



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Fakultät Life Sciences

Expression und intrazellulärer Transport der lysosomalen Protease Cathepsin Z

Bachelorarbeit

Studiengang Biotechnologie

Vorgelegt von:

Solange Estelle NONO TÉKAM

Matrikelnr.: 1767252

Hamburg, den 10. Februar 2016

1. Gutachter: Prof. Dr. Birger Anspach (HAW Hamburg)

2. Gutachterin: Dr. rer. nat. Sandra Pohl (UKE)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1 Lysosomen	9
1.2 Biosynthese und Mannose-6-Phosphat-Modifikation von lysosomalen Enzymen	9
1.3 Mannose-6-Phosphat-abhängiger Transport lysosomaler Enzyme	10
1.4 Die lysosomale Protease Cathepsin Z	11
1.5 Zielstellung	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	13
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	14
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	15
2.1.4 Expressionsvektor p.CTSZ-myc	16
2.2 Molekularbiologische Methoden	17
2.2.1 Amplifikation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	17
2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	17
2.2.3 RNA-Isolierung aus Zellen	18
2.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen	19
2.2.5 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA	19
2.2.6 Gel-Elektrophorese von DNA.....	19
2.2.7 Synthese von cDNA.....	20
2.2.8 Quantitative Realtime-PCR	20
2.3 Zellbiologische Methoden	22
2.3.1 Kultivieren von eukaryotischen Zellen.....	22
2.3.2 Transiente Transfektion von Zellen	23
2.3.3 Immunfluoreszenzmikroskopie	23
2.4 Proteinchemische Methoden	24
2.4.1 Herstellung von Zellextrakten.....	24
2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellextrakten	24
2.4.3 Deglykosylierung von Proteinen durch PNGase F und Endo H	25
2.4.4 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	25
2.4.5 Westernblot-Analysen	26
3. Ergebnisse und Diskussion	28
3.1 Expression der mRNA von Cathepsin Z in verschiedenen Zelllinien	28
3.2 Analyse des Expressionsvektors p.CTSZ-myc	29
3.3 Sequenzanalyse der Plasmid-DNA p.CTSZ-myc	30
3.4 Expression von Cathepsin Z	31
3.5 N-Glykosylierung von Cathepsin Z	33

3.6	Intrazelluläre Lokalisation von Cathepsin Z.....	36
4.	<i>Zusammenfassung</i>	38
5.	<i>Literaturverzeichnis</i>	39
6.	<i>Erklärung</i>	41
7.	<i>Danksagung</i>	42

Abkürzungsverzeichnis

Neben den hier aufgeführten Abkürzungen wurden die gängigen chemischen Formeln und SI - Einheiten verwendet. Alle englischen Abkürzungen und Wörter, deren Übersetzung nicht gebräuchlich ist, sind kursiv dargestellt.

Abb.	Abbildung
ACTB	<i>Beta-actin</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BHK	Zelllinie aus Hamster-Nieren (<i>baby hamster kidney</i>)
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
COS7	Zelllinie aus Nierengewebe von Grünen Meerkatzen
C _T	<i>cycle of threshold</i>
CTSZ	Cathepsin Z
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest. H ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
Endo H	Endoglykosidase H
ER	endoplasmatisches Retikulum
FB	Fibroblasten
FKS	Fötales Kälberserum
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
HAW	Hochschule für Angewandte Wissenschaften
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HeLa	humane Zelllinie eines Zervixkarzinoms (von Patientin Henrietta Lacks)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
kDa	kilodalton
LB	Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien (Luria-Bertani)
LIMP-2	<i>lysosomal integral membrane protein 2</i>
M6P	Mannose-6-Phosphat
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)

PNGase F	Peptid- <i>N</i> -Glykosidase F
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (<i>ribosomal ribonucleic acid</i>)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	ultraviolett
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung ($g = 9,78 \text{ m/s}^2$)

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Schematische Darstellung zum Mannose-6-Phosphat-abhängigen Transport lysosomaler Enzyme</i>	10
<i>Abbildung 2: Schematische Abbildung der Proteinstruktur des humanen Cathepsin Z</i>	11
<i>Abbildung 3: Vektorkarte des Plasmids p.CTSZ-myc</i>	16
<i>Abbildung 4: Schematische Darstellung des Taqman-Prinzips</i>	21
<i>Abbildung 5: Expression der mRNA von Cathepsin Z in verschiedenen Zelllinien</i>	28
<i>Abbildung 6: Gelelektrophoretische Auftrennung der präparierten Plasmid-DNA nach Restriktion</i>	29
<i>Abbildung 7: Westernblot-Analyse von Proteinextrakten transfizierter Zelllinien</i>	32
<i>Abbildung 8: Westernblot zur Analyse der N-Glykosylierung von Cathepsin Z nach Deglykosylierung mit PNGase F</i>	33
<i>Abbildung 9: Westernblot zur Analyse der N-Glykosylierung von Cathepsin Z nach Deglykosylierung mit PNGase F und Endo H</i>	35
<i>Abbildung 10: Westernblot zur Analyse der N-Glykosylierung von Cathepsin Z nach Deglykosylierung mit PNGase F und verschiedenen Inkubationszeiten</i>	36
<i>Abbildung 11: Intrazelluläre Lokalisation von Cathepsin Z</i>	37

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Geräte</i> -----	13
<i>Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien</i> -----	14
<i>Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien</i> -----	14
<i>Tabelle 4: Puffer und Lösungen</i> -----	15
<i>Tabelle 5: Verwendete eukaryotische Zelllinien</i> -----	22
<i>Tabelle 6: Verwendete Antikörper</i> -----	24
<i>Tabelle 7: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE</i> -----	26
<i>Tabelle 8: Verwendete Antikörper für die Western-Blot-Analysen</i> -----	27
<i>Tabelle 9: Auswertung des Bradford-Assays zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellextrakten</i> -----	31

1. Einleitung

1.1 Lysosomen

Lysosomen sind membranumschlossene Organellen in Eukaryonten und stellen das Recycling-System der Zelle dar. Dort werden zelleigene Makromoleküle wie z. B. Proteine, Fettsäuren, Kohlenhydrate und Nukleinsäuren durch lysosomale Enzyme verdaut (de Duve, 1983). Durch Endocytose aufgenommene Fremdkörper und Mikroorganismen werden ebenfalls zu den Lysosomen transportiert und abgebaut. Bisher sind mehr als 60 lysosomale Enzyme, darunter Nukleasen, Lipasen, Proteasen, Phosphatasen, Sulfatasen oder Glykosidasen bekannt (Schröder *et al*, 2010). Die Enzyme haben eine optimale Wirkung im sauren Milieu ($\text{pH} \leq 5$) und werden daher auch als saure Hydrolasen bezeichnet. Die Erhaltung des sauren pH-Wertes wird durch membranständige ATP-abhängige Protonenpumpen gewährleistet (Cuppoletti *et al*, 1987). Weiterhin beinhaltet die lysosomale Membran zahlreiche Membranproteine, um die abgebauten Produkte zurück ins Cytosol zu transportieren, die der Zelle zum Aufbau neuer Makromoleküle zur Verfügung stehen.

1.2 Biosynthese und Mannose-6-Phosphat-Modifikation von lysosomalen Enzymen

Damit die Funktion der Lysosomen aufrecht erhalten werden kann, müssen lysosomale Proteine stets neu synthetisiert und zum Lysosom transportiert werden. Die Biosynthese löslicher, lysosomaler Enzyme erfolgt über Vorläuferproteine an freien Ribosomen im Cytosol. Die entstehenden Polypeptidketten enthalten hydrophobe N-terminale Signalsequenzen, die von Signalerkennungspartikeln erkannt werden und eine Translokation ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) initiieren (Rapoport, 2008). Im ER beginnt die co-translationale Modifikation der entstehenden Proteine. Das Signalpeptid wird abgespalten und Oligosaccharide können N-glykosidisch an Asparaginreste der Erkennungssequenz Asn-X-Ser/Thr (X: alle Aminosäuren außer Prolin) gebunden werden (Yan & Lennarz, 1999). Wenn die Proteine korrekt gefaltet sind, werden sie vesikulär zum Golgi-Apparat transportiert (Braulke & Bonifacino, 2009).

Um den Transport der lysosomalen Enzyme vom Golgi-Apparat zu den Lysosomen zu gewährleisten, müssen diese mit einem Mannose-6-Phosphat (M6P)-Rest markiert werden.

Die M6P-Reste gelten als "Passierschein" für die meisten lysosomalen Enzyme (Pohl *et al*, 2009). Im *cis*-Golgi-Apparat überträgt zunächst die UDP-N-Acetylglucosamin-1-Phosphotransferase (GlcNAc-1-Phosphotransferase) ein GlcNAc-1-Phosphat auf die Hydroxyl-Gruppe von bestimmten Mannose-Resten lysosomaler Enzyme. In einer zweiten Reaktion im *trans*-Golgi-Apparat spaltet die GlcNAc-1-phosphodiesterase den GlcNAc-Rest ab und legt den M6P-Rest frei (Kollmann *et al*, 2010).

1.3 Mannose-6-Phosphat-abhängiger Transport lysosomaler Enzyme

Im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) werden die lysosomalen Vorläuferproteine von membrangebundenen M6P-Rezeptoren erkannt (Abb. 1). Anschließend werden sie in Clathrin-umhüllte Vesikel verpackt und zum Endosom transportiert (Ghosh *et al*, 2003). Die Vesikel verschmelzen mit der Membran der frühen oder späten Endosomen, wo der saure pH-Wert der Endosomen zur Dissoziation der Enzyme von den Rezeptoren führt. Die M6P-Rezeptoren werden anschließend zurück zum TGN transportiert, wo sie für neue Transportrunden zur Verfügung stehen (Braulke & Bonifacino, 2009).

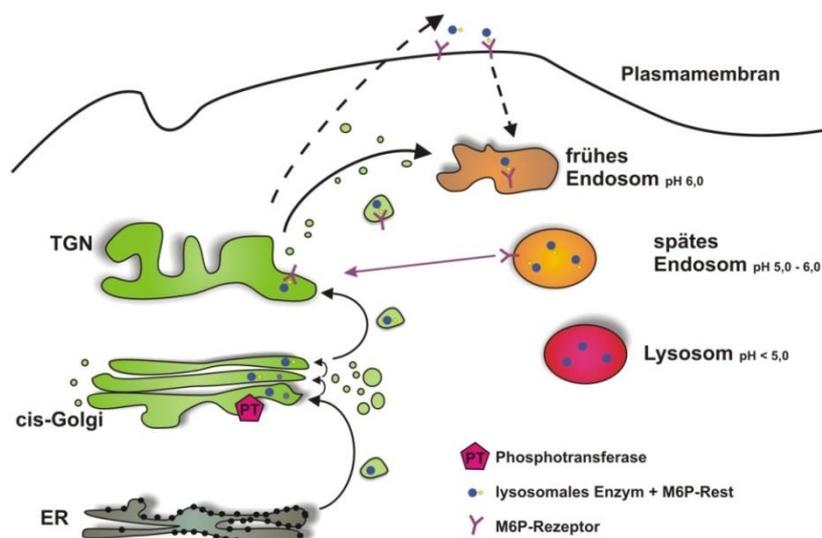


Abbildung 1: Schematische Darstellung zum Mannose-6-Phosphat-abhängigen Transport lysosomaler Enzyme

(Die Abbildung wurde von Dr. S. Pohl erstellt.)

Während des Transportes der Vorläuferproteine zum lysosomalen Kompartiment reifen sie durch Proteolyse zu aktiven lysosomalen Enzymen heran (Hasilik & Neufeld, 1980). Ein kleiner Anteil der lysosomalen Enzyme wird nicht von den M6P-Rezeptoren im Golgi-Apparat

gebunden und wird sezerniert. Diese können allerdings durch an der Plasmamembran vorhandene M6P-Rezeptoren gebunden und durch Endocytose über späte Endosomen zu den Lysosomen transportiert werden (Braulke & Bonifacio, 2009).

1.4 Die lysosomale Protease Cathepsin Z

Unter dem Begriff Cathepsine, der seinen Ursprung im Griechischen hat (kathepsine = verdauen), werden die in den Lysosomen vorkommenden Proteasen bzw. Peptidasen bezeichnet. Dort sind sie hauptsächlich für den Abbau von Proteinen und Peptiden verantwortlich. Aufgrund ihrer unterschiedlichen katalytischen Mechanismen lassen sie sich in Cystein-, Serin- und Aspartylproteasen unterteilen. Die Cathepsine B, F, H, K, L, S und Z gehören zur Familie der Cysteinproteasen (Turk *et al.*, 2000). Die meisten Cathepsine hydrolysieren Peptidbindungen innerhalb einer Polypeptidkette und zählen damit zu den sogenannten Endopeptidasen. Cathepsin Z (auch bekannt als Cathepsin X) wird ubiquitär in fast allen Geweben exprimiert und wird von dem Gen CTSZ kodiert (Nägler und Ménard, 1998). Die cDNA von CTSZ enthält 912 Basenpaare. Die Synthese von Cathepsin Z, das aus 303 Aminosäuren besteht, erfolgt zunächst als Präproform an den membrangebundenen Ribosomen des ER. Die hydrophobe Signalsequenz (Aminosäuren 1-22) ermöglicht den Transport des Enzyms in das Lumen des ER, wo das Signalpeptid abgespalten und das Proenzym an den Asparagin-Resten N184 und N224 glykosyliert wird (Abb. 2).

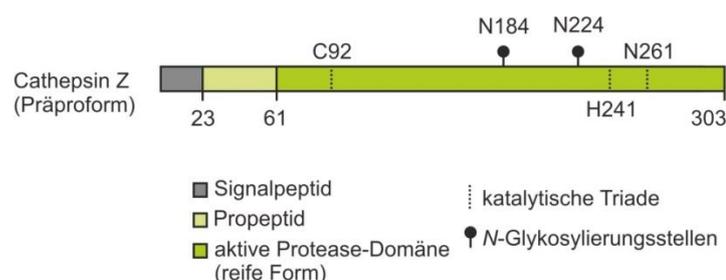


Abbildung 2: Schematische Abbildung der Proteinstruktur des humanen Cathepsin Z

(Die Abbildung wurde von Dr. S. Pohl erstellt.)

Im Golgi-Apparat wird das *N*-Glykan am Asparagin-Rest N224 zu komplexen Zuckern modifiziert, während ein Mannose-Rest des *N*-Glykans am Asparagin-Rest N184 phosphoryliert wird (Appenzeller-Herzog *et al.* 2005). Dieser M6P-Rest ermöglicht den Weitertransport des Proenzym zu den Lysosomen (siehe Abb. 1). Cathepsin Z wird durch

proteolytisches Entfernen des Propeptides zur reifen Form aktiviert (Santamaria *et al*, 1998). Im Gegensatz zu den meisten Cathepsinen spaltet Cathepsin Z Aminosäuren vom Carboxyterminus ab und wird daher als Carboxymonopeptidase bezeichnet (Klemencic *et al*, 2000).

1.5 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression, die *N*-Glykosylierung und den intrazellulären Transport der humanen lysosomalen Protease Cathepsin Z zu untersuchen:

- Amplifikation eines eukaryotischen Expressionsvektor, der die humane lysosomale Protease Cathepsin Z kodiert, in *E. coli*
- Präparation der Plasmid-DNA aus *E. coli* im Midi-Maßstab
- Restriktions- und Sequenzanalyse des Expressionsvektors
- Analyse der endogenen Cathepsin Z mRNA-Spiegel in verschiedenen humanen Zell-Linien
- Transiente Transfektion in verschiedenen Zell-Linien zur Überexpression von Cathepsin Z
- Vergleichende, zelltyp-spezifische Western-Blot-Analysen des endogenen und überexprimierten Cathepsin Z
- *In-vitro*-Deglykosylierung von Proteinextrakten mit PNGaseF und Endoglykosidase H zur Analyse der *N*-Glykane von Cathepsin Z
- Analyse der sezernierten Formen von Cathepsin Z in den Kulturüberständen
- Lokalisation des überexprimierten Cathepsin Z durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und deren Herkunft sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Firma
Absaugpumpe	SMT
Bakterien-Inkubator	New Brunswick Scientific
CO ₂ -Inkubator	New Brunswick Scientific
E-Box VX2 Geldokumentation	PeqLab
Eismaschine AF 10	Scotsman Ice Systems
Elektrophoresekammer SE600	Hoefer
Elektrophorese-Spannungsgerät	Biometra
Heizblock	HLC, Kleinfeld Labortechnik
Imager "ChemiDoc™XRS"	Bio-Rad
Konfokales Fluoreszenzmikroskop „SP2“	Leica
Lichtmikroskop, Axiovert 25	Zeiss
Magnetrührer MSH-basic	IKA-Werke
Mikrowelle	Whirlpool
PCR-Gerät, Realtime Mx3000P™	Stratagene
pH-Meter FE20	Mettler Toledo
Photometer	Thermo Scientific
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte
Sterilbank Herasafe	Heraeus
Transferkammer TE62	Hoefer
Waage AC100 (Feinwaage)	Mettler
Waage TE2101	Sartorius
Wasserbad C 10	Schütt Labortechnik
Wippschüttler Rocky	GFL
Vortex-Mixer	Neolab
Zentrifuge 5702 R, 5415R, 5424	Eppendorf

Neben den laborüblichen Kunststoff- und Glasgefäßen wurden die folgenden Verbrauchsmaterialien benutzt.

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma
Deckgläser	Glaswarenfabrik Karl Hecht
Einweg-Küvetten	Brand
Einwegmaterialien für Zellkultur	Falcon, Sarstedt
Filterpapier (Miracloth)	Calbiochem
Filterschwämme	Amersham
Gel-Glasplatten	Amersham
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schüll
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Eppendorf
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Sarstedt, Greiner
Schaber	Roth
<i>Stripes</i> und Deckel für Realtime-PCR	Applied Biosystems
Teflonkämme	Hoefer
UV-Küvetten,	Eppendorf
Whatman-Papier	Whatman

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Neben den in Tab. 3 gelisteten Chemikalien und Reagenzien wurden alle weiteren gängigen Laborchemikalien und Lösungsmittel von den Firmen Sigma-Aldrich und Roth bezogen.

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Firma
Acrylamid	Roth
Agarose Basic	Biozym
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Aqua Poly/Mount	Polysciences
Bovines Serumalbumin (BSA)	Thermo Scientific
Bradford-Reagenz Roti-Quant®	Roth
Coomassie® Blue R	Serva
Dithiothreitol	Sigma
DNA-Ladepuffer (6X DNA Loading Dye)	Thermo Scientific
DNA-Marker (GeneRuler 1 kb DNA-Ladder)	PeqLab
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies
Endo H	NEB
Ethidiumbromid	Sigma

Chemikalie	Firma
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA
GlutaMax™	Life Technologies
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
HPLC- H ₂ O	Roth
JetPEI Transfektionsreagenz	PeqLab
Kanamycin	Roth
Kit für cDNA-Synthese	Applied Biosystems
Kit für DNA-Präparation	Qiagen
Kit für RNA-Präparation	PeqLab
Luminol	Sigma
Lysozym	Serva
β-Mercaptoethanol	Sigma
Milchpulver	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Nonidet P-40	Roche
OptiMEM®	Life Technologies
Page-Ruler™ Protein-Marker	Fermentas
Paraformaldehyd	Roth
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies
PNGase F	Roche
Proteaseinhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich
RNase A	Applichem
Saponin	Sigma
N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
TritonX-100	Sigma-Aldrich
Trizma® base	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA	Life Technologies
Tween® 20	Roth
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck

2.1.3 Puffer und Lösungen

In Tab. 4 ist die Zusammensetzung von verwendeten Puffern und Lösungen aufgeführt.

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

Puffer, Lösung (pH)	Zusammensetzung
10 × PBS (pH 7,4)	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 17,6 mM KH ₂ PO ₄
10 × TBS (pH 7,4)	250 mM Tris/HCl, 1,37 M NaCl, 27 mM KCl
4 × Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 M Tris/HCl, 0,4 % SDS

Puffer, Lösung (pH)	Zusammensetzung
4 × Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris/HCl, 0,4 % SDS
Anodenpuffer (pH 8,6)	25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin
Blockpuffer (pH 7,4)	TBS, 0,1 % Tween 20, 5 % Milchkpulver
Denaturierungspuffer	5 % SDS-Lösung und 10 % β - Mercaptoethanol, pH 5,5
ECL-Lösung 1 (pH 8,5)	1 M Tris/HCl, 250 mM Luminol, 90 mM p-Cumarinsäure
ECL-Lösung 2 (pH 8,5)	1 M Tris/HCl (pH 8,5), 30 % H ₂ O ₂
Kathodenpuffer (pH 8,6)	25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
Lysispuffer (pH 7,5)	50 mM Tris/HCl, 1 % Triton X-100, Proteaseinhibitoren
Midi-I	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA
Midi-II	0,2 M NaOH, 1 % SDS
Solubilisierungspuffer (pH 6,8)	50 mM Tris/HCl , 4 % SDS, 12 % Glycerol, Coomassie® Blue R, 10 mM Dithiothreitol, 0,1 mM β -Mercaptoethanol
Transferpuffer (pH 7,4)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol
Waschpuffer (pH 7,4)	TBS, 0,1 % Tween 20

2.1.4 Expressionsvektor p.CTSZ-myc

Der für die transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen verwendete Expressionsvektor p.CTSZ-myc ist in Abb. 3 dargestellt. Das Plasmid wurde kommerziell von der Firma Origene (Katalog-Nr. RC208341) erworben. Die humane cDNA CTSZ wurde über die Restriktionsschnittstellen *SgfI* und *MluI* kloniert.

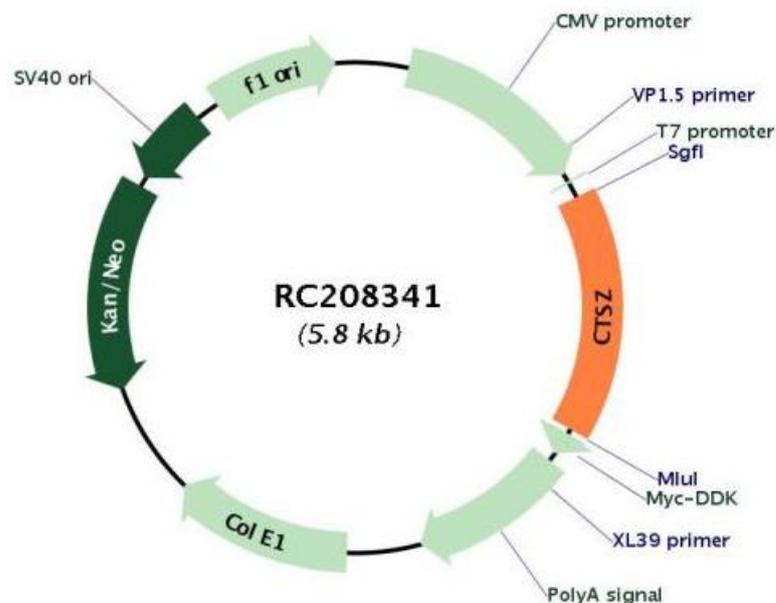


Abbildung 3: Vektorkarte des Plasmids p.CTSZ-myc

(<http://204.9.46.202:8080/NoegenAppExt/DrawMapBySKU?drawMap=drawMap&SKU=RC208341&VECTOR=pCMV6Entry>, abgerufen in Juni 2015)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Amplifikation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Das kommerziell erworbene Plasmid p.CTSZ-myc (Abb. 3) wurde in *E. coli* transformiert, auf einer Agarplatte 100 mg/l Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert (durchgeführt von J. Brand, UKE). Zur Amplifikation des Plasmides wurde 5 ml LB-Medium mit 100 mg/l Kanamycin mit einer Kolonie der Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C in einem Bakterieninkubator geschüttelt. Von dieser Vorkultur wurde 500 µl mit 150 ml LB-Medium und 100 mg/l Kanamycin in einem Erlenmeyerkolben gemischt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Übernachtskultur wurde für die Plasmid-Präparation im Midi-Maßstab und zum Anlegen einer Glycerolkultur verwendet. Dazu wurde 500 µl der Übernachtskultur mit 500 µl Glycerol versetzt und bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA im Midi-Maßstab erfolgte durch zwei verschiedene Methoden.

2.2.2.1 Methode ohne Kit

50 ml der Übernachtskultur wurden in ein Falcon-Gefäß (50 ml) gefüllt, für 10 Minuten bei 4000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 4,5 ml Midi-I resuspendiert, 0,5 ml Lysozym (10 mg/ml) dazu gegeben, gemischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde vorsichtig 10 ml frisch angesetzte Midi-II dazu gegeben, durch ca. 5 x invertieren vermischt und für weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Neutralisation wurden vorsichtig 7,5 ml Midi-III (60 mL 5 M Kaliumacetat, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml Wasser) dazu gegeben, durch ca. 5 x invertieren vermischt, wobei sich ein weißer Niederschlag bildete. Nach einer Zentrifugation für 20 Minuten bei 4 °C und 4500 x g wurden die gefällten Proteine durch Filterpapier (Miracloth®) filtriert. Zum Filtrat wurde 12 ml Isopropanol gegeben, gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die gefällten Nukleinsäuren für 20 Minuten bei 4 °C und 4500 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde für ca. 5 Minuten unter dem Abzug abgedampft und in 1 ml Midi-I komplett gelöst. In einem Reaktionsgefäß (2 ml) wurde die Lösung mit 1 ml 4 M LiCl-Lösung gemischt und für 20 Minuten bei 4 °C und 20000 x g zentrifugiert.

Der Überstand, der die DNA enthält, wurde mit 5 ml eiskaltem Ethanol (100 %) vorsichtig in einem Falcon-Gefäß (15 ml) gemischt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Die gefällte DNA wurde für 30 Minuten bei 4 °C und 4500 x g zentrifugiert und das Pellet für ca. 5 Minuten unter dem Abzug abgedampft. Das Pellet wurde in 500 µl Midi-I aufgenommen und die restliche RNA wurde mit 10 µl RNase A (10 mg/ml) für 30 Minuten bei 37 °C verdaut.

Die Proteine wurden mittels einer Phenol-Chloroform-Extraktion aus der wässrigen DNA-Lösung entfernt. Dazu wurde die DNA-Lösung unter dem Abzug zuerst mit 500 µl Phenol (pH 7,6) 10 Sekunden kräftig auf dem Vortex gemischt. Nach Zugabe von 500 µl Chloroform wurde erneut für 10 Sekunden kräftig auf dem Vortex gemischt und zur Phasentrennung für 5 Minuten bei 20000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase, die die DNA enthält, ohne Interphase in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Die Extraktion wurde so lange wiederholt, bis keine Interphase mehr zu erkennen war. Um das restliche Phenol zu entfernen, wurde noch einmal 500 µl Chloroform dazugegeben und zur Phasentrennung für 5 Minuten bei 20000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Die DNA-Lösung wurde mit 50 µl 3 M Natrium-Acetat (pH 5,5) und mit 1100 µl eiskaltem Ethanol (100 %) gut gemischt und bei -20 °C über Nacht gefällt. Die gefällte DNA wurde 30 Minuten bei 4 °C und 20000 x g zentrifugiert und das Pellet in 250 µl dest. H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.2.2.2 Methode mit QIAGEN Plasmid-Midi-Kit

50 ml der Übernachtskultur wurden in ein Falcon-Gefäß (50 ml) überführt und für 15 Minuten bei 4 °C und 6000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Aus dem Zellpellet wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAGEN Plasmid-Midi-Kits nach Herstellerangaben präpariert. Die DNA wurde in 200 µl dest. H₂O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.2.3 RNA-Isolierung aus Zellen

Die RNA wurde aus kultivierten eukaryotischen Zellen einer 3,5-cm-Schale isoliert. Die Zellen wurden zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen und in 1 ml PBS abgeschabt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 4 °C und 900 x g.

Aus dem Pellet wurde die RNA mit Hilfe des Total-RNA-Isolation-Kit (Pepqlab) nach Herstellerangaben präpariert. Die RNA wurde in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei -

20 °C gelagert. Die Quantität der RNA wurde photometrisch und die Qualität durch Auftrennung im Agarosegel überprüft.

2.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen

Die photometrische Messung von Nukleinsäure-Lösungen erfolgte am UV-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer UV-transparenten Küvette gegen dest. H₂O. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. von 40 µg/ml RNA.

2.2.5 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Restriktionsnukleasen erkennen spezifische kurze Nukleotidsequenzen und spalten die DNA in diesem Bereich. Sie wurden zur Analyse der Plasmid-DNA p.CTSZ-myc (Abb. 2) verwendet. Die DNA I (ohne Kit) wurde zuerst 1:10 verdünnt und die Restriktionen erfolgten nach dem folgenden Pipettierschema:

	<u>Restriktion von DNA I</u> (ohne Kit)	<u>Restriktion von DNA II</u> (mit Kit)
Plasmid-DNA	▪ 2,7 µL (= 1 µg)	▪ 2,5 µL (= 1 µg)
dest. H ₂ O	▪ 13,3 µl	▪ 13,5 µl
Fast Digest <i>SgfI</i>	▪ 1 µl	▪ 1 µl
Fast Digest <i>MluI</i>	▪ 1 µl	▪ 1 µl
Fast Digest Puffer (10 x)	▪ 2 µl	▪ 2 µl

Die Ansätze wurden mit einem Vortex gemischt, kurz zentrifugiert und bei 37 °C für 40 Minuten inkubiert.

2.2.6 Gel-Elektrophorese von DNA

Es wurde zunächst ein 0,5 %-iges Agarosegel gegossen. Dazu wurde 0,75 g Agarose in einen Erlenmeyerkolben mit 150 ml TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,3) gefüllt. Die Agarose wurde in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sie sich komplett gelöst hatte. Nachdem die Agarose-Lösung auf etwa 60 °C abkühlt war, wurde 7 µl Ethidiumbromid-Stocklösung (10 mg/ml) dazu gegeben und gemischt.

Die Lösung wurde in die Gelkammer gegossen und zum Erhärten 30 Minuten unter dem Abzug stehen gelassen. Anschließend wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen und das Gel in die Elektrophoresekammer überführt. Das Gel wurde mit TAE-Puffer übergossen, bis das Gel komplett mit Puffer bedeckt war. Die Proben wurden mit 4 µl Ladepuffer versetzt und in die Probenaschen pipettiert. Zusätzlich wurde 5 µl DNA-Marker aufgetragen. Bei 120 V wurden die DNA-Fragmente 30-45 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Die Interaktion von Ethidiumbromid in die DNA ermöglichte die Detektion der DNA-Banden durch Fluoreszenz mit UV-Licht. Dazu wurde das Gel in ein Geldokumentationsgerät gelegt und mit einem Kamera-System fotografiert.

2.2.7 Synthese von cDNA

RNA kann mit einer PCR nicht amplifiziert werden, da sie keine geeignete Matrize für die Polymerase darstellt. Es ist daher nötig, in einem Zwischenschritt mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase), zuerst eine zur RNA komplementäre cDNA zu synthetisieren. Die cDNA-Synthese aus RNA erfolgte mittels des High-capacity-cDNA-Reverse-Transcription-Kit. Es wurde der folgende Ansatz pipettiert und anschließend in einem Thermocycler inkubiert:

2,0 µl	Random-Primer (10 x)	Programm	
2,0 µl	Puffer (10 x)	25 °C	10 Minuten
0,8 µl	dNTP-Mix (25 x)	37 °C	120 Minuten
1,0 µl	Reverse Transkriptase	85 °C	5 Minuten
4,2 µl	DEPC-Wasser	4 °C	∞
1,0 µg	RNA		

Die entstandene cDNA diente als Matrize für die cDNA-Amplifikation über Realtime-PCR.

2.2.8 Quantitative Realtime-PCR

Die Expressionsanalyse von CTSZ auf RNA-Ebene wurde mit einer quantitativen Realtime-PCR durchgeführt. Verwendet wurde der TaqMan® Gene Expression Assay, der Gen-spezifische Primer und fluoreszenzmarkierte Sonden für CTSZ (Hs00938366_m1) und dem Kontrollgen ACTB (Hs99999903_m1) enthält.

Die TaqMan-Sonde besitzt an ihrem 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff während das 3'-Ende mit einem fluoreszierenden Quencherfarbstoff markiert ist.

Ist die TaqMan-Sonde nicht an einen cDNA-Abschnitt gebunden, wird die Energie des Reporterfarbstoffs nach Anregung bei 488 nm vom Quencher resorbiert (Cardullo *et al*, 1988). Während der PCR amplifiziert die *Taq*-Polymerase, ausgehend vom gebundenen Primer, die cDNA und entfernt die Sonde. Dadurch verlieren der Quencher- und der Reporterfarbstoff die Nähe zueinander und die Lichtsignale des Reporters können detektiert werden (Abb. 4). Da sowohl die Sonde als auch die Primer gebunden sein müssen, ist diese Methode sehr spezifisch.

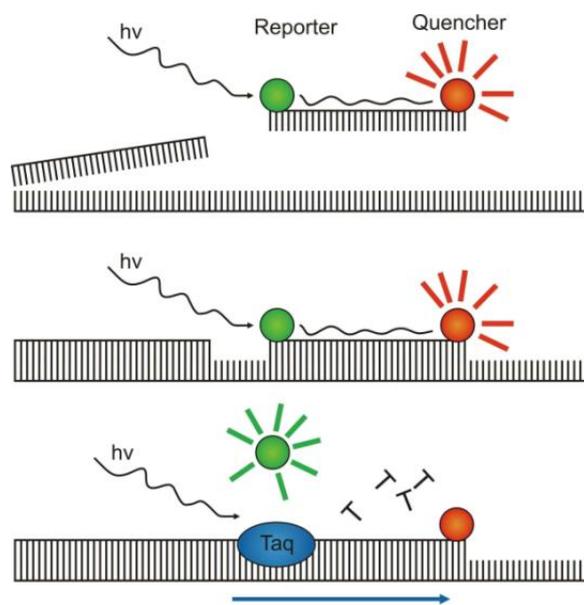


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Taqman-Prinzips

(Die Abbildung wurde von Dr. S. Pohl erstellt.)

In der exponentiellen Anstiegsphase wird der so genannte cycle of threshold (C_T) gesetzt. Der C_T -Wert einer Probe entspricht der Zahl der Zyklen der PCR, bei dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Dieser Wert ist die Grundlage für die weitere Auswertung. Zuerst wurde die Differenz zwischen dem C_T -Wert des zu untersuchenden Gens (CTS_Z) und dem Kontrollgen (ACTB) gebildet. Die relative Expression wurde aus dem Vergleich der Probe einer Zelllinie gegen die Proben anderer Zelllinien nach der folgenden Gleichung ermittelt (Schmittgen & Livak, 2008):

$$\text{relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad \text{mit} \quad \Delta C_T = C_{T \text{ CTSZ}} - C_{T \text{ ACTB}}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Zelllinie X}} - \Delta C_{T \text{ Zelllinie Y}}$$

Für die graphische Auswertung wurde ΔC_T der HEK-Zellen gleich 1 gesetzt. Es wurden folgende Ansätze pipettiert und in einem PCR-Gerät inkubiert:

10 μ l Maxima™ Probe Master Mix (2 \times)	95 °C 10 Minuten	} 40 Zyklen
7 μ l DEPC-Wasser	95 °C 30 sec	
1 μ l TaqMan® Gene Expression Assay	60 °C 1 Minuten	
2 μ l <u>Template-cDNA</u>		
20 μ l		

2.3 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung von eukaryotischen Zellen erfolgte unter einer Sterilbank. Die Arbeitsflächen und verwendeten Materialien wurden mit Ethanol desinfiziert. Die verwendeten Einwegmaterialien sowie Medien und Zusätze waren ebenfalls steril.

2.3.1 Kultivieren von eukaryotischen Zellen

Die jeweiligen Zellen wurden in großen (75 cm²) Zellkulturflaschen in einem Inkubator mit wassergesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂-Gehalt bei 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden in DMEM inkubiert, dem 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % GlutaMax™ zugesetzt war. Ein Mediumwechsel erfolgte zwei- bis dreimal pro Woche. In dieser Arbeit wurden die in Tab. 5 aufgeführten Zelllinien verwendet.

Tabelle 5: Verwendete eukaryotische Zelllinien

Zell-Linie	Spezie
BHK-Zelle	Hamster
COS7, Nierenzellen	Grüne Meerkatze
Fibroblasten	human
HEK, embryonale Nierenzellen	human
HeLa, Epithelzellen eines Zervixkarzinoms	human

Wenn die Konfluenz der kultivierten Zellen bei 80-100 % lag, wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung bei 37 °C für 3-5 Minuten inkubiert bis sich die Zellen abgerundet und abgelöst hatten. Durch Zugabe von vorgewärmtem Kulturmedium wurde die Wirkung von Trypsin inhibiert.

Die Zellsuspension wurde je nach gewünschter Verdünnung mit Kulturmedium aufgefüllt und auf entsprechende Zellkulturschalen oder -flaschen ausgesät.

2.3.2 Transiente Transfektion von Zellen

Die transiente Transfektion von kultivierten Zellen in 6-cm-Schalen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz JetPEI®. In einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden jeweils 5 µl DNA (5 µg) mit 245 µl NaCl-Lösung (150 mM) auf 250 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. In einem weiteren 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden 10 µl JetPEI® mit NaCl-Lösung (150 mM) auf 250 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Dann wurde die JetPEI®-Lösung zur DNA-Lösung pipettiert und 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Inzwischen wurden von den Zellen das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und 4 ml frisches Kulturmedium hinzugegeben. Nach der Inkubationszeit wurde die Mischung tröpfchenweise und unter Schwenken vorsichtig auf der Kulturschale verteilt und bei 37 °C inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen, einmal mit PBS gewaschen, durch OptiMEM® (serumfreies Medium) ersetzt und bei 37 °C für weitere 24 Stunden inkubiert. Die Zellernte erfolgte 48 Stunden nach Transfektion.

2.3.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Zellen wurden auf sterilen Deckgläschen in einer 24-Well-Zellkulturplatte ausgesät und transfiziert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 20 Minuten mit 500 µl 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach zwei Waschschrritten mit PBS wurden die fixierten Zellen mit 500 µl 0,1 % Saponin in PBS für 10 Minuten permeabilisiert. Die Blockierung erfolgte für 1 Stunde mit 500 µl 3 % BSA/0,1 % Saponin in PBS (Blockierlösung), um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu besetzen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C mit einem Primärantikörper verdünnt in Blockierlösung inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen.

Die Inkubation mit einem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper in Blockierlösung erfolgte für 2 Stunden in einer feuchten Kammer bei 4 °C. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen in Aqua Poly/Mount eingedeckt und am folgenden Tag mit Nagellack abgedichtet. Die Mikroskopie-Aufnahmen erfolgten an einem Fluoreszenzmikroskop.

Tabelle 6: Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper		
Antigen (aus Spezie)	Verdünnung	Firma
myc (aus Maus)	1:200	Cell signalling
Limp2 (aus Kaninchen)	1:500	Dr. M. Schwake
Sekundäre Antikörper		
AlexaFluor-Antikörper	Verdünnung	Firma
Alexa 448 (grün) anti Maus	1:1000	Invitrogen
Alexa 546 (rot) anti Kaninchen	1:1000	Invitrogen

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Zellextrakten

Zellen einer 6-cm-Schale wurden auf Eis gestellt und nach Abnahme des Kulturmediums mit eiskaltem PBS gewaschen, zweimal mit 700 µl PBS mit einem Gummischaber abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Danach folgte eine Zentrifugation bei 900 x g für 10 Minuten und 4 °C. Das entstandene Pellet wurde in 400 µl Triton X-100-Lysispuffer gut resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach folgte eine zweite Zentrifugation bei 20000 x g für 10 Minuten und 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen.

Das Kulturmedium wurde in ein Reaktionsgefäß (2 ml) überführt und bei 900 x g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen.

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellextrakten

Die verwendete kolorimetrische Methode beruht auf einer Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung.

Durch die Bindung wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 auf 595 nm verschoben. Anhand einer Eichreihe (0-20 µg BSA) lässt sich so die Konzentration einer Proteinlösung bestimmen. Dazu wurden 2-5 µl der zu messenden Probe mit dest. H₂O auf 800 µl aufgefüllt. Anschließend wurden je 200 µl Roti-Quant® zu den Proteinproben und den Proben der Eichreihe pipettiert und gut gemischt. Nach 3-5 Minuten Inkubation wurden die

Proben nacheinander in eine Einmalküvette gegeben und die Extinktion am Photometer bei 595 nm gemessen.

2.4.3 Deglykosylierung von Proteinen durch PNGase F und Endo H

2.4.3.1 Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F)

Das Enzym PNGase F spaltet *in-vitro* N-glykosidische Bindungen an Glykoproteinen. Dazu wurden jeweils 100 µg Protein in 100 µl Triton-X100-Lysispuffer mit 2 µl 10 % SDS-Lösung versetzt und für 10 Minuten bei 70 °C erhitzt. Anschließend wurden 10 µl 10 % Nonidet P- 40 und 2 µl (2 U) PNGase F hinzugefügt und die Proben 20-180 Minuten bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurden Proben unter den gleichen Bedingungen, ohne PNGase F inkubiert.

2.4.3.2 Endoglykosidase H (Endo H)

Das Enzym Endo H spaltet *in vitro* mannosereiche Glykane von Glykoproteinen. Dazu wurden jeweils 100 µg Protein in 100 µl Triton-X100-Lysispuffer mit 4 µl Denaturierungspuffer versetzt und für 10 Minuten bei 70 °C erhitzt. Anschließend wurden 10 µl 10 x G5-Puffer und 2 µl Endo H hinzugefügt und die Proben 20-180 Minuten bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurden Proben unter den gleichen Bedingungen jedoch ohne Endo H inkubiert.

2.4.4 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Die Proteine wurden nach ihrer molaren Masse durch SDS-PAGE in einem diskontinuierlichen Puffersystem getrennt. Zwischen zwei durch Abstandshalter getrennte Glasplatten wurde das Polyacrylamid-Trenngel (Tab. 7) gegossen. Nach ungefähr 30 Minuten wurde auf das polymerisierte Trenngel das Sammelgel gegossen und sofort ein Gel-Kamm eingesteckt. Nach weiteren 30 Minuten wurde der Gel-Kamm herausgenommen und die Geltaschen mit dest. H₂O gespült.

In die Taschen des Gels wurden 25-100 µg Protein aufgetragen, gegebenenfalls mussten die Proben mit Lysispuffer verdünnt werden. Die aufzutragenden Proben wurden in reduzierendem Solubilisierungspuffer aufgenommen, kurz gevortext, für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und in die Geltaschen überführt.

Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsstandard (Page Ruler™) auf das Gel geladen. Die Gele in den Glasplatten wurden in die Elektrophoresekammer eingespannt und an ein

Spannungsgerät angeschlossen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 60 mA für ca. 2 Stunden. Der Lauf war beendet, sobald die Coomassie-Front aus dem Gel herausgelaufen war.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE

Chemikalie/Puffer	10 % Trenngel (30 ml)	4 % Sammelgel (10 ml)
30,8 % Acrylamid	9,8 ml	1,3 ml
Trenngelpuffer (Tab. 6)	7,5 ml	-
Sammelgelpuffer (Tab. 6)	-	2,5 ml
dH ₂ O	12,2 ml	6 ml
10 % APS	250 µl	100 µl
10 % SDS	300 µl	100 µl
TEMED	25 µl	10 µl

2.4.5 Westernblot-Analysen

Die aufgetrennten Proteine werden bei dieser Methode vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, wodurch das Trennmuster erhalten bleibt. Das Gel und eine Nitrocellulosemembran wurden in Transferpuffer luftblasenfrei zwischen Whatman-Filterpapiere und Schwammfilter gelegt. Der Transfer erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Blot-Kammer für 2 Stunden bei 900 mA oder über Nacht bei 250 mA. Zur Besetzung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für eine Stunde in Blockpuffer inkubiert. Danach wurde die Membran mit einem primären Antikörper, der in Blockpuffer verdünnt wurde, für ca. eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen und es erfolgte eine Inkubation mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Membran wurde erneut dreimal für 10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte durch eine *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Reaktion. Dafür wurden 5 ml der beiden ECL-Lösungen gemischt und 30 Sekunden auf der Membran inkubiert. Diese konnte anschließend mit dem ChemiDoc™XRS mit eingebauter Digitalkamera aufgenommen werden. Die Exposition lag zwischen 10 Sekunden und 5 Minuten. Wenn nötig konnte die Membran nach dem „Strippen“ wiedereingesetzt werden, um andere Proteinbanden durch andere Antikörper zu

identifizieren. Für das „*Strippen*“ wurde die Membran zweimal mit 0,2 M NaOH für 5 Minuten inkubiert und zweimal mit dest. H₂O vor einer weiteren Inkubation mit dem Blockpuffer gewaschen. Für die Western-Blot-Analysen wurden die in Tab. 8 gelisteten primären und sekundären Antikörper in der angegebenen Verdünnung verwendet.

Tabelle 8: Verwendete Antikörper für die Western-Blot-Analysen

Primäre Antikörper		
Antigen (aus Spezie)	Verdünnung	Firma
myc (aus Maus)	1:10000	Cell signalling
Cathepsin Z (aus Ziege)	1:250	R&D Systems
α-Tubulin (aus Maus)	1:5000	Sigma
Sekundäre Antikörper		
HRP-Antikörper	Verdünnung	Firma
Ziege anti Maus	1:3000	Dianova
Kaninchen anti ziege	1:3000	Dianova

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Expression der mRNA von Cathepsin Z in verschiedenen Zelllinien

Zunächst wurde die endogene Expression von Cathepsin Z (CTSZ) auf mRNA-Ebene in verschiedenen Zelllinien bestimmt. Die Zelllinien HeLa, HEK, BHK, COS7 und Fibroblasten wurden in Zellkulturflaschen kultiviert und in 3,5-cm-Kulturschalen ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Die Qualität der RNA wurde vor ihrer Verwendung in Folgeexperimenten durch Auftrennung im Agarosegel überprüft. Die Gesamt-RNA ist in einem Gel im Wesentlichen als ribosomale RNA (rRNA) sichtbar, welche ca. 90 % der Gesamt-RNA ausmacht. In allen Proben konnten zwei Banden nachgewiesen werden, bei denen es sich um die 28 S und 18 S rRNAs handelt (Abb. 5A). Kleine Fragmente, die zu beobachten sind, wenn die RNA degradiert ist, konnten nicht festgestellt werden. Das bedeutet, dass die Qualität der isolierten RNA sehr gut war und für die weiteren Experimente verwendet werden konnten. Da die Zellpellets aus BHK- und HeLa-Zellen grösser waren, waren die rRNA-Banden in diesen Proben stärker nachweisbar (Abb. 5A).

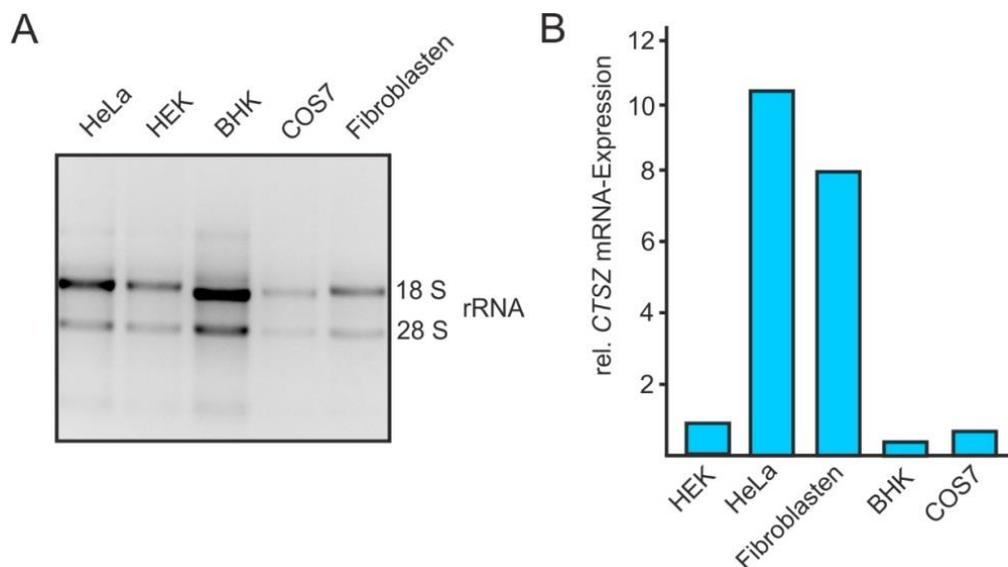


Abbildung 5: Expression der mRNA von Cathepsin Z in verschiedenen Zelllinien

A) Gelelektrophoretische Auftrennung der isolierten RNA. Jeweils 5 μ l RNA-Lösung wurden in einem 0,5 %-igen Agarose-Gel aufgetrennt. Die RNA-Banden wurden durch die Zugabe von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

B) Quantitative Realtime-PCR-Analyse. Jeweils 1 μ g RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mittels Realtime-PCR analysiert. Die CTSZ-Expression wurde auf die ACTB-Expression in der gleichen Probe normiert. Die relative CTSZ-Expression in HEK-Zellen wurde = 1 gesetzt.

Anschließend wurden aus 1 µg der jeweiligen RNA-Proben mit Hilfe der Reversen Transkriptase, die eine RNA-abhängige DNA-Polymerase ist, eine zur RNA komplementäre cDNA synthetisiert. Die CTSZ-Expression auf RNA-Ebene wurde mit einer quantitativen Realtime-PCR durchgeführt. Im Vergleich zu HEK-Zellen war die mRNA-Expression von CTSZ in HeLa-Zellen und Fibroblasten ca. 10- bzw. 8-fach höher (Abb. 5B). In BHK- und COS7-Zellen war die CTSZ-Expression geringer als in HEK-Zellen. Da für diese Analysen Primer gegen die humane CTSZ-Sequenz verwendet wurden, ist es möglich, dass diese nicht effektiv an die CTSZ-RNA vom Affen (COS7) oder Hamster (BHK) binden konnten.

3.2 Analyse des Expressionsvektors p.CTSZ-myc

Um die Expression, *N*-Glykosylierung und den Transport in verschiedenen Zelllinien zu untersuchen, wurde ein Expressionsvektor p.CTSZ-myc kommerziell bezogen und in *E. coli* transformiert. Die Plasmid-DNA wurde durch zwei verschiedene Methoden (Methode ohne Kit und Methode mit dem Qiagen-Kit) isoliert. Die DNA-Konzentration der Präparation mit dem Kit betrug 0,4 µg/µl, die Präparation ohne Kit jedoch 3,7 µg/µl. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Quantität der DNA ohne Kit größer ist als die mit dem Kit. Allerdings ist die Präparation ohne Kit wesentlich zeitaufwendiger. Um die Qualität der isolierten DNA zu überprüfen, wurde die Plasmid-DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen (*Asi*SI und *Mlu*I) verdaut und im Agarosegel aufgetrennt.

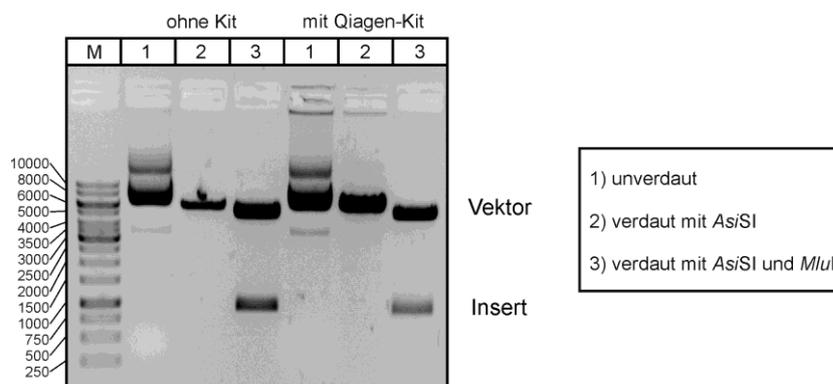


Abbildung 6: Gelelektrophoretische Auftrennung der präparierten Plasmid-DNA nach Restriktion

Jeweils 15 µl des Restriktionsansatzes wurden in einem 0,5 %-igen Agarose-Gel aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden durch die Zugabe von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Ein DNA-Marker (M) mit den Größen 250 - 10000 bp ist ebenfalls aufgetragen.

Der Vektor p.CTSZ-myc besteht aus 5800 Basenpaaren (bp). Nach der Restriktion waren für das Insert CTSZ 900 bp und für den Leervektor 4900 bp zu erwarten. Die unverdaute Vektor-DNA war nicht als einzelne sondern als drei Banden nachweisbar (Abb. 6, Spur 1). Dieses Phänomen beruht auf der unterschiedlichen Konformation der Plasmid-Moleküle. Plasmide können linearisiert sein, einen Einzelstrangbruch aufweisen (entspannt zirkulär) oder in der üblichen superspiralisierten Form (*supercoiled*) vorliegen. Superspiralisierte DNA ist wesentlich kompakter und starrer als lineare oder entspannte zirkuläre DNA und wandert daher im elektrischen Feld deutlich schneller. Nach Verdau der Plasmide mit *AsiSI* lag die DNA nur noch als linearisierte Form vor (Abb. 6, Spur 2). Lineare DNA wandert im Agarose-Gel immer gleich, so dass sich aus dem Vergleich mit einer im gleichen Gel aufgetrennten Standardprobe die Größe eines DNA-Fragmentes berechnen lässt. Die Bande entspricht der erwarteten Größe von 5800 bp. Der Verdau der Plasmid-DNA mit den Enzymen *AsiSI* und *MluI* führt zum Herausschneiden des Inserts aus dem Vektor, darum waren zwei Banden von 900 bp und 4900 bp nachweisbar (Abb. 6, Spur 3). Da sich das Bandenmuster in den unterschiedlich präparierten DNA-Proben nicht unterschied, enthalten beide Plasmide die erwarteten DNA-Fragmente. Allerdings ist die Plasmid-DNA, die mit dem Kit präpariert wurde mit genomischer DNA verunreinigt, die in den Geltaschen zu sehen ist (Abb. 6) und belegt erneut, dass die Präparation ohne Kit eine qualitativ und quantitativ bessere DNA ergibt. Für die weiteren Analysen wurde die DNA ohne Kit verwendet.

3.3 Sequenzanalyse der Plasmid-DNA p.CTSZ-myc

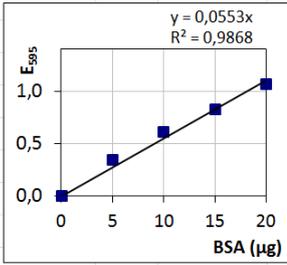
Um zu überprüfen, ob die DNA-Sequenz von CTSZ im Vektor p.CTSZ-myc korrekt ist, wurde die DNA kommerziell durch die Firma SeqLab sequenziert. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit der publizierten, humanen cDNA-Sequenz verglichen. Mit Hilfe des Online-Programms NCBI Blast wurde festgestellt, dass das Plasmid die humane cDNA von CTSZ enthält. Zur detaillierten Sequenzanalyse wurde ein *Alignment* mit dem Programm CloneManager durchgeführt. Das Ergebnis zeigte, dass die Sequenz des Plasmides mit der Referenz-Sequenz aus der NCBI-Datenbank identisch war, keine Mutationen enthielt und der *myc-tag* im Leserahmen war.

3.4 Expression von Cathepsin Z

Die Zelllinien HeLa, HEK, BHK, COS7 und Fibroblasten (FB) wurden in 6-cm-Schalen kultiviert und mit dem Expressionsplasmid p.CtsZ-myc transient transfiziert. Das Medium wurde 24 Stunden nach der Transfektion durch Optimem ersetzt. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion geerntet, lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt.

Tabelle 9: Auswertung des Bradford-Assays zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellextrakten

Standardreihe BSA				
µg	E ₅₉₅ (1)	E ₅₉₅ (2)	E ₅₉₅ (Ø)	Steigung:
0	0,000	0,000	0,000	0,0553
5	0,324	0,361	0,342	
10	0,594	0,621	0,607	
15	0,800	0,852	0,826	
20	1,068	1,059	1,064	



Proben		E ₅₉₅ (1)	E ₅₉₅ (2)	E ₅₉₅ (Ø)	Protein µg	Vol. µl	Protein µg/µl
Zelllinie	cDNA						
HeLa	-	0,497	0,485	0,491	8,9	2	4,4
HeLa	p.CTSZ	0,418	0,446	0,432	7,8	2	3,9
HEK	-	0,398	0,398	0,398	7,2	2	3,6
HEK	p.CTSZ	0,260	0,246	0,253	4,6	2	2,3
BHK	-	0,375	0,397	0,386	7,0	2	3,5
BHK	p.CTSZ	0,266	0,355	0,310	5,6	2	2,8
COS7	-	0,143	0,185	0,164	3,0	2	1,5
COS7	p.CTSZ	0,111	0,399	0,255	4,6	2	2,3
FB	-	0,047	0,056	0,051	0,9	2	0,5
FB	p.CTSZ	0,041	0,036	0,038	0,7	2	0,3

Daraus wurde festgestellt, dass in den Zellextrakten der Fibroblasten eine wesentlich geringere Proteinkonzentration (ca. 0,4 µg/µl) als in den Zellextrakten der Zelllinien HeLa, HEK, BHK und COS7 (1,5-4,4 µg/µl) vorhanden war. Dies lässt sich durch eine geringere Wachstumsrate der Fibroblasten gegenüber den anderen Zelllinien erklären. Die Proteinextrakte wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und im Westernblot mit einem Antikörper gegen Cathepsin Z analysiert.

In Proteinextrakten nicht-transfizierter HeLa-Zellen konnte ein schwaches Signal bei 38 kDa nachgewiesen werden, bei dem es sich wahrscheinlich um das endogene Cathepsin Z handelt (Abb. 7, Spur 1). In den nicht-transfizierten HEK-Zellextrakten konnte das endogene Cathepsin Z nicht nachgewiesen werden (Spur 3). Dieses Ergebnis stimmt mit der mRNA-Analyse überein (Abb. 5B), da die CTSZ-mRNA in HeLa-Zellen etwa 10-mal stärker exprimiert war als in HEK-Zellen.

Das endogene Hamster- bzw. Affen-Cathepsin Z konnte in den Extrakten von BHK- bzw. COS7-Zellen nicht mit dem Antikörper gegen das humane Protein nachgewiesen werden (Spuren 5 und 7). Obwohl in Fibroblasten eine starke mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte (Abb. 5), konnte im Westernblot kein immunreaktives Signal nachgewiesen werden (Abb. 7, Spur 9). Die α -Tubulin-Ladekontrolle zeigte in den Fibroblasten ebenfalls ein schwaches Signal und zeigt, dass die Gesamtproteinmenge sehr gering war. Nach transienter Transfektion mit der cDNA von humanem Cathepsin Z, konnte neben der 38 kDa-Bande eine etwa 40 kDa immunreaktive Bande in den Proteinextrakten von HeLa-, HEK-, BHK- und COS7-Zellen nachgewiesen werden (Spuren 2, 4, 6 und 8). Während die Überexpression in HEK-Zellen besonders stark war, war die Transfektion von Fibroblasten nicht erfolgreich. Bei der 40 kDa-Form handelt es sich wahrscheinlich um die Proform von Cathepsin Z, während die 38 kDa-Form die reife Form darstellt. Für weitere Experimente wurden die Fibroblasten, die sich nur schwer transfizieren ließen, nicht weiter verwendet.

HeLa-, HEK-, BHK- und COS7-Zellen sind Tumorzellen und stellen permanent wachsende Zelllinien dar. Dagegen handelt es sich bei den verwendeten Fibroblasten um primäre Zellen, die aus humanem Hautgewebe isoliert worden sind. Primäre Zellen zeigen eine geringere und endliche Wachstumsrate und sind wesentlich empfindlicher gegenüber toxischen Substanzen wie z. B. Transfektionsreagenzien. Diese Eigenschaften können mögliche Gründe für die geringe Transfektionseffizienz sein.

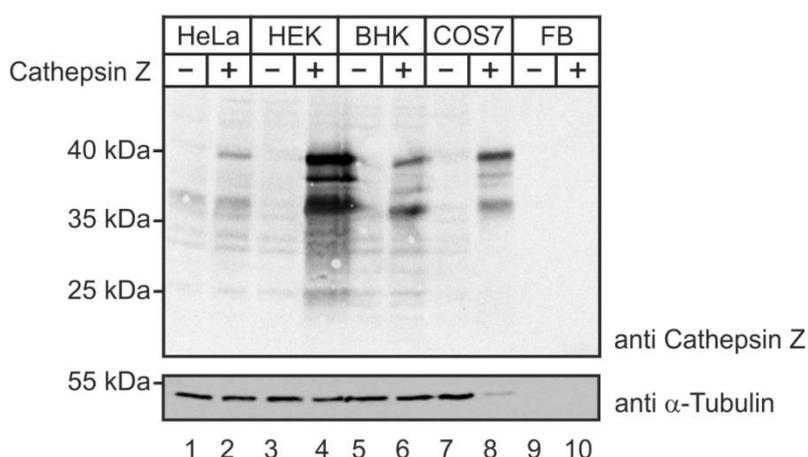


Abbildung 7: Westernblot-Analyse von Proteinextrakten transfizierter Zelllinien

Für die Überexpression in verschiedenen Zelllinien (HeLa, HEK, BHK, COS7, FB = Fibroblasten) wurde die cDNAs von Cathepsin Z transient transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit einem Antikörper gegen Cathepsin Z analysiert. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen α -Tubulin verwendet. Die molaren Massen von Markerproteinen in kDa sind angegeben.

3.5 N-Glykosylierung von Cathepsin Z

HEK-, BHK- und COS7-Zellen wurden transient mit der cDNA von humanem Cathepsin Z transfiziert. Das Medium wurde 24 Stunden nach der Transfektion durch Optimem ersetzt. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion geerntet, lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt.

Außerdem wurden die Medien der kultivierten Zellen gesammelt. Cathepsin Z enthält zwei N-Glykosylierungsstellen (siehe Abb. 2). Um die N-Glykosylierung zu untersuchen, wurden die Proteinextrakte mit oder ohne PNGase F behandelt. PNGase F spaltet die N-Glykane von Proteinen *in-vitro*. Nicht behandelte Proteinextrakte dienten als Kontrolle. Anschließend wurden die Zellextrakte und die Medien mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot analysiert. Da die transfizierte cDNA einen myc-Tag enthält, wurde der Westernblot nach der Inkubation mit dem Antikörper gegen Cathepsin Z auch noch mit einem anti myc-Antikörper analysiert.

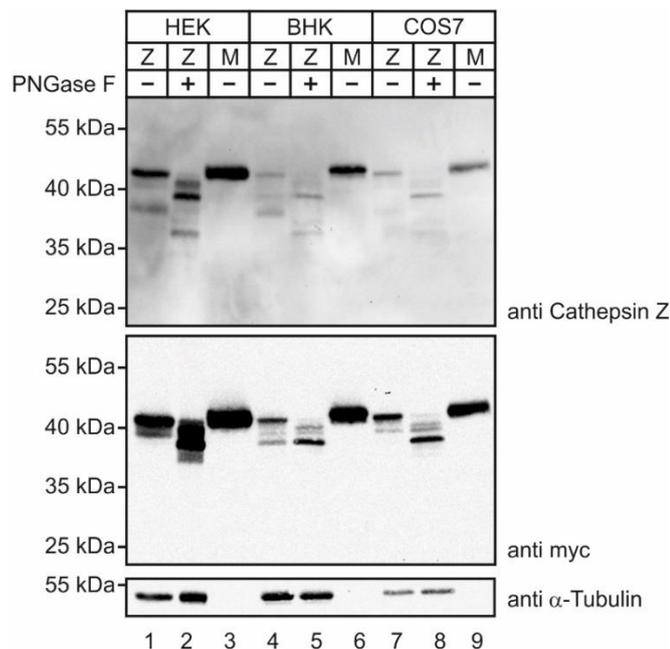


Abbildung 8: Westernblot zur Analyse der N-Glykosylierung von Cathepsin Z nach Deglykosylierung mit PNGase F

Für die Überexpression in verschiedenen Zelllinien (HEK, BHK, COS7) wurde die cDNAs von Cathepsin Z transient transfiziert. Das Medium wurde 24 Stunden nach der Transfektion durch Optimem ersetzt. Nach 48 Stunden wurden die Medien gesammelt und die Zellen geerntet und lysiert. Die Proteinextrakte wurden für 1 Stunde mit oder ohne PNGase F behandelt. Anschließend wurden die Zellen (Z) und die Medien (M) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in Westernblot gegen zwei verschiedene Antikörper analysiert. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen α -Tubulin verwendet. Die molaren Massen von Markerproteinen in kDa sind angegeben.

In den Proteinextrakten von transfizierten HEK-, BHK- und COS7-Zellen konnten erneut Signale bei 38 und 40 kDa nachgewiesen werden (Abb. 8, Spuren 1, 4 und 7). Nach Deglykosylierung mit PNGase F waren die Signale bei etwa 39 und 37 kDa zu beobachten (Spuren 2, 5 und 8). Dieses Ergebnis zeigt, dass Cathepsin Z in allen untersuchten Zelllinien *N*-glykosyliert wird. In den Medien der kultivierten Zellen ist die sezernierte Form von Cathepsin Z mit einem Molekulargewicht von etwa 41 kDa nachweisbar (Spuren 3, 6 und 9).

Das höhere Molekulargewicht lässt sich durch die Ausbildung von komplexen Glykanstrukturen erklären, die im Golgi-Apparat erfolgen. Bei den α -Tubulin-Ladekontrollen sind keine Signale in den Medien nachweisbar, da α -Tubulin ein intrazelluläres Protein ist.

Da in dem vorherigen Experiment gezeigt wurde, dass Cathepsin Z *N*-glykosyliert ist, wurde anschließend die Art der Glykosylierung in HEK-Zellen genauer untersucht, da die Überexpression in dieser Zelllinie am stärksten war. Die Zellextrakte wurden mit PNGase F und Endo H behandelt. Während PNGase F alle *N*-glykosidischen Bindungen spaltet, kann Endo H nur mannosereiche jedoch keine komplexen Glykane von Proteinen abspalten.

In Proteinextrakten von HEK-Zellen und in Medien, die mit PNGase F bzw. Endo H behandelt wurden, konnte eine etwa 38 kDa immunreaktive Bande nachgewiesen werden, bei der es sich um die deglykosylierte Form von Cathepsin Z handelt (Abb. 9, Spuren 2, 3, 5 und 6). Da die Deglykosylierung mit beiden Enzymen zur gleichen deglykosylierten Form führte, enthält das überexprimierte intrazelluläre Cathepsin Z nur mannosereiche Glykane.

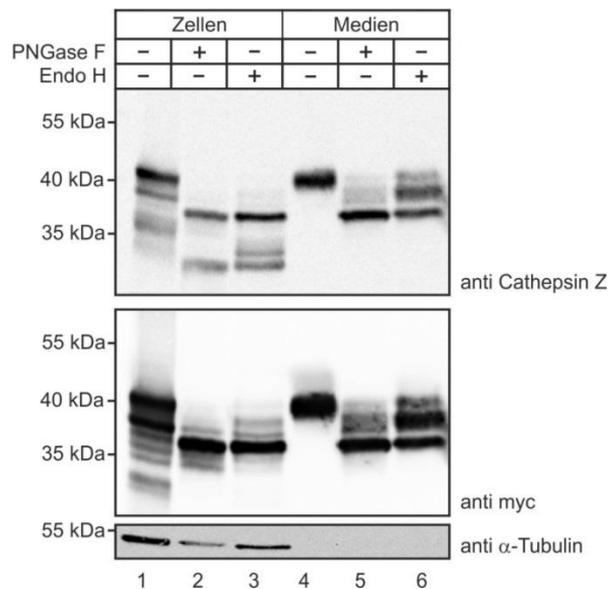


Abbildung 9: Westernblot zur Analyse der N-Glykosylierung von Cathepsin Z nach Deglykosylierung mit PNGase F und Endo H

Für die Überexpression in HEK-Zellen wurde die cDNAs von Cathepsin Z transient transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert. Die Proteinextrakte wurden für 1 Stunde mit oder ohne PNGase F bzw. Endo H behandelt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit Antikörper gegen Cathepsin Z und myc analysiert. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen α -Tubulin verwendet. Die molaren Massen von Markerproteinen sind in kDa angegeben.

Nach Behandlung der extrazellulären Proteine im Medium mit Endo H konnte zusätzlich eine Bande von etwa 39 kDa nachgewiesen werden, bei der es sich um eine Endo H-resistente Form von Cathepsin Z handelt, die komplexe N-Glykane enthält (Spur 6). In den Zellextrakten sind außerdem Proteinbanden unterhalb von 30 kDa nachweisbar, bei denen es sich wahrscheinlich um Abbauprodukte handelt (Spuren 2 und 3).

Da nach PNGase F-Behandlung der Zellextrakte und Medien noch Banden oberhalb der deglykosylierten Formen detektiert wurden (Abb. 9) und somit die Deglykosylierung nicht vollständig war, wurden im nachfolgenden Experiment verschiedene Inkubationszeiten analysiert. Dazu wurden Zellextrakte von COS7- und HEK-Zellen sowie die entsprechenden Medien für 20, 40, 60 und 180 Minuten mit PNGase F behandelt, anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit einem anti myc-Antikörper analysiert.

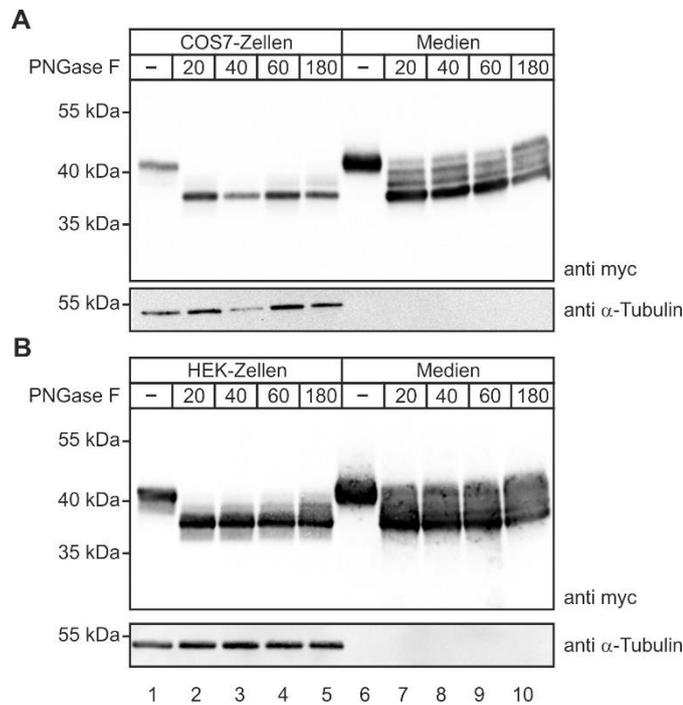


Abbildung 10: Westernblot zur Analyse der N-Glykosylierung von Cathepsin Z nach Deglykosylierung mit PNGase F und verschiedenen Inkubationszeiten

COS7- (A) und HEK-Zellen (B) wurden mit der cDNA von Cathepsin Z transient transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Lysate für verschiedene Zeiten (20, 40, 60 und 180 Minuten) mit PNGase F behandelt. Die Proben wurden im Westernblot mit einem myc-Antikörper analysiert. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen α -Tubulin verwendet. Die molaren Massen von Markerproteinen in kDa sind angegeben.

In den Proteinextrakten der unbehandelten Zellen konnte die glykosylierte Form von Cathepsin Z bei 40 kDa nachgewiesen werden (Abb. 10, Spur 1). Bereits die Behandlung mit PNGase F für 20 Minuten führte zur vollständigen Deglykosylierung von Cathepsin Z (Spur 2). In den Medien ist die Deglykosylierung unvollständig mit Banden zwischen 38 und 40 kDa (Spuren 7, 8, 9 und 10). Daraus kann geschlossen werden, dass Cathepsin Z im extrazellulären Raum in verschiedenen Formen vorliegt.

3.6 Intrazelluläre Lokalisation von Cathepsin Z

Die Protease Cathepsin Z ist im Lysosom lokalisiert. Um dies zu bestätigen, wurden Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dafür wurde die cDNA von Cathepsin Z in HeLa Zellen überexprimiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen auf Deckgläschen fixiert, mit einem Antikörper gegen den myc-Tag von Cathepsin Z (CTS_Z, grün)

oder gegen das lysosomale Membranprotein LIMP2 (rot) und durch Fluoreszenz-markierte sekundäre Antikörper inkubiert (Abb. 11).

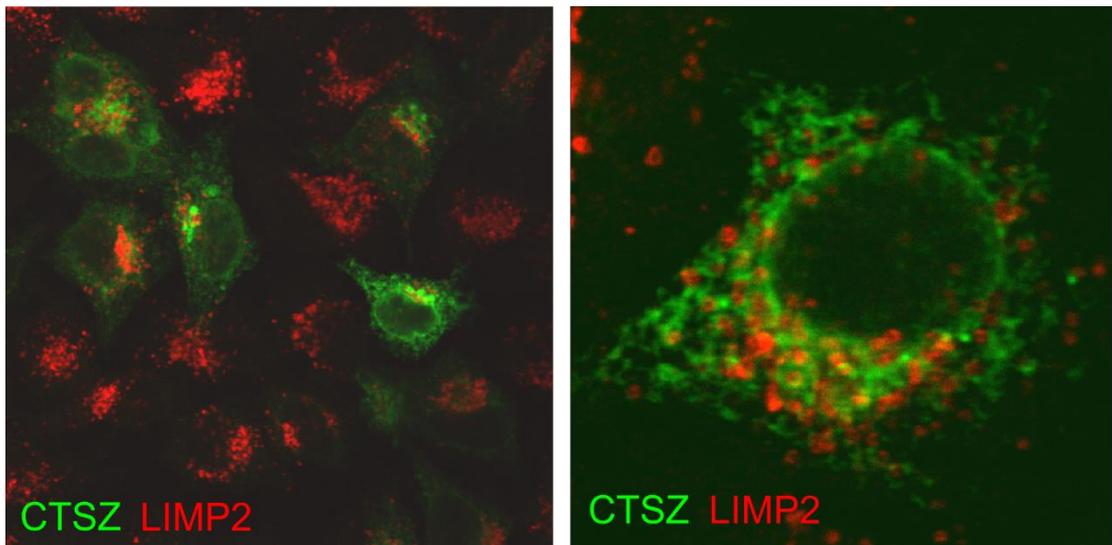


Abbildung 11: Intrazelluläre Lokalisation von Cathepsin Z

Die cDNAs von Cathepsin Z wurde in HeLa-Zellen transient transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und mit einem Antikörper gegen den myc-Tag von Cathepsin Z (CTS, grün) oder gegen das lysosomale Membranprotein LIMP2 (rot). Rechts ist eine vergrößerte einzelne Zelle dargestellt.

Es wurde festgestellt, dass das überexprimierte Cathepsin Z nicht zu den Lysosomen transportiert wird. Eine Co-Lokalisation mit dem lysosomalen Membranprotein LIMP2 wäre durch eine Gelbfärbung zu erkennen. Die Grünfärbung deutet eher auf eine Lokalisation im ER hin.

Es ist vorstellbar, dass durch die starke Überexpression in den HeLa-Zellen ein Großteil des neusynthetisierten Proteins nicht vom ER zum Golgi-Apparat transportiert wird. Somit kann keine Ausbildung von M6P-Resten durch die GlcNAc-1-Phosphotransferase erfolgen und der Rezeptor-vermittelte Transport zu den Lysosomen findet deshalb nicht statt. Stattdessen wird ein großer Teil von Cathepsin Z in den extrazellulären Raum sezerniert, was durch die Westernblot-Analysen gezeigt werden konnte. Ähnliche Beobachtungen wurden von der Arbeitsgruppe bereits bei der Überexpression des lysosomalen Enzyms α -Fukosidase gemacht (Masterarbeit Giorgia Di Lorenzo, 2014). Die starke Überexpression könnte durch einen schwächeren Promotor im Expressionsvektor verringert werden. Außerdem könnte weniger Vektor-DNA für die Transfektion der Zellen eingesetzt werden.

4. Zusammenfassung

Die lysosomale Protease Cathepsin Z spielt eine wichtige Rolle beim hydrolytischen Abbau von Proteinen im Lysosom. In Rahmen der vorliegenden Bachelor-Arbeit wurde die Expression, die *N*-Glykosylierung und der intrazelluläre Transport des humanen Cathepsin Z in verschiedenen Zelllinien untersucht. Zunächst wurde ein eukaryotischer Expressionsvektor, der humanes Cathepsin Z kodiert, in *E. coli* amplifiziert. Die Plasmid-DNA wurde aus *E. coli* durch zwei verschiedene Methoden (ohne Kit und mit dem Qiagen-Kit) isoliert und die Qualität und Quantität der isolierten DNA überprüft. Die DNA wurde kommerziell durch die Firma SeqLab sequenziert. Es wurde festgestellt, dass die Präparation ohne Kit eine qualitativ und quantitativ bessere DNA ergab. Außerdem war die Sequenz des Plasmides mit der Referenz-Sequenz aus der NCBI-Datenbank identisch. Die Analyse der endogenen mRNA-Spiegel von Cathepsin Z (CTSZ) in verschiedenen humanen Zelllinien mittels quantitativer Realtime-PCR ergab, dass die CTSZ-Expression in HeLa-Zellen und Fibroblasten ca. 10- bzw. 8-fach höher war im Vergleich zu HEK-Zellen. In BHK- und COS7-Zellen war die CTSZ-Expression geringer als in HEK-Zellen. Die intra- und extrazelluläre Proteinexpression und die *N*-Glykosylierung von überexprimiertem Cathepsin Z wurden durch Westernblot-Analysen untersucht. Cathepsin Z konnte als glykosyliertes Protein in den Zellextrakten nachgewiesen werden. Eine besonders starke Expression konnte in HEK-Zellen beobachtet werden, während sich humane Fibroblasten nicht transfizieren ließen. *In-vitro*-Deglykosylierungen zeigten, dass das überexprimierte Cathepsin Z mannosereiche *N*-Glykane besitzt. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und Co-Staining mit dem lysosomalen Markerprotein LIMP2 konnte gezeigt werden, dass das überexprimierte Cathepsin Z nicht zu den Lysosomen transportiert wird. Ein Großteil des überexprimierten Cathepsin Z wurde in den Extrazellulärraum sezerniert und lag dort als Protein mit komplexen *N*-Glykanen vor.

5. Literaturverzeichnis

- Appenzeller-Herzog C, Nyfeler B, Burkhard P, Santamaria I, Lopez-Otin C, Hauri H P (2005) Carbohydrate- and conformation-dependent cargo capture for ER-exit. *Mol Biol Cell* 16, 1258-1267
- Braulke T & Bonifacino JS (2009) Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* 1793: 605-614
- Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC & Wolf DE (1988) Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 8790-8794
- Cuppoletti J, Aures-Fischer D & Sachs G (1987) The lysosomal H⁺ pump: 8-azido-ATP inhibition and the role of chloride in H⁺ transport. *Biochim Biophys Acta* 899: 276-284
- de Duve C (1983) Lysosomes revisited. *Eur J Biochem* 137: 391-397
- Ghosh P, Dahms NM & Kornfeld S (2003) Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 202-212
- Hasilik A & Neufeld EF (1980) Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Synthesis as precursors of higher molecular weight. *J Biol Chem* 255: 4937-4945
- Klemencic I, Carmona AK, Cezari MH, Juliano MA, Juliano L, Guncar G, Turk D, Krizaj I, Turk V, Turk B (2000) Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. *Eur J Biochem* 267: 5404-5412
- Kollmann K, Pohl S, Marschner K, Encarnaç o M, Sakwa I, Tiede S, Poorthuis BJ, L bke T, M ller-Loennies S, Storch S & Braulke T (2010) Mannose phosphorylation in health and disease. *Eur J Cell Biol* 89: 117-123
- N gler DK, Ménard R (1998) Human cathepsin X: a novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions. *FEBS Lett* 434: 135 - 139
- Pohl S, Marschner K, Storch S & Braulke T (2009) Glycosylation- and phosphorylation-dependent intracellular transport of lysosomal hydrolases. *Biol Chem* 390: 521-527

- Rapoport TA (2008) Protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *FEBS J* 275: 4471-4478
- Santamaria I, Velasco G, Pendás AM, Fueyo A, López-Otín C (1998) Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location. *J Biol Chem* 273, 16816-16823
- Schmittgen TD & Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3: 1101-1108
- Schröder BA, Wrocklage C, Hasilik A & Saftig P (2010) The proteome of lysosomes. *Proteomics* 10: 4053-4076
- Turk B, Turk D, Turk V (2000) Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* 1477: 98-111
- Yan Q & Lennarz WJ (1999) Oligosaccharyltransferase: a complex multisubunit enzyme of the endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun* 266: 684-689

6. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

7. Danksagung

Prof. Dr. rer. nat. Thomas Braulke danke ich für die Bereitstellung des Labors.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Sandra Pohl für die Bereitstellung des Themas, die Strukturierung einer wissenschaftlichen Arbeit, die hervorragende und engagierte Unterstützung, ihre wertvolle Zeit und Ideen bei der Betreuung dieser Arbeit.

Bei Johannes Brand für die gründliche und geduldige Einarbeitung in die Methode der Zellbiologie, Proteinbiochemie, Molekularbiologie, für das Bedienen von Labor-Geräte, die Bereitstellung der Zellen und für viele wertvolle Tipps bedanke ich mich sehr.

Für die Hilfsbereitschaft, das nette Miteinander und die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe ‚Kinderklinik Biochemie‘ von Prof. Dr. Thomas Braulke bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Birger Anspach für die wunderbare Betreuung dieser Arbeit.

Mein spezieller Dank gilt meinem viel zu früh verstorbenen Bruder, der für mich die Rolle von Vater und Mutter übernommen hat, mir immer und immer wieder Mut gegeben hatte als ich im Gymnasium war und nach meinem Abitur mir die Gelegenheit gegeben hatte, mein Studium hier in Deutschland fortsetzen zu können.

Zum Schluss mein herzlicher Dank an meinen Mann Serge, der mich bei allen Entscheidungen unterstützt hat, mir Ratschläge gegeben und mich ständig ermutigt hat, sowie an meinen Sohn Akim und meine Tochter Seraphina, die mir ständig Kraft gegeben haben.