62^{\Delta 69-251}$ -Maus könnte auch auf anderer Ebene erfolgen. P62 interagiert mit TRAF6. Dieses Protein hat, neben der Rekrutierung von p62 und aPKC zu aktivierten Rezeptoren, auch eine E3-Ligasen-Aktivität. Es kann also mit hoher Spezifität Substratproteine ubiquitinieren. Durch die Interaktion von p62 mit einer E3-Ligase kommt p62 in räumliche Nähe mit dem zu degradierenden Protein und kann es so binden und dem UPS oder der Autophagozytose zuleiten. Hierdurch würde sich ein weiterer Schritt in der zunehmenden Substratspezifität der Ubiquitinierung von Proteinen ergeben, wenn durch die räumliche Nähe von E3-Ligase und Cargo-Protein eine direkte Übertragung des ubiquitinierten Proteins auf das Transportprotein möglich wäre. Anhand massenspektrometrischer Analysen konnte ein Hinweis auf die Interaktion einer weiteren E3-Ligase, dem Enzym UBR1, mit p62 gefunden werden. UBR1 erkennt Substrate anhand der N-Ende-Regel. Diese potentielle Interaktion konnte für das Protein $p62^{\Delta 69-251}$ nicht gefunden werden. Es ist also möglich, dass die Entkopplung der Signaltransduktion von der Autophagozytose des Proteins p62 Einfluss auf die Art der degradierten Proteine hat. Dieser Mechanismus könnte durch die Untersuchungen der Effektivität des Abbaus von Substraten der beschriebenen E3-Ligasen in Zellen der $p62^{\Delta 69-251}$ -Maus weiter analysiert werden. Neuere Studien zeigen, dass TRAF6 mutierte Formen von α -Synuclein bei

Parkinson-Patienten ubiquitiniert (Zucchelli et al., 2010). Durch die Rolle des Proteins p62 bei Morbus Parkinson wäre es gut denkbar, dass hier eine direkte Übertragung von mutiertem α -Synuclein auf p62 stattfindet. Eine zusätzliche Mutation des Proteins α -Synuclein 4 in der p62 ^{Δ 69-251}-Maus könnte demnach zu einem starken Parkinson-Phänotyp der Mauslinie führen.

6.5 P62 ^{Δ 69-251} und die MAP-Kinasen (Mitogen aktivierte Proteinkinasen)

Die Bindestelle von ERK1 liegt N-terminal um die Aminosäure 7 des Proteins p62 (Rodriguez et al., 2006). Die Bindestelle für p38 wurde auf die Aminosäuren 173-182 eingegrenzt (Kawai et al., 2008).

Für die p62^{-/-}-Maus der Arbeitsgruppe wurde publiziert, dass sie - ähnlich wie die p62 ^{Δ 69-251}-Maus - eine altersbedingte Fettleibigkeit entwickelt, die mit einer Fettleber und Insulinresistenz einhergeht (Rodriguez et al., 2006). Es wurde postuliert, dass die Fettleibigkeit auf eine gesteigerte Adipogenese mit einer gesteigerten ERK1-Aktivität in weißem Fettgewebe zurückzuführen ist (Lee et al., 2010). Die Verkreuzung einer ERK1^{-/-} mit der beschriebenen p62^{-/-}-Mauslinie ergab eine Mauslinie, die keinen adipösen Phänotyp entwickelt. Die Rolle von p62 wird wie folgt postuliert: p62 aggregiert ERK1, durch Interaktion im vorderen Bereich des Proteins p62 (Aminosäure 7, ein Lysin, ist essentiell, (Rodriguez et al., 2006)) und inaktiviert es so. Durch das Fehlen von p62 kann ERK1 nicht deaktiviert werden und ist somit hyperaktiv, was zu einer gesteigerten Adipogenese führt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass p62 ^{Δ 69-251} in der Lage ist, mit ERK1 zu interagieren (vgl. Abb. 22). Die Mauslinie entwickelt trotzdem einen adipösen Phänotyp. In stimulierten primären Fibroblasten der Maus liegt ERK1 co-lokalisiert mit p62 ^{Δ 69-251} vor. Zusätzlich konnte keine signifikante Veränderung der ERK-Aktivität (Verhältnis p-ERK zu ERK) in weißem Fettgewebe der p62 ^{Δ 69-251}-Mäuse im Vergleich mit Wildtypmäusen gefunden werden (vgl. Abb. 35). Die ERK1-p62-Interaktion kann demnach nicht der einzige Mechanismus sein, durch den eine Fettleibigkeit in Mäusen mit einem p62-Defekt begründet ist. Es ist bekannt, dass die ERK^{-/-}-Maus - selbst bei Fütterung einer Hochfettdiät - eine Veränderung in der Adipogenese mit verminderte Fettproduktion zeigt (Bost et al.,

2005b). Eventuell ist die Beobachtung, dass die p62-ERK-doppelknockout-Maus keine altersbedingte Fettleibigkeit entwickelt zum Teil auf das reduzierte Adipogenese-Vermögen der ERK^{-/-}-Maus zurückzuführen.

Im Gegensatz zu ERK1 kann die p38 MAP-Kinase nicht mit p62^{Δ69-251} interagieren. Die direkte Interaktion von p38 und p62 wird über die Aminosäuren 173-182 von p62 vermittelt (Kawai et al., 2008), die in dem hier vorgestellten Mausmodell nicht exprimiert werden. *Pulldown*-Experimente mit überexprimiertem HA-p38 und 3xFlag-p62-Konstrukten konnten bestätigen, dass p62^{Δ69-251}, im Gegensatz zu p62^{wt}, nicht in der Lage ist, p38 direkt zu binden (vgl. Abb. 23).

Die fehlende p38- p62^{Δ69-251} Interaktion könnte für die Ausbildung des adipösen Phänotyps der Maus mitverantwortlich sein. Es konnte gezeigt werden, dass p62 die p38-Aktivität dosisabhängig steigert (Sudo et al., 2000). Des Weiteren ist bekannt, dass nach p38-Aktivierung ein Komplex aus p38 und p62 in den Zellkern wandert und hier Transkriptionsregulierende Aufgaben übernimmt (Diradourian et al., 2008). Der Bezug von p38 zur Adipogenese wurde zunächst in einer präadipozytären Zelllinie (3T3-L1) erforscht, bei der in verschiedenen Studien auch der p38-Inhibitor SB203580 eingesetzt wurde (Bost et al., 2005a). Die Ergebnisse der Studien stehen zum Teil im Widerspruch zu anderen, bereits publizierten Daten. So zeigt z.B. Engelmann et al. eine gesteigerte Adipogenese durch p38 (Engelman et al., 1998; Engelman et al., 1999), wohingegen andere Arbeitsgruppen eine gesteigerte Adipogenese durch Inhibition von p38 zeigen (Takenouchi et al., 2004; Aouadi et al., 2006). Der direkte Einfluss, der p38-Aktivität auf die Adipogenese ist demnach noch nicht abschließend verstanden. Es könnte allerdings eine Verbindung der fehlenden p62^{Δ69-251}-p38-Bindung und einer veränderten Adipogenese in der p62^{Δ69-251}-Mauslinie geben. Um diese Frage genauer zu adressieren, werden wir in Zukunft mesenchymale Stammzellen (MSC) der p62^{Δ69-251}-Mäuse und der p62^{wt}-Mäuse zu Adipozyten differenziert und deren Differenzierungsgeschwindigkeit bestimmen. Man könnte die Adipogenese auch durch die Stimulation von Adipozyten-Vorläuferzellen aus weißem Fettgewebe untersuchen.

6.6 Verbindung von ROS, MAP-Kinase-Aktivierung und der Ausprägung von Adipositas – p62 als „Missing Link“?

Das Fehlen der Aminosäuren 69 bis 251 des Proteins p62 bewirkt eine erhöhte ROS-Aktivität und einen altersbedingten adipösen Phänotyp.

Bei über 80 Erkrankungen spielt ROS eine Rolle, darunter alle entzündlichen Erkrankungen (z.B. Arthritis und Glomerulonephritis), ischämische Herzerkrankungen, Krebs, Arteriosklerose und Neurodegenerative Erkrankungen, wie Alzheimer und Parkinson (McCord, 2000). In den meisten Fällen ist allerdings nicht geklärt, ob eine ROS-Überproduktion Ursache oder die Wirkung ist (Lavie und Lavie, 2009).

In Leber, Fett und Skelettmuskulatur von KKAy-Mäusen (genetisch bedingtes metabolisches Syndrom) wurde eine ROS-Erhöhung gefunden (Furukawa et al., 2004). Diese wurde aber auch als Folge einer Hochfettdiät in der Leber von Mäusen beschrieben (Matsuzawa-Nagata et al., 2008). Ein Überangebot an Nährstoffen führt in Folge des aktivierten Citratzyklus zu einer Steigerung der ROS-Produktion durch die Mitochondrien (Wellen und Thompson, 2010). ROS fällt in diesem Fall als Nebenprodukt im Rahmen der Zellatmung an.

Oxidativer Stress induziert adipogene Faktoren, wie TNF- α (Hosogai et al., 2007). NF- κ B wird im metabolischem Syndrom durch übermäßige Nährstoffaufnahme aktiviert (Baker et al., 2011). Diese Aktivierung führt zu einer Aktivierung von MAP-Kinasen (Kennedy et al., 2009). Das Netzwerk der Ursachen und Abläufe einer vermehrten Cytokin-Ausschüttung beim metabolischen Syndrom ist bislang noch nicht ausreichend entschlüsselt. Die Aufklärung des Signalweges könnte zur Identifizierung neuer Zielstrukturen für die Therapie führen (Baker et al., 2011).

In vielen Veröffentlichungen wird beschrieben, dass oxidativer Stress eine Begleiterscheinung von Adipositas und Diabetes ist (Evans et al., 2002). Es besteht jedoch noch eine Lücke in dem Verständnis, warum und mit welchen Folgen ROS in den verschiedenen Organen vermehrt gebildet wird; zudem scheinen gewebsspezifisch unterschiedliche Arten von ROS aufzutreten (Bashan et al., 2009). Neben der Entstehung von ROS durch ein Überangebot an Nahrung regt auch Insulin die ROS-Produktion über

diverse Mechanismen an. So wird beispielsweise die NADPH-Oxidase 4 (NOX4) durch Stimulation von Zellen mit Insulin aktiviert (Mahadev et al., 2004).

Darüber hinaus konnte bereits in den 80er Jahren gezeigt werden, dass Wasserstoffperoxid die gleichen Signalkaskaden auslöst wie Insulin (Hayes und Lockwood, 1987). Heute sind die Wirkungsmechanismen von ROS auf diesen Signalweg besser verstanden. ROS inhibieren verschiedene Proteine, die die Insulin-Signaltransduktion negativ regulieren (Bashan et al., 2009). Zusätzlich können ROS zu einer veränderten Genexpression (z.B. von Adipogenese-fördernden Faktoren), veränderten Phosphorylierungen (z.B. des Insulinrezeptors), alternativen Lokalisationen und veränderter Halbwertszeit von Proteinen führen (Bashan et al., 2009). In Folge dessen induzieren ROS Insulinresistenz (Kumashiro et al., 2008).

Demnach ist eine verstärkte ROS-Aktivität einerseits Folge, andererseits Ursache von Insulinresistenz und Adipositas. Demnach kann vermutet werden, dass es sich hierbei um einen sich selbst verstärkenden Mechanismus handelt. Auch die MAP-Kinase p38 steht in einem Kreislauf mit ROS. Verschiedene MAP-Kinasen werden durch ROS aktiviert, darunter auch p38 (Ferrer et al., 2008; Pan et al., 2009). P38 ist wiederum selbst direkt an der Aktivierung von ROS beteiligt (Emre et al., 2007).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Verlust des Signaltransduktionsmoduls von p62 zu einer verstärkten ROS-Produktion führt. Die erhöhte ROS-Formation wurde nicht direkt im Gewebe der p62^{Δ69-251}-Mauslinie untersucht, sondern in isolierten Primärzellen. Bei der Kultivierung dieser Zellen bestanden entsprechende Nährstoffbedingungen wie bei den p62^{wt}-Zellen. Es ist demnach auszuschließen, dass die Erhöhung der ROS-Produktion als Folge eines veränderten Stoffwechsels des Gesamtorganismus oder durch das Überangebot an Nährstoffen ausgelöst wird. Daher ist davon auszugehen, dass der Verlust der Aminosäuren 69 bis 251 direkt zu einer Erhöhung von ROS führt. Ein Mechanismus über eine gestörte MAP-Kinase-Aktivität durch fehlende Bindung von p38 an p62^{Δ69-251} oder durch eine veränderte NF-κB-Signaltransduktion durch den Verlust der Rezeptoradaptation von p62 ist denkbar. Die entstandenen ROS können nun zu einer Insulinresistenz führen, die ihrerseits wiederum eine Vermehrung von ROS nach sich zieht. Als Folge der Insulinresistenz kommt es zu einem adipösen Phänotyp. Dieser potentielle

kommt es vermutlich nicht zur Insulin-induzierten Phosphorylierung von Grb14. Hierdurch ist das Protein nur wenig aktiv, und es resultiert eine permanente Insulinrezeptor-Aktivität. Auf längere Sicht könnte diese Daueraktivität zu einer reduzierten Antwort der Zelle auf das Insulinsignal führen, wodurch es zu einer Insulinresistenz kommt. Diese Theorie würde auch die altersabhängige Entwicklung des adipösen Phänotyps erklären.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Mauslinie charakterisiert, die ein defektes p62-Protein exprimiert. Durch molekularbiologische Untersuchungen konnte der Defekt auf das Fehlen der Aminosäuren 69 bis 251 eingeschränkt werden. Diese p62^{Δ69-251}-Mauslinie ist besonders deshalb interessant, weil sich der Phänotyp direkt auf wenige Aminosäuren eines Proteins zurückführen lässt.

Die proteinbiochemische Charakterisierung des trunkierten Proteins p62^{Δ69-251} zeigte, dass ihm die Möglichkeiten der Bindung von TRAF6, aPKCζ und p38 fehlen. Dagegen ist p62^{Δ69-251} in der Lage, alle bekannten Interaktionspartnern, die es für die Zuleitung von Proteinen zur Degradation benötigt, zu binden. Diese Befunde zeigen, dass die p62^{Δ69-251}-Maus lediglich einen Defekt des Signaltransduktionsmoduls von p62 aufweist.

Das Protein p62^{Δ69-251} wird nicht nur stabil und ubiquitär exprimiert und kann auf einen Autophagozytose-assoziierten Stimulus in ähnlicher Weise reagieren wie das Wildtypprotein; es wird sogar alternativ gespleißt, was die Funktionalität des trunkierten Proteins noch einmal bestätigt.

Das Signaltransduktionsmodul von p62 konnte als intrazellulärer anti-Adipositas-Faktor identifiziert werden, da der Verlust zu einem altersbedingten adipösen Phänotyp bei Mäusen führt. Er geht mit einer Vergrößerung der Organe und einer Fettleber einher. Die Tiere entwickeln allerdings weder Bluthochdruck noch eine nephropathologische Beteiligung.

Untersuchungen an primären Zellen der p62^{Δ69-251}-Maus im Vergleich zu p62^{wt}-Zellen zeigten eine gesteigerte ROS-Produktion und, vermutlich in Folge dessen, eine veränderte Autophagozytose-Aktivität.

Es konnte ausgeschlossen werden, dass der adipöse Phänotyp der p62^{Δ69-251}-Maus auf eine fehlende ERK1-p62-Interaktion zurückzuführen ist, wie sie für den Phänotyp der kompletten p62^{-/-}-Maus postuliert ist. Alternative Mechanismen könnten eine reduzierte Phosphorylierung des Insulinrezeptor-Inhibitors Grb14 oder eine ROS-induzierte Insulinresistenz sein.

Die in dieser Arbeit charakterisierte p62^{Δ69-251}-Mauslinie kann als neues Tiermodell für das metabolische Syndrom genutzt werden.

8 Ausblick

Die grundlegende Charakterisierung der p62^{Δ69-251}-Maus eröffnet ein weites Feld neuer Forschungsaspekte in Bezug auf funktionelle Eigenschaften des Proteins p62. Da p62 an diversen Prozessen beteiligt ist, bietet die p62^{Δ69-251}-Maus die Möglichkeit einen veränderten Phänotyp auf den Verlust des Signaltransduktionsmoduls einzuschränken.

Besonders durch das Einkreuzen anderer gentechnisch veränderter Mäuse sind neue Erkenntnisse im Zusammenhang mit der Beteiligung von p62 an pathophysiologischen Prozessen bestimmter Organe möglich. Exemplarisch seien hier drei genannt:

1. Das Einkreuzen in eine TNF- α -transgene Mauslinie ist bereits erfolgt. Anhand dieser Tiere wird ein Knochenphänotyp im Zusammenhang mit rheumatoider Arthritis und p62 untersucht. Der Verlust des Signaltransduktionsmoduls von p62 führt in dem genannten Mausmodell zu einem verstärkten Phänotyp und einer veränderten Osteoklastogenese (Daten noch nicht publiziert).

2. Anhand der Kreuzung von p62^{Δ69-251}-Mauslinie in eine Autophagozytose-Reportermaus (z.B. GFP-LC3 überexprimierend) oder eine Autophagozytose-defiziente Maus (z.B. organspezifische Atg5^{-/-}-Maus) kann der Einfluss von p62 auf den Zusammenhang von ROS-Produktion und Autophagozytose näher untersucht werden.

3. Mutiertes α -Synuklein wird in familiären Formen von Morbus Parkinson gefunden. Durch das Einkreuzen einer solchen transgenen α -Synuklein-Maus in die bestehende p62^{Δ69-251}-Mauslinie kann die p62-TRAF6-Achse bei dieser Erkrankung näher untersucht werden. Das Mausmodell könnte Aufschluss über die Substratspezifität des *Cargo*-Proteins p62 durch die Interaktion mit E3-Ligasen geben.

Die p62^{Δ69-251}-Mauslinie kann allerdings auch direkt als Modell für das metabolische Syndrom fungieren. Beispielsweise kann anhand von Hochsalzdiäten oder Induktion eines Diabetes mellitus die Auswirkung eines exogenen Schadens auf den vorgeschädigten, adipösen Organismus untersucht werden. Besonders Als Modellsystem für nephrologische oder kardiovaskuläre Fragestellungen scheint dieses Mausmodell geeignet zu sein.

Zusätzlich zu der Fragestellung, wie sich der Verlust des Signaltransduktionsmoduls von p62 auf den gesamten Organismus auswirkt, kann anhand primärer Zellen der p62^{Δ69-251}-Maus der genaue Zusammenhang zwischen ROS-Produktion und Signaltransduktion über die MAP-Kinase und die NF-κB-Signaltransduktion entschlüsselt werden.

Die Identifizierung einer Spleißvariante war ein weiterer Befund dieser Arbeit. Die gezeigten Daten legen nahe, dass diese Spleißvariante über die Säugetiere hinweg hoch konserviert ist. Weitere Studien könnten neue Erkenntnisse über die zellbiologische Funktion des Proteins p62 liefern, welches - zumindest in der Maus - in einer gespleißten und einer ungespleißten Fraktion vorliegt. Erste Untersuchungen geben einen Hinweis auf eine Reduktion der Bindekapazität der Spleißvariante zu LC3. Diese Bindung ist essentiell für die Zuleitung von Proteinen durch p62 zu der selektiven Autophagozytose.

9 Literaturverzeichnis

- Ahlberg,J. and Glaumann,H. (1985). Uptake--microautophagy--and degradation of exogenous proteins by isolated rat liver lysosomes. Effects of pH, ATP, and inhibitors of proteolysis. *Exp. Mol. Pathol.* *42*, 78-88.
- Aleixandre de,A.A. and Miguel,C.M. (2009). Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *Br. J. Nutr.* *102*, 1246-1253.
- Aouadi,M., Laurent,K., Prot,M., Le Marchand-Brustel,Y., Binetruy,B., and Bost,F. (2006). Inhibition of p38MAPK increases adipogenesis from embryonic to adult stages. *Diabetes* *55*, 281-289.
- Apel,A., Zentgraf,H., Buchler,M.W., and Herr,I. (2009). Autophagy-A double-edged sword in oncology. *Int. J. Cancer* *125*, 991-995.
- Babu,J.R., Geetha,T., and Wooten,M.W. (2005). Sequestosome 1/p62 shuttles polyubiquitinated tau for proteasomal degradation. *J. Neurochem.* *94*, 192-203.
- Bachmair,A., Finley,D., and Varshavsky,A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* *234*, 179-186.
- Baker,R.G., Hayden,M.S., and Ghosh,S. (2011). NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* *13*, 11-22.
- Bartel,B., Wunning,I., and Varshavsky,A. (1990). The recognition component of the N-end rule pathway. *EMBO J.* *9*, 3179-3189.
- Bashan,N., Kovsan,J., Kachko,I., Ovadia,H., and Rudich,A. (2009). Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev.* *89*, 27-71.
- Bedford,L., Lowe,J., Dick,L.R., Mayer,R.J., and Brownell,J.E. (2011). Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* *10*, 29-46.
- Biederbick,A., Kern,H.F., and Elsasser,H.P. (1995). Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur. J. Cell Biol.* *66*, 3-14.
- Bjorkoy,G., Lamark,T., Brech,A., Outzen,H., Perander,M., Overvatn,A., Stenmark,H., and Johansen,T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* *171*, 603-614.
- Bjorkoy,G., Lamark,T., Pankiv,S., Overvatn,A., Brech,A., and Johansen,T. (2009). Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol.* *452*, 181-197.
- Bost,F., Aouadi,M., Caron,L., and Binetruy,B. (2005a). The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. *Biochimie* *87*, 51-56.
- Bost,F., Aouadi,M., Caron,L., Even,P., Belmonte,N., Prot,M., Dani,C., Hofman,P., Pages,G., Poussegur,J., Le Marchand-Brustel,Y., and Binetruy,B. (2005b). The extracellular signal-

- regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes* 54, 402-411.
- Boyle,W.J., Simonet,W.S., and Lacey,D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337-342.
- Bürgis, S. Interleukin-4-Receptor Signal Transduction: Involvement of P62. 2006.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Cariou,B., Capitaine,N., Le,M., V, Vega,N., Bereziat,V., Kergoat,M., Laville,M., Girard,J., Vidal,H., and Burnol,A.F. (2004). Increased adipose tissue expression of Grb14 in several models of insulin resistance. *FASEB J.* 18, 965-967.
- Cariou,B., Perdereau,D., Cailliau,K., Browaeys-Poly,E., Bereziat,V., Vasseur-Cognet,M., Girard,J., and Burnol,A.F. (2002). The adapter protein ZIP binds Grb14 and regulates its inhibitory action on insulin signaling by recruiting protein kinase Czeta. *Mol. Cell Biol.* 22, 6959-6970.
- Chari,A., Mazumder,A., and Jagannath,S. (2010). Proteasome inhibition and its therapeutic potential in multiple myeloma. *Biologics.* 4, 273-287.
- Clague,M.J. and Urbe,S. (2010). Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell* 143, 682-685.
- Colwill,K., Wells,C.D., Elder,K., Goudreault,M., Hersi,K., Kulkarni,S., Hardy,W.R., Pawson,T., and Morin,G.B. (2006). Modification of the Creator recombination system for proteomics applications--improved expression by addition of splice sites. *BMC. Biotechnol.* 6, 13.
- Croci,C., Brandstatter,J.H., and Enz,R. (2003). ZIP3, a new splice variant of the PKC-zeta-interacting protein family, binds to GABAC receptors, PKC-zeta, and Kv beta 2. *J. Biol. Chem.* 278, 6128-6135.
- Cybulsky,A.V., Takano,T., Papillon,J., Bijian,K., Guillemette,J., and Kennedy,C.R. (2009). Glomerular epithelial cell injury associated with mutant alpha-actinin-4. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 297, F987-F995.
- Dahlmann,B. (2007). Role of proteasomes in disease. *BMC. Biochem.* 8 *Suppl 1*, S3.
- Dai,C., Stolz,D.B., Kiss,L.P., Monga,S.P., Holzman,L.B., and Liu,Y. (2009). Wnt/beta-catenin signaling promotes podocyte dysfunction and albuminuria. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 1997-2008.
- Daneshgari,F., Leiter,E.H., Liu,G., and Reeder,J. (2009). Animal models of diabetic uropathy. *J. Urol.* 182, S8-13.
- Darwin,K.H. (2009). Prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup), proteasomes and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 485-491.
- Deng,Y. and Scherer,P.E. (2010). Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1212, E1-E19.

- Devergne,O., Hummel,M., Koeppen,H., Le Beau,M.M., Nathanson,E.C., Kieff,E., and Birkenbach,M. (1996). A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes. *J. Virol.* *70*, 1143-1153.
- Diradourian,C., Le,M.C., Cauzac,M., Girard,J., Burnol,A.F., and Pegorier,J.P. (2008). Involvement of ZIP/p62 in the regulation of PPARalpha transcriptional activity by p38-MAPK. *Biochim. Biophys. Acta* *1781*, 239-244.
- Dobson,C.M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature* *426*, 884-890.
- Duran,A., Linares,J.F., Galvez,A.S., Wikenheiser,K., Flores,J.M., Diaz-Meco,M.T., and Moscat,J. (2008). The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell* *13*, 343-354.
- Duran,A., Serrano,M., Leitges,M., Flores,J.M., Picard,S., Brown,J.P., Moscat,J., and Diaz-Meco,M.T. (2004). The atypical PKC-interacting protein p62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis. *Dev. Cell* *6*, 303-309.
- Eckel,R.H., Grundy,S.M., and Zimmet,P.Z. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet* *365*, 1415-1428.
- Elahi,M.M., Kong,Y.X., and Matata,B.M. (2009). Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxid. Med. Cell Longev.* *2*, 259-269.
- Emre,Y., Hurtaud,C., Nubel,T., Criscuolo,F., Ricquier,D., and Cassard-Doulier,A.M. (2007). Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages. *Biochem. J.* *402*, 271-278.
- Engelman,J.A., Berg,A.H., Lewis,R.Y., Lin,A., Lisanti,M.P., and Scherer,P.E. (1999). Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) or salicylate induces spontaneous 3T3-L1 adipogenesis. *J. Biol. Chem.* *274*, 35630-35638.
- Engelman,J.A., Lisanti,M.P., and Scherer,P.E. (1998). Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *J. Biol. Chem.* *273*, 32111-32120.
- Evans,J.L., Goldfine,I.D., Maddux,B.A., and Grodsky,G.M. (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* *23*, 599-622.
- Ferrer,I., Santpere,G., and van Leeuwen,F.W. (2008). Argyrophilic grain disease. *Brain* *131*, 1416-1432.
- Filimonenko,M., Stuffers,S., Raiborg,C., Yamamoto,A., Malerod,L., Fisher,E.M., Isaacs,A., Brech,A., Stenmark,H., and Simonsen,A. (2007). Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J. Cell Biol.* *179*, 485-500.
- Furukawa,S., Fujita,T., Shimabukuro,M., Iwaki,M., Yamada,Y., Nakajima,Y., Nakayama,O., Makishima,M., Matsuda,M., and Shimomura,I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest* *114*, 1752-1761.

- Galassi,A., Reynolds,K., and He,J. (2006). Metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis. *Am. J. Med.* *119*, 812-819.
- Geetha,T. and Wooten,M.W. (2003). Association of the atypical protein kinase C-interacting protein p62/ZIP with nerve growth factor receptor TrkA regulates receptor trafficking and Erk5 signaling. *J. Biol. Chem.* *278*, 4730-4739.
- Geisler,S., Holmstrom,K.M., Skujat,D., Fiesel,F.C., Rothfuss,O.C., Kahle,P.J., and Springer,W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat. Cell Biol.* *12*, 119-131.
- Geng,J. and Klionsky,D.J. (2008). The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep.* *9*, 859-864.
- Goenaga,D., Hampe,C., Carre,N., Cailliau,K., Browaeys-Poly,E., Perdereau,D., Holt,L.J., Daly,R.J., Girard,J., Broutin,I., Issad,T., and Burnol,A.F. (2009). Molecular determinants of Grb14-mediated inhibition of insulin signaling. *Mol. Endocrinol.* *23*, 1043-1051.
- Gong,J., Xu,J., Bezanilla,M., van,H.R., Derin,R., and Li,M. (1999). Differential stimulation of PKC phosphorylation of potassium channels by ZIP1 and ZIP2. *Science* *285*, 1565-1569.
- Goode,A. and Layfield,R. (2010). Recent advances in understanding the molecular basis of Paget disease of bone. *J. Clin. Pathol.* *63*, 199-203.
- Groll,M., Huber,R., and Moroder,L. (2009). The persisting challenge of selective and specific proteasome inhibition. *J. Pept. Sci.* *15*, 58-66.
- Guh,J.Y. (2010). Proteinuria versus albuminuria in chronic kidney disease. *Nephrology. (Carlton.)* *15 Suppl 2*, 53-56.
- Guo,R., Ma,H., Gao,F., Zhong,L., and Ren,J. (2009). Metallothionein alleviates oxidative stress-induced endoplasmic reticulum stress and myocardial dysfunction. *J. Mol. Cell Cardiol.* *47*, 228-237.
- Haglund,K., Di Fiore,P.P., and Dikic,I. (2003). Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 598-603.
- Haglund,K. and Dikic,I. (2005). Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J.* *24*, 3353-3359.
- Hariri,N. and Thibault,L. (2010). High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr. Res. Rev.* *23*, 270-299.
- Hartleben,B., Godel,M., Meyer-Schwesinger,C., Liu,S., Ulrich,T., Kobler,S., Wiech,T., Grahmmer,F., Arnold,S.J., Lindenmeyer,M.T., Cohen,C.D., Pavenstadt,H., Kerjaschki,D., Mizushima,N., Shaw,A.S., Walz,G., and Huber,T.B. (2010). Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. *J. Clin. Invest* *120*, 1084-1096.
- Hayes,G.R. and Lockwood,D.H. (1987). Role of insulin receptor phosphorylation in the insulinomimetic effects of hydrogen peroxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *84*, 8115-8119.

- Hershko,A. and Ciechanover,A. (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* *61*, 761-807.
- Hicke,L. and Dunn,R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *19*, 141-172.
- Hicke,L., Schubert,H.L., and Hill,C.P. (2005). Ubiquitin-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 610-621.
- Hirano,Y., Yoshinaga,S., Ogura,K., Yokochi,M., Noda,Y., Sumimoto,H., and Inagaki,F. (2004). Solution structure of atypical protein kinase C PB1 domain and its mode of interaction with ZIP/p62 and MEK5. *J. Biol. Chem.* *279*, 31883-31890.
- Holt,L.J., Lyons,R.J., Ryan,A.S., Beale,S.M., Ward,A., Cooney,G.J., and Daly,R.J. (2009). Dual ablation of Grb10 and Grb14 in mice reveals their combined role in regulation of insulin signaling and glucose homeostasis. *Mol. Endocrinol.* *23*, 1406-1414.
- Hosogai,N., Fukuhara,A., Oshima,K., Miyata,Y., Tanaka,S., Segawa,K., Furukawa,S., Tochino,Y., Komuro,R., Matsuda,M., and Shimomura,I. (2007). Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* *56*, 901-911.
- Ichimura,Y., Kirisako,T., Takao,T., Satomi,Y., Shimonishi,Y., Ishihara,N., Mizushima,N., Tanida,I., Kominami,E., Ohsumi,M., Noda,T., and Ohsumi,Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* *408*, 488-492.
- Ichimura,Y., Kominami,E., Tanaka,K., and Komatsu,M. (2008). Selective turnover of p62/A170/SQSTM1 by autophagy. *Autophagy*. *4*, 1063-1066.
- Ishii,T., Yanagawa,T., Kawane,T., Yuki,K., Seita,J., Yoshida,H., and Bannai,S. (1996). Murine peritoneal macrophages induce a novel 60-kDa protein with structural similarity to a tyrosine kinase p56lck-associated protein in response to oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *226*, 456-460.
- Ishii,T., Yanagawa,T., Yuki,K., Kawane,T., Yoshida,H., and Bannai,S. (1997). Low micromolar levels of hydrogen peroxide and proteasome inhibitors induce the 60-kDa A170 stress protein in murine peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *232*, 33-37.
- Jadhav,T. and Wooten,M.W. (2009). Defining an Embedded Code for Protein Ubiquitination. *J. Proteomics. Bioinform.* *2*, 316.
- James,W.P., Rigby,N., and Leach,R. (2006). Obesity and the metabolic syndrome: the stress on society. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1083*, 1-10.
- Jentsch,S. and Pyrowolakis,G. (2000). Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol.* *10*, 335-342.
- Jin,W., Chang,M., Paul,E.M., Babu,G., Lee,A.J., Reiley,W., Wright,A., Zhang,M., You,J., and Sun,S.C. (2008). Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates RANK signaling and osteoclastogenesis in mice. *J. Clin. Invest* *118*, 1858-1866.

- Johansen,T. and Lamark,T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*. 7.
- Joung,I., Strominger,J.L., and Shin,J. (1996). Molecular cloning of a phosphotyrosine-independent ligand of the p56lck SH2 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 5991-5995.
- Kaiser,P. and Huang,L. (2005). Global approaches to understanding ubiquitination. *Genome Biol.* 6, 233.
- Karin,M. and Ben-Neriah,Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 621-663.
- Kawai,K., Saito,A., Sudo,T., and Osada,H. (2008). Specific regulation of cytokine-dependent p38 MAP kinase activation by p62/SQSTM1. *J. Biochem.* 143, 765-772.
- Kelliher,M.A., Grimm,S., Ishida,Y., Kuo,F., Stanger,B.Z., and Leder,P. (1998). The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity*. 8, 297-303.
- Kennedy,A., Martinez,K., Chuang,C.C., LaPoint,K., and McIntosh,M. (2009). Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J. Nutr.* 139, 1-4.
- Kennedy,A.J., Ellacott,K.L., King,V.L., and Hasty,A.H. (2010). Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis. Model. Mech.* 3, 156-166.
- Kerjaschki,D. (2001). Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J. Clin. Invest* 108, 1583-1587.
- Kiel,J.A. (2010). Autophagy in unicellular eukaryotes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 365, 819-830.
- Kirkin,V., Lamark,T., Sou,Y.S., Bjorkoy,G., Nunn,J.L., Bruun,J.A., Shvets,E., McEwan,D.G., Clausen,T.H., Wild,P., Bilusic,I., Theurillat,J.P., Overvatn,A., Ishii,T., Elazar,Z., Komatsu,M., Dikic,I., and Johansen,T. (2009). A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol. Cell* 33, 505-516.
- Kitabchi,A.E., Umpierrez,G.E., Miles,J.M., and Fisher,J.N. (2009). Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes. *Diabetes Care* 32, 1335-1343.
- Klionsky,D.J., Abeliovich,H., Agostinis,P., Agrawal,D.K., Aliev,G., Askew,D.S., Baba,M., Baehrecke,E.H., Bahr,B.A., Ballabio,A., Bamber,B.A., Bassham,D.C., Bergamini,E., Bi,X., Biard-Piechaczyk,M., Blum,J.S., Bredesen,D.E., Brodsky,J.L., Brumell,J.H., Brunk,U.T., Bursch,W., Camougrand,N., Cebollero,E., Cecconi,F., Chen,Y., Chin,L.S., Choi,A., Chu,C.T., Chung,J., Clarke,P.G., Clark,R.S., Clarke,S.G., Clave,C., Cleveland,J.L., Codogno,P., Colombo,M.I., Coto-Montes,A., Cregg,J.M., Cuervo,A.M., Debnath,J., Demarchi,F., Dennis,P.B., Dennis,P.A., Deretic,V., Devenish,R.J., Di,S.F., Dice,J.F., Difiglia,M., Dinesh-Kumar,S., Distelhorst,C.W., Djavaheri-Mergny,M., Dorsey,F.C., Droge,W., Dron,M., Dunn,W.A., Jr., Duszenko,M., Eissa,N.T., Elazar,Z., Esclatine,A., Eskelinen,E.L., Fesus,L., Finley,K.D., Fuentes,J.M., Fueyo,J., Fujisaki,K., Galliot,B., Gao,F.B., Gewirtz,D.A., Gibson,S.B., Gohla,A., Goldberg,A.L., Gonzalez,R., Gonzalez-Estevez,C., Gorski,S., Gottlieb,R.A., Haussinger,D., He,Y.W., Heidenreich,K., Hill,J.A., Hoyer-Hansen,M., Hu,X., Huang,W.P., Iwasaki,A., Jaattela,M., Jackson,W.T., Jiang,X., Jin,S.,

Johansen, T., Jung, J.U., Kadowaki, M., Kang, C., Kelekar, A., Kessel, D.H., Kiel, J.A., Kim, H.P., Kimchi, A., Kinsella, T.J., Kiselyov, K., Kitamoto, K., Knecht, E., Komatsu, M., Kominami, E., Kondo, S., Kovacs, A.L., Kroemer, G., Kuan, C.Y., Kumar, R., Kundu, M., Landry, J., Laporte, M., Le, W., Lei, H.Y., Lenardo, M.J., Levine, B., Lieberman, A., Lim, K.L., Lin, F.C., Liou, W., Liu, L.F., Lopez-Berestein, G., Lopez-Otin, C., Lu, B., Macleod, K.F., Malorni, W., Martinet, W., Matsuoka, K., Mautner, J., Meijer, A.J., Melendez, A., Michels, P., Miotto, G., Mistiaen, W.P., Mizushima, N., Mograbi, B., Monastyrska, I., Moore, M.N., Moreira, P.I., Moriyasu, Y., Motyl, T., Munz, C., Murphy, L.O., Naqvi, N.I., Neufeld, T.P., Nishino, I., Nixon, R.A., Noda, T., Nurnberg, B., Ogawa, M., Oleinick, N.L., Olsen, L.J., Ozpolat, B., Paglin, S., Palmer, G.E., Papassideri, I., Parkes, M., Perlmutter, D.H., Perry, G., Piacentini, M., Pinkas-Kramarski, R., Prescott, M., Proikas-Cezanne, T., Raben, N., Rami, A., Reggiori, F., Rohrer, B., Rubinsztein, D.C., Ryan, K.M., Sadoshima, J., Sakagami, H., Sakai, Y., Sandri, M., Sasakawa, C., Sass, M., Schneider, C., Seglen, P.O., Seleverstov, O., Settleman, J., Shacka, J.J., Shapiro, I.M., Sibirny, A., Silva-Zacarin, E.C., Simon, H.U., Simone, C., Simonsen, A., Smith, M.A., Spanel-Borowski, K., Srinivas, V., Steeves, M., Stenmark, H., Stromhaug, P.E., Subauste, C.S., Sugimoto, S., Sulzer, D., Suzuki, T., Swanson, M.S., Tabas, I., Takeshita, F., Talbot, N.J., Talloczy, Z., Tanaka, K., Tanaka, K., Tanida, I., Taylor, G.S., Taylor, J.P., Terman, A., Tettamanti, G., Thompson, C.B., Thumm, M., Tolkovsky, A.M., Tooze, S.A., Truant, R., Tumanovska, L.V., Uchiyama, Y., Ueno, T., Uzcategui, N.L., van, d.K., I, Vaquero, E.C., Vellai, T., Vogel, M.W., Wang, H.G., Webster, P., Wiley, J.W., Xi, Z., Xiao, G., Yahalom, J., Yang, J.M., Yap, G., Yin, X.M., Yoshimori, T., Yu, L., Yue, Z., Yuzaki, M., Zabirnyk, O., Zheng, X., Zhu, X., and Deter, R.L. (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*. 4, 151-175.

Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Jr., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., and Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell* 5, 539-545.

Kobayashi, N., Gao, S.Y., Chen, J., Saito, K., Miyawaki, K., Li, C.Y., Pan, L., Saito, S., Terashita, T., and Matsuda, S. (2004). Process formation of the renal glomerular podocyte: is there common molecular machinery for processes of podocytes and neurons? *Anat. Sci. Int.* 79, 1-10.

Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y.S., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2007). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131, 1149-1163.

Kopito, R.R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* 10, 524-530.

Kumashiro, N., Tamura, Y., Uchida, T., Ogihara, T., Fujitani, Y., Hirose, T., Mochizuki, H., Kawamori, R., and Watada, H. (2008). Impact of oxidative stress and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha in hepatic insulin resistance. *Diabetes* 57, 2083-2091.

Kunz, J.B., Schwarz, H., and Mayer, A. (2004). Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro. *J. Biol. Chem.* 279, 9987-9996.

Kuusisto, E., Parkkinen, L., and Alafuzoff, I. (2003). Morphogenesis of Lewy bodies: dissimilar incorporation of alpha-synuclein, ubiquitin, and p62. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 1241-1253.

- Kuusisto,E., Salminen,A., and Alafuzoff,I. (2001). Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies. *Neuroreport* *12*, 2085-2090.
- Kuusisto,E., Salminen,A., and Alafuzoff,I. (2002). Early accumulation of p62 in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease: possible role in tangle formation. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *28*, 228-237.
- Kwoh,C., Shannon,M.B., Miner,J.H., and Shaw,A. (2006). Pathogenesis of nonimmune glomerulopathies. *Annu. Rev. Pathol.* *1*, 349-374.
- Lamark,T., Kirkin,V., Dikic,I., and Johansen,T. (2009). NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle* *8*, 1986-1990.
- Lamark,T., Perander,M., Outzen,H., Kristiansen,K., Overvatn,A., Michaelsen,E., Bjorkoy,G., and Johansen,T. (2003). Interaction codes within the family of mammalian Phox and Bem1p domain-containing proteins. *J. Biol. Chem.* *278*, 34568-34581.
- Laurin,N., Brown,J.P., Morissette,J., and Raymond,V. (2002). Recurrent mutation of the gene encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p62) in Paget disease of bone. *Am. J. Hum. Genet.* *70*, 1582-1588.
- Lavie,L. and Lavie,P. (2009). Molecular mechanisms of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative stress link. *Eur. Respir. J.* *33*, 1467-1484.
- Lee,S.J., Pfluger,P.T., Kim,J.Y., Nogueiras,R., Duran,A., Pages,G., Pouyssegur,J., Tschop,M.H., Diaz-Meco,M.T., and Moscat,J. (2010). A functional role for the p62-ERK1 axis in the control of energy homeostasis and adipogenesis. *EMBO Rep.* *11*, 226-232.
- Machnik,A., Neuhofer,W., Jantsch,J., Dahlmann,A., Tammela,T., Machura,K., Park,J.K., Beck,F.X., Muller,D.N., Derer,W., Goss,J., Ziomber,A., Dietsch,P., Wagner,H., van,R.N., Kurtz,A., Hilgers,K.F., Alitalo,K., Eckardt,K.U., Luft,F.C., Kerjaschki,D., and Titze,J. (2009). Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nat. Med.* *15*, 545-552.
- Mahadev,K., Motoshima,H., Wu,X., Ruddy,J.M., Arnold,R.S., Cheng,G., Lambeth,J.D., and Goldstein,B.J. (2004). The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol. Cell Biol.* *24*, 1844-1854.
- Martin,P., Diaz-Meco,M.T., and Moscat,J. (2006). The signaling adapter p62 is an important mediator of T helper 2 cell function and allergic airway inflammation. *EMBO J.* *25*, 3524-3533.
- Massey,A., Kiffin,R., and Cuervo,A.M. (2004). Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 2420-2434.
- Mathew,R., Karantza-Wadsworth,V., and White,E. (2007). Role of autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 961-967.

- Mathew,R., Karp,C.M., Beaudoin,B., Vuong,N., Chen,G., Chen,H.Y., Bray,K., Reddy,A., Bhanot,G., Gelinas,C., Dipaola,R.S., Karantza-Wadsworth,V., and White,E. (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 137, 1062-1075.
- Matsuzawa-Nagata,N., Takamura,T., Ando,H., Nakamura,S., Kurita,S., Misu,H., Ota,T., Yokoyama,M., Honda,M., Miyamoto,K., and Kaneko,S. (2008). Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism* 57, 1071-1077.
- McCord,J.M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* 108, 652-659.
- McDonell,M.W., Simon,M.N., and Studier,F.W. (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol.* 110, 119-146.
- Meiners,S., Ludwig,A., Stangl,V., and Stangl,K. (2008). Proteasome inhibitors: poisons and remedies. *Med. Res. Rev.* 28, 309-327.
- Miner,J.H. (2003). A molecular look at the glomerular barrier. *Nephron Exp. Nephrol.* 94, e119-e122.
- Mizushima,N. and Kuma,A. (2008). Autophagosomes in GFP-LC3 Transgenic Mice. *Methods Mol. Biol.* 445, 119-124.
- Mizushima,N., Kuma,A., Kobayashi,Y., Yamamoto,A., Matsubae,M., Takao,T., Natsume,T., Ohsumi,Y., and Yoshimori,T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J. Cell Sci.* 116, 1679-1688.
- Mizushima,N., Noda,T., and Ohsumi,Y. (1999). Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J.* 18, 3888-3896.
- Mizushima,N., Yamamoto,A., Hatano,M., Kobayashi,Y., Kabeya,Y., Suzuki,K., Tokuhisu,T., Ohsumi,Y., and Yoshimori,T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 152, 657-668.
- Moore,M.N. (2008). Autophagy as a second level protective process in conferring resistance to environmentally-induced oxidative stress. *Autophagy.* 4, 254-256.
- Moscat,J. and Diaz-Meco,M.T. (2009). p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell* 137, 1001-1004.
- Munafo,D.B. and Colombo,M.I. (2001). A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J. Cell Sci.* 114, 3619-3629.
- Nakamura,K., Kimple,A.J., Siderovski,D.P., and Johnson,G.L. (2010). PB1 domain interaction of p62/sequestosome 1 and MEKK3 regulates NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* 285, 2077-2089.

- Neubert,K., Meister,S., Moser,K., Weisel,F., Maseda,D., Amann,K., Wiethe,C., Winkler,T.H., Kalden,J.R., Manz,R.A., and Voll,R.E. (2008). The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis. *Nat. Med.* *14*, 748-755.
- Nezis,I.P., Simonsen,A., Sagona,A.P., Finley,K., Gaumer,S., Contamine,D., Rusten,T.E., Stenmark,H., and Brech,A. (2008). Ref(2)P, the *Drosophila melanogaster* homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain. *J. Cell Biol.* *180*, 1065-1071.
- Okada,K., Yanagawa,T., Warabi,E., Yamastu,K., Uwayama,J., Takeda,K., Utsunomiya,H., Yoshida,H., Shoda,J., and Ishii,T. (2009). The alpha-glucosidase inhibitor acarbose prevents obesity and simple steatosis in sequestosome 1/A170/p62 deficient mice. *Hepatology Res.* *39*, 490-500.
- Palmer,B.F. (2011). Screening tests for renal impairment in patients with type 2 diabetes: the what, when, and how. *Postgrad. Med.* *123*, 7-14.
- Pan,J.S., Hong,M.Z., and Ren,J.L. (2009). Reactive oxygen species: a double-edged sword in oncogenesis. *World J. Gastroenterol.* *15*, 1702-1707.
- Pankiv,S., Clausen,T.H., Lamark,T., Brech,A., Bruun,J.A., Outzen,H., Overvatn,A., Bjorkoy,G., and Johansen,T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* *282*, 24131-24145.
- Pavenstadt,H., Kriz,W., and Kretzler,M. (2003). Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev.* *83*, 253-307.
- Pearce,M.J., Mintseris,J., Ferreyra,J., Gygi,S.P., and Darwin,K.H. (2008). Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* *322*, 1104-1107.
- Plank,C., Nusken,K.D., Menendez-Castro,C., Hartner,A., Ostreicher,I., Amann,K., Baumann,P., Peters,H., Rascher,W., and Dotsch,J. (2010). Intrauterine growth restriction following ligation of the uterine arteries leads to more severe glomerulosclerosis after mesangioproliferative glomerulonephritis in the offspring. *Am. J. Nephrol.* *32*, 287-295.
- Puissant,A., Robert,G., Fenouille,N., Luciano,F., Cassuto,J.P., Raynaud,S., and Auberger,P. (2010). Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation. *Cancer Res.* *70*, 1042-1052.
- Puls,A., Schmidt,S., Grawe,F., and Stabel,S. (1997). Interaction of protein kinase C zeta with ZIP, a novel protein kinase C-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 6191-6196.
- Rabilloud,T., Carpentier,G., and Tarroux,P. (1988). Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* *9*, 288-291.
- Rea,S.L., Walsh,J.P., Ward,L., Magno,A.L., Ward,B.K., Shaw,B., Layfield,R., Kent,G.N., Xu,J., and Ratajczak,T. (2009). Sequestosome 1 mutations in Paget's disease of bone in Australia: prevalence, genotype/phenotype correlation, and a novel non-UBA domain mutation (P364S) associated with increased NF-kappaB signaling without loss of ubiquitin binding. *J. Bone Miner. Res.* *24*, 1216-1223.

- Reiley,W., Zhang,M., Wu,X., Granger,E., and Sun,S.C. (2005). Regulation of the deubiquitinating enzyme CYLD by I κ B kinase gamma-dependent phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* 25, 3886-3895.
- Richter-Ruoff,B., Heinemeyer,W., and Wolf,D.H. (1992). The proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase. In vivo function in the ubiquitin-dependent N-end rule pathway of protein degradation in eukaryotes. *FEBS Lett.* 302, 192-196.
- Rodriguez,A., Duran,A., Selloum,M., Champy,M.F., Diez-Guerra,F.J., Flores,J.M., Serrano,M., Auwerx,J., Diaz-Meco,M.T., and Moscat,J. (2006). Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell Metab* 3, 211-222.
- Rubinsztein,D.C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 443, 780-786.
- Rubinsztein,D.C., Gestwicki,J.E., Murphy,L.O., and Klionsky,D.J. (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 304-312.
- Salvador,N., Aguado,C., Horst,M., and Knecht,E. (2000). Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J. Biol. Chem.* 275, 27447-27456.
- Salz,H.K. and Erickson,J.W. (2010). Sex determination in *Drosophila*: The view from the top. *Fly. (Austin.)* 4, 60-70.
- Sanz,L., Diaz-Meco,M.T., Nakano,H., and Moscat,J. (2000). The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway. *EMBO J.* 19, 1576-1586.
- Sanz,L., Sanchez,P., Lallena,M.J., Diaz-Meco,M.T., and Moscat,J. (1999). The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation. *EMBO J.* 18, 3044-3053.
- Sato,S., Adachi,A., Sasaki,Y., and Dai,W. (2006a). Autophagy by podocytes in renal biopsy specimens. *J. Nippon Med. Sch* 73, 52-53.
- Sato,S., Kitamura,H., Adachi,A., Sasaki,Y., and Ghazizadeh,M. (2006b). Two types of autophagy in the podocytes in renal biopsy specimens: ultrastructural study. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 38, 167-174.
- Sato,S., Yanagihara,T., Ghazizadeh,M., Ishizaki,M., Adachi,A., Sasaki,Y., Igarashi,T., and Fukunaga,Y. (2009). Correlation of autophagy type in podocytes with histopathological diagnosis of IgA nephropathy. *Pathobiology* 76, 221-226.
- Scherz-Shouval,R. and Elazar,Z. (2011). Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem. Sci.* 36, 30-38.
- Schliephacke,M., Kremp,A., Schmid,H.P., Kohler,K., and Kull,U. (1991). Prosome (proteasomes) of higher plants. *Eur. J. Cell Biol.* 55, 114-121.
- Schweers,R.L., Zhang,J., Randall,M.S., Loyd,M.R., Li,W., Dorsey,F.C., Kundu,M., Opferman,J.T., Cleveland,J.L., Miller,J.L., and Ney,P.A. (2007). NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 19500-19505.

- Scott,I.S. and Lowe,J.S. (2007). The ubiquitin-binding protein p62 identifies argyrophilic grain pathology with greater sensitivity than conventional silver stains. *Acta Neuropathol.* *113*, 417-420.
- Seibenhener,M.L., Babu,J.R., Geetha,T., Wong,H.C., Krishna,N.R., and Wooten,M.W. (2004). Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol. Cell Biol.* *24*, 8055-8068.
- Seibenhener,M.L., Geetha,T., and Wooten,M.W. (2007). Sequestosome 1/p62--more than just a scaffold. *FEBS Lett.* *581*, 175-179.
- Sethi,J.K. and Vidal-Puig,A.J. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J. Lipid Res.* *48*, 1253-1262.
- Shevalye,H., Maksimchyk,Y., Watcho,P., and Obrosova,I.G. (2010). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) gene deficiency alleviates diabetic kidney disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1802*, 1020-1027.
- Simons,M., Hartleben,B., and Huber,T.B. (2009). Podocyte polarity signalling. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* *18*, 324-330.
- Simonsen,A., Cumming,R.C., Brech,A., Isakson,P., Schubert,D.R., and Finley,K.D. (2008). Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy.* *4*, 176-184.
- Sorokin,A.V., Kim,E.R., and Ovchinnikov,L.P. (2009). Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochemistry (Mosc.)* *74*, 1411-1442.
- Sriram,S.M., Banerjee,R., Kane,R.S., and Kwon,Y.T. (2009). Multivalency-assisted control of intracellular signaling pathways: application for ubiquitin- dependent N-end rule pathway. *Chem. Biol.* *16*, 121-131.
- Sudo,T., Maruyama,M., and Osada,H. (2000). p62 functions as a p38 MAP kinase regulator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *269*, 521-525.
- Sugimoto,R., Warabi,E., Katayanagi,S., Sakai,S., Uwayama,J., Yanagawa,T., Watanabe,A., Harada,H., Kitamura,K., Noguchi,N., Yoshida,H., Siow,R.C., Mann,G.E., and Ishii,T. (2010). Enhanced neointimal hyperplasia and carotid artery remodelling in sequestosome 1 deficient mice. *J. Cell Mol. Med.* *14*, 1546-1554.
- Tabuchi,K., Oikawa,K., Hoshino,T., Nishimura,B., Hayashi,K., Yanagawa,T., Warabi,E., Ishii,T., Tanaka,S., and Hara,A. (2010). Cochlear protection from acoustic injury by inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase and sequestosome 1 stress protein. *Neuroscience* *166*, 665-670.
- Takenouchi,T., Takayama,Y., and Takezawa,T. (2004). Co-treatment with dexamethasone and octanoate induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Cell Biol. Int.* *28*, 209-216.
- Tasaki,T., Mulder,L.C., Iwamatsu,A., Lee,M.J., Davydov,I.V., Varshavsky,A., Muesing,M., and Kwon,Y.T. (2005). A family of mammalian E3 ubiquitin ligases that contain the UBR box motif and recognize N-degrons. *Mol. Cell Biol.* *25*, 7120-7136.

- Teitelbaum,S.L. and Ross,F.P. (2003). Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat. Rev. Genet.* *4*, 638-649.
- Tuttle,D.L. and Dunn,W.A., Jr. (1995). Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Cell Sci.* *108 (Pt 1)*, 25-35.
- Tyedmers,J., Mogk,A., and Bukau,B. (2010). Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 777-788.
- Vadlamudi,R.K., Joung,I., Strominger,J.L., and Shin,J. (1996). p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* *271*, 20235-20237.
- Varshavsky,A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 12142-12149.
- Viiri,J., Hyttinen,J.M., Ryhanen,T., Rilla,K., Paimela,T., Kuusisto,E., Siitonen,A., Urtti,A., Salminen,A., and Kaarniranta,K. (2010). p62/sequestosome 1 as a regulator of proteasome inhibitor-induced autophagy in human retinal pigment epithelial cells. *Mol. Vis.* *16*, 1399-1414.
- Weide,T. and Huber,T.B. (2009). Signaling at the slit: podocytes chat by synaptic transmission. *J. Am. Soc. Nephrol.* *20*, 1862-1864.
- Weide,T. and Huber,T.B. (2011). Implications of autophagy for glomerular aging and disease. *Cell Tissue Res.* *343*, 467-473.
- Wellen,K.E. and Thompson,C.B. (2010). Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess. *Mol. Cell* *40*, 323-332.
- Wilkinson,K.D. (1997). Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J.* *11*, 1245-1256.
- Wilson,M.I., Gill,D.J., Perisic,O., Quinn,M.T., and Williams,R.L. (2003). PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62. *Mol. Cell* *12*, 39-50.
- Wong,E. and Cuervo,A.M. (2010). Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a006734.
- Wooten,M.W., Geetha,T., Babu,J.R., Seibenhener,M.L., Peng,J., Cox,N., Diaz-Meco,M.T., and Moscat,J. (2008). Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. *J. Biol. Chem.* *283*, 6783-6789.
- Wooten,M.W., Geetha,T., Seibenhener,M.L., Babu,J.R., Diaz-Meco,M.T., and Moscat,J. (2005). The p62 scaffold regulates nerve growth factor-induced NF-kappaB activation by influencing TRAF6 polyubiquitination. *J. Biol. Chem.* *280*, 35625-35629.
- Wooten,M.W., Seibenhener,M.L., Mamidipudi,V., Diaz-Meco,M.T., Barker,P.A., and Moscat,J. (2001). The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF-kappaB activation by nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* *276*, 7709-7712.

Yang,Z. and Klionsky,D.J. (2009). An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 335, 1-32.

Yao,T.P. (2010). The role of ubiquitin in autophagy-dependent protein aggregate processing. *Genes Cancer* 1, 779-786.

Zenker,M., Mayerle,J., Lerch,M.M., Tagariello,A., Zerres,K., Durie,P.R., Beier,M., Hulskamp,G., Guzman,C., Rehder,H., Beemer,F.A., Hamel,B., Vanlieferinghen,P., Gershoni-Baruch,R., Vieira,M.W., Domic,M., Auslender,R., Gil-da-Silva-Lopes VL, Steinlicht,S., Rauh,M., Shalev,S.A., Thiel,C., Ekici,A.B., Winterpacht,A., Kwon,Y.T., Varshavsky,A., and Reis,A. (2005). Deficiency of UBR1, a ubiquitin ligase of the N-end rule pathway, causes pancreatic dysfunction, malformations and mental retardation (Johanson-Blizzard syndrome). *Nat. Genet.* 37, 1345-1350.

Zhang,Z., Sun,L., Wang,Y., Ning,G., Minto,A.W., Kong,J., Quigg,R.J., and Li,Y.C. (2008). Renoprotective role of the vitamin D receptor in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 73, 163-171.

Zheng,Q., Li,J., and Wang,X. (2009). Interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in proteinopathies. *Int. J. Physiol Pathophysiol. Pharmacol.* 1, 127-142.

Zucchelli,S., Codrich,M., Marcuzzi,F., Pinto,M., Vilotti,S., Biagioli,M., Ferrer,I., and Gustincich,S. (2010). TRAF6 promotes atypical ubiquitination of mutant DJ-1 and alpha-synuclein and is localized to Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease brains. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3759-3770.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Pavenstädt für die Bereitstellung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung und Herrn Prof. Dr. Linke für die Übernahme der Betreuung für den Fachbereich Biologie.

Bedanken möchte ich mich auch bei den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für molekulare Nephrologie. Im Besonderen danke ich hier Dr. Thomas Weide, für den geistigen Austausch und die wissenschaftliche Unterstützung (obwohl sich mein Thema immer weiter von der Niere entfernt hat), Katja Brinkmann für die technische Unterstützung bei den quantitativen Western Blots der Nierenlysate, Karin Wacker für die Unterstützung bei den Blutdruckmessungen, Truc van Le, von dem ich viel über Mäuse lernen durfte und Marianne Heitzmann für die Unterstützung bei der Isolation mesenchymaler Stammzellen. Natürlich möchte ich mich auch bei Heidi Korb-Pap bedanken, die die p62^{Δ69-251}-Maus auf Mark und Bein untersucht und mit der ich mich über meine Untersuchungen auf Herz und Nieren austauschen konnte. Danke auch an Thomas Pap, für den wissenschaftlichen Beistand.

Ein herzlicher Dank gilt auch dem Evangelischen Studienwerk e.V. Villigst, das meine Promotionszeit nicht nur finanziell, sondern auch mit spannenden Seminaren, neuen Erfahrungen und tollen Menschen bereichert hat.

Für die Bereitstellung der Mauslinie möchte ich mich bei Prof. Dr. Gessner bedanken. Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Huber danke ich für die Zeit die ich in ihrem Labor in Freiburg verbringen durfte, während der ich verschiedene Methoden gelernt habe. Prof. Dr. Amann und der Nephropathologie aus Erlangen (im Besonderen Nadine Hainz) danke ich für die Unterstützung bei der Auswertung der Nierenschnitte und den Anstoß zu meinem Hobbyforschungsprojekt Lupusnephritis und die entstandene Kooperation mit Prof. Dr. Annett Jacobi.

Ich danke meiner Familie, Fabian und Carla für das Ertragen meiner Höhen und Tiefen während der Doktorarbeit und die Korrektur der Dissertation.

All meinen Freunden, mit denen ich meinen Freizeitausgleich gestalten durfte, möchte ich auch danken.

Und natürlich bedanke ich mich bei der dicken p62^{Δ69-251}-Maus.

DANKE!