

Aus dem medizinischen Zentrum für Hygiene und medizinische Mikrobiologie
mit Medizinaluntersuchungsamt der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H. D. Klenk
Institut für Zytobiologie und Zytopathologie
Leiter: Prof. Dr. R. Lill

**Proteoglykane und die Verpackung von Exportproteinen:
Interaktion von Serglycin und ZG 16 in den Zymogengranula
des exokrinen Rattenpankreas**

INAUGURAL DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Merle Hillebrand

aus Bochum

Marburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 5.11.2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. H. P. Elsässer

Co-Referent: Prof. Dr. W. Garten

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Biosynthese von reguliert sezernierten Proteinen in polarisierten Zellen	3
1.2. Proteinsortierung im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN)	5
1.3. Die Bedeutung von Proteoglykanen bei der Enzymverpackung und Granulabildung	9
1.4. Die Bildung von Zymogengranula im exokrinen Pankreas der Ratte	14
1.5. Fragestellung der vorliegenden Arbeit	19
2. Methoden	21
2.1. Häufig verwendete Puffer und Medien	21
2.2. Kultur von E. coli	22
2.2.1. Verwendete Bakterienstämme	22
2.2.2. Kompetentmachen von Bakterien	23
2.2.3. chemische Transformation von E. coli	24
2.3. DNA-Analysen	25
2.3.1. Verwendete Plasmide	25
2.3.2. Plasmidisolierung	27
2.3.3. Quantifizierung von Nukleinsäuren	28
2.3.4. Restriktionsverdau	29
2.3.5. Amplifizierung von DNA durch PCR	29
2.3.6. Mutations-PCR	30
2.3.7. Verwendete Oligonukleotid-Primer	32
2.3.8. Gelelektrophoretische Analyse von DNA	33
2.3.9. Isolierung von DNA aus Agarosegelen	34
2.3.10. Klonierung von PCR-Produkten	35
2.3.11. Ligation	36
2.3.12. Sequenzierung und Sequenzanalysen	36
2.4. Proteinexpression in E. coli	37
2.4.1. Expression und Reinigung des Volle-Länge-Serglycin als HisTag-Fusionsprotein	37
2.4.2. Expression und Reinigung von Serglycinmutanten als GST-Fusionsprotein	38
2.4.3. Abspaltung des GST-Anteils vom GST-Fusionsprotein	40
2.5. Gelelektrophoretische Analyse von Proteinen	41
2.5.1. Eindimensionale SDS-PAGE	41

2.5.2. Tricin-SDS-PAGE	42
2.5.3. Metaphorgele (2%)	43
2.6. Detektion gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine	44
2.6.1. Coomassiefärbung	44
2.6.2. Silberfärbung	44
2.6.3. Western Blot	45
2.6.4. Verwendete Antikörper	46
2.6.5. Immunoblot	46
2.7. Proteinbestimmung	47
2.8. Proteinfällungen	49
2.8.1. Glykogenfällung	49
2.8.2. Proteinfällung nach Wessel	49
2.8.3. Blyscan Assay (Fällung von Proteoglykanen)	50
2.9. Behandlung von Proteingemischen mit Chondroitinase ABC	50
2.10. Biotinylierung von Proteinen	51
2.11. Bindungsstudien	51
2.11.1. Co-Immunopräzipitation	51
2.11.2. GST-pull-down	52
2.11.3. Ligandenblot (Far Western)	53
2.11.4. Cross-linking (Quervernetzungsstudien)	55
2.12. Isolierung biotinylierter Proteine mittels Dynal beads	57
2.13. Zellkultur	58
2.13.1. Kultur von AR4-2J-Zellen	58
2.13.2. Präparation von Matrigel	59
2.13.3. Stimulation der AR4-2J-Zellen mit Dexamethason	59
2.14. Zellfraktionierung	60
2.14.1. Isolierung der Zymogengranula aus Rattenpankreas	60
2.14.2. Trennung von ZGI und ZGM	61
2.14.3. Herstellung des ZGM-Extraktes	61
2.14.4. Isolierung von ZG aus AR4-2J-Zellen über Sucrosedichtegradientenzentrifugation	62
2.15. Enzymatische Bestimmungen	63
2.15.1. Bestimmung der Amylase-Aktivität	63
2.15.2. Bestimmung der sauren Phosphatase-Aktivität	64
2.15.3. Bestimmung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität	65
3. Ergebnisse	66

3.1. Identifizierung der Bindedomäne des Serglycin an ZG 16	66
3.1.1. Herstellung der GST-SGC-und GST-SGN-Fusionsproteine	66
3.1.2. GST-SGN interagiert spezifisch mit der ZGM-Fraktion-Komponente ZG 16	69
3.1.3. Enzymatische Abspaltung des GST-Anteils	71
3.1.4. In Cross-link-Experimenten interagiert ZG 16 mit dem SGN-Peptid	73
3.1.5. Auch im Ligandenblot interagiert ZG 16 mit dem SGN-Peptid	75
3.2. Herstellung der SGN-Mutanten Mut-C-13-A, Mut-C-22-A und Del loop, die einen potentiellen intramolekularen loop nicht ausbilden können	77
3.2.1. Die Interaktion von ZG 16 mit Serglycin erfolgt Disulfid-loop unabhängig	81
3.3. Eingrenzung der Bindedomäne am N-Terminus des Serglycin, die für die Interaktion mit ZG 16 verantwortlich ist	84
3.3.1. Klonierung und Expression der beiden Deletionsmutanten Del 14 und Del 22	85
3.3.2. Die ersten 22 Aminosäuren des N-Terminus sind nötig für die Interaktion von Serglycin und ZG 16	87
3.4. Identifizierung der Aminosäuren am N-Terminus von Serglycin, die für die Bindung an ZG 16 verantwortlich sind	88
3.4.1. Herstellung der Mutanten Mut-R-12-A-K-14-A und Del 5	88
3.4.2. 9 Aminosäuren sind für die Bindung an ZG 16 nötig	89
3.5. Versuch der Isolierung von Proteoglykanen aus dem Inhalt der Zymogengranula des exokrinen Rattenpankreas	93
3.5.1. Welche Pufferbedingungen eignen sich am besten zur Proteoglykan- Isolierung mit Blyscan?	93
3.5.2. Verschiedene Ansätze zur Proteoglykan-Isolierung	94
3.5.3. Handelt es sich bei den 5 hochmolekularen Banden um Chondroitinsulfatproteoglykane?	100
3.5.4. Bei den 5 hochmolekularen Proteinen handelt es sich nicht um Proteoglykane	102
3.6. Isolierung von Zymogengranula aus AR4-2J-Zellen	104
4. Diskussion	106
4.1. Identifizierung der Bindedomäne des Serglycin an ZG 16	106
4.2. Isolierung von Proteoglykanen	112
5. Zusammenfassung	115
6. Literaturverzeichnis	117

7. Anhang	133
7.1. Sequenzierergergebnisse	133
7.2. Abkürzungsverzeichnis	136
7.3. Lebenslauf	139
7.4. Akademische Lehrer	140
7.5. Danksagung	141

1. Einleitung

In sekretorischen Zellen neugebildete Substanzen müssen gezielt zu bestimmten Kompartimenten geleitet werden, wo sie entweder ihren Wirkungsort haben oder von wo sie aus der Zelle ausgeschleust werden. Eine zielgerichtete und kontrollierte Abgabe von spezifischen Substanzen (Exozytose) ist für die Funktion der Zelle im Organismus unerlässlich. So werden beispielsweise Hormone, Verdauungsenzyme oder Neurotransmitter in Zellen gebildet und dann sezerniert. Der Mechanismus der Proteinsekretion ist in allen eukaryotischen Organismen hochkonserviert (Bennet und Scheller, 1993) und kann durch zwei bekannte unterschiedliche Mechanismen erfolgen. Ein dritter noch unbekannter Mechanismus wird als alternativer Sekretionsweg bezeichnet. Der eine bekannte Mechanismus ist die konstitutive Sekretion. Sie erfolgt in allen Zellen. Hierbei werden Membranproteine oder Komponenten der extrazellulären Matrix in Transportvesikeln zur Plasmamembran transportiert und dort kontinuierlich ohne bestimmte Signale durch Exozytose aus der Zelle ausgeschleust oder in die Membran eingebaut (Übersicht: Kelly, 1985). Der andere Mechanismus der Sekretion ist die regulierte Sekretion. Sie findet in spezialisierten polarisierten Zellen, wie Drüsen- oder Nervenzellen statt. Hier werden Hormone, Verdauungsenzyme oder Neurotransmitter in Sekretgranula verpackt am apikalen Zellpol gespeichert, bis das Signal zur Exozytose erfolgt.

Die Abbildung 1 gibt einen Überblick über den Proteintransport im sekretorischen Weg. Proteine, die für die Sekretion bestimmt sind, gelangen über das Endoplasmatische Retikulum (ER), den Golgi-Apparat und das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) in sekretorische Vesikel, deren Inhalt durch Exozytose aus der Zelle ausgeschleust wird (Abb. 1, Lodish et al., 2000). Auf ihrem Weg werden die Proteine durch Glykosylierung, Sulfatierung und Hydroxylierung noch modifiziert und von Proteinen, die für andere Kompartimente bestimmt sind, getrennt.

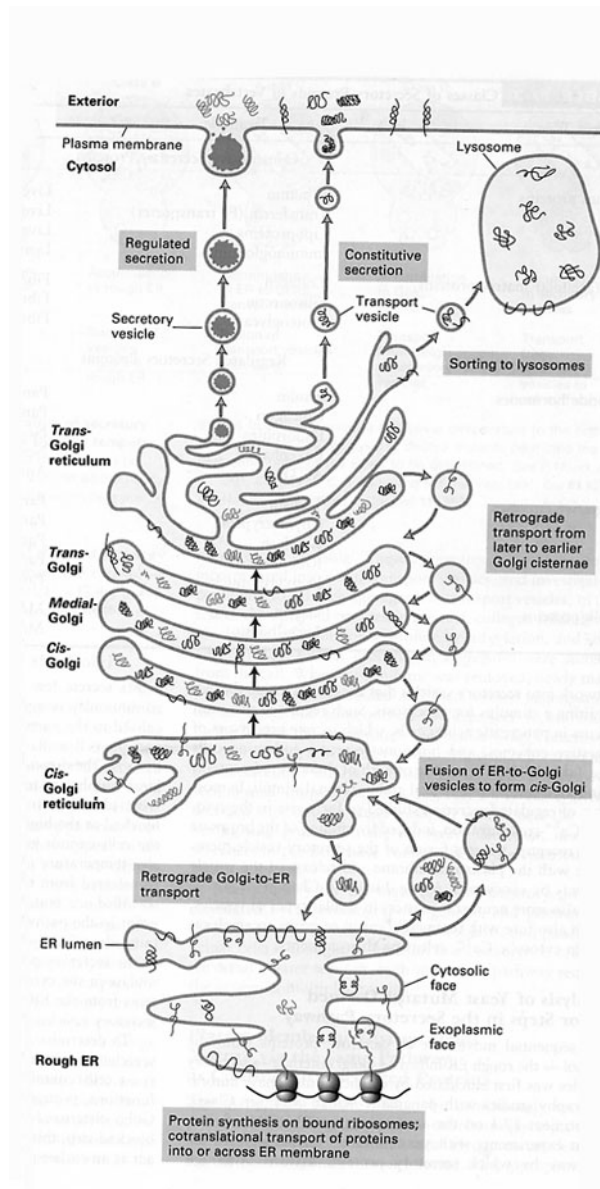


Abb. 1: Überblick über den Proteintransport im sekretorischen Weg

Dargestellt ist der Vesikel-vermittelte Transport von Proteinen vom ER über den Golgi-Apparat und das TGN. Vom TGN aus werden die Proteine entweder über lysosomale Vesikel zu den Lysosomen transportiert oder in sekretorische Vesikel verpackt. Diese können kontinuierlich sezerniert werden oder unter der apikalen Plasmamembran gespeichert werden, bis ein Reiz die regulierte Exozytose auslöst (entnommen aus Lodish et al., 2000).

1.1. Biosynthese von reguliert sezernierten Proteinen in polarisierten Zellen

Proteine, die sezerniert werden sollen, werden neben lysosomalen Proteinen, und Proteinen, die die Plasmamembran durchspannen, an membrangebundenen Ribosomen synthetisiert. In der Regel haben solche Proteine eine N-terminale Signalsequenz von 13-36 zumeist hydrophoben Aminosäuren. Das entstehende Protein wird kotranslational und energieverbrauchend durch eine Pore in der ER-Membran in das ER-Lumen transloziert (Übersicht: Walter und Johnson, 1994; Rapoport et al., 1996). Schon während ihres Durchtritts durch die Pore werden die Proteine durch ER-residente Chaperone gefaltet und modifiziert (Helenius et al., 1992). Zur Reifung des Proteins sind die proteolytische Abspaltung der Signalsequenz, Glykosylierungen, Ausbildung von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken, Hydroxylierung von Lysin- und Prolinresten, Einfügen von Lipiden bei GPI-verankerten Proteinen und die Assoziation von Liganden, wie z.B. Haem und Retinol nötig (Übersicht: Helenius, 2001). Für all diese Prozesse sind verschiedenste Enzyme und Chaperone im ER, wie z.B. Calreticulin, Calnexin und ERp 57 nötig (Gething, 1997), die an der Qualitätskontrolle im ER beteiligt sind (Übersicht: Helenius, 2001; Helenius und Aebi, 2001). Wichtig sind auch die im ER vorkommenden Glukosidasen und Glykosyltransferasen, die die Zuckerbäume an Asparaginreste von zu verzuckernden Proteinen anknüpfen und trimmen (Übersicht: Helenius und Aebi, 2001). Da viele dieser Helferproteine im ER Lektine sind, binden sie bestimmte Zuckermuster, die anzeigen können, dass ein Protein nicht ordnungsgemäß glykosyliert und gefaltet wurde (Übersicht: Braakman, 2001). Solche Proteine, die im ER nicht in die korrekte Form gebracht werden können, werden durch ER-assoziierte Degradation (ERAD) eliminiert, aus dem ER ausgeschleust und zum endgültigen Abbau dem Proteasom zugeführt (Klausner und Sitia, 1990; Plemper und Wolf, 1999). Korrekt modifizierte und gefaltete Proteine verlassen das ER in COP II-Vesikeln von bestimmten Stellen des ER, den sogenannten *exit sites*. Über das ER-Golgi intermediäre Kompartiment (ERGIC) oder die vesikulären-tubulären Cluster (VTCs) gelangen die Proteine schließlich zum Golgi-Apparat.

Der Golgi-Apparat ist eine zentrale Station für alle Proteine, die sezerniert, in Lysosomen gebracht oder an die Zelloberfläche transportiert werden sollen (Farquhar und Palade, 1998; Warren und Malhotra, 1998). Er besteht aus einer Anzahl membranumhüllter Kompartimente mit vielfältiger Enzymausstattung. Diese Kompartimente haben die Form von flachen Zisternen, die zu Stapeln angeordnet sind.

Proteine gelangen über das eine Ende dieses Stapels, Cis-Golgi genannt, in den Golgi und verlassen diesen am anderen Ende, dem Trans-Golgi- Netzwerk (TGN) (Übersicht: Pfeffer, 2001). Die Anzahl der Zisternen eines Golgi-Stapels und ihre Form variieren sehr stark zwischen verschiedenen Spezies und Zelltypen (Pelham, 1998). In sekretorischen Zellen lässt sich der Golgi-Apparat klar in ein Cis-, ein mediales und ein Trans-Kompartiment unterteilen (Mellman und Simons, 1992). Diesen Kompartimenten kann eine feste enzymatische Ausstattung zugeordnet werden, mit deren Hilfe die reifenden Proteine modifiziert werden. So werden im Cis-Golgi-Kompartiment O-glykosidische Bindungen eingeführt und die lysosomalen Hydrolasen phosphoryliert. Im medialen Golgi werden Mannosereste von Zuckerbäumen glykosylierter Proteine entfernt und N-Acetyl-Glucosaminreste angefügt. Im Trans-Golgi-Kompartiment werden Galaktosereste auf Zuckerketten an Proteinen übertragen. Einige Zuckerketten werden durch Sulfotransferasen, die im Golgi-Apparat und auch bereits im ER lokalisiert sind, sulfatiert und anschließend im TGN durch die Anheftung von Sialinsäure modifiziert (Plattner und Hentschel, 1997; Lodish et al., 2000).

Für den Transport der Enzyme und vor allem der Proteine auf dem Weg ihrer Reifung durch den Golgi-Apparat werden nach wie vor verschiedene Modelle diskutiert. Ein Modell ist das sogenannte Reifungsmodell. Hierbei wird angenommen, dass von einer bestimmten Region des ER, dem tER (transitional ER), Vesikel abgeschnürt werden, die nach Abwerfen ihrer Proteinhülle homotypisch fusionieren und das ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment), auch VTCs (vesicular-tubular clusters) genannt, bilden. Wenn dann mehrere dieser ERGICs fusionieren, entsteht eine neue Cis-Zisterne, die im Laufe der Zeit durch Reifung alle Golgi-Stufen bis hin zum Trans-Golgi durchläuft. Das nicht-sekretorische Material (z.B. Golgi-Enzyme) wird dabei retrograd mittels COP I-Vesikeln transportiert, so dass immer ein bestimmter Satz von Golgi-Enzymen in jeder Zisterne vorhanden ist, um die Proteine zu modifizieren (Glick und Malhotra, 1998). Dieses Modell wird durch die Tatsache unterstützt, dass auch Substanzen durch den Golgi-Apparat befördert werden müssen, die für einen Vesikeltransport zu groß sind, wie z.B. Casein-Submicellen in Milchdrüsenzellen oder Apolipoprotein E in Leberzellen (Mironov et al., 1997). Ebenso verhält es sich mit Prokollagen in Fibroblasten (Bonfanti et al., 1998). Auch konnten Martinez-Menarguez et al. 2001 und Mironov et al. 2001 durch Licht- und Elektronenmikroskopie Beweise für das Reifungsmodell liefern, indem sie nachweisen konnten, dass das VSV G (vesicular stomatitis virus membrane glycoprotein) aus Vesikeln ausgeschlossen wird,

während residente Golgi-Enzyme in Vesikeln transportiert werden (Übersicht: Pelham, 2001). Das andere Modell stellt Transportvesikel in den Vordergrund. Es wird hierbei angenommen, dass die Proteinladung anterograd in COP I-Vesikeln von einer Zisterne zur nächsten transportiert wird (Pelham, 1998). Darüber hinaus gibt es auch einen retrograden Transport mittels Vesikeln, in denen Proteine zurücktransportiert werden. Der Vorwärtstransport der Proteine verläuft als *bulk flow*, während stationäre Golgi-Proteine oder ER-residente Proteine im retrograden Vesikeltransport an ihren Bestimmungsort zurückgebracht werden müssen (Pfeffer und Rothman, 1987). Sowohl die Vesikel des anterograden wie auch des retrograden Transports tragen eine COP I-Hülle (Übersicht: Rothman und Wieland, 1996; Glick, 2001). Orci und Mitarbeiter postulieren, dass verschiedene Populationen von COP I-Vesikeln diese Aufgaben übernehmen (Orci et al., 1997). Die zu transportierenden Proteine interagieren wohl teilweise mit Komponenten der COP I-Hülle (Lanoix et al., 2001). Neben Vesikeln wurden auch noch Tubuli beschrieben, die zwischen den einzelnen Golgi-Zisternen ausgebildet werden können und zum Transport von Substanzen dienen. Da es für all diese Modelle Hinweise in vitro und auch in vivo gibt, ist anzunehmen, dass eine Mischung der verschiedenen Modelle zutrifft (Mellman et al., 1992; Bannykh et al., 1997; Glick et al., 1998; Pelham, 2000; Pelham und Rothman, 2000).

1.2. Proteinsortierung im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN)

Nachdem die Proteine den Golgi-Apparat durchlaufen haben und modifiziert wurden, müssen sie nun sortiert und zu ihren Bestimmungsorten (Lysosomen und Plasmamembran) transportiert werden (Übersicht: Griffiths und Simons, 1986). Der genaue Prozess der Proteinsortierung ist noch weitgehend unklar und verläuft nicht für jedes Protein gleich. Derzeit werden zwei Modelle diskutiert: das *sorting-for-entry* und das *sorting-by-retention* Modell (Shennan 1996; Gorr und Moore, 1999; Gorr et al., 2001; Übersicht: Arvan und Castle, 1998). Die *sorting-for-entry* Hypothese besagt, dass reguliert sezernierte Proteine von Sortierungsrezeptoren in die unreifen Sekretgranula sortiert werden. Da aber nicht für jedes sekretorische Protein ein Sortierungsrezeptor zur Verfügung steht, wird davon ausgegangen, dass die zu sezernierenden Proteine untereinander binden/aggregieren und nur einzelne Proteine der Aggregate diese dann an einen Rezeptor binden. Dieses Modell geht davon aus, dass nur reguliert sezernierte

Proteine in die Sekretgranula gelangen. Alle anderen Proteine werden ausgeschlossen, da sie nicht die Fähigkeit haben zu aggregieren.

Der *sorting-by-retention* Hypothese nach gelangen alle Proteine zunächst ohne zu aggregieren in unreife Granula. Erst in den Sekretgranula kommt es dann zur intermolekularen Assoziation der reguliert sezernierten Proteine, die in den Granula verbleiben, während nicht-reguliert sezernierte Proteine aus den Granula entfernt werden. Dies geschieht entweder Rezeptor-vermittelt, wie beispielsweise bei lysosomalen Proteinen oder auf noch unbekannte Weise dadurch, dass von den Sekretgranula Vesikel mit nicht-reguliert sezernierten Proteinen abgeschnürt werden. Hinweise für das *sorting-by-retention* Modell gibt es vor allem aus den β -Zellen des Pankreas, in denen das Proinsulin in unreife Granula gelangt, dort in Insulin und das C-Peptid gespalten wird, und das Insulin erst dadurch die Fähigkeit zur Aggregation erwirbt und somit in den Granula verbleiben kann. Das lösliche C-Peptid wird aus den sekretorischen Granula in konstitutive Vesikel überführt (Arvan und Castle, 1998; Tooze, 1998).

Keines der beiden Modelle kann als alleingültig angesehen werden, da die Proteinsortierung ein sehr komplexer Prozess ist, an dem eine ganze Reihe Ionen, Proteine und Lipide beteiligt sind. Ein konserviertes einheitliches Sortierungssignal wie die KDEL-Sequenz bei ER-residenten Proteinen (Pelham, 1990) oder das Mannose-6-Phosphat bei lysosomalen Proteinen (Hille-Rehfeld, 1995) konnte für die Proteinsortierung der reguliert sezernierten Proteine am TGN nicht gefunden werden. Stattdessen gibt es eine Reihe von Sortiermechanismen, die je nach Zelltyp verwendet werden. In einigen reguliert sekretorischen Proteinen (z.B. bei Chromogranin A und B, sowie bei Pro-Opiomelanocortin) wurden am N-Terminus eine hydrophobe Domäne und ein konservierter Disulfid-*loop* gefunden, die eine Rolle bei der Sortierung spielen (Tam et al., 1993; Cool et al., 1995; Van Horssen et al., 1998; Gerdes und Glombik, 1999; Gorr et al., 1999; Übersicht: Tooze et al., 2001). Proteine können mehrere Sortierungssignale haben, die in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich funktionieren. So ist z.B. der N-terminale Disulfid-*loop* des Chromogranin für die richtige Sortierung in PC12-Zellen nötig (Chanat et al., 1993; Gerdes und Glombik, 1999), jedoch nicht in GH4C1-Zellen. Dort spielt eine C-terminale Domäne am Chromogranin A eine Rolle bei der Sortierung (Cowley et al., 2000; Übersicht: Gorr et al., 2001). Auch die Ca^{2+} -induzierte Aggregation bei leicht saurem pH-Wert trägt zur Sortierung und Verpackung von sekretorischen Proteinen bei (Rindler, 1998). Diese Kondensation wird neben Ca^{2+}

und dem pH-Wert auch durch Proteoglykane gefördert. Dabei scheinen die Glykosaminoglykanseitenketten der Proteoglykane durch elektrostatische Interaktionen ihrer negativ geladenen Sulfatgruppen mit positiv geladenen Proteasen die Verpackung zu erleichtern (Übersicht: Prydz und Dalen, 2000). In Studien mit Knock-out-Mäusen, denen ein essentielles Enzym für die Biosynthese des Glykosaminoglykans Heparin fehlt, konnte gezeigt werden, dass Heparin für die Speicherung von Proteasen in Mastzellgranula wichtig ist (Humphries et al., 1999; Forsberg et al., 1999). Bei einigen Proteinen ist eine proteolytische Prozessierung zur Aggregation und somit zur Sortierung nötig (Shields et al., 1990; Sei et al., 1992). So könnte die proteolytische Prozessierung durch das im Golgi befindliche Furin eine Rolle bei der Sortierung spielen. Für Chromogranin A (Cowley et al., 2000) und verschiedene andere Proteine, wie das egg-laying hormone der Mollusken (Klumpermann et al., 1996) und das Neurotrophin-3 (Farhadi et al., 2000) konnte dies gezeigt werden. Wie bereits erwähnt ist die proteolytische Spaltung auch für das Insulin bei der Sortierung und dem Verbleib in sekretorischen Granula unerlässlich. Reguliert sezernierte Proteine müssen mit der Membran der Granula interagieren, um korrekt sortiert zu werden. Bei vielen sekretorischen Proteinen handelt es sich nicht um klassische Membranproteine, sondern um löslich vorliegende Formen. Dadurch wird die Frage aufgeworfen, wie diese Proteine mit der Granulamembran interagieren. Dafür gibt es diverse Möglichkeiten: die reguliert sekretorischen Proteine interagieren mit anderen Proteinen, die fest mit der Membran assoziiert sind (Pimplikar et al., 1992), mit einem Membranprotein (Cool et al., 1997) oder mit Membranlipiden (Thiele und Huttner, 1998). Pimplikar und Mitarbeiter konnten 1992 zeigen, dass einige sekretorische Proteine (z.B. das Chromogranin B) sowohl in löslicher wie auch in membrangebundener Form existieren. Durch Multimerisierung von löslichen mit membrangebundenen Proteinen können so Aggregate ausgebildet werden, die dann an der Membran verankert sind. Da die Abknospung von Vesikeln eine Deformation der Membran voraussetzt (Burger, 2000), liegt die Vermutung nahe, dass Lipid-Mikrodomänen (*rafts*) beteiligt sind (Thiele und Huttner, 1998). In verschiedenen Arbeiten konnte die Rolle von *rafts* bei der apikalen Sortierung gezeigt werden (Ikonen et al., 1998; Martin-Belmonte et al., 2000; Wang et al., 2000; Übersicht: Tooze et al., 2001). Außerdem wurde in den Granula des exokrinen Pankreas eine submembranöse Matrix gefunden, bestehend aus Glykoproteinen, Proteoglykanen und Lektinen, die mit Lipid-Mikrodomänen assoziiert sind (Schmidt et al., 2000). Auch N- und O-glykosidisch gebundene Oligosaccharide an

Proteinektodomänen werden als Sortierungssignale diskutiert (Benting et al., 1999; Yeaman et al., 1997). Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass nach Inhibition der N- oder O-Glykosylierung apikal lokalisierte Proteine an die basolaterale Plasmamembran transportiert werden (Alfalah et al., 1999). Auch Proteoglykane, die ja schon an der Aggregation von reguliert sezernierten Proteinen beteiligt sein können, scheinen apikale bzw. basolaterale Sortierungssignale zu enthalten. So gelangen Chondroitinsulfat-haltige Proteoglykane hauptsächlich zur apikalen Seite, während Heparansulfat überwiegend zur basolateralen Seite transportiert wird (Kolset et al., 1999; Mertens et al., 1996).

Zur Reifung der Granula müssen schließlich verschiedenste Substanzen entfernt werden, z.B. die Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren und gebundene lysosomale Proteine, Furin und andere Membranproteine. Diese Proteine werden in Clathrin-umhüllten Vesikeln von den reifenden Granula abgeschnürt (Übersicht: Tooze et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass diese Proteine mit bestimmten Adaptor-Protein-Komplexen (AP-Komplexen) auf den Clathrin-Vesikeln kolokalisieren (Klumperman et al., 1998). Von diesen AP-Komplexen wurden bislang 4 verschiedene beschrieben, die jeweils verschiedene Proteine binden können (Übersicht: Robinson und Bonifacino, 2001). Ähnliche Funktion haben die GGAs (Golgi-associated γ -adaptin homologous ARF-interacting protein) (Puertollano et al., 2001). Über Interaktion mit solchen Protein-Komplexen auf Clathrin-umhüllten Vesikeln erfolgt die Aussortierung nicht-sekretorischer Proteine aus reifenden Sekretgranula, so dass letztendlich reife Granula entstehen, die lediglich das zu sezernierende Material enthalten.

Die Proteinsortierung am TGN ist ein sehr komplexer und komplizierter Prozess, an dem viele verschiedene Helferproteine und Mechanismen beteiligt sind, die auch je nach Zelltyp unterschiedlich wichtig sind.

1.3. Die Bedeutung von Proteoglykanen bei der Enzymverpackung und Granulabildung

Proteoglykane kommen in allen Säugerzellarten vor. Sie bestehen per Definition aus einer oder mehreren sulfatierten Polysaccharid-Ketten, den sogenannten Glykosaminoglykanen (GAGs), die kovalent an das *core*-Protein gebunden sind (Kolset und Gallagher, 1990) und eine immense Größe erreichen können. Die Polysaccharid-

Ketten, die bis zu 400 Saccharide tragen können, sind nur an den Enden verzweigt (Ernst et al., 1995; Übersicht: Savolainen, 1999). Die Größe der *core*-Proteine variiert von 10kDa bis mehr als 500kDa und die Anzahl der gebundenen GAG-Ketten variiert von einer bis zu mehr als 100 (Übersicht: Poole, 1986; Prydz und Dalen, 2000).

Es gibt vier Hauptklassen von Proteoglykanen, die durch die sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten definiert werden. Diese bestehen, mit Keratan-Sulfat als einzige Ausnahme, aus einem Aminozucker und einer Uronsäure. So gibt es das Chondroitinsulfat und Dermatan-sulfat, bestehend aus Galaktosamin-(β 1,4)-Iduronsäure, das Heparin und Heparansulfat, bestehend aus Glukosamin-(α 1,4)-Iduronsäure, das Keratansulfat, bestehend aus Glukosamin-(β 1,3)-Galaktose und die Hyaluronsäure, bestehend aus Glukosamin-(β 1,4)-Glukuronsäure (Kolset und Gallagher, 1990; Übersicht: Savolainen, 1999). Die Sulfatgruppen verleihen den Zuckern eine negative Ladung und ermöglichen dadurch elektrostatische Wechselwirkungen mit anderen Proteinen. Neben den GAGs treten aber auch die *core*-Proteine der Proteoglykane mit anderen Proteinen in Interaktion (Kjellen und Lindahl, 1991). Daher können Proteoglykane vielfältige Funktionen übernehmen.

Die Biosynthese der Proteoglykane beginnt im Golgi-Apparat. Die Substrate, die für die GAG-Synthese benötigt werden (Monosaccharide und Sulfat) werden unter Nukleotidverbrauch im Zytosol aktiviert, was in UDP-Zuckern und PAPS (3'-Phosphoadenosin 5'-Phosphosulfat) resultiert. Diese aktivierten Bausteine werden durch spezifische Transporter ins ER- und Golgi-Lumen gebracht (Hirschberg und Snider, 1987; Hirschberg et al., 1998). Zunächst muss im Golgi-Apparat ein Linker-Tetrasaccharid an einen oder mehrere Serinreste des *core*-Proteins enzymatisch angeknüpft werden. Die Konsensussequenz des Proteins dafür ist A-Ser-Gly-X-Gly, wobei A eine saure Aminosäure sein muss und X eine beliebige Aminosäure sein kann (Bourdon et al., 1987; Kolset und Gallagher, 1990). In der Reihenfolge Xylose, Galaktose, Galaktose und Glukuronsäure werden die Zucker durch spezifische Transferasen des Golgi-Apparates addiert. Nach Fertigstellung des Linker-Tetrasaccharids entscheidet die Anlagerung des 5. Zuckers, welches Glykosaminoglykan entsteht (Prydz und Dalen, 2000). Durch weitere enzymatische Einwirkungen kommt es zu Modifikationen an den Zuckern, wie Deacetylierungen, Isomerisierungen und Sulfatierungen, so dass ihre Diversität ansteigt. Die Zuckeraddition wird bis ins TGN weitergeführt oder findet ausschließlich dort statt, wie für Chondroitinsulfat-Proteoglykane postuliert wird. Welche Mechanismen für die

Festlegung der Länge der GAG-Ketten der einzelnen Proteoglykane verantwortlich sind, ist noch völlig ungeklärt. Sie können bei ein und demselben Proteoglykan je nach Zelltyp unterschiedlich lang sein (Prydz und Dalen, 2000). Auch die GAG-Art variiert sogar innerhalb eines Zelltyps. So ist das Serglycin-*core*-Protein in Bindegewebsmastzellen vor allem mit Heparin verzuckert, die Zellen sind aber auch in der Lage, Chondroitinsulfat zu synthetisieren. Hingegen weisen muköse Mastzellen ausschließlich Chondroitinsulfat als Zuckerkomponente auf (Kresse et al., 1993).

Sehr vielfältig sind auch die bisher bekannten Funktionen von Proteoglykanen: Sie reichen von der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der extrazellulären Matrix, über Zell-Adhäsion, Proliferation und Mobilität der Zelle bis hin zur Aggregation von Proteinen in sekretorischen Granula (Kjellen und Lindahl, 1991).

Bei Letzterem spielt das Proteoglykan Serglycin eine wichtige Rolle. Die Serglycin-mRNA der Ratte kodiert für ein ca. 19kDa großes *core*-Protein, das in der Mitte eine 49 Aminosäuren lange Sequenz aus alternierenden Serin- und Glycinresten trägt. Durch starke Modifikationen der Serinreste (teilweise mehr als 50%) mit Glykosaminoglykanen, meist Chondroitinsulfat, kann das Molekulargewicht in nativer Form auf 150-1000kDa ansteigen, abhängig vom Grad der Glykosylierung und der Länge der GAGs, was Zelltyp-spezifisch stark variieren kann (Kresse et al., 1993). Die N- und C-terminalen Enden des Proteins bleiben unverzuckert. Die ersten 26 N-terminalen Aminosäuren bilden das Signalpeptid, das allen Angaben nach bei Eintritt in den sekretorischen Weg abgespalten wird und somit am reifen Protein fehlt.

*MRQVPVGTRLVLALAFVLVWGSSVQGY***PARRARYQWVRCKPDGIFANCIE**
EKGPRFDLIAEESNVGPPMTDPVLMRGFPNDFFPISDDYSGSGSGSGSGS
SGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSL**ADMEWEYQPTD**
ENNIVYFNYGPFDRMLTEQNQE QPGDFII

Aminosäure-Sequenz des Serglycin. Das Signalpeptid ist kursiv dargestellt, die unverzuckerten N- und C-terminalen Abschnitte sind fett gedruckt.

Erstmals wurde das Serglycin 1985 in einer Ratten-Dottersack-Tumorlinie (L2-Zellen) gefunden (Bourdon et al., 1985). Seitdem wurde es in den sekretorischen Granula von Mastzellen, Makrophagen, zytotoxischen T-Zellen, Thrombozyten, natürlichen Killerzellen, Neutrophilen Granulozyten (Kresse et al., 1993; Gullberg et al., 1997), humanen Endothelzellen (Kulseth et al., 1999; Schick et al., 2001) und Azinuszellen des exokrinen Rattenpankreas (Biederbick et al., 2003) beschrieben.

Durch die starke Glykosylierung sind einige Proteoglykane, wie auch das Serglycin, Protease-resistent (Nicodemus et al., 1990). Daher können sie unbeschadet Komplexe mit aktiven Proteasen bilden und diese dadurch zur Speicherung in sekretorischen Granula binden. Dies konnte für das Heparin-tragende Serglycin in Mastzellen gezeigt werden. Hier interagiert das Serglycin in den sekretorischen Granula mit der Mastzellprotease 7 (MCP-7). In einem 3-dimensionalen Modell der MCP-7 wurde an der Oberfläche des gefalteten Proteins ein Bereich gefunden, der bei leicht saurem pH-Wert, wie er in den sekretorischen Granula herrscht, ein starkes positives Potential aufweist, worüber die Interaktion mit dem negativ geladenen Heparin-Serglycin stattfindet. Durch Mutagenese einzelner Aminosäuren der MCP-7 konnte herausgefunden werden, dass einige Histidine für die elektrostatische Interaktion mit dem Proteoglykan verantwortlich sind. Nach Exozytose gelangt dieser Enzym-Proteoglykan-Komplex in ein neutrales bis leicht basisches Milieu, in dem es zur Dissoziation der MCP-7 vom Heparin kommt (Matsumoto et al., 1995). Auch für die Mastzellprocarboxypeptidase A konnte gezeigt werden, dass sie positiv geladene Bereiche aufweist, über die sie in den sekretorischen Granula der Mastzellen mit dem dort vorkommenden negativ geladenen Heparin-Serglycin interagiert (Springman et al., 1995). In Experimenten mit Mastzellen aus dem Knochenmark von Mäusen mit einem Gendefekt der N-Deacetylase/N-Sulfotransferase-2 (NDST-2), einem Enzym, das für die Sulfatierung von Heparin zuständig ist, konnte gezeigt werden, dass nur eine geringe Menge an Mastzellchymasen und Exopeptidasen in den Granula gespeichert wurde. Verglichen mit Mastzellen aus Wildtyp-Mäusen war das Heparin um 75% geringer sulfatiert. Korrekt sulfatiertes Heparin ist nötig für die Speicherung von Enzymen in den sekretorischen Granula der Mastzellen (Humphries et al., 1999). Auch Forsberg und Mitarbeiter kamen bei Untersuchungen dieser NDST-2-gendefekten Mäuse zu dem Schluss, dass sulfatiertes Heparin-Serglycin an der Speicherung von sekretorischen Enzymen in den Granula nötig ist (Forsberg et al., 1999). Des Weiteren konnte in den Mastzellen dieser Mäuse das Fehlen der Carboxypeptidase A-Aktivität

festgestellt werden. Es wurde lediglich die inaktive proteolytisch noch nicht gespaltene Form des Enzyms detektiert. In diesem Fall kommt dem Heparin-Proteoglykan entweder eine Funktion bei der Prozessierung oder bei der Speicherung ausschließlich der prozessierten Form der Carboxypeptidase in den Sekretgranula der Mastzellen zu (Henningsson et al., 2002).

Außer in Bindegewebsmastzellen, in denen das Serglycin mit Heparin modifiziert ist, liegt das Serglycin mit Chondroitinsulfat verzuckert vor. In den Granula der zytotoxischen Zellen dient es als Gerüst für die Verpackung der positiv geladenen Granzyme, welche, ähnlich wie Mastzellproteasen, mit negativ geladenen Proteoglykanen assoziieren. Im Gegensatz zur Mastzellprotease 7 konnte gezeigt werden, dass das Granzym B nach der Exozytose fest an das Chondroitinsulfat-Serglycin gebunden bleibt und nicht durch pH-Änderung abdissoziiert (Galvin et al., 1999). Dass das Granzym B eine sehr hohe Affinität zum Chondroitinsulfat-Serglycin aufweist, konnten Raja und Mitarbeiter durch *surface plasmon resonance*-Analysen (SPR) zeigen. Sowohl unter leicht sauren wie auch unter neutralen Bedingungen bindet das Enzym an das Proteoglykan. In vitro zeigten sie, dass das Serglycin unter sauren Bedingungen bis zu 50 Granzym B-Moleküle binden kann, unter neutralen Bedingungen ca. 30 Moleküle. Solche extremen Werte ließen sich in vivo allerdings nicht bestätigen. Hier stellten sich zwei Formen heraus, eine niedermolekulare Form, die der Größe nach vergleichbar einem Serglycinmolekül komplexiert mit bis zu 8 Granzym B-Molekülen ist. Die zweite Form stellt eine höhermolekulare Struktur dar, die der Größe nach mit einem Serglycinmolekül komplexiert mit ca. 32 Granzym B-Molekülen vergleichbar ist (Raja et al., 2002).

Auch von Lysosomen ist bekannt, dass sie Chondroitinsulfat-Proteoglykane enthalten, und dass diese eine wichtige Funktion beim Transport von Lysozym in die Lysosomen haben. Die Interaktion des Lysozyms mit dem Proteoglykan, sehr wahrscheinlich Serglycin, erfolgt über das negativ geladene Chondroitinsulfat. Wurde die Sulfatierung des Proteoglykans durch Chlorat-Zugabe inhibiert, ist der Transport des Lysozyms in die Lysosomen stark beeinträchtigt. Das Lysozym weist, ähnlich wie die Mastzellproteasen, eine Reihe positiver Ladungen auf, über die eine Interaktion mit den negativen GAGs stattfinden kann (Lemansky und Hasilik, 2000).

Studien von Venkatesh und Gorr beschreiben, dass ein sulfatiertes Proteoglykan für die Speicherung von reguliert sekretorischen Proteinen in der Parotis der Ratte nötig ist, da es den pH-Wert innerhalb der Granula moduliert. Die Sulfatierung des Proteoglykans ist

nicht notwendig für die Speicherung der sekretorischen Proteine in den Granula. Dies konnte durch Chloratbehandlung gezeigt werden, die die Sulfatierung des Proteoglykans inhibiert. Wird jedoch eine Inkubation mit einem Inhibitor der Proteoglykansynthese (pNPX) durchgeführt, ist eine verminderte Speicherung der sekretorischen Proteine feststellbar. Dieser Effekt konnte aber durch Zugabe einer leichten Säure aufgehoben werden. Durch die Ansäuerung kam es wieder zur Speicherung sekretorischer Proteine in den Granula. In diesem Falle fungiert das Chondroitinsulfat-Proteoglykan als Puffersubstanz, die Einfluss auf den intragranulären pH-Wert nimmt (Venkatesh und Gorr, 2002).

Eine andere Art der Interaktion mit einem Chondroitinsulfat-Proteoglykan wurde für die Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) in den Granula der Makrophagen-Zelllinie TPH-1 beschrieben. Hier erfolgt die Bindung der Protease an das Proteoglykan nicht über ionische Wechselwirkungen, sondern über eine kovalente Verknüpfung der MMP-9 mittels Disulfidbrücke an das *core*-Protein des Proteoglykans. Dies wurde herausgefunden, indem MMP-9-Chondroitinsulfat-Proteoglykan-Komplexe entweder vor oder nach der Auftrennung im SDS-PAGE mit DTT behandelt wurden. Wurde vor dem SDS-PAGE DTT zugegeben, war im Western-Blot ein Signal in Höhe der monomeren MMP-9 bei 92kDa zu detektieren. Wurde hingegen das Gel erst nach SDS-PAGE mit DTT behandelt, so war das MMP-9-Signal im anschließenden Western-Blot bei ca. 300kDa detektierbar, was in etwa der Größe des Proteoglykans plus MMP-9 entspricht (Winberg et al., 2000).

Neben funktionellen Nachweisen über die Notwendigkeit von Proteoglykanen bei der Speicherung von Proteinen, konnten Proteoglykane in Granula elektronenmikroskopisch dargestellt werden. Mit Hilfe der Cupromeronic Blue[®]-Färbemethode, die spezifisch Proteoglykane anfärbt, konnte in aktivierten murinen Natürlichen Killerzellen ein intragranuläres Maschenwerk nachgewiesen werden, in das die Inhaltsenzyme der Granula wie z.B. Perforin oder andere Serinesterasen eingebettet sind (Unger et al., 1997). Auch in den Granula der Azinuszellen des Rattenpankreas wurde ein Maschenwerk aus Proteoglykanen und Glykoproteinen, die sogenannte submembranöse Matrix gefunden, an die Zymogenaggregate binden, und die an der Granulabildung beteiligt zu sein scheint (Schmidt et al., 2000).

Außer mit den bereits beschriebenen Proteinen interagiert Serglycin noch mit Makrophagen Inflammatorischem Protein-1 α , Plättchenfaktor 4 (Kolset et al., 1996),

mit dem Zelloberflächenprotein CD44 (Toyama-Sorimachi et al., 1995) und Komponenten der extrazellulären Matrix (Schick et al., 1997).

1.4. Die Bildung von Zymogengranula im exokrinen Pankreas der Ratte

Das exokrine Pankreas ist eine tubulo-azinöse Drüse, die den Verdauungssaft produziert. In diesem sind 15-20 Verdauungsenzyme, die Zymogene und ihre Isoformen enthalten. Aufgrund ihrer Substratspezifität lassen sie sich in 4 Gruppen einteilen: Proteasen, Lipasen, Glukosidasen und Nukleasen, mit Molekulargewichten zwischen 13-110kDa. Durch einen neuronalen (Acetylcholin) oder hormonellen (Cholecystokinin) Reiz, der jeweils intrazellulär zur Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen führt (Gardner und Jensen, 1981; Übersicht: Thevenod, 2002), wird an der apikalen Plasmamembran die Exozytose des Zymogengranuluminhalts in das Azinulumen induziert.

Im TGN erfolgt die Trennung der reguliert sezernierten Zymogene von den konstitutiv sezernierten Proteinen. Die Granulabildung in den Azinuszellen des Rattenpankreas beginnt mit der Bildung von kondensierenden Vakuolen am TGN, die ein saures Milieu haben. Dartsch und Mitarbeiter konnten elektronenmikroskopisch zeigen, dass diese Vakuolen nach Abknospung vom TGN größer sind als reife Zymogengranula, und dass sie ein flockiges Material enthalten. Während ihrer Reifung kondensiert der Inhalt der Granula weiter, so dass er elektronendichter wird und die Granula ihre endgültige Größe erreichen. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Ausbildung der Komplexe ein schrittweiser Prozess ist, bei dem kleinere Partikel mit abnehmendem pH-Wert zu größeren Komplexen aggregieren (Dartsch et al., 1998). Durch einen neu entwickelten Assay, das *condensation-sorting*, konnte die Wichtigkeit des pH-Wertes und der Calcium-Ionen bei der Granulabildung gezeigt werden. Beim *condensation-sorting* handelt es sich um ein in vitro-System, das die Aggregation der Zymogene und deren Bindung an Membrankomponenten der Zymogengranula untersucht. Radioaktiv markierte isolierte Pankreasenzyme aus dem Inhalt der Granula werden mit verschiedenen Mengen Zymogengranulamembranfraktionen (ZGM) gemischt. Dann erfolgt eine Inkubation bei zwei verschiedenen pH-Werten: entweder bei pH 7,5, der die Bedingungen in prä-Golgi-Kompartimenten repräsentiert, oder bei pH 5,9, der das Milieu im TGN widerspiegelt. Durch Zentrifugation können kondensierte Proteine, die

Komplexe ausgebildet haben und mit Membrankomponenten interagieren, sedimentiert werden. Es zeigte sich, dass bei pH 5,9 viel mehr Enzym-gebundene Radioaktivität pelletiert werden konnte als bei pH 7,5. Außerdem war die detektierte Enzym-gebundene Radioaktivität umso größer, je mehr Membranmenge zugegeben wurde. Die Zugabe von 10 mM Ca^{2+} -Ionen zu diesem Assay hatte lediglich bei pH 7,5 eine positive Auswirkung auf die Aggregation der Zymogene. Die Enzym-gebundene Radioaktivität stieg dann um das 2-3-fache an. Mit diesen Experimenten konnten Dartsch und Mitarbeiter 1998 zeigen, dass es durch Ca^{2+} -Ionen und einen sauren pH-Wert zur Ausbildung von Zymogenkomplexen und deren Bindung an die Membran der Granula kommt.

Mittels nativer Agarose-Gelelektrophorese konnten 5 Komplexe aus dem Inhalt der Zymogengranula (ZGI) isoliert werden, die unterschiedliche elektrophoretische Mobilitäten aufweisen. Durch SDS-PAGE-Analysen zeigte sich, dass jeder Komplex eine definierte Enzymausstattung hat: in 4 Komplexen ist Procarboxypeptidase enthalten zusammen mit Trypsinogen in den Komplexen 1 und 2 oder Chymotrypsinogen in den Komplexen 3 und 4. Der Komplex 5 besteht hauptsächlich aus Amylase zusammen mit der basischen Form des Trypsinogens. Neben diesen bekannten Proteinen enthalten alle Komplexe auch noch bislang unidentifizierte Komponenten und weitere Zymogene (Kleene et al., 1999a). Diese Komplexe lagern sich während der Granulabildung zusammen und interagieren mit Komponenten der Zymogengranulamembran. Bislang konnte kein Sortierungsrezeptor gefunden werden, über den die Zymogenaggregate an die Membran der Granula gebunden werden. Die Zymogengranulamembran enthält nur etwa 0,5-1% der Gesamtproteinmenge des Granulums (99% sind sekretorische Enzyme), und 96% des Trockengewichts machen Lipide aus. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, dass eine stöchiometrische 1:1 Ligand-Rezeptor-Interaktion die Bindung der Zymogene an die Membran vermittelt.

Für das mit der Zymogengranulamembran assoziierte sekretorische Lektin ZG 16 (Cronshagen et al., 1994) konnte im *condensation-sorting* Assay gezeigt werden, dass es bei pH 5,9 zusammen mit Zymogenen in der Pelletfraktion angereichert ist. Durch Vorinkubation der Membranfraktion mit einem polyklonalen Antikörper gegen ZG 16 (Cronshagen et al., 1994) kommt es im *condensation-sorting* Assay zur starken Reduzierung der Protein-gebundenen Radioaktivität in der Pelletfraktion bei pH 5,9 (Kleene et al., 1999b). Diese Daten zeigen, dass dem sekretorischen Lektin ZG 16 eine wichtige Rolle bei der Verankerung der Zymogenaggregate an der Membran und somit

ihrer Sortierung in die Granula zukommt. Es fungiert als *linker*-Protein zwischen Membrankomponenten und Bestandteilen der Zymogenkomplexe. Das ZG 16 ist kein fest in der Membran verankertes Protein. Es ist mit der Membran assoziiert und durch Bicarbonatbehandlung (150-300 mM NaHCO₃ pH 11,5) von der Membran ablösbar. Die Membranassoziation findet über ein submembranöses Proteoglykannetzwerk statt, wie es Scheele und Mitarbeiter schon 1994 beschrieben haben. Sie konnten sulfatierte Komponenten als Bestandteile der Zymogengranulamembranfraktion nachweisen. Diese submembranöse Matrix wurde inzwischen näher charakterisiert und auch das ZG 16 wurde als Bestandteil identifiziert. Durch Inkubation von ZGM mit Bicarbonat pH 11,5 konnten einige Komponenten von der Membran abgelöst werden. Wurden diese mit Bicarbonat behandelten Membranen im *condensation-sorting* Assay eingesetzt, war eine verminderte Bindungseffizienz der Zymogenaggregate bei pH 5,9 an diese Membran festzustellen. Es wurden also für die Bindung der Aggregate an die Membran wichtige Komponenten durch die Bicarbonatbehandlung abgelöst.

In der 2D-Gel-Analyse des Bicarbonatextraktes konnten ZG 16, das Membranprotein GP-2, das Serpin ZG 46, Lipase, CEL und einige unbekannte Proteine mit basischem oder saurem pI detektiert werden. Die basischen und sauren Proteine wurden als außergewöhnlich kleine Glykoproteine und Chondroitinsulfat-Proteoglykane identifiziert (Schmidt et al., 2000).

Bei GP-2 handelt es sich um ein über GPI-Anker in der Membran befindliches Glykoprotein (LeBel und Beattie, 1988), das im sauren Milieu Tetramere ausbildet und von dem angenommen wurde, dass es zusammen mit Proteoglykanen in Form einer submembranösen Matrix bei der Granulabildung eine Rolle spielt (Scheele et al., 1994). Allerdings gibt es Hinweise, dass es ohne GP-2 zumindest während der Embryonalentwicklung und frühen postnatalen Phase im Rattenpankreas zur Bildung von Zymogengranula kommt (Dittie und Kern, 1992). Daher kann dem GP-2 nicht alleine eine Schlüsselrolle bei der Bindung der Zymogenaggregate an die Membran und somit bei der Granulabildung zukommen. Als sehr wichtiges Protein dafür hat sich, wie hier bereits beschrieben, das ZG 16 herausgestellt.

Sowohl das ZG 16, wie auch das GP-2 und sulfatierte Proteoglykane sind mit Cholesterol-Glykosphingolipid-angereicherten Mikrodomänen der Membran assoziiert, die aus ZGM isoliert werden können (Schmidt et al., 2001). Diese Glykolipid-Cholesterol-*rafts* bilden bei 4°C Triton X-100-unlösliche Komplexe, DIGs (detergent-insoluble glycolipid-enriched complex), die in Sucrosegradienten zu Bereichen

geringerer Dichte flotieren. Die Analyse isolierter DIGs und damit assoziierter Proteine ergab Cholesterol und Sphingomyelin, sowie Proteoglykane, ZG 16 und GP-2. Durch Inhibition der GPI-Anker-Synthese mittels Mannosamin konnte herausgefunden werden, dass die Proteoglykane der submembranösen Matrix über GP-2 in den *rafts* an die Membran gekoppelt werden. Fehlte der GPI-Anker am GP-2, war die Menge an Proteoglykanen an der Membran stark reduziert (Schmidt et al., 2001).

Für die Bindung der bei saurem pH-Wert ausgebildeten Zymogenaggregate an die Membran ist eine submembranöse Matrix bestehend aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und ZG 16 nötig, die über GP-2 in Cholesterol-Sphingomyelin-*rafts* an die Membran gekoppelt wird. Wie genau die Zymogenaggregate mit der submembranösen Matrix und dabei vor allem mit ZG 16 interagieren, ist noch unklar. Eine Möglichkeit wäre das Vorhandensein einer intragranulären Matrix, an die die Zymogenaggregate assoziiert sind, und die dann an die submembranöse Matrix bindet. Ein möglicher Kandidat dafür konnte bereits gefunden werden. Dabei handelt es sich um das Proteoglykan Serglycin, das im Inhalt der Granula identifiziert werden konnte (Biederbick et al., 2003). Durch die Erzeugung einer Serglycin-Deletionsmutante, der die Anheftungsstellen für die Glykosaminoglykane fehlt, konnte gezeigt werden, dass das Serglycin dann nicht in die Granula transportiert wird, sondern im Golgi-Apparat verbleibt. Auch sekretorische Enzyme wie Amylase oder Procarboxypeptidase gelangten nicht in die Granula. Ähnlich verhielt es sich, wenn die Glykosylierung durch Zugabe von Xylosid inhibiert wurde. Die Glykosylierung des Proteoglykans ist nötig für die korrekte Sortierung des Serglycin und sekretorischer Enzyme in die Granula (Biederbick et al., 2003).

1.5. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

In Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das sekretorische Lektin ZG 16 möglicherweise als *linker*-Protein zwischen aggregierten Zymogenkomplexen und der submembranösen Proteoglykan-Glykoprotein-Matrix der Zymogengranula des exokrinen Rattenpankreas fungiert (Kleene et al., 1999b). Um die Funktion des Lektins ZG 16 genauer zu untersuchen, sollten Bindungspartner des Proteins identifiziert werden. Mittels Cross-link-Experimenten mit einem rekombinanten ZG 16-Fusionsprotein konnte ein Proteoglykan aus dem Inhalt der Zymogengranula (ZGI) isoliert werden. Bei diesem Bindungspartner des ZG 16 handelt es sich um ein mehr als 300kDa großes Molekül, das in Agarosegelen dargestellt werden konnte. Seine Aminosäurezusammensetzung deutete auf das Proteoglykan Serglycin hin (Diplomarbeit A. Licht, 2000; Biederbick et al., 2003). Das core-Protein von Serglycin konnte aus einer Rattenpankreas-cDNA-Bibliothek kloniert werden. Durch RT-PCR wurde bestätigt, dass das Serglycin auch in AR4-2J-Zellen, einer Rattenpankreas-Azinuszelllinie, exprimiert wird. Durch Immunfluoreszenzstudien und Elektronenmikroskopie war das Serglycin in den Zymogengranula der Azinuszellen des Rattenpankreas nachweisbar. Auch konnte ihm eine mögliche Funktion bei der Sortierung von Zymogenen zugewiesen werden (Biederbick et al., 2003). Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe deuteten darauf hin, dass die Interaktion des Lektins ZG 16 mit dem Proteoglykan Serglycin durch zuckerunabhängige Protein-Protein-Wechselwirkungen zustande kommt. Nun sollte in dieser Arbeit die Interaktion zwischen ZG 16 und Serglycin näher analysiert werden, um Anhaltspunkte für die Sortierung der Zymogene und deren Anheftung an die Membran der Granula zu erhalten. Dafür wurden Mutanten des Serglycin-*core*-Proteins hergestellt und auf ihre Bindung an ZG 16 untersucht.

Außerdem sollten mögliche weitere Proteoglykane aus dem Inhalt der Zymogengranula (ZGI) isoliert und identifiziert werden. Da Katja Schmidt aus unserer Arbeitsgruppe kleine Proteoglykane als Bestandteile der submembranösen Matrix beschreibt (Schmidt et al., 2000), sollte untersucht werden, ob im Inhalt ebenfalls verschiedene Proteoglykane zu finden sind, die möglicherweise eine intragranuläre Matrix ausbilden, an der die Zymogenaggregate assoziiert sind und so sortiert werden. Hierfür wurde ZGI auf unterschiedliche Weise vorbehandelt und es wurde versucht, Proteoglykane zu fällen und in verschiedenen Gelsystemen darzustellen.

Alternativ sollte versucht werden, aus AR4-2J-Zellen die Zymogengranula mittels Sucrosedichtegradientenzentrifugation zu isolieren, um dann Proteoglykane radioaktiv zu markieren und aus dem gewonnenen ZGI ebenfalls zu isolieren.

2. Methoden

2.1. Häufig verwendete Puffer und Medien

Alle verwendeten Lösungen wurden mit sterilem entionisiertem Wasser aus der Reinstwasseranlage (H₂O-Reinstwasser-System Clear, SG, Barsbüttel) angesetzt.

PBS (phosphate buffered saline)	140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM K ₂ HPO ₄ pH 7,25
PBST	PBS + 0,05% v/v Tween-20
TBS (Tris buffered saline)	20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl
TBST	TBS + 0,05% v/v Tween-20
TE	10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA
50x TAE-Puffer	2 M Tris-HCl, 5,7% v/v Eisessig, 50 mM EDTA pH 8,0
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-Base, 190 mM Glycin, 0,1% w/v SDS
TSDS-Laufpuffer	0,1 M Tris-Base, 0,1 M Tricin, 0,1% SDS
TSDS-Gelpuffer	3 M Tris-HCl, 0,3% SDS pH 8,5
4x SDS-Probenpuffer (Laemmli)	160 mM Tris-HCl pH 6,8, 140 mM SDS, 20% v/v Glycerin, 1 Spatelspitze Bromphenolblau, 40 mg/ml DTT
DNA-/RNA-Probenpuffer	0,4% w/v Bromphenolblau oder Xylencyanol, 50% v/v Glycerin, 1 mM EDTA pH 8,0

LB-Medium	1% w/v Bacto-Trypton, 0,5% w/v Bacto-yeast-extract, 1% w/v NaCl
LB-Platten	LB-Medium + 1,5% w/v Bacto-Agar (Difco, Detroit/USA) + 100 µg/ml Ampicillin (Boehringer Mannheim, Mannheim) oder + 25 µg/ml Chloramphenicol (Serva, Heidelberg)
Semidry Blotpuffer	48 mM Tris-HCl, 39 mM Glycin, 0,04% w/v SDS, 20% v/v Methanol

2.2. Kultur von E. coli

2.2.1. Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Firma	Bemerkung
INV α F ⁺	F ⁺ endA1recA1hsdR17(r _k ⁻ ,m _k ⁺)supE44thi-1gyrA96relA1 ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U196 λ ⁻	Invitrogen, Groningen /NL	wurden zur Vermehrung von PCR-Produkten im Vektor pCR2.1 verwendet
XL1-blue superkompetent	recA1endA1gyrA96thi-1hsdR17supE44relA1lac[F ⁺ proABlacI ^q Z Δ M15Tn10(Tet ^r)]	Stratagene, La Jolla/USA	hoch transformierbarer Stamm, bes. geeignet zur Plasmid-Präparation im quantitativen Maßstab
M15	pREP4	Qiagen, Hilden	Stamm bes. geeignet zur Expression von His-tag-Fusionsproteinen kloniert in pQE-Vektoren

BL21	E. coli BF- dcm ompT hsdS($r_B^- m_B^-$) gal(DE3)[pLysS Cam ^r]	Stratagene, La Jolla/USA	Stamm bes. geeignet zur Proteinexpression in großer Menge
------	--	--------------------------------	---

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme

2.2.2. Kompetentmachen von Bakterien

Um Bakterien für die Aufnahme von DNA durch chemische Transformation kompetent zu machen, werden sie zuvor mit unterschiedlichen Puffern behandelt, die die Eigenschaften der Bakterienmembran so beeinflussen, dass die DNA durch die Membran hindurch ins Bakterium aufgenommen werden kann.

a) bei BL-21-Zellen

Von einer frischen Agarplatte mit BL-21-Zellen, die über Nacht bei 37°C mit 250 UpM in einem Brutschrank (Memmert, Schwabach) inkubiert wurde, wurde eine Kolonie gepickt und in 100 µl eiskaltes 50 mM CaCl₂ gegeben. Die so kompetent gemachten Bakterien konnten dann für die chemische Transformation verwendet werden.

b) bei M15-Zellen

Ein Klon M15-Zellen wurde in 3 ml LB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin (Sigma, Deisenhofen) gegeben und über Nacht bei 37°C und 250 UpM im Schüttelinkubator für Bakterienkultur (Modell G25, New Brunswick Scientific Corporation Inc., Edison/USA) inkubiert. Am nächsten Tag wurde diese Kultur in 100 ml LB-Medium ebenfalls mit 25 µg/ml Kanamycin überführt und bis zu einer optischen Dichte von etwa 0,5 (gemessen bei 600 nm in dem Spektralphotometer Cadas 100, Dr. Lange, Düsseldorf) bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension mit 4000xg 5 Min. in einer Kühlzentrifuge (J2-21, Beckmann, München) bei 4°C mit dem Rotor JA-14 zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation entfernt und das Bakterienpellet in 30 ml/100 ml Kultur TFB 1-Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 15% v/v Glycerol, pH 5,8 steril filtriert) resuspendiert, für 90 Min. auf Eis inkubiert und anschließend für 5 Min. mit 4000xg bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder entfernt und die pelletierten Bakterien nun in 4 ml/100 ml Ausgangskultur eiskaltem TFB 2-Puffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% v/v Glycerol, pH 8,0 mit KOH

einstellen und steril filtrieren) aufgenommen. Die so kompetent gemachten M15-Zellen wurden dann zu je 500 µl aliquotiert, kurz in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.3. Chemische Transformation von E.coli

Bei der chemischen Transformation wird das Bakterien-DNA-Gemisch zunächst auf Eis inkubiert, was zur Anlagerung der DNA an die kompetenten Bakterien führt. Durch einen anschließenden Hitzeschock wird die DNA dann von den Bakterien aufgenommen.

a) bei M15-Zellen

70 µl chemisch kompetente M15-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1-2 µl DNA (ca. 500ng) leicht gemischt. Die Bakterien wurden zur Anlagerung der zugegebenen DNA 40 Min. auf Eis belassen. Danach wurde die Probe 45'' bei 42°C im Wasserbad (Memmert, Schwabach) inkubiert, mit 450 µl Psi-broth (LB-Medium mit 4 mM MgSO₄ und 10 mM KCl, steril filtriert) versetzt und 1h bei 37°C und 250 UpM geschüttelt. Von diesem Transformationsansatz wurden 100-150 µl auf eine Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank (Memmert, Schwabach) inkubiert.

b) bei XL1-blue-Zellen

20 µl superkompetente XL1-blue-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1,5 µl DNA für 40 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurde für 45'' ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad (Memmert, Schwabach) durchgeführt, die Bakterien wieder auf Eis gestellt und 180 µl steriles SOC-Medium (2% w/v Bacto-Trypton, 0,5% w/v Bacto-yeast-extract, 0,05% w/v NaCl, 25 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glukose, pH 7,6 mit KOH eingestellt) zugegeben. Die Zellen wurden dann 1h bei 37°C im Schüttelinkubator bei 250 UpM inkubiert (Modell G25, New Brunswick Scientific Corporation Inc., Edison/USA). 100-150 µl davon wurden auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Bakterienbrutschrank (Memmert, Schwabach) inkubiert.

c) bei BL-21-Zellen

Zu den zuvor kompetent gemachten Bakterien (s. 2.2.2) wurden 0,5 µg Plasmid-DNA gegeben und nach leichtem Mischen 15 Min. auf Eis gestellt. Es erfolgte ein Hitzeschock

für 45` bei 42°C im Wasserbad (Memmert, Schwabach) worauf dann 500 µl LB-Medium zugegeben wurden. Danach erfolgte eine Inkubation für 1h bei 37°C im Schüttler bei 250 UpM (Modell G25 New Brunswick Scientific Corporation Inc., Edison/USA). Anschließend wurden 200-250 µl auf Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert, die über Nacht bei 37°C im Bakterienbrutschrank (Memmert, Schwabach) inkubiert wurden.

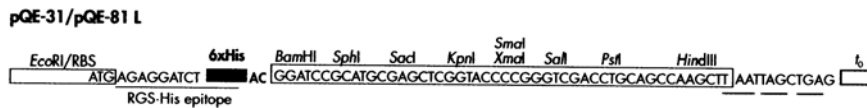
d) bei INVαF`-Zellen

50 µl kompetente INVαF`-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Vor der 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol und 2 µl DNA (Ligationsansatz, s. 2.3.10) hinzugegeben und vorsichtig mit der Pipettenspitze umgerührt. Dann erfolgte ein Temperaturwechsel nach 42°C für 30` im Wasserbad (Memmert, Schwabach), wonach 250 µl steriles SOC-Medium zugefügt wurden, bevor die Bakterien für 1 Stunde bei 37°C und 250 UpM inkubiert wurden. Vom Transformationsansatz wurden anschließend 50-150 µl auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank (Memmert, Schwabach) inkubiert.

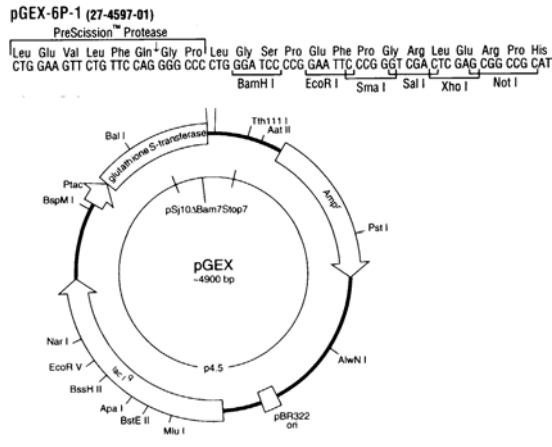
2.3. DNA-Analysen

2.3.1. Verwendete Plasmide

a) pQE-31



b) pGEX-6P-1



c) pCR2.1

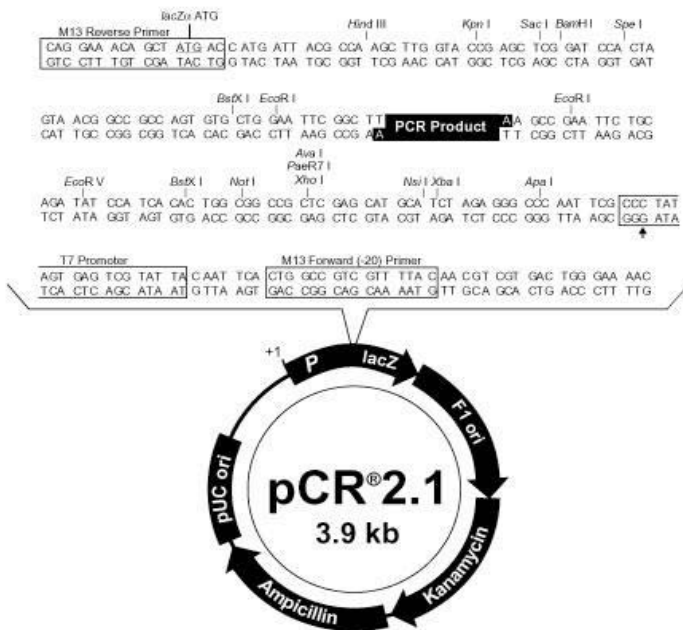


Abb. 2: Plasmidkarten der prokaryotischen Expressionsvektoren pQE 31 (Qiagen, Hilden) (a), pGEX-6P-1 (apbiotech, Freiburg) (b) und pCR2.1 (Invitrogen, Groningen/NL) (c)

2.3.2. Plasmidisolierung

a) in analytischem Maßstab (Minipräp)

Es wurde die „ultra-fast alkaline lysis plasmid extraction“-Methode (modifiziert nach Cormack, R.S. und Somssich, I.E., 1997) angewandt, um die DNA mehrerer Klone gleichzeitig zu untersuchen.

Pro Ansatz wurden 2 ml LB-Medium plus Antibiotikum mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 UpM inkubiert. Von dieser Bakteriensuspension wurden dann 300 µl entnommen, mit 300 µl Lysispuffer (0,2 N NaOH, 1% SDS) versetzt und 5 Min. bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Neutralisierungspuffer (3 M K-Acetat pH 5,5) und erneuter 5 minütiger Inkubation bei RT wurden Zelltrümmer und chromosomale DNA für 5 Min. bei 14000xg in einer Tischzentrifuge (Biofuge, Heraeus, Osterode) abzentrifugiert. Von dem entstandenen Überstand wurden 800 µl entnommen und mit 600 µl Isopropanol versetzt, was zur Fällung der Plasmid-DNA führt. Die DNA wurde durch einen 5 minütigen Zentrifugationsschritt bei 14000xg pelletiert, mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und durch Zentrifugation bei 14000xg erneut pelletiert. Danach wurde die DNA kurz bei RT getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert (meist in 12 µl). Zum Abbau der RNA wurde dem TE-Puffer 1:100 einer 10 mg/ml-Stocklösung RNase A (Calbiochem, La Jolla/USA) zugesetzt. Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde anschließend im Agarosegel (s. 2.3.8) analysiert.

b) in präparativem Maßstab (Maxipräp)

Diese Methode diente der Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA, die z.B. zur Sequenzierung verwendet wurde. Es wurde das Jetstar Plasmid Purification System von GENOMED, Bad Oeynhausen, verwendet. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte unter alkalischen Bedingungen. Die DNA wurde dann an ein Anionen-Austauscher-Material gebunden. Nach Waschen und Elution der DNA wurde diese schließlich mittels Alkohol-Präzipitation ankonzentriert.

200 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit 1 ml einer zuvor angesetzten ÜN-Kultur oder einem Klon angeimpft und im Bakterienschüttler (Modell G25, New Brunswick Scientific Corporation Inc., Edison/USA) bei 37°C und 250 UpM über Nacht inkubiert. Durch Zentrifugation in einem Beckmann JA-14 Rotor mit 5000 rpm

für 10 Min. wurden die Bakterien pelletiert. Sie wurden dann in 10 ml Puffer E1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA-HCl pH 8,0) resuspendiert und durch Zugabe von 10 ml Puffer E2 (200 mM NaOH, 1% w/v SDS) lysiert, wobei die Probe leicht gemischt, und dann 5 Min. bei RT inkubiert wurde. Anschließend wurde das Gemisch durch Zugabe von 10 ml Puffer E3 (3,1 M K-Acetat, pH 5,5 mit Essigsäure eingestellt) neutralisiert. Aus diesem Ansatz wurden dann durch 10 minütige Zentrifugation in einem Beckmann JA-20 Rotor mit 15000xg bei 20°C Zelltrümmern und chromosomale DNA entfernt. Der Überstand wurde auf eine JETstar-Säule filtriert, die vorher mit 30 ml Puffer E4 (600 mM NaCl, 100 mM Na-Acetat, 0,15% TritonX-100, pH 5,0 mit Essigsäure eingestellt) equilibriert worden war. Nach Bindung der DNA an das Säulenmaterial wurde mit 60 ml Puffer E5 (800 mM NaCl, 100 mM Na-Acetat, pH 5,0 mit Essigsäure eingestellt) gewaschen, wobei unspezifisch gebundene Substanzen entfernt wurden. Schließlich wurde mit 15 ml Puffer E6 (1250 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,5) die gebundene DNA vom Säulenmaterial eluiert. Zur Präzipitation dieser DNA wurden 10,5 ml Isopropanol zum Eluat gegeben und gut durchmischt. Danach wurde die DNA durch einen Zentrifugationsschritt in einem Beckmann Ja-20-Rotor (30 Min. bei 15000xg und 4°C) pelletiert, mit 70% eiskaltem Ethanol gewaschen und erneut für 30 Min. zentrifugiert. Nun wurde die DNA bei RT getrocknet und in 100 µl TE-Puffer resuspendiert. Der Gehalt an isolierter DNA wurde mittels OD-Messung im Spektralphotometer Cadas 100 (Dr. Lange, Düsseldorf) bestimmt (s. 2.3.3).

2.3.3. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von DNA, RNA und Oligonukleotiden erfolgte spektrophotometrisch im Photometer Cadas 100 (Dr. Lange, Düsseldorf) durch Messung der Extinktion bei 260 nm. Eine OD von 1 entspricht einer Konzentration von:

50 µg/ml doppelsträngiger DNA

40 µg/ml einzelsträngiger DNA/RNA

20 µg/ml Oligonukleotiden

2.3.4. Restriktionsverdau

Zum Schneiden doppelsträngiger DNA werden Restriktionsendonukleasen verwendet, die das Phosphat-Zucker-Gerüst der DNA im Bereich spezifischer palindromer Sequenzen spalten. Bei den hier verwendeten Enzymen entstanden kurze überhängende Einzelstrangabschnitte, sogenannte *sticky ends*. Für die Aktivität der Enzyme sind optimale Pufferbedingungen nötig.

Die verwendeten Restriktionsenzyme und entsprechenden 10x Reaktionspuffer stammten von New England Biolabs (Beverly, MA/USA).

Entweder wurden die gesamten Minipräp-Ansätze (s. 2.3.2 a) verdaut oder es wurde die erforderliche DNA-Menge, die verdaut werden sollte, berechnet. Die Verdauungen erfolgten in einem Endvolumen von entweder 20, 50 oder 100 µl, wobei jeder Reaktionsansatz zu 10% mit einer 10 mM DTT- und BSA-Stocklösung (1 mg/ml) und mit 10x Reaktionspuffer versetzt wurde. Die Enzyme wurden im Überschuss zugegeben (mindestens 0,5 U/Ansatz), ohne dass die Glycerolkonzentration von 5% bis maximal 10% im Reaktionsansatz überschritten wurde. Verdaut wurde 1 1/2 bis 3 Stunden bei 37°C.

2.3.5. Amplifizierung von DNA durch PCR (polymerase chain reaction)

Die PCR dient dazu, bestimmte DNA-Fragmente enzymatisch zu vermehren. Dafür ist es notwendig, zwei kleine einzelsträngige DNA-Fragmente (Oligonukleotid-Primer) mit einer bestimmten Sequenz, die einem Stück der zu amplifizierenden DNA komplementär ist, künstlich herzustellen. Durch hohe Temperaturen während der PCR kommt es zur Trennung (Denaturierung) des DNA-Doppelstranges (des *templates*), so dass die Oligonukleotid-Primer mit der komplementären Sequenz des *templates* während des Abkühlens hybridisieren können. Durch Zugabe einer DNA-Polymerase werden Nucleotide an die 3'-OH-Enden der Primer angeheftet und der komplementäre DNA-Strang synthetisiert. Durch erneutes Erhitzen wird die entstandene DNA wieder denaturiert, so dass ein weiterer Zyklus von Primer-Hybridisierung und DNA-Synthese ablaufen kann. Auf diese Weise kann ein einziges DNA-Molekül millionenfach amplifiziert werden. Wählt man die Oligonukleotid-Primer so, dass sie der *template*-DNA fast komplementär sind, sich aber an bestimmter Stelle geringfügig von ihr unterscheiden, kann man gezielt Mutationen

einführen (z.B. Deletionen oder Punktmutationen). Durch Anhängen von Restriktionsschnittstellen an die Primer, kann die neusynthetisierte DNA dann nach Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen kloniert werden.

Es wurden verschiedene DNA-Abschnitte der Serglycin-cDNA unter Verwendung von Primerpaaren amplifiziert. Die verwendeten Primer sind nachfolgend aufgelistet (s. 2.3.7). Es wurden eine Taq-Polymerase mit entsprechendem Puffer (50x Advantage cDNA Polymerase Mix von Clontech, Palo Alto/USA) und ein dNTP-Mix (Clontech, Palo Alto/USA) verwendet. Die Reaktionsansätze wurden wie folgt auf Eis erstellt:

25 µl 2x PCR-Premix (Endkonz.: 200 µM dNTPs 2 mM Mg²⁺, 1x Reaktionspuffer)
1-2 µl template-DNA (Serglycin-DNA)
2 µl down-Primer (10 pmol/µl)
2 µl up-Primer (10 pmol/µl)
1 µl Polymerase (Clontech, Palo Alto/USA)
ad 50 µl H₂O

Die PCR-Reaktion wurde im Thermocycler UNO Thermoblock (Biometra, Göttingen) nach folgendem Programm durchgeführt:

Schritt 1:	95°C	30''
Schritt 2:	95°C	30''
Schritt 3:	50°C	1'
Schritt 4:	72°C	1,5'
Schritt 5:	72°C	10'
Schritt 6:	4°C	

Die Schritte 2 - 4 wurden 25 mal wiederholt.

Zur Kontrolle der PCR wurden 5 µl anschließend in einem 2% Agarosegel analysiert.

Die synthetisierte DNA wurde noch am selben Tag mittels Original TA Cloning Kit von Invitrogen (Groningen/NL) kloniert (s. 2.3.10).

2.3.6. Mutations-PCR

Sollten Punktmutationen gesetzt werden, wurde die PCR mit dem QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (La Jolla/USA) durchgeführt. Die Mutation lag in der Mitte des Primers, so dass zu beiden Seiten der Mutation etwa 10-15 korrekt

hybridisierende Basen lagen. Da hierbei das gesamte Plasmid und nicht nur ein kurzes DNA-Fragment amplifiziert werden sollte, musste eine pfu-Polymerase (PfuTurbo® DNA-Polymerase, Stratagene La Jolla/USA) verwendet werden, da sie eine 6 fach höhere Genauigkeit bei der DNA-Synthese hat als eine Taq-Polymerase. Die hier verwendeten Primer sind unter 2.3.7 aufgeführt. Die PCR-Ansätze waren wie folgt zusammengesetzt:

- 5 µl 10x cloned pfu reaction buffer (Stratagene, La Jolla/USA)
- 1 µl dNTPs (Clontech, Heidelberg)
- 25 ng DNA-template (= 0,5 µl)
- 2 µl up-Primer (10 pmol/µl)
- 2 µl down-Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl Pfu turbo DNA-Polymerase (2,5 U/µl, Stratagene, La Jolla/USA)
- ad 50 µl H₂O

Diese PCR wurde im Thermocycler UNO Thermoblock (Biometra, Göttingen) nach folgendem Programm durchgeführt:

- | | | |
|------------|------|-----------------------|
| Schritt 1: | 95°C | 30'' |
| Schritt 2: | 95°C | 30'' |
| Schritt 3: | 55°C | 1' |
| Schritt 4: | 68°C | 2' pro kb Plasmid-DNA |
| Schritt 5: | 68°C | 10' |
| Schritt 6: | 4°C | |

Die Schritte 2 - 4 wurden 16 mal wiederholt, wenn eine einzelne Aminosäure ausgetauscht werden sollte, oder 18 mal wiederholt, wenn mehrere Aminosäuren mutiert werden sollten.

Die PCR wurde überprüft, indem 5 µl davon in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt wurden.

Nach erfolgreicher Amplifizierung wurde dem PCR-Ansatz dann 1 µl der Endonuklease DpnI (Boehringer Mannheim, Mannheim) zugegeben und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Das DpnI erkennt methylierte und hemimethylierte DNA und wird daher zum Verdau der unmutierten Ausgangs-DNA eingesetzt.

Danach wurde die DNA direkt in XL1-blue-Zellen transformiert (s. 2.2.3 b).

2.3.7. Verwendete Oligonukleotid-Primer**SGN:**

up: 5'TTAGGATCCTATCCTGCTCGGAGA3'

down: 5'TTAGTCGACTCAATAGTCATCAGAAAT3'

SGC:

up: 5'TAAGGATCCCTAGCTGACATGGAATG3'

down: 5'TAGGTCGACTCATATAATAAAATCTCC3'

Mut-C-13-A:up: 5'TACCAATGGGTCCGGG**G**CAAAACCAGATGGCATT3'down: 5'AATGCCATCTGGTTTT**T**GCGCGGACCCATTGGTA3'**Mut-C-22-A:**up: 5'GGCATTTTTGCAAAC**G**CAATTGAGGAGAAAGGA3'down: 5'TCCTTTCTCCTCAATT**T**GCGTTTGCAAAAATGCC3'**Del 14:**

up: 5'TTAGGATCCCCAGATGGCATTTTTG3'

Del 22:

up: 5'TTAGGATCCATTGAGGAGAAAGGA3'

Del loop:up: 5'GGTCCGCTGTAAACCAA**A**CTGCATTGAGGAG3'

down: 5'CTCCTCAATGCAGTTTGGTTTACAGCGGACC3'

Mut-R-12-A-K-14-A:up: 5'AGGTACCAATGGGT**C**GCATGT**G**CACCAGATGGCATTTTT3'down: 5'AAAAATGCCATCTGGT**T**GCACAT**G**CGACCCATTGGTACCT3'

Del 5:up: 5'**CAGGGG**CCCCTGGGATCCGCCAGGTACCAATGG3'down: 5'CCATTGGTACCTGGCGGATCC**CAGGGG**CCCCTG3'

Abb. 3: Verwendete Oligonukleotid-Primer. Die Basen, die am Aminosäureaustausch beteiligt sind, sind fett gedruckt. Bei den kursiv geschriebenen Basen handelt es sich um die Schnittstellen der Restriktionsenzyme BamHI und Sall

2.3.8. Gelelektrophoretische Analyse von DNA (Agarose-Gelelektrophorese)

Die durch PCR oder Restriktionsverdau erhaltenen DNA-Fragmente wurden zu analytischen oder präparativen Zwecken durch Elektrophorese in horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Dabei wurde die unterschiedliche Mobilität der negativ geladenen DNA, die abhängig ist von der Molekülgröße, Molekülform und Agarosekonzentration des Gels, ausgenutzt. Für lineare DNA-Moleküle bis ca. 3000bp gilt: der Logarithmus ist der im Gel zurückgelegten Strecke umgekehrt proportional. Zirkuläre Plasmid-DNA hingegen wandert aufgrund ihrer superhelikalen Molekülform schneller als lineare DNA gleicher Größe.

Durch Zugabe von Ethidiumbromid in die Gellösung kann nach dem Gellauf dann die DNA mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden, da das Ethidiumbromid in die DNA interkaliert und rötlich fluoresziert

Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern (Eigenbau, Medizin Werkstatt der Philipps-Universität). Je nach DNA-Größe wurden entweder 0,8%ige oder 2%ige (w/v) Gele verwendet. Die abgewogene Agarose (Sea Kem, FMCBio Products, Rockland/USA) wurde in 1x TAE-Puffer (s. 2.1) gegeben und in einem Mikrowellengerät geschmolzen. Danach wurde die Agaroselösung mit 1/40000 Volumen Ethidiumbromid (1 mg/ml Stocklösung) versetzt und in einen Gelträger gegossen. Nach Festwerden des Gels wurde der Kamm entfernt und der Gelträger in die Elektrophoresekammer gelegt, die dann mit 1x TAE aufgefüllt wurde, so dass das Gel mit Puffer bedeckt war. Die zu analysierenden Proben wurden mit 6x Probenpuffer (s. 2.1) versetzt und in die Probenaschen pipettiert. Zum Abschätzen der Molekülgröße wurde ein Größenmarker (1kb DNA ladder 1 µg/µl, Invitrogen, Groningen/NL oder

Generuler™100bp DNA ladder Plus 0,5 µg/µl, MBI Fermentas) mitaufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 Volt durchgeführt. Anschließend wurden die Gele auf einem UV-Schirm mit einer Kamera fotografiert und über einen damit verbundenen PC mit dem Programm „Diana“ bearbeitet.

2.3.9. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Mit diesem QIAquick® Gel Extraction Kit (250) (QIAGEN, Hilden) können DNA-Fragmente von 70bp bis zu 10kb aus Agarosegelen extrahiert werden. Zur Reinigung der DNA von Enzymen, Salzen oder Nukleotiden kann die DNA-Probe präparativ auf ein Agarosegel aufgetragen werden. Die gewünschte Bande wird dann mit einem Skalpell auf einem UV-Tisch ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit dem Quiaquick® Gel Extraction Kit isoliert.

Die DNA-Isolierung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Dafür musste das aus dem Gel ausgeschnittene Stück zunächst gewogen werden, um dann 3 Volumen des Puffers QG zu einem Volumen des Gels geben zu können (100 mg ~ 100 µl). Wurden > 2% Agarosegele verwendet, wurden 6 Volumen Puffer QG zugegeben. Die Maximalmenge an Gel pro QIAquick-Säule beträgt 400 mg. Das Gelstück in Puffer QG wurde dann zum Auflösen der Agarose für ca. 10 Min. bei 50°C inkubiert und zwischendurch immer wieder gevortext. Danach wurde 1 Gelvolumen Isopropanol zugegeben, was zur Erhöhung der DNA-Ausbeute bei DNA-Fragmenten <500bp und >4kb führt. Die Probe wurde auf eine QIAquick-Säule gegeben, die zuvor in ein 2ml-Röhrchen gestellt wurde. Zur Bindung der DNA an das Säulenmaterial wurde eine Zentrifugation bei 13000xg für 1 Min. in einer Tischzentrifuge (Biofuge, Heraeus, Osterode) durchgeführt. Der Puffer QG weißt die optimalen pH- und Salzbedingungen für die DNA-Bindung an das Säulenmaterial auf. Der Durchfluss wurde verworfen. Um noch vorhandene Agarosespuren zu entfernen, wurden 500 µl Puffer QG auf die Säule gegeben und nochmals zentrifugiert. Daran schloss sich ein Waschschriff an, bei dem 750 µl Puffer PE auf die Säule gegeben wurden. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 13000xg für 1 Min. wurde der Durchfluss verworfen und die Säule nochmals zentrifugiert, um den ganzen ethanolhaltigen Puffer von der Säule zu entfernen. Zur Elution der DNA wurde die Säule dann in ein 1,5 ml-Gefäß gestellt, mit 30

µl Puffer EB für 1 Min. inkubiert, 1 Min. zentrifugiert und die DNA im Auffanggefäß gesammelt.

2.3.10. Klonierung von PCR-Produkten

Es wurde das Original TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, Groningen/NL) verwendet.

Bei dieser Methode wird die Tatsache genutzt, dass die Taq Polymerase die template-unabhängige Aktivität hat, ein einzelnes Deoxyadenosin an das 3'-Ende des PCR-Produkts anzufügen. Der linearisierte Vektor (pCR[®]2.1, s. 2.3.1) in diesem Kit trägt ein einzelnes 3'-Deoxythymidin. Darüber kann das PCR-Produkt direkt nach der PCR ohne vorherigen Restriktionsverdau in diesen Vektor ligiert werden. Die Ligation wird von dem Enzym T4 DNA Ligase katalysiert, wobei unter ATP-Verbrauch die Bindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe zweier DNA-Fragmente gebildet wird. Die Ligation sollte innerhalb eines Tages nach der PCR durchgeführt werden, da ansonsten die Deoxyadenosin-Reste mit der Zeit abgebaut werden. Nach Ligation des PCR-Produkts in den Vektor wird dieser dann in die im Kit enthaltenen INVαF'-kompetenten Zellen transformiert (s. 2.2.3 d).

Zunächst musste berechnet werden, wie viel ng des PCR-Produkts für die Ligation benötigt wurden. Dies erfolgte über die Formel:

$$x \text{ ng PCR-Produkt} = (\text{Anzahl bp des PCR-Produkts})(50 \text{ ng pCR}^{\text{®}}2.1\text{-Vektor})/\text{bp des pCR}^{\text{®}}2.1\text{-Vektors: } 3900)$$

Es galt folgendes Pipettierschema:

- x µl frisches PCR-Produkt
- 1 µl 10x Ligationspuffer
- 2 µl pCR[®]2.1-Vektor (25 ng/µl)
- 1 µl T4 DNA Ligase (4 Weiss units)
- ad 10 µl H₂O

Dieser Ansatz wurde über Nacht in einem Wasserbad bei 14°C inkubiert und am nächsten Tag in INVαF'-Zellen transformiert.

2.3.11. Ligation

Bei der Ligation werden DNA-Fragmente, die identische Einzelstrangüberhänge haben, durch das Enzym T4 DNA Ligase verknüpft. Die Ligase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe zweier DNA-Fragmente. Auf diese Weise können z.B. cDNA-Fragmente in Vektoren eingebracht werden.

In der Regel wird das cDNA-Fragment (Insert) im molekularen Überschuss zur Vektor-DNA gegeben. Dabei werden üblicherweise 100 ng Vektor verwendet und die benötigte cDNA-Menge über folgende Formel berechnet:

$$[\text{ng}(\text{Vektor}) \times \text{kb}(\text{Insert})/\text{kb}(\text{Vektor})] \times \text{molares Verhältnis Insert/Vektor} = \text{ng}(\text{Insert})$$

Nach Klonierung der SG-Konstrukte mit dem Original TA Cloning® Kit in den Vektor pCR®2.1 (s. 2.3.10) wurde die SG-cDNA mit den Restriktionsenzymen BamHI und Sall aus diesem Vektor rausgeschnitten, um sie dann in den Vektor pGEX-6P-1 (s. 2.3.1) zu ligieren, der ebenfalls mit BamHI und Sall verdaut worden war. Dafür wurden 100 ng verdauter pGEX-6P-1 eingesetzt und die errechnete Menge an SG-cDNA zugegeben. Außerdem mussten 2 µl des 10x Ligasepuffers (Promega, Madison/USA) und 1 U T4 DNA Ligase (Promega, Madison/USA) zugegeben werden. Abschließend wurde der Ansatz auf 20 µl mit H₂O aufgefüllt und dann über Nacht in einem Kühlwasserbad bei 16°C inkubiert.

2.3.12. Sequenzierung und Sequenzanalysen

Sämtliche SG-Konstrukte im Vektor pGEX-6P-1 (s. 2.3.1) wurden zur Sequenzanalyse geschickt, um sicherzustellen, dass die Sequenz stimmt, bevor sie in Protein umgeschrieben wurde. Dazu wurden 10 µg DNA (SG-Konstrukte in pGEX-6P-1) zu der Firma MWG Biotech geschickt, wo die Sequenzierungen mit dem Primer pGEX 5' durchgeführt wurden. Die Sequenzergebnisse wurden per e-Mail zugeschickt und konnten dann mit Sequenzen in den Datenbanken abgeglichen werden. Dafür wurden die Sequenzergebnisse in eine Word-Datei umformatiert und mit Hilfe des Blast-N Programms am NIH/USA mit Daten verglichen (Internet-Adresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>). Des weiteren

wurden verschiedene Analysen mit Hilfe des ExPASy-Servers durchgeführt (Internet-Adresse: <http://www.expasy.ch>).

2.4. Proteinexpression in E. coli

2.4.1. Expression und Reinigung des Volle-Länge-Serglycin als HisTag-Fusionsprotein

Hierbei wird ein Protein in Bakterien erzeugt, das am N-Terminus einen *HisTag*, bestehend aus 6 Histidinresten, trägt. Über diesen *HisTag* ist nach der Proteinexpression eine Aufreinigung des Proteins mittels Ni-NTA-Agarose möglich, wobei die Elution des Proteins von der Agarose durch *pH-shifts* erfolgt.

Die Serglycin-cDNA wurde durch PCR (s. 2.3.5) hergestellt und über die Restriktionsschnittstellen für BamHI und PstI in die *multi-cloning-site* des Expressionsvektors pQE-31(Qiagen, Hilden)(s. 2.3.1) eingebracht. Dieses Konstrukt wurde in M15-Zellen transformiert (s. 2.2.3 a). Von den Agarplatten wurde ein Klon gepickt und über Nacht in 10 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (Boehringer, Mannheim) und 25 µg/ml Kanamycin (Sigma, Deisenhofen) bei 37°C und 250 UpM inkubiert. Am nächsten Tag wurde die gesamte ÜN-Kultur in 200 ml LB-Medium mit Antibiotika überimpft und bei 37°C so lange inkubiert, bis die OD bei einer Wellenlänge von 600 nm >0,6 war. Dann wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) (Biomol) für 4 Stunden bei 37°C durchgeführt. Danach wurden die Bakterien durch eine 20 minütige Zentrifugation mit 7700xg bei 4°C in einem JA-14-Rotor pelletiert. Die so gewonnenen Bakterien wurden bei -20°C eingefroren. Dann wurde das Bakterienpellet in 4,5 ml Denaturierungspuffer (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl pH 8,0) resuspendiert und 3×10^7 auf Eis mit Ultraschall behandelt. Zur Bakterienlyse und Proteindenaturierung wurden die Bakterien noch für 1 Stunde bei RT drehend inkubiert. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 15 Min. bei 20°C mit 2000xg, wonach das entstandene Pellet erneut in 4,5 ml Denaturierungspuffer aufgenommen und nochmals, wie oben beschrieben, behandelt wurde. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der dabei entstandene Überstand mit dem zuvor gewonnenen Überstand vereinigt und mit

equilibrierter Ni-NTA-Agarose 1 Stunde bei RT drehend inkubiert. Es wurde 1 ml der Ni-NTA-Agarose durch zweimaliges Waschen mit je 1 ml Denaturierungspuffer equilibriert. Nach einstündiger Inkubation mit der Agarose wurde der Ansatz 2 Min. bei 20°C mit 2000xg zentrifugiert und die pelletierte Agarose in 4 ml Denaturierungspuffer aufgenommen und 5 Min. drehend inkubiert, bevor erneut zentrifugiert wurde. Dieser Schritt wurde insgesamt zweimal wiederholt. Darauf folgten drei Waschschritte, wobei die Agarose in je 1,5 ml Waschpuffer (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl pH 6,3) aufgenommen und 5 Min. drehend inkubiert wurde, bevor eine Zentrifugation mit 13000xg für 5 Min. in einer Tischzentrifuge (Biofuge, Heraeus, Osterode) erfolgte. Nach diesen drei Waschschritten folgten nun mehrere Elutionsschritte. Zunächst wurde dreimal mit einem Elutionspuffer (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl) mit pH 5,9 eluiert, wozu die Agarose jeweils in 0,5 ml Elutionspuffer aufgenommen wurde und wie oben beschrieben 5 Min. inkubiert wurde, bevor zentrifugiert wurde. Daran schlossen sich noch 4 Elutionsschritte mit dem Elutionspuffer (s.o.) mit einem pH-Wert von 4,5 an. Es wurden ebenfalls pro Elutionsschritt 0,5 ml des Puffers verwendet. Durch Analyse der Fraktionen im SDS-PAGE (s. 2.5.1) zeigte sich, dass das *HisTag*-Fusionsprotein in den Elutionsfraktionen vorlag, die dann vereinigt wurden. Das Fusionsprotein wurde für Interaktionsstudien verwendet.

2.4.2. Expression und Reinigung von Serglycinmutanten als GST-Fusionsprotein

Mit dieser Methode wird ein Fusionsprotein erzeugt, das aus der 26kDa großen Gutathion-S-Transferase (GST) und dem gewünschten Protein, in diesem Falle verschiedene Serglycinmutanten, besteht. Da die *multi-cloning-site* im hier verwendeten pGEX-6P-1-Expressionsvektor (s.2.3.1) hinter der GST-cDNA liegt, wird das gewünschte Protein an den C-Terminus der GST exprimiert. Mittels einer Glutathion-Sepharose (Glutathione Sepharose 4B, apbiotech) kann das Fusionsprotein dann gereinigt werden. Die Induktion der Proteinexpression erfolgt mit Isopropylthiogalaktosid (IPTG) (Biomol). Nach der Reinigung kann durch Einsatz der PreScission™Protease (apbiotech), die ebenfalls als GST-Fusionsprotein vorliegt, das GST von den Serglycinmutanten abgespalten werden und der Ansatz durch Bindung der Protease an die Glutathion-Sepharose gereinigt werden.

Die per PCR hergestellten Serglycin-DNA-Fragmente (s. 2.3.5 und 2.3.6) wurden sämtlichst über die Restriktionsschnittstellen von BamHI und Sall in den pGEX-6P-1-Expressionsvektor (apbiotech) ligiert. Zur Proteinexpression wurden diese Konstrukte in BL-21-Zellen transformiert (s. 2.2.3 c) und auf LB-Platten mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml)(Boehringer, Mannheim) ausplattiert. Von diesen Platten wurde dann ein Klon gepickt, in 20 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gesamte ÜN-Kultur wurde dann am nächsten Tag in 400 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und bis zu einer OD > 0,5 (gemessen bei 600 nm in einem Spektralphotometer Cadas 100, Dr. Lange, Düsseldorf) bei 37°C inkubiert. Darauf wurde IPTG zugesetzt (Endkonzentration 0,1 mM) und der Ansatz für weitere 3 Stunden bei 37°C im Schüttler mit 250 UpM inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 10 Min. in einem Beckmann JA-14-Rotor mit 7700xg bei 4°C pelletiert. Die Bakterienpellets wurden in 50 µl eiskaltem PBS (s. 2.1) pro ml Bakterienkultur resuspendiert und anschließend zur Lyse 6×10^{11} auf Eis mit Ultraschall behandelt. Dann wurde zur besseren Lösung des Fusionsproteins TritonX-100 (Serva, Heidelberg) (Endkonzentration 1%) und der Proteaseinhibitor PMSF (Endkonzentration 1 mM) (Merck, Darmstadt) zugegeben. Die Bakterien wurden 30 Min. schüttelnd auf Eis inkubiert und dann bei -20°C eingefroren. Das nachfolgende Auftauen unterstütze die Lyse der Bakterien. Das aufgetaute Lysat wurde bei 4°C in einem Beckmann JA-20-Rotor mit 12000xg zentrifugiert, wodurch Zelltrümmer und DNA pelletiert wurden. Der relativ klare Überstand wurde dann für 30-45 Min. bei RT drehend mit Glutathion-Sepharose 4B inkubiert. Zuvor musste die Sepharose equilibriert werden. Da die Sepharose als 75%-Suspension vorliegt, wurden 1,33 ml für 1 ml *bed-volume* (bindet etwa 5 mg GST) eingesetzt. Diese 1,33 ml Sepharose wurden mit 10 ml kaltem PBS gewaschen, 2 Min. mit 500xg zentrifugiert und das entstandene Sepharosepellet wurde dann in 1 ml PBS aufgenommen und konnte nun als 50%-Suspension zum Bakterienlysat gegeben werden. Nach der Inkubation, während der das GST-Fusionsprotein an die Glutathion-Sepharose band, wurde der Ansatz 2 Min. mit 500xg zentrifugiert, um die Sepharose zu pelletieren, die dann mit 10 ml kaltem PBS gewaschen wurde. Insgesamt wurde 3x mit PBS gewaschen, um unspezifisch an die Sepharose gebundene Proteine zu entfernen. Danach wurde die Sepharose entweder 3x mit je 1 ml Elutionspuffer (10 mM reduziertes Glutathion (Sigma) in 50 mM Tris-HCl pH 8,0) für je 10 Min. drehend inkubiert, was zur Elution der

Fusionsproteine führte oder sie wurde in 1-2 ml *cleavage buffer* (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,0) zur weiteren Behandlung mit der PreScission™Protease (apbiotech) aufgenommen (s. 2.4.3).

Zu Kontrollzwecken wurde auch nur GST exprimiert und gereinigt, wozu der leere pGEX-6P-1-Vektor in BL-21-Zellen transformiert wurde und ebenso verfahren wurde, wie oben beschrieben.

2.4.3. Abspaltung des GST-Anteils vom GST-Fusionsprotein mit der PreScission™Protease

Die PreScission™Protease (apbiotech) ist ein 46kDa großes Fusionsprotein aus der Glutathion-S-Transferase (GST) und der humanen Rhinovirus (HRV) Typ 14 3C Protease. Sie erkennt spezifisch die Sequenz Leu-Phe-Gln/Gly-Pro und schneidet zwischen Gln und Gly. Fusionsproteine die vom pGEX-6P-1-Expressionsvektor gebildet wurden, werden zwischen dem GST-Rest und dem klonierten Fusionspartner gespalten (s. Vektorkarte 2.3.1). Da das Enzym einen GST-*tag* trägt, kann es zusammen mit abgespaltenem GST leicht durch die GST-Sepharose® 4B entfernt werden.

Zur mit Fusionsprotein gekoppelten GST-Sepharose® 4B, die in 1-2 ml *cleavage buffer* (s. 2.4.2) aufgenommen wurde, wurden 15 µl (30 U) PreScission™Protease zugegeben. Dieser Ansatz wurde über Nacht (16 Stunden) bei 4°C drehend inkubiert, wobei es zur Abspaltung des GST-Anteils kam. Durch den GST-*tag* band das Enzym gleichzeitig an die Sepharose. Durch eine 2 minütige Zentrifugation bei 13000xg in einer Biofuge (Heraeus, Osterode) wurde die Sepharose und daran gebundene GST-Reste sowie das Enzym pelletiert. Dadurch verblieben die Serglycinmutanten als Peptide im Überstand. Durch SDS-PAGE (s. 2.5.2) wurde die Reinheit der Peptide überprüft. Bis zur Verwendung für Interaktionsstudien wurden die Peptide bei -20°C gelagert.

2.5. Gelelektrophoretische Analyse von Proteinen

2.5.1. Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Laemmli, 1970

Mit dieser Methode werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch Einsatz des anionischen Detergenz SDS werden die Eigenladungen der Proteine überdeckt, so dass sie schließlich alle eine negative Ladung tragen. Außerdem werden die Proteine denaturiert und durch Zugabe reduzierender Substanzen (DTT, β -Mercaptoethanol) vollständig entfaltet und in ihre Untereinheiten zerlegt. Die Auftrennung erfolgt in einer Gelmatrix aus Acrylamidpolymeren, die über N'N'-Methylen-bisacrylamid quervernetzt werden. Die Durchlässigkeit der Matrix ist abhängig von der Konzentration der Polyacrylamid-Monomeren und dem Grad der Quervernetzung, d.h. der Konzentration der bifunktionellen Gruppen. Die Polymerisation erfolgt durch eine Radikalkettenreaktion, die mit dem Zerfall von APS in Radikale gestartet wird, welche daraufhin TEMED aktivieren.

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese wird dem eigentlichen Trenngel noch ein Sammelgel von ca. 1/10 Länge der Trenngelstrecke vorgeschaltet, dessen pH-Wert um zwei Einheiten tiefer liegt als der des Trenngels. Dies führt zu einer Verdichtung der Proteinprobe vor dem Eintritt in das Trenngel und somit zu einer schärferen Trennung der jeweiligen Proteinbanden.

Zum einen wurden Minigele in einer vertikalen Flachbett-Gelelektrophorese-Kammer der Firma Keutz (Reiskirchen) verwendet. Hierbei betrug die Laufstrecke im Sammelgel 0,5-1 cm und die des Trenngels ca. 6 cm. Zum anderen wurden große Gele in einer vertikalen Gelelektrophorese-Kammer (Eigenbau Medizintechnik der Universität Marburg) verwendet, deren Laufstrecke im Sammelgel ca. 1,5-2 cm und im Trenngel ca. 13 cm betrug. Die Polyacrylamidkonzentration des Sammelgels war ausschließlich 5%, die des Trenngels entweder 12,5% oder 7,5% (s. Tabelle 2). Die zu analysierenden Proteinproben wurden vor Auftrag auf das Gel 1:4 mit 4x Laemmli-Probenpuffer (s. 2.1) versetzt und für 3 Min. bei 95°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurden die Proben in die Taschen des Gels pipettiert und die Elektrophorese bei Minigelen im Sammelgel mit 80 V und im Trenngel mit 140 V durchgeführt. Bei großen Gelen wurde die Elektrophorese mit 9 mA über Nacht durchgeführt.

Als Molekulargewichtsstandards wurden definierte Proteingemische der Firma Invitrogen, Groningen/NL mitaufgetragen.

	12,5% Trenngel	7,5% Trenngel	5% Sammelgel
30%RotiphoreseGel 30 (PAA), Roth, Karlsruhe	3ml	1,25ml	830 µl
2M Tris-HCl pH 8,8	1,34ml	0,93ml	-----
1M Tris-HCl pH 6,8	-----	-----	625µl
20% (w/v) SDS	36µl	25µl	25µl
H ₂ O	2,8ml	2,78ml	3,425ml
TEMED	3,8µl	2,5µl	5µl
10% (w/v) APS	20 µl	15µl	40 µl

Tab. 2: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für SDS-PAGE

Für große Gele wurde die vierfache Menge an Gellösung angesetzt.

2.5.2. Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (TSDS-PAGE)

Modifizierung der Methode von Schagger und von Jagow 1987 beschrieben von Dayhuff et al, 1992

Diese Methode dient der verbesserten Auftrennung von niedermolekularen Proteinen (kleiner 10 kDa). Es eignet sich für Proteine zwischen 1-70 kDa.

Es wurden dieselben Gelapparaturen verwendet wie für die SDS-Gele (s 2.5.1.). Die Gellösung, der Laufpuffer und die Laufbedingungen wurden verändert. Für die Gellösung wurde eine 49,5% T, 3% C Acrylamid-Bisacrylamid-Mischung angesetzt, wobei T für die Gesamtkonzentration beider Monomere (Acrylamid und Bisacrylamid) steht, während C die Konzentration des quervernetzenden Monomers (Bisacrylamid) relativ zur Gesamtkonzentration beider Monomere angibt. Für diese Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung wurden also 48 g w/v Acrylamid (Serva, Heidelberg) und 1,5 g w/v Bisacrylamid (Serva, Heidelberg) auf 100 ml Wasser eingewogen (PAA). Das Sammelgel hatte 4% T und 3% C. Der Gelpuffer bestand aus 3 M Tris-HCl, 0,3% (w/v) SDS und wurde auf einen pH-Wert

von 8,45 eingestellt. Der Laufpuffer bestand aus 0,1 M Tris-Base, 0,1 M Tricin und 0,1% (w/v) SDS. Die Zusammensetzung der Gellösungen ist der Tabelle 3 zu entnehmen.

	Trenngel	Sammelgel
PAA (49,5% T, 3% C)	3,33ml	333 μ l
Gelpuffer (s.o.)	3,33ml	1ml
H ₂ O	3,33ml	2,8ml
TEMED	5 μ l	3,3 μ l
10% (w/v) APS	50 μ l	33,3 μ l

Tab. 3: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für TSDS-PAGE

Die zu analysierenden Proben wurden mit 1:4 Laemmli-Probenpuffer + DTT (s. 2.1) versetzt, 3 Min. bei 95°C denaturiert und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit 80 V im Sammelgel und 120 V im Trenngel durchgeführt.

2.5.3. Metaphorgele (2%)

Hierbei handelt es sich um Agarosegele. In 2% Metaphorgelen können sehr große Proteine (größer 250 kDa) oder unter nativen Bedingungen Proteinkomplexe aufgetrennt werden.

Die hier verwendeten Gele hatten eine Trennstrecke von ca. 13 cm und eine Dicke von 1,5 mm. Für diese Gele wurden 45 ml Gellösung angesetzt. Dafür mussten 0,9 g MetaPhor Agarose (FMC Bio Products, Rockland, Me/USA) abgewogen werden und in 45 ml Metaphorpuffer (0,5 M Tris, 0,16 M Borsäure, 0,1% w/v SDS pH 8,5) gegeben werden. Die Gellösung wurde vor dem Aufkochen in der Mikrowelle gewogen, so dass nach dem Lösen das verdunstete Wasser wieder zugegeben werden konnte. Zum Lösen der Agarose wurde der Ansatz ca. 8x kurz in der Mikrowelle aufgekocht, herausgenommen, gerührt und nochmals aufgekocht. Diese Gellösung wurde dann in eine zuvor im Trockenschrank erwärmte Gelapparatur (Eigenbau der Medizintechnik der Universität Marburg) gegossen und es wurde ein geeigneter Kamm eingesetzt. Nach Festwerden des Agarosegels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die bei 95°C hitzedenaturierten Proben in Laemmli-Probenpuffer wurden aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Metaphorlaufpuffer (90

mM Tris, 90 mM Borsäure, 0,1% w/v SDS) über Nacht bei 8 mA. Bevor die Lauffront aus dem Gel auslief, wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel zur weiteren Analyse auf eine PVDF-Membran geblottet (s. 2.6.3).

2.6. Detektion gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine

2.6.1. Coomassiefärbung

Bei der Substanz Coomassie-Brilliant-Blau handelt es sich um einen Triphenylmethanfarbstoff, mit dem Proteine direkt im Gel oder auf einer PVDF-Membran sichtbar gemacht werden können. Dieser Farbstoff lagert sich an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine an (Bioanalytik, F.Lottspeich/H.Zorbas, Spektrum-Verlag).

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurde entweder das Gel für 30 Min. oder ü.N. oder eine PVDF-Membran für 5 Min. in Coomassielösung (10% v/v Essigsäure, 40% v/v Methanol, 0,25% w/v Coomassie R250 (Serva, Heidelberg), H₂O) gelegt und leicht geschüttelt. Dabei wurden die Proteine fixiert und angefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt und das Gel oder die PVDF-Membran durch mehrfaches Wechseln der Entfärbelösung (40% v/v Methanol, 10% v/v Essigsäure) von überschüssigem Farbstoff befreit, so dass nur noch gefärbte Proteinbanden zu sehen waren. Dann wurde die Entfärbungsreaktion mit 1% v/v Essigsäure bei Gelen und H₂O bei einer PVDF-Membran gestoppt.

2.6.2. Silberfärbung (nach Hempelmann und Kaminsky, 1986)

Durch Silberfärbung kann weniger als 1ng Protein/Bande sichtbar gemacht werden. Nach Fixierung der Proteine im Gel wird dieses in eine Silbernitratlösung gelegt, wobei Silberionen von den Proteinen gebunden werden und durch Reduktion dann in sogenannte Silberkeime umgewandelt werden. Dies geschieht durch funktionelle Gruppen der Proteine und durch Peptidbindungen. Durch starke Reduktionsmittel werden nun alle Silberionen zu metallischem Silber reduziert, was in der Nähe der Silberkeime schneller abläuft als im

restlichen Gel, so dass sich die Proteinbanden schneller dunkel färben. Durch starke pH-Änderung wird dann die Reaktion gestoppt, damit sich nicht das ganze Gel dunkel verfärbt. Zunächst wurden die Proteine im Gel 30 Min. in 10% (v/v) Essigsäure auf einem Schüttler fixiert. Danach wurde für weitere 30 Min. in der Reaktionslösung (20% (v/v) Ethanol; 5% (v/v) Essigsäure; 0,002% (w/v) DTT) inkubiert. Daran schloss sich ein 5 minütiger Oxidationsschritt in einer 0,5%igen (w/v) Kaliumdichromatlösung (Serva, Heidelberg) an. Nach mehrfachem Waschen mit H₂O wurde das Gel 10 Min. in 0,1% (w/v) Silbernitrat (Serva, Heidelberg) inkubiert, bevor das Gel dann mit der Entwicklerlösung (3% (w/v) Na₂CO₃; 0,02% (w/v) Paraformaldehyd (Serva, Heidelberg)) benetzt wurde. Sobald eine ausreichende Färbung erzielt war, wurde die Reaktion mit 1%iger (v/v) Essigsäure gestoppt.

2.6.3. Western Blot (nach Towbin et al., 1979 und Burnette, 1981)

Durch das Western-Blot-Verfahren werden Proteine, die zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden, durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran oder PVDF-Membran transferiert. Da die Proteine auf dieser Membran dann immobilisiert vorliegen, sind sie für weitere Analysen ohne den störenden Einfluss der Gelmatrix zugänglich. Es wurde das Verfahren des „Semidry-Blottings“ angewendet. Hierbei werden Whatman-Filterpapiere und eine Nitrocellulosemembran oder PVDF-Membran mit Blotpuffer getränkt und in einer Blotapparatur so geschichtet, dass die Proteine aus dem Gel zur Anode wandern, und dabei auf der Membran haften bleiben. Die Wanderung zur Anode kommt durch SDS zustande, das nach der Gelelektrophorese noch an die Proteine gebunden ist und ihnen so eine negative Ladung verleiht.

Um ein SDS-Gel zu blotten, wurden 6 3MM-Whatman-Filterpapiere (Whatman, Maidstone, UK) und eine Nitrocellulosemembran (Porendurchmesser 0,45 µm, Schleicher&Schüll, Dassel), bzw. eine PVDF-Membran (Millipore Corporation, Bedford, MA 01730) auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Filter und Membran wurden dann in Blotpuffer (48 mM Tris/HCl; 39 mM Glycin; 0,04% (w/v) SDS; 20% (v/v) Methanol bei Nitrocellulosemembranen und 50 mM Borat, 20% (v/v) Methanol pH 9,0 mit NaOH eingestellt bei PVDF-Membranen) eingeweicht. In einer Semidry-Blot-Apparatur (Modell OWL, AGS, Heidelberg) wurden schließlich luftblasenfrei folgende Komponenten auf die

Kathode geschichtet: drei Whatman-Filterpapiere, das Gel, darauf die Membran und zum Abschluss drei weitere Whatman-Filterpapiere. Darauf wurde die Anode aufgesetzt und leicht festgeschraubt. Der Proteintransfer erfolgte mit 2 mA/cm^2 für 1 1/2 bis 2 Stunden. Danach wurde die Membran mit den darauf befindlichen Proteinen entweder mit Antikörpern inkubiert (Immunoblot, s. 2.6.5), oder es wurde ein Ligandenblot durchgeführt (s. 2.11.3). Die PVDF-Membran wurde mit Coomassie gefärbt (s. 2.6.1).

2.6.4. Verwendete Antikörper

Kaninchen-α-Serglycin (K136), polyklonal	eingesetzte Verdünnung: 1:400	selbst rekombinant erzeugtes Serglycin (Biederbick et al., 2003) wurde zur Antikörperherstellung zu Seramun Diagnostica GmbH, Dolgenbrodt geschickt
Kaninchen-α-ZG 16, polyklonal	eingesetzte Verdünnung: 1:1000	eigene Herstellung (Cronshagen et al., 1994)
Ziege-α-GST, polyklonal	eingesetzte Verdünnung 1:300	apbiotech, Freiburg
Ziege-α-Kaninchen-HRP IgG (H + L)	eingesetzte Verdünnung: 1:2000	BioRad, Richmond/USA)
Ziege-α-Kaninchen-AP	Eingesetzte Verdünnung: 1:2000	BioRad, Richmond/USA
Kaninchen-α-Ziege-HRP	eingesetzte Verdünnung: 1:2000	DAKO, Dänemark

Tab. 4: verwendete Antikörper, die beim Western-Blot eingesetzte Verdünnung und Herkunft der Antikörper

2.6.5. Immunoblot

Hierbei können einzelne Proteine eines Proteingemisches mittels spezifischer Antikörper auf der Membran nachgewiesen werden. Dafür wird zunächst ein Antikörper an das entsprechende Protein gebunden, an den dann wiederum ein Zweitantikörper bindet. Da der

Zweitantikörper Enzym gekoppelt ist (HRP oder AP), kann durch anschließende Zugabe eines geeigneten Substrats eine Farbreaktion an der Stelle, an der sich das Protein auf der Membran befindet, hervorgerufen werden.

Nach dem Proteintransfer auf die Membran (s. 2.6.3), wurde diese 30 Min. bei RT in 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS (s. 2.1) (Blotto-PBS) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurde der jeweilige Antikörper in einer geeigneten Verdünnung in Blotto-PBS angesetzt und die Membran damit 1 bis 1 1/2 Stunden bei RT inkubiert. Bevor der Zweitantikörper zugegeben werden konnte, musste der Erstantikörper durch mehrmaliges Waschen mit PBST und PBS (jeweils 3x5 Min.) entfernt werden. Der geeignete Zweitantikörper wurde in PBS oder TBS verdünnt und für eine Stunde bei RT auf die Membran gegeben. Danach wurde nochmals mit PBST und PBS gewaschen. Wurde ein Zweitantikörper mit HRP verwendet, wurde die Farbreaktion durch Zugabe eines Milliliters der TMB/Substratlösung (Seramun Diagnostica GmbH, Dolgenbrodt) hervorgerufen. Sobald Banden sichtbar wurden, wurde die Reaktion mit H₂O gestoppt. Bei HRP-gekoppeltem Neutravidin (Pierce, Rockford/USA) wurde 1ml Chemolumineszenzlösung SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (Pierce, Rockford/USA) auf die Blotmembran gegeben und die Chemilumineszenz mittels Röntgenfilm (KODAK X-OMAT AR FILM, Eastman Kodak Company, Rochester/USA) detektiert. War AP an den Zweitantikörper gekoppelt, wurden die letzten Waschschriffe mit TBST und TBS anstelle von PBST und PBS durchgeführt und die Farbreaktion durch 5 ml Equilibrierungslösung (0,1 M Tris pH 9,5, 0,05 M MgCl₂, 0,1 M NaCl), der 33 µl NBT und 16,5 µl BCIP (Boehringer, Mannheim) zugesetzt wurden, durchgeführt.

2.7. Proteinbestimmung

a) nach Lowry (Lowry et al., 1951)

Der Proteinbestimmung nach Lowry liegt die Reaktion des Folinreagenzes mit Peptidbindungen und Seitenketten von Tryptophan - und Tyrosinresten zugrunde. Bei dieser Reaktion entsteht ein Kupfer-Protein-Komplex, der auf das Molybdat, bzw. Wolframat, das in dem Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz enthalten ist, reduzierend wirkt, was eine Blauverfärbung der zuvor gelben Lösung bewirkt. Diese Verfärbung kann bei 750

nm gemessen werden. Dabei ist die Extinktionszunahme einem Anstieg der Proteinkonzentration proportional, welche anhand einer Eichkurve abgelesen werden kann. Als Standardprotein wurde BSA eingesetzt.

Zunächst wurde das Lowry-Reagenz frisch angesetzt. Dazu wurde ein Teil einer 1% (w/v) CuSO₄-Lösung mit einem Teil einer 2% (w/v) Natrium-Kalium-Tartrat-Lösung und 48 Teilen 2% (w/v) Na₂CO₃ in 0,1 M NaOH gemischt. Das kommerziell erhältliche Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz (Merck, Darmstadt) wurde 1:2 mit H₂O verdünnt.

Die zu bestimmenden Proben wurden mit 0,1 M NaOH auf 100 µl aufgefüllt. Diese Ansätze wurden mit 1 ml zuvor frisch angesetztem Lowry-Reagenz versetzt und gut gemischt. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei RT, wurden jeweils 100 µl Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz (Merck, Darmstadt) zugefügt und wiederum gut gemischt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 Min. bei RT wurde die Extinktion bei 750 nm gegen den Leerwert (100 µl 0,1 M NaOH) im Spektralphotometer Cadas 100 (Dr. Lange, Düsseldorf) gemessen. Für die Eichkurve wurde eine BSA-Standardlösung (1 mg/ml in 0,1 M NaOH) verwendet. Entsprechende Volumina der BSA-Stammlösung wurden ebenfalls mit 0,1 M NaOH auf 100 µl gebracht und mit Lowry- und Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz inkubiert.

b) mit Bicinchoninsäure (BCA) (modifiziert nach Smith et al., 1985)

Alkalisches Kupfer (CuII) wird von Proteinen proportional ihrer Konzentration zu CuI reduziert. Dieses reduzierte Kupfer kann man mit Hilfe der Bicinchoninsäure messen, da die beiden einen dunklen Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm bilden, wobei die Extinktionszunahme einem Anstieg der Proteinkonzentration direkt proportional ist. Die Kupferreduktion wird durch Cystein, Cystin, Tyrosin, Tryptophan und die Peptidbindungen hervorgerufen. Auch hierbei diente wieder BSA als repräsentativer Standard. Die BCA-Proteinbestimmung zeichnet sich vor allem durch ihre Toleranz gegenüber Detergenzien aus.

Zunächst musste je nach Probenanzahl eine geeignete Menge des Bicinchoninsäure-Reagenzes hergestellt werden. Dafür wurden 49 Teile Biocinchoninsäure (Pierce, Illinois, USA) mit einem Teil der 4%igen Kupfer(II)-SO₄-Lösung (Sigma, Deisenhofen) gemischt. Die zu bestimmende Probe wurde mit 0,1 M NaOH auf 100 µl aufgefüllt und es wurde 1 ml des zuvor angesetzten Bicinchoninsäure-Reagenzes zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 30

Min. bei 37°C inkubiert, anschließend auf RT abgekühlt, um dann die Extinktion bei 562 nm in einem Spektralphotometer Cadas 100 (Dr. Lange, Düsseldorf) zu ermitteln. Als Leerwert dienten hierbei 100 µl 0,1 M NaOH, die mit 1 ml des Bicinchoninsäure-Reagenzes inkubiert wurden. Für die Eichkurve wurde eine BSA-Standardlösung (1 mg/ml in 0,1 M NaOH) verwendet. Entsprechende Volumina der BSA-Stammlösung wurden ebenfalls mit 0,1 M NaOH auf 100 µl gebracht und mit dem Reagenz inkubiert.

2.8. Proteinfällungen

2.8.1. Glykogenfällung

Die Glykogenfällung dient dazu, aus Proteingemischen Amylase quantitativ zu entfernen. Die Amylase interagiert mit dem zugegebenen Glykogen und kann durch Zentrifugation unter Anwesenheit von Alkohol pelletiert werden.

600 µl ZGI wurden mit 400 µl 100% Ethanol und 8 mg Glykogen (Sigma, Deisenhofen) 5 Min. bei RT unter Schütteln inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 2000xg für 6 Min. in der Tischzentrifuge (Heraeus, Osterode)t. Der Überstand enthielt das Amylase-reduzierte Proteingemisch, während im Pellet die Amylase und das Glykogen vorlagen. Aus dem Überstand wurde dann durch Verdampfen im Speed Vac Konzentrador das Ethanol entfernt.

2.8.2. Proteinfällung nach Wessel (Methanol-Chloroform-Fällung)

Wessel und Flugge, 1984

Da Proteoglykane und Glykoproteine Methanol-löslich sind, können diese Komponenten mittels Wesselfällung aus einem Proteingemisch getrennt werden. Sie sind bei der Wesselfällung in der organischen Phase zu finden, während alle anderen Proteine ausfallen und im Pellet erscheinen.

Ein bestimmtes Volumen ZGI wurde mit 4 Volumen Methanol, 1 Volumen Chloroform und 3 Volumen H₂O gemischt. Nach einer 3 minütigen Zentrifugation mit 13000xg in einer Tischzentrifuge (Heraeus, Osterode) wurde die obere organische Phase, in der sich

Methanol-lösliche Komponenten befinden, abgenommen. Gegebenenfalls musste diese Phase in einem Speed Vac Konzentrator eingengt werden. Die Interphase und darunterliegende wässrige Phase wurden mit 3 Volumen Methanol gemischt und zur Präzipitation der Methanol-unlöslichen Proteine nochmals 3 Min. mit 13000xg zentrifugiert. Im Sediment waren dann die Methanol-unlöslichen Proteine zu finden.

2.8.3. Blyscan Assay (Fällung von Proteoglykanen)

Mit dem Blyscan Assay (Biocolor, Belfast/Irland) können Proteoglykane spezifisch präzipitiert werden, da sie sulfatiert sind. Das im Blyscan Dye Reagent enthaltene 1,9-Dimethyl-Methylen Blau (DMB) bindet spezifisch an sulfatierte Polysaccharidkomponenten an Proteoglykanen und Glykosaminoglykan-Ketten. Es bindet Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat, sowie Heparin. Dadurch kommt es zur Ausbildung eines DMB-Proteoglykan-Komplexes, der durch Zentrifugation sedimentiert werden kann. In der Probe befindliche Proteine und Kohlenhydrate haben keinen Einfluss auf diesen Assay. Auch eine Salzkonzentration bis 0,5 M behindert die Ausbildung des DMB-Proteoglykan-Komplexes nicht. Dieser sedimentierte Komplex kann dann durch Zugabe des Blyscan Dissociation Reagent (chaotropes Salz) wieder aufgelöst und zur Extinktionsmessung bei 656nm eingesetzt werden.

100-150 µl Probe wurden mit 1 ml Blyscan Dye Reagent 30 Min. schüttelnd bei RT inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 13000xg in einer Tischzentrifuge (Heraeus, Osterode). Das dabei entstandene Pellet wurde entweder direkt für weitere Analysen verwendet oder in 1 ml Blyscan Dissociation Reagent aufgenommen und in einer etwa 20 minütigen Inkubation unter Schütteln aufgelöst. Dann konnte die Extinktion der Proben bei 656 nm gegen H₂O in einem Spektralphotometer (Cadas 100 Dr. Lange, Düsseldorf) bestimmt werden

2.9. Behandlung von Proteingemischen mit Chondroitinase ABC

Das Enzym Chondroitinase ABC (Sigma, Deisenhofen) spaltet Chondroitin-4-Sulfat, Chondroitin-6-Sulfat, nicht-sulfatiertes Chondroitin und Dermatansulfat, so dass diese

Proteoglykane nach Enzymeinwirkung ein anderes Laufverhalten im SDS-Gel haben. Das Enzym hat ein pH-Optimum zwischen pH 6-8 und ist bei 37°C aktiv.

Die zu verdauenden Proben mussten in Chondroitinase-Puffer (50 mM Tris, 60 mM Natriumacetat, 0,01% (w/v) BSA pH 8,0 bei 37°C eingestellt) resuspendiert werden. Dann wurde 0,1 U Enzym zugegeben und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe in SDS-Gelen analysiert, wobei immer eine Kontrolle ohne Enzym mitgeführt wurde.

2.10. Biotinylierung von Proteinen (modifiziert nach Zurzolo et al., 1994)

Das nach Blyscan-Fällung erhaltene Präzipitat (s. 2.8.3) wurde in 500 µl PBS (s. 2.1) mit MgCl₂ (1 mM Endkonzentration) und CaCl₂ (0,1 mM Endkonzentration) resuspendiert. Dazu wurden 0,25 mg NHS-Biotin (Sigma, Deisenhofen) das in DMSO gelöst wurde, gegeben und 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe im Speed Vac Konzentratoren pelletiert, in Laemmli-Probenpuffer (s. 2.1) aufgenommen, nach Auftrennung im Metaphorgele (s. 2.5.3) auf eine PVDF-Membran geblottet (s. 2.6.3) und mit Neutravidin-HRP (Pierce, Rockford/USA), das 1:50000 in PBS verdünnt wurde, analysiert (s. 2.6.5).

2.11. Bindungsstudien

2.11.1. Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

Bei der Co-Immunopräzipitation wird aus einem Proteingemisch mit einem spezifischen Antikörper das an den Antikörper bindende Protein sowie seine Bindungspartner isoliert. Dazu wird der Antikörper an eine Matrix (oft Protein A- oder Protein-G-Sepharose) gekoppelt und so immobilisiert. Durch Inkubation der mit Antikörper gekoppelten Matrix mit einem Proteingemisch, in dem sowohl das spezifische Protein für den Antikörper, wie auch Bindungspartner dieses Proteins enthalten sind, können diese isoliert werden und im SDS-PAGE, bzw. Western-Blot analysiert werden.

Zunächst musste die hier verwendete Protein A-Sepharose (PAS, Sigma, Deisenhofen) zum Quellen mit Puffer inkubiert werden. Dafür wurden 50 mg des PAS-Pulvers abgewogen und in 1 ml IP-Puffer (Immunopräzipitationspuffer: 50 mM Tris-HCl, 60 mM KCl, 0,2% NP-40, pH 7,5) 1 Stunde auf Eis inkubiert. Danach wurde die PAS 2 Min. mit 13000xg in einer Tischzentrifuge (Biofuge, Heraeus, Osterode) pelletiert. Der Puffer wurde entfernt und das PAS-Pellet 1:1 mit IP-Puffer resuspendiert, so dass die PAS dann 50%ig vorlag. Zur Antikörperkopplung wurden 200 µl der 50%igen PAS entnommen und mit 1 ml IP-Puffer versetzt. Dazu wurden 2 µl des ZG16-Antiserums gegeben und über Nacht bei 4°C drehend inkubiert. Am nächsten Tag wurde die PAS, nun PAS α ZG16, 3x mit je 1 ml IP-Puffer gewaschen und nach der letzten Zentrifugation (2 Min. 13000xg) 1:1 in IP-Puffer resuspendiert.

Pro Co-IP-Ansatz wurden 80 µl PAS α ZG16 eingesetzt. Zunächst wurde die PAS α ZG16 1x mit 1 ml IP-Puffer gewaschen und das Pellet in 1 ml 3% (w/v) BSA in IP-Puffer aufgenommen und zum Blocken 45 Min. bei RT drehend inkubiert. Währenddessen wurden 30 µg ZGM-Extrakt (s. 2.14.3) mit 10 µg GST (Glutathion-S-Transferase), dem N-terminalen Serglycinfusionsproteinen SGN-GST oder dem C-terminalen Serglycinfusionsprotein SGC-GST in 1 ml IP-Puffer aufgenommen und ebenfalls 45 Min. bei RT drehend inkubiert. Nach dem Blocken wurde die PAS α ZG16 1x mit 1 ml IP-Puffer gewaschen und dann mit den vorinkubierten Proteingemischen 1 1/2 Stunden bei RT ebenfalls drehend inkubiert. Danach wurde 4x mit je 1 ml IP-Puffer gewaschen und abschließend mit 1 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,5, um die Salze und das Detergenz zu entfernen. Schließlich wurde die PAS dann in 40 µl 2x Laemmli-Puffer + DTT (s. 2.1) aufgenommen, 3 Min. bei 95°C erhitzt und zur Analyse der gebundenen Proteine einem 12,5%igen SDS-PAGE (s. 2.5.1) und anschließendem Immunoblot (s. 2.6.5) unterzogen.

2.11.2. GST-pull-down

Mittels GST-pull-down können Bindungspartner eines GST-Fusionsproteins ermittelt werden. Dazu wird das GST-Fusionsprotein über den GST-Anteil an Glutathion-Sepharose gekoppelt. Gibt man dann ein Proteingemisch hinzu, so interagieren die Bindungspartner mit dem GST-Fusionsprotein. Nach Isolierung der Glutathion-Sepharose können etwaige Bindungspartner im SDS-PAGE (s. 2.5.1) und Immunoblot (s. 2.6.5) analysiert werden.

Zunächst wurde die Glutathion-Sepharose (Glutathione Sepharose 4B, apbiotech) equilibriert und mit den GST-Fusionsproteinen gekoppelt. Es wurden drei Ansätze gemacht, da GST allein, sowie die Serglycinfusionsproteine GST-SGN und GST-SGC verwendet werden sollten. Dazu wurde jeweils 0,1 *bed volume* (= 133 μ l der 75%Sepharoselösung) verwendet. Laut Herstellerangaben bindet diese Menge ca. 500 μ g GST-Fusionsprotein. Die Sepharose wurde zweimal mit je 1 ml PBS (s. 2.1) gewaschen und danach mit 600 μ g in Bakterien erzeugtem rekombinanten GST, GST-SGN oder GST-SGC in 1 ml PBS 45Min. bei RT drehend inkubiert, wodurch es zur Bindung der GST-Anteile an die Glutathion-Sepharose kam. Anschließend wurden die Ansätze noch dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen, bevor die Sepharose dann 30 Min. mit je 1 ml 3% BSA in pull-down-Puffer (50 mM Tris-HCl, 60 mM KCl, pH 7,5) zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen drehend inkubiert wurde. Nach dem Blocken wurde einmal mit 1 ml pull-down-Puffer gewaschen und die Sepharose dann in 100 μ l pull-down-Puffer resuspendiert, was in gebrauchsfertiger 50% Sepharose resultierte. Für die GST-pull-down-Ansätze wurden je 50 μ l dieser 50%-Sepharose verwendet. Diese 50 μ l wurden mit 500 μ l pull-down-Puffer versetzt und mit 20 μ g ZGM-Extrakt (s. 2.14.3) 11/2 Stunden drehend bei RT inkubiert. Um alle nichtgebundenen Proteine zu entfernen, wurden die Ansätze dreimal mit je 1 ml pull-down-Puffer gewaschen. Die pelletierten Ansätze wurden schließlich in 20 μ l Laemmli-Probenpuffer + DTT (s. 2.1) aufgenommen, 3 Min. bei 95°C erhitzt und in einem 12,5% SDS-PAGE (s. 2.5.1) mit nachfolgendem Immunoblot (s. 2.6.5). Um zu überprüfen, ob ZG 16 mit den GST-Fusionsproteinen interagiert hat, wurde der Blot mit einem Antikörper gegen ZG 16 inkubiert (s. 2.6.4 und 2.6.5).

2.11.3. Ligandenblot (Far-Western) (Min Li et al., 1992)

Der Ligandenblot dient der Analyse von Protein-Protein-Interaktionen auf einer Blotmembran. Hierfür wird ein Proteingemisch im SDS-PAGE aufgetrennt und dann auf eine Membran geblottet. Durch Behandlung der Proteine auf der Blotmembran mit bestimmten Puffern werden die Proteine zunächst denaturiert und dann langsam wieder renaturiert. Nach diesen Equilibrierungsschritten wird der Blot mit einem Protein (potentieller Ligand), dessen Interaktionen mit den aufgetrennten Proteinen untersucht

werden sollen, inkubiert. Anschließend wird mittels Antikörper gegen diesen Liganden überprüft, ob und mit welchen Proteinen des Proteingemisches er interagiert.

50 µg ZGM (s. 2.14.2) wurden in einem SDS-PAGE (s.2.5.1) aufgetrennt und danach auf eine Nitrocellulosemembran gebロットet (s. 2.6.3). Nach dem Proteintransfer auf die Membran wurde diese 5 Min. in Puffer A (10 mM Hepes-KOH, pH 7,5, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM 2-Mercaptoethanol) inkubiert. Anschließend wurde die Membran jeweils 10 Min. in Puffer A mit abnehmender Guanidiniumhydrochlorid-Konzentration (6 M, 3 M, 1,5 M, 0,75 M, 0,38 M, 0,19 M, 0,1 M und 0 M) gewaschen. Darauf folgte eine 60 minütige Inkubation in Puffer A mit einem Zusatz von 5% (w/v) Magermilchpulver und 0,05% (v/v) NP-40 und eine weitere 60 minütige Inkubation in Puffer A mit 1% (w/v) Magermilchpulver. Nach diesen Equilibrierungsschritten wurden 300 µg des Liganden (die verschiedenen rekombinant erzeugten Serglycinmutanten) in Puffer A mit 1% (w/v) Magermilchpulver zur Membran gegeben und auf einem Schüttler inkubiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei 4°C. Nach mindestens 16h wurde die Blotmembran 2x mit PBST und 3x mit PBS gewaschen, um nicht gebundenen Liganden zu entfernen. Zur Detektion des an Protein(e) auf der Membran gebundenen Liganden wurde die Blotmembran dann mit einem Antikörper gegen den Liganden für 11/2h bei RT inkubiert (α SG, 1:400 in Blotto, s. 2.6.4). Zur Entfernung von überschüssigem Antikörper wurde die Membran wiederum 2x mit PBST und 3x mit PBS gewaschen, bevor der Zweitantikörper ($G\alpha$ R-HRP, 1:2000 in PBS, s. 2.6.4) für 1h bei RT zugegeben wurde. Nach nochmaligem Waschen mit PBST und PBS erfolgte die Detektion mit TMB/Substratlösung (Seramun Diagnostica GmbH, Dolgenbrodt). Durch Kontrollen, bei denen das aufgetrennte auf eine Membran transferierte Proteingemisch mit einem Serglycin-Antikörper inkubiert wurde, konnte eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit dem aufgetrennten Proteingemisch ausgeschlossen werden. Außerdem konnte durch weitere Kontrollen das sekretorische Lektin ZG 16 als ein Bindungspartner des Liganden durch Antikörperinkubation mit einem Antikörper gegen ZG 16 (s. 2.6.4) identifiziert werden.

2.11.4. Cross-linking (Quervernetzungsstudien)

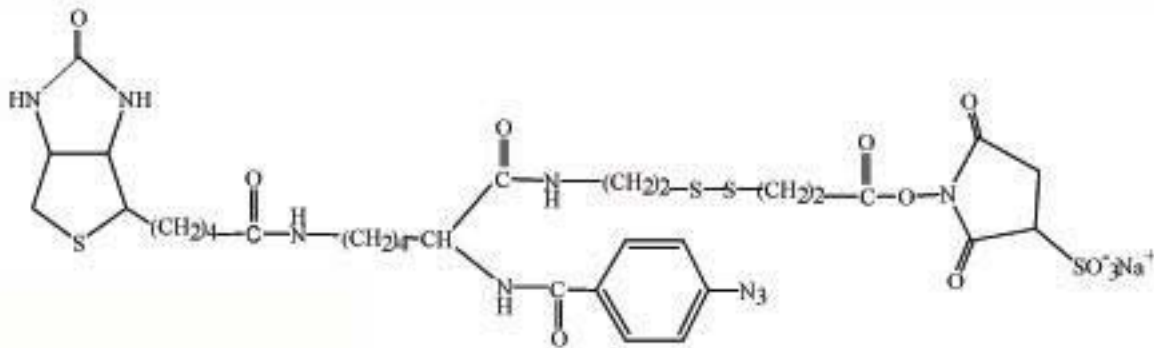


Abb. 4: Trifunktioneller Crosslinker Sulfo-SBED (Pierce, Rockford/USA)

Diese Methode dient dazu, Bindungspartner eines bestimmten Proteins zu finden. Für diese Zwecke wird der trifunktionelle Crosslinker Sulfosuccinimidyl-2-[6-(biotinamido)-2-(p-azidobenzamido)hexanoamido]ethyl-1,3'-dithiopropionat (Sulfo-SBED, Pierce, Rockford/USA) eingesetzt. Neben einem Biotinrest trägt er einen sulfonierten N-Hydroxysuccinimidoester und ein photoaktivierbares Arylazid. Außerdem existiert noch eine spaltbare Disulfidbindung. Im ersten Inkubationsschritt wird der Crosslinker an ein Protein gekoppelt, dessen Bindungspartner identifiziert werden sollen. Dann wird das Cross-linker-gekoppelte Protein mit zu untersuchenden Proben inkubiert und anschließend mit UV-Licht bestrahlt, wodurch die Arylazidgruppe des Cross-linkers eine kovalente Bindung zum proteingebundenen Liganden (sofern vorhanden) ausbildet und so der Biotinrest auf den Liganden übertragen wird. Im SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen wird die Disulfidbindung im Crosslinker gespalten, so dass Protein und Ligand getrennt werden. Der Biotinrest verbleibt am Liganden. Das im Gel aufgetrennte Proteingemisch wird auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, auf der der biotinylierte Bindungspartner mittels Neutravidin, das HRP-gekoppelt ist (Pierce, Rockford/USA), detektiert wird. Die durch die Umsetzung des ECL-Substrats (SuperSignal West Dura, Pierce, Rockford/USA) durch die Peroxidase entstehende Lumineszenz kann mit einem Röntgenfilm detektiert werden.

In diesem Experiment wurde gleichzeitig das *in vitro* Aggregationssystem (condensation-sorting, Dartsch et al., 1998) angewendet. In diesem *in vitro* System können die

Aggregation der Zymogene in den Granula der Azinuszellen des exokrinen Rattenpankreas und die Bindung dieser Aggregate an die Zymogengranulamembran (ZGM) als getrennte Prozesse untersucht werden. Unter pH-Bedingungen, wie sie physiologisch im TGN herrschen (pH 5,9) binden Aggregate an ZGM und können bei 13000xg sedimentiert werden. Die im Überstand verbleibenden Aggregate sind nicht membrangebunden.

Da der Crosslinker photoaktivierbar ist, musste im Dunkeln gearbeitet werden, um ihn nicht zu inaktivieren. Es wurden 1,12 mg Sulfo-SBED in 25 µl DMSO gelöst. 11 µl davon wurden zu etwa 200 µg rekombinantem Protein (Serglycinmutanten nach enzymatischer Abspaltung des GST-Anteil, s. 2.4.3), das zuvor in 10 mM Hepes pH 8,0 dialysiert wurde, gegeben. Diese Probe wurde 45 Min. bei RT drehend inkubiert. Um danach überschüssigen Crosslinker zu entfernen, wurde 3x 45 Min. jeweils gegen ca. 300 ml 50 mM Hepes pH, 8,0 dialysiert. Für die Dialyse mussten Dialyseschläuche mit einem MWCO von 2000Da (ZelluTrans, Roth, Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe) verwendet werden, da sonst die Serglycinpeptide verlorengegangen wären. Anschließend wurden die Proben in der Vakuumzentrifuge (Savant Instruments, Farmingdale) auf ein Volumen von ca. 500 µl eingengt. Danach wurden 100 µg Zymogengranulamembranen (ZGM) (s. 2.14.2) zu den Serglycinpeptiden gegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei RT wurden die Proben mit dem gleichen Volumen 0,1 M Mes pH 4,7 versetzt, was einen pH-shift auf 5,9 bewirkt. Dieses Gemisch wurde 2 Stunden bei RT drehend inkubiert und danach 15 Min. mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm aus etwa 5 cm Abstand bestrahlt (Hand-UV-Lampe, Eigenbau, Werkstatt der Universität Marburg), wodurch der Crosslinker mit dem Liganden kovalent verknüpft wurde. Von hier ab konnte wieder bei Licht gearbeitet werden. Zur Trennung der Membranen und daran gebundenen Proteinen wurde ein Zentrifugationsschritt für 30 Min. bei 13000xg in einer Tischzentrifuge (Biofuge, Heraeus, Osterode) durchgeführt. Die Pellets wurden in 40 µl Laemmli-Probenpuffer + DTT (s. 2.1) aufgenommen. Davon wurden 10 µl (1/4 des Gesamtansatzes) auf ein 12,5% SDS-Gel (s. 2.5.1) aufgetragen. Von den Überständen wurde ¼ genommen und mit magnetischen Streptavidin-beads inkubiert (s. 2.12). Danach wurden die beads und daran gebundenes Protein ebenfalls in Laemmli-Probenpuffer + DTT (s. 2.1) resuspendiert und auch im SDS-PAGE (s. 2.5.1) aufgetrennt. Das Gel wurde dann auf eine Nitrocellulosemembran geblotet (s. 2.6.3) Nach dem Blocken mit 5% Blotto in PBS wurde die Membran gründlich mit PBST und PBS gewaschen (je 3x für 10 Min.), bevor sie mit Neutravidin, das 1:50000 in

PBS verdünnt wurde, 1 Stunde bei RT inkubiert wurde. Nach erneutem Waschen mit PBST und PBS (je 2x 5 Min.) wurde 1 ml Chemilumineszenzlösung SuperSignal[®] West Dura Extended Duration Substrate (Pierce, Rockford/USA) auf die Membran gegeben. Nach einer kurzen Inkubationszeit (ca. 1 Min.) wurde die Membran in eine Klarsichthülle gelegt. In der Dunkelkammer wurde ein Film aufgelegt (KODAK X-OMAT AR FILM, Eastman Kodak Company, Rochester/USA). Dieser wurde nach verschiedenen Expositionszeiten von ca. 2-10 Min. entwickelt.

2.12. Isolierung biotinylierter Proteine mittels Dynal beads

Bei den Dynal beads (Dynabeads[®]M-280 Streptavidin, Dynal, Hamburg) handelt es sich um magnetische *beads*, die Streptavidin tragen. Darüber können sie mit biotinylierten Proteinen, Zuckern oder biotinylierter DNA/RNA interagieren. In einem dazugehörenden Ständer können die *beads* und an sie gebundene Substanzen magnetisch isoliert und so ankonzentriert werden.

Pro Ansatz wurden 30 µl der *beads* 2x mit je 500 µl PBS (s. 2.1) gewaschen, um das Natriumazid, in dem die *beads* gelagert sind, zu entfernen. Danach wurde die Probe (1/4 der Crosslink-Überstände) (s. 2.11.4) zugegeben und mit PBS auf 1 ml aufgefüllt. Es folgte eine 30 minütige Inkubation bei RT auf einem Drehschüttler (Eigenbau, Werkstatt der Universität Marburg), in der biotinylierte Proteine (also Bindungspartner im Crosslinkexperiment) an die Streptavidin-*beads* binden konnten. Danach wurden die *beads* wieder 2x mit je 500 µl PBS gewaschen, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Zuletzt wurden die magnetisch isolierten *beads* noch in 20 µl Laemmli-Probenpuffer + DTT (s. 2.1) aufgenommen, 3 Min. bei 95°C erhitzt und in einem SDS-PAGE aufgetrennt (s. 2.5.1). Danach wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (s.2.6.3). Die Detektion erfolgte wie schon unter 2.11.4 beschrieben mit Neutravidin und anschließender Chemilumineszenz.

2.13. Zellkultur

2.13.1. Kultur von AR4-2J-Zellen

Bei den AR4-2J-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie aus einem transplantierbaren Tumor der Azinuszellen des exokrinen Rattenpankreas, der durch Azaserin induziert wurde (Jessop und Hay, 1980; Logsdon, 1986).

Die AR4-2J-Zellen wurden in 55cm² Zellkulturflaschen (Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg) kultiviert. Die Schalen mussten zuvor für 30 Min. mit Matrigel (s. 2.13.2) beschichtet werden, da die Zellen adhärent darauf wachsen. Außerdem benötigten die AR4-2J-Zellen Dulbeccos modified Eagle medium (DMEM, PAA, Linz/A), dem 10% (v/v) FCS (fetal calf serum) (PAA, Linz/A) und 0,05 mg/l Gentamycin (Gibco BRL, Eggenstein) zugegeben werden mussten. Die Zellen wurden in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C unter Begasung mit 5% CO₂ in einem Brutschrank (Heraeus, Messer-Griesheim, Düsseldorf) inkubiert. Ein- bis zweimal pro Woche wurden die Zellen passagiert.

Die Zellen wurden 2x mit je 5 ml auf 37°C vorgewärmtem PBS (s. 2.1) gewaschen. Danach wurden sie mit 2 ml ebenfalls 37°C warmer Trypsin (0,5 g/l)-EDTA (0,2 g/l)-Lösung (PAA, Linz/A) 5 Min. bei 37°C inkubiert, was zur Ablösung der Zellen vom Substrat führte. Durch Zugabe von 5-10 ml Kultivierungsmedium wurde das Trypsin durch im Medium befindliche Trypsininhibitoren inaktiviert. Die im Medium befindlichen abgelösten Zellen wurden durch Zentrifugation (5 Min. bei 800 rpm) in einer Tischzentrifuge (Hermle, Gosheim) pelletiert und in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Davon wurde ein Tropfen in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Zeiss, Oberkochen) zur Zellzahlbestimmung am Mikroskop gegeben. Letztendlich wurden 2 Millionen Zellen in eine frische, mit Matrigel beschichtete 55cm² Zellkulturflasche ausgesät und mit warmem Medium auf 20 ml Endvolumen gebracht. Die Flaschen wurden mit leicht geöffnetem Deckel dann in den Brutschrank gestellt. Je nach Bedarf wurde zumeist alle zwei Tage ein Mediumswechsel und 1-2 mal pro Woche eine Passage durchgeführt.

2.13.2. Präparation von Matrigel

Beim Matrigel handelt es sich um den Extrakt der extrazellulären Matrix des Engelbreth-Holm-Swarm-Tumors der Maus. Die Präparation erfolgt nach Kleinmann et al., 1981.

2 g EHS-Tumor wurden in 3-4 ml 3,4 M NaCl in 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 in einem Thomas-Homogenisator (H.A. Thomas, Philadelphia/USA) mit den Einstellungen: Stufe II, 500 homogenisiert. Das Homogenat wurde in einen Erlenmeyerkolben gegeben, mit 80 ml 3,4 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,4 aufgefüllt und ca. 30 Min. im Kühlraum auf einem Magnetrührer gerührt. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 15 Min. mit 10000 rpm im JA-20-Rotor der Beckman-Kühlzentrifuge. Der gewonnene Überstand wurde verworfen und das Pellet in 80 ml 3,4 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,4 aufgenommen und erneut 30 Min. im Kühlraum gerührt. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 30 ml 2 M Harnstoff, 50 mM Tris-HCl pH 7,4 aufgenommen und über Nacht im Kühlraum auf einem Magnetrührer gerührt. Am nächsten Tag wurde für 30 Min. bei 10000 rpm im JA-20-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt. Das Pellet nochmals in 30 ml 2 M Harnstoff, 50 mM Tris-HCl pH 7,4 resuspendiert, 30 Min. gerührt und schließlich nochmals 30 Min. bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem zuvor gewonnenen Überstand vereinigt und in einen Dialyseschlauch MWCO 10 kDa (Roth, Karlsruhe) gefüllt. Die Dialyse erfolgte für 3-4 Stunden gegen 1 Liter 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,4 im Kühlraum. Danach wurde der Puffer erneuert und die Dialyse wurde über Nacht fortgesetzt. Am darauffolgenden Tag wurde die Probe dem Dialyseschlauch entnommen und 20 Min. bei 15000 rpm im JA-20-Rotor zentrifugiert. Der dadurch erhaltene Überstand ist das Matrigel und muss zur Sterilisation einmalig mit 100 Gray bestrahlt werden. Danach wird das Matrigel in kleinere Portionen zu je 2 ml aliquotiert und ist gebrauchsfertig. Das Matrigel wird bei -20°C gelagert. Eingesetzt wird es in einer 1:5-Verdünnung in PBS und kann mehrmalig verwendet werden. Das verdünnte Matrigel wird bei 4°C aufbewahrt.

2.13.3. Stimulation der AR4-2J-Zellen mit Dexamethason

Die Stimulation der AR4-2J-Zellen mit dem Glukokortikoid Dexamethason führt nach etwa 48 Stunden zu gravierenden Veränderungen in der Morphologie und Genexpression. Alle

an der Sekretion beteiligten Kompartimente vergrößern sich und die Anzahl an elektronendichten Granula nimmt zu (Logsdon et al., 1985; Swarovsky et al., 1988). Außerdem steigt die Konzentration an sekretorischen Enzymen und deren Sekretion.

Zur Stimulation der Zellen mit dem Glukokortikoid Dexamethason wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt. Danach wurde frisches erwärmtes Medium zu den Zellen gegeben, das neben FCS und Gentamycin noch 10 nM Dexamethason (Hexal, Holzkirchen) enthielt. Auf diese Weise wurden die Zellen 72 Stunden im Brutschrank bei 37°C stimuliert.

2.14. Zellfraktionierung

Für die Präparation des Pankreas wurden männliche Wistar-Ratten der Charles River Wiga GmbH in Sulzfeld verwendet. Die Ratten wurden in einem klimatisierten Tierstall mit Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und erhielten die Standarddiät Altromin C1000 der Fa. Altromin GmbH, Lage/Lippe und außerdem Wasser ad libitum.

2.14.1. Isolierung der Zymogengranula aus Rattenpankreas

4 Ratten mit einem Gewicht von ca. 200-230 g wurden 16-20 h gefastet, wodurch es zur Anreicherung der Zymogengranula (ZG) im Pankreas kommt. Unter Äthernarkose wurde der Bauchraum eröffnet und die Tiere wurden durch Entbluten über die Aorta descendens und anschließenden Schnitt ins Herz getötet. Dann wurde das Pankreas freipräpariert, entnommen und in eisgekühltem PBS (s. 2.1) von Fett und Lymphgewebe befreit. Von diesem Schritt an wurde auf Eis und in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren gearbeitet. Das entnommene Organ wurde zunächst in 1 ml eiskaltem Homogenisationspuffer (250 mM Saccharose; 5 mM MES pH 6,25; 0,1 mM MgSO₄; 1 mM DTT (Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg); 2,5 mM Trasylol (Bayer, Leverkusen); 0,01 mM FOY-305 (Sanol-Schwarz, Monheim); 0,1 mM PMSF (Merck, Darmstadt) mit einer Schere zerkleinert und dann in 10 ml Homogenisationspuffer in einem Thomas-Homogenisator (H.A. Thomas, Philadelphia/USA) homogenisiert. Dies erfolgte bei 2500 rpm durch dreimaliges Auf- und Abbewegen des Röhrchens gegen das rotierende Teflonpistill (Fa. Braun-Melsungen). Das entstandene Homogenat wurde bei 4°C und 500xg für 10 Min. in einer Kühlzentrifuge

(Modell RT 6000D) im Rotor Sorvall H1000B zentrifugiert, um Zellkerne und Zelltrümmer zu pelletieren. Dieses Pellet (P1) wurde auf Eis aufbewahrt, und der Überstand wurde erneut zentrifugiert (10 Min. bei 2000xg und 4°C). Das resultierende Pellet bestand aus weißen ZG, die von einer braunen Schicht aus Mitochondrien überlagert waren. Zur Erhöhung der ZG-Ausbeute wurde Pellet P1 mit dem Überstand der letzten Zentrifugation vereinigt und nochmals im Homogenisator, wie bereits beschrieben, homogenisiert. Die beiden oben genannten Zentrifugationsschritte wurden wiederholt. Die braune Mitochondrienschicht wurde mit Homogenisationspuffer gut von den ZG ab gespült und dann erneut zentrifugiert (10 Min., 2000xg, 4°C). Das resultierende Pellet enthielt nochmals ZG und Mitochondrien, die wieder mit Homogenisationspuffer ab gespült wurden. Die ZG wurden in Homogenisationspuffer resuspendiert und für 20 Min. bei 2000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die ZG in 10 ml 50 mM Hepes-Puffer mit pH 8,0 aufgenommen. Zur Trennung des Zymogengranuluminhalts (ZGI) und der Zymogengranulamembranen (ZGM) wurden sie dann ü.N. bei -20°C eingefroren.

2.14.2. Trennung von Zymogengranulainhalt (ZGI) und Zymogengranulamembran (ZGM)

Die bei -20°C eingefrorenen ZG (s. 2.14.1) wurden durch langsames Auftauen und durch den alkalischen pH-Wert des Puffers (50 mM Hepes pH 8,0) lysiert. Zur Trennung von ZGI und ZGM wurden sie für 30 Min. bei 100000xg und 4°C in der UZ (Modell Sorvall Combi Plus, Dupont Company, Wilmington, Delaware, USA) mit dem Rotor SW50.1 (Beckman, München) zentrifugiert. Der Überstand entspricht ZGI und wird für weitere Versuche bei -20°C eingefroren. Das Pellet entspricht ZGM und wurde in 1 ml 50 mM Hepes pH 8,0 resuspendiert.

2.14.3. Herstellung des ZGM-Extraktes

Man kann von ZGM (s. 2.14.2) periphere Proteine ablösen, indem man 1 ml in Hepes resuspendierte ZGM mit 1 ml 300 mM NaHCO₃-Puffer pH 11,5 für 2 h bei 4°C inkubiert. Durch Ultrazentrifugation dieses Ansatzes bei 100000xg und 4°C für 30 Min. in der UZ (Modell Sorvall Combi Plus, Dupont Company, Wilmington, Delaware, USA) gelangen die

peripheren Membranproteine in den Überstand, während die gewaschenen Membranen das Pellet bilden und in 200 µl 50 mM Hepes pH 8,0 aufgenommen wurden. Der so gewonnene ZGM-Extrakt wurde bei -20°C gelagert.

2.14.4. Isolierung von ZG aus AR4-2J-Zellen über Sucrosegradientenzentrifugation

Es wurden kontinuierliche Dichtegradienten aus Sucrose eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine isopyknische Zentrifugation (= Sedimentations-Gleichgewichtszentrifugation), bei der Teilchen unterschiedlicher Dichte getrennt werden können. Durch eine lange Zentrifugation mit hoher Geschwindigkeit kommt es zur Gleichgewichtseinstellung. Die Teilchen bleiben im Schwebезustand, wenn ihre Dichte und die Dichte des umgebenden Mediums gleich sind.

Pro Fraktionierungsansatz wurden 5 55cm² Zellkulturflaschen mit AR4-2J-Zellen, die 72 Stunden mit Dexamethason stimuliert waren (s. 2.13.3), verwendet. Das Zellkulturmedium der 5 Flaschen wurde abgesaugt und die Zellen 2x mit je 7 ml eiskaltem 10 mM Tris-HCl pH 8,0 gewaschen. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vom Schalenboden abgekratzt und in 1,6 ml eiskaltem Tris-HCl pH 8,0 je Flasche aufgenommen. Die Zellen der 5 Flaschen wurden in einen Glass-Dounce-Homogenisator (Kontes Glass Co., Vineland, N.J./USA) gegeben und auf Eis durch 15 *strokes* homogenisiert. Danach wurden 2 ml 50% (w/w) Sucrose, 100 µl 300 mM MgSO₄, 100 µl 1 M NaCl, 10 µl 1 M DTT und 10 µl 0,1 M PMSF zugegeben. Das Homogenat wurde dann 10 Min. bei 4°C mit 700xg in der Sorvall-Zentrifuge (Modell RT 6000D) im Swing-Out-Rotor Sorvall H1000B zentrifugiert, was zum Abtrennen von Zellkernen und nicht-lysierten Zellen führte. Zur anschließenden Trennung von membranumhüllten Kompartimenten wurde der postnukleäre Überstand (PNS) 1 Stunde bei 4°C mit 105000xg in der Ultrazentrifuge im Rotor TY65 zentrifugiert. Die sedimentierten Organellen wurden in 1 ml eiskaltem 10 mM Tris-HCl pH 8,0 aufgenommen. Mit einem Gradientenmischer und einer Peristaltikpumpe (Abimed Gilson, Minipuls 2; Villiers/F) wurden in Beckman-Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (Beckman Instruments Inc., Palo Alto/USA) kontinuierliche Dichtegradienten zwischen 20% und 50%, 20% und 60% sowie 40% und 60% mit einem Volumen von 11 ml durch Unterschichten hergestellt. Dazu wurden in die erste Kammer des Gradientenmischers 5,5 ml einer 20% Sucroselösung (w/w: 20 g Sucrose + 80 ml Tris-HCl pH 8,0) oder 5,5 ml

einer 40% Sucroslösung (w/w: 40 g Sucrose + 60 ml Tris-HCl pH 8,0) und in die zweite Kammer 5,5 ml einer 50% oder 60% Sucroslösung (w/w) eingefüllt und durch das Mischungs- und Unterschichtungsprinzip entstand ein kontinuierlicher Gradient. Die zuvor gewonnene Zellorganellensuspension (1 ml) wurde auf diesen Sucrosegradienten aufgetragen und 5 Stunden bei 4°C mit 112500xg im Ausschwingrotor TH 642 in der Sorvall-Ultrazentrifuge (Dupont) zentrifugiert. Danach wurde vorsichtig am Röhrchenboden von außen eine Kanüle eingestochen, über die der Sucrosegradient in Fraktionen von ca. 350 µl gesammelt wurde. Die Dichte der Fraktionen wurde durch Messung der Sucrosekonzentration mit 25µl pro Fraktion mit dem Abbe-Refraktometer (Carl Zeiss, Oberkochen) bestimmt. Des weiteren wurden die Fraktionen auf ihren Gehalt an unterschiedlichen Zellorganellen hin mittels Enzym-Assays untersucht (s. 2.15). Außerdem wurden Gradienten mit dem Lymphozytentrennmedium von PAA, Linz/A hergestellt. Dafür wurden 11 ml dieser gebrauchsfertigen Lösung in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und die Probe darauf pipettiert. Diese Gradienten wurde ebenso behandelt wie oben beschrieben.

2.15. Enzymatische Bestimmungen

2.15.1. Bestimmung der Amylase-Aktivität (Bergmeyer, 1974)

Die Amylase ist ein Enzym, das die 1,4 α -glykosidischen Bindungen in Polysacchariden wie Stärke, Glykogen, etc. hydrolysiert. Dadurch entstehen Hemiacetale mit reduzierenden Gruppen, die das Farbreagenz 2-Hydroxy-3,5-dinitrobenzoesäure zu Nitroaminosalicylsäure umsetzen. Die Konzentration des entstandenen Produkts wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 530 nm bestimmt und entspricht der Konzentration der neugebildeten Endgruppen und somit direkt der Enzymaktivität.

Je 1µl der Proben wurde mit Tritonpuffer (0,3 g NaH₂PO₄ x H₂O; 0,39 g Na₂HPO₄ x 2H₂O; 0,29 g NaCl; 0,5 g Triton X-100 ad 250 ml H₂O pH 6,9) auf 250 µl aufgefüllt. Ebenso wurden 0-60 µl eines Maltosestandards (10 mg Maltose/ml H₂O) mit Tritonpuffer auf 250 µl gebracht. Diese Schritte erfolgten auf Eis. Aus 10x Stärkepuffer (1,25 g NaH₂PO₄ x H₂O; 1,56 g Na₂HPO₄ x 2H₂O; 1,17 g NaCl ad 100 ml H₂O pH 6,9) wurde die

Stärkegebrauchslösung (1% (w/v) Stärke in 1x Stärkepuffer) hergestellt. Die Proben sowie die Stärkegebrauchslösung wurden 5 Min. bei 30°C im Wasserbad vorinkubiert. Danach wurden je 250 µl der Stärkegebrauchslösung zu den Ansätzen hinzugegeben und 5 Min. im Wasserbad bei 30°C inkubiert. Dann wurde 1 ml Farbreagenz (1 g 2-Hydroxy-3,5-dinitrobenzoesäure; 1,12 g KOH; 0,6 g Kalium-Natriumtartrat ad 100ml H₂O) zugesetzt und die Amylase 10 Min. im kochenden Wasserbad inaktiviert. Anschließend wurden 3,5 ml H₂O zugegeben und nach Abkühlen die Extinktion im Spektralphotometer Cadas 100 (Dr. Lange, Düsseldorf) bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen. Aus den Eichpunkten erhält man nach linearer Regression die den Proben entsprechenden Enzymkonzentrationen, die mit der Verdünnung multipliziert und durch die Inkubationszeit dividiert (5 Min.) die Amylase-Aktivität (U Amylase/ml in µmol/Min.) ergeben.

2.15.2. Bestimmung der sauren Phosphatase

Die saure Phosphatase fungiert als Markerenzym für lysosomale Zellorganellen mit einem pH-Wert < 6. Sie katalysiert bei saurem pH die Abspaltung von Phosphatgruppen. Als Substrat bei diesem Assay wird 4-Methylumbelliferylphosphat verwendet, eine Substanz, die durch Einwirkung der sauren Phosphatase in einen fluoreszierenden Farbstoff umgewandelt wird. Dadurch kommt es zur Änderung der spektralen Eigenschaften der Substanz. Das Absorptionsmaximum liegt bei 360 nm. Nach enzymatischer Umsetzung des Substrats kommt es zur Blaufluoreszenz mit einem Emissionsmaximum von 450 nm bei pH 9.

Als Stocklösungen wurden angesetzt:

4-Methylumbelliferylstocklösung: 0,1 M 4-Methylumbelliferylphosphat in 1 ml DMSO

Substratpuffer: 0,1 M Natriumcitrat-NaOH pH 4,5.

50 µl zu testende Probe der Sucrosegradienten (s. 2.14.4) wurden auf Eis mit 150 µl Substratlösung (0,1 M Natriumcitrat-NaOH pH 4,5; 0,1% (v/v) Triton X-100, 1 mM Methylumbelliferylphosphat) in 2 ml-Reaktionsgefäßen gemischt. Dieser Ansatz wurde bei 37°C 30 Min. im Wasserbad inkubiert. Danach wurden 1,8 ml Stopplösung (50 mM Glycin-NaOH pH 10,5; 5 mM EDTA) hinzugegeben, was zu einem pH-*shift* auf pH 9 führt und das Enzym inaktiviert. Die Proben wurden dann wieder auf Eis gestellt. Im Spektralfluoreszenzphotometer (Kontron Instruments, Zürich) wurden die Proben mit einer

Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm gemessen. Da hier nur die Verteilung des Markerenzym im Dichtegradienten interessierte, wurden die absoluten Messwerte der jeweiligen Fraktionen in Relation zum höchsten Messwert (100%) dargestellt.

2.15.3. Bestimmung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität

(modifiziert nach Davies, G.A. und Bloom, F.E., 1973)

Zur Lokalisierung der Mitochondrien in den Fraktionen eines Dichtegradienten, in dem durch Zentrifugation eines postnukleären Überstandes homogener Zellen die subzellulären Kompartimente gemäß ihrer Dichte separiert worden waren, wurde die Aktivität des mitochondrialen Markerenzym Succinat-Dehydrogenase bestimmt. Hierbei handelt es sich um einen kolorimetrischen Assay, bei dem Jodnitrotetrazoliumsalz (INT) als Substrat zugegeben und von der Succinat-Dehydrogenase reduziert wird. Dadurch verschiebt sich das Extinktionsmaximum des INT von 300 nm nach 490 nm proportional zur Enzymaktivität. Als INT wurde hierbei 3-(p-Nitrophenyl)-2-(p-jodphenyl)-5-phenyl-tetrazoliumchlorid (Serva, Heidelberg) verwendet.

Die Sucrosegradientenfraktionen (s. 2.14.4) wurden mit 750 µl Verdünnungspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA) versetzt und 30 Min. bei 4°C mit 100000xg zentrifugiert. Die Organellenpellets der einzelnen Sucrosegradientenfraktionen wurden in je 50 µl Verdünnungspuffer aufgenommen und bei 37°C 10 Min. reaktiviert. Anschließend wurden 300 µl Reaktionspuffer (10 mM Natriumsuccinat; 50 mM NaH₂PO₄ pH 7,5) zugegeben. Danach wurden noch 100 µl der INT-Substratlösung (2,5 mg INT/ml Reaktionspuffer) zugesetzt und 10 Min. bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Stopplösung (Essigsäureethylester:Ethanol:TCA = 5:5:1) abgestoppt. Die Proben wurden gegen einen Leerwert (300 µl Reaktionspuffer, 100 µl INT-Lösung und 1 ml Stopplösung) bei 490 nm in einem Spektralphotometer (Cadas 100, Dr. Lange, Düsseldorf) gemessen. Die absoluten Messwerte der einzelnen Fraktionen wurden in Relation zum höchsten Messwert (100%) dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Identifizierung der Bindedomäne des Serglycin an ZG 16

In vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde ein hochmolekulares Molekül im Inhalt der Zymogengranula der Azinuszellen des exokrinen Rattenpankreas als Bindungspartner des sekretorischen Lektins ZG 16 gefunden (Licht, A., 2000; Biederbick et al., 2003). Die Aminosäurezusammensetzung des isolierten hochmolekularen Moleküls deutete auf das Proteoglykan Serglycin hin. Um dies zu überprüfen, wurde die Rattenpankreas-cDNA von Serglycin kloniert, und Serglycin-mRNA konnte dann durch reverse Transkriptions-PCR in Pankreasgewebe und AR4-2J-Zellen nachgewiesen werden. Mit einem polyklonalen Antikörper gegen das Serglycin-*core*-Protein konnte dieses in den Granula lokalisiert werden. Das Proteoglykan Serglycin scheint hier eine Funktion bei der Sortierung und Verpackung der Zymogene zu haben. Wurde durch Zugabe von Xylosid oder durch Mutation die Anheftung der Glykosaminoglykane an das *core*-Protein verhindert, kam es zur Beeinträchtigung der Sortierung des Serglycin und sekretorischer Enzyme, wie Procarboxypeptidase A und Amylase (Biederbick et al., 2003).

Vorarbeiten ließen darauf schließen, dass die Interaktion zwischen ZG 16 und Serglycin zuckerunabhängig über Protein-Protein-Wechselwirkungen stattfindet. Dem Lektin ZG 16 wird eine Rolle als Vermittlerprotein zwischen der Zymogengranulamembran (ZGM) und Proteinen des Zymogengranuluminhalts (ZGI) zugewiesen, da es die Zymogenaggregate an die Granulamembran bindet (Kleene et al., 1999b). Im Weiteren sollte nun diese Interaktion zwischen ZG 16 und Serglycin detaillierter untersucht werden, da dem Serglycin möglicherweise eine *linker*-Funktion zukommt und es Zymogenaggregate über das ZG 16 an die Granulamembran bindet.

3.1.1. Herstellung der GST-SGC- und GST-SGN-Fusionsproteine

Es ist die Aminosäuresequenz des Serglycin dargestellt. Bei dem kursiv geschriebenen Abschnitt handelt es sich um das Signalpeptid, das allen Angaben nach bei Eintritt in den sekretorischen Weg abgespalten wird. Daher ist es im reifen Protein nicht mehr vorhanden und wird für die Bindungsstudien und die Nummerierung der Aminosäuren

2003) erkannt (s. Abb. 5b). Auch das GST-SGN-Fusionsprotein wird von diesem Antikörper erkannt und erscheint als etwa 33kDa großes Protein (s. Abb. 5b). Zur Kontrolle, dass der Antikörper wirklich spezifisch den Serglycin-Anteil der Fusionsproteine erkennt, und nicht etwa den GST-Anteil, wurde nur das durch Expression des Vektors pGEX-6P-1 rekombinant hergestellte GST im Western-Blot getestet. Dabei zeigte sich, dass dies nicht mit dem Antikörper gegen Serglycin interagiert (s. Abb. 5b).

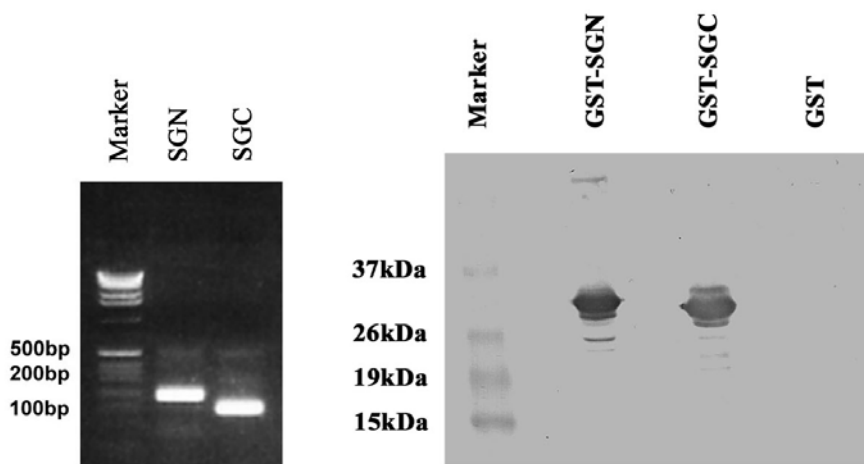


Abb. 5: Herstellung von Serglycin-Konstrukten.

a: je 8 μ l der PCR-Ansätze für SGN und SGC wurden auf ein 2% Agarosegel aufgetragen. In Spur 1 wurde zum Größenvergleich ein DNA-Marker mitaufgetragen, in Spur 2 ist SGN bei 189bp und in Spur 3 SGC bei 125bp zu sehen.

b: je 5 μ g der Fusionsproteine GST-SGN, GST-SGC und GST wurden in einem 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose gebロットet und mit einem Antikörper gegen Serglycin (1:400 in Blotto) inkubiert. In Spur 1 wurde zum Größenvergleich ein Proteinmarker aufgetragen, in Spur 2 ist GST-SGN bei ca. 33kDa und in Spur 3 GST-SGC bei etwa 31kDa zu sehen. Zur Kontrolle wurde in Spur 4 GST aufgetragen, das aber vom Serglycin-Antikörper nicht erkannt wird.

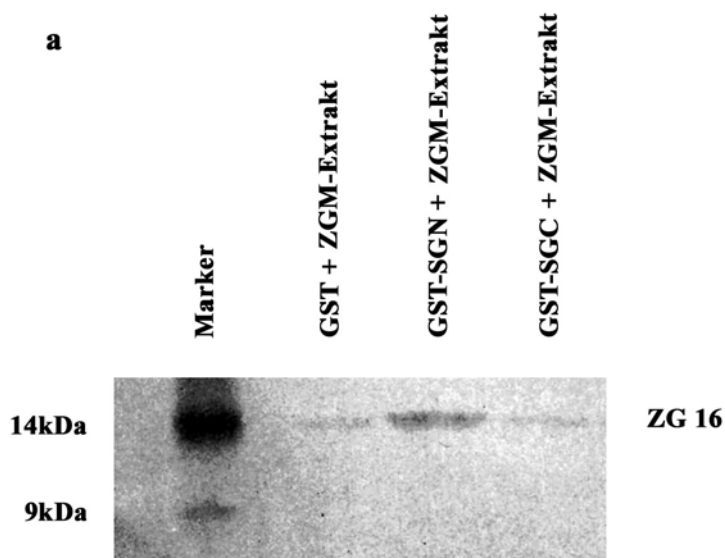
3.1.2. GST-SGN interagiert spezifisch mit der Zymogengranulamembranfraktion-Komponente ZG 16

Durch GST-pull-down und Co-Immunopräzipitation sollte herausgefunden werden, ob die Bindung des Serglycin an natives ZG 16, das eine Komponente der Zymogengranulamembran-Fraktion ZGM (s. 2.14.2) ist, über den N-terminalen Anteil SGN oder den C-terminalen Anteil SGC erfolgt. In einem weiteren Ansatz wurde getestet, ob der GST-Anteil der Fusionsproteine eine Auswirkung auf die Interaktion hat. Für den GST-pull-down wurden jeweils 50 µl der mit Fusionsprotein gekoppelten Glutathion-Sepharose (GST-Sepharose, GST-SGN-Sepharose und GST-SGC-Sepharose) mit je 20 µg ZGM-Extrakt inkubiert (s. 2.11.2). Als ZGM-Extrakt wird der NaHCO₃-Extrakt der Zymogengranulamembran-Fraktion, in dem auch das ZG 16 zu finden ist, bezeichnet (Schmidt et al., 2000) (s. 2.14.3). Nach dreimaligem Waschen (s. 2.11.2) wurden die Ansätze in einem 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt (s. 2.5.1), um die Proteine dann auf eine Nitrocellulosemembran zu transferieren (s. 2.6.3). Mit einem polyklonalen Antikörper gegen ZG 16 (Cronshagen et al., 1994) konnte festgestellt werden, dass alle drei Proteine mit ZG 16 interagieren (s. Abb. 6a). Ein Vergleich der ZG 16-Banden zeigt jedoch, dass GST-SGN das ZG 16 am besten bindet, während sich die schwachen Signale bei GST und GST-SGC in ihrer Intensität nicht unterscheiden, was zeigt, dass es sich hierbei um eine durch den GST-Anteil hervorgerufene unspezifische Interaktion handelt. Die Interaktion zwischen Serglycin und ZG 16 erfolgt demnach über den N-terminalen Anteil SGN.

Die gleichen Ergebnisse liefert auch die Co-Immunopräzipitation (s. 2.11.1). Hierfür wurde ein polyklonaler Antikörper gegen ZG 16 an Protein-A-Sepharose gekoppelt (PASαZG 16). 80 µl davon wurden mit einem Gemisch aus 30 µg ZGM-Extrakt (2.14.3) und entweder je 10 µg GST-SGN, GST-SGC oder GST inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen nach der Inkubation (s. 2.11.1) wurden unspezifische Interaktionen minimiert. Die PASαZG 16 und daran gebundene Proteine wurden in einem 12,5% SDS-PAGE (s. 2.5.1) und Immunoblot (s. 2.6.5) analysiert. Zur Überprüfung der Immunopräzipitation wurde auf der unteren Hälfte der Nitrocellulosemembran in allen drei Ansätzen das ZG 16 mit einem ZG 16-Antikörper detektiert (s. Abb. 6b). Die Effizienz dieser Immunopräzipitation war in allen drei Fällen gleich.

Die obere Membranhälfte wurde zur Analyse der Co-Immunopräzipitation mit einem Antikörper gegen GST inkubiert. Der Kontrollansatz zwischen dem PAS α ZG16-Komplex und GST führte zu einer schwachen unspezifischen Co-Präzipitation des 26kDa-GST-Proteins. Das GST-SGC-Konstrukt (31kDa) wurde ebenso schwach durch PAS α ZG16 kopräzipitiert, was auch auf eine unspezifische, durch den GST-Anteil bedingte, Interaktion schließen lässt. Signifikant größer hingegen ist die Menge des präzipitierten GST-SGN (33kDa). Dieser Unterschied im Vergleich zum Ansatz mit GST bzw. GST-SGC ist auf eine spezifische Interaktion zwischen dem SGN-Anteil mit dem ZG 16 zurückzuführen. In diesem Ansatz ist auch etwas GST zu detektieren, da die Expression des GST-SGN-Vektors nicht durchgängig das vollständige Fusionsprotein lieferte.

Sowohl der GST-pull-down, wie auch die Co-Immunopräzipitation, welche mehrmals durchgeführt wurden, zeigen somit, dass die Serglycin-Interaktion mit ZG 16 durch den N-terminalen unverzuckerten Abschnitt SGN erfolgt, dass aber der GST-Anteil der Fusionsproteine einen störenden Einfluss hat, da er selbst schon mit ZG 16 interagiert. Weitere Experimente, in denen der GST-Anteil entfernt wurde, sollen die Bindung von SGN an ZG 16 untermauern.



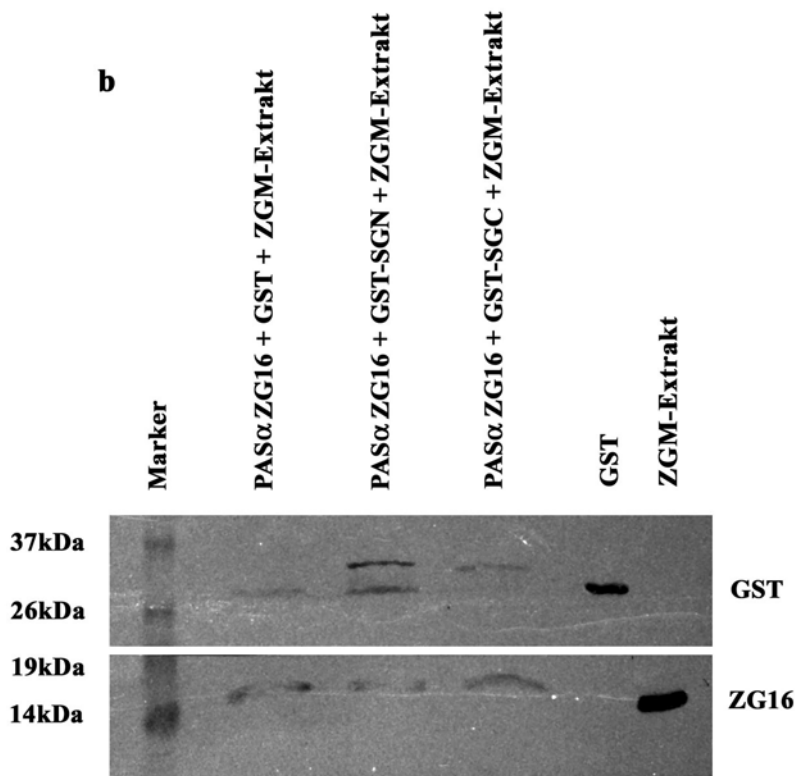


Abb. 6: GST-pull-down und Co-Immunopräzipitation mit GST-SGN und GST-SGC.

a: GST-pull-down. Je 50 μ l der mit den Proteinen GST, GST-SGN und GST-SGC gekoppelten Glutathion-Sepharose wurden mit je 20 μ g ZGM-Extrakt 1,5 h inkubiert. Die Ansätze wurden nach mehrmaligem Waschen in einem 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblotet und mit einem Antikörper gegen ZG 16 (1:1000 in Blotto) inkubiert.

b: Co-Immunopräzipitation. Je 80 μ l PAS α ZG 16 wurden mit einem vorinkubierten Gemisch aus 30 μ g ZGM-Extrakt mit entweder 10 μ g GST, GST-SGN oder GST-SGC 1,5 h inkubiert. Die Ansätze wurden in einem 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblotet und diese dann halbiert. Der obere Teil wurde mit einem GST-Antikörper (1:300 in Blotto) und der untere Teil mit einem ZG 16-Antikörper (1:1000 in Blotto) inkubiert.

3.1.3. Enzymatische Abspaltung des GST-Anteils

Um die Bindung des GST bei Bindungsexperimenten mit Serglycin-Konstrukten und ZG 16 zu verhindern, wurde der GST-Anteil der Fusionsproteine mit dem Enzym PreScissionTM Protease abgespalten (s. 2.4.3). Nach dem enzymatischen Verdau wurde sowohl das GST, wie auch das Enzym, das einen GST-Tag trägt und an die Glutathion-Sepharose bindet, aus dem Ansatz entfernt. Zur Kontrolle wurden die beiden Serglycinpeptide (SGN und SGC) nach dem Verdau in einem Tricin-SDS-Gel (TSDS-

Gel) aufgetrennt (s. 2.5.2) und mittels Coomassiefärbung (s. 2.6.1) sichtbar gemacht. Es musste ein TSDS-Gel verwendet werden, da die Peptide für SDS-Gele zu klein sind. Die Peptide haben ein Molekulargewicht von ca. 7kDa (SGN) und 4,6kDa (SGC). Allerdings laufen sie in diesem Gelsystem verglichen mit den Markerbanden nicht in den zu erwartenden Höhen. Bei beiden Ansätzen sind keine nennenswerten Kontaminationen durch GST (in Höhe von 26kDa), die GST-Fusionsproteine (GST-SGN: 33kDa und GST-SGC: 31kDa) oder das Enzym (ca. 46kDa) mehr zu sehen (s. Abb. 7). Diese Serglycinpeptide wurden für weitere Experimente verwendet.

Die geringe Größe der Peptide stellte für das Blotting ein Problem dar. Es war nicht möglich, die Peptide quantitativ aus dem TSDS-Gel auf eine Membran zu transferieren. Das SGN verblieb zum großen Teil im Gel, wo es nach der Blotprozedur noch nachweisbar war. Das SGC war nach dem Blotting weder auf der Membran, noch im Gel nachweisbar. Es bleibt unklar, ob es während des Blotprozesses durch die spezielle Immobilon PSQ-Membran (Millipore) hindurchgeht, oder ob es aufgrund seiner Ladung nicht mit dieser Membran interagiert und so während des Transfers verloren geht. Aus diesen Gründen mussten Experimente für die Bindungsstudien ausgewählt werden, bei denen die Peptide selbst nicht geblottet werden mussten.

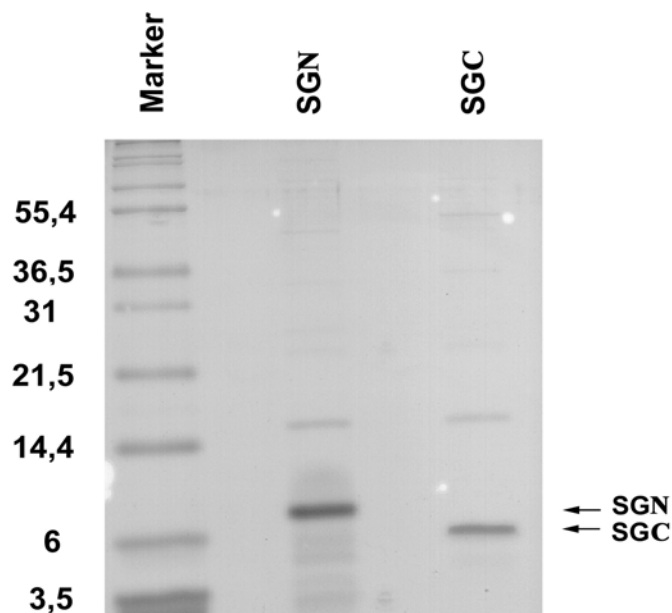


Abb. 7: Enzymatische Abspaltung des GST-Anteils der Fusionsproteine.

Nach 16 stündigem Verdau bei 4°C mit der PreScission™ Protease wurde jeweils ein Aliquot in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und in einem TSDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung analysiert. In der ersten Spur ist der Mark 12™ MW Standard (Invitrogen)

aufgetragen. Die zweite Spur zeigt das vom GST abgespaltene SGN bei ca. 7kDa und die dritte Spur das vom GST abgespaltene SGC bei etwa 4,6kDa.

3.1.4 In Cross-linking-Experimenten interagiert ZG 16 mit dem SGN-Peptid

Um das bereits dargelegte Problem des Transfers der SGN- und SGC-Peptide auf eine Membran zu umgehen, wurden nun Cross-link-Experimente durchgeführt, in denen die Interaktionen dieser Peptide mit dem in der Membranfraktion ZGM enthaltenen ZG 16 analysiert werden sollten.

Zunächst wurden die Peptide SGN und SGC mit dem trifunktionellen Cross-linker Sulfo-SBED gekoppelt (s. 2.11.4). Dieser Cross-linker trägt Biotinreste, die auf Bindungspartner übertragen werden. Durch nachfolgende Spaltung einer Cross-linker-internen Disulfidbrücke trägt dann der Bindungspartner das Biotin, wobei sein Molekulargewicht und somit sein Laufverhalten im SDS-PAGE nicht verändert werden. Der Nachweis der biotinylierten Bindungspartner erfolgt über Inkubation mit HRP-gekoppeltem Neutravidin und anschließender Chemilumineszenz durch ECL (s. 2.11.4). Nach Bindung des Liganden wurde der Ansatz zentrifugiert, um Membranen und daran gebundene Proteine zu pelletieren. Das Pellet (P) und der Überstand (Ü) wurden durch SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrocellulosemembran analysiert.

Bei dem Ansatz, bei dem der Cross-linker an SGN gekoppelt wurde, sind vor allem in der durch Zentrifugation entstandenen membranhaltigen Pelletfraktion Signale zu sehen. Besonders auffällig ist eine Doppelbande unter der 21kDa-Markerbande (Abb. 8a). Die untere der beiden Banden konnte auf derselben Nitrocellulosemembran durch Inkubation mit einem Antikörper als ZG 16 identifiziert werden (s. Abb. 8a ZG 16-WB). Die darüberliegende Bande konnte nicht identifiziert werden. Neben diesen gibt es noch weitere Banden um 68kDa. Es könnte sich dabei um weitere Komponenten der ZGM-Fraktion handeln, z.B. um periphere oder integrale Membranproteine, die als Interaktionspartner des N-terminalen Anteils von Serglycin fungieren.

In der durch Zentrifugation entstandenen Überstandfraktion (Ü) sind ebenfalls Proteine zu detektieren. Die ZG 16-Bande ist nicht nachweisbar. Ebenso verhält es sich mit der Bande darüber. Es finden sich einige Proteine im Bereich über 60kDa. Ob einzelne davon mit den bereits beschriebenen Proteinen der Pelletfraktion identisch sind oder nicht, kann nicht entschieden werden. Möglicherweise handelt es sich um Zymogenkontaminationen. Da die Trennung der Granula in ZGI und ZGM nie

vollständig erfolgt, ist das Vorkommen von geringen Zymogenkontaminationen hier zu erwarten.

Bei dem Ansatz, bei dem SGC mit dem Cross-linker verbunden wurde, sind kaum Banden zu sehen (Abb. 8b). Die ZG 16-Bande und die Bande darüber, die beim SGN-Ansatz so deutlich zu sehen sind, sind hier nicht detektierbar und interagieren demnach nicht mit SGC.

In der Überstandfraktion fällt ein Protein bei ca. 68kDa auf. In der Pelletfraktion sind lediglich zwei schwache Interaktionspartner um 65kDa zu detektieren, die nicht identifiziert werden konnten.

Auch mit diesen Cross-linking-Experimenten kann gezeigt werden, dass das Serglycin über den N-terminalen Bereich (SGN) mit ZG 16 interagiert. Neben ZG 16 gibt es möglicherweise noch weitere Interaktionspartner des Serglycin-core-Proteins.

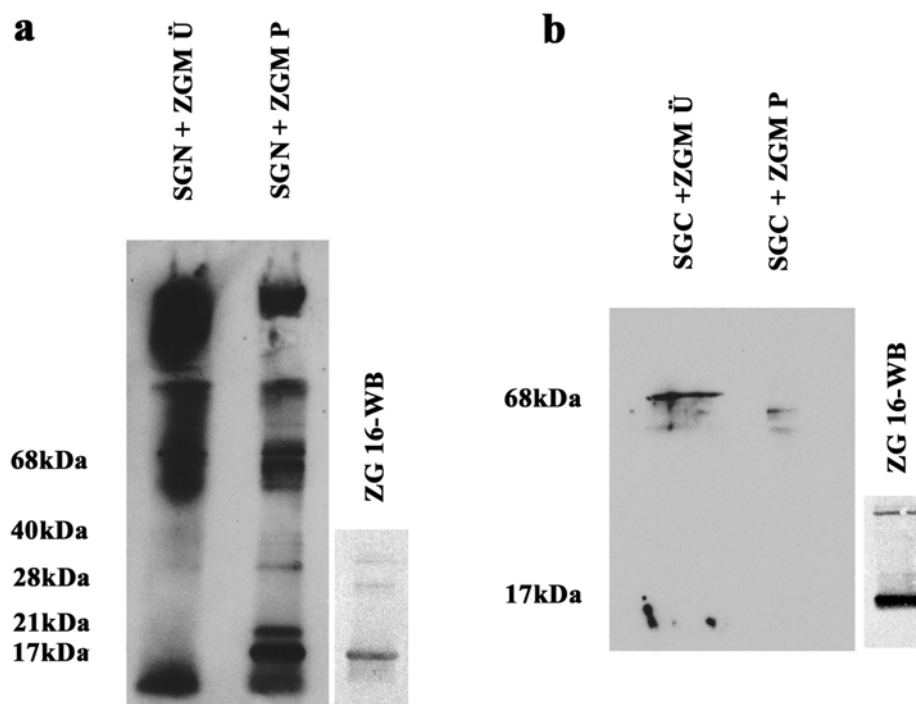


Abb. 8: Cross-linking-Experimente mit rekombinantem SGN (a) und SGC (b).

Je 200 µg der rekombinanten Proteine wurden mit dem Cross-linker gekoppelt und mit 100 µg ZGM inkubiert. Anschließend wurde eine Zentrifugation angeschlossen, bei der es zur Pelletierung der Membrankomponenten kam. Jeweils $\frac{1}{4}$ der Ansätze wurden auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und 1h mit Neutravidin-HRP inkubiert. In den ersten Spuren (SGN/SGC + ZGM Ü) sind jeweils die nach Zentrifugation erhaltenen Überstände aufgetragen, in der zweiten Spur (SGN/SGC + ZGM P) die gewonnen

Pellets und in der dritten Spur (ZG 16-WB) wurde die Membran einer Western-Blot-Analyse mit einem ZG 16-Antikörper unterzogen. Die Detektion der biotinylierten Proteine erfolgte durch HRP-gekoppeltes Neutravidin, ECL und Auflegen eines Röntgenfilms. Zum Größenvergleich wurde bei beiden Ansätzen ein Proteinmarker mitaufgetrennt.

3.1.5 Auch im Ligandenblot interagiert ZG 16 mit dem SGN-Peptid

Neben der Methode des Cross-linking sollte die Interaktion von Serglycin mit ZG 16 noch durch eine weitere Methode abgesichert werden. Um auch hierbei das Transfer-Problem der Serglycinpeptide auf eine Membran zu umgehen, wurde die Ligandenblot-Methode verwendet.

Je 50 µg ZGM wurden in die Taschen eines SDS-Gels gegeben, gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.5.1), auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (s. 2.6.3) und einem Ligandenblot unterzogen (s. 2.11.3). Dafür wurde die Nitrocellulosemembran mit den nach dem Blotten darauf befindlichen Proteinen in vertikale Streifen geschnitten, so dass jeder Streifen einer Proteinspur entsprach. Nach Waschen mit Puffern abnehmender Guanidinium-Hydrochlorid (GuHCl)-Konzentration, was zur Denaturierung und langsamen Renaturierung der Proteine auf der Membran führte, wurden die Streifen über Nacht mit verschiedenen Peptiden inkubiert. Je 100 µg Peptid Volle-Länge-Serglycin SG (S. 2.4.1) (Abb. 9a) bzw. SGN und SGC (Abb. 9b) wurden in 5 ml Puffer auf je einen Blotstreifen gegeben. Am nächsten Tag wurden die Blotstreifen gewaschen und dann mit einem Antikörper gegen Serglycin inkubiert (s. 2.6.4). Nach Zweitantikörperinkubation wurde die Färbelösung zugegeben. Um die Spezifität der erhaltenen Signale zu überprüfen, wurde außerdem in einer normalen Western-Blot-Prozedur (s. 2.6.3) je ein Streifen mit einem Antikörper gegen ZG 16 inkubiert.

In Abb. 9a ist in der Ligandenblotspur des Volle-Länge-Serglycin (SG) ein deutliches Signal bei 14kDa zu detektieren und ein wesentlich schwächeres bei etwa 19kDa. In mehreren weiteren Durchführungen dieses Ligandenblots war das ca. 19kDa große Protein deutlicher zu sehen (vgl. Abb. 16). Nur in diesem Fall ist es sehr schwach und durch phototechnische Verluste kaum noch zu erkennen. Die Kontroll-Western-Blotspur gegen ZG 16 zeigt ein Signal, das das gleiche Molekulargewicht und ein identisches Laufverhalten aufweist, wie das 14kDa große Signal aus dem Ligandenblot. Der Abb. 9b ist zu entnehmen, dass das SGN ebenfalls an die beiden Proteine zwischen

14 und 19kDa bindet. Auch in diesem Fall ist die Interaktion mit dem etwa 19kDa großen Protein hier kaum zu erkennen. Bei der kleineren Bande (ca. 14kDa) konnte wie auch oben schon gezeigt, durch eine Kontrollspur, die mit einem Antikörper gegen ZG 16 inkubiert wurde, nachgewiesen werden, dass es sich um das Protein ZG 16 handelt, da die Formen der Banden und das Laufverhalten sich entsprachen. Beim SGC-Ansatz (Abb. 9b) sind im Ligandenblot keine Banden zu detektieren. Dieses Peptid interagiert demzufolge nicht mit ZG 16.

Auch durch die Bindungsstudien mittels Ligandenblot konnte gezeigt werden, dass das Serglycin über die N-terminale unverzuckerte Domäne SGN mit ZG 16 interagiert. Diese Interaktion sollte im Weiteren näher untersucht werden.

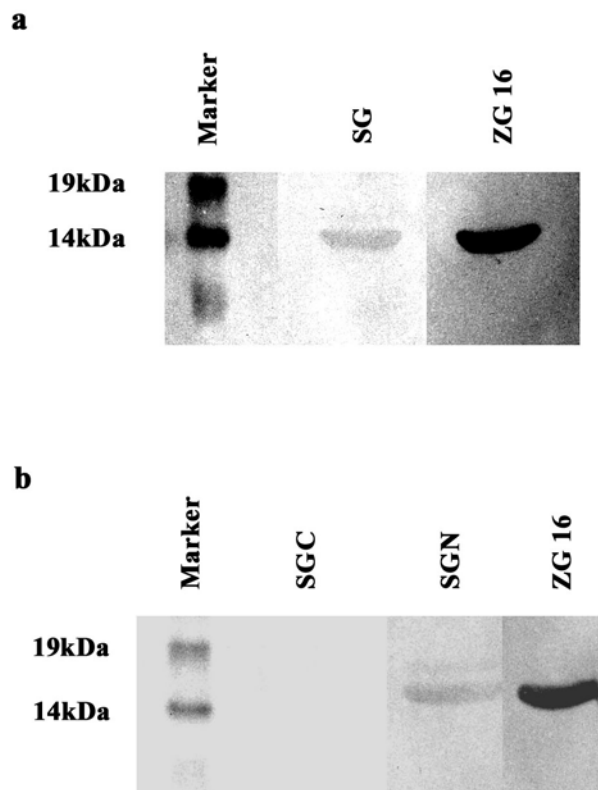


Abb. 9: Ligandenblot mit SG, SGC und SGN.

a: Ligandenblot mit SG. In einem 12,5% SDS-PAGE wurden in den Spuren 2 und 3 50 µg ZGM aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. In Spur 1 ist zum Größenvergleich ein Proteinmarker aufgetragen. Spur 2 wurde über Nacht bei 4°C mit 100 µg SG und danach mit einem Serglycin-Antikörper (1:400 in Blotto) inkubiert. Spur 3 wurde mit einem ZG 16-Antikörper (1:1000 in Blotto) inkubiert.

b: Ligandenblot mit SGC und SGN. In einem 12,5% SDS-PAGE wurden in den Spuren 2, 3 und 4 je 50 µg ZGM aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. In Spur 1 wurde ein

Proteinmarker aufgetragen. Spur 2 wurde dann mit 100 µg SGC und Spur 3 mit 100 µg SGN über Nacht bei 4°C inkubiert und dann mit einem Serglycin-Antikörper (1:400 in Blotto) inkubiert. Spur 4 wurde nur mit einem ZG 16-Antikörper (1:1000 in Blotto) inkubiert.

3.2. Herstellung der SGN-Mutanten Mut-C-13-A, Mut-C-22-A und Del loop, die einen potentiellen intramolekularen *loop* nicht ausbilden können

Bei dem N-terminalen Bereich von Serglycin (SGN), der mit ZG 16 interagiert, handelt es sich um einen Proteinabschnitt von 63 Aminosäuren. Es wird davon ausgegangen, dass das N-terminal gelegene Signalpeptid beim Eintritt in den sekretorischen Weg abgespalten wird. Daher wird mit der Nummerierung der Aminosäuren hier erst nach dem Signalpeptid begonnen.

SGN:

13 22

YPARRARYQWVRC**K**PDGIFAN**C**IEEKGPRFDLIAEESNVGPPMTDFVLMRGFPNDFFPISDY

Da dieser Abschnitt zwei Cysteinreste an den Positionen 13 und 22 enthält (fett gedruckt in der oben angegebenen Aminosäuresequenz), wäre es möglich, dass darüber ein intramolekularer *loop* ausgebildet wird, der für die Wechselwirkung mit ZG 16 von Bedeutung ist. Solche intramolekularen *loop*-Bildungen wurden z. B. in neuroendokrinen Granula für Granine beschrieben, wo sie essentiell für die Sortierung von Proteinen sind. Um dies zu überprüfen, wurden drei Mutanten des N-terminalen Serglycin-Abschnitts (Mut-C-13-A, Mut-C-22-A und Del loop) per Mutations-PCR (s. 2.3.6) mit dem Quick Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla/USA) erzeugt. Bei der Punktmutante Mut-C-13-A sollte der Cysteinrest an Position 13, bei der Punktmutante Mut-C-22-A der Cysteinrest an Position 22 jeweils durch ein Alanin ausgetauscht werden. Bei Del loop handelt es sich um eine Deletionsmutante, bei der die 5 Aminosäuren DGIFA an den Positionen 16-20 zwischen den beiden Cysteinen deletiert wurden, um so eine mögliche *loop*-Bildung zu unterbinden:

Mut-C-13-A:

YPARRARYQWVR**A**KPDGIFANCIEEKGPRFDLIAEESNVGPPMTDPVLMRGFPNDFFFPI SDY

Mut-C-22-A:

YPARRARYQWVR**RCK**PDGIFAN**A**IEEKGPRFDLIAEESNVGPPMTDPVLMRGFPNDFFFPI SDY

Del loop:

YPARRARYQWVR**RCKP**----NCIEEKGPRFDLIAEESNVGPPMTDPVLMRGFPNDFFFPI SDDY

Als DNA-*template* diente in allen drei Fällen die SGN-DNA im Vektor pGEX-6P-1. Für die Mutante Mut-C-13-A wurden die Primer Mut-C-13-A-up und Mut-C-13-A-down, für die Mutante Mut-C-22-A die Primer Mut-C-22-A-up und Mut-C-22-A-down, sowie für die Mutante Del loop die Primer Del loop-up und Del loop-down (s. 2.3.7) verwendet.

Bei den Mutanten Mut-C-13-A und Mut-C-22-A wurden die Schritte 2-4 der PCR 16 mal, bei Del loop 18 mal wiederholt. In Abb. 10a und 10b sind die PCR-Produkte aufgetrennt in 0,8% Agarosegelen (s. 2.3.8) zu sehen. Abb. 10a zeigt die DNA Mut-C-13-A und Mut-C-22-A im pGEX-6P-1 als Doppelbanden bei etwa 5200bp (Mut-C-13-A/Mut-C-22-A sind 189bp, der pGEX-6P-1 4980bp groß). Die Entstehung der Doppelbande in der PCR ist unklar. Ob eines der beiden Produkte fehlerhaft war, wurde nicht überprüft. Durch nachfolgende Sequenzierung der DNA (siehe unten) konnte sichergestellt werden, dass in den Experimenten die korrekte DNA verwendet wurde. In Abb. 10b ist Del loop in pGEX-6P-1 bei etwa 5150bp dargestellt (Del loop ist 174bp groß). Am unteren Rand sind überzählige Primer zu erkennen, die nicht in ein PCR-Produkt eingebaut wurden. Nach PCR und DpnI-Restriktionsverdau (s. 2.3.6) wurden die DNA-Konstrukte in XI-1-blue-Zellen transformiert (s. 2.2.3 b). Nach Isolierung der DNA im präparativen Maßstab (s. 2.3.2 b), wurde durch Sequenzierung festgestellt, dass die Mutationen korrekt eingeführt wurden (s. 7.1). Diese DNA-Konstrukte wurden dann zur Proteinexpression in BL-21-Zellen transformiert (s. 2.3.2 c), exprimiert und die entstandenen GST-Fusionsproteine gereinigt (s. 2.4.2). Zur Sicherstellung, dass der Antikörper gegen Serglycin die mutierten Proteine erkennt, wurden diese als GST-Fusionsproteine im Western-Blot (s. 2.6.3) getestet (Abb. 10c). Alle drei Proteine, GST-

Mut-C-13-A, GST-Mut-C-22-A und GST-Del loop werden vom Serglycin-Antikörper erkannt und wiesen das zu erwartende Molekulargewicht auf. Die beiden Punktmutanten Mut-C-13-A und Mut-C-22-A sind als GST-Fusionsproteine etwa 33kDa groß, während die Deletionsmutante Del loop als GST-Fusionsprotein ca. 32,6kDa groß ist. Der Größenunterschied ist so minimal, dass er in diesem Gelsystem nicht dargestellt werden kann. Da aus den vorher beschriebenen Experimenten ersichtlich war, dass der GST-Anteil der Fusionsproteine einen störenden Einfluss auf die Bindungsstudien mit ZG 16 hat, wurde der GST-Anteil enzymatisch abgespalten (s. 2.4.3). Die Reinheit der gewonnenen Peptide wurde mittels TSDS-PAGE (s. 2.5.2) sichergestellt (Abb. 10d). Alle drei Peptide laufen kurz über der 6kDa-Markerbande (Mut-C-13-A und Mut-C-22-A haben ein Molekulargewicht von ca. 7kDa, Del loop von ca. 6,6kDa). Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Serglycinmutanten ohne Verunreinigungen durch Fusionsprotein oder Enzym vorliegen.

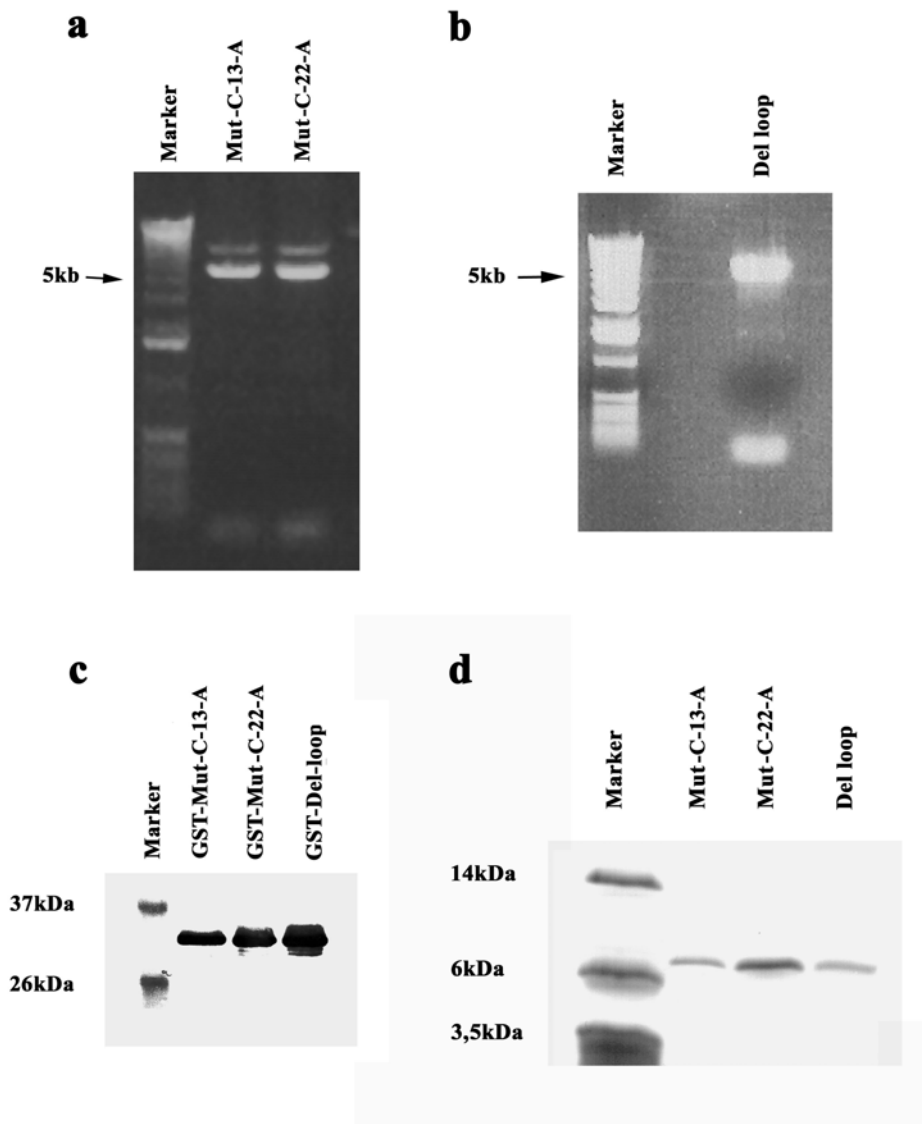


Abb. 10: Herstellung der SG-Mutanten Mut-C-13-A, Mut-C-22-A und Del loop.

Amplifizierte DNA für Mut-C-13-A und Mut-C-22-A im 0,8% Agarosegel (a) und für Del loop im 0,8% Agarosegel (b). Es wurden 5 µl der PCR-Ansätze aufgetragen. In der ersten Spur der beiden Agarosegele wurde jeweils ein DNA-Marker zum Größenvergleich aufgetragen.

c: Western-Blot mit den Fusionsproteinen GST-Mut-C-13-A, GST-Mut-C-22-A und GST-Del-loop. Es wurden jeweils 5 µg der Proteine in einem 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit einem Serglycin-Antikörper (1.400 in Blotto) inkubiert.

d: TSDS-PAGE mit Mut-C-13-A, Mut-C-22-A und Del-loop nach Abspaltung des GST-Anteils durch Verdau mit der PreScission™ Protease. Die Proteine wurden mittels Coomassiefärbung sichtbar gemacht. Es wurden je 4 µg der Proteine aufgetragen.

3.2.1. Die Interaktion von ZG 16 mit Serglycin erfolgt Disulfid-*loop* unabhängig

a) Überprüfung mittels Ligandenblot

Um herauszufinden, ob die Ausbildung eines intramolekularen *loops* nötig für die Interaktion von SGN und ZG 16 ist, wurden die Mutanten Mut-C-13-A, Mut-C-22-A und Del loop im Ligandenblot (s. 2.11.3) eingesetzt. Wie schon zuvor beschrieben, wurden auch in diesem Fall 50 µg ZGM gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.5.1), auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (s. 2.6.3) und mit je 100 µg der Mutantenpeptide inkubiert. Wieder wurde eine ZGM-Spur zur Kontrolle einer Immunoblot-Analyse (s. 2.6.5) mit einem ZG 16-Antikörper unterzogen.

Die Detektion der Serglycinmutanten, die an die auf der Membran befindlichen ZGM-Proteine gebunden hatten, erfolgte mit einem Antikörper gegen Serglycin.

Bei allen drei Mutanten sind Signale bei etwa 14 und 19kDa zu detektieren (s. Abb. 11). Allerdings ist die Effizienz der Interaktion von Mut-C-13-A etwas schwächer als die der anderen beiden Mutanten. Das Protein von ca. 14kDa lässt sich durch Vergleich mit der Kontrollspur als ZG 16 identifizieren. Die bereits erwähnte etwas höhermolekulare Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 19kDa konnte nicht identifiziert werden.

Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen, dass eine intramolekulare *loop*-Bildung des Serglycin für die Bindung an ZG 16 nicht erforderlich ist. Ob das Serglycin überhaupt solch einen intramolekularen *loop* ausbildet, kann aus diesen Experimenten nicht gefolgert werden.

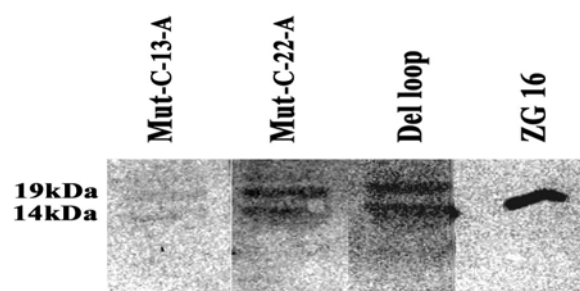


Abb. 11: Ligandenblot mit Mut-C-13-A, Mut-C-22-A und Del-loop.

Je 50 µg ZGM wurden in einem SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Spur 1 wurde mit 100 µg Mut-C-13-A, Spur 2 mit 100 µg Mut-C-22-A und Spur 3 mit 100 µg Del-loop über Nacht bei 4°C und anschließend mit einem Serglycin-Antikörper (1:400 in

Blotto) inkubiert. Spur 4 wurde zur Kontrolle nur mit einem ZG 16-Antikörper (1:1000 in Blotto) inkubiert.

b) Überprüfung mittels Cross-link-Experimenten

Um weiter abzusichern, dass eine mögliche *loop*-Bildung innerhalb des SGN nicht benötigt wird für die Interaktion mit ZG 16, wurden mit den mutierten Peptiden Mut-C-13-A, Mut-C-22-A und Del loop Cross-link-Experimente (s. 2.11.4) durchgeführt.

Sowohl bei dem Ansatz, bei dem der Cross-linker an Mut-C-13-A, wie auch bei dem Ansatz, bei dem der Cross-linker an Mut-C-22-A gekoppelt wurde, sind in der durch Zentrifugation entstandenen membranhaltigen Pelletfraktion einige Signale zu detektieren. Bei beiden Mutanten handelt es sich um ein Signal bei etwa 14kDa, das durch Inkubation derselben Membran mit einem Antikörper als ZG 16 identifiziert werden konnte, da das Signal auf dem Röntgenfilm mit dem durch Antikörper erzeugten Signal auf der Membran deckungsgleich ist (s. Abb. 12 ZG 16-WB). Weitere Signale sind bei ca. 60kDa zu sehen, bei denen es sich offenbar um andere Komponenten der ZGM-Fraktion handelt, die ebenfalls als spezifische Interaktionspartner der beiden Mutanten fungieren könnten. Auch in der nach Zentrifugation erhaltenen Überstandfraktion ist ein Signal nachzuweisen. Hierbei handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 63kDa, das eine Zymogenkontamination darstellen könnte. Das ZG 16-Signal findet sich nicht in der Überstandfraktion.

Leider ergaben sich im Folgenden Probleme mit der Methode des Cross-links. In einem weiteren Ansatz wurde getestet, wie sich die Serglycinmutante Del loop verhält. Hierfür wurde wiederum ein Cross-link-Experiment durchgeführt, wobei als Kontrollen SGN, Mut-C-13-A, Mut-C-22-A und SGC mitgeführt wurden. Hier war festzustellen, dass bei allen Konstrukten ein identisches Bandenmuster auftritt (Daten nicht gezeigt). Es fallen die Banden zwischen 14 und 19kDa auf, von denen die untere in vorherigen Experimenten als ZG 16 identifiziert werden konnte. Des Weiteren erscheint in allen Ansätzen eine Bande etwas über 26kDa, welche die dimere Form des ZG 16 darstellt. Auch im Bereich über 50kDa sind bei allen Konstrukten Banden zu detektieren. Diese Befunde widersprechen allen bisher durchgeführten Bindungsstudien, in denen gezeigt werden konnte, dass SGC nicht mit ZG 16 interagiert. Da diese möglicherweise unspezifischen Interaktionen in weiteren Cross-link-Experimenten immer wieder zu beobachten waren, mit anderen Methoden jedoch nicht untermauert werden konnten,

kann die Glaubwürdigkeit der Cross-link-Experimente nicht aufrechterhalten bleiben. Fortan wurde diese Methode nicht mehr durchgeführt, um die Bindung von Serglycin an ZG 16 zu untersuchen.

Worauf dieses Problem basiert, konnte nicht herausgefunden werden. Möglicherweise waren noch Spuren des GST-Anteils vorhanden, der nach enzymatischer Abspaltung nicht vollständig aus den Serglycinfractionen entfernt wurde. Da das GST natürlich auch den Cross-linker bindet, könnte dies eine Erklärung für das Auftreten der Banden in allen Ansätzen sein, da ja schon in vorherigen Versuchen gezeigt wurde, dass das GST eine leichte Interaktion mit ZG 16 macht (s. Abb. 6a und 6b).

Wenn man die Daten dieses letzten Cross-link-Experiments außer Acht lässt, kann man aus den Bindungsstudien folgern, dass Serglycin unabhängig von einer intramolekularen *loop*-Bildung am N-Terminus mit ZG 16 interagiert, die Bindung daher durch andere Strukturen zustande kommen muss.

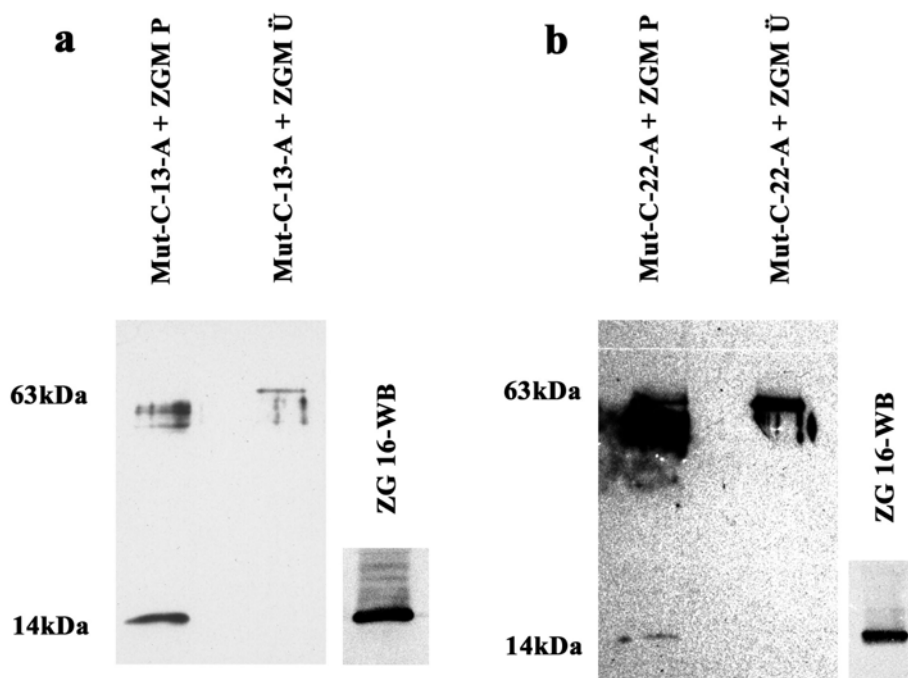


Abb. 12: Cross-linking-Experimente mit Mut-C-13-A und Mut-C-22-A.

200 µg Mut-C-13-A und Mut-C-22-A wurden mit Cross-linker gekoppelt und mit je 50 µg ZGM inkubiert. Durch Zentrifugation wurden die Ansätze in eine Pellet- (1. Spur auf den Blots) und eine Überstandfraktion (2. Spur auf den Blots) getrennt. Je ¼ der Proben wurde in einem 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit Neutravidin-HRP

inkubiert. Mittels Chemilumineszenz und anschließendes Auflegen eines Röntgenfilms konnten biotinylierte Proteine detektiert werden.

a: Cross-link mit Mut-C-13-A

b: Cross-link mit Mut-C-22-A

Bei beiden Cross-links wurde auf derselben Membran das ZG 16 mit einem Antikörper (1:1000 in Blotto) detektiert (ZG 16-WB). Zum Größenvergleich wurden Markergrößen angegeben.

3.3. Eingrenzung der Bindedomäne am N-Terminus des Serglycin, die für die Interaktion mit ZG 16 verantwortlich ist

Da sich bislang gezeigt hat, dass die Bindung von Serglycin an ZG 16 über den N-terminalen unverzuckerten Bereich erfolgt und eine intramolekulare *loop*-Bildung durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinen an Position 13 und 22 nicht erforderlich ist, wurden Deletionsmutanten des N-Terminus erzeugt. Zur Eingrenzung des Bindemotivs wurden zwei unterschiedlich lange Proteinabschnitte am N-Terminus von SGN deletiert. Bei der Mutante Del 14 wurden die 14 N-terminalen Aminosäuren entfernt, worunter 5 basisch geladene Aminosäuren sind. Die Deletionsmutante Del 22 wurde um 22 Aminosäuren am N-Terminus verkürzt, wobei es sich jeweils um die ersten 14 bzw. 22 Aminosäuren nach der Signalsequenz handelt:

Del 14:

-----PDGIFANCIEEKGPRFDLIAEESNVGPPMTDPVLMRGFPNDFFPISDDY

Del 22:

-----IEEKGPRFDLIAEESNVGPPMTDPVLMRGFPNDFFPISDDY

3.3.1. Klonierung und Expression der beiden Deletionsmutanten Del 14 und Del 22

Die beiden Mutanten Del 14 und Del 22 wurden per PCR mit den Primern Del 14 up und SGN down bzw. Del 22 up und SGN down mittels Taq-Polymerase amplifiziert (s. 2.3.5). Als DNA-*template* diente hierbei die DNA des Volle-Länge-Serglycin, die sich in dem Plasmid pQE 31 befand. Die Produkte dieser PCR sind in Abb. 13a zu sehen. In einem 2% Agarosegel (s. 2.3.8) sind Del 14 und Del 22 als DNA-Banden unterhalb der 200bp-Markerbande zu detektieren. Del 14 ist 149bp groß, während Del 22 125bp aufweist. Die beiden PCR-Produkte wurden mit dem Original TA Cloning[®] Kit ligiert und transformiert (s. 2.3.10). Nach präparativem Verdau (s. 2.3.4) wurden die beiden Deletionsmutanten in den Vektor pGEX-6P-1 ligiert (s. 2.3.11) und in XL1-blue-Zellen transformiert (s. 2.2.3 b). Nachdem durch Sequenzierung sichergestellt war, dass die Sequenz der beiden Konstrukte stimmt (s. 7.1), wurden diese in BL-21-Zellen als GST-Fusionsproteine exprimiert (s. 2.4.2). Wieder wurde dann überprüft, ob der Antikörper gegen Serglycin diese Konstrukte erkennt. In Abb. 13b sind die Ergebnisse dargestellt. Im Western-Blot ist bei jeder der beiden Mutanten eine Bande bei etwa 31kDa zu detektieren. Dadurch ist bewiesen, dass der Serglycin-Antikörper beide Deletionsmutanten, Del 14 und Del 22, erkennt. Del 14 weist als GST-Fusionsprotein ein Molekulargewicht von ca. 31,5kDa auf, während Del 22 als GST-Fusionsprotein ein Molekulargewicht etwa 30,5kDa hat. Für weitere Experimente wurde der GST-Anteil mit dem Enzym PreScission[™]Protease abgespalten (s. 2.4.3). Die entstandenen Serglycinpeptide wurden im TSDS-Gel (s. 2.5.2) analysiert (Abb. 13c). Sie erscheinen als Banden knapp unter 6kDa, wobei die Molekulargewichte von Del 14 bei 5,5kDa und von Del 22 bei 4,6kDa liegen. Die Proteine lagen ohne sichtbare Verunreinigungen durch GST und das Enzym vor.

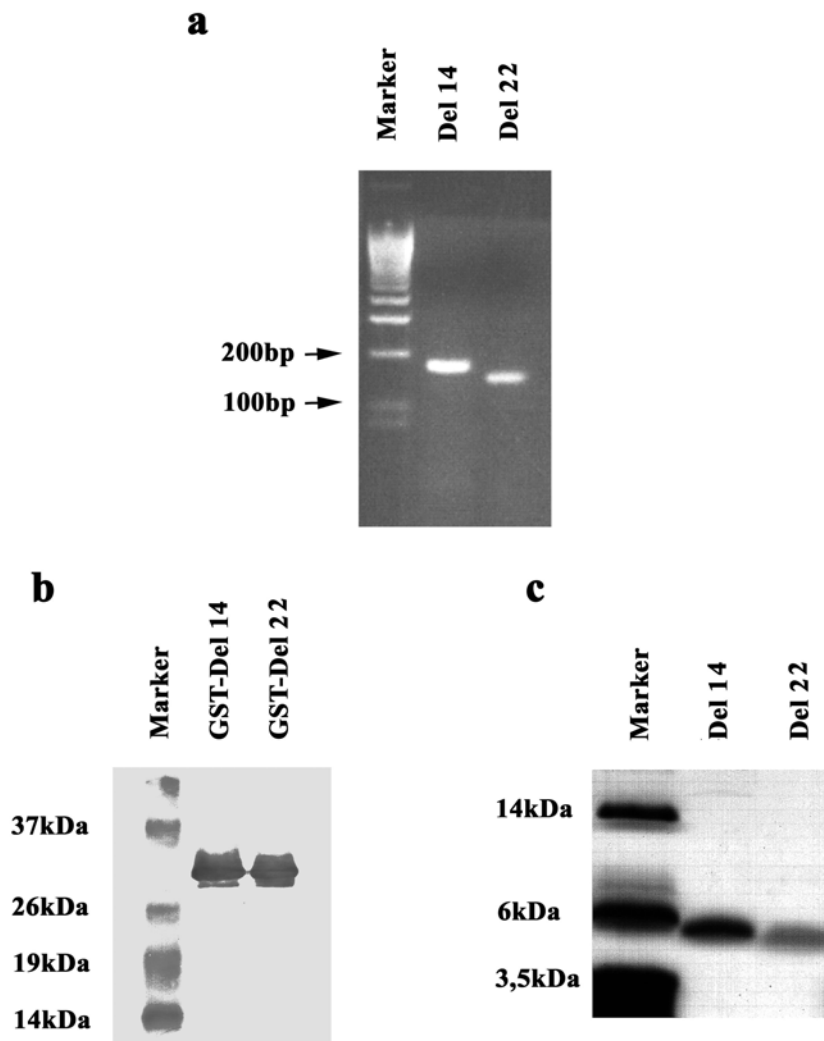


Abb. 13: Herstellung der Mutanten Del 14 und Del 22.

a: Amplifizierte DNA von Del 14 und Del 22. Je 5 μ l der PCR-Ansätze wurden in einem 2% Agarosegel analysiert. In Spur 1 wurde ein DNA-Marker zum Größenvergleich aufgetragen. In Spur 2 ist Del 14 aufgetragen, in Spur 3 Del 22.

b: Western-Blot. Je 3 μ g GST-Del 14 und GST-Del 22 wurden in einem 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit einem Serglycin-Antikörper (1:400 in Blotto) inkubiert. Zum Größenvergleich wurde in Spur 1 ein Proteinmarker aufgetragen.

c: TSDS-PAGE. Je 4 μ g der Peptide wurden nach Abspaltung des GST-Anteils aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Zum Größenvergleich wurde in Spur 1 ein Proteinmarker aufgetragen.

3.3.2. Die ersten 22 Aminosäuren des N-Terminus sind nötig für die Interaktion von Serglycin und ZG 16

Zur Analyse der Bindung dieser beiden Serglycin-Deletionsmutanten an ZG 16 wurde die Methode des Ligandenblots (s. 2.11.3) gewählt. Wieder wurde ein Membranstreifen zur Kontrolle einer Immunoblot-Analyse (s. 2.6.5) mit einem Antikörper gegen ZG 16 unterzogen. In Abb. 14 sind lediglich Signale bei der Mutante Mut-C-22-A nachzuweisen. Diese interagiert, wie schon in vorherigen Experimenten gezeigt, mit zwei Proteinen von ca. 14 und 19kDa, von denen das Protein von 14kDa wieder durch Vergleich mit der Kontrollspur als ZG 16 identifiziert werden konnte. Das Protein von 19kDa bleibt unbekannt. Bei den Ansätzen mit den Deletionsmutanten Del 14 und auch Del 22 konnten in diesem und einem weiteren Experiment reproduzierbar keine Banden auf der Nitrocellulosemembran detektiert werden. Beide Mutanten interagieren daher nicht mit ZG 16 und auch nicht mit dem Protein von ca. 19kDa. Durch die N-terminalen Deletionen bei Del 14 und Del 22 wurde das Bindemotiv vollständig oder teilweise entfernt, das für die Interaktion mit ZG 16 verantwortlich ist. Es ist diesen Ergebnissen nach unter den ersten 14-22 Aminosäuren am N-Terminus des Serglycin zu finden, die in den Deletionsmutanten entfernt wurden. Durch weitere Mutanten soll das genauere Bindemotiv eingegrenzt werden.

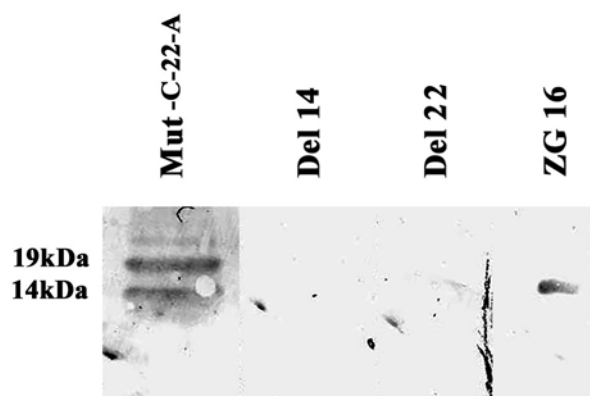


Abb. 14: Ligandenblot mit Del 14, Del 22 und Mut-C-22-A.

Pro Spur wurden 50 µg ZGM in einem 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und einer Ligandenblotanalyse unterzogen. Dafür wurde Spur 1 als Positivkontrolle mit 100 µg Mut-C-22-A, Spur 2 mit 100 µg Del 14 und Spur 3 mit 100 µg Del 22 inkubiert. Danach wurde mit einem Serglycin-Antikörper (1:400 in Blotto) inkubiert. Spur 4 wurde als Kontrolle lediglich mit einem ZG 16-Antikörper (1:1000 in Blotto) inkubiert.

3.4. Identifizierung der Aminosäuren am N-Terminus von Serglycin, die für die Bindung an ZG 16 verantwortlich sind

Um diejenigen Aminosäuren am N-Terminus von Serglycin zu identifizieren, die für die Bindung an ZG 16 essentiell sind, wurden zwei weitere Mutanten, Mut-R-12-A-K-14-A und Del 5 hergestellt. Bei der Mutante Mut-R-12-A-K-14-A wurden zwei geladene Aminosäuren (Arginin an Position 12 und Lysin an Position 14) jeweils durch die neutrale Aminosäure Alanin ersetzt, um herauszufinden, ob die Interaktion durch die positiven Ladungen dieser beiden Aminosäuren hervorgerufen wird. Bei der Deletionsmutante Del 5 wurden die ersten 5 Aminosäuren am N-Terminus (YPARR) deletiert:

Mut-R-12-A-K-14-A:

YPARRARYQWV**ACA**PDGIFANCIEEKGPREFDLIAEESNVGPPMTDPVLMRGFPNDFFPISDY

Del 5:

----ARYQWVRCKPDGIFANCIEEKGPREFDLIAEESNVGPPMTDPVLMRGFPNDFFPISDDY

3.4.1. Herstellung der Mutanten Mut-R-12-A-K-14-A und Del 5

Zur Herstellung dieser Mutanten wurden zunächst zwei cDNA-Konstrukte über PCR mit dem Quick Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene amplifiziert (s. 2.3.6). Dies erfolgte mit den Primern Mut-R-12-A-K-14-A-up und -down und Del 5-up und Del 5-down. Als *template* wurde SGN in pGEX-6P-1 verwendet. Die amplifizierte DNA wurde in einem Agarosegel (s. 2.3.8) analysiert (Abb. 15a). Es sind PCR-Produkte der erwarteten Größe von ca. 5150bp nachzuweisen. Die unteren Banden im Agarosegel stammen von den Primern aus dem PCR-Ansatz. Zum Abbau der unmutierten *template*-DNA wurde der PCR-Ansatz mit DpnI verdaut und anschließend in XL 1-blue-Zellen transformiert. Durch Sequenzierung wurde sichergestellt, dass die Mutationen korrekt eingeführt wurden (s. 7.1).

Die DNA wurde zur Proteinexpression in BL-21-Zellen transformiert (s. 2.2.3 c). Vom gereinigten GST-Fusionsprotein wurde der GST-Anteil wieder enzymatisch abgespalten (s. 2.4.3) und die gewonnenen Mut-R-12-A-K-14-A- und Del 5-Peptide im TSDS-PAGE (s. 2.5.2) analysiert, wobei Peptidbanden in der entsprechenden Höhe zu sehen sind: Mut-R-12-A-K-14-A hat ein Molekulargewicht von ca. 7kDa und Del 5 hat ein Molekulargewicht von 6,4kDa (s. Abb. 15b).

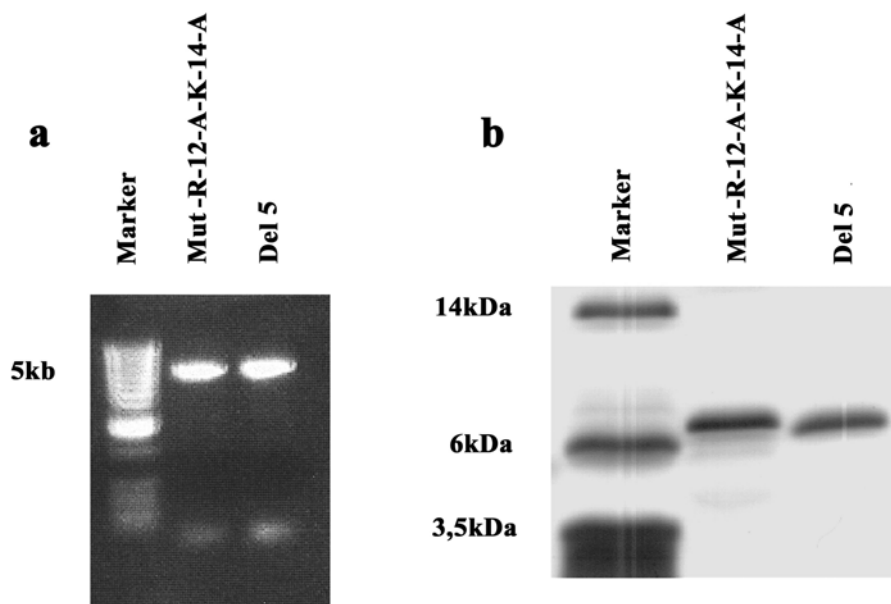


Abb. 15: Herstellung von Mut-R-12-A-K-14-A und Del 5.

a: Amplifizierte DNA von Mut-R-12-A-K-14-A und Del 5. Je 5 µl der Ansätze der Mutations-PCR wurden in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt. Zum Größenvergleich wurde in Spur 1 ein DNA-Marker mitaufgetragen.

b: TSDS-PAGE. Je 4 µg der nach Verdau mit PreScission™ Protease erhaltenen Proteine Mut-R-12-A-K-14-A und Del 5 ohne GST-Anteil wurden in einem TSDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. In Spur 1 wurde ein Proteinmarker mitaufgetragen.

3.4.2. 9 Aminosäuren des Serglycin sind für die Bindung an ZG 16 nötig

Im nachfolgenden Ligandenblot (s. 2.11.3) wurden die Peptide SGN, Mut-R-12-A-K-14-A und Del 5 auf ihre Bindung an ZG 16 untersucht. Ein Blotstreifen wurde wieder zur Kontrolle einer Western-Blot-Analyse (s. 2.6.5) mit einem Antikörper gegen ZG 16

unterworfen. In Abb. 16 sind Signale bei allen drei Konstrukten, Mut-R-12-A-K-14-A, Del 5 und SGN, zu detektieren. Es handelt sich um zwei Signale, eines bei etwa 14, und eines bei ca. 19kDa. Das 14kDa-Protein konnte wieder durch Vergleich mit der Western-Blot-Kontrollspur als ZG 16 identifiziert werden. Die beiden geladenen Aminosäuren, Arginin an Position 12 und Lysin an Position 14, die bei Mut-R-12-A-K-14-A durch Alanin ausgetauscht wurden, haben also keinen Einfluss auf die Bindung an ZG 16. Ebenso verhält es sich mit den ersten 5 Aminosäuren des N-Terminus (YPARR), die bei Del 5 fehlen. Sie sind für die Bindung von Serglycin an ZG 16 ebenfalls nicht von Bedeutung. Von Bedeutung für die Bindung von Serglycin an ZG 16 sind die den Aminosäuren YPARR nachfolgenden 9 Aminosäuren ARYQWVRCK, deren Fehlen bei der Mutante Del 14 dazu führt, dass Del 14 nicht mit ZG 16 interagieren kann.

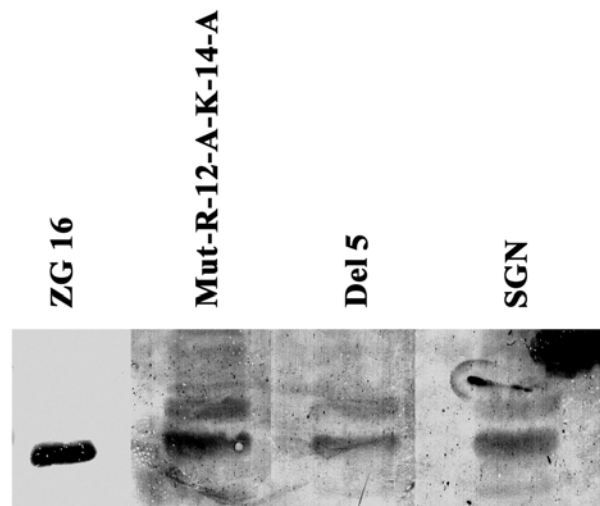


Abb. 16: Ligandenblot mit Mut-R-12-A-K-14-A, Del 5 und SGN.

In einem 12,5% SDS-Gel wurden je 50 µg ZGM aufgetrennt und die Proteine dann auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Spur 1 wurde zur Kontrolle nur mit einem ZG 16-Antikörper (1:1000 in Blotto) inkubiert. Spur 2 wurde mit 100 µg Mut-R-12-A-K-14-A, Spur 3 mit 100 µg Del 5 und Spur 4 mit 100 µg SGN über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Spuren 2-4 mit einem Serglycin-Antikörper (1:400 in Blotto) inkubiert.

Durch Herstellung der verschiedenen Mutanten und deren Bindungstests an ZG 16 vor allem in Ligandenblot-Experimenten kann die Bindungssequenz von Serglycin an ZG 16 auf 9 Aminosäuren eingegrenzt werden.

Die Liste zeigt alle Mutanten des N-terminalen Anteils von Serglycin. Die deletierten Bereiche, bzw. ausgetauschten Aminosäuren sind heller dargestellt:

SGN: YPARRARYQWVRCKPDGIFANCIEEKGPRFDLIAEESNVGPPMTDPVLMRGFPNDFFPISDDY
Del 5: YPARRARYQWVRCKPDGIFANCIEEKGPRFDLIAEESNVGPPMTDPVLMRGFPNDFFPISDDY
Del 14: YPARRARYQWVRCKPDGIFANCIEEKGPRFDLIAEESNVGPPMTDPVLMRGFPNDFFPISDDY
Del 22: YPARRARYQWVRCKPDGIFANCIEEKGPRFDLIAEESNVGPPMTDPVLMRGFPNDFFPISDDY
Del. loop: YPARRARYQWVRCKPDGIFANCIEEKGPRFDLIAEESNVGPPMTDPVLMRGFPNDFFPISDDY
Mut-C-13-A: YPARRARYQWVRAKPDGIFANCIEEKGPRFDLIAEESNVGPPMTDPVLMRGFPNDFFPISDDY
Mut-C-22-A: YPARRARYQWVRCKPDGIFANAIIEEKGPRFDLIAEESNVGPPMTDPVLMRGFPNDFFPISDDY
Mut-R-12-A-K-14-A: YPARRARYQWVACAPDGIFANCIEEKGPRFDLIAEESNVGPPMTDPVLMRGFPNDFFPISDDY

Für die Bindung an ZG 16 sind die N-Terminus nahen 9 Aminosäuren ARYQWVRCK nötig, wobei der Austausch der Aminosäuren Arginin, Cystein und Lysin an den Positionen 12, 13 und 14 durch Alanin die Bindung nicht beeinträchtigt, was die Vermutung nahe legt, dass wirklich essentiell für die Bindung nur die 6 Aminosäuren ARYQWV sind. Der hypothetischen Sekundärstruktur des Serglycin ist zu entnehmen, dass die 8 Aminosäuren ARYQWVRC, ein potientielles β -Faltblatt ausbilden (s. Abb. 17). Das β -Faltblatt wird durch den ersten Pfeil in der Abb. 17 dargestellt. Die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung dieses Faltblattes ist sehr hoch, was durch die darüber abgebildete Balkendarstellung angezeigt wird (confidence of prediction). Unter den Aminosäuren, die an der Ausbildung des Faltblattes beteiligt sind, sind unter anderen zwei aromatische Aminosäuren (Tyrosin an Position 34 und Tryptophan an Position 36 in der Abbildung 17) sowie zwei basische Aminosäuren (Arginin an den Positionen 33 und 38) zu finden. Bei der vor der Faltblattstruktur befindlichen Helixstruktur handelt es sich um ein Strukturmotiv in der Signalsequenz, die bei Eintritt in den sekretorischen Weg abgespalten wird. Das reife Protein beginnt daher erst mit der Aminosäure Tyrosin an Position 27 in der Abbildung 17. So stellt das β -Faltblatt das erste Strukturmotiv am N-Terminus des Serglycin dar. Diese Sekundärstruktur wurde mit Hilfe des ExPASy Molecular Biology Server (www.expasy.ch) unter „secondary and tertiary structure prediction“ erstellt.

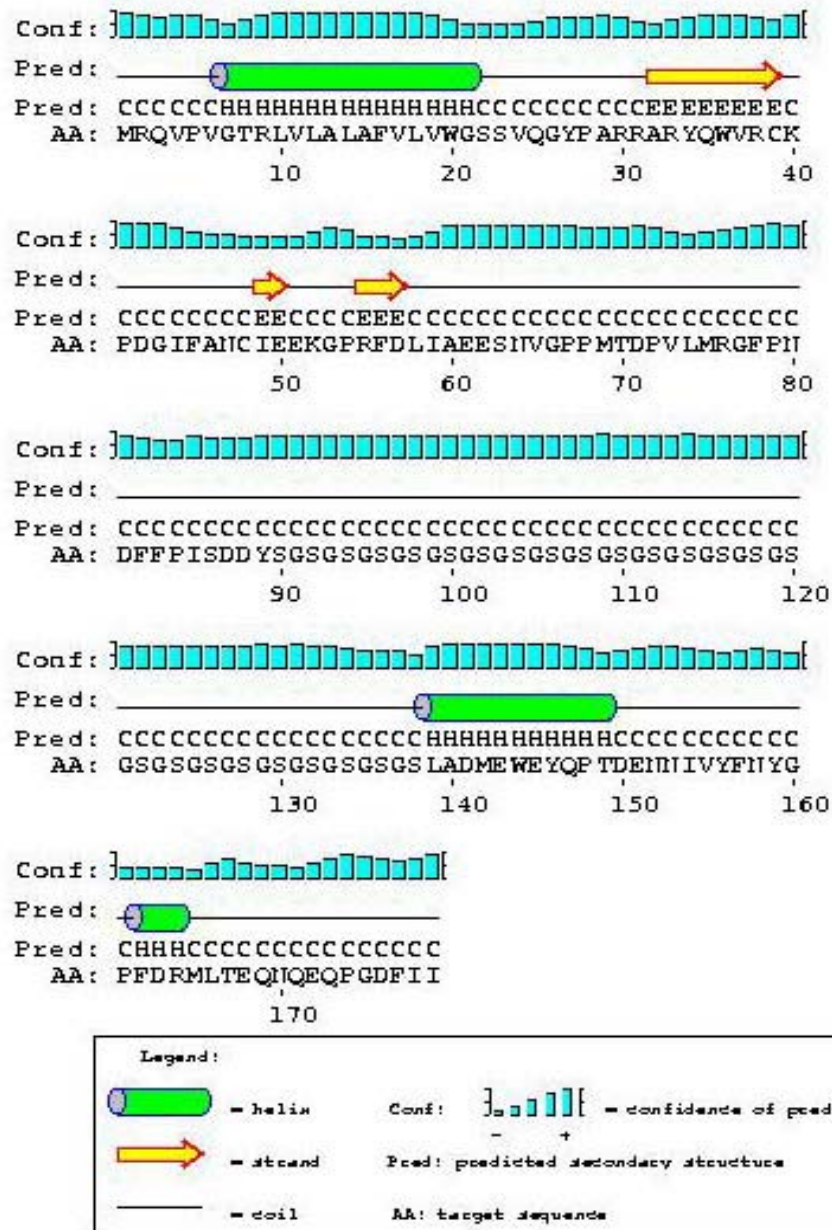


Abb. 17: Sekundärstruktur von Serglycin (SG)

3.5. Versuch der Isolierung von Proteoglykanen aus dem Inhalt der Zymogengranula (ZGI) des exokrinen Rattenpankreas

Da bislang das Proteoglykan Serglycin in den Zymogengranula des exokrinen Rattenpankreas identifiziert und ihm eine Rolle bei der Verpackung und Sortierung der Zymogene zugewiesen werden konnte, sollte nun versucht werden, weitere Proteoglykane zu isolieren und zu identifizieren. Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass eine submembranöse Matrix bestehend aus mehreren Proteoglykanen und Glykoproteinen existiert und für die Granulabildung in den Azinuszellen des Rattenpankreas wichtig ist (Schmidt et al., 2000). Ein ähnliches Gerüst könnte auch im Inhalt der Granula zu finden sein. Indizien für das Vorkommen von sulfatierten Proteoglykanen in den Zymogengranula gibt es schon länger: 1978 fanden Reggio und Palade sulfatierte Komponenten in den Zymogengranula von Meerschweinchen. Scheele und Mitarbeiter konnten 1994 zeigen, dass 90% der Sulfatmarkierten Proteoglykane in den Azinuszellen des Rattenpankreas mit der Zymogengranulamembran (ZGM) assoziiert sind. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass ca. 10% im Inhalt der Granula (ZGI) zu finden sind. Ziel war es, Proteoglykane aus ZGI zu isolieren, die an der Sortierung und Verpackung der Zymogene beteiligt sein könnten und eine mögliche intragranuläre Matrix ausbilden.

3.5.1. Welche Pufferbedingungen eignen sich am besten zur Proteoglykanisolierung mit Blyscan?

Da bekannt ist, dass der pH-Wert im Azinusbereich basisch ist (Freedman et al., 1998) und die in den Granula vorliegenden Zymogenaggregate dort aufgelöst werden, wurde nun versucht durch Inkubation von ZGI mit verschiedenen Pufferlösungen unterschiedlicher pH-Werte Proteoglykane aus ZGI zu präzipitieren. Die Präzipitation erfolgte mit dem Blyscan Proteoglycan and Glycosaminoglycan Assay (Biocolor, Belfast, N. Irland) (s. 2.8.3). Mit diesem Assay können Proteoglykane spezifisch präzipitiert werden, da das im Assay enthaltene 1,9-Dimethyl-Methylen Blau (DMB) an sulfatierte Polysaccharidkomponenten an Proteoglykanen und Glykosaminoglykanketten bindet. Durch Zentrifugation kann dieser Komplex dann sedimentiert werden.

Je 100 µl ZGI wurden mit je 100 µl der in Tabelle 5 aufgeführten Pufferlösungen 30 Min. bei RT inkubiert. Dann wurde 1 ml *Blyscan Dye Reagent* zugegeben und der Ansatz 30 Min. ebenfalls bei RT geschüttelt. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation mit 13000xg wurde das entstandene Pellet in 1 ml *Blyscan Dissociation Reagent* aufgelöst und die Extinktion bei 656 nm gegen H₂O in einem Spektralphotometer gemessen. Die folgende Tabelle zeigt die verwendeten Pufferlösungen und die jeweiligen Extinktionswerte:

ZGI	Pufferlösungen	Extinktionswert bei 656 nm
100 µl ZGI	300 mM Hepes pH 8,0	0,034
100 µl ZGI	300 mM Hepes pH 11,5	0,100
100 µl ZGI	300 mM NaHCO ₃ pH 8,0	0,09
100 µl ZGI	300 mM NaHCO ₃ pH 11,5	1,23
100 µl ZGI	300 mM NaHCO ₃ pH 9,0	0,055
100 µl ZGI	300 mM KHCO ₃ pH 11,5	0,96
100 µl ZGI	300 mM Nasulfat pH 11,5	0,032
100 µl ZGI	300 mM Naphosphat pH 11,5	0,7

Tab. 5: Präzipitation von Proteoglykanen mit dem Blyscan-Assay nach Inkubation von ZGI mit unterschiedlichen Pufferlösungen. In der Tabelle sind die verwendeten Lösungen und die bei 656 nm gemessenen Extinktionswerte eingetragen.

Der Tabelle ist zu entnehmen, dass mit 300 mM NaHCO₃ pH 11,5 die größte Extinktion erzielt wurde, also mit dieser Pufferlösung am meisten Proteoglykane präzipitiert werden konnten. Aus diesem Grund wurde in weiteren Experimenten 300 mM NaHCO₃ pH 11,5 verwendet, welches bereits von Schmidt et al. 2000 zur Isolierung von Komponenten der submembranösen Matrix von ZGM verwendet wurde.

3.5.2. Verschiedene Ansätze zur Proteoglykan-Isolierung

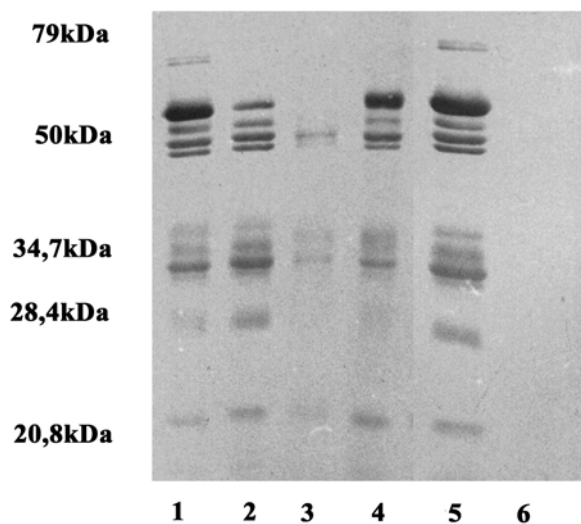
Es wurden verschiedene Ansätze zur Proteoglykan-Isolierung getestet. Zum einen wurde durch Glykogenfällung (s. 2.8.1) die Amylase, ein in großer Menge im ZGI vorkommendes Enzym, verringert. In einem anderen Fall wurde nach der Glykogenfällung das ZGI noch für 30 Min. bei RT mit 300 mM NaHCO₃ pH 11,5

behandelt, um mögliche Zymogenaggregate aufzulösen. Danach wurde eine Proteinfällung nach Wessel (Wesselfällung) (s. 2.8.2) durchgeführt, da bekannt ist, dass manche Proteoglykane und Glykoproteine Methanol-löslich (Faltynek et al., 1982) und daher im organischen Überstand der Wesselfällung zu finden sind. Alternativ wurde ZGI nur mit 300 mM NaHCO₃ pH 11,5 und anschließender Wesselfällung behandelt.

Von manchen Zellen, beispielsweise neuroendokrinen Zellen und Azinuszellen des Pankreas, weiß man, dass zur Aggregation der Proteine in den Sekretgranula millimolare Mengen an Calcium-Ionen (Ca²⁺) benötigt werden (Colomer et al., 1996). Daher wurde EGTA (10 mM Endkonzentration) zu ZGI gegeben und 30 Min. bei RT inkubiert, um durch Ca²⁺-Chelatierung Bindungen aufzuheben und so die Aggregate möglicherweise aufzulösen. Im letzten Ansatz wurde untersucht, wie sich die Wesselfällung auf bereits mit EGTA behandelte Proteine des ZGI auswirkt. Dazu wurde die organische Phase der Proteinfällung nach Wessel (s. 2.8.2) untersucht. Pro Ansatz wurden 400 µg (50 µl) ZGI eingesetzt. ¼ all dieser Ansätze wurde nach Hitzedenaturierung (3 Min. 95°C) mittels SDS-PAGE (s. 2.5.1) aufgetrennt. Das Gel wurde nach dem Lauf mit 2mA/cm² für 2 Stunden auf eine PVDF-Membran geblottet (s. 2.6.3) und die Proteine mit Coomassie sichtbar gemacht (s. 2.6.1). Der Abbildung 18 ist zu entnehmen, dass nach Glykogenfällung (s. 2.8.1) (Spur 2) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Spur 1, 50 µg ZGI) eine deutliche Reduzierung der Amylase stattgefunden hat (Bande bei ca. 55 kDa). Wurde nach der Glykogenfällung noch eine Wesselfällung (s. 2.8.2) durchgeführt und die organische Phase analysiert (Spur 3), sieht man eine starke Verringerung aller Proteine bis zum kompletten Verschwinden der Banden bei ca. 28 kDa, 40 kDa, 50 kDa, 55 kDa und der Doppelbande bei etwa 70 kDa. Vergleicht man Spur 4 (ZGI nach NaHCO₃-Behandlung und Wesselfällung) mit der Kontrollspur 1, stellt man fest, dass das normale ZGI-Bandenmuster zu erkennen ist. Allerdings geht nur ein geringer Anteil der ZGI-Proteine in die organische Phase der Wesselfällung über. Bei einem Vergleich der Bandenintensität zwischen Spur 1 und Spur 4, muss bedacht werden, dass im Gegensatz zu Spur 1, wo 50 µg Protein eingesetzt wurden, in Spur 4 100 µg verwendet wurden. Nach EGTA-Behandlung (Spur 5) ist kein Unterschied zur Kontrolle zu erkennen. Alle Banden, die in der Kontrolle zu sehen sind, bleiben auch nach EGTA-Einwirkung noch detektierbar. Der Entzug von Calcium hat somit keine Auswirkung auf die Proteine. Auffällig ist, dass keinerlei Banden mehr zu sehen sind, wenn nach der EGTA-Inkubation noch eine Wesselfällung durchgeführt wurde (Spur 6). Die Zymogene müssen durch das EGTA von einer oder

mehreren Komponenten abgelöst worden sein, die für den Verbleib in der organischen Phase verantwortlich sind. Auch die Glykogenfällung mit anschließender NaHCO_3 -Behandlung und Wesselfällung (Spur 3) zeigt einen deutlichen Unterschied zur Kontrolle. Hier gelangen kaum noch Proteine in die organische Phase der Wesselfällung. Es sind nur schwache Banden bei ca. 20 kDa, um die 35 kDa und bei etwa 50 kDa zu sehen. Mit dieser Experimentreihe konnten aber keine Proteoglykane direkt dargestellt werden. Es gibt lediglich indirekte Hinweise auf das Vorhandensein von Proteoglykanen oder Glykoproteinen. Die Zymogene müssen an Komponenten gebunden sein, die bei der Proteinfällung nach Wessel in die organische Phase übergehen. Durch NaHCO_3 -Behandlung von ZGI werden nicht alle Zymogene von diesen Komponenten abgelöst, so dass auch Zymogene in der organischen Phase nachweisbar sind. Durch EGTA-Einwirkung hingegen werden die Zymogene komplett abgelöst und es sind keine Proteine im 12, 5% SDS-PAGE der organischen Phase zu detektieren. Die Interaktion der Zymogene mit diesen Komponenten erfolgt Ca^{2+} -abhängig.

a



b

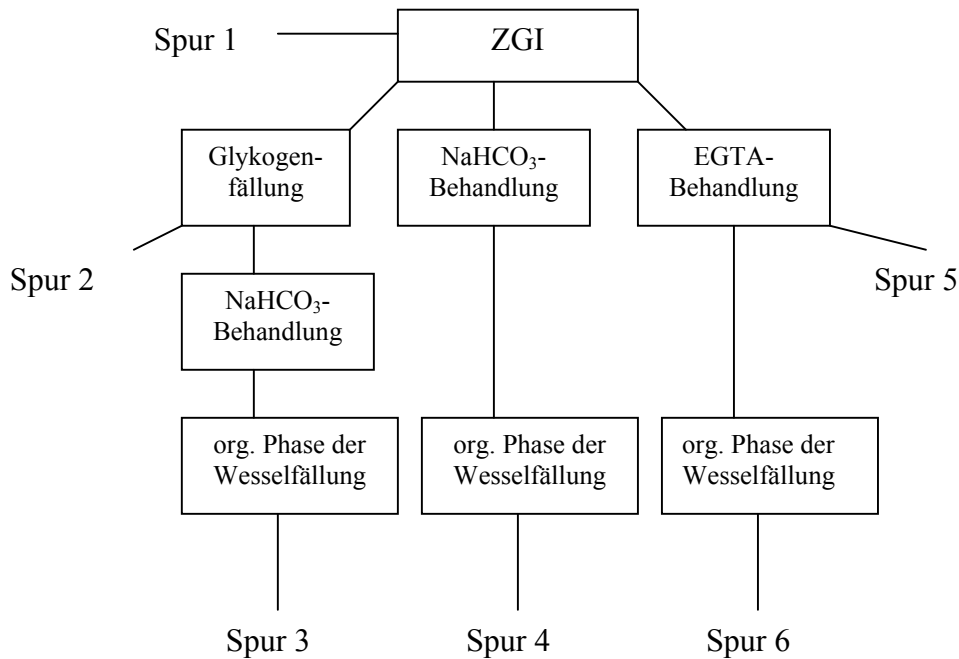


Abb. 18: Ansätze zur Matrix-Isolierung aus ZGI.

a) Je 400 µg ZGI wurden unterschiedlich behandelt. ¼ der Ansätze wurde in einem 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit Coomassie gefärbt.

Spur 1: 50 µg ZGI als Kontrolle

Spur 2: ZGI nach Glykogenfällung

Spur 3: organische Phase der Wesselfällung von ZGI nach Glykogenfällung und NaHCO₃-Behandlung

Spur 4: organische Phase der Wesselfällung von ZGI nach NaHCO₃-Behandlung

Spur 5: ZGI nach EGTA-Behandlung

Spur 6: organische Phase der Wesselfällung von ZGI nach EGTA-Behandlung

b) Reinigungsschema

In einer weiteren Experimentreihe wurde nun das *Blyscan Dye Reagent* verwendet, welches spezifisch an sulfatierte Glykosaminoglykane bindet (s. 2.8.3). *Blyscan Dye Reagent*-Glykosaminoglykan-Komplexe werden unlöslich und können dann durch Zentrifugation präzipitiert werden. Durch unterschiedliche Behandlung von ZGI und anschließender Blyscan-Präzipitation wurde nun versucht, Proteoglykane zu isolieren. Hierbei wurde pro Ansatz 1 mg ZGI (125 µl) eingesetzt. Zunächst wurden 125 µl ZGI mit 125 µl 300 mM NaHCO₃ pH 11,5 30 Min. bei RT inkubiert, um mögliche

Zymogenaggregate aufzulösen. Danach wurde 1 ml *Blyscan Dye Reagent* (s. 2.8.3) zugesetzt und ebenfalls für 30 Min. bei RT schüttelnd inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurde zu 125 µl ZGI EGTA (10 mM Endkonzentration) gegeben und 30 Min. bei RT inkubiert, um mögliche Interaktionen zwischen den Zymogenen und sulfatierten Komponenten (möglicherweise Proteoglykanen), die durch Calcium-Ionen hervorgerufen werden, zu unterbinden. Danach wurde diese Probe einer Wesselfällung (s. 2.8.2) unterzogen, um die Methanol-löslichen Komponenten zu isolieren. Im letzten Inkubationsschritt wurde die organische Phase der Wesselfällung mit 1 ml *Blyscan Dye Reagent* 30 Min. bei RT geschüttelt und dann durch Zentrifugation die an den Farbstoff gebundenen Proteine präzipitiert. Zur Überprüfung der Wirkung von EGTA alleine wurden wiederum 125 µl ZGI mit EGTA versetzt (10 mM Endkonzentration) und 30 Min. bei RT inkubiert. Danach wurde auch dieser Ansatz mit 1 ml *Blyscan Dye Reagent* 30 Min. bei RT geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Die Präzipitate aller Ansätze nach Blyscan-Fällung wurden schließlich in 25 µl Laemmli-Probenpuffer + DTT aufgenommen und 3 Min. bei 95°C denaturiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert (s. 2.6.3) und mit Coomassie angefärbt. In Abb. 19 in Spur 2 ist als Kontrolle 100 µg ZGI aufgetragen. Vergleicht man nun die Kontrollspur 2 mit der Spur 1 (ZGI mit NaHCO₃ behandelt und dann mit Blyscan inkubiert), so ist zu sehen, dass im Bereich zwischen 20 und 30 kDa Banden fehlen, während im höhermolekularen Bereich (>120 kDa) Banden zu detektieren sind, die in der Kontrolle nicht zu sehen sind. Dabei handelt es sich um eine Bande bei ca. 120 kDa und um mehrere Banden um 200 kDa und darüber, die in diesem Gelsystem nicht richtig aufgetrennt werden können. Bei beiden Ansätzen mit EGTA (Spuren 3 und 4) sind keine Proteine nachzuweisen wie schon im Experiment zuvor zu sehen war (Abb. 18 Spur 6), da das EGTA die Zymogene oder Zymogenaggregate von sulfatierten Komponenten ablöst, die sowohl Methanol-löslich sind wie auch mit dem *Blyscan Dye Reagent* interagieren können, selbst aber in diesem Gelsystem vermutlich aufgrund ihrer Größe durch Zuckermodifikationen nicht nachweisbar sind. Durch die NaHCO₃-Behandlung (Spur 1) wurden die Zymogene nicht vollständig von diesen Komponenten gelöst, sondern blieben teilweise daran assoziiert und konnten durch das Blyscan mitpräzipitiert werden. Hier traten einige hochmolekulare Proteine über 120 kDa auf, die im Weiteren untersucht werden sollten, da es sich dabei möglicherweise um sulfatierte Komponenten (Proteoglykane) handelt.

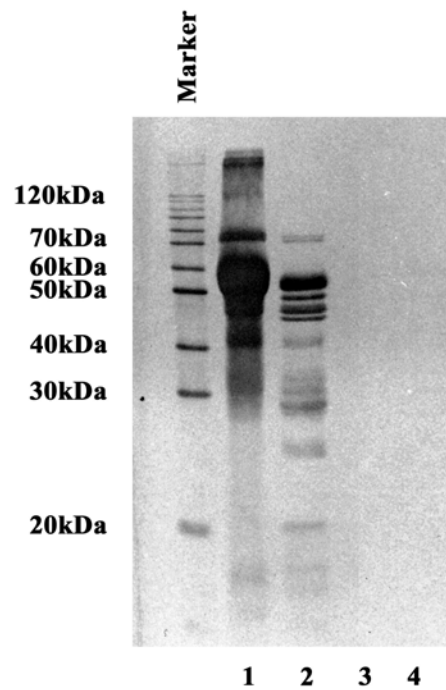
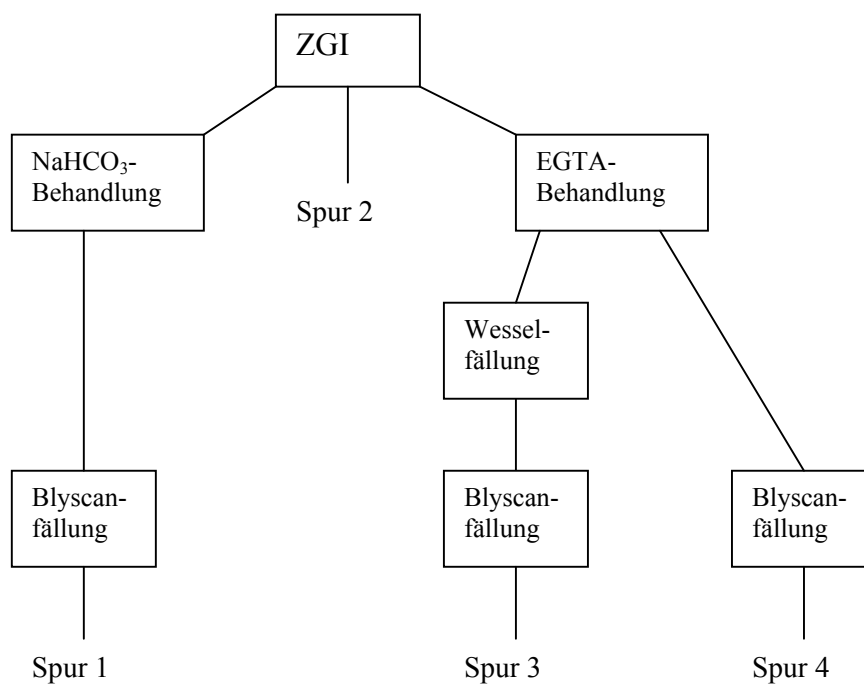
a**b**

Abb. 19: Ansätze zur Proteoglykan-Isolierung mit Blyscan.

a) Je 1 mg ZGI wurde unterschiedlich behandelt und mit dem Blyscan Dye Reagent inkubiert. Die dabei entstandenen Pellets wurden in einem 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt, 2h mit $2\text{mA}/\text{cm}^2$ auf eine PVDF-Membran geblottet und mit Coomassie angefärbt.

Spur 1: ZGI nach NaHCO_3 -Behandlung und Blyscan-Fällung

Spur 2: 100 μg ZGI als Kontrolle

Spur 3: ZGI nach EGTA-Behandlung, Wesselfällung und Blyscan-Fällung

Spur 4: ZGI nach EGTA-Behandlung und Blyscan-Fällung

b) Reinigungsschema

3.5.3. Handelt es sich bei den 5 hochmolekularen Banden um Chondroitinsulfat-Proteoglykane?

Mit diesem Experiment sollte herausgefunden werden, ob die oben beschriebenen hochmolekularen Banden von mehr als 120 kDa Chondroitinsulfat-haltig sind. Zwei Ansätze von je 350 μl (=3,5 mg) ZGI wurden wiederum mit 350 μl 300 mM NaHCO_3 pH 11,5 für 30 Min. bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben einer Wesselfällung (s. 2.8.2) unterzogen und die organische Phase in einem speed vac Konzentrator auf je 125 μl Volumen eingengt. Zu diesen 125 μl wurde nachfolgend jeweils 1 ml *Blyscan Dye Reagent* gegeben und die Ansätze, wie bereits beschrieben, inkubiert. Von den nach Zentrifugation entstandenen Präzipitaten aus sulfatierten Komponenten, die mit dem *Dye Reagent* interagiert hatten, wurde eines in 50 μl Chondroitinase-Puffer aufgenommen, das andere in 50 μl Chondroitinase-Puffer mit 0,1 U Chondroitinase ABC (s. 2.9). Beide Ansätze wurden für 2 Stunden bei 37°C im Heizblock inkubiert. Dann wurden die Proben mit Laemmli-Probenpuffer + DTT versetzt und 3 Min. bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden in einem 7,5% SDS-PAGE (s. 2.5.1) aufgetrennt, um die hochmolekularen Proteine besser darstellen zu können, auf eine Membran transferiert und mit Coomassie angefärbt (s. 2.6.3). In Abbildung 20 ist in Spur 2 der Ansatz mit Chondroitinase ABC aufgetragen, in Spur 3 der Ansatz ohne Chondroitinase ABC. In Spur 1 wurden zur Kontrolle 50 μl Chondroitinase-Puffer aufgetragen, um die Proteine, wie BSA, die im Puffer enthalten sind, darzustellen.

Es sind mindestens 5 hochmolekulare Proteine zwischen 120 und 250 kDa zu detektieren, die ein leicht diffuses Laufverhalten aufweisen, wie es beispielsweise für Glykoproteine typisch ist. Die Chondroitinase-Behandlung (Spur 2) führte zu keiner Veränderung des Laufverhaltens einer dieser 5 Proteine im Vergleich zur Kontrolle

ohne Chondroitinase ABC (Spur 3). Es handelt sich hierbei also nicht um Chondroitinsulfat-haltige Proteoglykane.

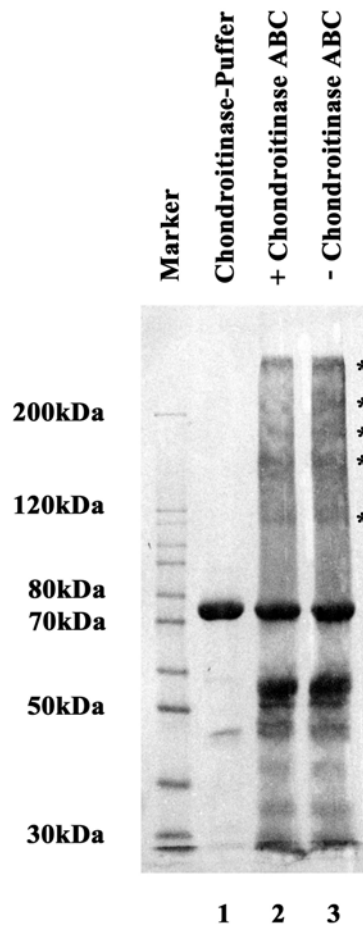


Abb. 20: Chondroitinase-Verdau.

Die Proteine wurden in einem 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt, 2h mit $2\text{mA}/\text{cm}^2$ auf eine PVDF-Membran geblottet und mit Coomassie angefärbt. Die Sterne weisen auf die hochmolekularen Banden hin.

Spur 1: 50 μl Chondroitinase-Puffer

Spur 2: 3,5 mg ZGI nach NaHCO_3 -Behandlung, Wesselfällung, Blyscan-Fällung und Chondroitinase ABC-Verdau

Spur 3: 3,5 mg ZGI nach NaHCO_3 -Behandlung, Wesselfällung, Blyscan-Fällung ohne Chondroitinase ABC-Verdau

3.5.4. Bei den 5 hochmolekularen Proteinen handelt es sich nicht um Proteoglykane

Um diese 5 hochmolekularen Banden zu identifizieren, sollten sie in Kooperation mit Professor Lottspeich aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried mikrosequenziert werden. Entsprechend der Vorgehensweise in 3.5.3 wurden nun 250 µl (2 mg) ZGI mit 250 µl 300 mM NaHCO₃ pH 11,5 inkubiert, anschließend der Wesselfällung (s. 2.8.2) unterzogen und die organische Phase der Fällung wurde im speed vac Konzentrador in diesem Fall auf etwa 250 µl eingeeengt. Je 125 µl davon wurden mit je 1 ml *Blyscan Dye Reagent* inkubiert und durch Zentrifugation pelletiert (s. 2.8.3). Die Pellets wurden gemeinsam in 40 µl Laemmli-Probenpuffer + DTT aufgenommen, hitzedenaturiert und wie zuvor in einem 7,5% SDS PAGE aufgetrennt (s. 2.5.1). Das Gel wurde nach dem Lauf 1 Stunde in Coomassielösung angefärbt (2.6.1) und dann mit 10% Essigsäure entfärbt. Nach Entfärbung des Gels sind die 5 hochmolekularen Banden zu erkennen (s. Abb. 21). Bei den stark gefärbten Banden im unteren Gelbereich (unter 80 kDa) handelt es sich sehr wahrscheinlich um Zymogene.

Überraschenderweise ergab die Analyse der Mikrosequenzierung als eindeutiges Ergebnis, dass es sich bei allen ausgeschnittenen Proteinbanden um Amylase handelte, und nicht etwa um Proteoglykane. Normalerweise ist Amylase als Bande bei etwa 55 kDa zu identifizieren und zeigt kein diffuses Laufverhalten. Auch auf diesem Gel ist ein distinktes Amylase-Signal bei 55 kDa zu erkennen. Ein möglicher Grund für die außergewöhnlich niedrige elektrophoretische Mobilität eines Teils dieses Enzyms könnte eine Homooligomerisierung sein (siehe Diskussion). Auf jeden Fall ist es nicht gelungen, Proteoglykane, die durch Blyscanbehandlung gefällt wurden, elektrophoretisch darzustellen. Möglicherweise ist dies auf die extreme Modifikation der Proteoglykane durch Zucker (Glykosaminoglykan-Ketten) zurückzuführen, die das Laufverhalten dieser Proteingruppe stark beeinflussen, so dass eine herkömmliche SDS-PAGE hierfür nicht geeignet ist.

Das Vorhandensein solcher sulfatierten Komponenten (Proteoglykane) wird indirekt darüber nachgewiesen, dass es überhaupt zu Blyscan-Präzipitaten kommt. Im Folgenden sollte nun versucht werden, diese sulfatierten Komponenten in einem anderen Gelsystem nachzuweisen.

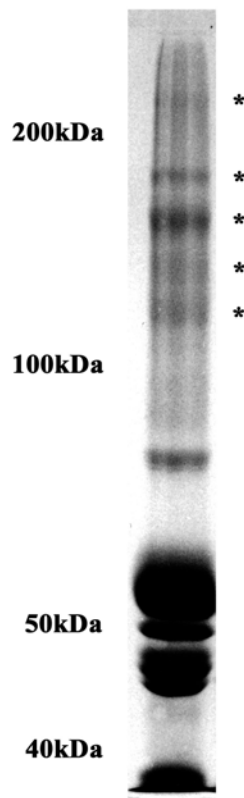


Abb. 21: Probe für die Mikrosequenzierung.

2 mg ZGI nach NaHCO_3 -Behandlung, Wesselfällung und Blyscan-Fällung in einem 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

Um nun große Komponenten wie stark glykosylierte Proteoglykane (> 200 kDa) im Gel auftrennen zu können, wurden 2% Metaphorgele verwendet (s. 2.5.3). Bei den Metaphorgelen handelt es sich um Agarosegele (Kleene et al, 1999a). Da diese Gele sehr instabil sind, ist es schwierig sie zu färben. Daher wurden die NaHCO_3 -behandelten und mittels Blyscan-Fällung präzipitierten Proteine zunächst biotinyliert (s. 2.10), um sie dann nach Gelelektrophorese und Transfer auf eine PVDF-Membran mittels HRP-gekoppeltem Neutravidin sichtbar zu machen (s. 2.6.3).

Als Problem erwies sich hierbei, dass ein starker Hintergrund mögliche distinkte Banden überlagerte. Zwar war auch im hochmolekularen Bereich eine Schwärzung des Films zu erkennen, mögliche Proteoglykane konnten jedoch nicht identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

3.6. Isolierung von Zymogengranula aus AR4-2J-Zellen

Da es mit den bislang verwendeten Methoden nicht gelang Proteoglykane darzustellen, sollte nun versucht werden die bisherigen Probleme, wie das Blotzen von Proteoglykanen sowie das Anfärben mit Coomassie oder Silber, zu umgehen. Dazu sollten Proteoglykane in AR4-2J-Zellen, einer Zelllinie aus einem Tumor des exokrinen Rattenpankreas durch Zugabe von ^{35}S -Sulfat radioaktiv markiert werden, wobei das Sulfat in die Glykosaminoglykan-Ketten der Proteoglykane eingebaut wird. Die radioaktiv markierten Proteoglykane sollten dann nach Isolierung der Zymogengranula aus den Zellen durch Radiographie nach SDS-PAGE detektiert werden. Die Zymogengranulaisolierung erfolgte über Sucrosedichtegradienten unterschiedlicher Sucrosekonzentrationen (s. 2.14.4). Pro Sucrosegredient wurden 5 Zellkulturflaschen mit AR4-2J-Zellen 72 Stunden mit 10 nM Dexamethason zur Anreicherung der Zymogengranula stimuliert (s. 2.13.3). Danach wurden die Zellen gewaschen, in einem Glas-Dounce-Homogenisator homogenisiert und einer isopyknischen Sucrosedichtegradientenzentrifugation unterworfen (s. 2.14.4). Nach 5-stündiger Zentrifugation der Gradienten wurden diese in Fraktionen zu ca. 350 μl gesammelt und die Sucrosedichte der Fraktionen refraktometrisch bestimmt (s. 2.14.4). Um herauszufinden, in welchen Fraktionen die Zymogengranula vorliegen, wurde ein Enzymassay durchgeführt, mit dem die Aktivität des Zymogengranulaenzyms Amylase bestimmt werden kann. Außerdem wurden die Fraktionen noch auf ihren Gehalt an anderen Zellorganellen getestet. Dies erfolgte ebenfalls über Enzymassays, wobei für die Mitochondrien die Aktivität der Succinat-Reduktase und für die Lysosomen die Aktivität der sauren Phosphatase gemessen wurde (s. 2.15).

Zur Isolierung der Zymogengranula wurden Sucrosedichtegradienten zwischen 20-50%, 40-60% und 20-60% Sucrose verwendet. Auch wurde ein Gradient aus Lymphozytentrennmedium (PAA, Linz/A), der wie oben beschrieben durchgeführt wurde, ausprobiert. Da die Verteilung der Organellen in allen verwendeten Dichtegradienten sehr ähnlich war, wird hier exemplarisch die Verteilung der Zymogengranula, Lysosomen und Mitochondrien im Dichtegradienten zwischen 20-60% Sucrose als Aktivität der Markerenzyme dargestellt (s. Abb. 22). Die Messwerte des Amylase-Assays, des Lysosomen-Assays (saure Phosphatase-Aktivität) und des Mitochondrien-Assays (Succinat-Dehydrogenase-Aktivität) wurden gegen die Sucrosedichte aufgetragen. Da hierbei nur die Verteilung der Markerenzyme im

Dichtegradienten interessiert, wurden die absoluten Messwerte der jeweiligen Fraktionen in Relation zum höchsten Messwert (100%) des jeweiligen Assays dargestellt. Zymogengranula sind bei etwa 49-26% Sucrose zu finden. In diesem Bereich flotieren auch die Mitochondrien (45-26% Sucrose). Die Lysosomen erscheinen als breiter *peak* in den Fraktionen mit 45-22% Sucrose. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass sich die *peaks* aller drei Enzyme überlagern, was bedeutet, dass die Zymogengranula, Mitochondrien und Lysosomen nicht ausreichend gut voneinander getrennt werden können.

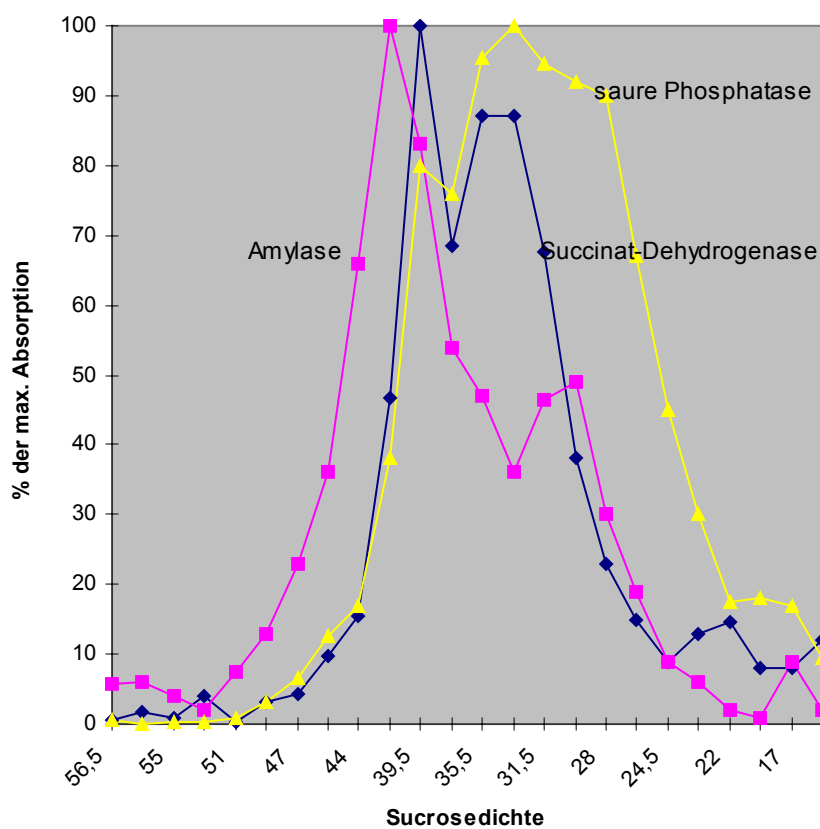


Abb. 22: Nachweis der Amylase-, Succinat-Reduktase- und saure Phosphatase-Aktivität in den Fraktionen eines Sucrosegradienten mit 20-60% Sucrose.

Es wurde das 105000xg Membranpellet des postnukleären Überstandes aus AR4-2J-Zellen separiert. Die gemessenen Enzymaktivitäten der einzelnen Fraktionen wurden in % der maximal gemessenen Aktivitäten gegen die Sucrosekonzentrationen aufgetragen.

Da diese Versuche nicht zu den gewünschten Ergebnissen führten, wurde diese Isolierungsmethode nicht weiter verfolgt.

4. Diskussion

Die reguliert sezernierten Zymogene müssen in den Azinuszellen des exokrinen Rattenpankreas von allen übrigen Proteinen getrennt, und in die Zymogengranula verpackt werden. Eine wichtige Rolle spielen dabei die Lipid-Mikrodomänen (rafts) in der Granulamembran, über die die von Schmidt et al. 2000 näher charakterisierte submembranöse Matrix verankert ist. Von zentraler Bedeutung für die Verknüpfung der Zymogenaggregate an die Membran ist das Protein ZG 16, eine Komponente der submembranösen Matrix. In der vorliegenden Arbeit konnte das Verbindungsprotein zwischen den Zymogenaggregaten und der Granulamembran näher aufgeklärt werden. Dabei handelt es sich um das im Inhalt der Granula vorkommende Proteoglykan Serglycin, das über seinen N-terminalen Anteil mit ZG 16 interagiert und darüber die an seine Glykosaminoglykan-Ketten assoziierten Zymogenaggregate über die submembranöse Matrix an der Membran verankert.

4.1. Identifizierung der Bindedomäne des Serglycin an ZG 16

Von A. Licht aus unserer Arbeitsgruppe gab es Hinweise auf ein sehr hochmolekulares Proteoglykan im Inhalt der Zymogengranula in den Azinuszellen des exokrinen Rattenpankreas. In Cross-link-Studien mit rekombinantem ZG 16 konnte er einen hochmolekularen (größer als 250 kDa) Bindungspartner biotinylieren. Da sich dieser Bindungspartner nicht in Gelen durch Coomassie- und Silberfärbung darstellen ließ, wurde er aus Metaphorgelen durch Elektroelution isoliert. Von den proteinhaltigen Elutionsfraktionen wurde dann die Aminosäurezusammensetzung bestimmt, die deutliche Hinweise auf das Proteoglykan Serglycin ergab, da ein Großteil der Aminosäuren Serin und Glycin waren (Diplomarbeit A. Licht, 2000). Später konnte durch RT-PCR und Antikörperinkubation von AR4-2J-Zellen der Beweis erbracht werden, dass es sich tatsächlich um das Proteoglykan Serglycin handelt (Biederbick et al., 2003). Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe deuteten an, dass es sich bei der Interaktion von Serglycin mit ZG 16 um eine zuckerunabhängige Protein-Protein-Wechselwirkung handeln könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Hinweis überprüft. Dabei konnte die Bindungsdomäne des Serglycin für das ZG 16 identifiziert

werden, um Aufschluss über die Sortierung der Zymogene und deren Anheftung an die Membran der Zymogengranula zu erhalten.

Das Serglycin der Ratte besteht aus drei Abschnitten: einem unverzuckerten N-terminalen Bereich (63 AS), dem verzuckerten Bereich, der aus 49 Serin-Glycin-Wiederholungen besteht und dem Protein seinen Namen gibt, sowie dem unverzuckerten C-terminalen Bereich (41 AS). Zunächst wurden der unverzuckerte N- und C-Terminus rekombinant hergestellt. In verschiedenen Bindungsstudien (GST-pull-down, Co-Immunopräzipitation, Ligandenblot und Cross-link-Experimenten) stellte sich heraus, dass der 63 Aminosäuren umfassende N-terminale Abschnitt SGN mit ZG 16 interagiert (s. Abb. 8 und 9). Anders als bei vielen bislang beschriebenen Interaktionen von Serglycin, bei denen eine Interaktion zumeist über elektrostatische Wechselwirkungen mit den sulfatierten Glykosaminoglykanen stattfindet (s. 1.3), kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass weder die Glykosylierung noch die Sulfatierung für die Interaktion mit ZG 16 nötig sind. Um das Bindungsmotiv einzugrenzen, wurde der N-terminale Bereich (SGN) weiter analysiert. Der Sequenz von SGN ist zu entnehmen, dass an den Positionen 13 und 22 jeweils ein Cystein zu finden ist. Aus neuroendokrinen Zellen, wie PC 12-Zellen, ist bekannt, dass ein intramolekularer Disulfidbrücken-*loop* z.B. im Chromogranin B essentiell für die Sortierung in sekretorische Granula ist. Durch die Gabe von DTT zu PC 12-Zellen konnte die *loop*-Bildung verhindert werden und das Chromogranin B wurde dann in konstitutive Vesikel sortiert anstatt in reguliert sekretorische Vesikel geleitet zu werden (Chanat et al., 1993; Krömer et al., 1998). Auch für das Chromogranin A konnte diese N-terminale *loop*-Bildung gezeigt werden, die nötig ist für die Oligomerisierung des Proteins und somit für seine korrekte Sortierung in reguliert sekretorische Granula (Thiele und Huttner, 1998). Die Oligomerisierung des Chromogranin A beginnt schon bei pH-Werten von 7,4 bis 6,4. Diese pH-Werte entsprechen denen des sekretorischen Wegs (7,4 im ER und ca. 6,4 in den unreifen sekretorischen Granula). Der Disulfidbrücken-*loop* im Chromogranin ist für die Interaktion mit Membrankomponenten zuständig, entweder für die Bindung an membrangebundenes Chromogranin, oder an andere Membrankomponenten (Thiele und Huttner, 1998) und trägt so im TGN zur Sortierung bei. Solch eine Interaktion mit Membrankomponenten über einen intramolekularen Disulfid-*loop* am N-Terminus konnte auch für das Pro-Opiomelanocortin gezeigt werden, das mit der Membran-assoziierten Form der Carboxypeptidase E interagiert und darüber sortiert wird (Cool et al., 1997).

Durch Herstellen von Mutanten des N-terminalen Bereichs von Serglycin (SGN) wurde in der vorliegenden Arbeit für dieses Protein gezeigt, dass ein intramolekularer *loop*, der durch Disulfidbrückenbildung stabilisiert wird, für die Bindung an ZG 16 nicht erforderlich ist. Sowohl die Punktmutante Mut-C-13-A, bei der das Cystein an Position 13 wie auch die Punktmutante Mut-C-22-A, bei der das Cystein an Position 22 durch ein Alanin ausgetauscht wurde, binden an ZG 16 und auch an ein weiteres bisher nicht näher identifiziertes Protein von ca. 19 kDa. Ebenso interagiert die Deletionsmutante Del loop, bei der die 5 Aminosäuren DGIFA zwischen den beiden Cysteinen entfernt wurden, mit ZG 16 und dem 19 kDa Protein (s. Abb. 11). Beim Serglycin ist folglich keine *loop*-Bildung durch eine Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinen im N-terminalen Abschnitt an der Bindung mit ZG 16 erforderlich.

Auch eine intermolekulare Disulfidbrückenbildung wie sie für die Bindung der Matrix-Metalloproteinase 9 an ein Chondroitinsulfat-Proteoglykan, vermutlich Serglycin, beschrieben wird (Winberg et al., 2000), kann für die Interaktion zwischen Serglycin und ZG 16 ausgeschlossen werden, da das ZG 16 kein Cystein aufweist, das an einer solchen Interaktion beteiligt sein könnte.

Durch Erzeugung verschiedener Deletionsmutanten (Del 5, Del 14 und Del 22), konnte die Bindedomäne auf 9 Aminosäuren eingegrenzt werden. Dabei handelt es sich um die N-Terminus nahen Aminosäuren ARYQWVRCK an den Positionen 6-14 im Serglycin, die in der hypothetischen Sekundärstruktur eine gestreckte β -Faltblatt-Struktur einnehmen (vgl. Abb. 17). Die β -Faltblatt-Struktur zeichnet sich dadurch aus, dass sie plattenförmige Gestalt hat, wobei die Polypeptidkette an dieser Stelle fast völlig gestreckt ist und nicht eng verpackt vorliegt wie bei einer α -Helix. Durch diese gestreckte Form sind die beteiligten Aminosäuren frei zugänglich und nicht im Inneren des Proteins verborgen. Bei zwei der beteiligten Aminosäuren handelt es sich um die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, bei zwei weiteren um die basische Aminosäure Arginin. Ob beispielsweise die reaktive Gruppe des aromatischen Rings des Tyrosins an der Interaktion beteiligt ist, die Wechselwirkung durch die positiven Ladungen der beiden Arginine stattfindet oder die Interaktion auf einem ganz anderen Mechanismus basiert, kann hier nicht entschieden werden. Dazu müssten noch weitere Mutanten erzeugt werden, bei denen gezielt diese Aminosäuren (Tyrosin, Tryptophan und die Arginine) z. B. durch Alanin ausgetauscht werden und diese Mutanten dann in Bindungsstudien auf ihre Bindung an das ZG 16 untersucht werden.

Da, wie in dieser Arbeit gezeigt, das Serglycin über 9 Aminosäuren am N-Terminus mit dem ZG 16 interagiert, bleiben noch eine Vielzahl von Interaktionsmöglichkeiten mit anderen Proteinen offen. So stellte sich heraus, dass die Zymogenaggregate mit den Glykosaminoglykan-Ketten des Serglycin interagieren und über diese Interaktion in die Sekretgranula sortiert werden. Das konnten Biederbick und Mitarbeiter zeigen, indem sie Mutanten des Serglycin herstellten, die nicht verzuckert werden konnten und diese in AR4-2J-Zellen einbrachten. Dabei zeigte sich, dass das unverzuckerte Serglycin im Golgi-Apparat verblieb und nicht in die Granula sortiert wurde. Da auch reguliert sezernierte Proteine wie Amylase und Procarboxypeptidase nicht korrekt in die Granula sortiert wurden, wenn das Serglycin ohne Glykosaminoglykan-Ketten vorlag, lässt dies den Schluss zu, dass das korrekt verzuckerte Serglycin eine Rolle als Helferprotein bei der Sortierung der Zymogene in die Granula spielt (Biederbick et al., 2003).

Zwei unterschiedliche Mechanismen sind denkbar. Zum einen könnte die Interaktion zwischen den Zymogenaggregaten und den Glykosaminoglykan-Ketten des Serglycin über ionische Wechselwirkungen stattfinden. Zum anderen könnten in den Zymogenaggregaten Komponenten vorhanden sein, die Lektindomänen aufweisen, über die sie direkt an bestimmte Zucker der Glykosaminoglykane binden und die Zymogenaggregate so verankern.

Eine weitere Interaktion könnte das Serglycin auch über den unverzuckerten C-Terminus mit Zymogenen ausbilden, so dass es im Granulum zur Ausbildung eines Netzwerks von Serglycin und Zymogenaggregaten kommt. Auch gibt es Hinweise durch ein bakterielles two-hybrid-system und Cross-link-Studien aus unserer Arbeitsgruppe, dass das Serglycin in homooligomerer Form vorliegen kann, was ebenfalls für die Ausbildung eines intragranulären Netzwerks spricht. Das membranassoziierte Lektin ZG 16 würde dann die Verankerung dieses Netzwerks an die Granulummembran darstellen. Ein geringer Teil des ZG 16 kommt auch nicht-membranassoziiert im Inhalt der Granula vor, und könnte dort als *linker*-Protein zwischen Serglycin und Komponenten der Zymogenaggregate fungieren, so dass ein intragranuläres Gerüst aus Serglycin, ZG 16 als *linker*-Protein und Komponenten der Zymogenaggregate ausgebildet wird, an dem weitere Zymogenaggregate assoziiert sind. Im *in vitro* condensation-sorting Assay, einem System, das es erlaubt, die Kondensation der sekretorischen Proteine in *dense cores* und deren Anheftung an die ZGM zu analysieren, konnte gezeigt werden, dass ZG 16 an der Bindung von aggregierten sekretorischen Proteinen an die ZGM beteiligt ist (Dartsch et al., 1998). Wurde ZGM

mit einem polyklonalen Antikörper gegen ZG 16 vorinkubiert und dann im condensation-sorting Assay eingesetzt, wurde die Bindung von Zymogenen an die Membran verhindert. Ebenfalls eine Beeinträchtigung auf die Bindung der Zymogene an die Membran hatte eine Vorinkubation von ZGM mit Chondroitinase ABC, einem Enzym, das Proteoglykane verdaut (Kleene et al., 1999b). Diese Daten zeigen, dass dem ZG 16 eine Rolle als *linker*-Protein zwischen der submembranösen Matrix an der luminalen Seite der ZGM bestehend aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und Lipiden, und aggregierten sekretorischen Proteinen zukommt. Experimente zeigen, dass durch Bicarbonat-Behandlung bei pH 11,5 oder Chondroitinase ABC-Verdau von Zymogengranulamembranen ZG 16 zusammen mit Proteoglykanen, GP-2 und Lipase von der Membran ablösbar ist (Kleene et al., 1999b; Schmidt et al., 2000). Es ist also mit der submembranösen Lipid-Glykoprotein-Proteoglykan-Matrix assoziiert. Schmidt und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass diese Matrix an der Innenseite der ZGM, zu der auch das ZG 16 gehört, eine Rolle bei der Sortierung von reguliert sekretorischen Proteinen in den Azinuszellen des exokrinen Rattenpankreas spielt. Durch Inkubation von isolierten Pankreasläppchen mit Inhibitoren der Cholesterolsynthese und Behandlung mit Methyl- β -Cyclodextrin, welches spezifisch Cholesterol extrahiert, wurden bis zu 50% Cholesterol entfernt. In pulse-chase-Experimenten mit anschließender Zellfraktionierung der so behandelten Pankreasläppchen konnte gezeigt werden, dass die Cholesterol-Depletion Auswirkung auf die Ausbildung der Lipid-Mikrodomänen (rafts) in der Zymogengranulamembran hat, was wiederum die Assoziation der Glykoproteine und Proteoglykane daran beeinträchtigt. Letztendlich verblieben die Zymogene nach Behandlung mit Cholesterol-Inhibitoren im Golgi-Apparat anstatt in Zymogengranula verpackt zu werden (Schmidt et al., 2001).

Kleene und Mitarbeiter schlugen ein Modell vor, bei dem das sekretorische Lektin ZG 16 eine *linker*-Funktion zwischen der submembranösen Matrix und den Zymogenaggregaten hat. Sie postulierten, dass ZG 16 über ionische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Proteoglykanen der submembranösen Matrix interagiert und über seine Jacalin-ähnliche Lektin-Domäne nahe des C-Terminus (Cronshagen et al., 1994) an Zuckerkomponenten der Zymogenaggregate bindet (Kleene et al., 1999b). In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass ZG 16 mit einer Komponente aus dem Inhalt der Zymogengranula, mit dem Proteoglykan Serglycin, zuckerunabhängig durch Protein-Protein-Wechselwirkungen interagiert. Dabei stünde die Jacalin-ähnliche

Weitere Experimente müssen durchgeführt werden, um genau zu klären, welche Komponenten der Zymogenaggregate auf welche Weise mit Serglycin interagieren, um Klarheit über die Ausbildung der Zymogenaggregate zu gewinnen. Es müsste nach Bindungspartnern des unverzuckerten C-Terminus (SGC) gesucht werden. Um zu verstehen, wie die Zymogenaggregate dann genau sortiert werden, wäre es hilfreich, die Domäne am ZG 16 zu kennen, über die es mit Serglycin interagiert. Darüber hinaus sollten noch weitere Membrankomponenten, wie der Serglycin-Bindungspartner von etwa 19 kDa identifizieren werden.

4.2. Isolierung von Proteoglykanen

In der vorliegenden Arbeit sollte nun versucht werden, neben dem Serglycin mögliche weitere Proteoglykane aus dem Inhalt der Zymogengranula (ZGI) der Azinuszellen des exokrinen Rattenpankreas zu isolieren und zu identifizieren, um die molekulare Grundlage der Zymogenaggregate, etwa eine intragranuläre Matrix, näher aufzuklären. Dabei konnte mit Bicarbonat (300 mM NaHCO₃ pH 11,5) die größte Menge an Proteoglykanen mit dem Blyscan-Assay präzipitiert werden, wie die Extinktionsmessung bei 656 nm zeigt (s. Tab. 5). Andere Pufferlösungen und andere pH-Werte führten nicht zu einer so hohen Proteoglykan-Präzipitation in diesem Assay. Vermutlich wurden durch die Bicarbonat-Behandlung Interaktionen zwischen Zymogenen und Proteoglykanen verringert, so dass die Zymogene von den Proteoglykanen teilweise abgelöst wurden. Dadurch wurden an den Proteoglykanen Bindungsstellen für das *Blyscan Dye Reagent* zugänglicher, so dass das Reagenz an die Proteoglykane binden konnte und diese Komplexe dann durch Zentrifugation präzipitiert werden konnten.

Für die Kondensation/Aggregation reguliert sekretorischer Proteine ist neben einem leicht sauren pH-Wert im TGN noch eine millimolare Ca²⁺-Konzentration erforderlich (Tooze et al., 2001; Arvan und Castle, 1998). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Inkubation von ZGI mit dem Ca²⁺-Chelator EGTA eine vollständige Ablösung der Zymogene von Proteoglykanen erzielt wurde, während die NaHCO₃-Behandlung die Zymogene nur teilweise von im ZGI vorhandenen Proteoglykanen ablöst. Nach Inkubation mit NaHCO₃ pH 11,5 und anschließender Wesselfällung gelangt noch ein Großteil der Zymogene in die organische Phase (s. Abb. 18 Spur 4),

beziehungsweise nach Blyscan-Fällung in das Proteoglykanpellet (s. Abb. 19 Spur 1). Diese Zymogene müssen noch an Proteoglykane gebunden sein, da sie sonst nicht in diesen Fraktionen zu finden sein dürften. Wurde ZGI hingegen vor den Fällungen mit EGTA behandelt, so sind nach Wesselfällung keinerlei Zymogene mehr in der organischen Phase (s. Abb. 18 Spur 6) oder nach Blyscan-Fällung im Proteoglykanpellet (s. Abb. 19 Spuren 3 und 4) zu finden.

Die hier beschriebenen Ergebnisse beweisen nur indirekt das Vorhandensein von Proteoglykanen im ZGI. Hier scheinen keine außergewöhnlich kleinen, leicht darstellbaren Proteoglykane vorzukommen, wie sie von Schmidt et al. 2000 für die submembranöse Matrix beschrieben wurden. Dort konnte gezeigt werden, dass diese kleinen Proteoglykane Methanol-löslich sind, und bei der Proteinfällung nach Wessel in der organischen Phase zu finden sind (Schmidt et al., 2000). Die Tatsache, dass mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten kein Proteoglykan direkt dargestellt werden konnte, liegt wahrscheinlich in der Struktur dieser Proteinklasse begründet. Bei Proteoglykanen handelt es sich um eine besondere Klasse der Glykokonjugate, die sich dadurch auszeichnet, dass das *core*-Protein mit stark negativ geladenen Glykosaminoglykan (GAG)-Ketten substituiert vorliegt. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um Chondroitinsulfat und Heparin/Heparansulfat (Übersicht: Kjellen und Lindahl, 1991). Die an das *core*-Protein gebundenen Glykosaminoglykanketten nehmen großen Einfluss auf die Eigenschaften der Proteoglykane. Zum einen lassen sie sich je nach Grad der Glykosylierung in Gelsystemen nicht gut auftrennen. Meist sind sie als „Schmier“, also unscharfe Signale zu sehen und nicht als distinkte Bande. Viele Proteoglykane sind aufgrund der Zuckermodifikationen viel zu groß, um überhaupt in SDS-Gele einzulaufen. So reicht die Anzahl der GAG-Ketten pro Proteoglykan von einer, wie zum Beispiel bei Decorin, bis zu über hundert, wie im Aggrecan. Auch die Länge der *core*-Proteine variiert zwischen 19 kDa bei Serglycin und 600 kDa bei Perlecan (Alberts et al., 1994; Prydz und Dalen, 2000). Dadurch weisen sie unterschiedlichste Laufverhalten in verschiedenen Gelsystemen, von SDS-Gelen bis zu Metaphorgelen, auf. Eine weitere Besonderheit mancher Proteoglykane ist die Tatsache, dass sie sich nicht blotten lassen. Die Anwesenheit von Chondroitinsulfatketten an einem Chondroitinsulfat-Proteoglykan macht es unmöglich, dieses Proteoglykan zu blotten. Winberg und Mitarbeiter haben gezeigt, dass ein ³⁵S-markiertes Proteoglykan auch nach Blotten nur im Sammelgel durch Autoradiographie detektierbar war. Auf der Membran konnte es nicht

nachgewiesen werden (Winberg et al., 2000). Auch die Methanollöslichkeit von Proteoglykanen (Faltynek et al., 1982) ist bei manchen Färbungen ein Problem, da die Proteoglykane aus dem Gel in den Methanol-haltigen Puffer übergehen und somit im Gel nicht mehr dargestellt werden können.

Die hochmolekularen Banden von 120 bis mehr als 200 kDa, die nach NaHCO_3 -Behandlung und Blyscan-Fällung auftraten (s. Abb. 19 Spur 1), dann in niederprozentigen Gelen aufgetrennt wurden und bei der Mikrosequenzierung als Amylase identifiziert werden konnten (s. Abb. 21), könnten Bestandteile des von Kleene et al. 1999a beschriebenen Komplex 5 sein. Kleene und Mitarbeiter haben 1999 durch native Gelelektrophorese von ZGI 5 Komplexe bestehend aus Zymogenen und noch unbekannt Proteinen isoliert. Jeder Komplex zeichnet sich durch eine bestimmte Zymogenzusammensetzung aus. In Komplex 5 ist vor allem Amylase zu finden zusammen mit der basischen Form des Trypsins. Ferner konnte gezeigt werden, dass dieser Komplex NaHCO_3 -sensitiv ist, also durch Bicarbonat in seine Untereinheiten zerlegt werden kann. Da die Amylase als Monomer bei etwa 53-55 kDa im SDS-Gel zu sehen ist, weist sie bei diesen Experimenten ein ungewöhnliches Laufverhalten auf, was auf oligomere Formen schließen lässt. Da für die hier durchgeführten Experimente jeweils recht große Proteinmengen eingesetzt wurden, wäre es möglich, dass der Komplex 5 hier durch die NaHCO_3 -Behandlung und das DTT im Probenpuffer nicht vollständig aufgelöst werden konnte und deshalb noch Amylaseaggregate als hochmolekulare Formen im SDS-Gel erscheinen. Schon 1978 haben Reggio und Dagorn Amylase, Chymotrypsinogen und Ribonuklease A bei saurem pH-Wert zusammen mit Chondroitinsulfat präzipitieren können, was darauf hindeutet, dass diese Zymogene direkt mit Chondroitinsulfat-haltigen Proteoglykanen interagieren und andere Zymogene über eine Interaktion mit diesen drei Komponenten an die Proteoglykane gekoppelt werden.

5. Zusammenfassung

In Vorarbeiten konnte das Proteoglykan Serglycin in den Zymogengranula der Azinuszellen des exokrinen Rattenpankreas als Bindungspartner des sekretorischen Lektins ZG 16 identifiziert werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass das korrekt glykosylierte Serglycin für die Sortierung von Zymogenen in die Granula nötig ist (Biederbick et al., 2003).

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion zwischen dem überwiegend membranständigen ZG 16 und Serglycin näher zu analysieren, um Aufschluss über Mechanismen der Verpackung und Sortierung der Zymogene zu erhalten. Darüber hinaus sollten mögliche weitere Proteoglykane aus dem Inhalt der Zymogengranula isoliert werden.

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Durch Klonierung und Expression der unverzuckerten, rekombinanten N- und C-terminalen Abschnitte des Serglycin und deren Einsatz in Bindungsstudien (Co-Immunopräzipitation, GST-pull-down, Ligandenblots und Crosslinkexperimenten) wurde festgestellt, dass die Interaktion zwischen ZG 16 und Serglycin über den unverzuckerten N-terminalen Bereich (SGN) durch zuckerunabhängige Protein-Protein-Wechselwirkungen erfolgt.

2. Die Bindungssequenz des Serglycin an das ZG 16 konnte durch Herstellung verschiedener Punkt- und Deletionsmutanten des N-terminalen Bereichs SGN und deren Verwendung in Bindungsstudien auf die 9 N-Terminus nahen Aminosäuren ARYQWVRCK eingegrenzt werden.

3. Bei der Analyse der hypothetischen Sekundärstruktur des Serglycin, die mit Hilfe des ExPASy Molecular Biology Server erstellt wurde, gab es sehr starke Hinweise darauf, dass das Bindungsmotiv des Serglycin an das ZG 16 ein β -Faltblatt darstellt.

Diese Daten zeigen, dass Serglycin über den N-terminalen unverzuckerten Abschnitt eine Protein-Protein-Interaktion mit dem sekretorischen Lektin ZG 16 macht. Über diese Interaktion werden das Serglycin und über seine Glykosaminoglykan-Ketten assoziierte Zymogene an die Zymogengranulamembran gebunden. Diese

Wechselwirkung stellt einen Sortierungsmechanismus für die Zymogene in die Granula dar.

4. Für das Vorhandensein weiterer Proteoglykane im Inhalt der Zymogengranula (ZGI) konnten nur indirekte Hinweise gefunden werden. Im Blyscan-Assay, einer Fällung, die spezifisch für Proteoglykane ist, konnten durch Extinktionsmessung Proteoglykane nachgewiesen werden. Die größte Extinktion wurde nach Vorbehandlung des ZGI mit NaHCO_3 erhalten.

5. Die Zymogene scheinen mit Proteoglykanen assoziiert zu sein. Durch diese Interaktion gelangt ein Teil der Zymogene noch nach NaHCO_3 -Behandlung von ZGI und anschließender Blyscan- oder Wesselfällung in das Blyscanpellet, bzw. in die organische Phase der Wesselfällung. Durch EGTA-Inkubation von ZGI kann diese Interaktion zwischen Proteoglykanen und Zymogenen aufgehoben werden. Hier erscheinen keine Zymogene im Blyscanpellet oder der organischen Phase der Wesselfällung.

6. Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.** (1994): Molecular biology of the cell. 3rd edition. Garland Publishing inc., New York London
- Alfalah, M., Jacob, R., Preuss, U., Zimmer, K.P., Naim, H., Naim, H.Y.** (1999): O-linked glycans mediate apical sorting of human intestinal sucrase-isomaltase through association with lipid rafts. *Curr. Biol.* 9(11): 593-596
- Arvan, P., Castle, D.** (1998): Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem. J.* 332: 593-610
- Bannykh, S.I., Balch, W.E.** (1997): Membrane dynamics at the endoplasmic reticulum-Golgi interface. *J. Cell Biol.* 138: 1-4
- Bennet, M.K., Scheller, R.H.** (1993): The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:2559-2568
- Benting, J.H., Rietveld, A.G., Simons, K.** (1999): N-glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* 146(2): 313-320
- Bergmeyer, H.U.** (1974): *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd Ed. 1.2 Vols; Verlag Chemie, Weinheim
- Biederbick, A., Licht, A., Kleene, R.** (2003): Serglycin proteoglycan is sorted into zymogen granules of rat pancreatic acinar cells. *Eur. J. Cell Biol.* 81: 1-11
- Bonfanti, L., Mironov, A.A.Jr., Martinez-Menarguez, J.A., Martella, O., Fusella, A., Baldassare, M., Buccione, R., Geuze, H.J., Mironov, A.A., Luini, A.** (1998): Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell* 95: 993-1003

Bourdon, M.A., Krusius, T., Campbell, S., Schwartz, N.B. (1987): Identification and synthesis of a recognition signal for the attachment of glycosaminoglycans to proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 3194-3198

Bourdon, M.A., Oldberg, A., Pierschbacher, M., Ruoslahti, E. (1985): Molecular cloning and sequence analysis of a chondroitin sulfate proteoglycan cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 1321-1325

Braakman, I. (2001): A novel lectin in the secretory pathway. EMBO reports vol. 2| no. 8| 666-668

Burger, K. (2000): Greasing membrane fusion and fission machineries. Traffic 1: 605-613

Burnette, W.N. (1981): „Western blotting“: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem. 1981 Apr;112(2): 195-203

Chanat, E., Weiss, U., Huttener, W.B., Tooze, S.A. (1993): Reduction of the disulfide bond of chromogranin B (secretogranin I) in the trans-Golgi network causes its missorting to the constitutive secretory pathway. EMBO J. 12: 2159-2168

Colomer, V., Kicska, G.A., Rindler, M.J. (1996): Secretory granule content proteins and the luminal domains of granule membrane proteins aggregate in vivo at mildly acidic pH. J. Biol. Chem. 271, 48-55

Cool, D.R., Fenger, M., Snell, C.R., Loh, Y.P. (1995): Identification of the sorting signal motif within pro-opiomelanocortin for the regulated secretory pathway. J. Biol. Chem. 270: 8723-8729

Cool, D.R., Normant, E., Shen, F., Chen, H.C., Pannell, L., Zhang, Y., Loh, Y.P. (1997): Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe(fat) mice. Cell 88:73-83

Cormack, R.S. und Somssich, I.E. (1997): Ultra-fast alkaline lysis plasmid extraction (UFX). Technical Tips online. <http://www.elsevier.com/locate/tto>. Tip No.:T01210.

Cowley, D.J., Moore, Y.R., Darling, D.S., Joyce, P.B., Gorr, S.U. (2000): N-and C-terminal domains direct cell type-specific sorting of chromogranin A to secretory granules. *J. Biol. Chem.* 275: 7743-7748

Cronshagen, U., Volland, P., Kern, H.F. (1994): cDNA cloning and characterization of a novel 16 kDa protein located in zymogen granules of the rat pancreas and goblet cells of the gut. *Eur. J. Cell Biol.* 65, 366-377

Dartsch, H., Kleene, R., Kern, H.F. (1998): In Vitro Condensation-sorting Of Enzyme Proteins Isolated From Rat Pancreatic Acinar Cells. *Eur. J. Cell. Biol.* 75, 211-222

Davies, G.A., Bloom, F.E. (1973): Subcellular particles separated through a histochemical reaction. *Anal. Biochem.* 51: 429-435

Dayhuff TJ, Gesteland RF Atkins JF (1992): Electrophoresis, autoradiography and electroblotting of peptides: T4 gene 60 hopping. *Bio Techniques* 13: 500-503

Dittie, A., Kern, H.F. (1992): The major zymogen granule membrane protein GP-2 in the rat pancreas is not involved in granule formation. *Eur. J. Cell Biol.* 58(2): 243-258

Ernst, S., Langer, R., Cooney, C.C., Sasisekharan, R. (1995): Enzymatic degradation of glycosaminoglycans. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30: 387-444

Faltynek, C.R., Silbert, J.E., Hof, L. (1982): Xylosylphosphoryldolichol synthesized by chick embryo epiphyses. Not an intermediate in proteoglycanbiosynthesis. *J. Biol. Chem.* 257, 5490-5495

Farhadi, H.F., Mowla, S.J., Petrecca, K., Morris, S.J., Seidah, N.G., Murphy, R.A. (2000): Neutrophin-3 sorts to the constitutive secretory pathway of hippocampal neurons and is diverted to the regulated secretory pathway by coexpression with brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 20: 4059-4068

Farquhar, M.G., Palade, G.E. (1998): The Golgi-Apparatus - 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol.* 8: 2-10

Forsberg, E., Pejler, G., Ringvall, M., Lunderius, C., Tomasini-Johansson, B., Kusche-Gullberg, M., Eriksson, I., Ledin, J., Hellman, L., Kjellen, L. (1999): Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature* 400(6746): 773-776

Freedman, S.D., Kern, H.F., Scheele, G.A. (1998): Acinar lumen pH regulates endocytosis, but not exocytosis, at the apical plasma membrane of pancreatic acinar cells. *Eur. J. Cell Biol.* 75, 153-162

Galvin, J.P., Spaeny-Dekking, L.H.A., Wang, B., Seth, P., Hack, C.E., Froelich, C.J. (1999): Apoptosis induced by granzyme B-glycosaminoglycan complexes: implications for granule mediated apoptosis in vivo. *J. Immunol.* 162: 5345-5350

Gardner, J.D., Jensen, R.T. (1981): Regulation of pancreatic exocrine secretion in vitro: the action of secretagogues. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 296(1080): 17-26

Gerdes, H.H., Glombik, M.M. (1999): Signal-mediated sorting to the regulated pathway of protein secretion. *Anat. Anz.* 181: 447-453

Gething, M.J. (ed.) (1997): Guidebook to molecular chaperones and protein-folding catalysts. Oxford University Press

Glick, B.S. (2001): ER export: More than one way out. *Curr. Biol.* 11: R361-363

Glick, B.S., Malhotra, V. (1998): The curious status of the Golgi apparatus. *Cell* 95: 883-889

Gorr, S.U., Huang, X.F., Cowley, D.J., Kuliawat, R., Arvan, P. (1999): Disruption of disulfide bonds exhibits differential effects on trafficking of regulated secretory proteins. *Am. J. Physiol.* 277: C121-131

Gorr, S.U., Moore, Y.R. (1999): Sorting of a constitutive secretory protein to the regulated secretory pathway of exocrine cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257: 545-548

Gorr, S.U., Jain, R.K., Kuehn, U., Joyce, P.B.M., Cowley, D.J. (2001): Comparative sorting of neuroendocrine secretory proteins: a search for common ground in a mosaic of sorting models and mechanisms. *Mol. Cell. Endocrinol.* 172: 1-6

Griffiths, G., Simons, K. (1986): The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* 234 (4775): 438-443

Gullberg, U., Andersson, E., Garwicz, D., Lindmark, A., Olsson, I. (1997): Biosynthesis, processing and sorting of neutrophil proteins: insight into neutrophil granule development. *Eur. J. Haematol.* 58: 137-153

Helenius, A. (2001): Quality control in the secretory assembly line. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 356, 147-150

Helenius, A., Aebi, M. (2001): Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291: 2364-2369

Helenius, A., Tatu, U., Marquardt, T., Braakman, I. (1992): Protein folding in the endoplasmic reticulum. In *Cell biology and biotechnology* (ed. R.G. Rupp und M.S. Oka), pp. 125-136 Berlin, Heidelberg, Germany: Springer

Hempelmann, E. and Kaminsky, R. (1986): *Electrophoresis* 7, 481-481

- Henningsson, F., Ledin, J., Lunderius, C., Wilen, M., Hellman, L., Pejler, G.** (2002): Altered storage of proteases in mast cells from mice lacking heparin: a possible role for heparin in carboxypeptidase A processing. *Biol. Chem.* 383: 793-801
- Hille-Rehfeld, A.** (1995): Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *biochim. Biophys. Acta* 1241: 177-194
- Hirschberg, C.B., Robbins, P.W., Abeijon, C.** (1998): Transporters of nucleotide sugars, ATP and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 49-69
- Hirschberg, C.B., Snider, M.D.** (1987): Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 63-87
- Humphries, D.E., Wong, G.W., Friend, D.S., Gurish, M.F., Qiu, W.T., Huang, C., Sharpe, A.H., Stevens, R.L.** (1999): Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature* 400(6746): 769-772
- Ikonen, E., Simons, K.** (1998): Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9: 503-509
- Jessop, N.W., Hay, R.I.** (1980): Characteristics of two rat pancreatic cell lines derived from transplantable tumors. *In vitro* 16: 212 A
- Kamada, M.M., Michion, J., Ritz, J., Holldack, J., Serafin, W.E., Austen, K.F., MacDermott, R.P., Stevens, R.L.** (1989): Identification of carboxypeptidase and tryptic esterase activities that are complexed to proteoglycans in the secretory granules of human cloned natural killer cells. *J. Immunol.*, 42, 609-615
- Kelly, R.B.** (1985): Pathways of protein secretion in eucaryotes. *Science* 230: 25-32
- Kjellen, L., Lindahl, U.** (1991): Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 443-475

Klausner, R.D., Sitia, R. (1990): Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell* 62 (4): 611-614

Kleene, R., Dartsch, H., Kern, H.F. (1999b): The secretory lectin ZG16p mediates sorting of enzyme proteins to the zymogen granule membrane in pancreatic acinar cells. *Eur. J. Cell Biol.* 78(2): 79-90

Kleene, R., Kastner, B., Rösser, R., Kern, H.F. (1999a): Complex formation among rat pancreatic secretory proteins under mild alkaline pH conditions. *Digestion* 60:305-313

Kleinmann, H.K., Goodwin, E.B., Rennard, S.L., Martin, G.R. (1981): Preparation of collagen substrates for cell attachment : Effect of collagen concentration and phosphate buffer. *Anal. Biochem.* 94: 308

Klumperman, J., Spijker, S., van Minnen, J., Sharp-Baker, H., Smit, A:B., Geraerts, W.P.M. (1996): Cell type-specific sorting of neuropeptides : a mechanism to modulate peptide composition of large dense-core vesicles. *J. Neurosci.* 16: 7930-7940

Klumperman, J., Kuliawat, R., Griffith, J.M., Geuze, H.J., Arvan, P. (1998): Mannose 6-phosphate receptors are sorted from immature secretory granules via adaptor protein AP 1, clathrin, and syntaxin 6-positive vesicles. *J. Cell Biol.* 141: 359-371

Kolset, S.O., Gallagher, J.T. (1990): Proteoglycans in haemopoietic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1032: 191-211

Kolset S.O., Mann, D.M., Uhlin-Hansen, L., Winberg, J.O., Ruoslahti, E. (1996): Serglycin-binding proteins in activated macrophages and platelets. *J. Leukoc. Biol.* 59: 545-554

Kolset, S.O., Vuong, T.T., Prydz, K. (1999): Apical secretion of chondroitin sulphate in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 11): 1797-1801

Kresse, H., Hausser, H., Schönherr, E. (1993): Small proteoglycans. *Experientia* 49: 403-416

Krömer, A., Glombik, M.M., Huttner, W.B., Gerdes, H.H. (1998): essential role of the disulfide-bonded loop of chromogranin B for sorting to secretory granules is revealed by expression of a deletion mutant in the absence of endogenous granin synthesis. *J. Cell Biol.* 140(6): 1331-1346

Kulseth, M.A., Kolset, S.O., Ranheim, T. (1999): Stimulation of serglycin and CD44 mRNA expression in endothelial cells exposed to TNF- α and IL- α . *Biochim. Biophys. Acta* 1428: 225-232

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Lanoix, J., Ouwendijk, J., Stark, A., Szafer, E., Cassel, D., Dejgaard, K., Weiss, M., Nilsson, T. (2001): Sorting of Golgi resident proteins into different sub populations of COP I vesicles: a role for ArfGAP 1. *J. Cell Biol.* 155: 1199-1212

Lebel, D., Beattie, M. (1988): The major protein of pancreatic zymogen granule membranes (GP-2) is anchored via covalent bonds to phosphatidylinositol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154(2): 818-823

Lemansky, P., Hasilik, A. (2000): Chondroitin sulfate is involved in lysosomal transport of lysozyme in U937 cells. *J. Cell Sci.* 114: 345-352

Licht, A.H., Charakterisierung des Lektins ZG 16p und seiner Bindungspartner in Zymogengranula des Rattenpankreas. Diplomarbeit, Oktober 2000

Lodish, H., Baltimore, D. Berk, A., Zipursky, S.L. Matsudaira, P., Darnell, J. (2000): *Molecular Cell Biology*, 4th edition, W.H. Freeman and Company, New York

Logsdon C.D. (1986): Glucocorticoids increase cholecystokinin receptors and amylase secretion in pancreatic acinar AR4-2J cells. *J. Biol. Chem.* 261: 2096-2101

Logsdon C.D., Moessner, J., Williams, J.A., Goldfine, I.D. (1985): Glucocorticoids increase amylase mRNA levels, secretory organelles and secretion in pancreatic acinar cells. *J. Cell. Biol.* 100: 1200-1208

Lottspeich, F. and Zorbach H. (1998): *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin

Lowry, O.H., Rosenbrough, M.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275

Martin-Belmonte, F., Alonso, M.A., Zhang, X., Arvan, P. (2000): Thyroglobulin is selected as a luminal protein cargo for apical transport via detergent-resistant membranes in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 275: 41074-41081

Martinez-Menarguez, J.A., Perkeris, R., Oorschot, V., Scheller, R., Slot, J.W., Geuze, H.J., Klumpermann, J. (2001): Peri-Golgi vesicles contain retrograde but not anterograde proteins favouring the cisternal-progression model of intra-Golgi transport. *J. Cell Biol.* 155: 1213-1224

Matsumoto, R., Sali, A., Ghildyal, N., Karplus, M., Stevens, R.L. (1995): Packaging of proteases and proteoglycans in the granules of mast cells and other hematopoietic cells. A cluster of histidines on mouse mast cell protease 7 regulates its binding to heparin serglycin proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 270: 19524-19531

Mellman, I., Simons, K. (1992): The Golgi Complex: In Vitro Veritas? *Cell* 68: 829-840

Mertens, G., Van der Schueren, B., van den Berghe, H., David G. (1996): Heparan sulfate expression in polarized epithelial cells: the apical sorting of glypican (GPI-anchored proteoglycan) is inversely related to its heparan sulfate content. *J. Cell Biol.* 132(3): 487-497

Min Li, Yuh Nung Jan and Lily Yeh Jan (1992): Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of Shaker potassium channel. *Science* **257**: 1225-1230

Mironov, A.A., Beznoussenko, G.V., Nicoziani, P., Martella, O., Trucco, A., Kweon, H.S., Di Giandomenico, D., Polishchuk, R.S., Fusella, A., Lupetti, P. et al. (2001): Small cargo proteins and large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae. *J. Cell Biol.* **155**: 1225-1238

Mironov, A.A., Weidman, P., Luini, A. (1997): Variations on the intracellular transport theme: Maturing cisternae and trafficking tubules. *J. Cell Biol.* **138**: 481-484

Moyer, B.D., Allan, B.B., Balch, W.E. (2001): Rab 1 interaction with a GM 130 effector complex regulates COP II vesicle cis-Golgi tethering. *Traffic.* **2**: 268-276

Nicodemus, C.F., Avraham, S., Austen, K.F., Purdy, S., Jablonsky, J., Stevens, R.L. (1990): Characterization of the human gene that encodes the peptide core of secretory granule proteoglycans in promyelocytic leukemia HL-60 cells and analysis of the translated product. *J. Biol. Chem.* **265**: 5889-5896

Oldberg, A., Hayman E.G., Ruoslahti, E. (1981): Isolation of a chondroitin sulfate proteoglycan from a rat yolk sac tumor and immunochemical demonstration of its cell surface localization. *J. Biol. Chem.* **256**: 10847-10852

Orci, L., Stamnes, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Sollner, T.H., Rothman, J.E. (1997): Bidirectional transport by distinct populations of COP I-coated vesicles. *Cell* **90**: 335-349

Pelham, H.R.B (1990): The retention signal for soluble proteins of the ER. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 483-486

Pelham, H.R.B. (1998): Getting through the Golgi complex. *Trends Cell Biol.* **8**: 45-49

Pelham, H.R.B. (2000): Getting stuck in the Golgi. *Traffic* **1**: 191-192

- Pelham, H.R.B.** (2001): Traffic through the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 155: 1099-1101
- Pelham, H.R.B., Rothman, J.E.** (2000): The debate about transport in the Golgi - two sides of the same coin?. *Cell* 102: 713-719
- Pfeffer, S.R.** (2001): Constructing a Golgi complex. *J. Cell Biol.* 155 (6): 873-875
- Pfeffer, S.R., Rothman, J.E.** (1987): Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 829-852
- Pimplikar, S.W., Huttner, W.B.** (1992): Chromogranin B (secretogranin I), a secretory protein of the regulated pathway, is also present in a tightly membrane-associated form in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 267: 4110-4118
- Plattner, H., Hentschel, J.** (1997): Taschenlehrbuch der Zellbiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Plempner, R.K., Wolf, D.H.** (1999): Retrograde protein translocation: ERADiction of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* 24 (7): 266-270
- Poole, A.R.** (1986): Proteoglycans in health and disease: structures and functions. *Biochem. J.* 236: 1-14
- Prydz, K., Dalen, K.T.** (2000): Synthesis and sorting of proteoglycans. *J. Cell Science* 113: 193-205
- Puertollano, R., Randazzo, P.A., Presley, J.F., Hartnell, L.M., Bonifacino, J.S.** (2001): The GGAs promote ARF-dependent recruitment of clathrin to the TGN. *Cell* 105: 93-102

Raja, S.M., Wang, B., Dantuluri, M., Desai, U.R., Demeler, B., Spiegel, K., Metkar, S.S., Froelich, C.J. (2002): Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: characterization of the macromolecular complex of granzyme B with serglycin. *J. Biol. Chem.* 277(51): 49523-49530

Rapoport, T.A., Rolls, M.M., Jungnickel, B. (1996): Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8 (4): 499-504

Reggio, H.A., Dagorn, J.C. (1978): Ionic interactions between bovine chymotrypsinogen A and chondroitin sulfate ABC. *J. Cell Biol. Rapid Communications:* 951-957

Reggio, H.A., Palade, G.E. (1978): Sulfated compounds in the zymogen granules of the guinea pig pancreas. *J. Cell Biol.* 77, 288-314

RindlerM.J. (1998): Carboxypeptidase E, a peripheral membrane protein implicated in the targeting of hormones to secretory granules, coaggregates with granule content proteins at acidic pH. *J. Biol. Chem.* 273: 31180-31185

Robinson, M.S., Bonifacino, J.S. (2001): Adaptor-related proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 444-453

Rothman, J.E., Wieland, F.T. (1996): Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272: 227-234

Sali, A., Matsumoto, R., McNeil, H.P., Karplus, M., Stevens, R.L. (1991): Three-dimensional models of four mouse mast cell chymases: identification of proteoglycan binding regions and protease-specific antigenic epitopes. *J. Biol. Chem.* 266: 20316

Savolainen, H. (1999): Isolation and separation of proteoglycans. *J. Chromatography B* 722: 255-262

Scheele, G.A., Fukuoka, S., Freedman, S.D. (1994): Role of the GP2/THP family of GPI-anchored proteins in membrane trafficking during regulated exocrine secretion. *Pancreas* 9, 139-149

Schick, B.P., Gradowski, J.F., San Antonio, J.D. (2001): Synthesis, secretion, and subcellular localization of serglycin proteoglycan in human endothelial cells. *Blood* 97: 449-458

Schick, B.P., Pestina, T.I., San Antonio, J.D., Stenberg, P.E., Jackson, C.W. (1997): Decreased serglycin proteoglycan size is associated with the platelet alpha granule storage defect in Wistar Furth hereditary macrothrombocytopenic rats. Serglycin binding affinity to type I collagen is unaltered. *J. Cell. Physiol.* 172: 87-93

Schmidt, K., Dartsch, H., Linder, D., Kern, H.F., Kleene, R. (2000): A submembranous matrix of proteoglycans on zymogen granule membranes is involved in granule formation in rat pancreatic acinar cells. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 12): 2233-42

Schmidt, K., Schrader, M., Kern, H.F., Kleene, R. (2001): Regulated apical secretion of zymogens in rat pancreas. *J. Biol. Chem.* 276(17): 14315-14323

Seemann, J., Pypaert, M., Taguchi, T., Malsam, J., Warren, G. (2002): Partitioning of the matrix fraction of the Golgi apparatus during mitosis in animal cells. *Science* 295: 848-851

Sei, C.A., Hand, G.L., Murray, S.F., Glembotski, C.C. (1992): The cosecretional maturation of atrial natriuretic factor by primary atrial myocytes. *J. Mol. Endocrinol.* 6: 309-319

Shennan, K.I.J. (1996): Intracellular targeting of secretory proteins in neuroendocrine cells. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 535-539

Shields, P.P., Sprenkle, A.B., Taylors, E.W., Glembotski, C.C. (1990): Rat pro-atrial natriuretic factor expression and post-translational processing in mouse corticotropic pituitary tumor cells. *J. Biol. Chem.* 265: 10905-10911

- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C.** (1985): Measurement of proteins using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150(1): 76-85
- Springman, E., Dikov, M.M., Serafin, W.E.** (1995): Mast cell procarboxypeptidase A molecular modeling and biochemical characterization of its processing within secretory granules. *J. Biol. Chem.* 270 (3): 1300-1307
- Swarovsky, B., Steinhilber, W., Scheele, G.A., Kern, H.F.** (1988): Coupled induction of exocrine proteins and intracellular compartments involved in the secretory pathway in AR4-2J cells by glucocorticoids. *Eur. J. Cell. Biol.* 47: 101-111
- Tam, W.W.H., Andreasson, K.I., Loh, Y.P.** (1993): The amino-terminal sequence of pro-opiomelanocortin directs intracellular targeting to the regulated secretory pathway. *Eur. J. Cell Biol.* 62: 294-306
- Thevenod, F.** (2002): Ion channels in secretory granules of the pancreas and their role in exocytosis and release of secretory proteins. *Am. J. Physiol.* 283: C651-C672
- Thiele, C., Huttner, W.B.** (1998): Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to secretory granules - recent developments. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9: 511-516
- Tooze, S.A.** (1998): Biogenesis of secretory granules in the trans-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells. *BBA* 1404: 231-244
- Tooze, S.A., Martens, G.J.M., Huttner, W.B.** (2001): Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol.* 11(3): 116-122
- Towbin, H., Staehlin, T. and Gordon, T.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354

- Toyama-Sorimachi, N., Sorimachi, H., Tobita, Y., Kitamura, F., Yagita, H., Suzuki, K., Miyasaka, M.** (1995): A novel ligand for CD44 is serglycin, a hematopoietic cell lineage-specific proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 270(13): 7437-7444
- Uhlin-Hansen, L., Wik, T., Kjellen, L., Berg, E., Forsdahl, F., Kolset, S.O.** (1993): Proteoglycan metabolism in normal and inflammatory human macrophages. *Blood* 82, 2880-2889
- Unger, M.L., Hokland, M., Basse, P.H., Nannmark, U., Johansson, B.R.** (1997): High dose IL-2-activated murine natural killer (A-NK) cells accumulate glycogen and granules, lose cytotoxicity, and alter target interaction. *in Vitro Scand. J. Immunol.* 45: 623-636
- Van Horssen, A.M., Van Kuppeveld, F.J., Martens, G.J.** (1998): Manipulation of disulfide bonds differentially affects the intracellular transport, sorting and processing of neuroendocrine secretory proteins. *J. Neurochem.* 71: 402-409
- Venkatesh, S.G., Gorr, S.U.** (2002): A sulfated proteoglycan is necessary for storage of exocrine secretory proteins in the rat parotid gland. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283: C438-C445
- Walter, P., Johnson, A.E.** (1994): Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10: 87-119
- Wang, Y., Thiele, C., Huttner, W.B.** (2000): Cholesterolis required for the formation of immature secretory granules from the trans-Golgi network. *Traffic* 1: 952-962
- Warren, G., Malhotra, V.** (1998): The organisation of the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 493-498
- Wessel, D., Flugge, U.I.** (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138 (1): 141-3

Winberg, J.O., Kolset, S.O., Berg, E., Uhlin-Hansen, L. (2000): Macrophages secrete matrix metalloproteinase 9 covalently linked to the core protein of chondroitin sulphate proteoglycans. *J. Mol. Biol.* 304:669-680

Yeaman, C., Le Gall, A.H., Baldwin, A.N., Monlauzeur, L., Le Bivic, A., Rodriguez-Boulan, E. (1997): The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neutrophin receptors in polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* 139(4): 929-940

Zurzolo, C., Le Bivic, A., Rodriguez-Boulan, E. (1994): Cell surface biotinylation techniques. In *Cell Biology. A laboratory handbook*. J.E. Celis, editor. Academic Press Lim., London. 185-192

7. Anhang

7.1. Sequenzierergebnisse

Die im Folgenden fett gedruckten Sequenzabschnitte stellen die Mutanten dar. Kursiv geschrieben sind die beiden Restriktionsschnittstellen für die Enzyme BamHI und Sall. Die drei unterstrichenen Basen TGA stellen das eingefügte Stop-Codon dar. Bei den klein gedruckten Basen gca handelt es sich um die Mutationen zum Alanin. Die nicht-fett gedruckte Sequenz ist die des Vektors PGEX-6P-1.

SGN:

5'CGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCT
GGGATCCTATCCTGCTCGGAGAGCCAGGTACCAATGGGTCCGCTGTAAACCAGATGGC
ATTTTTGCAAACCTGCATTGAGGAGAAAGGACCACGGTTCGACCTAATAGCAGAGGAAT
CCAACGTTGGCCCCCGATGACCGATCCTGTTTTGATGAGAGGATTCCCGAATGATTC
TTCCCCATTTCTGATGACTATTGAGTCGACACAAAACGTACATCCAGATGGGATGCCAGCG
GTACCAGCGCATCTTCCGACGCAACATCAACATGGTGATGTAATGCCGCAATGCCAGTACG
C3'

SGC:

5'AGGGGCCCTGGGATCCCTAGCTGACATGGAATGGGAATACCAGCCAACAGATGAAAA
CAATATTGTCTATTTCAACTATGGGCCTTTTGATAGGATGCTCACCGAGCAAAACCAAG
AACAACCAGGAGATTTTATTATATGAGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGACTGACG
AT3'

Mut-C-13-A:

5'TTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCTATCCTGCTCGGAGAGCCAGGTACCAATGGGTC
CGCgcaAAACCAGATGGCATTTTTTGCAAACCTGCATTGAGGAGAAAGGACCACGGTTCGA
CCTAATAGCAGAGGAATCCAACGTTGGCCCCCGATGACCGATCCTGTTTTGATGAGA
GGATTCCCGAATGATTTCTTCCCCATTTCTGATGACTATTGAGTCGACTCGAGCGGCCGC
ATCGTGACTGACTGACGATCTGC3'

Mut-C-22-A:

5'GGGGCCCCTGGGATCCTATCCTGCTCGGAGAGCCAGGTACCAATGGGTCCGCTGTAAA
CCAGATGGCATTFFFFGCAAACgcaATTGAGGAGAAAGGACCACGGTTCGACCTAATAGC
AGAGGAATCCAACGTTGGCCCCCGATGACCGATCCTGTTTTGATGAGAGGATTCCCG
AATGATTTCTTCCCCATTTCTGATGACTATTGAGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTG
ACTGACGATCTGC3'

Del loop:

5'TTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAATCGGATCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGG
ATCCTATCCTGCTCGGAGAGCCAGGTACCAATGGGTCCGCTGTAAACCAAATGCAATTG
AGGAGAAAGGACCACGGTTCGACCTAATAGCAGAGGAATCCAACGTTGGCCCCCGAT
GACCGATCCTGTTTTGATGAGAGGATTCCCGAATGATTTCTTCCCCATTTCTGATGACT
ATTGAGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGGTTTCGGTG
ATGACGGTGAAAACCTCTGACA3'

Del 14:

5'CGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCT
GGGATCCCCAGATGGCATTFFFFGCAAATGCAATTGAGGAGAAAGGACCACGGTTCGACC
TAATAGCAGAGGAATCCAACGTTGGCCCCCGATGACCGATCCTGTTTTGATGAGAGG
ATTCCCGAATGATTTCTTCCCCATTTCTGATGACTATTGAGTCGACTCGAGCGGCCGCAT
CG3'

Del 22:

5'CGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTG
GGATCCATTGAGGAGAAAGGACCACGGTTCGACCTAATAGCAGAGGAATCCAACGTTG
GCCCCCGATGACCGATCCTGTTTTGATGAGAGGATTCCCGAATGATTTCTTCCCCATT
TCTGATGACTATTGAGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGC
G3'

Mut-R-12-A-K-14-A:

5'CCAAATCGGATCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCTATCCTGCTCGGAGAG
CCAGGTACCAATGGGTGcaTGTgcaCCAGATGGCATTFFFFGCAAATGCAATTGAGGAGA
AAGGACCACGGTTCGACCTAATAGCAGAGGAATCCAACGTTGGCCCCCGATGACCGA
TCCTGTTTTGATGAGAGGATTCCCGAATGATTTCTTCCCCATTTCTGATGACTATTGAG
TCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCT3'

Del 5:

5'TTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCCCATCGGATCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCCTGGG
ATCCGCCAGGTACCAATGGGTCCGCTGTAAACCAGATGGCATTTTTGCAAACCTGCATTG
AGGAGAAAGGACCACGGTTCGACCTAATAGCAGAGGAATCCAACGTTGGCCCCCGAT
GACCGATCCTGTTTTGATGAGAGGATTCCC GAATGATTTCTTCCCATTCTGATGACT
ATTGAGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTG
A3'

7.2. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
ca.	zirka
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
Del	Deletionsmutante
d.h.	das heisst
DIG	detergent-insoluble glycolipid-enriched complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoximid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	2-Desoxy(ribo)- (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT	Dithiotreithol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assozierte Degradation
ERGIC	ER-Golgi-intermediate compartment
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FOY-305	Ethyl-4-(6-Guanidinohexanoyloxy)-benzoat
GAG	Glykosaminoglykan
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
Hepes	4-(2- Hydroxyethyl)-1- Piperazinethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
mA	Milliampere

MES	2-Morpholino-Ethansulfonsäure
mg	Milligramm
Min.	Minute
mM	millimolar
ml	Milliliter
Mut	Mutante
MWCO	molecular weight cut off
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
NBT	4-Nitrobluetetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Protein A-Sepharose
PBS(T)	Phosphat gepufferte Salzlösung (+ Tween 20)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	post nuclear supernatant
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen/Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SG	Serglycin
SGC	C-terminaler Bereich von SG
SGN	N-terminaler Bereich von SG
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS(T)	Tris gepufferte Salzlösung (+ Tween 20)
TEMED	Tetramethyldiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tris	Tris-(Hydroxyl)-Aminomethan

TSDS	Tricin-SDS
TX-100	Triton X-100
U	Units
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
VSVG	vesicular stomatitis virus glycoprotein
VTC	vesicular tubular cluster
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
w/w	Gewicht pro Gewicht (weight per weight)
ZG	Zymogengranulum
ZGI	Zymogengranula-Inhalt
ZGM	Zymogengranula-Membranen

7.3 Lebenslauf

Name:	Merle Hillebrand
Geburtsdatum:	3.10.1972
Geburtsort:	Bochum
Familienstand:	ledig
Schulausbildung:	
1979-1983	Grundschule in Essen
1983-1992	B.M.V.-Schule in Essen, Abschluss: Abitur
Berufsausbildung:	
1992-1994	Ausbildung zur staatl. geprüften BTA an der städtischen Lessing-Kollegschule in Düsseldorf
Studium:	
Okt.1994-Apr.1999	Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg
Nov.1998-Apr.1999	Diplomarbeit am Institut für Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg bei Prof. Dr. H.F. Kern: „Charakterisierung und Lokalisierung des Zymogengranulaproteins ZG 38“
seit Juli 1999	Promotion am Institut für Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg bei Prof. Dr. H.P. Elsässer: „Proteoglykane und die Verpackung von Exportproteinen: Interaktion von Serglycin und ZG 16 in den Zymogengranula des exokrinen Rattenpankreas“

7.4. Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

H.-G. Aurich, M. Beato, J. Daut, A. Dressler, H.P. Elsässer, B. Feuser, Fruhstorfer, Fuhs, Garten, A. Habermehl, K.U. Hartmann, A. Hasilik, G. Hensel, Jungclas, H.F. Kern, C. Kirchner, J. Koolman, R. Lill, H.G. Löffler, M. Löffler, R. Lührmann, A. Meinhard, Melsheimer, R. Müller, W. Risau, K.H. Röhm, Schachtschabel, H. Schäfer, S. Schulz, C. Schwee, K.H. Seifart, J. Seitz, K.A. Seitz, B. Steiniger, A. Steinmetz, G. Suske, K.-H. Voigt, von Löw, H. Westphal,

7.5. Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. P. Elsässer und Frau Dr. A. Biederbick möchte ich herzlich für die Betreuung dieser Arbeit, die stete Unterstützung und Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Prof. Dr. H. F. Kern und Herrn PD Dr. Ralf Kleene danke ich sehr für die anfängliche Betreuung dieser Arbeit sowie ihr Interesse an ihrem Fortgang.

Ein lieber Dank gilt Ralf Rösser für die Unterstützung bei so manchen technischen Problemen, Volkwin Kramer für die geduldige Hilfe bei der phototechnischen Bearbeitung der Abbildungen, Herrn PD Dr. M. Schrader für seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und Gisi Lesch nicht nur für die Unterstützung bei allen verwaltungstechnischen Fragen.

Darüber hinaus sei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Zytobiologie und Zytopathologie für das freundliche und nette Arbeitsklima gedankt, insbesondere Annett Koch, Waltraud Ackermann, Oliver Borchers, Jan-Philipp Bach, Fabienne Schmit, Gabriele Schneider, Katja Schmidt, Eva-Maria Damm, Ina Kalus, Alexander Licht, Heike Borta und Barbara Wäsle für freundliche und hilfreiche Worte im Labor, bei einer Tasse Kaffee oder auf dem Weg in die Mensa.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir das Studium und noch viel mehr ermöglicht hat und mich stets unterstützt und mir verständnisvoll zur Seite gestanden hat.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin in Marburg zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel „Proteoglykane und die Verpackung von Exportproteinen: Interaktion von Serglycin und ZG 16 in den Zymogengranula des exokrinen Rattenpankreas“ am Institut für Zytobiologie und Zytopathologie unter der Leitung von Prof. Dr. H. P. Elsässer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bislang an keinem anderen in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation eingereicht.

Marburg, 20.5.2003