

**Charakterisierung der molekularen Rolle  
von BEACH-Proteinen und von PKC-Isotypen  
im Vesikelverkehr**

Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

Vorgelegt von

Heike Möhlig  
aus Bad Kreuznach

Kiel  
2005

Referent: Prof. Dr. Dieter Adam

Korreferent/in: Prof. Dr. Matthias Leippe

Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.05

Zum Druck genehmigt: Kiel, 08.06.05

Der Dekan      Prof. Dr. J. Grotemeyer



## Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Intrazellulärer Vesikelverkehr	1
1.2 Mechanismen des vesikulären Transports	5
1.3 Defekte im vesikulären Transport	11
1.4 Chediak-Higashi Syndrom (CHS)	12
1.4.1 Molekulare Charakterisierung des CHS	13
1.4.2 BEACH (beige and CHS)-Protein-Familie	16
1.4.3 Biochemische Defekte des CHS	19
1.5 Proteinkinase C (PKC)-Familie	19
1.6 RACK1 (receptor for activated C-kinase)	22
1.7 Fragestellung	23
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1 Material	25
2.1.1 Geräte	25
2.1.2 Verbrauchsmaterial	26
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	26
2.1.4 Biologische Reagenzien	27
2.1.5 Antikörper	27
2.1.6 Zelllinien	27
2.1.7 Mausstämme	28
2.2 Methoden	28
2.2.1 Zellkultur	28
2.2.2 Präparation von Organen aus Versuchstieren	29
2.2.3 Isolierung von murinen Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen)	29

2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	30
2.2.4.1	Untersuchung der zytotoxischen Aktivität von murinen NK-Zellen	30
2.2.4.2	Herstellung von Zytosol- und Membranfraktionen	31
2.2.4.3	Ionenaustausch-Chromatographie (IEC)	32
2.2.4.4	Immunpräzipitation (IP)	32
2.2.4.5	Proteinbestimmung (Coomassie)	33
2.2.4.6	Proteinkinase C-Assay (PKC-Assay)	33
2.2.4.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.2.4.8	Western Blot-Analyse	34
2.2.4.9	Subzelluläre Fraktionierung	35
2.2.4.10	Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D)	36
2.2.4.11	Saure Phosphatase-Assay	38
2.2.4.12	Immunfluoreszenz	38
2.2.5	Molekularbiologische Methoden	39
2.2.5.1	RNA-Isolierung	39
2.2.5.2	Reverse Transkription (RT)	40
2.2.5.3	Primer	41
2.2.5.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
2.2.5.5	Agarose Gelelektrophorese	44
2.2.5.6	Quantitative Echtzeit-PCR	44
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
3.1	Bedeutung der PKC-Isotypen im lysosomalen Vesikeltransport	46
3.1.1	Untersuchungen zur Membrantranslokation von konventionellen PKCs	47
3.1.2	Untersuchungen zur Enzymaktivität von konventionellen PKCs	52
3.1.2.1	Optimierung der Aktivitätsbestimmungen	52
3.1.2.2	Analysen der PKC-Aktivität von wt-, FAN-defizienten, C57-F2- und MCHSF2-Fibroblasten	53
3.1.2.3	Analyse der PKC-Aktivität mittels Immunpräzipitation	56

3.1.3 Inhibition der PKC-Proteolyse	60
3.1.4 Membrantranslokation des WD-repeat Proteins RACK1	64
3.1.5 Rolle der PKC in der Komplexbildung von FAN, RACK1 und TNF-R55	67
3.2 Bedeutung von FAN im lysosomalen Vesikelverkehr	70
3.3 RNA-Expressionsanalyse von WD-repeat Proteinen	72
3.4 Untersuchungen der Proteinzusammensetzung lysosomaler Kompartimente	81
3.5 Untersuchung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen	87
<b>4. Diskussion</b>	<b>91</b>
4.1 Bedeutung der PKC $\beta$ 2 in der Bildung eines molekularen Komplexes aus Lyst/FAN und RACK1	92
4.1.1 Intrazelluläre Lokalisierung und Aktivierung der PKC-Isotypen	93
4.1.2 Bedeutung der PKC-Proteolyse bei der Bildung von Riesenlysosomen	94
4.1.3 Membranrekrutierung von RACK1 und PKC $\beta$ 2	95
4.1.4 Bedeutung der PKC-Isotypen im TNF-R55 Signalweg	95
4.2 Bedeutung von FAN und Lyst im lysosomalen Vesikeltransport	97
4.3 Untersuchungen zur Exozytose im NK-Zellen System	100
4.4 Expressionsanalysen	103
<b>5. Ausblick</b>	<b>105</b>
<b>6. Zusammenfassung/Summary</b>	<b>107</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>110</b>
<b>Danksagung</b>	<b>127</b>

## Abkürzungen

<b>AKAP</b>	A-kinase anchoring protein
<b>AMV</b>	Avian-myoblastis-virus-Reverse Transkriptase
<b>AP</b>	Adaptin Protein
<b>ARM-Motiv</b>	Armadillo-Motiv
<b>aPKC</b>	atypische Proteinkinase C
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>aSMase</b>	saure Sphingomyelinase
<b>ATP</b>	Adenosin-Triphosphat
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BEACH</b>	Beige and CHS
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin
<b>cDNA</b>	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
<b>CHS</b>	Chediak-Higashi Syndrom
<b>CK</b>	Casein Kinase
<b>cAMP</b>	zyklisches Adenosin-Monophosphat
<b>COP</b>	Coat Protein
<b>cp</b>	crossing point
<b>cpm</b>	counts per minute
<b>cPKC</b>	konventionelle PKC
<b>Da</b>	Dalton
<b>DAG</b>	Diacylglycerin
<b>DEAE</b>	Diethylaminoethyl
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DMEM</b>	Dulbeco's Modification of Eagle's Serum
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	2'-Desoxynukleotide
<b>E</b>	Endosom
<b>ECL</b>	enhanced chemoluminescence light
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat

<b>EGTA</b>	Ethylendioxybis (ethylenitrilo-) tetraessigsäure
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Reticulum
<b>Erv</b>	ER Vesikelproteine
<b>eV</b>	endozytotische Vesikel
<b>FAN</b>	Factor associated with neutral sphingomyelinase activation
<b>fE</b>	frühes Endosom
<b>FKS</b>	fötales Kälberserum
<b>x g</b>	x-fache Erdbeschleunigung
<b>GAP</b>	GTPase-activating protein
<b>GDP</b>	Guanin-Diphosphat
<b>GEF</b>	Guanine-Nucleotide-Exchange Factor
<b>GFP</b>	green fluorescence protein
<b>G3PDH</b>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
<b>GPI</b>	Glykosyl-Phosphatidylinositol
<b>GTC</b>	Guanidinisothiocyanat
<b>GTP</b>	Guanin-Triphosphat
<b>HEAT-Motiv</b>	Huntingtin-elongation-A subunit-TOR-Motiv
<b>HPS</b>	Hermansky-Pudlak Syndrom
<b>HRS</b>	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
<b>IEC</b>	Ionenaustausch-Chromatographie
<b>IEF</b>	Isoelektrische Fokussierung
<b>IGF-R1</b>	Insulin-like growth factor 1
<b>IP</b>	Immunpräzipitation
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositoltriphosphat
<b>IPG</b>	immobilisierter pH-Gradient
<b>kB</b>	KiloBasen
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>L</b>	Lysosom
<b>LAMP</b>	Lysosome associated membrane protein
<b>LYST</b>	Lysosomal traffic regulator
<b>MHC</b>	Major histocompatibility complex
<b>M-MLV</b>	Moloney-murine-leukemia-virus-Reverse Transkriptase
<b>mRNA</b>	messenger RNA

<b>NF-κB</b>	Nuclear factor κB
<b>NK-Zellen</b>	Natürliche Killerzellen
<b>nPKC</b>	neue Proteinkinase C
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NMDA</b>	N-Methyl-D-Aspartat
<b>NSD</b>	neutrale Sphingomyelinase aktivierende Domäne
<b>NSF</b>	N-ethylmaleimide-sensitive factor
<b>nSMase</b>	neutrale Sphingomyelinase
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PBS</b>	phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PH</b>	Pleckstrin Homologie
<b>pI</b>	Isoelektrischer Punkt
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Phosphatidyl-4,5-Bisphosphat
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PLM</b>	Plasmamembran
<b>PMA</b>	12-Myristat-13-Acetat
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>pNPP</b>	para-Nitrophenylphosphat
<b>PNS</b>	postnukleärer Überstand
<b>PS</b>	Phosphatidylserin
<b>pV</b>	post-Golgi-Vesikel
<b>RACK1</b>	receptor for activated C-kinase 1
<b>rER</b>	rauhes Endoplasmatisches Reticulum
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>rRNA</b>	ribosomale RNA
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>RT</b>	Reverse Transkription
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>sE</b>	spätes Endosom

<b>SM-Proteine</b>	Sec1/Munc18-Proteine
<b>SMase</b>	Sphingomyelinase
<b>SNARE</b>	Soluble NSF attachment protein receptor
<b>SNAP</b>	Synaptosome-associated protein
<b><math>\alpha</math>-SNAP</b>	Soluble NSF attachment protein
<b>STICK</b>	Substrate that interact with C-kinase
<b>TGN</b>	Trans-Golgi Netzwerk
<b>TIP</b>	Tail interacting protein
<b>Tm</b>	Schmelztemperatur
<b>TNF</b>	Tumor Nekrose Faktor
<b>TNF-R55</b>	55 kDa TNF Rezeptor
<b>TV</b>	Transportvesikel
<b>Tris</b>	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
<b>tRNA</b>	transfer RNA
<b>t-SNARE</b>	target-SNARE
<b>VAMP</b>	Vesicle-associated membrane protein
<b>v-SNARE</b>	vesicle-SNARE
<b>v/v</b>	Volumen pro Volumen
<b>w/v</b>	Gewicht pro Volumen
<b>2D</b>	Zweidimensionale Gelelektrophorese
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

## 1.1 Intrazellulärer Vesikelverkehr

Prokaryoten besitzen eine wenig differenzierte Zellstruktur, zeichnen sich aber durch eine große Diversität in biochemischen Prozessen aus. Dagegen ist die Entwicklung der Eukaryoten von einer strukturellen Vielfältigkeit gekennzeichnet. Diese liegt in dem Besitz von Organellen und in der Entwicklung zur Multizellularität begründet. Die strukturelle Diversität der Eukaryoten erforderte eine Bildung komplexer Kommunikationswege sowohl innerhalb der Zelle, zwischen den Zellen als auch mit der Umwelt.

Hauptmerkmale der Eukaryoten sind ein membranumgebender Zellkern (Nukleus) und eine intrazelluläre Gliederung in membranumschlossene Reaktionsräume (Kompartimente). Das Prinzip der Kompartimentierung erlaubt, dass in einer Zelle gegenläufige Stoffwechselwege gleichzeitig ablaufen können. Auch Energie konservierende Mechanismen, wie der Protonengradient der Atmungskette, werden erst durch diese Aufteilung ermöglicht.

Eine Euzyte besitzt folgende Kompartimente: Zellkern, Mitochondrien, Plastiden (bei Pflanzen), Lysosomen bzw. Vakuolen (bei Pflanzen), Microbodies (Peroxisome bzw. Blatt-Glyoxisome bei Pflanzen) und das Endomembransystem mit endoplasmatischem Reticulum und dem Golgi-Apparat. Im Vergleich zu einer prokaryotischen Zelle besitzt die eukaryotische Zelle ein  $10^3$  bis  $10^4$  fach größeres Volumen, welches die Ansammlung membranumschlossener Kompartimente ermöglicht (Dacks & Doolittle, 2004). Die eukaryotischen Zellen verfügen über eine Transportmaschinerie, in der die Kompartimente und die Plasmamembran dynamisch durch Austausch von Vesikeln miteinander in Verbindung stehen.

Für den vesikulären Transport von Proteinen und anderen Molekülen existieren zwei gegenläufige Wege, die im Folgenden vorgestellt werden. Mit Hilfe dieses ausgeklügelten Transports steht die äußere Begrenzung einer eukaryotischen Zelle, die Plasmamembran, über das endoplasmatische Reticulum mit der Kernmembran in Verbindung.

### 1) Der biosynthetisch-sekretorische Weg

Die Hauptaufgabe des biosynthetisch-sekretorischen Weges besteht in der Regulierung des Transports von neu synthetisierten Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden, sowie deren Lagerung und Modifizierung.

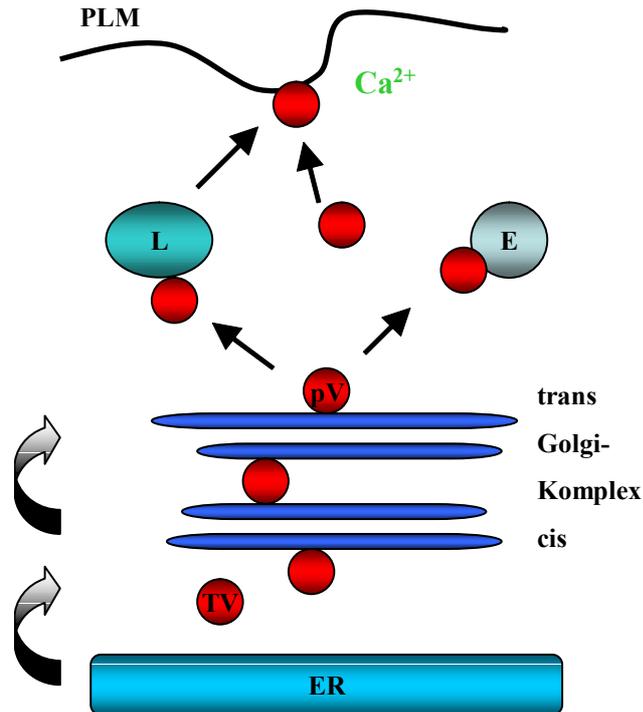
Neu synthetisierte Proteine gelangen von den Ribosomen des rauen Endoplasmatischen Reticulum (rER) in dessen Lumen. Von dort werden die Moleküle zum Golgi-Komplex transportiert und weiter prozessiert. Innerhalb des Trans-Golgi Netzwerk (TGN) werden sie sortiert, in spezifische post-Golgi-Vesikel verpackt und gelangen zu ihrem Bestimmungsort z. B. in Lysosomen, in Endosomen oder an die Plasmamembran (Abb. 1.1). Der Membrantransport erfolgt entlang hoch organisierter gerichteter „Routen“.

Die Freisetzung der Moleküle über die Zellmembran in die Umgebung erfolgt über Exozytose. Bei der konstitutiven Exozytose werden Stoffe über einen gewissen Zeitraum kontinuierlich sezerniert. Diese gilt allgemein für alle Zellen, die keine besondere sekretorische Aufgabe ausführen.

Die regulierte Exozytose ist dagegen abhängig von einem externen Stimulus. Bis vor kurzem wurde angenommen, dass der regulierte sekretorische Weg eine Besonderheit spezialisierter, z. B. neuronaler, endokriner oder exokriner Zellen repräsentiert und für die schnelle Signalübertragung zwischen Zellen verantwortlich ist (Neher, 1998). Hierbei erfolgt eine Ausschüttung von Botenstoffen über einen Kalzium-Stimulus (Burgoyne & Morgan, 1998; Jaiswal, 2001). Als Kalzium-Sensor und Fusionsmotor wurden Synaptotagmine identifiziert, die mit ihren beiden C2-Domänen Kalzium binden. Synaptotagmine repräsentieren Transmembranproteine und wurden erstmals in sekretorischen Vesikeln von neuronalen Synapsen gefunden (Ybe *et al.*, 2000). Weitere Studien zeigten, dass sie ubiquitär exprimiert werden und in unterschiedlichsten Zelltypen zu finden sind (Rao *et al.*, 2004).

Jüngere Studien zeigen, dass auch in „nicht professionellen“ sekretorischen Zellen eine Kalzium-stimulierte Exozytose stattfindet (Rodriguez *et al.*, 1997; Martinez *et al.*, 2000; Jaiswal *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2004). Hierbei sind die Übergänge zwischen konstitutiver bzw. regulierter Exozytose fließend.

Die Plasmamembran repräsentiert den Endpunkt des biosynthetisch-sekretorischen und zugleich den Anfang des endozytotischen Wegs.



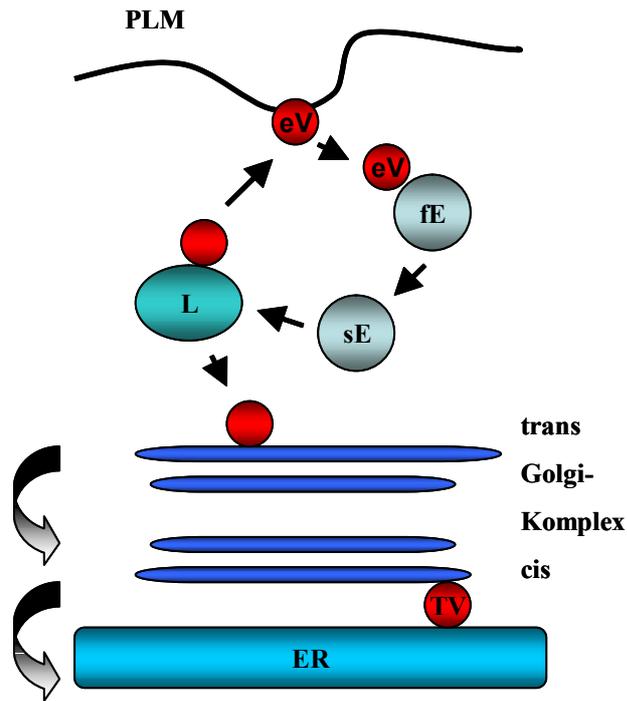
**Abbildung 1.1: vereinfachtes Schema des biosynthetisch-sekretorischen Weges.** ER: Endoplasmatisches Reticulum, TV: Transportvesikel, pV: post-Golgi-Vesikel, E: Endosom, L: Lysosom, PLM: Plasmamembran. Neu synthetisierte Moleküle werden aus dem Lumen des ER in Transportvesikel verpackt und zum Golgi-Komplex transportiert. Dort werden sie prozessiert, gelangen in post-Golgi-Vesikel und letztlich zu ihrem Zielpunkt, z. B. Endosom, Lysosom oder Plasmamembran.  $\text{Ca}^{2+}$  als Stimulus für die regulierte Exozytose ist im grünen Schriftzug dargestellt.

## 2) Der endozytotische Weg

Noch vor kurzem wurde postuliert, dass für die Aufrechterhaltung des zellulären Milieus ein einfacher gerichteter Transportmechanismus angewandt wird. Makromoleküle werden über Endozytose aufgenommen, in Lysosomen transportiert und verdaut oder zur Plasmamembran zurück transportiert (Tjelle *et al.*, 1996).

Mit der Entwicklung besserer Methoden zur Untersuchung des Vesikelverkehrs *in vivo*, vor allem in der konfokalen Lasermikroskopie, wurde das Bild der Endozytose komplexer. Es wurde eine genauere Identifizierung der endozytotischen Komponenten ermöglicht. Das endosomale System besteht aus primären endozytotischen Vesikeln, frühen Endosomen, späten Endosomen und Lysosomen (Murk *et al.*, 2003; Abb. 1.2). In Säugerzellen spielt der endozytotische Weg eine essentielle Rolle im Transport von Membrankomponenten, Rezeptorassoziierten Liganden und löslichen Molekülen an zahlreiche intrazelluläre Bestimmungsorte

(Maxfield & McGraw, 2004). In Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems (B-Lymphozyten, Dendritische Zellen, Makrophagen) agieren Endosome und Lysosome als Speicher für MHC II (major histocompatibility complex)-Moleküle (Geuze, 1998).



**Abbildung 1.2: vereinfachtes Schema des endozytotischen Weges.** PLM: Plasmamembran, eV: endozytotische Vesikel, fE: frühes Endosom, sE: spätes Endosom, L: Lysosom, TV: Transportvesikel, ER: Endoplasmatisches Reticulum. Moleküle werden über Endozytose aufgenommen und in endozytotische Vesikel verpackt. Sie gelangen über frühe und späte Endosome in Lysosomen. Dort werden sie verdaut oder zurück zur Plasmamembran oder zum Endoplasmatischen Reticulum transportiert.

## 1.2. Mechanismen des vesikulären Transports

Wie finden die Transportvesikel innerhalb dieser beiden beschriebenen Kommunikationswege ihr Ziel und wie bewegen sie sich fort? Dies sind die zentralen Fragen in der molekularen Aufklärung des Vesikelverkehrs, bis dato ist das Wissen darüber lückenhaft. Jedes Kompartiment besitzt eine funktionelle Identität, die auf der enzymatischen Zusammensetzung im Lumen beruht. In den letzten fünf Jahren wurde ein zusätzliches Charakteristikum der Kompartimente aufgeklärt, das von der Transportmaschinerie erkannt und genutzt wird, um einen zielgerichteten Vesikelverkehr zu gewährleisten (Munro, 2004). Hierbei handelt es sich um konservierte Proteinfamilien, die spezifisch für jedes Kompartiment sind. Dazu gehören Rab-Proteine und SNARE-Proteine (soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein receptor). Grundsätzlich bildet sich ein Transportvesikel aus einer Donor-Membran und gelangt gerichtet zu seiner spezifischen Ziel-Membran.

Der vesikuläre Transport findet in fünf aufeinander folgenden Stufen statt, die nachfolgend beschrieben sind.

### 1) Vesikel-Bildung („budding“)

Dieser Prozess beginnt mit der Rekrutierung kleiner GTPasen (z. B. Arf-, Sar1-Proteine) an die zytosolische Seite der Membran, an der die Vesikelabschnürung erfolgt. GTPasen sind in der Lage, Guanin-Nukleotide zu binden (Pfeffer, 2003). Mit Hilfe eines Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktors (GEF, guanine-nucleotide-exchange factor) wird Guanosin-Diphosphat (GDP) in Guanosin-Triphosphat (GTP) ausgetauscht. Mit dieser Reaktion vollziehen GTPasen eine Konformationsänderung und binden mit einem Lipidrest (Farnesyl- und Palmitoyl-Reste) an die Membran. In diesem aktiven Zustand katalysieren sie die lokale Ansammlung von Hüllproteinen (Abb. 1.3). Diese Hüllproteine sind zum einen daran beteiligt, die physikochemischen Eigenschaften der Membran zu ändern und eine Ausstülpung der Membran zu erlauben. Zum anderen unterziehen sie die potentielle „Fracht“ einer Qualitätskontrolle. Sie erkennen spezifische Signalsequenzen und ermöglichen selektiv den Eintritt in das sich bildende vesikuläre Lumen.

Es gibt vier verschiedene Hüllkomplexe. Diese Komplexe bestehen aus den eigentlichen Hüllproteinen (Coatamere), GTPasen und speziellen Transmembranproteinen, so genannten ER Vesikelproteinen (Ervs). Ervs beschleunigen die Vesikelbildung und haben einen regulatorischen Einfluss auf die Beladung der

entsprechenden Vesikel (Belden & Barlowe, 2001, Powers & Barlowe, 2002).

Die ersten beiden Hüllkomplexe, so genannte COP (coat protein)-Komplexe, spielen im frühen sekretorischen Weg eine Rolle. Zum einem vermittelt COP II die Vesikelbildung vom ER und dessen anschließenden Transport zum Golgi-Apparat (Barlowe, 1998, Kaiser & Ferro-Novick, 1998, Springer *et al.*, 1999). Zum anderem spielt COP I eine Rolle im retrograden Weg: Vesikel knospen am Golgi-Apparat und gelangen zurück in das ER (Springer *et al.*, 1999). Aber auch innerhalb der Golgi-Zisternen spielen COP I Vesikel eine Rolle (Orci *et al.*, 1997, Schekman & Mellman, 1997).

Der dritte Hüllkomplex liegt entlang der endozytotischen Route, aber auch in der regulierten Exozytose (Lafer, 2002) und besteht aus Clathrin-beschichteten Vesikeln. Aufgrund der Struktur des Clathrins (je drei kleine und drei große Polypeptidketten) ergibt sich eine „Dreibeinstruktur“. Bei Anlagerung vieler Clathrin-Moleküle entsteht ein konvexes Netz. Elektronenmikroskopisch sind netzausgekleidete Vertiefungen an der zytoplasmatischen Seite der Membranen zu erkennen, die als „coated pits“ bezeichnet werden.

Der vierte Hüllkomplex ist am wenigsten verstanden und besteht aus Caveolae, die aus integralen Membranproteinen, den Caveolinen bestehen (Parton & Richards, 2003, Fujimoto *et al.*, 2000) und ebenfalls an endozytotischen Ereignissen beteiligt sind. Im Gegensatz zu Clathrin- bzw. COP I- und COP II-beschichteten Vesikeln stülpen sich diese Caveolae-Membranstrukturen ein und nehmen ihre „Fracht“ nicht durch den Aufbau einer zytosolischen Proteinhülle auf. Aufgrund dieser Eigenschaften wird vermutet, dass Caveolae aus Lipid-Flößen (lipid rafts) entstehen (Murata *et al.*, 1995, Trigatti *et al.*, 1999). Diese zeichnen sich durch einen hohen Anteil an Cholesterin, Glykosphingolipiden und Glykosyl-Phosphatidylinositol-(GPI)-verankerte Membranproteinen aus.

## 2) Vesikel-Fortbewegung („movement“)

Nach der Vesikelbildung und dessen Ausstülpung wird das GTP der aktiven kleinen GTPasen (z. B. Arf oder Sar1) hydrolytisch in GDP gespalten. Diese Reaktion wird von GAP (GTPase-activating protein) vermittelt und resultiert in einer inaktiven GDP-gebundenen GTPase (Dacks & Doolittle, 2004). Aufgrund der einhergehenden Konformationsänderung ist die GDP-bindende GTPase nicht mehr in der Lage an der Vesikelmembran zu binden. Die genaue Bedeutung der GTP-Hydrolyse für die Vesikel-Fortbewegung ist noch unklar. Es wird vermutet, dass die beteiligten Enzyme eine Rolle in der Signalleitung und der Interaktion mit dem Zytoskelett spielen (Donaldson & Lippincott-Schwartz, 2000). Wird die Hydrolyse von GTP blockiert, bewahren die intrazellulären Transportvesikel ihre Hüllproteine und sind nicht in der Lage zu fusionieren (Tanigawa *et al.*, 1993). Vesikel werden über Interaktion mit Mikrotubuli transportiert, indem Kinesine und Dyneine die treibende Kraft darstellen (Girod *et al.*, 1999). Diese beiden „Motorproteine“ gewinnen ihre Energie aus der ATP-Hydrolyse. Kinesine sind zum Plus-Pol der Mikrotubuli gerichtet und sind verantwortlich für den anterograden Transport, d. h. Vesikel und Organellen wandern in Richtung Plasmamembran. Zytoplasmatisches Dynein bewegt sich in Richtung des Minus-Pols eines Mikrotubulus und treibt den retrograden Transport an. Organellen und Vesikel werden durch das Zytoplasma transportiert (Ligon *et al.*, 2004). Dieser bidirektionale Transportweg wird über Dynactin koordiniert. Dynactin verkörpert einen großen multimeren Proteinkomplex, welcher sowohl mit Dynein als auch Kinesin interagiert und die Assoziation der Motorproteine mit Vesikel und Mikrotubulus vermittelt (Deacon *et al.*, 2003).

## 3) Vesikel-Annäherung („tethering“)

Dieser Prozess ist bis heute in seinem Mechanismus kaum verstanden. Ebenfalls ist wenig bekannt über die beteiligten Moleküle. Es wird vermutet, dass diese einen physikalischen Kontakt zwischen dem Transportvesikel und dem Zielkompartiment herstellen (Whyte & Munro, 2002). Dieser kontrolliert den gerichteten Vesikeltransport und fördert die anschließende Fusion (Pfeffer, 1999; Guo *et al.*, 2000). „Tethering“ Faktoren sind langkettige Moleküle bzw. Molekülkomplexe, die innerhalb der Vesikelmembran bzw. der Zielmembran C-terminal verankert sind (Sonnichsen *et al.*, 1998; Abb. 3.1). Das Zytosol wird nach geeigneten Fusionspartnern mit ihrem zytosolischen N-terminalen Bereich durchsucht. Die bis

dato identifizierten Moleküle bzw. Molekülkomplexe zeigen keine konservierte Struktur. Einige besitzen allerdings eine GEF-Aktivität und fungieren als Effektoren für Rab-Proteine (Sacher *et al.* 2001; Wurmser *et al.*, 2000; Seals *et al.* 2000).

#### 4) Vesikel-Kontakt „(docking“)

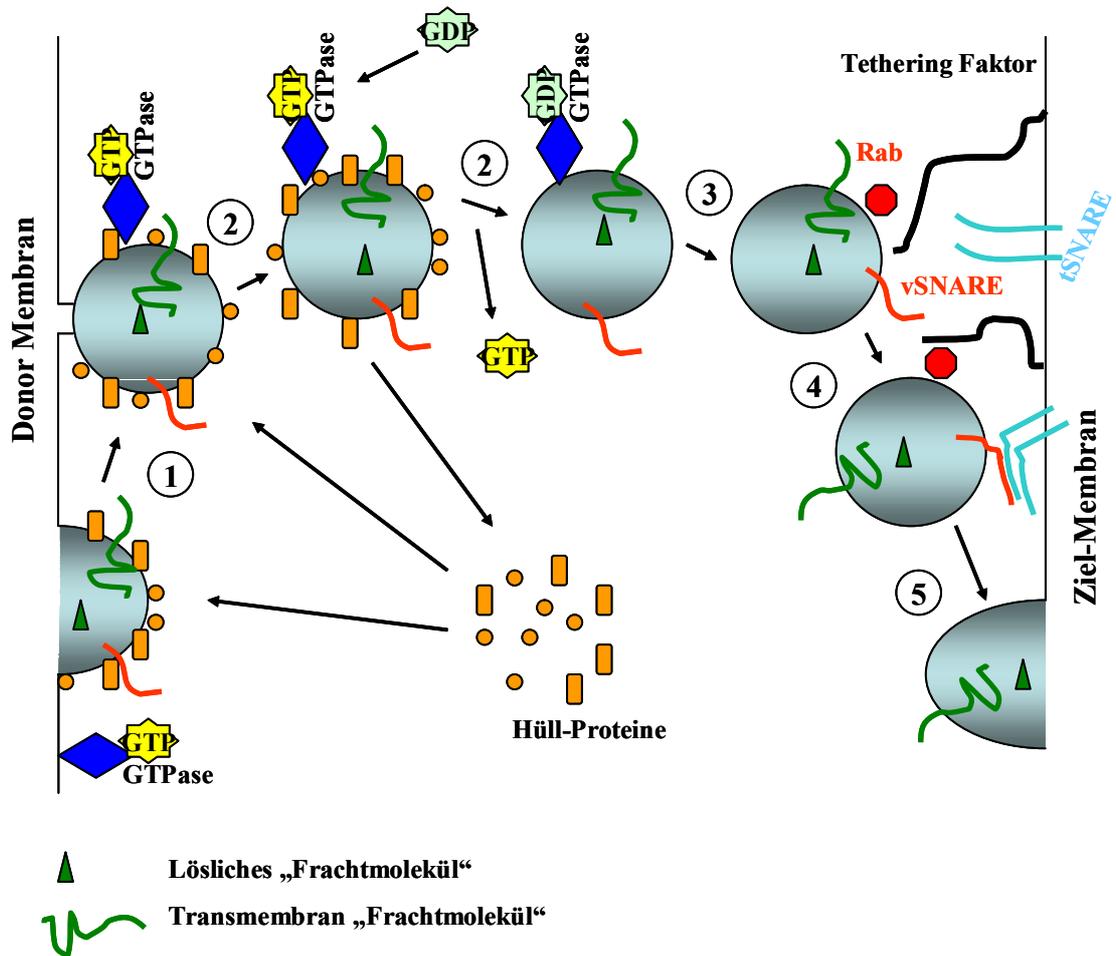
Von diesem Schritt an spielen zwei hoch konservierte Proteinfamilien eine essentielle Rolle, die für die Identifizierung der Fusionspartner und für die Aktivierung der Fusionsmaschinerie verantwortlich sind.

Eine dieser Gruppen umfasst die Rab-Proteine. Diese gehören zur Superfamilie der Ras kleinen GTPasen, sind in allen Eukaryoten zu finden und besitzen eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit von 75-95% (Bock *et al.*, 2001). Das Säugergenom codiert für mehr als 60 Rab-Proteine (Pereira-Leal & Seabra, 2001), welche jeweils eine spezifische Lokalisation aufweisen und Markermoleküle intrazellulärer Kompartimente darstellen (Abb. 3.1). Die konservierten Strukturen der Rab-Proteine sind vor allem in den Guanin-Nukleotid-Bindungsstellen zu finden. Der Carboxy-Terminus besteht aus einer variablen Sequenz, die für die subzelluläre Identifizierung verantwortlich ist (Stenmark & Olkkonen, 2001), zusätzlich besitzen Rab-Proteine eine hydrophobe Geranylgeranyl-Gruppe, durch die die Membranassoziation vermittelt wird. Rab-Proteine bewirken eine Anhäufung von Vesikeln an ihrem Zielort, vermitteln und beschleunigen die Freisetzung von SNARE-Proteinen, die die Vesikelfusion bestimmen.

#### 5) Vesikelfusion („fusion“)

Der letzte Schritt im Vesikeltransport ist die Fusion der Vesikel mit ihrem Zielkompartiment. SNARE-Proteine repräsentieren die essentiellen Moleküle dieses Vorgangs. In Säugern sind mehr als 35 SNARE-Proteine bekannt (Bock *et al.*, 2001), die in Struktur und Größe variieren. SNARE-Proteine besitzen eine C-terminale Transmembran-Domäne, mit der sie in der Membran verankert sind. Wie die Rab-Proteine gelten sie als spezifische Marker für verschiedene intrazelluläre Kompartimente und Fusionsereignisse. SNAREs werden in zwei Klassen entsprechend ihres Vorkommens eingeteilt. Innerhalb der Membran von Transportvesikeln werden sie als v-SNARE (vesicle-SNARE) bzw. als R-SNARE bezeichnet, wobei R für Arginin innerhalb der konservierten Sequenz steht (Antonin *et al.*, 2002, Fasshauer *et al.*, 1998). Zu den v-SNAREs gehört die Synaptobrevin/VAMP-Familie (vesicle-associated membrane protein). Innerhalb

der Zielmembran befinden sich t-SNAREs (target-SNARE) bzw. Q-SNAREs, wobei Q für Glutamin an einer konservierten Position innerhalb der coiled coil Sequenz steht. Mitglieder der t-SNAREs sind Syntaxine und SNAPs (synaptosome-associated protein). Ihre spezifische Funktion beruht auf dem so genannten SNARE-Motiv, das aus 60 bis 70 hoch konservierten Aminosäuren besteht. Aufgrund dieser Struktur entsteht ein sehr stabiler „SNARE-Komplex“, der aus vier  $\alpha$ -Helices besteht. Nachdem die Identität der potentiellen Fusionspartner während des „Tetherings“ und „Dockings“ überprüft wurde, kommt es zur Bildung des SNARE-Kernkomplexes, der aus jeweils einer  $\alpha$ -Helix eines v-SNAREs, einer  $\alpha$ -Helix eines t-SNAREs und zwei  $\alpha$ -Helices eines weiteren t-SNAREs besteht (Bonifacino & Glick, 2004, Rao *et al.*, 2004; Abb. 1.3). Dieser SNARE-Komplex ist dafür verantwortlich, dass die beiden zu fusionierenden Membranen einen engen Kontakt eingehen und eine Fusionspore gebildet wird. Nach erfolgreicher Fusion erfolgt die Dissoziation des SNARE-Komplexes mittels dem NSF-Faktor, einer ATPase und seinem Adapterprotein  $\alpha$ -SNAP (soluble NSF attachment protein). Neuere Studien zeigen, dass SM-Proteine (Sec1/Munc18-Proteine) essentiell für ein Fusionsereignis sind. Sie bestehen aus 650 bis 700 Aminosäuren und besitzen eine konservierte Struktur. Eine Deletion dieser Proteine führt zu einem Stop der Fusion (Bonifacino & Glick, 2004). Die Munc 18 Familie ist an exozytotischen Ereignissen beteiligt, sie bindet an spezifische t-SNAREs (Syntaxine) an der Plasmamembran (Schraw *et al.*, 2003). Es erfolgt eine Interaktion mit dem N-terminalen Bereich der SNARE-Proteine während der Komplexbildung (Bracher & Weissenhorn, 2002, Dulubova *et al.*, 2003). Einige Studien zeigten, dass Munc-Proteine spezifisch von Isotypen der Proteinkinase C (1.4.2.1), einer Familie von Serin/Threonin Kinasen, phosphoryliert werden (Burgoyne *et al.*, 2001, Reed *et al.*, 1999). Diese Phosphorylierung führt zu einer geringeren Affinität zu den jeweiligen t-SNAREs, was in einer gestörten Kinetik der Exozytose resultiert (Barclay *et al.*, 2003). In *in vitro* Studien wurden weitere Komponenten der Vesikelfusion, SNAP-25 (Shimazaki *et al.*, 1996), VAMP (Nielander *et al.*, 1995), Synaptotagmin I (Hilfiker *et al.*, 1999) und rab3 (Evans *et al.*, 2001) als PKC-Substrate identifiziert.



**Abbildung 1.3: Vereinfachtes Schema des vesikulären Transports. 1: Vesikel-Bildung**, mit GTP beladene kleine GTPasen katalysieren die Ansammlung von Hüllproteinen, **2: Vesikel-Fortbewegung**, Hydrolyse von GTP zu GDP führt zur Dissoziation von Hüllproteinen, **3: Vesikel-Annäherung**, physikalischer Kontakt zwischen Transportvesikel und Zielkompartiment durch „tethering“ Moleküle, **4: Vesikel-Kontakt**, Identifizierung der Fusionspartner durch Rab-Proteine, **5: Vesikelfusion**, Ausbildung eines SNARE Komplexes und Fusion des Vesikels mit der Zielmembran. Verändert nach Bonifacino & Glick, 2004.

### 1.3. Defekte im vesikulären Transport

Der Vesikeltransport scheint evolutiv konserviert zu sein und zeigt in seinen Grundmechanismen keine großen Unterschiede durch die Taxa der Eukaryota. Trotz seiner Bedeutung sind die einzelnen Schritte des Membrantransports auf molekularer Ebene erst in ihren Anfängen verstanden (1.2). Molekulare Defekte in der Membrantransport-Maschinerie haben große Auswirkung auf die zelluläre Homöostase, auf die zelluläre Kommunikation und letztlich auf den Organismus.

Krankheiten, die auf Defekte im lysosomalen Transport zurückzuführen sind, zeigen häufig eine Kombination von Immundefizienz und Albinismus. Die Ursache liegt in einer gestörten Sekretion von zytotoxischen Komponenten, wie Perforin und Granzymen in Immunzellen (Stepp *et al.*, 1999), sowie in einer beeinträchtigten Ausschüttung von Melanin bei Melanozyten, was zu Pigmentierungsstörungen führt (Griffiths, 2002, Stinchcombe & Griffiths, 1999).

Die molekularen Defekte resultieren aus Genmutationen, die einerseits direkt an der Transportmaschinerie beteiligte Moleküle betreffen, z. B. Rab-Proteine (Griscelli Syndrom, Menasche *et al.*, 2003) oder Hüllproteine (Hermansky-Pudlak Syndrom, Clark *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2003). Andererseits können Mutationen Gene betreffen, die für Proteine codieren, die für posttranslationale Modifikationen, z. B. an Rab-Proteinen, verantwortlich sind. Somit resultiert eine gestörte enzymatische Aktivität und/oder gestörte Navigation einzelner Moleküle zu ihren Zielkompartimenten. Ein Beispiel ist die Rab-Geranylgeranyl-Transferase, die Rab-Proteinen das Geranylgeranyl-Motiv überträgt, welches für die Anheftung der Rab-Proteine an die Membran essentiell ist. Ohne diese Modifikation sind Rab-Proteine nicht funktionell (Detter *et al.*, 2000). Tabelle 1.1 gibt einen kurzen Überblick über Krankheiten, die auf funktionelle Defekte im Vesikeltransport zurückzuführen sind. Ein detaillierter Überblick von zahlreichen genetischen- und Autoimmunerkrankungen, die ihre Ursache in einem gestörten intrazellulären Vesikelverkehr haben, findet sich in Aridor & Hannan (Aridor & Hannan, 2002).

**Tabelle 1.1: Krankheiten mit einer Kombination von Albinismus und Immundefizienz.** Dieses Zusammenspiel hat seine Ursache in einem gestörten lysosomalen Transport.

Krankheit (Maus-Modell)	Gen-Defekt	Funktion	Literatur
<b>Griscelli Syndrom (Ashen)</b>	Rab 27a	Fehlregulation der Exozytose	Menasche <i>et al.</i> , 2000
<b>Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 1 (pale-ear)</b>	HPS I	Einfluss auf Biogenese von Lysosomen ?	Dell'Angelica <i>et al.</i> , 2000
<b>Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 2 (Pearl)</b>	Untereinheit von AP-3 (Hüll-Protein)	Fehltransport von lysosomalen Proteinen	Dell'Angelica <i>et al.</i> , 1999
<b>Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 3 (Gummetal)</b>	Rab Geranylgeranyl Transferase	inaktive Rab-Proteine, gestörte Vesikelfusion	Huizing <i>et al.</i> , 2002
<b>Chediak-Higashi Syndrom (Beige)</b>	LYST (Lysosomal traffic regulator)	Regulation in lysosomalem Transport ?	Barbosa <i>et al.</i> , 1996, Perou <i>et al.</i> , 1996

#### 1.4 Chediak-Higashi Syndrom

Das Chediak-Higashi Syndrom (CHS) resultiert aus einem seltenen autosomal-rezessiven Gendefekt, welcher Spezies-übergreifend auftritt. Dieser ist sowohl beim Menschen, als auch bei Walen, Rindern, Füchsen, Katzen, Mäusen und Ratten zu finden (Shiraishi *et al.*, 2002, Ward *et al.*, 2000). Der Defekt manifestiert sich in partiellem Albinismus, einer Blutungs-Tendenz, neurologischen Defekten und einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen (Shiflett *et al.*, 2002). Diese Immundefizienz ist beim Menschen häufig in der ersten Lebensdekade letal und wird durch eine fehlende zytolytische Aktivität von T-Zellen und eine gestörte Funktion von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) verursacht (Targan & Oseas, 1983, Baetz *et al.*, 1995, Barrat *et al.*, 1999, Stinchcombe *et al.*, 1999, Stinchcombe *et al.*, 2000).

Das CHS wurde 1952 zum ersten Mal beschrieben und ist lichtmikroskopisch durch eine Häufung von stark vergrößerten vesikulären Kompartimenten charakterisiert (Shiraishi *et al.*, 2002). Diese Vesikel repräsentieren Lysosomen, Melanosomen und sekretorische Granula, die vor allem in sezernierenden Zellen zu finden sind, wie z. B. den NK- und T-Zellen. Die zytotoxische Aktivität dieser beiden Zelltypen beruht auf der Freisetzung zytolytischer Moleküle, wie z. B. Granzyme und Perforine, über Fusion

„sekretorischer Lysosome“ dieser Immunzellen mit der Plasmamembran. Sekretorische Lysosome verkörpern einerseits den Endpunkt des endozytotischen Weges (Kapitel 1.1.) mit katabolischer Funktion. Andererseits lagern sie Stoffe, die auf einen externen Stimulus hin reguliert sezerniert werden (Stinchcombe *et al.*, 2000). Beim CHS erfolgt keine geregelte Exozytose der sekretorischen Lysosomen über die Plasmamembran und somit treten Störungen der Immunabwehr auf.

Vor kurzem wurde gezeigt, dass auch nicht-sekretorische Zellen Defekte aufgrund einer gestört regulierten Exozytose (1.1) besitzen können. Diese manifestieren sich in einer unzureichenden Membranreparatur (Huynh *et al.*, 2004), die auch bei Synaptotagmin-defizienten Mäusen beobachtet wurde. Die zellulären Störungen des CHS beeinträchtigen somit alle Zellen und Gewebe, wobei die Fehlfunktion der zytotoxischen T-Lymphozyten und der NK-Zellen zu den schwerwiegendsten Symptomen führt.

Stinchcombe & Griffiths zeigten, dass in CHS T-Zellen die Biogenese der sekretorischen Lysosomen identisch mit gesunden T-Zellen ist (z. B. im Hinblick auf ihre Größe und ihre Ausstattung an lysosomalen und lytischen Proteinen). Es gibt keine Hinweise auf eine fehlerhafte Sortierung oder eine gestörte Navigation entlang des endozytotischen Transportweges (Stinchcombe & Griffiths, 2001). Aufgrund dieser Daten wird ein zellulärer Defekt im exozytotischen Transportweg angenommen, der „abwärts“ (downstream) der Vesikelbildung (1.2) statt findet (Ward *et al.*, 2000).

#### **1.4.1 Molekulare Charakterisierung des CHS**

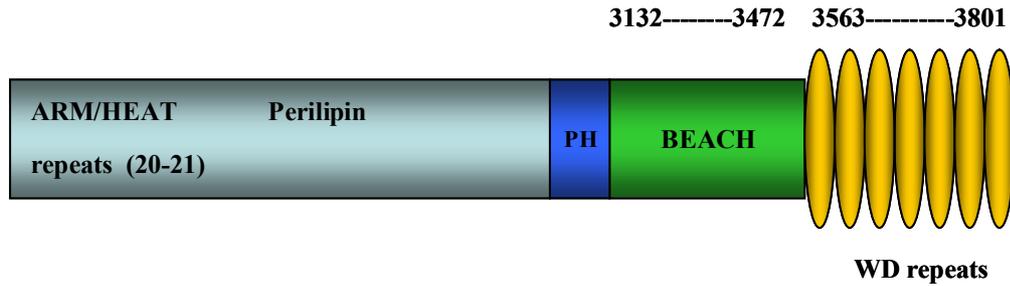
Zwei Gruppen (Perou *et al.*, 1996; Barbosa *et al.* 1996) identifizierten unabhängig voneinander das bei CHS betroffene Gen beim Menschen und sein homologes Gegenstück bei der Maus. Die von diesen Genen codierten Proteine weisen eine Ähnlichkeit auf Aminosäuren-Ebene von 88% (Ward *et al.*, 2000) und eine Aminosäure-Identität von 81% (Barbosa *et al.*, 1997, Perou *et al.*, 1997) auf.

Beide Gene wurden entsprechend der Krankheitsbilder benannt, da ihre Funktion nicht bekannt war. Im humanen System wurden der Name CHS (Chediak Higashi Syndrom), im Maus Modell Beige (beige Maus) verwendet. In den letzten Jahren kristallisierte sich die Hypothese heraus, dass CHS bzw. Beige einen Einfluss auf den lysosomalen Transportweg haben. Bis heute ist die Funktion von CHS/Beige nicht geklärt, aber es gilt als gesichert, dass CHS/Beige einen regulatorischen Einfluss auf die Fusion von

Lysosomen besitzt. Aufgrund dieser Annahme bürgerte sich der Name Lyst (lysosomal traffic regulator) für CHS/Beige ein, der auch in dieser Arbeit benutzt wird. Die mRNA von Lyst hat eine Größe von 12 kb und wird ubiquitär in geringer Kopienzahl transkribiert (Perou *et al.*, 1996). Sie codiert für ein zytosolisches Protein mit 3801 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 429,153 kDa. Die für das CHS verantwortlichen Mutationen im Lyst Gen generieren ein verfrühtes Stop-Codon. Aus einer mRNA von 5,8 kb wird ein verkürztes Protein mit fehlendem C-terminalen Ende translatiert.

Der Amino-Terminus von Lyst zeichnet sich durch verschiedene Motive aus, die eine Rolle im intrazellulären Vesikelverkehr und insbesondere im lysosomalen Transport nahe legen. N-terminal liegt ein  $\alpha$ -helikaler Bereich, der aus 20-21 ARM/HEAT-Wiederholungen und einer Perilipin-Domäne besteht (Abb. 1.4). ARM-(Armadillo) Motive vermitteln Membran-Assoziationen (Pfeifer *et al.*, 1994) und HEAT-(Huntingtin-elongation-A subunit-TOR) Wiederholungen finden sich in Proteinen, die am Vesikelverkehr beteiligt sind (Andrade *et al.*, 2001, Andrade *et al.*, 1995). Perilipin-Domänen spielen eine mögliche Rolle in der Lipid-Assoziation (Londos *et al.*, 1999). Proteine des intrazellulären Vesikelverkehrs, wie z. B. TIP47 (tail interacting Protein mit 47kDa) besitzen ebenfalls ein Perilipin-Motiv (Krise *et al.*, 2000).

Am C-Terminus von Lyst befinden sich 7 WD-40-Motive, N-terminal benachbart von einer BEACH-Domäne (beige and CHS, Abb. 1.4). WD-40-Motive vermitteln Protein-Protein Interaktionen (Neer *et al.*, 1994). Die BEACH-Domäne besteht aus ca. 300 Aminosäuren und ist charakteristisch für eine neue Protein-Familie, die innerhalb der Eukaryota hoch konserviert ist. Kristallographische Studien zeigten, dass die BEACH-Domäne in Lyst einer PH-Domäne (Pleckstrin Homologie-Domäne) benachbart ist (Abb. 1.4) und dass diese interagieren (Jogl *et al.*, 2002). PH-Domänen bestehen aus ca. 100 Aminosäure-Resten und sind in unterschiedlichen Proteinen zu finden, die Bestandteile intrazellulärer Signalwege oder Komponenten des Zytoskeletts darstellen. Die Sequenzhomologie auf Proteinebene zwischen verschiedenen PH-Domänen beträgt nur zwischen 10 und 30%, allerdings zeigt die Tertiärstruktur eine hohe Ähnlichkeit. Es wurden zahlreiche Funktionen dieser Domänen beschrieben, wie Interaktionen mit G-Proteinen, Phosphatidyl-Inositolen, phosphorylierten Serin/Threonin Resten und mit Membran-Lipiden (Pawson, 1995, Lemmon *et al.*, 1996).



**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des CHS/Beige Proteins (Lyst).** N-terminal befinden sich 20-21  $\alpha$ -helikale HEAT/ARM-Motive und eine Perilipin-Domäne. C-terminal liegen 7 WD40-Wiederholungen, benachbart von einer BEACH-Domäne und einem PH-Motiv.

Hinweise auf eine Funktion von Lyst in exozytotischen Ereignissen wurden vor kurzem in einem Hefe „Two Hybrid Screen“ aufgedeckt (Tchernev *et al.*, 2002). Als Köder (bait) verwendeten sie einen C-terminalen Bereich von Lyst. Es wurden Interaktionen mit Proteinen gefunden, die eine Rolle in der Bildung von SNARE Komplexen spielen, z. B. HRS (Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate). HRS bindet an SNAP25, einen t-SNARE, und inhibiert die Exozytose. Die Autoren postulieren, dass die Interaktion von Lyst mit HRS zu einer korrekten Ausbildung des SNARE-Komplexes führt und die Exozytose ermöglicht. Zusätzlich wurden in diesem Hefe Two Hybrid Screen Interaktionen mit Casein Kinasen gefunden. Mögliche Phosphorylierungsmotive von Casein Kinase II (CK2) und Proteinkinase C (PKC) verteilen sich über die gesamte Primärsequenz von Lyst. Diese Kinasen spielen eine Schlüsselrolle in der intrazellulären Signalweiterleitung mittels Phosphorylierung und können Moleküle über mögliche Phosphorylierungen beeinflussen, die in der Fusionsmaschinerie beteiligt sind.

### 1.4.2 BEACH (beige and CHS)-Protein-Familie

Das BEACH-Protein-Motiv ist erst 1996 durch die Charakterisierung des CHS-Proteins identifiziert worden (Barbosa *et al.*, 1996, Nagle *et al.*, 1996, Perou *et al.*, 1996). Inzwischen wurde das BEACH-Motiv in weiteren Proteinen gefunden. Die Familie der BEACH-Proteine ist in allen Eukaryoten zu finden (Wang *et al.*, 2002). Genetische Untersuchungen ergaben auch putative codierende Sequenzen in Prokaryoten und besitzen eine Sequenzähnlichkeit von über 30%. Diese ubiquitäre Präsenz spricht dafür, dass BEACH-Proteine eine evolutiv alte Molekül-Gruppe repräsentieren. Die Funktion der meisten BEACH-Proteine ist bis heute nicht aufgeklärt. Tabelle 1.2 zeigt einige Vertreter der BEACH-Protein-Familie mit ihren putativen Funktionen. Insgesamt wurden über BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)-Suche 216 BEACH-Proteine gefunden.

**Tabelle 1.2: BLAST-Suche von BEACH-Proteinen nach Sequenzhomologie (Altschul *et al.*, 1990) mit der Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information).** Als Ursprungssequenz wurde die BEACH-Domäne des murinen Lyst (P97412) verwendet. AS: Aminosäure

Spezies	BEACH-Protein (Accession Nr.)	Größe (AS)	Sequenz- Identität	Funktion
<i>Mus musculus</i>	Beige (P97412)	3788	100%	Regulator im lysosomalen Transport
	Neurobeachin (Q9EPN1)	2936	46%	Rolle in synapt. Signalweiterleitung
	WDFY3, BWF1 (AAQ84516)	3508	51%	?
	LRBA, CDC4L (Q9ESE1)	2856	45%	?
	FAN (O35242)	920	44%	Rolle im TNF-R55 Signalweg
<i>Homo sapiens</i>	CHS (Q99698)	3801	97%	Regulator im lysosomalen Transport
	Neurobeachin, KIAA1544 (Q8NFP9)	2946	46%	Rolle in synapt. Signalweiterleitung
	WDFY3, ALFY (AAN15137)	3526	51%	?
	LRBA, CDC4L (P50851)	2863	45%	?
	FAN (Q92636)	917	45%	Rolle im TNF-R55 Signalweg
<i>Gallus gallus</i>	Lyst (XP_419558)	2844	96%	Regulator im lysosomalen Transport
<i>Drosophila melanogaster</i>	Neurobeachin, DAKAP550 (Q9W4E2)	3584	46%	?
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Lyst, XM748 (NP_510030)	2692	42%	?
	Neurobeachin, F10F2.1 (Q19317)	2507	47%	?
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Beige-related (NP_171805)	3601	51%	?
<i>Dictyostelium discoideum</i>	LvsA	3619	44%	Rolle in Zytokinese, Osmoregulation
	LvsB (Beige Homolog) (AAN38985)	3633	53%	Regulator der homotypischen Fusion
	LvsC (AAN38986)	2402	48%	?
	LvsD (AAN38987)	2507	48%	?
	LvsE (AAN38983)	1929	46%	?
	LvsF (AAN38984)	1051	42%	?
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BPH1 (Beige Homolog) (P25356)	2167	44%	?

Alle BEACH-Proteine besitzen eine ähnliche strukturelle Organisation (Abbildung 1.4) und zeichnen sich durch ihre Größe aus (>400 kDa), mit Ausnahme von FAN (Factor associated with neutral sphingomyelinase). Am äußersten C-Terminus aller BEACH-Proteine liegen mehrere WD-repeats. Die Sequenz-Identität der WD-Motive liegt nur bei 20%, aber allen wird eine Faltung zu einer  $\beta$ -Propeller-Struktur vorausgesagt, welche Protein-Interaktionen begünstigt (Neer *et al.*, 1994). N-terminal befindet sich die BEACH-Domäne, die hoch konserviert ist und eine Identität von mindestens 40% innerhalb der verschiedenen Proteine aufweist (Tabelle 1.2). Benachbart liegt bei allen BEACH-Proteinen eine PH-Domäne, die nur eine geringe Sequenz-Ähnlichkeit zu den PH-Motiven anderer Proteine aufweist, aber eine ähnliche Faltung eingeht. Zusammen besitzen WD-repeats, BEACH- und PH-Domäne ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa und nehmen bei den meisten BEACH-Proteinen 25% des gesamten Moleküls ein. Der restliche N-terminale Bereich dieser Proteine ist sehr variabel (De Lozanne, 2003). Das BEACH-Motiv selbst besitzt ein Molekulargewicht von 35 kDa. Aufgrund dieser Größe wird postuliert, dass diese Domäne nicht nur für Protein-Interaktionen verantwortlich ist. Kristallographische Studien (Jogl *et al.*, 2002) zeigten, dass die BEACH-Domäne eine bis dato unbekannte Faltung eingeht. Es wurden keine eindeutigen Regionen gefunden, die für eine katalytische Funktion sprechen oder Bindungen begünstigen. Die meisten konservierten Aminosäuren liegen innerhalb eines hydrophoben Kerns. Die Oberflächen der gefalteten BEACH-Domänen zeichnen sich durch eine variabelere Zusammensetzung aus. Es wird postuliert, dass diese Konformation der BEACH-Proteine unterschiedliche Funktionen bzw. Protein-Interaktionen erleichtert.

Phylogenetische Analysen von BEACH-Proteinen (De Lozanne, 2003) zeigen eine Einteilung in 5 Klassen. Innerhalb dieser Klassen gibt es zusätzliche Regionen mit Sequenz-Ähnlichkeiten, die in den anderen Klassen nicht zu finden sind. Dies unterstützt die Vermutung, dass jede Gruppe klar abgegrenzte Funktionen besitzt.

In Klasse I befinden sich Beige/CHS (Lyst) und alle homologen Proteine anderer Spezies, wie z. B. LvsB bei *Dictyostelium discoideum*. Allen diesen BEACH-Proteinen wird eine regulatorische Rolle im lysosomalen Transport zu geschrieben.

Klasse II besteht aus LvsA von *Dictyostelium discoideum*. LvsA ist essentiell für die Zytokinese und Funktion der kontraktilen Vakuole (Kwak *et al.*, 1999, Gerald & De Lozanne, 2002). Studien der Osmoregulation zeigten, dass dieses BEACH-Protein an

Membranen bindet, in diesem Fall an die kontraktile Vakuole (Wu *et al.*, 2004).

Klasse III wird von dem kürzesten bislang gefundenen BEACH-Protein, FAN, mit nur 920 Aminosäuren repräsentiert. FAN zeigt eine Interaktion über seine WD-repeats mit der NSD-Domäne (neutrale Sphingomyelinase aktivierende Domäne) des TNF-R55 (55 kDa Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Rezeptors; Adam-Klages *et al.*, 1996) und beeinflusst die TNF-abhängige Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase (nSMase). Zusätzlich bindet FAN über seine WD-repeats das WD40-Protein RACK1 (receptor for activated C-kinases, Tcherkasowa *et al.*, 2002).

Klasse IV besteht aus Neurobeachin und seinen Homologen DAKAP550 (*Drosophila melanogaster*), F10F2.1 (*Caenorhabditis elegans*) und LRBA bzw. CDC4L. Diese BEACH-Proteine werden vorrangig im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert und besitzen eine Bindungsstelle für die regulatorische Untereinheit Typ II (RII) der Proteinkinase A (PKA) (Wang *et al.*, 2000). Diese Bindungsstelle ist charakteristisch für AKAPs (A-kinase anchoring proteins). AKAPs vermitteln die subzelluläre Lokalisation und Aktivierung der PKA (Pawson & Scott, 1997). Neurobeachin-defiziente Mäuse zeigen einen vollständigen Block der synaptischen Signalweiterleitung, der genaue molekulare Mechanismus ist allerdings nicht bekannt (Su *et al.*, 2004). LRBA bzw. CDC4L besitzen ebenfalls das AKAP-Motiv und werden im Gegensatz zu Neurobeachin in nicht nervösen Zellen exprimiert. Konfokale Studien mit LRBA-GFP (green fluorescence protein)-Konstrukten zeigten zum ersten Mal, dass die BEACH-WD-Domänen mit Membranen von Golgivesikeln und einigen Lysosomen assoziiert sind (Wang *et al.*, 2001).

Klasse V besteht aus BEACH-Proteinen, die in Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*) vorkommen und den *Dictyostelium* Proteinen LvsC, LvsD, LvsE und LvsF. Die Funktion dieser Proteine ist nicht bekannt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle bis dato aufgeklärten oder vermuteten Funktionen der BEACH-Proteine eine direkte oder indirekte Rolle im vesikulären bzw. lysosomalen Membrantransport spielen.

### 1.4.3 Biochemische Defekte des CHS

In biochemischen Studien zeigten Tanabe *et al.* eine gestörte Membran-assoziierte Proteinkinase C (PKC)-Aktivität in zahlreichen Zellsysteme, wie z. B. frisch isolierten NK-Zellen, Granulozyten und Fibroblasten aus CHS-Patienten bzw. beige-Mäusen. Sie beschrieben diese gestörte Aktivität als grundlegenden Defekt beim CHS bzw. bei der beige-Maus (Tanabe *et al.* 2000). In allen Zellsystemen stellten sie eine schnelle Herunterregulation („down regulation“) von Gesamt-PKC-Aktivität nach Stimulation fest (Ito *et al.*, 1988). Als Stimulanz verwendeten sie ein Analogon von DAG (Diacylglycerin), welches PKC *in vivo* aktiviert, den Phorbolster PMA (12-Myristat-13-Acetat). Mit der Aktivierung der PKC erfolgt eine Konformationsänderung und das zytosolische Enzym transloziert an die Plasmamembran. Diese Membranrekrutierung wird durch Stütz- bzw. Ankerproteine, so genannte RACKs (receptor for activated C-kinase) vermittelt (Kapitel 1.6). RACKs stabilisieren die aktivierte PKC an der Membran und schützen sie vor einer verfrühten proteolytischen Spaltung durch Calpain. Beim CHS erfolgt ein schnellerer Abbau der Membran-assoziierten PKC durch Calpain. Inhibition der PKC Proteolyse in Zellen aus CHS-Patienten/beige-Mäusen führte zu einer Normalisierung der PKC-Aktivität (Ito *et al.*, 1989, Cui *et al.*, 2001). Zusätzlich zeigten die Autoren eine vermehrte Ceramid Produktion in Beige-defizienten Fibroblasten (Tanabe *et al.*, 2000). Die Behandlung gesunder Fibroblasten mit einem spezifischen PKC Inhibitor, Chelerythrin, resultierte in vergrößerten Lysosomen (Tanabe *et al.*, 2000). Diese Daten zeigen, dass die Abwesenheit von Lyst und eine gestörte PKC-Aktivität Einfluss auf die Morphologie der Lysosomen haben. Auf welche Weise PKC innerhalb der Funktion von Lyst eine Rolle spielt, ist vollkommen unklar.

### 1.5 Proteinkinase C (PKC)-Familie

Die Proteinkinase C (PKC) repräsentiert eine Familie von Serin/Threonin-spezifischen Kinasen, deren Aktivität abhängig von Lipid-Cofaktoren und Regulatoren ist (Nishizuka, 1992). Mitglieder der PKC-Familie vermitteln eine Vielzahl von Signalen, die aus Ligandenbindung an Zelloberflächenrezeptoren für Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren resultieren. Die Signaltransduktion via PKC wird über ihre subzelluläre Lokalisierung reguliert.

Alle PKC-Mitglieder bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette und besitzen zwei Haupt-Domänen: N-terminal liegt die regulatorische und C-terminal die katalytische

Domäne. Es wurden 12 Isoformen innerhalb der Mammalia identifiziert, die in drei Gruppen eingeteilt werden. Diese unterscheiden sich in der Primärstruktur ihres regulatorischen Abschnitts und in ihrer Aktivierbarkeit.

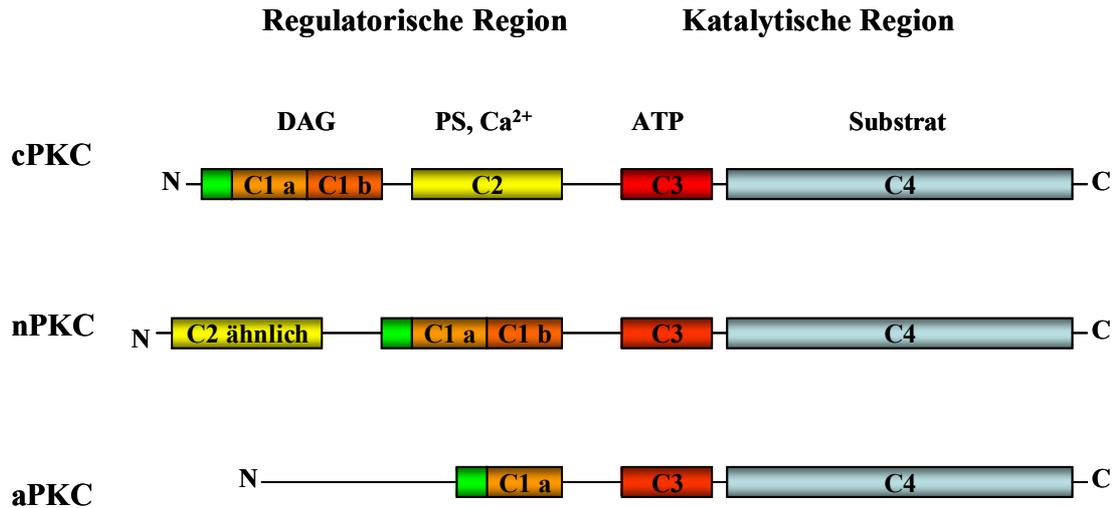
1) Die konventionellen oder klassischen PKCs (cPKC,  $\alpha$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\gamma$ ) sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und werden durch Diacylglycerin (DAG) und Phosphatidylserin (PS) oder *in vitro* durch Phorbolster (PMA) aktiviert.

2) Die neuen PKCs (nPKC,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  und  $\theta$ ) arbeiten  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig und werden durch DAG und PS aktiviert.

3) Die atypischen PKCs (aPKC,  $\zeta$  und  $\lambda$ ) werden durch Phospholipide und Fettsäuren aktiviert, sind aber insensitive gegenüber DAG und  $\text{Ca}^{2+}$  (Toker, 1998, Dekker & Parker, 1994).

Alle bisher identifizierten PKCs besitzen eine konservierte Kinaseuntereinheit. Sie besteht aus den variablen Regionen V4 und V5, einem konservierten ATP-Bindungsmotiv und einem konservierten aktiven Zentrum (C4). Die regulatorische Untereinheit zeigt einige Unterschiede in ihrem Aufbau und ihrer Sequenz. Die C1-Domäne vermittelt die Bindung an DAG bzw. Phorbolster und besteht aus 2 homologen cysteinreichen Zinkfinger-Motiven (C1a und C1b). Atypische PKCs besitzen eine verkürzte C1-Domäne und sind nicht in der Lage DAG zu binden (Newton, 1997, Ohno & Nishizuka, 2002).

N-terminal der C1-Domäne befindet sich eine Pseudosubstrat-Region, die bei allen PKCs vorkommt. Diese kurze Sequenz besitzt ein PKC-Phosphorylierungsmotiv, interagiert mit der Kinaseuntereinheit und resultiert in einer Autoinhibition der PKC (Newton, 1995). Die C2-Domäne der regulatorischen Untereinheit vermittelt die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  und PS bei den konventionellen PKCs. Den nPKCs und aPKCs, die nicht durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierbar sind, wurde ein Fehlen dieser C2-Domäne zugesprochen. Kürzliche Studien deckten ähnliche Sequenzbereiche zur C2-Domäne auf, allerdings fehlen kritische Aminosäuren zur Bindung von Kalzium (Pappa *et al.*, 1998).



**Abbildung 1.5:** Schematische Darstellung der Primärstruktur von konventionellen PKCs (cPKC), neuen PKCs (nPKC) und atypischen PKCs (aPKC). Die N-terminale Pseudosubstrat-Region ist grün, die C1-Domäne orange, die C2-Domäne gelb unterlegt. Alle 3 Domänen gehören zur regulatorischen Region. Die katalytische Region besteht aus dem ATP-Bindungs-Motiv (C3-Domäne, rot) und der Substrat-bindenden Domäne (C4-Domäne, blau). Verändert nach Newton, 1995.

Wie bereits ausgeführt, werden konventionelle PKCs (cPKC) *in vivo* durch Diacylglycerin (DAG) aktiviert, *in vitro* imitieren Phorbol ester (PMA) diesen Effekt. Beide Moleküle induzieren eine Translokation der inaktiven zytosolischen PKC an die Membran. DAG entsteht in der Membran aus der Spaltung von Phosphatidyl-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) durch die Phospholipase C (PLC) und bindet an die C1-Domäne. Zusätzlich wird Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) gebildet, welches zur Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern, wie dem Endoplasmatischen Reticulum (ER), führt. Ca<sup>2+</sup> bindet an die C2-Domäne und erhöht deren Affinität zu sauren Lipiden, wie z. B. Phosphatidylserin (PS). Diese synergistische Aktivierung durch Ca<sup>2+</sup> und DAG führt zu einer engen Membranassoziation und einer Konformationsänderung, welche die Autoinhibition des Enzyms aufhebt (Newton, 1995, Nishizuka, 1986).

Fluoreszenzstudien zeigten spezifische intrazelluläre Bestimmungsorte der PKC-Isoformen (Goodnight *et al.*, 1995). Wie gelangen die PKC-Isoformen spezifisch an definierte Membranen innerhalb der Zelle? Protein-Protein Interaktionen ermöglichen eine subzelluläre Lokalisation. Einige Motive, die eine Proteinwechselwirkung fördern sind PH-, LIM-Domänen (Michelsen *et al.*, 1993, Pawson, 1995) und WD-repeats (Neer *et al.*, 1994). Die Gruppe der bis heute aufgeklärten PKC-interagierenden Proteine ist groß und sehr heterogen. Es ist nicht möglich, ein generelles Modell zu postulieren. Die

PKC-Bindungspartner werden in Subgruppen aufgeteilt: STICKs (substrates that interact with C-kinase) sind PKC-Interaktionspartner, die PKC Phospholipid-abhängig binden, durch PKC phosphoryliert werden und in verschiedenen subzellulären Kompartimenten immer an der Schnittstelle zwischen Membranen und Zytoskelett zu finden sind (Jaken & Parker, 2000, Parekh *et al.*, 2000). RACKs (receptor for activated C-kinase) sind keine PKC-Substrate, binden PKCs aber ebenfalls Phospholipid-abhängig. RACKs werden als Ankerproteine beschrieben, die mit PKC-Isoformen spezifisch an subzellulären Membranen lokalisiert sind (Csukai *et al.*, 1997).

### **1.6 RACK1 (receptor for activated C-kinase)**

RACK1 wurde als spezifischer Interaktionspartner der PKC  $\beta$ 2 identifiziert (Ron *et al.*, 1995). Diese Interaktion führt zu einer erhöhten Substrat-Phosphorylierung der PKC (Ron *et al.*, 1994). RACK1 besitzt ein Molekulargewicht von 36 kDa, besteht aus 7 WD40-repeats und fungiert als Stütz- bzw. Ankerprotein für die PKC  $\beta$ 2. Die WD40-repeats gehen eine direkte Protein-Protein Wechselwirkung innerhalb der C2-Region der regulatorischen Domäne der aktivierten zytosolischen PKC ein (Ron *et al.*, 1999) und rekrutieren diese an die Membran. Aufgrund der WD-repeat-Motive von RACK1 werden Interaktionen von RACK1 mit weiteren Proteinen postuliert, die eine spezifische Translokation der PKC  $\beta$ 2 gewährleisten (Schlechtman & Mochly-Rosen, 2001).

Aufgrund der starken Homologie von RACK1 zur  $\beta$ -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen wurde postuliert, dass die Struktur von RACK1 aus einem Propeller besteht, der 7  $\beta$ -Blätter besitzt (Lambright *et al.*, 1996, Sondek *et al.*, 1996). Diese Struktur suggeriert eine Vielzahl von Protein-Interaktions-Möglichkeiten. Die bisher identifizierten Bindungspartner sind Moleküle der intrazellulären Signalkaskaden, wie die Serin/Threonin Kinase PKC  $\beta$ 2, die Tyrosinkinase Fyn (Thornton *et al.*, 2004), eine cAMP spezifische Phosphodiesterase (PDE4; Yarwood *et al.*, 1999), eine Phosphatase (PTPmu; Mourton *et al.*, 2001) aber auch zahlreiche intrazelluläre Regionen von Rezeptoren, wie der NMDA-Rezeptor (N-Methyl-D-Aspartat; Yaka *et al.*, 2002) und der Insulin Rezeptor IGF-1R (insulin-like growth factor 1; Kiely *et al.*, 2002). Seit kurzem wird RACK1 auch eine Rolle in der Transkription, Translation und der Zusammensetzung und Aktivierung von Ribosomen zugeschrieben (Yaka *et al.*, 2003,

Ceci *et al.*, 2003). In Hefe Two Hybrid Studien wurde eine Interaktion von RACK1 mit der C-terminalen WD-repeat Region von FAN nachgewiesen. Kollokalisationsstudien zeigten eine Komplexbildung des TNF-R55 mit FAN und RACK1 (Tcherkasowa, *et al.*, 2002).

Zu der ursprünglichen Funktion als Ankerprotein bzw. Stützprotein für PKC  $\beta$ 2 wird RACK1 als „universeller“ Interaktionspartner von einer Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen betrachtet, der zahlreiche verschiedene biologische Funktionen reguliert.

### **1.7. Fragestellung**

Das Lyst-Protein besitzt eine ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit mit dem WD-repeat Protein FAN, welches Teil der Signalwege des TNF-R55 ist (Adam-Klages *et al.*, 1996). Beide besitzen eine C-terminale hoch konservierte BEACH-Domäne, die zum C-Terminus hin von WD-repeats und N-terminal von einer PH-Domäne benachbart ist. Diese strukturellen Ähnlichkeiten von Lyst und FAN legen mögliche überschneidende biochemische bzw. zellbiologische Funktionen der beiden Proteine nahe. Aber bis jetzt sind für FAN-defiziente Mäuse weder generelle Defekte der NK-Zellen, noch phänotypische Auffälligkeiten wie Riesenlysosomen beschrieben.

Als spezifischer Interaktionspartner von FAN war das WD-repeat Protein RACK1 identifiziert worden (Tcherkasowa *et al.*, 2002), welches aktivierte konventionelle PKCs (cPKC), spezifisch die PKC  $\beta$ 2, an die Zellmembran rekrutiert (Ron *et al.*, 1995). Daher lag die Vermutung nahe, dass die PKC  $\beta$ 2 in einem Komplex mit RACK1 und FAN an die Plasmamembran rekrutiert wird. Eventuell ist dieser „trimolekulare“ Komplex wichtig für die Stabilität der aktiven PKC  $\beta$ 2. Biochemische Studien des Chediak-Higashi Syndroms zeigten weiterhin, dass im CHS eine gestörte Membrantranslokation und Membran-assoziierte Aktivität der cPKCs, insbesondere der PKC  $\beta$ 2, ursächlich für die Bildung von Riesenlysosomen und die Defekte der NK-Zellen sind (Ito *et al.*, 1988, Ito *et al.*, 1989, Sato *et al.*, 1990, Tanabe *et al.*, 1998). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der beiden BEACH-Proteine FAN und Lyst ist es vorstellbar, dass auch Lyst einen Komplex mit RACK1 und PKC  $\beta$ 2 bildet. Diese Hypothese würde die beschriebene gestörte Rekrutierung der PKC  $\beta$ 2 an die Plasmamembran und die beeinträchtigte Stabilität der aktiven PKC  $\beta$ 2 in Lyst-defizienten Zellen erklären.

Für die meisten bis dato identifizierten BEACH-Proteine wird eine Funktion im lysosomalen Vesikelverkehr postuliert, allerdings ist bislang kein molekularer Mechanismus bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war daher, die molekularen Mechanismen zu untersuchen, über die BEACH-Proteine, spezifisch die Proteine Lyst und FAN und das WD-repeat Protein RACK1, sowie PKC-Isotypen zum lysosomalen Vesikeltransport und zur Aktivierung von NK-Zellen beitragen.

Dazu sollten murine Fibroblasten aus FAN-defizienten und Beige/Lyst-defizienten Mäusen auf eine mögliche gestörte Aktivität und Rekrutierung von PKC-Isotypen und RACK1 hin untersucht werden. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob eine gestörte PKC-Aktivität tatsächlich Einfluss auf die Lysosomengröße besitzt. Neben den Analysen auf Proteinebene sollten die beteiligten BEACH-Proteine FAN und Lyst, sowie das WD-repeat Protein RACK1 auf ihre Gewebs- bzw. Zelltyp-spezifische Expression überprüft werden, um erste Hinweise zu erhalten, ob die Funktion dieser Proteine bzw. deren Defizienz für einzelne Gewebe bzw. Zelltypen wichtiger ist als für andere. Dies sollte speziell im Hinblick auf die Tatsache erfolgen, dass FAN-defiziente Mäuse keine den gesamten Phänotyp betreffenden Defekte zeigen. Zusätzlich sollten lysosomale Kompartimente von Lyst-defizienten Fibroblasten getrennt vom intrazellulären Verband auf ihre Proteinzusammensetzung im Vergleich zu Wildtyp-Fibroblasten untersucht werden, um erste Hinweise auf die Ursachen des gestörten lysosomalen Transports in diesen Zellen zu erhalten. Für FAN-defiziente Fibroblasten sollten analoge Untersuchungen durchgeführt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Agfa	Curix 60 Entwicklermaschine
Amersham Biosciences	Hyperfilm™ ECL-Chemilumineszenzfilm, HiTrap™ DEAE FF Chromatographie Säulen
Beckman Coulter	Ultrazentrifuge (TL-100), Ultrazentrifuge (XL-80), Szintillationszähler (LS 6000 LL)
Bio-Rad	Smart Spec 3000 Spectrophotometer, PowerPac™ 200 Power Supply, Mini-PROTEAN® 3, PROTEAN® II xi (Gel- elektrophoresekammern), Mini Trans-Blot® Cell (Blot Kammern), PROTEAN® IEF System (2D Gelelektrophorese), Gel Air Drying System (Geltrockner)
Branson	Ultraschallstab (SONIFIER 250)
Eppendorf	Tischzentrifuge (5415R), Kühlzentrifuge (4517R), Thermomixer 5436
Canberra Packard	γ-Counter
Forma Scientific	Zellkulturbrutschrank
Invitrogen	HORIZON Agarosegel Elektrophoresekammern
Heraeus	LaminAir HB 2448K, Megafuge 1.0, Minifuge RF
IKA-Labortechnik	Schütteltisch KS250 Basic
Miltenyi Biotec	Mini MACS Separation columns
Sartorius Analytic	Analysewaage
Roche Applied Science	LightCycler
Zeiss, Jena	Laserscanning Mikroskop 510

### 2.1.2. Verbrauchsmaterial

Die Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Bio-Rad, Eppendorf, Falcon, Greiner, Nunc, Sarstedt, Schleicher & Schüll und Schütt bezogen.

### 2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Alle Grundchemikalien wurden in Analysequalität von den Firmen Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen. Spezielle Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Biosciences	ECL Detektions Kit, Protein Kinase C Enzyme Biotrack™ Assay System
Bio-Rad	ReadyStrip IPG Strips pH 4-7 / pH 5-8, Bio-Lyte 3/10 Ampholyte 100x (2D Gelelektrophorese)
Cedarlane Laboratories	Lympholyte-M
INTAS Imaging Instruments	Geldokumentation
Invitrogen	Taq Polymerase, 50mM MgCl <sub>2</sub> , 10x PCR Reaktionspuffer (-MgCl <sub>2</sub> ), Lyso Tracker® Red (DND-99)
Macherey-Nagel	RNA-Isolierungs Kit
MBI Fermentas	Desoxynukleotide (dNTPs), DNA-Längenstandard (1kbp)
Miltenyi Biotec	NK-Zellen Isolierungs Kit
NEN Life science	EasyTides Adenosine 5'-triphosphate [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]
PAA	DMEM Kulturmedium, RPMI-1640 Kulturmedium
PEQLAB Biotechnologie	PeqGOLD Universal Agarose
Pierce Biotechnologie	Coomassie Proteinbestimmungsreagenz
Roche Applied Science	First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV), Light Cycler Fast Start DNA Marker <sup>PLUS</sup> SYBR Green
Zinsser Analytic	Aquasafe 300 Plus (Szintillatorflüssigkeit)

#### 2.1.4. Biologische Reagenzien

Rekombinantes, humanes TNF [hTNF, spezifische Aktivität  $5 \times 10^7$  Units/mg) wurden von Dr. G. Adolf (Bender Med Systems, Wien) zur Verfügung gestellt.

Oligonukleotide wurden von der Firma TIB MolBiol bezogen.

#### 2.1.5. Antikörper

BD Biosciences/Pharmingen	RACK1 (610178)
Developmental Studies Hybridoma Bank	LAMP 1 (11D4B)
Santa Cruz Biotechnology	$\beta$ -Aktin (C-11) sc-1615
	Pan PKC (A-3) sc-17769
	PKC $\alpha$ (C-20) sc-208
	PKC $\beta$ 1 (E-3) sc-8049
	PKC $\beta$ 2 (C-18) sc-210
	PKC $\gamma$ (C-19) sc-211
Jackson ImmunoResearch Laboratories	POD-konjugierte Sekundärantikörper (Ziege anti-Maus, Ziege anti-Kaninchen, Ziege anti-Ratte)

#### 2.1.6 Zelllinien

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit murinen Fibroblasten gearbeitet. Die FAN-defizienten (factor associated with nSMase activation) und dazugehörige Wildtyp (wt)-Zelllinien sind immortalisierte Embryonalfibroblasten und wurden von Dirk Kreder im Rahmen seiner Doktorarbeit am Institut für Immunologie hergestellt (Kreder *et al.*, 1999; Kreder, Dissertation 1998). Murine Fibroblasten aus Wildtypmäusen (C57-CF2), aus Beige-defizienten Mäusen (MCHSF2) (Perou & Kaplan, 1993) und die Zelllinie Beige24 wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Jerry Kaplan (Institut für Pathologie, Universität Utah, USA) zur Verfügung gestellt. Beige24-Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Kaplan aus beige defizienten Mäusen generiert und mit einem Yeast Artificial Chromosome (YAC), welches das beige Gen codiert, rekonstituiert (Perou *et al.*, 1996). Die murine YAC-1 und die humane K562 Lymphom Zelllinien wurden von der Organisation ATCC (American Type Culture Collection) bezogen.

### 2.1.7 Mausstämme

Der Wildtypstamm C57BL/6 wurde von Charles River Laboratories bezogen und in der Zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel zur Zucht gehalten.

Zur Charakterisierung der molekularen Rolle von Riesenlysosomen im Krankheitsbild des Chediak-Higashi Syndrom wurde der Mausstamm C57BL/6-*lyst*<sup>bg-J/+</sup> von Charles River Laboratories bezogen. Dieses Maus-Modell Beige besitzt eine Spontanmutation im *Lyst* Gen (*lysosome traffic regulator*), welches für den Phänotyp (vergrößerte Lysosomen) verantwortlich ist. Aufgrund dieser Mutation erfolgt eine Expression eines verkürzten Proteins.

FAN-defiziente Mäuse wurden transgen von Dirk Kreder im Rahmen seiner Doktorarbeit am Institut für Immunologie hergestellt (Kreder *et al.*, 1999; Kreder, Dissertation 1998) und in der Zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel zur Zucht gehalten.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> und 98% relativer Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen kultiviert und alle 2-3 Tage passagiert. Zur Kultivierung der murinen Fibroblasten wurde DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) als Kulturmedium verwendet. Das Medium wurde mit 10% v/v fötalem Kälberserum (FKS), 2 mM Glutamin und je 50 µg/ml Penicillin und Streptomycin supplementiert. Die murine YAC-1 und humane K562 Lymphom Zelllinien wurden in RPMI 1640 Kulturmedium, das mit 10% v/v FKS, 2 mM Glutamin und je 50 µg/ml Penicillin/Streptomycin versetzt wurde, gehalten.

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in 1 ml FKS mit 10% v/v DMSO resuspendiert und in Flüssigstickstoff (-196°C) gelagert.

### **2.2.2. Präparation von Organen aus Versuchstieren**

Versuchstiere wurden durch Genickbruch in Äthernarkose schmerzfrei getötet. Es wurden Milz, Herz, Lunge, Niere und Leber nach Desinfektion des Bauchfells steril entnommen. Für eine spätere RNA-Isolierung wurden die Organe in Flüssigstickstoff in 1,5 ml Reaktionsgefäßen schockgefroren. Zur Gewinnung Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) wurden je zwei Milzen in 10 ml warmen RPMI 1640 Medium in ein 50ml Reaktionsgefäß steril überführt. Anschließend wurden die Milzen in einer Zellkulturschale zerkleinert. Das aufgeschlossene Gewebe wurde über eine steriles 70 µM Sieb gegeben. Die gewonnene Splenozytensuspension wurde in 5 ml warmem RPMI 1640 für kurze Zeit gelagert und zur Isolierung von NK-Zellen verwendet.

### **2.2.3. Isolierung von murinen Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen)**

Zur Gewinnung reiner Lymphozyten wurden Erythrozyten und Debris aus der Splenozytensuspension durch Dichtegradienten-Zentrifugation mit Hilfe von Lympholyte-M (Cedarlane Laboratories) entfernt. Hierzu wurde 10 ml warmes (37°C) Lympholyte-M in einem 50 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und anschließend vorsichtig mit 5ml der Splenozytensuspension überschichtet. Durch Zentrifugation (20 min, 1000 x g, Raumtemperatur (RT), ohne Bremse) reicherte sich eine definierte Lymphozytenschicht in der Interphase an. Diese Zellen wurden vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt, in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt, zweimal mit 10 ml warmem PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung) gewaschen (Zentrifugation für 10 min, 800 x g, RT) und in 5 ml RPMI 1640 resuspendiert.

Zur Isolierung von NK-Zellen aus der Lymphozytensuspension wurde das MACS System (Miltenyi Biotec) für magnetische Separation verwendet. Dieses Verfahren beruht auf der Depletion von Nicht-NK-Zellen über Negativ-Selektion, indem diese Zellen magnetisch markiert und innerhalb des magnetischen Felds zurückgehalten werden, während unmarkierte NK-Zellen das magnetische Feld passieren und als Durchfluß aufgefangen werden.

Alle Schritte wurden auf Eis und möglichst schnell durchgeführt. Es wurden  $1 \times 10^7$  Leukozyten in 40 µl Puffer (PBS, 0,5% w/v BSA, 2 mM EDTA) eingesetzt. Diese wurden entsprechend dem Protokoll des murinen NK-Zell-Isolierungs Kit (Miltenyi Biotec) mit einem 10 µl Mix an Biotin-konjugierten monoklonalen Primärantikörpern für 10 Minuten inkubiert. Die magnetische Markierung erfolgte durch eine Inkubation

von 15 Minuten mit 20 µl anti-Biotin MicroBeads und 30 µl Puffer. Vor der magnetischen Selektion wurden die Zellen mit 1,5 ml kaltem Puffer gewaschen (10 min, 300 x g, 4°C) und in 500 µl Puffer resuspendiert. Die magnetische Separation wurde mit einer MACS Säule (Miltenyi Biotec) durchgeführt. Die im Eluat enthaltenen gereinigten NK-Zellen wurden in einem Endvolumen von 2 ml aufgefangen und auf Eis für die weitere Verwendung im Chromfreisetzungsversuch gelagert.

#### **2.2.4. Proteinbiochemische Methoden**

##### **2.2.4.1. Untersuchung der zytotoxischen Aktivität von murinen NK-Zellen**

Die zytotoxische Aktivität unstimulierter Splenozyten gegenüber der murinen Lymphom Zelllinie YAC-1 wurde in einem Chromfreisetzungsversuch (Chrome release assay) untersucht. Die Verwendung dieser MHC-freien Zelllinie als Ziel stellt sicher, dass die gemessene Zytotoxizität nicht von CD8<sup>+</sup>, sondern von NK-Zellen ausgeht. Die Menge der freigesetzten Radioaktivität in Form von Chrom 51 wird als Überstand mit Hilfe eines  $\gamma$ -Counters (Canberra Packard) quantifiziert und verhält sich proportional zu der lytischen Aktivität der NK-Zellen.

YAC-1 Zellen wurden auf eine Zellzahl von  $5 \times 10^5$  in 1 ml RPMI 1640 eingestellt und 1 h bei 37°C im Schüttelwasserbad mit 100 µCi <sup>51</sup>Cr inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (5 min, 300 x g, RT) wurde das Präzipitat in 10 ml warmem RPMI resuspendiert, erneut bei 37°C für 1 Stunde inkubiert und anschließend in 5 ml RPMI aufgenommen. Die radioaktiv markierten Target-Zellen wurden in einer Flachbodenplatte mit 96 Kavitäten mit 5000 Zellen/50 µl pro Kavität ausgesät. Die NK-Zellen als Effektor-Zellen (50 µl) wurden als Dreifachwerte in einem Target/Effektor Verhältnis von 1:100, 1:50, 1:25, 1:12,5, 1:6,2 zugegeben. Jede Kavität wurde mit 100 µl Medium auf ein Endvolumen von

200 µl aufgefüllt. Als interne Kontrolle wurde die Spontanfreisetzung der Target Zellen gemessen. Es wurden Sechsfachwerte pipettiert (50 µl Target Zellen + 150 µl Medium). Zusätzlich wurde eine Maximalfreisetzung in Dreifachwerten induziert, indem 10 µl 20% Triton X100 zugegeben wurden. Dieses Detergenz zerstört die Zellmembran und es kommt zu einem ungehinderten Ausstrom von Chrom 51. Die 96 well Platte wurde für 1 Minute bei 300 x g zentrifugiert und für 4 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Um das freigesetzte <sup>51</sup>Cr zu messen, wurden die Zellen bei 300 x g für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand im  $\gamma$ -Counter quantifiziert.

Die spezifische Lyse wurde mit nachstehender Formel berechnet, wobei zu beachten ist, dass die Spontanfreisetzung der Target-Zellen 20% der maximalen Freisetzung nicht überschreitet.

$$\text{Spezifische Lyse [\%]} = \frac{100 \times \text{Versuch cpm [\%]} - \text{spontan Freisetzung cpm[\%]}}{\text{Max Freisetzung cpm[\%]} - \text{spontan Freisetzung cpm[\%]}}$$

#### **2.2.4.2. Herstellung von Zytosol- und Membranfraktionen**

Um die Translokation von Isotypen der Proteinkinase C (PKC) nach Stimulation der Zellen mit PMA [0,1  $\mu\text{M}$ ] aus dem Zytosol an die Membran zu dokumentieren, wurden Gesamtlysate hergestellt und anschließend mittels Ultrazentrifugation und Zugabe des Detergenz Triton X100 in Zytosol- und Membranfraktionen aufgetrennt.

Die Stimulation von adhärennten Fibroblasten erfolgte in Zellkulturschalen. Hierzu wurde die benötigte Anzahl Zellen ( $5 \times 10^6$  für 15 cm Schalen) in supplementiertem DMEM Medium ausgesät und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

Am nächsten Tag wurde mit PMA [0,1  $\mu\text{M}$ ] und hTNF- $\alpha$  [100 ng/ml] eine Kurzzeit-Stimulation durchgeführt (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 Minuten). Danach wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 500  $\mu\text{l}$  Homogenisierungspuffer (20 mM Tris HCl pH 7,5; 250 mM Sacharose; 2 mM EDTA; 5 mM EGTA; 2 mM PMSF; 50 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) aufgenommen. Um die Membranstruktur aufzubrechen, wurden die Proben dreimal für 20 Sekunden mit einem Ultraschallstab (Branson) beschallt. Nach Ultrazentrifugation (100000  $\times g$ , 1 h,  $4^\circ\text{C}$ ) lag das Zytosol im Überstand vor. Die Membranbestandteile im Präzipitat wurden in Homogenisierungspuffer mit Triton X100 resuspendiert und zentrifugiert (40000  $\times g$ , 15 min,  $4^\circ\text{C}$ ). Der resultierende Überstand stellte die angereicherte Membranfraktion dar. Die generierten Zytosol- und Membranfraktionen wurden nach einer Proteinbestimmung (2.2.4.5) entweder direkt per Western Blot mit den Gesamtfractionen bzw. nach Immunpräzipitation (IP) mit PKC-spezifischen Antikörpern auf die Lokalisation der PKC-Isotypen hin untersucht. Mittels eines Enzymassays wurde parallel die PKC-Aktivität der frisch generierten Fraktionen und der Immunpräzipitate ermittelt (2.2.4.6).

### **2.2.4.3. Ionenaustausch-Chromatographie (IEC)**

Die Zytosol- und Membranfraktionen (2.2.4.2) wurden mittels einer Ionenaustausch-Chromatographie (IEC) gereinigt, bevor die PKC-Aktivität gemessen wurde (2.2.4.6). Bei der IEC binden Proteine durch elektrostatische Wechselwirkungen an eine Matrix, die positiv geladene Gruppen (Anionenaustauscher) trägt. In dieser Arbeit wurden DEAE Säulen mit einem 1ml Fassungsvermögen von Amersham Biosciences (HiTrap™ DEAE FF) verwendet.

Das Prinzip beruht auf dem unterschiedlichen Verhalten der Proteine bei veränderten pH- und Salz-Bedingungen. In dieser Arbeit wurde bei konstantem pH chromatographiert und die PKC durch stufenweise Änderung der Ionenstärke absorbiert bzw. eluiert. Die Säule wurde zunächst mit 5 ml Äquilibriumspuffer niedriger Ionenstärke (20 mM Tris HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 2 mM PMSF; 50 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit 1 M NaCl-Äquilibriumspuffer gewaschen, die Probe dazu gegeben und mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen (0,2 M NaCl, 0,4 M NaCl, 0,6 M NaCl) eluiert. Die PKC lag vermehrt in einem Eluat mit einer NaCl Konzentration von 0,2 M stabil vor. Nach einer Proteinbestimmung (2.2.4.5) wurden die Eluate auf ihre PKC-Aktivität (2.2.4.6) hin untersucht.

### **2.2.4.4. Immunpräzipitation (IP)**

Mit diesem Verfahren wurden die gesuchten Proteine, PKC  $\beta$ 2 bzw. simultan PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\gamma$  (bei Verwendung des „Pan PKC“-Antikörpers), aus den Zytosol- und Membranfraktionen (2.2.4.2) spezifisch gefällt und angereichert. Es wurden 400-500  $\mu$ g Protein in 400-500  $\mu$ l Homogenisierungspuffer (20 mM Tris HCl pH 7,5; 250 mM Sucrose; 2 mM EDTA; 5 mM EGTA; 2 mM PMSF; 50 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) mit 0,25% Nonidet P40 eingesetzt. Zu den Proben wurde 1  $\mu$ g Primärantikörper gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 20  $\mu$ l Protein G-Sepharose ( $\gamma$ -bind Sepharose, Amersham Biosciences) für 2 h bei 4°C unter Rollern inkubiert, um den Primärantikörper zu binden. Der Komplex aus gesuchtem Protein, Primärantikörper und  $\gamma$ -bind Sepharose wurde 3 x mit 500  $\mu$ l Homogenisierungspuffer + 0,5% Nonidet P40 gewaschen (1100 x g, 3 min). Das Präzipitat wurde in 25  $\mu$ l Homogenisierungspuffer aufgenommen und für weitere Verwendung im PKC-Assay (2.2.4.6) bei 4°C gelagert.

#### 2.2.4.5. Proteinbestimmung (Coomassie)

Die gewonnenen Proteinextrakte wurden 1:1000 in Coomassie Protein-Assay Reagens Lösung (Pierce) verdünnt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch photometrische Messung bei 595nm in einem Photometer (Smart Spec 3000).

#### 2.2.4.6 Proteinkinase C-Assay (PKC-Assay)

Mit dieser Methode wurde die enzymatische Aktivität der PKC radioaktiv gemessen. Es wurde ein kommerzieller Kit der Firma Amersham Biosciences (Protein Kinase C Enzyme Biotrack™ Assay System) verwendet. Das Probenvolumen betrug 25 µl, wobei sowohl die IP-Lysate (2.2.4.4) als auch 1,5 µg der IEC-Eluate (2.2.4.3) mit 25 µl Reaktionsgemisch versetzt wurden. Diesem Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 50 µl wurden 5 µl ATP-Puffer, der 40 µCi <sup>32</sup>P-ATP enthielt, zugegeben, sanft geschüttelt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 10 µl Stop-Lösung beendet und 35 µl auf einem Nitrocellulose Filter pipettiert. Unspezifisch gebundenes <sup>32</sup>P-ATP wurde durch Waschen (2 x 10 min) der Filter in 75 mM ortho-Phosphorsäure entfernt. Die Membranen wurden mit 4 ml Szintillations-Flüssigkeit (Zinsser Analytic) versetzt und in einem Szintillationszähler (Beckman Coulter) gemessen. Der Phosphat-Transfer (P) [pmol/min] wurde mit der von Amersham Biosciences angegebenen Formel wie folgt berechnet:

$$P \text{ [pmol/min]} = \frac{T \times 1000}{I \times R}$$

P = Phosphat-Transfer [pmol/min]

I = Inkubationszeit [min]

R = spezifische Aktivität von 1,2 mM <sup>32</sup>P-ATP

T = Transfer von Total-Phosphat

$$R = \frac{\text{cpm pro } 5 \mu\text{l } ^{32}\text{P-ATP}}{6}$$

$$T = \text{cpm (Probe)} \times \frac{65 \mu\text{l}}{35 \mu\text{l}} - \text{cpm (Blindwert)}$$

#### 2.2.4.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden mittels einer SDS-PAGE entsprechend ihres Molekulargewichts in einer Gelmatrix in Anlehnung an Laemmli (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Das negativ geladene Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an hydrophobe Regionen der Proteine und verursacht deren Entfaltung.

Proben mit einer Proteinkonzentration von 2-20 µg wurden mit SDS-Probenpuffer (125 mM Tris pH 6,8; 20% v/v Glycerin; 4% w/v SDS, 10% v/v β-Mercaptoethanol; 0,2% w/v Bromphenolblau) in einem maximalen Endvolumen von 40 µl eingesetzt. Zur Denaturierung wurden die Proben für 5 min bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel.

#### 2.2.4.8. Western Blot-Analyse

Die separierten Proteine wurden aus den Gelen in einem Nassblotverfahren bei einer konstanten Spannung von 100 V für 1 h unter Kühlung auf Nitrozellulosemembranen transferiert (Transferpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% v/v Methanol). Durch reversible Färbung der Membran mit Ponceau-S-Lösung (0,5% w/v in 1% v/v Essigsäure) wurde die Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung und des Transfers kontrolliert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in Blockierungspuffer (5% w/v Magermilchpulver in PBS/0,1% v/v Tween 20; PBST) auf einem Schwenktisch inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST (je 5 min) wurden die Membranen über Nacht bei 4°C oder bei RT für 1 h mit dem Primärantikörper in PBST inkubiert. Ungebundener Primärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBST für 15 min entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper für 60 min in PBST. Nach wiederholtem Waschen der Membranen (3 x 15 min) erfolgte die Detektion der Immunoreaktivität mittels ECL Reagens und anschließende Autoradiographie (Amersham Applied Sciences). Die verwendeten Antikörper und ihre Konzentrationen sind in der Tabelle 2.1 dargestellt.

**Tabelle 2.1: Zusammenstellung der für die Western Blot-Analyse verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.**

Primärantikörper			Sekundärantikörper	
Name	Wirt	Konzentration	Herkunft	Konzentration
Pan PKC	Maus	1:1000	Ziege gegen Maus	1:10000
PKC β1	Kaninchen	1:500	Ziege gegen Kaninchen	1:50000
PKC β2	Kaninchen	1:500	Ziege gegen Kaninchen	1:50000
RACK1	Maus	1:2000	Ziege gegen Maus	1:10000
β-Aktin	Ziege	1:10000	Maus gegen Ziege	1:10000
LAMP 1	Ratte	1:50	Ziege gegen Ratte	1:10000

#### 2.2.4.9. Subzelluläre Fraktionierung

Um Hinweise auf eine mögliche gestörte Funktion der Lysosomen zu bekommen, wurden diese durch Dichtegradienten-Zentrifugation angereichert und die Proteinzusammensetzung untersucht. Die Auftrennung der zellulären Kompartimente mittels Dichtegradienten-Zentrifugation erfolgte in einem SW 60Ti Rotor. Es wurde ein Stufengradient (1,05 g/ml; 1,14 g/ml) mit Percoll als Medium verwendet.

Die Zellen wurden mit Hungermedium synchronisiert (DMEM mit 0,1% v/v FKS), um zu gewährleisten, dass eine homogene Lysosomen-Population aus Zellen im gleichen physiologischen Zustand isoliert wurde. Während des Zell-Zyklus variieren die Lysosomen in ihrer Größe und in ihren lumenalen und Membran-Bestandteilen (Lem *et al.*, 1999). Adhärente Fibroblasten wurden auf 15 cm Zellkulturschalen in einer Zellzahl von  $5 \times 10^6$  ausgesät. Nach erfolgter Synchronisierung wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 500 µl HB Puffer (340 mM Sucrose; 10 mM HEPES pH 7,3; 0,3 mM EDTA) aufgenommen. Um die Zellmembran aufzubrechen, aber gleichzeitig die Membranen der subzellulären Kompartimente weitgehend intakt zu erhalten, wurden die Proben je zweimal in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut („freeze/thaw cycle“). Zellkerne und Debris wurden mittels Zentrifugation (1000 x g, 10 min, 4°C) entfernt. Der Überstand entsprach dem postnukleären Überstand (PNS). Dieser wurde in einem Endvolumen von 1 ml vorsichtig auf den vorbereiteten Percoll Gradienten (je 1,7 ml) aufgetragen. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 100000 x g für 2,5 h bei 4°C ohne Bremse (XL-80 Ultrazentrifuge, Beckman Coulter). Anschließend wurde der Boden der Zentrifugenröhrchen vorsichtig mit einer 0,9 mm Kanüle perforiert und je 200 µl tropfenweise in vorbereiteten 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt. Die aufgetrennten Fraktionen wurden nach einer Proteinbestimmung (2.2.4.5) auf eine Anreicherung von lysosomalen Bestandteilen hin untersucht. Dazu wurde die Aktivität der sauren Phosphatasen als lumenale Markerenzyme mit Hilfe eines Enzymassays (2.2.4.11) untersucht. Parallel wurde das lysosomale Membranprotein LAMP 1 (lysosome associated membrane glycoprotein 1) mittels Western Blot-Analyse (2.2.4.8) detektiert. Zeigten beide Verfahren eine Anreicherung lysosomaler Komponenten in derselben Fraktion, wurde diese in der Zweidimensionalen Gelelektrophorese (2.2.2.10) eingesetzt.

#### **2.2.4.10. Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D)**

Die 2D Gelelektrophorese repräsentiert die Methode mit dem höchsten Auflösungsvermögen für die Trennung komplexer Proteingemische. Das Prinzip beruht auf der Kombination zweier Trennverfahren für Proteine. In der ersten Dimension wird die unterschiedliche Eigenladung der Proteine genutzt, um sie zu separieren. Die zweite Trenngröße ist das Molekulargewicht der Proteine.

In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), werden die Proteine mittels immobilisierter pH-Gradienten (IPG) nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) getrennt. Proteine haben so lange eine elektrophoretische Mobilität, bis sie zu dem Punkt (pH) gewandert sind, an dem ihre Nettoladung Null beträgt. Der isoelektrische Punkt ist abhängig von der Zahl an basischen und sauren Aminosäuren.

In der zweiten Dimension, einer SDS-PAGE, wird die Eigenschaft des anionischen Detergenz SDS ausgenutzt, die Eigenladung der Proteine effektiv abzuschirmen. Ab einer bestimmten Konzentration von SDS bilden sich Micellen aus, bei denen sich die Proteine im Inneren befinden. Nach außen sind nur die negativen Ladungen der SDS-Moleküle verfügbar, dies verhindert eine Aggregation der Proteine. Die Micellen wandern entsprechend ihres Molekulargewichts im elektrischen Feld.

Die Proben für die 2D Gelelektrophorese wurden aus der subzellulären Fraktionierung gewonnen. Es wurden Fraktionen, die eine Anreicherung lysosomaler Bestandteile zeigten und der jeweilige postnukleäre Überstand (PNS) verwendet. Proteinmengen von 20 bis 30 µg wurden in einem Endvolumen von 185 µl in Rehydrationspuffer (für ein Endvolumen von 2,5 ml: 8 M Harnstoff, 2% w/v NP40, 7 mg DTT, 12,5 µl 100%ige Ampholyt Lösung, pH 3-10) eingesetzt. Dabei wurde ein Verhältnis von 1:1 (Probe:Rehydrationspuffer) eingehalten, um störende Salzkonzentrationen innerhalb des Probenpuffers möglichst gering zu halten. Vor der Fokussierung wurden die Proben für 30 min bei 50°C und 300 upm in einem Thermoschüttler inkubiert.

Für die IEF pH-Gradienten kamen Gelstreifen der Firma Bio Rad (ReadyStrip IPG Strips) im pH-Bereich 4-7 bzw. pH 5-8 mit einer Länge von 11 cm zum Einsatz. Die trockenen IPG Streifen (immobilisierte pH-Gradienten) wurden mit der „in gel reswelling“ Methode rehydriert (Eckerskorn *et al.*, 1997), welche eine Rehydrierung der IEF-Streifen und Probenaufgabe in einem Schritt ermöglicht.

Die IEF erfolgte in einer Fokussierungseinheit von Bio-Rad (PROTEAN® IEF System). Zunächst wurden die Proben in einem Volumen von 185 µl in die Kammer

überführt und anschließend die Gelstreifen vorsichtig eingelegt. Um eine vollständige Sättigung des Streifens mit dem Probenvolumen zu gewährleisten, wurde für 10 min bei RT inkubiert. Ein Auskristallisieren des Harnstoffs wurde verhindert, indem die Zwischenräume mit Mineralöl überschichtet wurden.

Es erfolgte eine aktive Rehydrierung nach folgendem Protokoll: 50 Volt, 16 h bei 20°C, 250 Volt für 15 min, 3 h bei 8000 Volt, 6 h bei 80000 Volt.

Um den Transfer aus dem IPG-Gel in das SDS-Gel zu ermöglichen, wurden die Proben 2 x 20 min bei RT in Äquibrierungslösung (6 M Harnstoff, 50 mM Tris/HCl pH 8,8, 30% v/v Glycerin, 2% SDS) gepuffert. Für die erste Inkubation wurde dem Äquibrierungslösung 1% DTT zugegeben, für die zweite 1% Iodacetamid und eine Spatelspitz Bromphenolblau zur Lauffrontkontrolle.

Die fokussierten Gelstreifen wurden direkt in der zweiten Dimension verwendet oder bei -20°C gelagert.

Das Trennprinzip der zweiten Dimension erfolgte in Polyacrylamidgelen (2.2.4.7). Die Gelstreifen wurden in nicht auspolymerisiertem Sammelgel auf die Gele gelegt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer niedrigen Spannung von 60 Volt über Nacht.

Anschließend wurden die Proteine mittels Silberfärbung nach dem Protokoll von Heukeshoven & Dernick, 1988 detektiert.

- Fixieren: mindestens 1 h (50% Methanol, 12% Essigsäure, 0,5 ml 37% Formaldehyd)
- Waschen: 3 x 20 min in 50% Ethanol
- Imprägnieren: 1 min in Natriumthiosulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , 0,22 g/l)
- Waschen: 3 x 20 s in  $\text{H}_2\text{O}$
- Silbernitrat: 20 min ( $\text{AgNO}_3$ , 2 g/l + 0,75 ml 37% Formaldehyd)
- Waschen: 3 x 20 s in  $\text{H}_2\text{O}$
- Reduzieren: variabel ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 60 g/l + 0,5 ml 37% Formaldehyd +  $\text{Na}_2\text{SO}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , 4 mg/l)
- Waschen: 2 x 2 min in  $\text{H}_2\text{O}$
- Abstoppen: 10 min in 50% Methanol + 12% Essigsäure
- Waschen: 20 min in 50% Methanol
- Konservieren: in 30% Methanol + 3% Glycerin

Konservierte Gele wurden in Zellophan-Folien in einem Geltrockner (Bio-Rad) getrocknet und gelagert.

### 2.2.4.11. Saure Phosphatase-Assay

Nach der Subzellulären Fraktionierung (2.2.4.9) wurden die Fraktionen auf eine Anreicherung von lysosomalen Bestandteilen hin untersucht. Saure Phosphatasen repräsentieren lysosomale Markerenzyme und besitzen ihre maximale enzymatische Aktivität bei einem pH < 6. Saure Phosphatasen spalten pNPP (para-Nitrophenylphosphat) in Phosphat und p-Nitrophenol. Diese Enzymreaktion resultiert in einem gelben Farbumschlag, welcher bei 410 nm photometrisch bestimmt wurde.

1-2 µg Protein in einem Endvolumen von 40 µl wurden mit 200 µl Assay Mix versetzt (gleiches Volumen von 16 mM pNPP + 180 mM Natrium Acetat pH 5) und für 40 min bei 37°C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 600 µl 0,25M NaOH abgestoppt. Nach Zentrifugation (20500 x g, 5 min, RT) wurde die optische Dichte des Überstands (800 µl) bei 410 nm gemessen. Mit Hilfe des Lambert Beerschen Gesetzes wurde die Konzentration des Substrats p-Nitrophenol [µmol] und anschließend die spezifische Aktivität der sauren Phosphatase [U/mg] errechnet.

$$c = \frac{\Delta E}{\epsilon_{\text{mol}} \times d}$$

$\Delta E$  = optische Dichte

$\epsilon_{\text{mol}}$  = molarer Extinktionskoeffizient [l/mol x cm]

$c$  = Konzentration [mol/l]

$d$  = Schichtdicke [cm]

$$U/mg = \frac{\mu\text{mol (Substrat)}}{\text{min} \times \text{mg}}$$

### 2.2.4.12. Immunfluoreszenz

Fibroblasten wurden in einer Zellzahl von  $4 \times 10^4$  auf Poly-L-Lysin (50 µg/ml) beschichtete Glasplättchen (Mikroskopische Deckgläser Ø 18 mm) in einer Zellkulturschale mit 12 Kavitäten ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die adhärennten Zellen wurden mit 100 nM LysoTracker (Lyso Tracker® Red, Invitrogen) für 1 h bei 37°C inkubiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und für 30 min in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Das überschüssige PFA wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Zur Dokumentation der Zellen mit dem Laserscanning-Mikroskop wurden die Deckgläser auf Objektträger in einem Tropfen Glycerolpuffer/2 mM Azid mit Nagellack versiegelt. Zusätzlich wurden Fibroblasten „*in vivo*“ ( $2 \times 10^4$  Zellen pro Kammer) in chamber slides (Nunc) untersucht.

## 2.2.5. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.5.1. RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Gewebe und Zellen erfolgte mit einem kommerziellen Kit (Macherey-Nagel), für Organe wurde der NucleoSpin®RNA L und für Zellen der NucleoSpin®RNA II Kit verwendet. Das Prinzip beruht auf einer modifizierten Variante der „single step“ Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987). Zur Lyse des Gewebes wird das toxische Guanidinisothiocyanat (GTC) verwendet. Das chaotrope Salz GTC denaturiert Proteine und RNAsen. Exemplarisch wird das Protokoll der RNA-Isolierung aus Organen beschrieben. 30 bis 100 mg schockgefrorenes Gewebe wurden in einem sterilen Mörser pulverisiert und in 1,8 ml Puffer RA1 (enthält GTC) + 18 µl β-Mercaptoethanol in einem 15 ml Reaktionsgefäß aufgenommen. Die Suspension wurde mit einer 0,9 mm Kanüle homogenisiert. Um das restliche unlösliche Material zu entfernen, wurde das Lysat auf eine Filtereinheit (NucleoSpin® Filter L) gegeben und 10 Minuten bei 4500 x g zentrifugiert. Der Überstand zeichnete sich durch eine reduzierte Viskosität aus, wurde in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1,8 ml 70% Ethanol in DEPC H<sub>2</sub>O versetzt. Nach kräftigem Mischen wurde der Lysat/Ethanol-Mix auf eine NucleoSpin® RNA L Säule geladen und für 3 Minuten bei 4500 x g zentrifugiert. In diesem Schritt binden die Nukleinsäuren an die Silikatmembran innerhalb der Säule. Anschließend wurde die Membran entsalzt, indem 2,2 ml MDB Puffer auf die Säule pipettiert und bei 4500 x g für 3 Minuten zentrifugiert wurden. Um eine Kontamination mit DNA zu verhindern, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Es wurden 250 µl der DNase I-Reaktions Mischung auf die Membran geladen und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Die DNase wurde mit 2,6 ml Puffer RA2 inaktiviert (3 min, 4500 x g) und anschließend die Membran zweimal mit 2,6 ml Puffer RA3 gewaschen (3 min, 4500 x g). Die aufgereinigte RNA wurde mit 500 µl DEPC H<sub>2</sub>O eluiert (3 min, 4500 x g) und bei -70°C gelagert.

### 2.2.5.2. Reverse Transkription (RT)

Die Reverse Transkription (RT) ermittelt Gene auf mRNA-Ebene qualitativ und quantitativ sensitiver, als z. B. mit einem Northern Blot (Gassen *et al.*, 1994). Die Ermittlung der Expressionsmuster eines Gewebes oder von Zellen ist nur mit der mRNA bzw. der komplementären DNA (cDNA) möglich. Die Umschreibung gelingt durch Reverse Transkriptasen. Standardmäßig werden zwei verschiedene Enzyme verwendet, die avian-myoblastis-virus (AMV)-Reverse Transkriptase und die moloney-murine-leukemia-virus (M-MLV)-Reverse-Transkriptase. In dieser Arbeit wurde die AMV (Roche Applied Science) verwendet. Diese Reverse Transkriptase trägt sowohl Polymerase-Aktivität in 5'→3' Richtung als auch RNaseH-Aktivität, hat ihr Temperaturoptimum bei 42°C und bevorzugt ein leicht basisches Milieu von pH 8,3. Das freie 3'-OH-Ende der einzelsträngigen RNA hybridisiert mit einem komplementären kurzen Nukleinsäure-Fragment (Primer). Dieser doppelsträngige Nukleinsäure Bereich dient als Startpunkt für die Reverse Transkription. Als Primer für die RT wurden oligo-dT-Primer (Roche Applied Science) benutzt. Diese binden am polyA-Ende der mRNA und erlauben somit eine komplette Umschreibung vom 3'-Ende aus ohne dabei rRNA oder tRNA zu transkribieren. Ein entscheidender Nachteil dieser Primer ist, dass die mRNAs oft eine beachtliche Länge aufweisen und die gesuchten codierenden Bereiche möglicherweise weit entfernt vom 3' Ende liegen, so dass die Reaktion vor dem 5'-Ende abbricht (Lewin, 1998).

Als Ausgangsmaterial (Template) wurde 1 µg Gesamt-RNA verwendet. Die Komponenten der Reversen Transkription sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Um die Sekundärstruktur der RNA aufzubrechen wurde RNA mit der entsprechenden DEPC H<sub>2</sub>O Menge für 15 min bei 65°C inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Mastermix dazugegeben und die Reverse Transkription unter folgenden Bedingungen gestartet:

- 10 min, 25°C, in diesem Schritt lagern sich die Primer an
- 60 min, 42°C, dieser Schritt entspricht der optimalen Arbeitstemperatur der Reversen Transkriptase (AMV)
- 5 min, 99°C, in diesem Schritt wird die AMV denaturiert
- 10 min, 4°C

Die einzelsträngige cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.2: Ansatz für die RT-PCR.

	Volumina	Endkonzentration im 20µl Ansatz
<b>10x Reaktions-Puffer</b>	2 µl	1x
<b>MgCl<sub>2</sub> (25 mM)</b>	4 µl	5 mM
<b>dNTP</b>	2 µl	1 mM
<b>Oligo-p(dT)<sub>15</sub> Primer</b>	2 µl	1,6 µg
<b>RNAse-Inhibitor</b>	1 µl	50 Einheiten
<b>AMV</b>	0,8 µl	≥20 Einheiten
<b>DEPC H<sub>2</sub>O</b>	variabel	----
<b>RNA</b>	variabel	1 µg
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	

### 2.2.5.3. Primer

Primer lagern sich an der komplementären Zielsequenz des Templates an und bieten damit der Taq-Polymerase ein 3'-OH-Ende als Startpunkt. Mit spezifischen Primern kann jedes gewünschte DNA-Fragment, welches von den Oligonukleotiden eingeschlossen wird, amplifiziert werden. In der Primer-Konstruktion wurden folgende Parameter beachtet, um eine erfolgreiche PCR zu gewährleisten:

- Der GC-Gehalt betrug sofern möglich 40-60%.
- Beide Primer besaßen möglichst ähnliche Schmelztemperaturen ( $T_m$ ).
- Primersequenzen bildeten möglichst keine Dimere oder Hairpins.
- Primer lagen Intron überspannend, um eine Kontamination mit DNA auszuschließen.
- Die Spezifität der Primer wurde durch Sequenzvergleich mit öffentlichen Datenbanken per BLAST-Analyse sicher gestellt.

Die Schmelztemperatur wurde folgendermaßen berechnet:

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = [(\text{Anzahl von A} + \text{T}) \times 2^{\circ}\text{C}] + [(\text{Anzahl von G} + \text{C}) \times 4^{\circ}\text{C}]$$

Die korrekte Annealing-Temperatur muss in der Praxis empirisch optimiert werden, um ein spezifisches PCR-Produkt zu erhalten. Die hier eingesetzten Primer sind in der Tabelle 2.3 aufgezeigt.

**Tabelle 2.3: Sequenzen der verwendeten Primer.**

In dieser Tabelle sind die Sequenzen, die Schmelz- und Annealing-Temperaturen der verwendeten Primer aufgeführt. G3PDH: Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase, lyst: lysosomale trafficking regulator, fan: factor associated with nSMase, rack 1: receptor for activated C-kinase

Primer-Bezeichnung	Primersequenz [5'→3']	T <sub>m</sub> [°C]	Optimale Annealing-Temperatur [°C]
<b>Kontrollgen-Primer</b>			
G3PDH 5'	ACCACAGTCCATGCCATCAC	58	61
G3PDH 3'	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	62	61
lyst 5'	ACAATGCCTCTGACGCAGTTG	64	61
lyst 3'	CAGGTTTGTGTCAGAGCGGTGAT	64	61
fan 5'	GTGACACCTCTAGTGACGAAC	64	61
fan 3'	CAGCAGGTACTGGTAGTTGGA	64	61
rack1 5'	TGTGGAAGCTGACCAGAGATG	64	61
rack1 3'	AATGACTCTCATCCTGGACCG	64	61

#### 2.2.5.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR basiert auf einer exponentiellen Amplifikation doppelsträngiger DNA zwischen einem spezifischen Strangprimer und einem ebenfalls sequenzspezifischen Gegenstrangprimer. In einem dreiphasigen Zyklus, der aus Denaturierung des Doppelstrangs, Primeranlagerung (Annealing) und Strangverlängerung (Elongation) besteht, wird durch eine DNA-Polymerase ausgehend vom 3'-Ende des jeweiligen Primers der komplementäre Strang zur Matrizen-DNA gebildet. In dieser Arbeit wurde die Taq-Polymerase von Invitrogen verwendet. Diverse Temperaturprofile wurden mit den oben beschriebenen Primern (Tabelle 2.3) verwendet, um möglichst distinkte Sequenzen aus unterschiedlichen Organen der Maus und aus Fibroblasten zu amplifizieren. In Tabelle 2.4 wurde exemplarisch ein Reaktionsansatz für die PCR zusammengestellt. Die Temperaturprofile sind in der Tabelle 2.5 aufgeführt.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung eines Reaktionsgemisch für eine Polymerase-Kettenreaktion.

	Endkonzentration	PCR-Ansatz	Negativ-Kontrolle
<b>10xPCR-Puffer</b>	1 x	2,5 µl	2,5 µl
<b>MgCl<sub>2</sub> (25 mM)</b>	1,25 mM	1,5 µl	1,5 µl
<b>dNTP (2 mM)</b>	0,2 mM	0,5 µl	0,5 µl
<b>sense Primer</b>	1,2 pmol	1 µl	1 µl
<b>antisense Primer</b>	1,2 pmol	1 µl	1 µl
<b>Template</b>	---	1 µl	---
<b>steriles H<sub>2</sub>O</b>	---	17 µl	17 µl
<b>Taq-Polymerase</b>	1 U/µl	0,5 µl	0,5 µl
<b>Gesamtvolumen</b>		<b>25 µl</b>	<b>25 µl</b>

Tabelle 2.5 : PCR-Profil, Überblick über die eingesetzten PCR-Bedingungen zur Amplifikation von G3PDH, rack1, fan und lyst.

	PCR-Profil A (G3PDH)			PCR-Profil B (rack1)			PCR-Profil C (fan)		
	T[°C]	T[min]	Zyklen	T[°C]	T[min]	Zyklen	T[°C]	T[min]	Zyklen
	95	3	1	95	3	1	95	3	1
<b>Denaturierung</b>	95	0,3	25	95	0,45	30	95	1	30
<b>Annealing</b>	61	0,45		61	0,45		61	1	
<b>Elongation</b>	72	0,45		72	0,45		72	1	
<b>Endsynthese</b>	72	10	1	72	10	1	72	10	1
	PCR-Profil D (lyst)								
	T[°C]	T[min]	Zyklen						
	95	3	1						
<b>Denaturierung</b>	95	1	30						
<b>Annealing</b>	61	1							
<b>Elongation</b>	72	1							
<b>Endsynthese</b>	72	10	1						

### 2.2.5.5. Agarose Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden in einem Standard-Agarosegel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde bei 100 bis 110 Volt in 2%igen bzw. 1,5%igen Gelen durchgeführt, die in 1 x TAE Puffer (50 x TAE-Puffer: 2 M Tris, 50 mM EDTA pH 8, 6% v/v Eisessig) lagen. Nach Trennung der PCR-Produkte wurden die Gele mit Ethidiumbromid (0,5 µg Ethidiumbromid je 1 ml 1 x TAE Puffer) gefärbt und unter UV-Licht bei 312 nm mit einer Kamera mit angeschlossenem PC ausgewertet. Die isolierte Gesamt-RNA wurde mit einem Standard-Agarosegel unter den oben beschriebenen Bedingungen auf ihre Qualität geprüft.

### 2.2.5.6. Quantitative Echtzeit-PCR (Real-time quantitative PCR, RTq PCR)

In dieser Arbeit wurde das LightCycler System von Roche Applied Sciences verwendet. Dieses Verfahren erlaubt es, eine PCR-Reaktion in kurzer Zeit durchzuführen (45 Zyklen in ca. 30 Minuten) und dabei die Amplifikation auf einem angeschlossenen PC in „real-time“ zu verfolgen. Zur sequenzunabhängigen Detektion wurde Sybr®Green I verwendet. Dieser Farbstoff interkaliert spezifisch in doppelsträngige DNA. Somit werden nicht nur Amplifikationsprodukte, sondern auch Primer-Dimere markiert. Der Hintergrund der Primer-Dimere zeichnet sich allerdings durch einen niedrigeren Schmelzpunkt aus und ermöglicht daher in der Auswertung eine klare Trennung vom korrekten Amplifikationsprodukt. Die fluorimetrische Messung erfolgt einmal pro Zyklus am Ende der Elongationsphase.

Erreicht die PCR die logarithmische Phase, hebt sich die gemessene Fluoreszenzintensität zum ersten Mal von der Hintergrundstrahlung ab. Dieser Punkt wird als „crossing point“ (cp) bezeichnet. Die relative Quantifizierung erfolgt durch Bildung des Quotienten  $cp(\text{Probe})/cp(\text{Standard})$ .

Als interner Standard zur Normierung von Unterschieden in der Menge der eingesetzten DNA wurde G3PDH (Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase) verwendet. Dieses Gen repräsentiert ein so genanntes Housekeeping-Gen, welches konstitutiv in allen Zellen und Geweben exprimiert wird.

Es wurden die Expressionsmuster von *fan*, *lyst* und *rack1* innerhalb unterschiedlicher Zelltypen und Geweben aus Mäusen verschiedenen Alters quantifiziert. Als Versuchstiere fungierten Wildtypmäuse (C57BL/6), FAN-defiziente und Beige-defiziente Mäuse (C57BL/6-*lyst*<sup>bg-J/+</sup>) unterschiedlicher Altersstufen (3 bzw. 4 Monate

und 9 Monate). Es wurden Herz, Lunge, Niere, Leber und Milz entnommen (2.2.2), in Flüssigstickstoff schockgefroren, mRNA isoliert (2.2.5.1) und 1 µg mRNA in cDNA umgeschrieben (2.2.5.2). Zusätzlich wurden Fibroblasten nach Stimulation (0, 3 h, 24 h) mit PMA [0,1 µM] und hTNF [100 ng/ml] auf die differentielle Expression von fan, lyst und rack1 hin untersucht.

In Tabelle 2.6 ist die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes nach der Vorschrift des Kits Light Cycler Fast Start DNA Marker<sup>PLUS</sup> SYBR Green (Roche Applied Science) gezeigt. Das PCR-Profil ist in Tabelle 2.7 dargestellt.

**Tabelle 2.6: Zusammensetzung eines Reaktionsansatz für die LightCycler PCR.**

Der Master Mix beinhaltet Reaktionspuffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP Mix, SYBR Green I, FastStart Taq Polymerase

Komponenten	PCR-Ansatz	Negativ Kontrolle
Steriles H <sub>2</sub> O	5 µl	6 µl
Primer 5' [5 pmol]	1 µl	1 µl
Primer 3' [5 pmol]	1 µl	1 µl
Master Mix	2 µl	2 µl
cDNA	1 µl	---

**Tabelle 2.7: Protokoll der LightCycler PCR.**

		T[°C]	T[min]
<b>Präinkubation</b>		95	10
<b>Amplifikation</b>	<b>Denaturierung</b>	95	0,15
	<b>Annealing</b>	64	0,3
	<b>Extension</b>	72	0,3
<b>Schmelzkurve</b>	<b>Denaturierung</b>	95	0
	<b>Annealing</b>	65	0,2
	<b>Schmelzen</b>	95 [0,1°C/s]	0
<b>Kühlen</b>		40	0,5

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Bedeutung der PKC-Isotypen im lysosomalen Vesikeltransport

Biochemische Studien des Chediak-Higashi Syndroms (CHS) zeigten, dass die Aktivität der Proteinkinase C (PKC), insbesondere der PKC  $\beta_2$ , gestört ist (Ito *et al.*, 1988, Ito *et al.*, 1989, Sato *et al.*, 1990, Tanabe *et al.*, 2001). Mit Hilfe von Stütz- bzw. Ankerproteinen, z. B. RACKs werden die cPKCs aus dem Zytoplasma an die Membran rekrutiert und stabilisiert. Sie liegen Membran-assoziiert im aktiven Zustand vor und phosphorylieren spezifisch Serin/Threonin Reste von Zielmolekülen, die in unterschiedlichen Signalwegen involviert sein können. Beim CHS wurde eine durch PMA-induzierte schwache Membranrekrutierung beobachtet und die PKC-Aktivität nahm bereits nach zwei Minuten PMA-Stimulation dramatisch ab. Zusätzlich war die Basalaktivität der PKC in CHS/Beige/Lyst-defizienten Zellen geringer als in den Wildtypzellen (Ito *et al.*, 1988, Ito *et al.*, 1989, Sato *et al.*, 1990, Tanabe *et al.*, 2001). Diese Arbeitsgruppe postuliert, dass PKC an der Bildung von Riesenlysosomen, dem zellulären Phänotyp des CHS, beteiligt ist.

Zur Klärung der Frage, ob – analog zur oben für Lyst-defiziente Zellen beschriebenen Situation – eine Defizienz für FAN ebenfalls eine Störung der PKC-Aktivierung verursacht und Einfluss auf die Lysosomengröße hat, wurden zum einem FAN-defiziente (FAN ko; Kreder, 1998) und zum anderen als Positiv-Kontrolle Beige/CHS/Lyst-defiziente (MCHSF2; Perou & Kaplan, 1993) murine Fibroblasten mit ihren dazugehörigen Wildtyp-Zelllinien („wt“ und C57-F2) verwendet. C57-F2- und wt-Fibroblasten wurden beide aus Wildtypmäusen generiert, allerdings wurden diese Zelllinien in unterschiedlichen Labors hergestellt. Daher wurden sie in dieser Arbeit als separate Positivkontrollen für FAN-defiziente (wt) und Lyst-defiziente (C57-F2) Zellen verwendet.

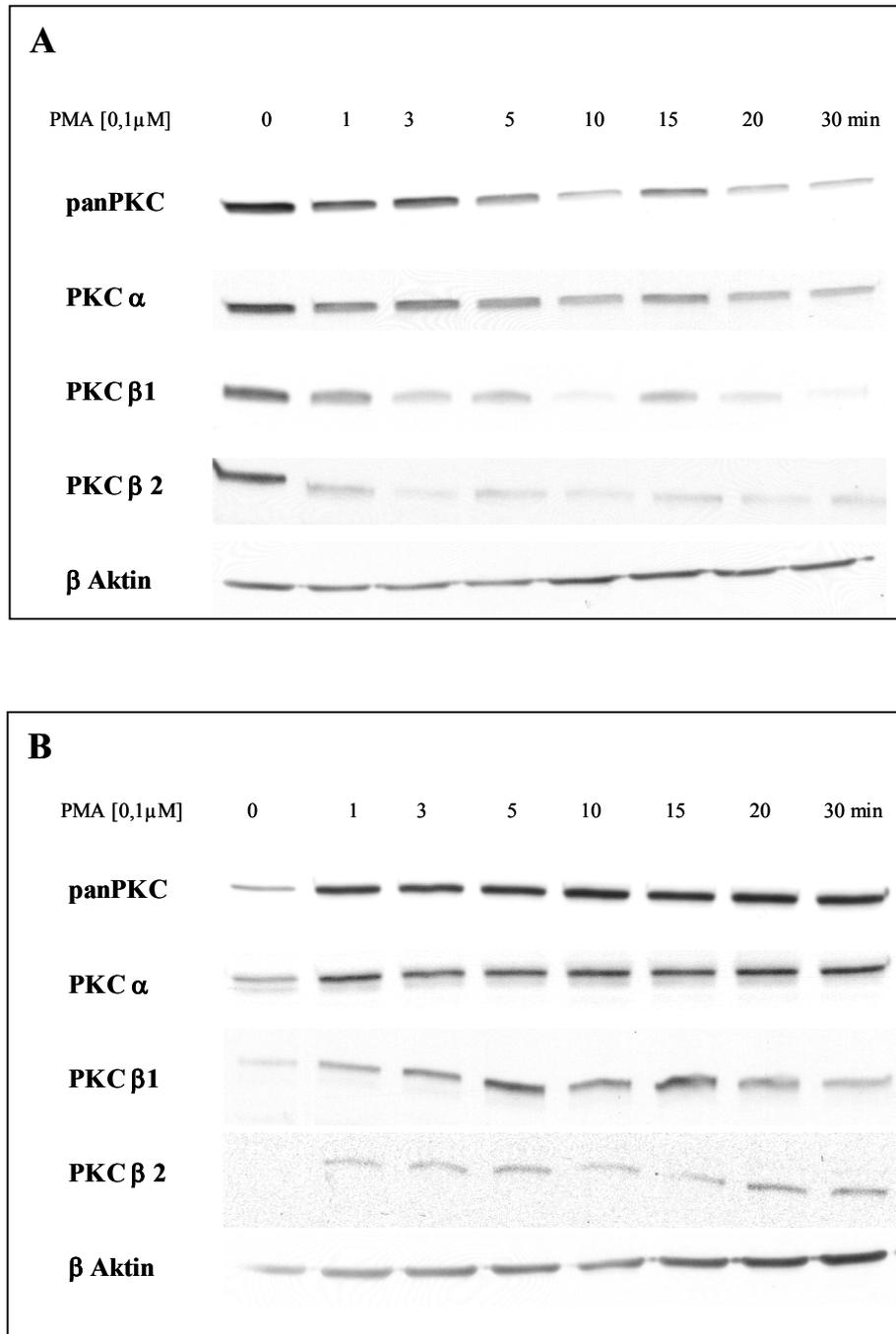
### 3.1.1 Untersuchungen zur Membrantranslokation von konventionellen PKCs

Die Expression der cPKCs und ihre intrazelluläre Verteilung wurde nach Stimulation mit PMA mittels Western Blot-Analyse untersucht.

Die Zelllinien (FAN ko, wt, MCHSF2 und C57-F2) wurden mit dem Phorbolester PMA [0,1  $\mu$ M] stimuliert (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 min). Dieser imitiert *in vitro* die Funktion von DAG und bindet an die regulatorische C1 Domäne (1.5). Nach Stimulation wurden Zytosol- und Membranfraktionen hergestellt (2.2.4.2). Die Fraktionen wurden in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.2.4.7) aufgetrennt und anschließend die Expression der PKC mittels Western Blot-Analyse (2.2.4.8) detektiert.

Antikörper gegen alle Mitglieder der konventionellen PKCs,  $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\gamma$  (2.1.5), wurden einzeln verwendet. Zusätzlich wurde ein „Breitband“-Antikörper, Pan PKC (2.1.5), eingesetzt. Pan PKC erkennt die Gesamtheit der cPKCs. Als Ladungskontrolle fungierte  $\beta$  Aktin (2.1.5). Die Blots mit dem polyklonalen PKC  $\gamma$ -Antikörper konnten aufgrund schlechter Qualität des Antikörpers nicht ausgewertet werden. Der polyklonale PKC  $\beta$ 2-Antikörper ergab nur im ersten verwendeten Lot ein klares Bandenmuster. Alle nachfolgend erworbenen Lots dieses Antikörpers detektierten nur unspezifische Banden. Daher werden in dieser Arbeit nur die mit dem ersten Lot des PKC  $\beta$ 2-Antikörpers gewonnenen Ergebnisse gezeigt.

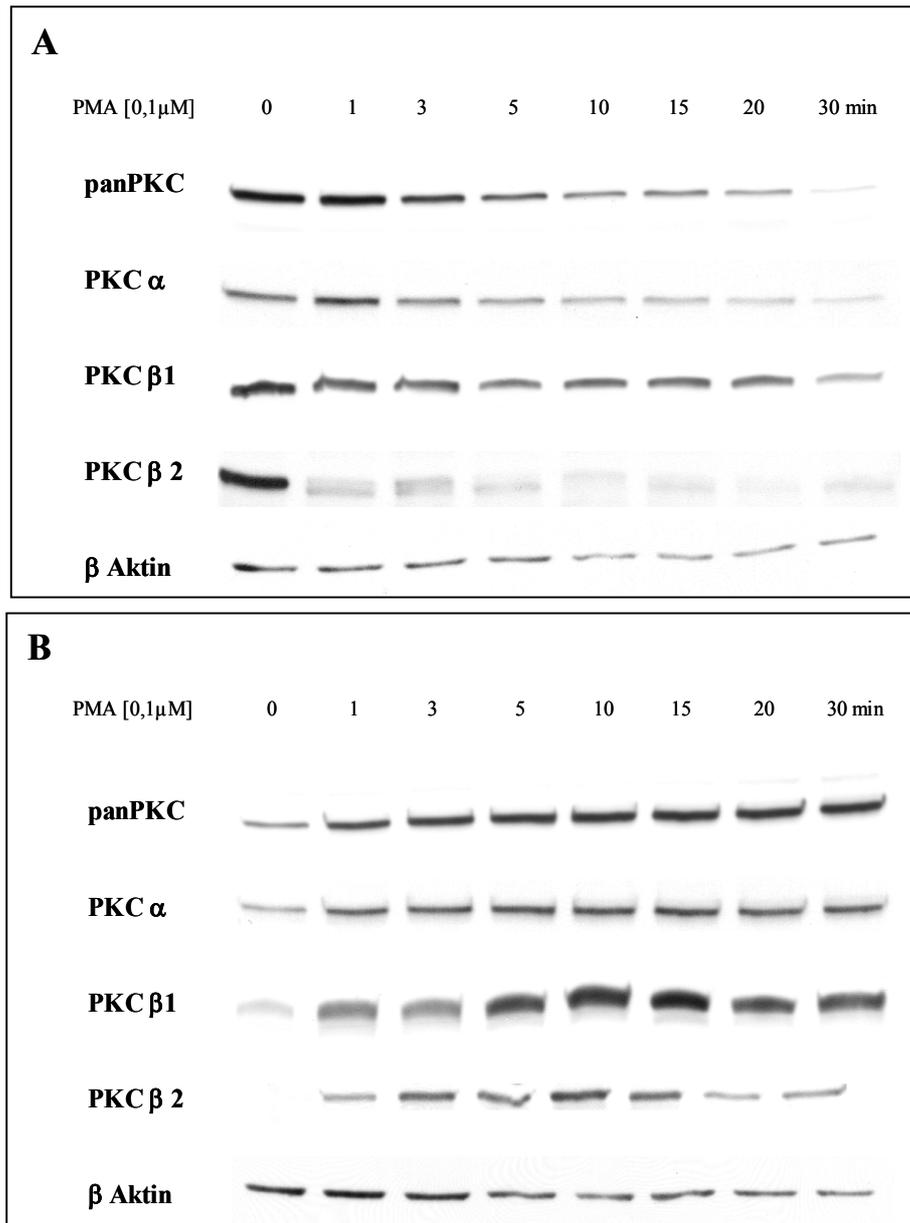
Abbildung 3.1 A zeigt Zytosolfraktionen aus wt-Zellen. Deutlich ist eine Abnahme der Expression von Pan PKC, PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 zu erkennen. Die beiden PKC  $\beta$ -Isoformen zeigen schon nach wenigen Minuten eine dramatische zytosolische Abnahme. Die Membranfraktionen der wt-Zellen sind in Abbildung 3.1 B dargestellt. Bereits nach einer Minute PMA-Stimulation erfolgte eine verstärkte Translokation der PKC an die Membran. Somit konnte in den wt-Fibroblasten die charakteristische PMA-induzierte Membranrekrutierung der PKC nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.1: Membrantranslokation von PKC-Isotypen in wt-Fibroblasten nach Stimulation mit PMA [0,1  $\mu$ M].** Western Blot der cPKC-Isoformen von Zytosol- und Membranfraktionen. Zellen wurden mit PMA [0,1  $\mu$ M] stimuliert (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 min). **A:** Zytosolfraktionen wurden mit folgenden Antikörpern analysiert: panPKC, PKC  $\alpha$ , PKC  $\beta$ 1 und PKC  $\beta$ 2.  $\beta$  Aktin diente als Ladungskontrolle. **B:** Parallele Untersuchung der entsprechenden Membranfraktionen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

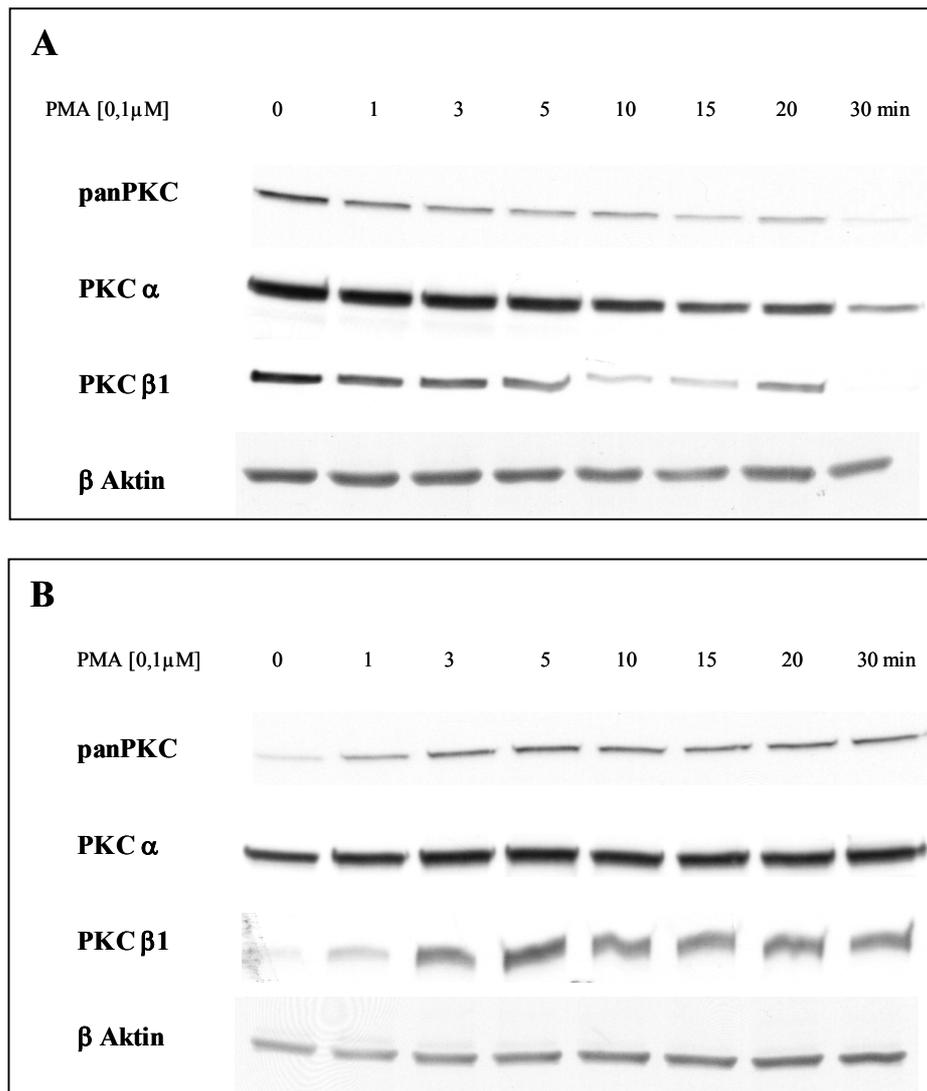
Die PKC-Expressionsmuster der FAN-defizienten Fibroblasten sind in Abbildung 3.2 dokumentiert. In den Zytosolfractionen (Abb. 3.2 A) ist eine Abnahme der PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und von Pan PKC zu erkennen. An der Membran (Abb. 3.2 B) ist ebenfalls bereits nach einer Minute eine Zunahme der PKC-Isotypen zu sehen.

Auch in FAN-defizienten Zellen wurde eine normale Translokation der PKC aus dem Zytosol an die Membran beobachtet.



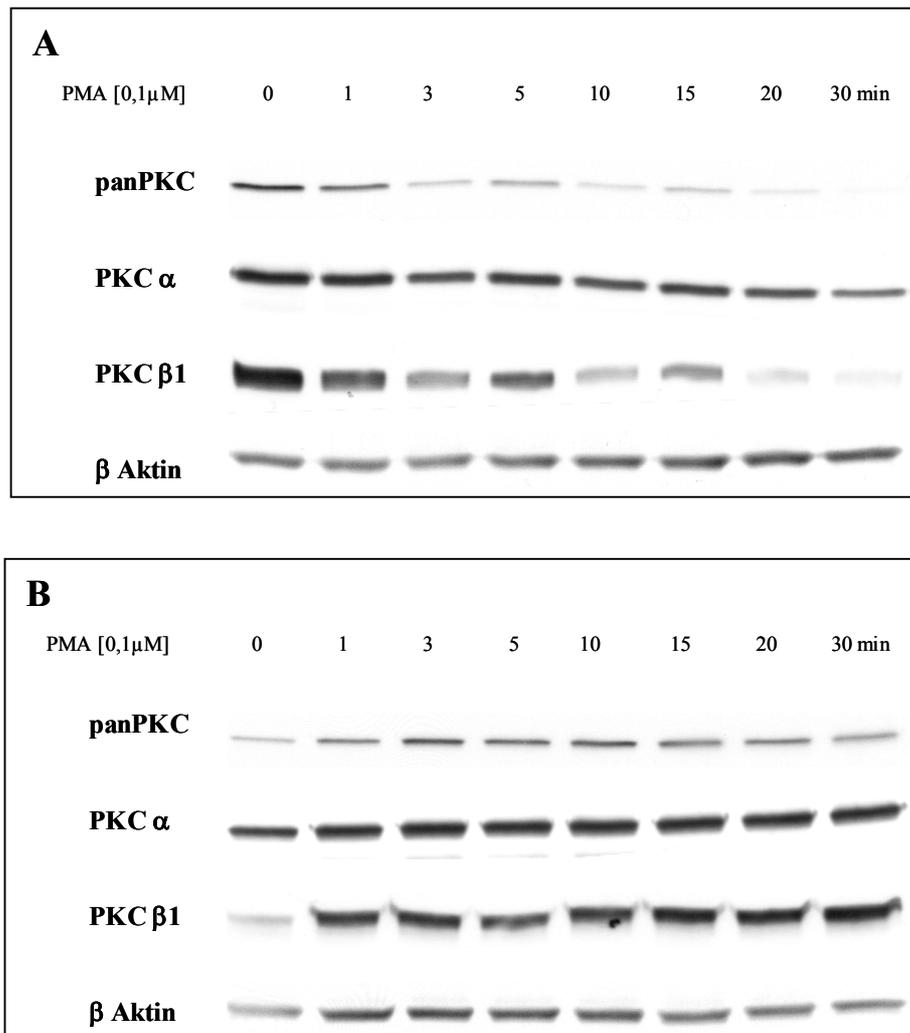
**Abbildung 3.2: Membrantranslokation von PKC-Isotypen in FAN-defizienten Zellen nach Stimulation mit PMA [0,1  $\mu$ M].** Western Blot der cPKC-Isoformen von Zytosol- und Membranfraktionen. Zellen wurden mit PMA [0,1  $\mu$ M] stimuliert (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 min). **A:** Zytosolfractionen wurden mit folgenden Antikörpern analysiert: panPKC, PKC  $\alpha$ , PKC  $\beta$ 1 und PKC  $\beta$ 2.  $\beta$  Aktin diente als Ladungskontrolle. **B:** Die entsprechenden Membranfraktionen wurden analog zu A untersucht. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Zusätzlich wurden Lyst-defiziente Fibroblasten (MCHSF2, Abb. 3.4) und die dazugehörigen Wildtypfibroblasten (C57-F2, Abb. 3.3) auf Translokation der PKC untersucht. In Abbildung 3.3 zeigen die C57-F2-Zellen ein Bandenmuster, welches denen der FAN-wt Zellen entspricht (Abb. 3.1). Die PKC-Isotypen werden wie erwartet PMA-induziert vom Zytosol an die Membran rekrutiert. Daten für die PKC  $\beta$ 2 konnten aufgrund der schlechten Qualität eines neuen Lots des PKC  $\beta$ 2-Antikörpers für C57-F2- und MCHSF2-Zellen nicht mehr erhoben werden.



**Abbildung 3.3: Membrantranslokation von PKC-Isotypen in C57-F2-Fibroblasten nach Stimulation mit PMA [0,1  $\mu$ M].** Western Blot der cPKC-Isoformen von Zytosol- und Membranfraktionen. Zellen wurden mit PMA [0,1  $\mu$ M] stimuliert (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 min). **A:** Zytosolfractionen wurden mit folgenden Antikörpern analysiert: panPKC, PKC  $\alpha$  und PKC  $\beta$ 1.  $\beta$  Aktin diente als Ladungskontrolle. **B:** Parallele Untersuchungen der entsprechenden Membranfraktionen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Experimenten.

Die Analyse der MCHSF2-Fibroblasten ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass die PKC-Expression im Zytosol abnimmt und an der Membran zunimmt. Somit zeigt die PKC in den Lyst-defizienten Fibroblasten in Abhängigkeit der subzellulären Verteilung eine vergleichbare Kinetik wie die C57-F2-Fibroblasten (Abb. 3.3) und auch die FAN-defizienten Zellen (Abb. 3.2).



**Abbildung 3.4: Membrantranslokation von PKC-Isotypen in MCHSF2-Fibroblasten nach Stimulation mit PMA [0,1 μM].** Western Blot der cPKC-Isoformen von Zytosol- und Membranfraktionen. Zellen wurden mit PMA [0,1 μM] stimuliert (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 min). **A:** Zytosolfraktionen wurden mit folgenden Antikörpern analysiert: panPKC, PKC α und PKC β1. β Aktin dient als Ladungskontrolle. **B:** Entsprechende Membranfraktionen wurden analog zu A untersucht. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Experimenten.

Diese Befunde stimmen nicht mit den Studien von Ito *et al.* und Sato *et al.* überein. Diese Arbeitsgruppe zeigte in Lyst-defizienten Fibroblasten eine gestörte Membranrekrutierung der PKC nach Stimulation mit PMA [0,1µM]. Zusätzlich stellten sie nach 2 minütiger Stimulation mit PMA [0,1µM] eine Herunterregulation der Membran-assoziierten PKC Aktivität fest (Ito *et al.*, 1989, Sato *et al.*, 1990).

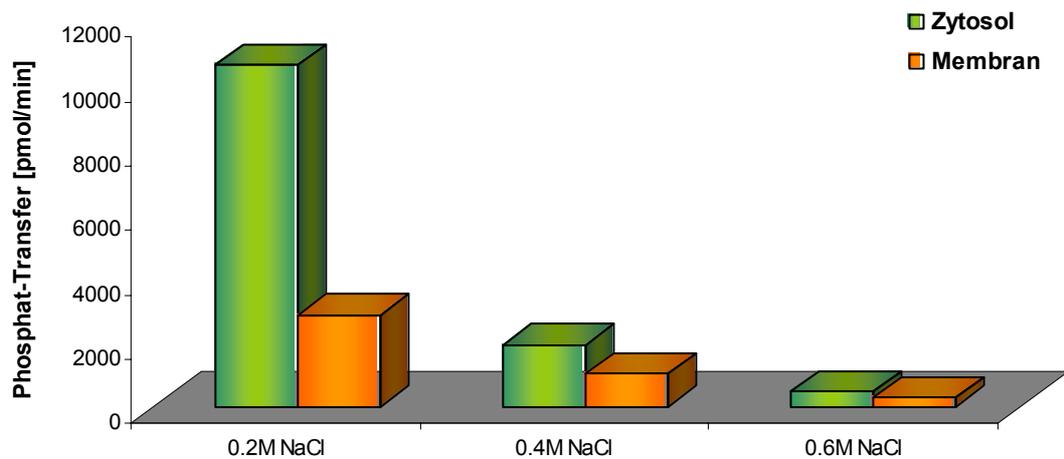
Die durchgeführten Western Blot-Analysen quantifizieren lediglich die Verteilung der untersuchten Proteine und lassen keine Aussage über Enzym-Aktivitäten zu. Um eine mögliche Aktivitätsstörung der PKC nach PMA-Stimulation in den oben gezeigten Zelllinien zu untersuchen, wurde daher die PKC-Aktivität in einem Enzym-Assay bestimmt.

### **3.1.2 Untersuchungen zur Enzymaktivität von konventionellen PKCs**

Die Enzymaktivität der konventionellen PKCs wurde in Zytosol- und Membranfraktionen (2.2.4.2) mittels eines radioaktiven Assays (2.2.4.6) bestimmt. Der verwendete PKC-Assay ist nicht spezifisch für einen PKC-Isotyp, sondern erfasst die Enzymaktivitäten der konventionellen PKCs allgemein.

#### **3.1.2.1 Optimierung der Aktivitätsbestimmungen**

Zur Optimierung der Aktivitätsmessung wurden die PKCs der Zytosol- und Membranfraktionen mittels einer Ionenaustausch-Chromatographie (IEC) angereichert. Zunächst wurde die optimale Salzkonzentration für die Anreicherung bestimmt. Es wurden unstimulierte Zytosol- und Membranfraktionen aus wt-Fibroblasten bei konstantem pH und mit drei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (0,2 M, 0,4 M und 0,6 M) chromatographiert und die eluierte Kinase-Aktivität bestimmt. In Abbildung 3.5 ist die PKC-Aktivität unter den verschiedenen Salz-Bedingungen aufgetragen. Bei der Elution der Proben mit 0,2 M NaCl wurde eine fast 6-fache PKC-Aktivität gegenüber 0,4 M NaCl und eine fast 24-fache gegenüber 0,6 M NaCl gemessen. Daher wurde für alle nachfolgenden PKC-Aktivitätsassays eine Ionenaustausch-Chromatographie durchgeführt, bei der die Proben mit 0,2 M NaCl eluiert wurden.



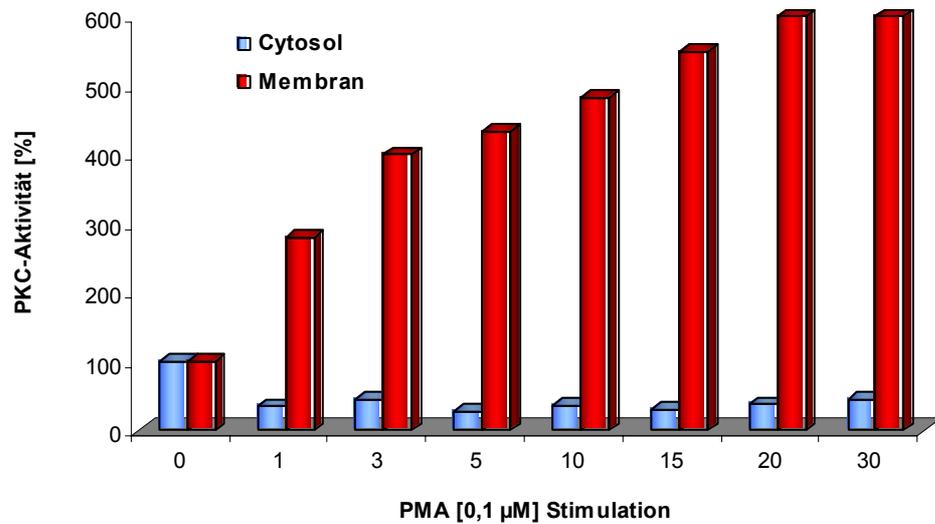
**Abbildung 3.5: PKC-Assay von Zytosol- und Membranfraktionen aus unstimulierten wt-Fibroblasten.** Die Enzymaktivität ist als Phosphat-Transfer angegeben. Vor der Aktivitätsmessung wurde eine Ionenaustausch-Chromatographie bei konstantem pH mit 0,2 M, 0,4 M und 0,6 M Salzkonzentration durchgeführt. Die Berechnung des Phosphat-Transfers ist in 2.2.4.6 angegeben. Es ist ein repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Experimenten dargestellt.

### 3.1.2.2 Analysen der PKC-Aktivität von wt-, FAN-defizienten, C57-F2- und MCHSF2-Fibroblasten

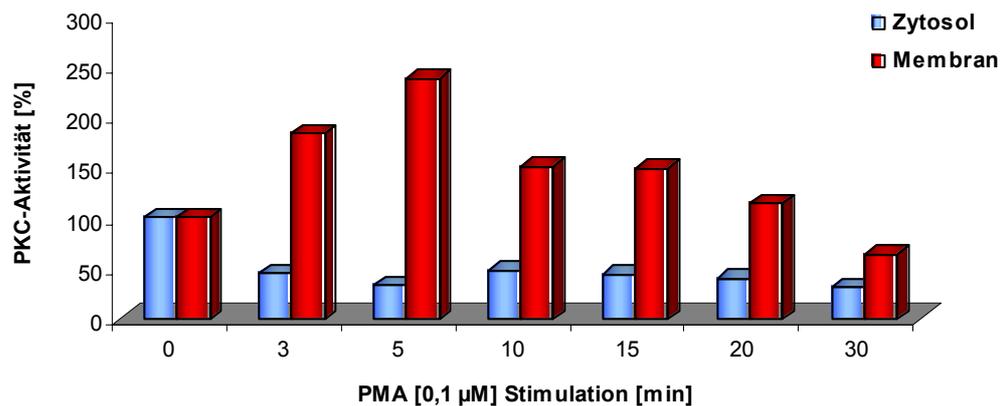
Analog zu den in 3.1.2.1 dargestellten Untersuchungen zur Membrantranslokation der konventionellen PKCs per Western Blot wurden zunächst wt- und FAN-defiziente Fibroblasten mit PMA [0,1  $\mu$ M] stimuliert (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 min). Anschließend wurden Zytosol- und Membranfraktionen hergestellt (2.2.4.2), über Ionenaustausch-Chromatographie (2.2.4.3) gereinigt und die enzymatische Aktivität der gereinigten PKCs gemessen (2.2.4.6). In Abbildung 3.6 sind die Enzymaktivitäten der PKC in den jeweiligen Fraktionen der wt- und FAN-defizienten Fibroblasten dargestellt. Die Membrantranslokation der PKC-Aktivität der wt-Fibroblasten (Abb. 3.6 A) zeigt einen Verlauf, der mit den im Western Blot erhaltenen Daten übereinstimmt (Abb. 3.1). In den Zytosolfractionen hat sich die enzymatische Aktivität bereits nach 1 minütiger Stimulation auf 10% gegenüber dem unstimulierten Zustand verringert. Während der gesamten Stimulationsdauer bleibt die zytosolische PKC-Aktivität stabil zwischen 10 und 20%. An der Membran steigert sich die PKC-Aktivität im Laufe der Stimulationszeit. Nach 20 Minuten ist das Optimum, eine 6-fache Zunahme gegenüber dem unstimulierten Zustand, erreicht.

In FAN-defizienten Fibroblasten (Abb. 3.6 B) verringert sich die zytosolische PKC-Aktivität auf 40-60% im Vergleich zu unstimulierten Fraktionen. Die Rekrutierung der PKC an die Membran hat nach 5 Minuten ihr Maximum erreicht. Zu diesem Zeitpunkt hat das Enzym eine Aktivität von 260%, danach fällt sie bis auf unter 100% nach 30 Minuten ab. Die PMA-induzierte Translokation der PKC an die Membran erfolgt in beiden Zelllinien bereits nach einer Minute Stimulation.

A



B

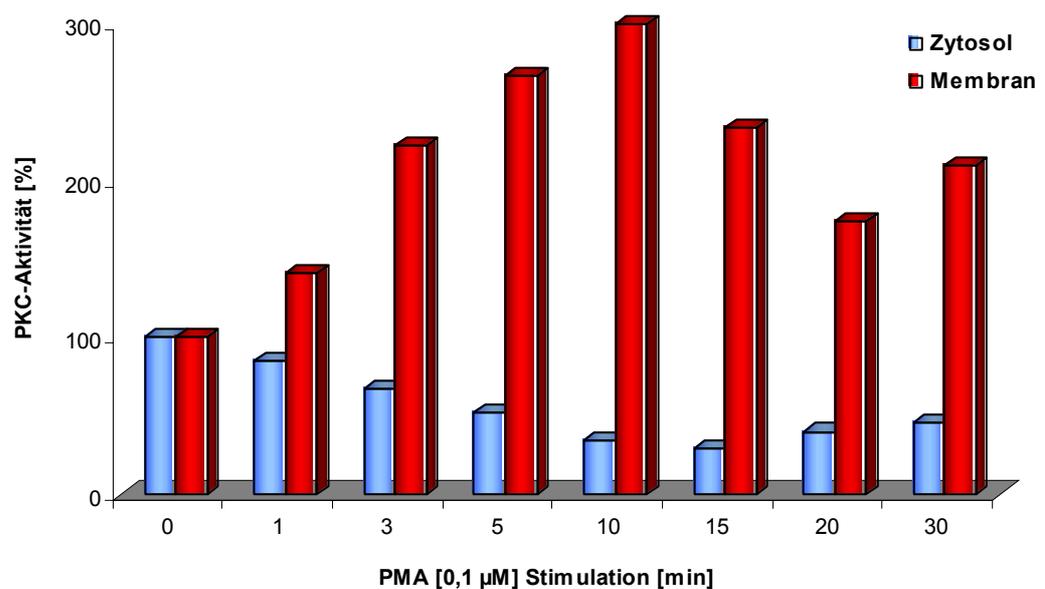


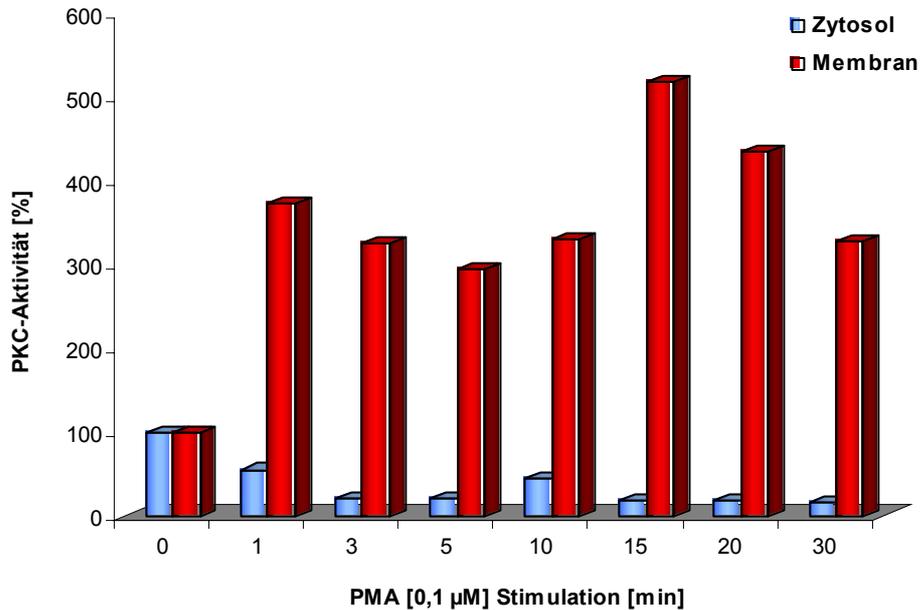
**Abbildung 3.6: PKC-Assay von Zytosol- und Membranfraktionen aus wt- und FAN-defizienten Fibroblasten.** Zellen wurden mit PMA [0,1 µM] stimuliert (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 min). Vor der Aktivitätsmessung wurde eine Ionenaustausch-Chromatographie bei konstantem pH mit einer Salzkonzentration von 0,2 M NaCl durchgeführt. **A:** wt-Fibroblasten, **B:** FAN-defiziente Fibroblasten. Die in % angegebene Enzymaktivität ist relativ zu unstimulierten Zellen angegeben. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

In beiden Zelllinien konnte die Rekrutierung der PKC aus dem Zytosol an die Membran und eine Zunahme der Membran-assoziierten Aktivität durch PMA-Stimulation induziert werden. Unter Einbeziehung der Western Blot-Daten (3.1.1) wurden insgesamt keine wesentlichen Unterschiede in der Translokation der PKC-Isotypen bei wt- und FAN-defizienten Zellen beobachtet.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass eine Defizienz von FAN keinen Einfluss auf die intrazelluläre Membrantranslokation und Aktivierung der cPKCs nach PMA-Stimulation ausübt.

In analogen Ansätzen wurden nachfolgend MCHSF2- und C57-F2-Fibroblasten nach PMA-Stimulation auf die Translokation der PKC-Aktivität in die Membranfraktion hin untersucht. Die C57-F2-Fibroblasten (Abb. 3.7 A) zeigen einen glockenförmigen Verlauf der PKC-Aktivität mit einem Maximum von 320% nach 10 Minuten in der Membranfraktion. MCHSF2-Fibroblasten (Abb. 3.7 B) lassen einen steileren Anstieg der PKC-Aktivität in den Membranfraktionen erkennen. Bereits nach einer Minute sind knapp 400% erreicht, das Maximum befindet sich nach 15 Minuten bei 530%. Im Zytosol ist ebenfalls eine rasche und stärkere Abnahme der PKC-Aktivität bis auf 10% im Gegensatz zu C57-F2-Fibroblasten zu erkennen.

**A**

**B**

**Abbildung 3.7: PKC-Assay von Zytosol- und Membranfraktionen aus C57-F2- und MCHSF2-Fibroblasten.** Zellen wurden mit PMA [0,1 µM] stimuliert (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 min). Vor der Aktivitätsmessung wurde eine Ionenaustausch-Chromatographie bei konstantem pH mit einer Salzkonzentration von 0,2 M NaCl durchgeführt. **A:** C57-F2-Zellen, **B:** MCHSF2-Zellen. Die in % angegebene Enzymaktivität ist relativ zu unstimulierten Zellen angegeben. Es ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Diese Ergebnisse widersprechen den publizierten Daten von Ito *et al.*, Sato *et al.* und Tanabe *et al.* Diese Arbeitsgruppe hat in Lyst-defizienten Fibroblasten eine gestörte Translokation und Aktivität der PKC nachgewiesen (Ito *et al.*, 1989, Sato *et al.*, 1990, Tanabe *et al.*, 2001).

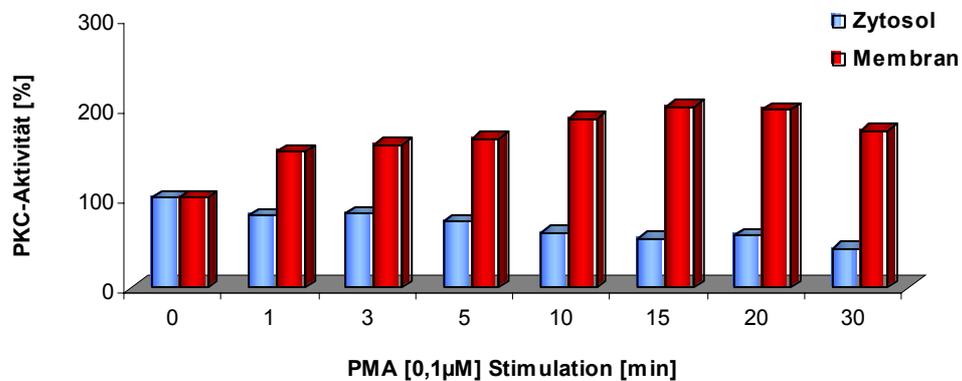
### 3.1.2.3 Analyse der PKC-Aktivität mittels Immunpräzipitation

Für eine selektivere Untersuchung einzelner PKC-Isotypen wurde mittels Immunpräzipitation (IP) die gesuchte PKC gezielt angereichert (2.2.4.4). Ito *et al.* und Sato *et al.* postulierten, dass in Lyst-defizienten Zellen vor allem die Membranrekrutierung von PKC β2 gestört ist (Ito *et al.*, 1989, Sato *et al.*, 1989). Daher wurde die PKC β2 aus generierten Zytosol- und Membranfraktionen (2.2.4.2) mit einem polyklonalen Antikörper immunpräzipitiert, bevor sie dem PKC-Assay unterworfen

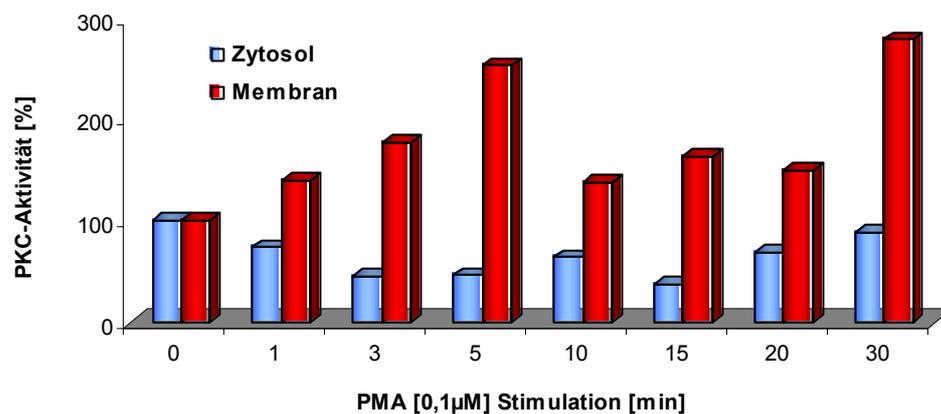
wurden. Für diesen Versuch stand noch das funktionelle Lot des PKC  $\beta$ 2-Antikörpers zur Verfügung.

In Abbildung 3.8 sind die Ergebnisse des PKC-Assays mit PKC  $\beta$ 2 IP-Proben aus wt- und FAN-defizienten Fibroblasten dargestellt. Im Gegensatz zu den durch Ionenaustausch-Chromatographie gereinigten Proben wurde eine geringere Enzymaktivität gemessen, da nach der Immunpräzipitation ausschließlich die Aktivität der gesuchten PKC  $\beta$ 2 gemessen wurde ohne „Verunreinigung“ durch weitere konventionelle PKCs.

A



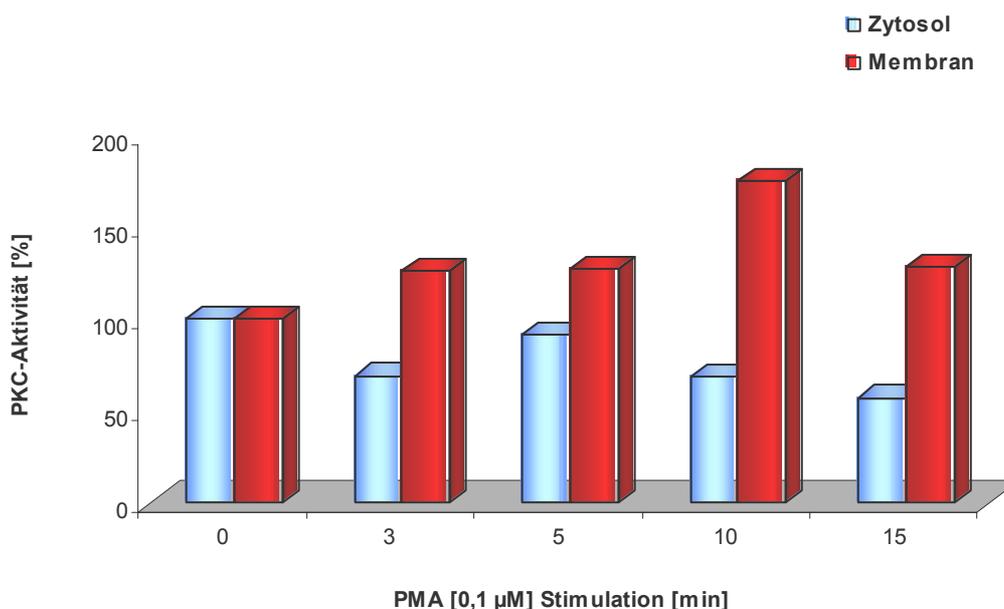
B

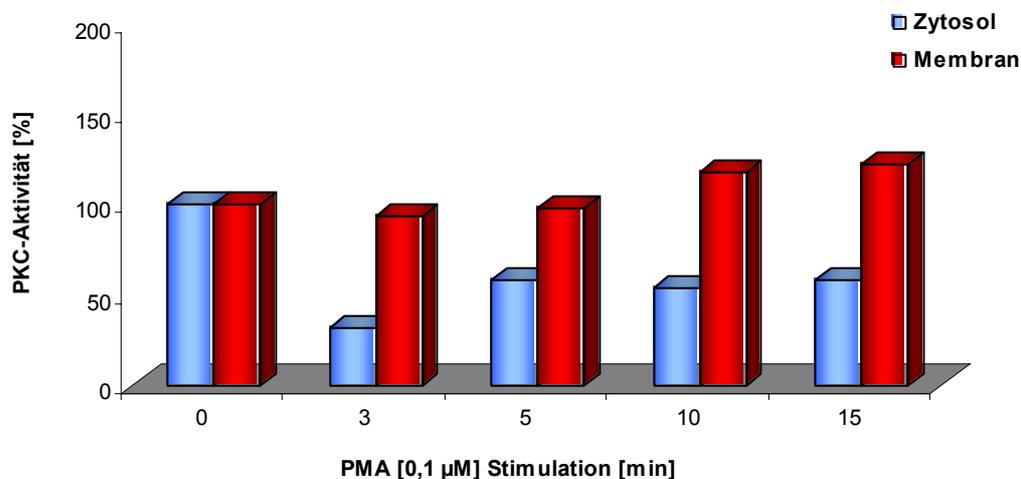


**Abbildung 3.8: PKC-Assay von Zytosol- und Membranfraktionen aus wt- und FAN-defizienten Fibroblasten.** Zellen wurden mit PMA [0,1  $\mu$ M] stimuliert (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 min). Vor der Aktivitätsmessung wurde eine Immunpräzipitation mit 400  $\mu$ g Protein und einem polyklonalen PKC  $\beta$ 2 Antikörper [1  $\mu$ g] durchgeführt. **A:** wt-Fibroblasten, **B:** FAN-defiziente Fibroblasten. Die in % angegebene Enzymaktivität der PKC  $\beta$ 2 ist relativ zu unstimulierten Zellen angegeben. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Das Aktivitätsmuster der PKC  $\beta$  2 in wt-Zellen ist in Abb. 3.8 A dokumentiert. Das enzymatische Maximum der PKC  $\beta$  2 liegt bei 220% und ist bei 15 bzw. 20 Minuten PMA-Stimulation erreicht. Der Zeitpunkt des Aktivitätsmaximums entspricht den Ergebnissen aus den Aktivitätsmessungen nach einer Ionenaustausch-Chromatographie (Abb. 3.6 A). Hierbei beträgt die maximale PKC-Aktivität 620% und ist nach 20 Minuten Stimulation erreicht. Die enzymatische Aktivität von PKC  $\beta$  2 in FAN-defizienten Fibroblasten ist in Abb. 3.8 B gezeigt. Ein Aktivitätsmaximum von 270% ist nach 5 Minuten PMA-Stimulation erreicht. Auch mit der selektiven Anreicherungsmethode der PKC  $\beta$  2 mittels Immunpräzipitation sind keine Unterschiede zwischen wt- und FAN-defizienten Zellen in der PKC-Rekrutierung aus dem Zytosol an die Membran zu erkennen.

Im nächsten Schritt wurde die PKC  $\beta$  2 in zytosolischen- und Membranfraktionen von PMA-stimulierten MCHSF2- und C57-F2-Fibroblasten ebenfalls in einer Immunpräzipitation selektiv angereichert. Anschließend wurde die enzymatische Aktivität der PKC  $\beta$  2 gemessen (Abbildung 3.9).

**A**

**B**

**Abbildung 3.9: PKC-Assay von Zytosol- und Membranfraktionen aus C57-F2- und MCHSF2-Fibroblasten.** Zellen wurden mit PMA [0,1 µM] stimuliert (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 min). Vor der Aktivitätsmessung wurde eine Immunpräzipitation mit 400 µg Protein und einem polyklonalen PKC β2 Antikörper [1 µg] durchgeführt. **A:** C57-F2-Zellen, **B:** MCHSF2-Zellen. Die in % angegebene Enzymaktivität der PKC β2 ist relativ zu unstimulierten Zellen angegeben. Es ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Die enzymatische Aktivität der PKC β2 in den zytosolischen- und Membranfraktionen aus C57-F2-Fibroblasten ist in Abbildung 3.9 A dargestellt. Das Maximum ist bei 10 Minuten erreicht und liegt bei 200%. Die maximale PKC-Aktivität nach vorgeschalteter Ionenaustausch-Chromatographie ist ebenfalls bei 10 Minuten und beträgt 320%. (Abb. 3.7 A). Das Aktivitätsmuster der PKC β2 spiegelt die „normale“ Translokation wieder und steht im Einklang mit den Western Blot-Analysen.

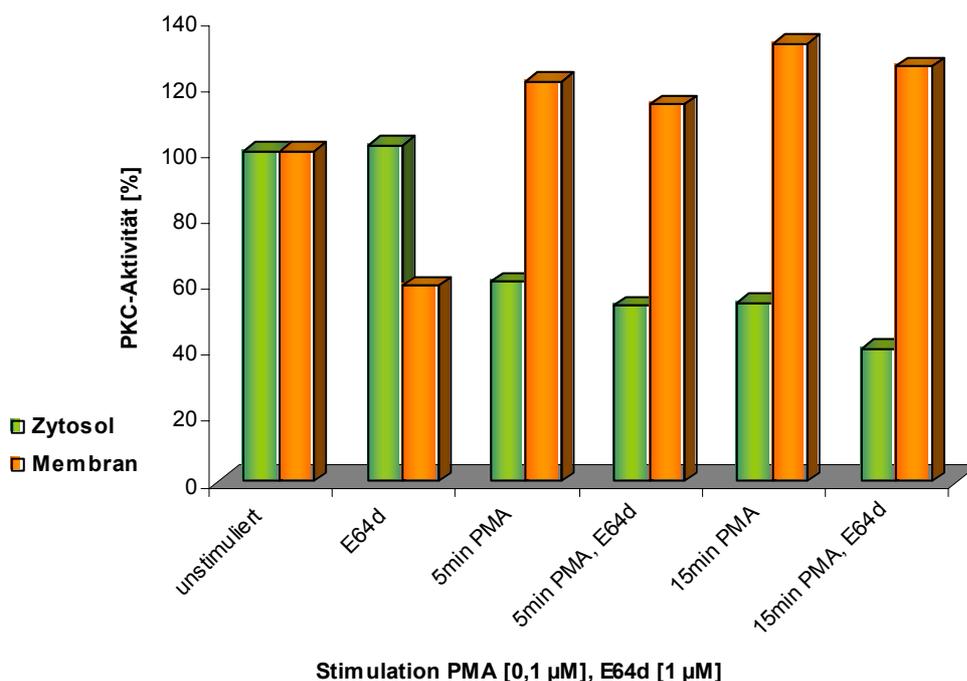
Die Ergebnisse des PKC-Assays mit Zytosol- und Membranfraktionen aus MCHSF2-Fibroblasten sind in Abbildung 3.9 B dokumentiert. Nach PMA-Stimulation verringert sich die PKC β2-Aktivität im Zytosol deutlich bis auf 40-60%. Allerdings ist an den Membranfraktionen keine aussagekräftige Zunahme der Aktivität zu erkennen, sie liegt zwischen 90 bis 120%.

Die Aktivität der PKC β2 in der Membranfraktion der Lyst-defizienten Fibroblasten bleibt während der PMA-Stimulation stabil. Eine „Herunterregulation“ der PKC nach 2 Minuten, wie von Ito *et al.* und Sato *et al.* beschrieben, konnte nicht beobachtet werden (Ito *et al.*, 1989, Sato *et al.*, 1990).

### 3.1.3 Inhibition der PKC-Proteolyse

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit sprachen gegen eine Abnahme der Membran-assoziierten PKC-Aktivität in Lyst-defizienten Fibroblasten nach PMA-Stimulation und stellten somit auch eine Rolle der PKC in der Bildung an Riesenlysosomen in Frage. Tanabe *et al.* und Cui *et al.* postulierten, dass die Protease Calpain für einen gesteigerten Abbau der Membran-assoziierten PKC und damit für die gestörte Aktivierung in Lyst-defizienten Fibroblasten verantwortlich ist. Sie zeigten eine Wiederherstellung der „normalen“ PKC-Aktivität in Lyst-defizienten Fibroblasten, indem sie die Proteolyse der PKC durch Calpain inhibierten (Tanabe *et al.*, 2000, Cui *et al.*, 2001). Calpain ist eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Thiol-Proteinase, die aktive Membran-assoziierte PKC in eine inaktive Form spaltet. Um diesen Punkt genauer zu untersuchen, wurde ein Membran-permeabler Thiol-Proteinase Inhibitor, E64d, verwendet, der Calpain und somit die PKC-Proteolyse blockiert.

MCHF2-Fibroblasten wurden mit E64d [1  $\mu\text{g/ml}$ ] für 24 Stunden präinkubiert. Es wurden Zytosol- und Membranfraktionen von unbehandelten und 5 bzw. 15 Minuten mit PMA-stimulierten Zellen hergestellt. PKC  $\beta 2$  wurde immunpräzipitiert und somit selektiv angereichert. Anschließend erfolgte die Messung der enzymatischen Aktivität.



**Abbildung 3.10: PKC-Assay von Zytosol- und Membranfraktionen aus MCHSF2-Fibroblasten.** Zellen wurden für 24 Stunden mit E64d [1  $\mu$ M] vorinkubiert oder unstimuliert gelassen und mit PMA [0,1  $\mu$ M] stimuliert (0, 5, 15 min). Vor der Aktivitätsmessung wurde eine Immunpräzipitation mit 400  $\mu$ g Protein und einem polyklonalen PKC  $\beta$ 2 Antikörper [1  $\mu$ g] durchgeführt. Die in % angegebene Enzymaktivität der PKC  $\beta$ 2 ist relativ zu unstimulierten Zellen angegeben. Ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

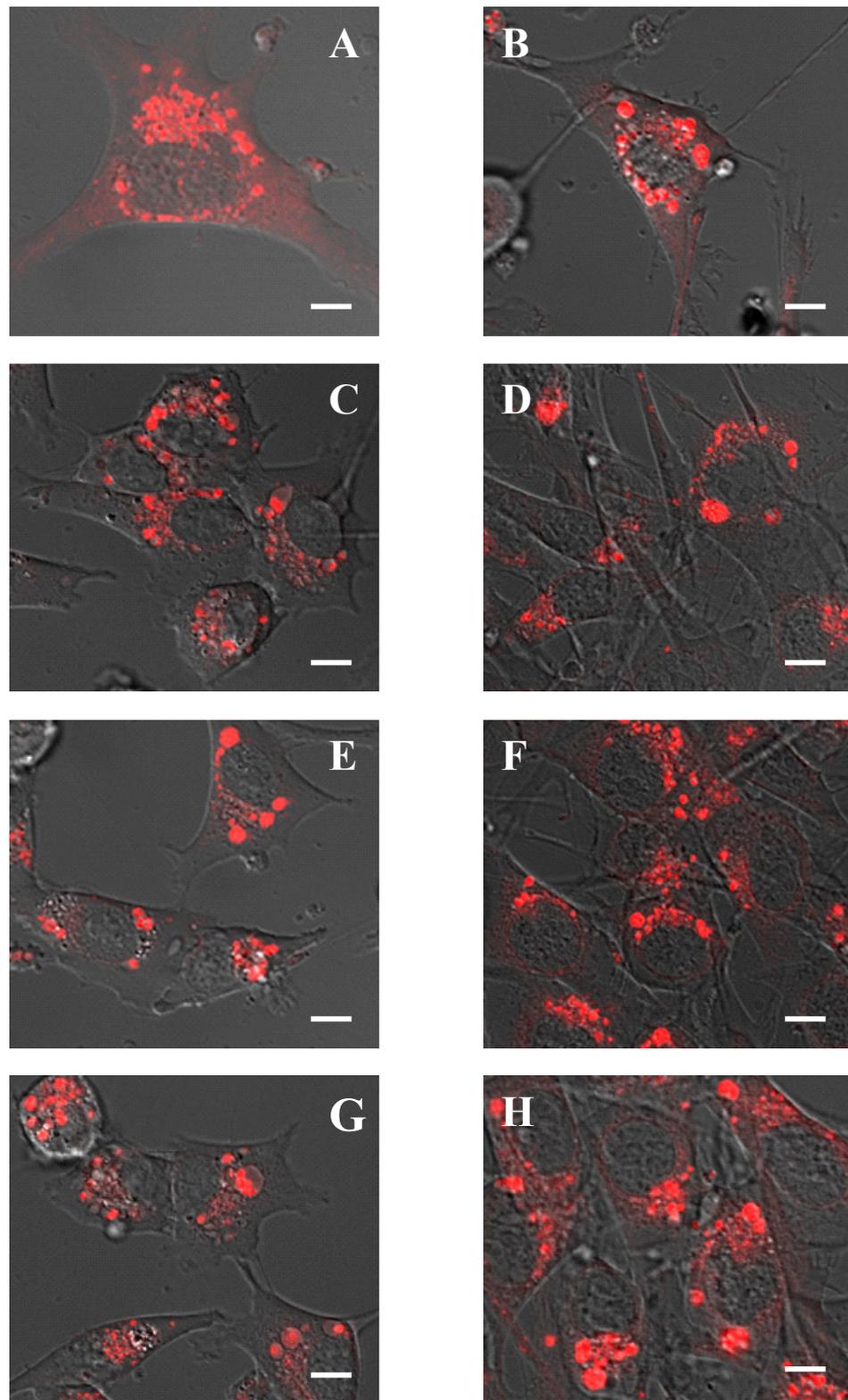
Abbildung 3.10 dokumentiert das Ergebnis des PKC-Assays. Deutlich ist zu erkennen, dass sich die PKC  $\beta$ 2-Aktivität an der Membran nach Behandlung mit PMA auf maximal 130% erhöht. Dieser Anstieg entspricht den vorigen Versuchen und resultiert aus der selektiven Messung der PKC  $\beta$ 2, nicht aber der übrigen cPKCs. Die Vorinkubation mit E64d und damit Inhibition von Calpain hat keinen steigernden Einfluss auf die enzymatische Aktivität der zytosolischen und Membran-assoziierten PKC  $\beta$ 2. Bei Zugabe von E64d wurde kein erhöhter Phosphattransfer gemessen, die katalytische Aktivität der PKC  $\beta$ 2 blieb unverändert. MCHSF2-Fibroblasten, die nur mit E64d vorinkubiert wurden, lassen demgegenüber sogar eine reproduzierbare Abnahme der PKC  $\beta$ 2-Aktivität in der Membranfraktion auf 60% erkennen.

Neben den Messungen der enzymatischen Aktivität von PKC  $\beta$ 2 wurden Immunfluoreszenzstudien angewandt, um zu untersuchen, ob PKC-Isotypen einen Einfluss auf die Bildung von Riesenlysosomen haben. Lyst-defiziente Fibroblasten (MCHSF2) wurden mit E64d behandelt und somit die PKC-Proteolyse durch Calpain inhibiert. Als Positiv-Kontrolle wurden C57-F2-Fibroblasten mit Chelerythrin vorinkubiert. Chelerythrin ist ein Breitband PKC-Inhibitor, der alle Mitglieder der drei PKC-Gruppen inhibiert (Platzbecker *et al.*, 2003). Um eine homogene Lysosomen-Population in den Zellen zu gewährleisten, wurden C57-F2- und MCHSF2-Fibroblasten vor Versuchsbeginn synchronisiert (2.2.4.9). C57-F2-Zellen wurden mit Chelerythrin [1  $\mu$ M] und MCHSF2-Fibroblasten mit E64d [0,1  $\mu$ g/ml] für 12 Stunden vorinkubiert. Zur Darstellung der Lysosomen wurde ein so genannter Lysotracker (Invitrogen) verwendet, der sich spezifisch im sauren Milieu anreichert. Die Zellen wurden in einer Wärmekammer „*in vivo*“ mit einem Laserscanning Mikroskop analysiert.

In Abbildung 3.11 sind repräsentative Ausschnitte dieser Immunfluoreszenz-Färbungen dargestellt. Die Größe und Verteilung der Lysosomen bei MCHSF2-Zellen verändert sich nicht mit Inkubation von E64d (Abb. 3.11 D, F, H). Es ist eine geringere Anzahl von Lysosomen im Gegensatz zu C57-F2-Fibroblasten zu erkennen.

Die Behandlung von C57-F2-Zellen mit Chelerythrin (Abb. 3.11 C, E, G) führt dagegen zu einer deutlichen Vergrößerung der Lysosomen. Die Anzahl der lysosomalen Kompartimente hat sich ebenfalls im Gegensatz zu den unbehandelten C57-F2-Zellen (Abb. 3.11 A) verringert.

Durch die Behandlung der MCHSF2-Zellen mit E64d konnte keine verringerte Lysosomengröße festgestellt werden. Diese Befunde stehen im Einklang mit den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit, aber im Widerspruch zu den publizierten Daten von Tanabe *et al.* (Tanabe *et al.*, 2000) und sprechen gegen eine essentielle Beteiligung von PKC-Isoenzymen an molekularen Defekten in Lyst-defizienten Zellen. Andererseits wurde eine Größenzunahme der Lysosomen bei C57-F2-Fibroblasten nach Behandlung mit Chelerythrin beobachtet. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt durch unspezifische Nebenwirkungen von Chelerythrin verursacht wird. Daher müssen diese Ergebnisse noch durch Einsatz anderer PKC-Inhibitoren erhärtet werden.



**Abbildung 3.11: Immunfluoreszenzen von C57-F2- und MCHSF2-Fibroblasten.** Lysosomen wurden mit einem LysoTracker (Invitrogen) markiert (rote Fluoreszenz) und im Laserscanning Mikroskop analysiert. Der Balken entspricht einer Größe von 10  $\mu\text{m}$ . **A:** unbehandelte C57-F2-Zellen, **C, E, G:** C57-F2-Zellen wurden mit Chelerythrin [1  $\mu\text{M}$ ] für 12 Stunden inkubiert. **B:** unbehandelte MCHSF2-Zellen, **D, F, H:** MCHSF2-Zellen wurden mit E64d [1  $\mu\text{g/ml}$ ] inkubiert.

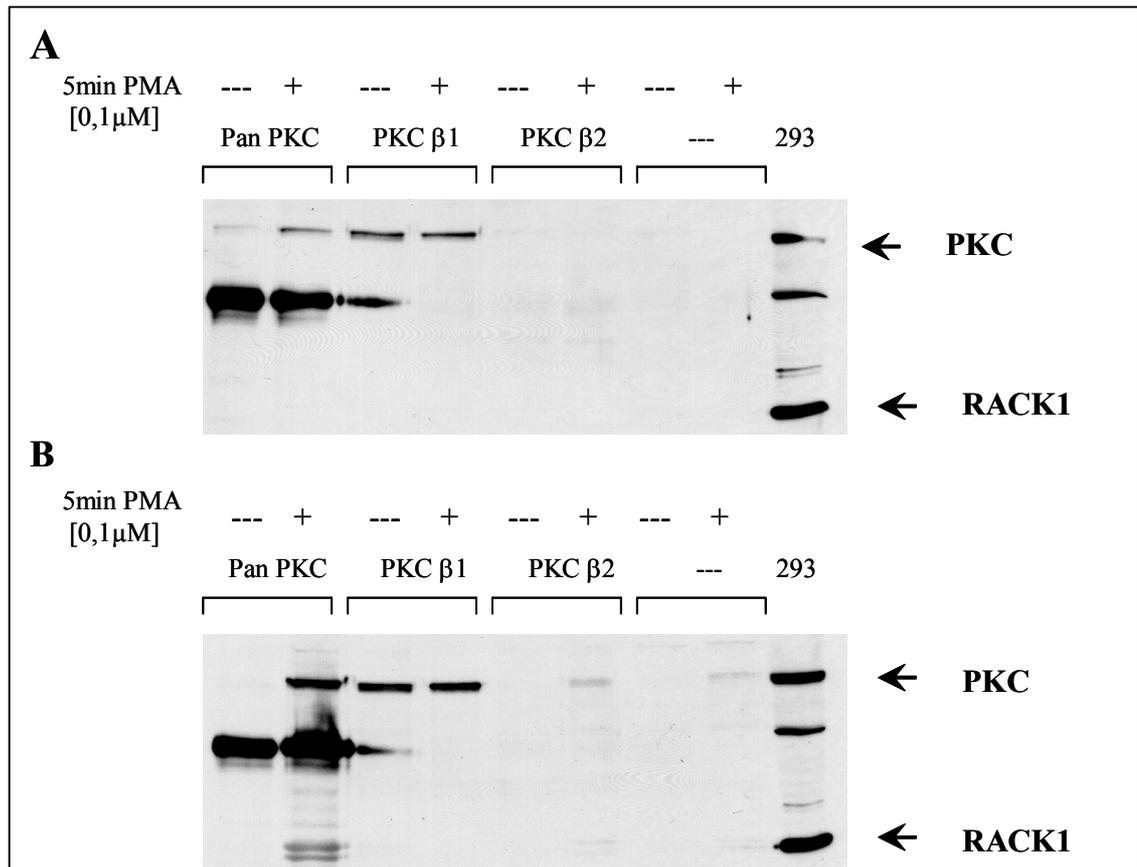
Um die bisher erhaltenen Ergebnisse weiter zu validieren, wurde das WD-repeat Protein RACK1 (receptor for activated C-kinase) genauer untersucht. RACK1 ist ein Stütz- bzw. Ankerprotein der PKC  $\beta$ 2, welches diese im aktiven Zustand bindet, zur Membran rekrutiert und stabilisiert. Eventuell liegt die Ursache der postulierten gestörten Membran-assoziierten PKC-Aktivierung in Lyst-defizienten Zellen (Ito *et al.*, 1989, Sato *et al.*, 1990) in einer mangelnden Interaktion der beiden Proteine PKC  $\beta$ 2 und RACK1 oder einer mangelnden Stabilisierung der PKC  $\beta$ 2 durch RACK1. Da eine Interaktion von RACK1 mit der WD-repeat Domäne von FAN identifiziert wurde (Tcherkasowa *et al.*, 2002), wäre eine Interaktion von RACK1 mit der WD-repeat Domäne des verwandten Proteins Lyst ebenfalls denkbar. In Lyst-defizienten Zellen wäre mit einem Fehlen dieser Interaktion eine fehlende Stabilisierung der PKC  $\beta$ 2 durch RACK1 und damit eine gestörte Aktivierung erklärbar.

Im Folgendem wurde deshalb die Interaktion von RACK1 mit PKC und die RACK1 Membrantranslokation untersucht.

#### **3.1.4 Membrantranslokation des WD-repeat Proteins RACK1**

Murine Fibroblasten (wt, FAN-defiziente, C57-F2 und MCHSF2) wurden mit PMA [0,1  $\mu$ M] stimuliert (0, 5, 10, 15 min). Zytosol- und Membranfraktionen wurden nach Immunpräzipitation von PKC  $\beta$ 2 mit einem monoklonalen RACK1-Antikörper auf eine Interaktion von RACK1 und PKC  $\beta$ 2 an der Membran untersucht. Da für diese Versuche das ursprüngliche Lot mit spezifischem PKC  $\beta$ 2-Antikörper nicht mehr zur Verfügung stand, konnten keine aussagekräftigen Blots generiert werden (Daten nicht gezeigt). Als alternativer Ansatz wurde mit spezifischen PKC-Antikörpern ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 (wenig spezifisches neues Lot), und Pan) präzipitiert und anschließend mit einem Antikörper gegen RACK1 und dem Breitband PKC-Antikörper (Pan PKC) geblottet. Als Kontrolle fungierte die Immunpräzipitation mit dem Pan PKC-Antikörper, da er alle Mitglieder der konventionellen PKCs erkennt. Abbildung 3.12 stellt die Koimmunpräzipitation in C57-F2-Zellen dar. Als Positiv-Kontrolle für RACK1/PKC wurde Gesamtlysat von 293 Zellen aufgetragen. Diese zeichnen sich durch eine hohe endogene Expression von PKC und RACK1 aus. In der zytosolischen Fraktion (Abb. 3.12 A) konnte kein mit PKC koimmunpräzipitiertes RACK1 detektiert werden.

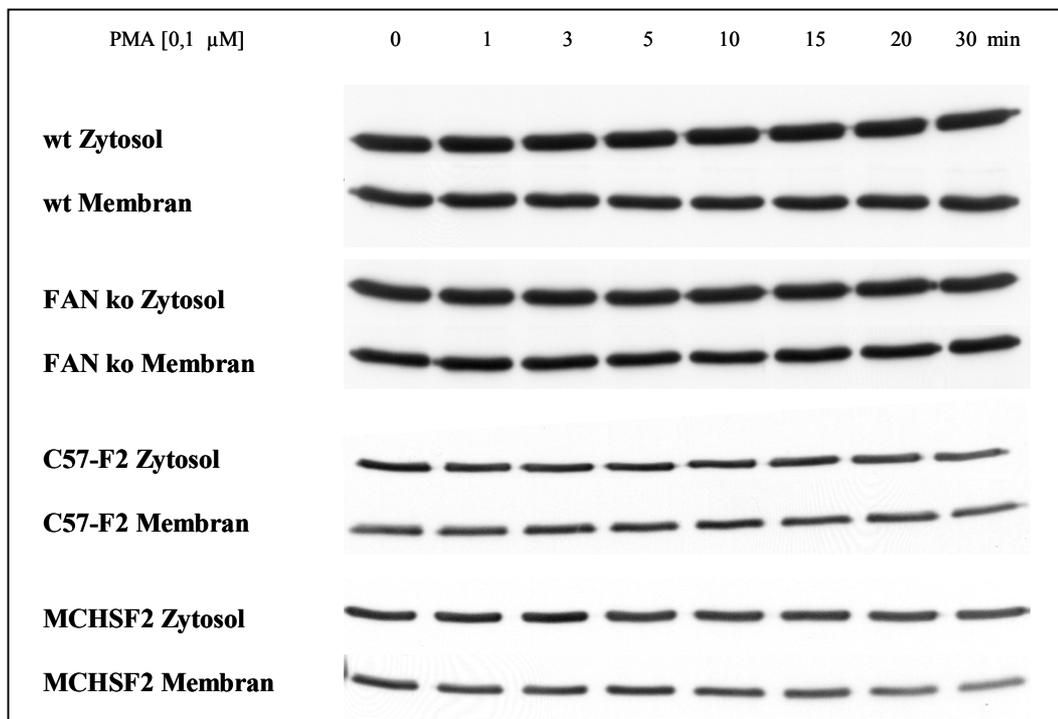
Membran-assoziiert (Abb. 3.12 B) liegt RACK1 nach 5 Minuten PMA-Stimulation deutlich in der Immunpräzipitation mit Pan PKC vor. Mit PKC  $\beta$ 2 ist nach PMA-Stimulation wegen der geringen Spezifität des Antikörpers nur eine schwache Bande auf der Höhe von RACK1 zu erkennen.



**Abbildung 3.12: Koimmunpräzipitation von RACK1 mit PKC-Isotypen aus Zytosol- und Membranfraktionen von C57-F2-Fibroblasten.** Zellen wurden mit PMA [0,1  $\mu$ M] stimuliert (0, 5 min). Die Fraktionen wurden mit Pan PKC-, PKC  $\beta$ 1-, PKC  $\beta$ 2-Antikörper und  $\gamma$ -bind Sepharose (Spezifitäts-Kontrolle) präzipitiert. Anschließend wurde mit einem Antikörper-Mix aus RACK1 und Pan PKC geblottet. Als Kontrolle für RACK1/PKC fungierte ein Gesamtlysate aus 293 Zellen. **A:** Zytosolfraktionen, **B:** Membranfraktionen. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

Diese PMA-induzierte Translokation von RACK1 mit Pan PKC bzw. PKC  $\beta$ 2 wurde auch bei MCHSF2-Fibroblasten beobachtet (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde stimmen mit den Western Blot-Daten (3.1.1) und PKC-Aktivitäts Bestimmungen (3.1.2) überein und sprechen im Einklang mit den bisherigen Daten gegen eine gestörte Membranrekrutierung des Komplexes aus RACK1 und PKC  $\beta$ 2 nach PMA-Stimulation von Lyst-defizienten Zellen.

Parallel wurde die Verteilung des RACK1-Proteins nach PMA-Stimulation in Zytosol- und Membranfraktionen aus wt-, FAN-defizienten, C57-F2- und MCHSF2-Fibroblasten untersucht. Unabhängig von Stimulationsdauer und intrazellulärer Lokalisation ist eine gleich bleibende Verteilung von RACK1 in allen Zelllinien zu erkennen (Abb. 3.13). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass nur ein geringer Teil des zellulären RACK1 an die aktivierte PKC  $\beta$ 2 bindet und diese an die Membran rekrutiert. Dieser Anteil ist zu gering, um in den Gesamtfractionen identifiziert zu werden.

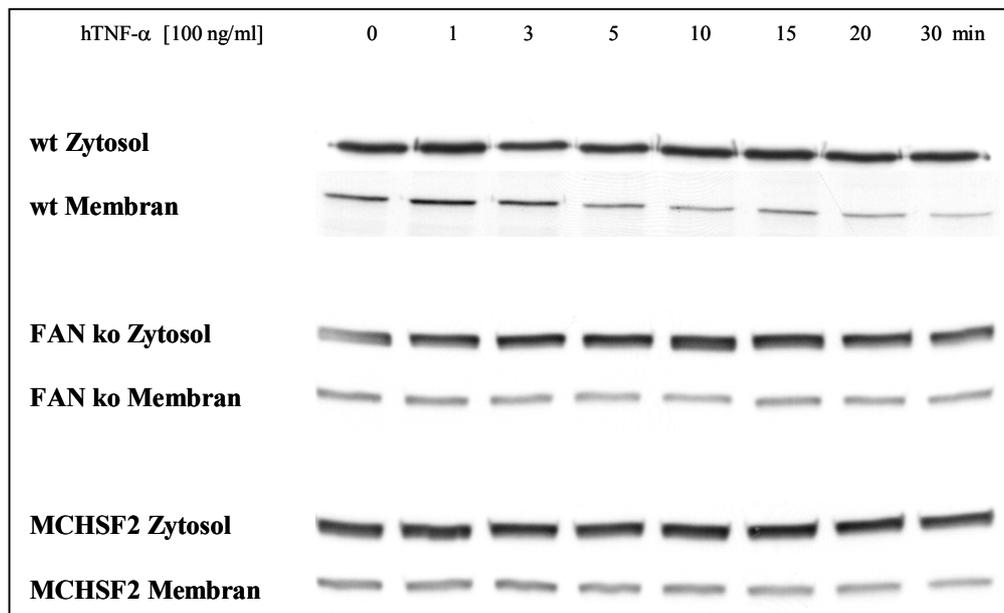


**Abbildung 3.13: Western Blot-Analysen der Expression von RACK1 aus Zytosol- und Membranfraktionen aus wt-, FAN-defizienten, C57-F2- und MCHSF2-Fibroblasten nach Stimulation mit PMA.** Zellen wurden mit PMA [0,1 μM] stimuliert (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 min) und die Expression von RACK1 mittels RACK1-Antikörpern untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

### 3.1.5 Rolle der PKC in der Komplexbildung von FAN, RACK1 und TNF-R55

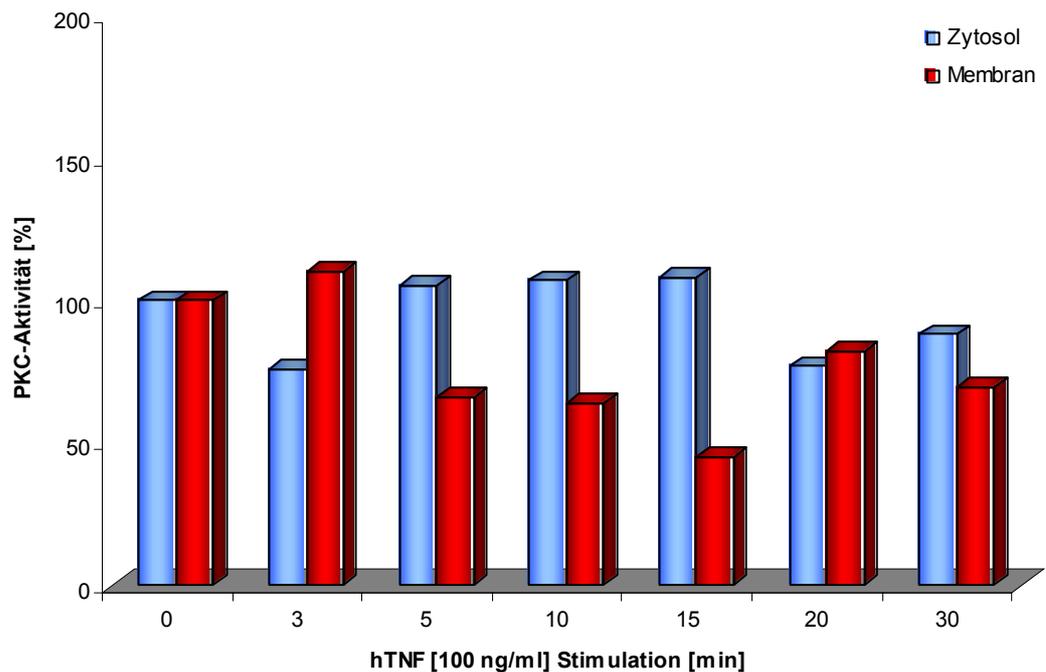
Tcherkasowa *et al.* wiesen eine Interaktion von FAN mit RACK1 über die WD-repeat Domäne von FAN nach (Tcherkasowa *et al.* 2002). Unabhängig wurde gezeigt, dass die WD-repeat Domäne von FAN an die zytoplasmatische neutrale Sphingomyelinase aktivierende Domäne (NSD) des TNF-R55 bindet (Adam-Klages *et al.*, 1996). Tcherkasowa *et al.* zeigten in Immunfluoreszenz-Studien eine Kollokalisierung von FAN, RACK1 und TNF-R55. Interessant ist die Frage, ob sich PKC-Isotypen, speziell die PKC  $\beta$ 2, aktivierungsabhängig in diesem Komplex nachweisen lassen. Entsprechende Studien mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop wurden in einem anderen Teilprojekt innerhalb dieser Arbeitsgruppe durchgeführt. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde die Membrantranslokation von PKC und RACK1 nach hTNF- $\alpha$  [100 ng/ml]-Behandlung (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 min) im Western Blot untersucht. Weiterhin wurde die enzymatische Aktivität der PKC nach Stimulation mit TNF in Zytosol- und Membranfraktionen bestimmt.

Abbildung 3.14 zeigt eine gleich bleibende zytoplasmatische Verteilung von PKC in wt-, FAN-defizienten und MCHSF2-Fibroblasten. Die Stimulation mit hTNF- $\alpha$  verursacht keine Translokation der PKC an die Membran. Bei Betrachtung der Wildtypzellen lässt sich eine Abnahme der Membran-assoziierten PKC im Verlauf der hTNF- $\alpha$ -Behandlung erkennen. In FAN-defizienten und MCHSF2-Zellen ist in den Membranfraktionen eine geringere Bandenstärke als im Zytosol zu sehen. Diese bleibt während der Stimulation unverändert.



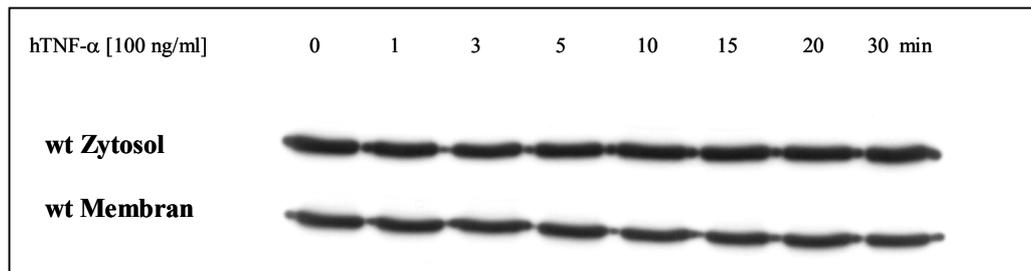
**Abbildung 3.14: Western Blot-Analysen der Expression von Pan PKC aus Zytosol- und Membranfraktionen von wt-, FAN-defizienten und MCHSF2-Fibroblasten.** Zellen wurden mit hTNF- $\alpha$  [100 ng/ml] stimuliert (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 min) und die Verteilung von konventionellen PKCs mittels Pan PKC-Antikörper untersucht. Es ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Parallel wurden Zytosol- und Membranfraktionen über Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt und die Enzymaktivität in einem PKC-Assay gemessen. In Abbildung 3.15 ist die enzymatische Aktivität am Beispiel der wt-Fibroblasten dargestellt. Die zytosolische Aktivität der PKC zeigt Assay-abhängige geringe Schwankungen, die zu vernachlässigen sind. Die enzymatische Aktivität der Membranfraktionen zeigt in Übereinstimmung mit den Expressionsdaten aus den Western Blots (Abb. 3.14) eine Abnahme, aber keine Zunahme. Das Minimum von 47% wurde nach 15 Minuten Stimulation erreicht. Diese Befunde weisen darauf hin, dass hTNF- $\alpha$  im Gegensatz zu PMA keine Zunahme der Membran-assoziierten PKC-Aktivität in Fibroblasten induziert und steht im Einklang mit Studien von Schütze *et al.* Die Autoren zeigten, dass in Fibroblasten durch TNF keine Membrantranslokation von PKC induziert wird (Schütze *et al.*, 1990).



**Abbildung 3.15: PKC-Assay von Zytosol- und Membranfraktionen aus wt-Fibroblasten.** Die Zellen wurden mit hTNF- $\alpha$  [100 ng/ml] stimuliert (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 min). Vor der Aktivitätsmessung wurde eine Ionenaustausch-Chromatographie bei konstantem pH mit einer Salzkonzentration von 0,2 M NaCl durchgeführt. Die in % angegebene Enzymaktivität ist relativ zu unstimulierten Zellen angegeben. Ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

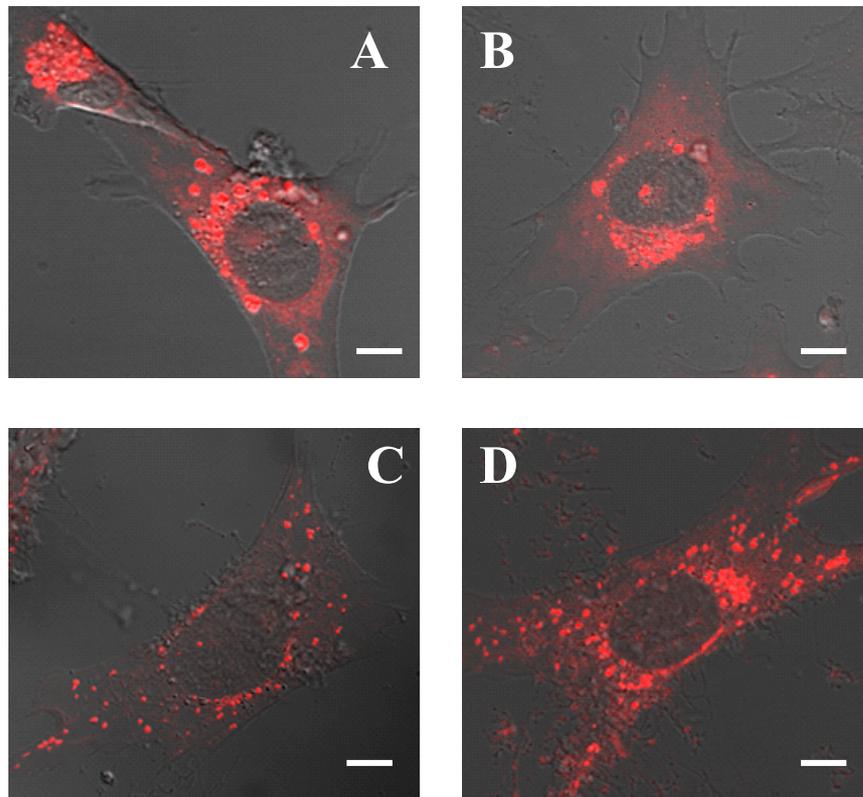
Zusätzlich wurde die Verteilung von RACK1 nach hTNF- $\alpha$ -Stimulation in Zytosol- und Membranfraktionen untersucht. Exemplarisch ist die Western Blot-Analyse von wt-Fibroblasten dargestellt (Abb. 3.16), diese zeigen unabhängig von Stimulation und intrazellulärer Lokalisation eine gleich bleibende Expression von RACK1. FAN- und Lyst-defiziente Fibroblasten zeigten ebenfalls eine gleich bleibende Expression (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.16: Western Blot-Analysen der Expression von RACK1 aus Zytosol- und Membranfraktionen von wt-Fibroblasten.** Zellen wurden mit hTNF- $\alpha$  [100 ng/ml] stimuliert (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 min) und die Expression von RACK1 mittels RACK1-Antikörper untersucht. Ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten ist angegeben.

### 3.2 Bedeutung von FAN im lysosomalen Vesikelverkehr

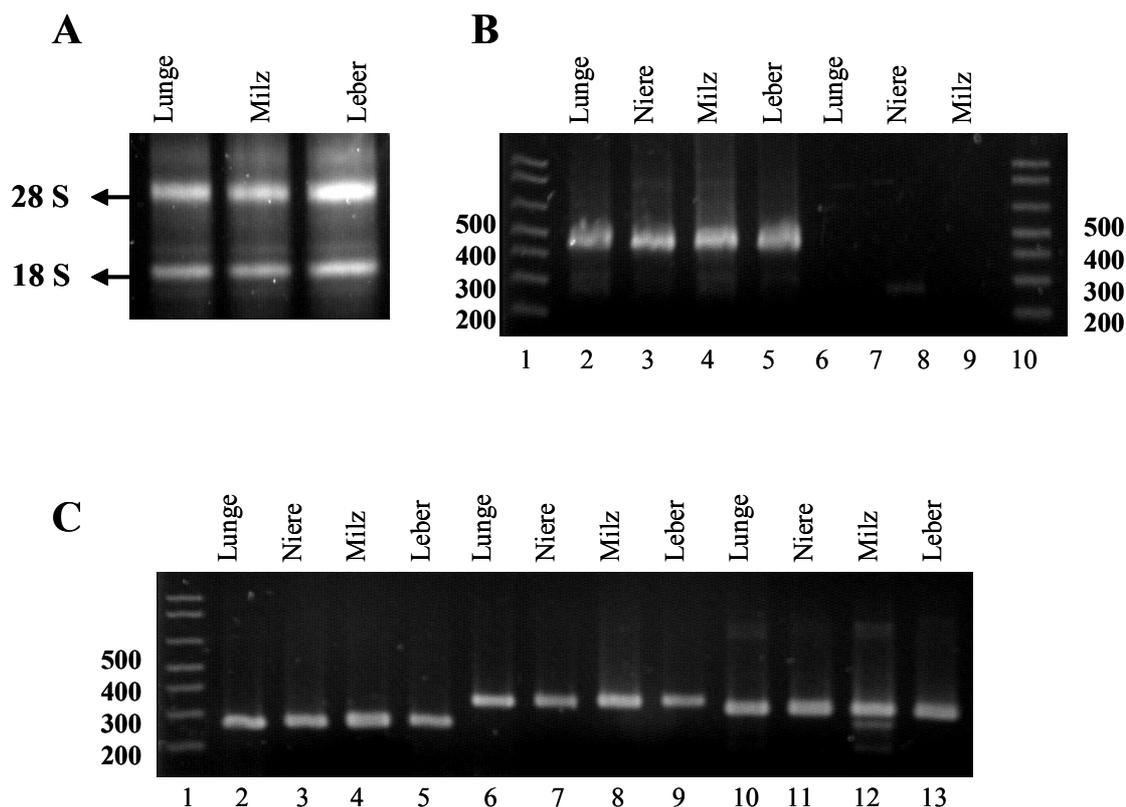
Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von FAN und Lyst wurde eine mögliche Beteiligung von FAN im lysosomalen Vesikelverkehr untersucht. Zunächst wurde geprüft, ob FAN-defiziente Fibroblasten vergrößerte Lysosomen ähnlich denen der MCHSF2-Zellen besitzen. Fibroblasten (wt-, FAN-defiziente, C57-F2- und MCHSF2-Zellen) wurden in Hungermedium synchronisiert, um sicher zu stellen, dass die Zellen sich im gleichen physiologischen Zustand befinden und somit eine homogene Lysosomen-Population vorliegt. Nach der Synchronisation wurden die Lysosomen der Zellen mit LysoTracker gefärbt und im Laserscanning Mikroskop untersucht. In Abbildung 3.17 sind repräsentative Zellen dargestellt. Deutlich sind die vergrößerten Lysosomen bei den MCHSF2- (Abb. 3.17 A) im Gegensatz zu C57-F2-Zellen (Abb. 3.17 B) zu erkennen. Ebenfalls lassen die Lysosomen der wt- (Abb. 3.17 C) und FAN-defizienten (Abb. 3.17 D) Fibroblasten Unterschiede erkennen. Diese Unterschiede sind allerdings nicht so ausgeprägt wie in den MCHSF2-Zellen. Dennoch ist im Gegensatz zu den wt-Zellen (Abb. 3.17 C) in FAN-defizienten Fibroblasten (Abb. 3.17 D) eine größere Anzahl von Lysosomen zu beobachten, die schwach vergrößert erscheinen.



**Abbildung 3.17: Immunfluoreszenzen von MCHSF2-, C57-F2-, wt- und FAN-defizienten Fibroblasten.** Lysosomen wurden mit einem Lysotracker (Invitrogen) markiert (rote Fluoreszenz) und im Laserscanning Mikroskop analysiert. Der Balken entspricht einer Größe von 10  $\mu\text{m}$ . **A:** MCHSF2-Zellen, **B:** C57-F2-Zellen, **C:** wt-Zellen, **D:** FAN-defiziente Zellen.

### 3.3 RNA-Expressionsanalyse von WD-repeat Proteinen

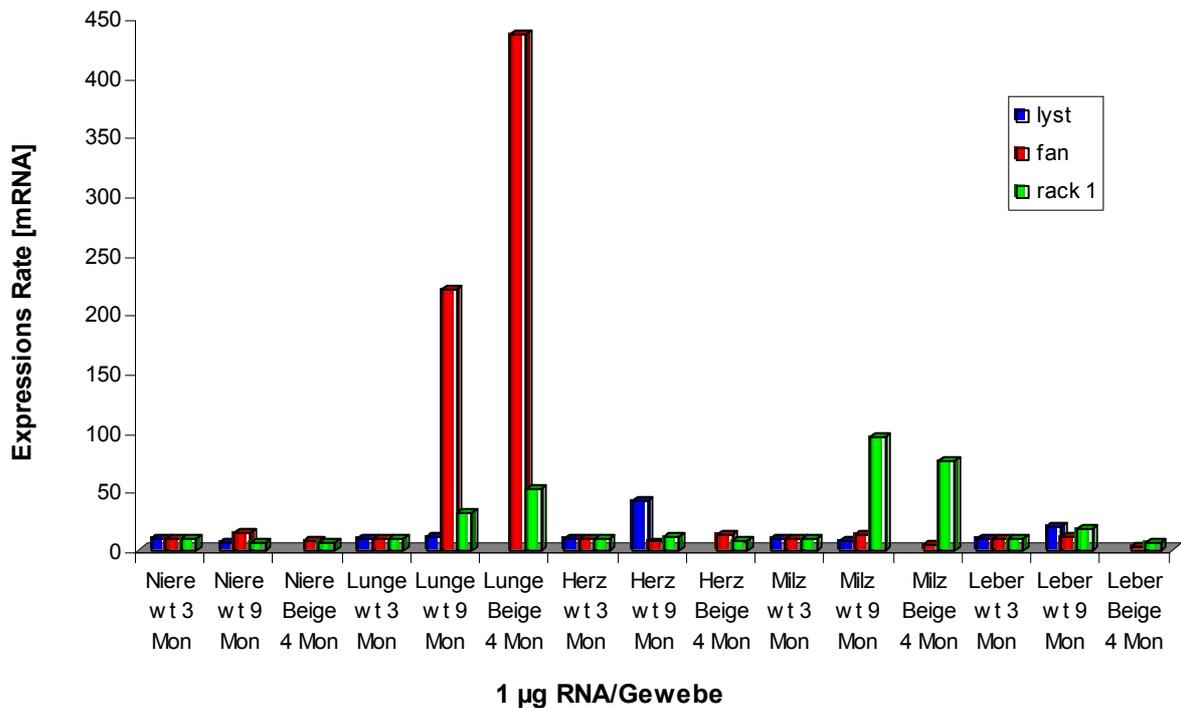
Die RNA-Expression der WD-repeat Proteine, FAN, Lyst und RACK1 wurde in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen systematisch analysiert. Es sollte die Frage geklärt werden, ob die Funktion dieser Moleküle gewebsspezifisch bzw. zu spezifischen Zeitpunkten im Organismus benötigt wird. Als Organe wurden Milz, Leber, Lunge, Herz und Niere aus Wildtyp, FAN- und Lyst-defizienten Mäusen unterschiedlicher Altersstufen (drei bzw. vier und neun Monate) untersucht. Parallel wurden mit PMA bzw. hTNF- $\alpha$  stimulierte Fibroblasten (wt-, FAN-defiziente, C57-F2- und MCHSF2-Zellen) verwendet. In einer LightCycler PCR (2.2.5.6) wurde die Expression der einzelnen Gene überprüft. Als interner Standard wurde das housekeeping-Gen G3PDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) verwendet, welches konstitutiv in allen hier untersuchten Zellen und Geweben gleichmäßig exprimiert wird. Zunächst wurden Qualitätskontrollen durchgeführt. In Abbildung 3.19 A sind exemplarisch drei RNA-Präparationen von Lunge, Milz und Leber aus Wildtypmäusen dargestellt. Die beiden prominenten ribosomalen RNAs sind klar abgegrenzt zu erkennen. Alle übrigen RNA-Präparationen wurden ebenfalls über Gelelektrophorese geprüft (Daten nicht gezeigt). Die Qualität der Gen-spezifischen Primer (lyst, fan und rack1) wurde mit einer RT-PCR überprüft. In Abbildung 3.19 B und C sind ebenfalls exemplarisch für alle durchgeführten Versuche die Produkte aus unterschiedlichen RT-PCRs aufgetragen. Als Ausgangsmaterial wurde hier cDNA verwendet, die aus Lunge, Niere, Milz und Leber von Wildtypmäusen generiert wurde. In Abb. 3.19 B wurde das housekeeping-Gen G3PDH amplifiziert (Spur 2-5). Die Genprodukte, lyst, fan und rack1 sind in Abb. 3.19 C dargestellt. Bei allen RT-PCRs wurde spezifisch nur ein Produkt amplifiziert und es wurde keine Kontamination mit genomischer DNA gefunden. Nach dieser Überprüfung wurde die cDNA in die LightCycler PCR eingesetzt. Für alle anderen RNA-Präparationen wurden analoge Kontrollen durchgeführt (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.19: Qualitätskontrollen der RNA-Präparationen** **A: RNA.** Drei unterschiedliche RNA Präparationen (Lunge, Milz und Leber aus Wildtypmäusen) wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und auf ihre Qualität geprüft. Die prominenten ribosomalen RNAs (18 S und 28 S) sind deutlich abgegrenzt zu erkennen. **B: RT-PCR,** Spur 2-5: Amplifikation von G3PDH (432 bp) mit cDNA aus Lunge, Niere, Milz, Leber. Spur 6-9: Negativ Kontrollen. Spur 1 und 10: 1 kbp Standard. **C: RT-PCR,** Spur 1: 1 kbp Standard. Spur 2-5: Amplifikation von *lyst* (269 bp) mit cDNA aus Lunge, Niere, Milz, Leber. Spur 6-9: Amplifikation von *fan* (344 bp) mit cDNA aus Lunge, Niere, Milz, Leber. Spur 10-13: Amplifikation von *rack1* (317 bp) mit cDNA aus Lunge, Niere, Milz, Leber.

In die LightCycler PCR wurde 1  $\mu$ l cDNA als Ausgangsmaterial eingesetzt. Die cDNA wurde aus je 1  $\mu$ g RNA generiert. Die Annealing Temperatur aller verwendeter Primer lag bei 64°C und die Länge der Amplifikate lag unter 500 bp (G3PDH: 432 bp, *fan*: 344 bp, *rack1*: 317 bp, *lyst*: 269 bp). Aus dem Quotienten von crossing point (cp) Probe/cp G3PDH ergab sich die Expressionsrate der mRNA. G3PDH repräsentierte als housekeeping-Gen den internen Standard. Als Bezugsgröße fungierten die Werte der drei Monate alten Wildtypmaus. Das Expressionsmuster von *lyst*, *fan* und *rack1* in unterschiedlichen Geweben ist in Abbildung 3.20 dargestellt. Am auffälligsten ist die erhöhte Expression von *fan* in der Lunge einer neun Monate alten Wildtypmaus und der vier Monate alten *Lyst*-defizienten Maus. Bezogen auf die drei Monate alte Wildtyp-

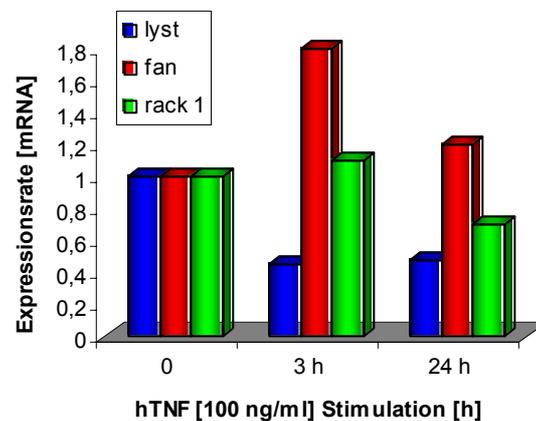
maus ergab sich bei der neun Monate alten eine 22-fache, bei der vier Monate alten Lyst-defizienten Maus eine 42-fache Erhöhung. Die Expression von rack1 zeigt in der Milz einer 9 Monate alten Wildtypmaus eine 9-fache und in der Milz einer 4 Monate alten Lyst-defizienten Maus eine 7-fache Erhöhung bezogen auf die mRNA Expression aus der Milz einer 3 Monate alten Wildtypmaus. In Lungengewebe ist ebenfalls eine schwache Erhöhung der rack1-Expression zu beobachten. Bei der 9 Monate alten Wildtypmaus liegt eine 5-fache, bei der 4 Monate alten Lyst-defizienten Maus eine 3-fache Erhöhung vor. Die Expressionsraten von lyst lassen nur in Herzgewebe aus einer 9 Monate alten Wildtypmaus eine 4-fache Zunahme erkennen. Die restlichen Werte verhalten sich stabil und lassen keinerlei Tendenzen einer Hoch- bzw. Herunterregulation erkennen.

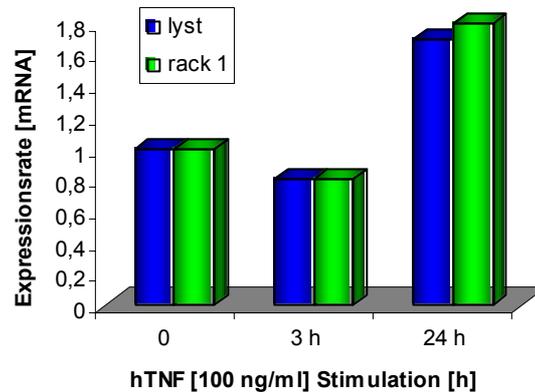


**Abbildung 3.20: Quantitative mRNA Expression von lyst, fan und rack1 in murinem Gewebe.** RNA wurde aus Niere, Lunge, Herz, Milz und Leber gewonnen. Es wurden drei bzw. neun Monate alte Wildtypmäuse und vier Monate alte Lyst-defiziente Mäuse verwendet und die Expression von lyst, fan und rack1 in Niere, Lunge, Herz, Milz und Leber untersucht. Die Expression ist relativ zu den drei Monate alten Wildtypmäusen angegeben. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

Zusätzlich wurden die Expressionsmuster von *lyst*, *fan* und *rack1* in wt-, FAN-defizienten, C57-F2- und MCHSF2-Fibroblasten untersucht. Es sollte die Frage geklärt werden, ob eine Hochregulation der WD-repeat Proteine bei Stimulation mit PMA bzw. hTNF- $\alpha$  auf Transkriptionsebene eintritt. Die Zellen wurden mit PMA [0,1  $\mu$ M] bzw. hTNF- $\alpha$  [100 ng/ml] stimuliert (0, 3 h, 24 h). Anschließend wurde die RNA-Expression von *fan*, *lyst* und *rack1* in der LightCycler PCR untersucht. Die Expressionsraten nach der TNF-Stimulation sind in den Abbildungen 3.21 und 3.22 dargestellt. In den wt-Zellen (Abb. 3.21 A) zeigt *fan* nach drei Stunden TNF-Stimulation eine schwache Erhöhung um 0,8. Nach Langzeitstimulation (24 h) entspricht die Expressionsrate von *fan* wieder ungefähr dem Ausgangswert. Das Expressionsniveau von *rack1* bleibt annähernd gleich, es bewegt sich zwischen 1,1 und 0,8. Dagegen zeigt *lyst* eine abnehmende Tendenz, nach 3 Stunden verringert sich die Expression auf 0,5 und bleibt auch nach 24 Stunden annähernd gleich. In den FAN-defizienten Zellen (Abb. 3.21 B) ist eine schwache Zunahme nach 24 Stunden sowohl von *lyst* auf 1,7 als auch von *rack1* auf 1,8 zu erkennen. Nach 3 Stunden sind keine Veränderungen in der RNA-Expression dieser Gene zu sehen.

A

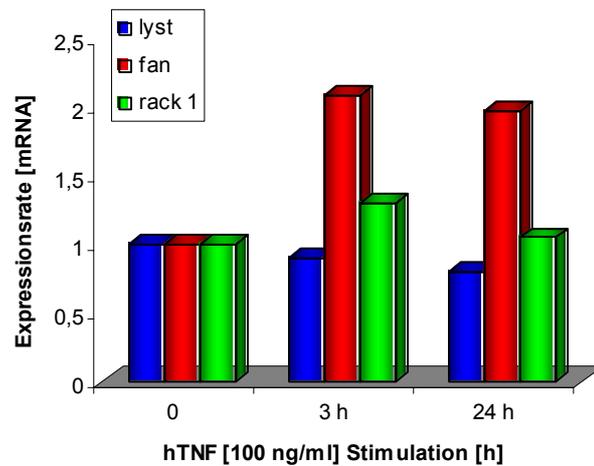


**B**

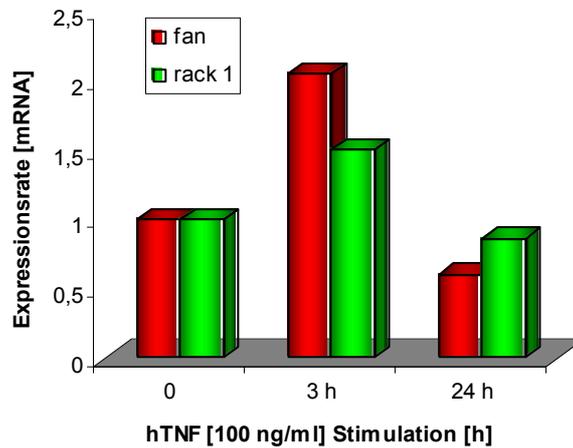
**Abbildung 3.21: Quantifizierung der mRNA Expression von lyst, fan und rack1 mittels LightCycler PCR. A:** wt-Fibroblasten, **B:** FAN-defiziente Fibroblasten. Zellen wurden mit hTNF- $\alpha$  [100 ng/ml] stimuliert (0, 3, 24 h). Als interner Standard fungierte G3PDH. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

In den C57-F2-Zellen (Abb. 3.22 A) zeigt fan nach drei Stunden TNF-Stimulation eine schwache Erhöhung um 1,1, diese bleibt auch nach Langzeitstimulation (24 h) bestehen. Die Zunahme der Expression von fan nach 3 Stunden Stimulation stimmt mit den wt-Zellen überein (Abb. 3.21 A). Das Expressionsniveau von rack1 bleibt annähernd gleich, es bewegt sich zwischen 1,3 und 1. Dies entspricht ebenfalls den Ergebnissen aus den wt-Zellen (Abb. 3.21 A). Dagegen zeigt lyst keine veränderten Expressionsraten nach Stimulation. In MCHSF2-Zellen (Abb. 3.22 B) ist bereits eine Zunahme nach 3 Stunden sowohl von fan auf 2,1 als auch von rack1 auf 1,6 zu erkennen. Nach 24 Stunden ist eine Abnahme der RNA-Expression auf 0,6 bei fan und auf 0,8 bei rack1 zu beobachten.

A



B

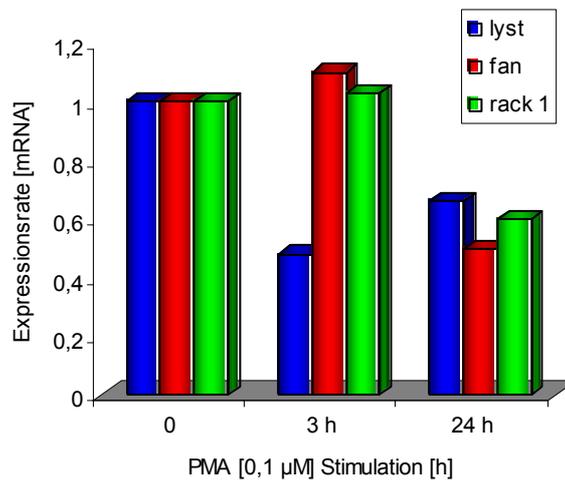


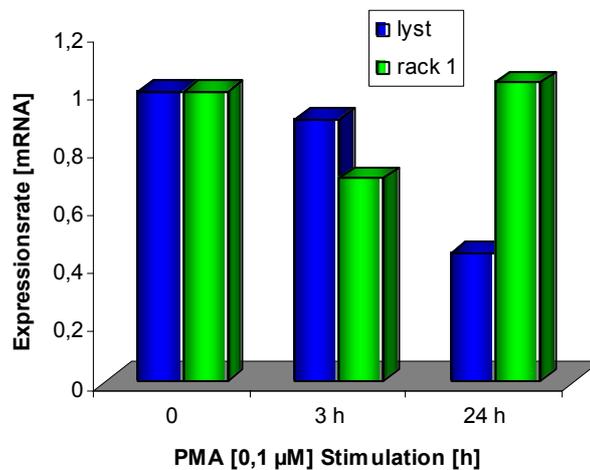
**Abbildung 3.22: Quantifizierung der mRNA Expression von lyst, fan und rack1 mittels LightCycler PCR. A:** C57-F2-Fibroblasten, **B:** MCHSF2-Fibroblasten. Zellen wurden mit hTNF- $\alpha$  [100 ng/ml] stimuliert (0, 3, 24 h). Als interner Standard fungierte G3PDH. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

Die Expressionsraten von fan, lyst und rack1 bewegen sich innerhalb eines engen Bereichs zwischen 0,5 und 2,1, d. h. bezogen auf den unstimulierten Status ergibt sich eine Abnahme um 0,5 bzw. eine Zunahme um 1,1. Diese Werte sprechen nicht für eine klare differentielle Transkription der einzelnen Gene nach TNF-Stimulation.

Die Expressionsraten nach der PMA-Stimulation sind in den Abbildung 3.23 und 3.24

dargestellt. In den wt-Zellen (Abb. 3.23 A) zeigt lyst nach drei Stunden PMA-Stimulation eine schwache Abnahme um 0,5. Nach Langzeitstimulation (24 h) bleibt diese verringerte Expressionsrate von lyst bestehen. Die Expressionsraten von rack1 und fan zeigen nach 3 Stunden keine Veränderung, nach 24 Stunden ist eine Abnahme bei rack1 auf 0,6 und bei fan auf 0,5 zu sehen. In den FAN-defizienten Zellen (Abb. 3.23 B) ist eine abnehmende Tendenz im Expressionsniveau auf 0,5 nach 24 Stunden bei lyst zu erkennen. Die RNA-Expression von rack1 lässt keine Tendenz erkennen, sie bewegt sich zwischen 0,8 und 1,1.

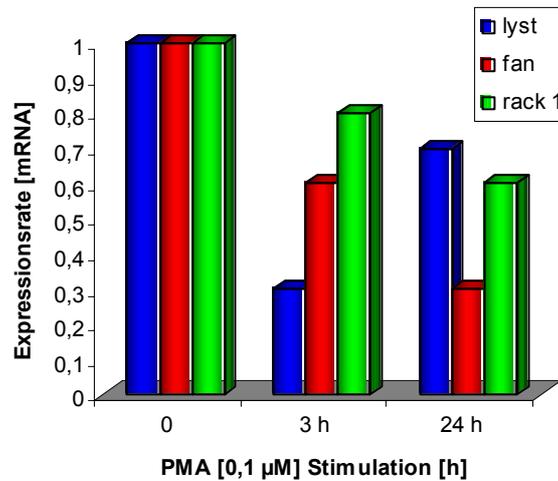
**A**

**B**

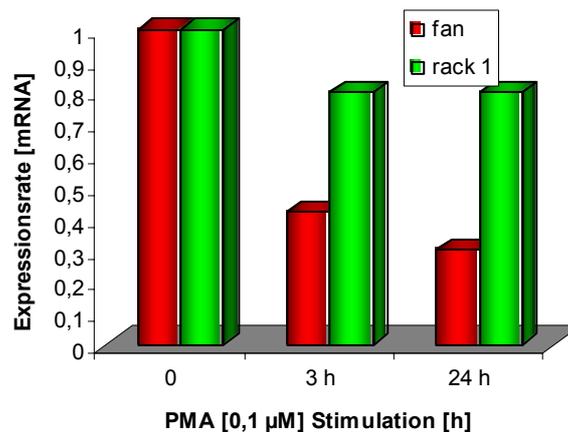
**Abbildung 3.23: Quantifizierung der mRNA Expression von lyst, fan und rack1 mittels LightCycler PCR. A: wt-Fibroblasten, B: FAN-defiziente Fibroblasten.** Zellen wurden mit PMA [0,1 µM] stimuliert (0, 3, 24 h). Als interner Standard fungierte G3PDH. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

In den C57-F2-Fibroblasten (Abb. 3.24 A) zeigt lyst nach drei Stunden PMA-Stimulation eine Abnahme auf 0,3, diese steigt nach Langzeitstimulation (24 h) auf 0,7. Die verringerte Expression von lyst nach 3 Stunden stimmt mit den Wildtypzellen überein (Abb. 3.23 A). Die Expressionsraten von fan und rack1 zeigen ebenfalls eine abnehmende Tendenz. Dies entspricht ebenfalls den Ergebnissen aus den wt-Zellen (Abb. 3.23 A). Allerdings ist hier schon eine Abnahme nach 3 Stunden zu erkennen, bei fan auf 0,6 und bei rack1 auf 0,8. In MCHSF2-Zellen (Abb. 3.24 B) hat sich die Expressionsrate von fan nach 3 Stunden 0,4 verringert. Dieses Niveau bleibt auch nach 24 Stunden bestehen. Die mRNA-Expression von rack1 nach PMA-Stimulation bleibt im Wesentlichen unverändert.

A



B



**Abbildung 3.24: Quantifizierung der mRNA Expression von lyst, fan und rack1 mittels LightCycler PCR. A: C57-F2-Fibroblasten, B: MCHSF2-Fibroblasten.** Zellen wurden mit PMA [0,1 µM] stimuliert (0, 3, 24 h). Als interner Standard fungierte G3PDH. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

Auch nach PMA-Stimulation liegen die Expressionsraten von fan, lyst und rack1 innerhalb eines engen Bereichs zwischen 0,3 und 1,1 und sprechen nicht für eine klare differentielle Transkription der einzelnen Gene nach PMA-Stimulation.

### 3.4 Untersuchungen der Proteinzusammensetzung lysosomaler

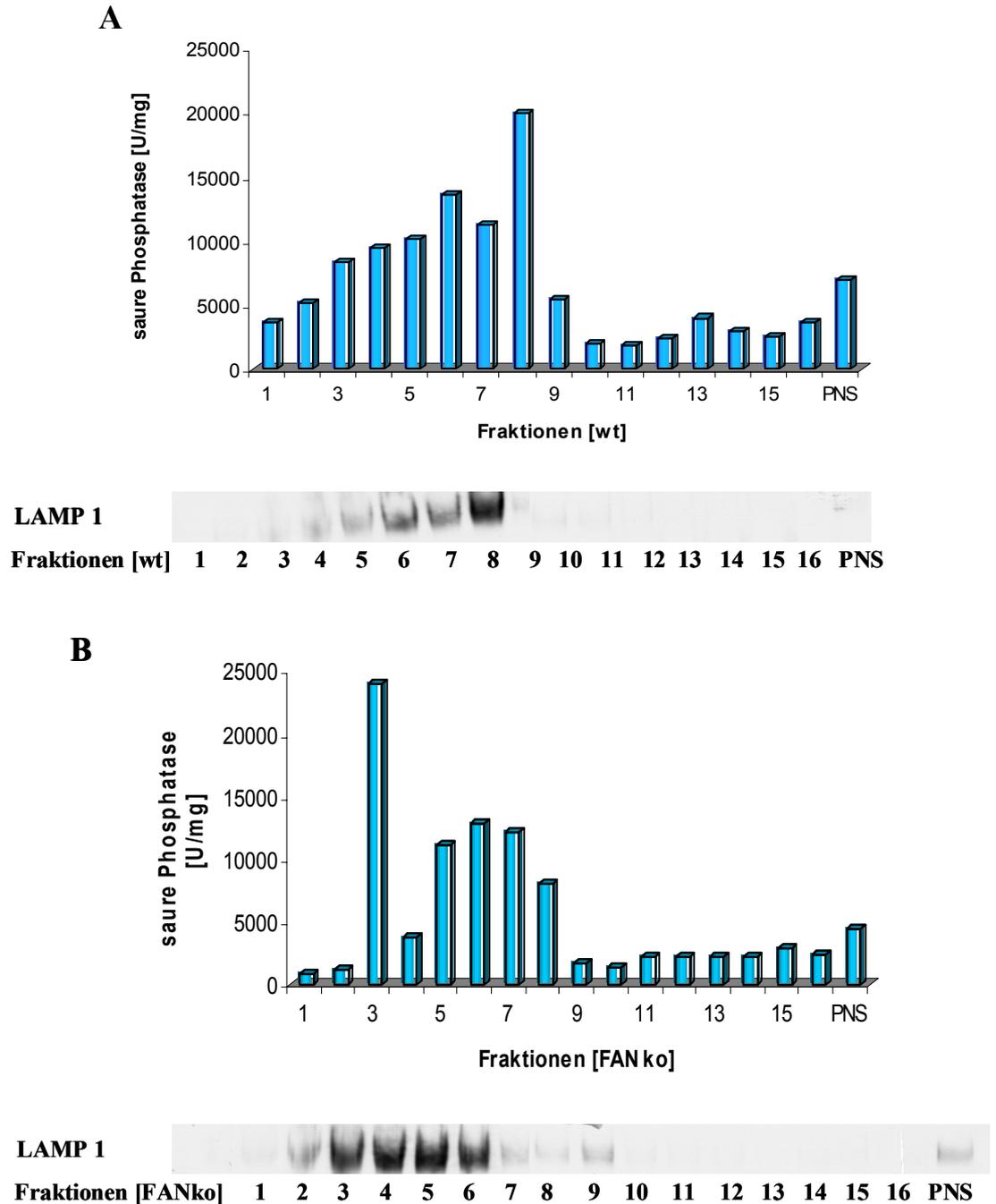
#### Kompartimente

Der morphologische Phänotyp des Chediak-Higashi Syndroms in Lyst-defizienten Fibroblasten (MCHSF2) ist, wie in Abbildung 3.17 A und B gezeigt, durch deutlich vergrößerte Lysosomen im Vergleich zu C57-F2-Zellen charakterisiert. In FAN-defizienten Zellen scheinen die Lysosomen vermehrt vor zu liegen und lassen einen vergrößerten Umfang im Vergleich zu Lysosomen aus wt-Zellen erkennen (Abb 3.17 C und D). Dieser Unterschied ist allerdings nicht so stark ausgeprägt wie bei den MCHSF2-Zellen.

Um diese Unterschiede in der Lysosomen-Morphologie weiter zu charakterisieren wurde nachfolgend die Protein-Zusammensetzung der lysosomalen Kompartimente in wt-, C57-F2-, FAN- und Lyst defizienten Zellen untersucht.

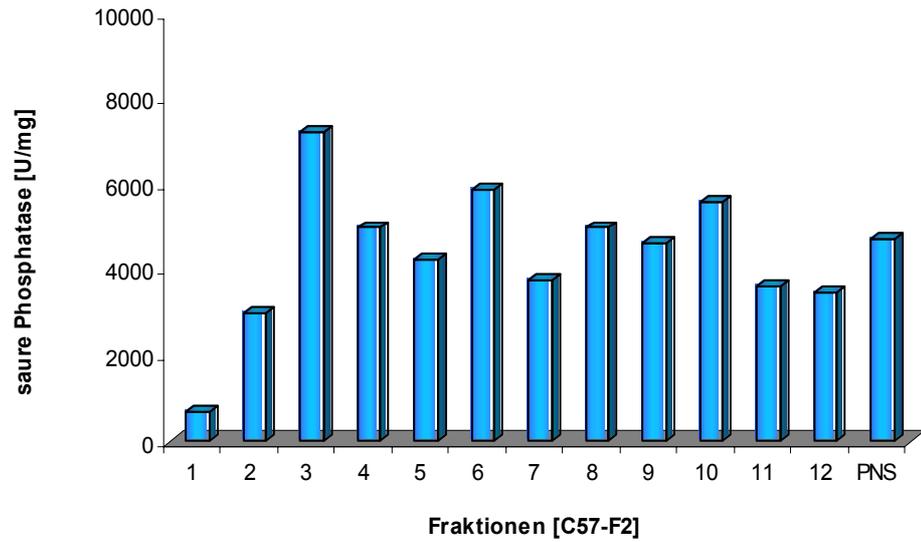
Hierzu wurden Lysosomenfraktionen von wt-, FAN-defizienten, C57-F2- und MCHSF2-Fibroblasten analysiert. Die Zellen wurden in Hungermedium synchronisiert, um einen gleichen physiologischen Zustand der Zellen und damit eine homogene Lysosomen-Population zu gewährleisten. Durch Schockgefrieren und Auftauen wurden die Zellmembranen aufgeschlossen und gleichzeitig versucht, die Membranen der intrazellulären Kompartimente möglichst intakt zu halten. Zytoplasma und Organellen wurden fraktioniert (2.2.4.9). Die lysosomale Fraktion wurde mit zwei verschiedenen Verfahren identifiziert. Zum einem wurde das lysosomale Membranprotein LAMP 1 durch Western Blot-Analysen detektiert (2.2.4.8), zum anderem wurden die lumenalen sauren Phosphatasen in Lysosomen über einen Enzymassay nachgewiesen (2.2.4.11). Wurde eine Anreicherung von lysosomalen Komponenten in einer Fraktion mit beiden Methoden nachgewiesen, wurde diese in die Zweidimensionale Gelelektrophorese (2.2.4.10) eingesetzt. Der saure Phosphatase-Assay und die Western Blot-Analyse von LAMP 1 mit Fraktionen aus wt-Fibroblasten (Abb. 3.25 A) zeigen eine klare Anreicherung lysosomaler Komponenten in Fraktion 8. In Western Blot-Analysen von Fraktionen aus FAN-defizienten Fibroblasten (Abb. 3.25 B) wurde in Fraktionen 3-6 eine annähernd gleich starke LAMP 1-Expression gefunden. Der parallel ausgeführte Enzymassay zeigt das Maximum der sauren Phosphatase-Aktivität in Fraktion 3. Somit wurde Fraktion 3 in die Zweidimensionale Gelelektrophorese eingesetzt. In den Fraktionen der C57-F2-Fibroblasten wurde eine lysosomale Anreicherung über saure Phosphatase-Assay und LAMP 1 Western Blot in Fraktion 3 nachgewiesen (Abb. 3.26

A). Für MCHSF2-Zellen zeigte Fraktion 4 das enzymatische Maximum der sauren Phosphatase und die stärkste LAMP 1-Expression (Ab. 3.26 B).



**Abbildung 3.25: Überprüfung der Anreicherung lysosomaler Komponenten mit einem sauren Phosphatase-Assay und einem LAMP 1 Western Blot in wt- und FAN-defizienten Zellen.** Die Fraktionen wurden aus dem postnukleären Überstand (PNS), welcher über eine Dichtegradientenzentrifugation separiert wurde, gewonnen. **A:** Fraktionen aus wt-Fibroblasten. **B:** Fraktionen aus FAN-defizienten Fibroblasten. Die Berechnung der sauren Phosphatase-Aktivität [U/mg] ist in 2.2.4.11 angegeben.

**A**



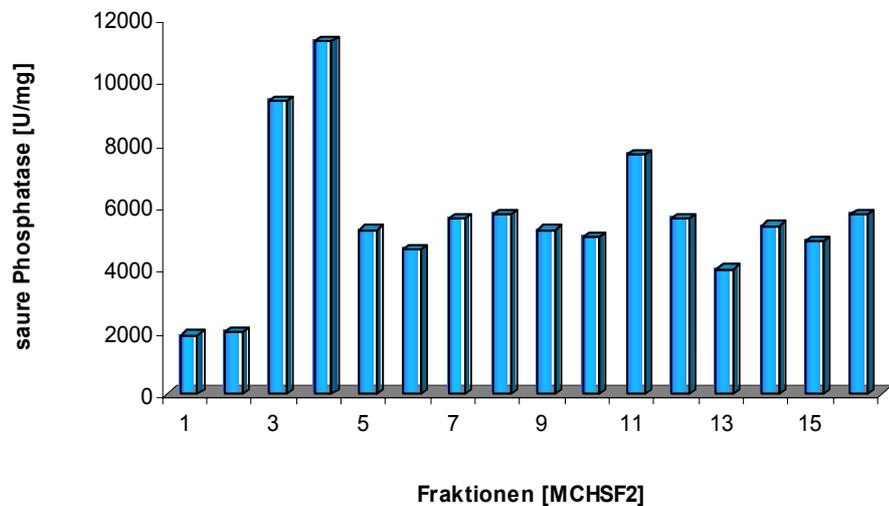
**LAMP 1**

**Fraktionen C57-F2**



**1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 PNS**

**B**



**LAMP 1**

**Fraktionen**

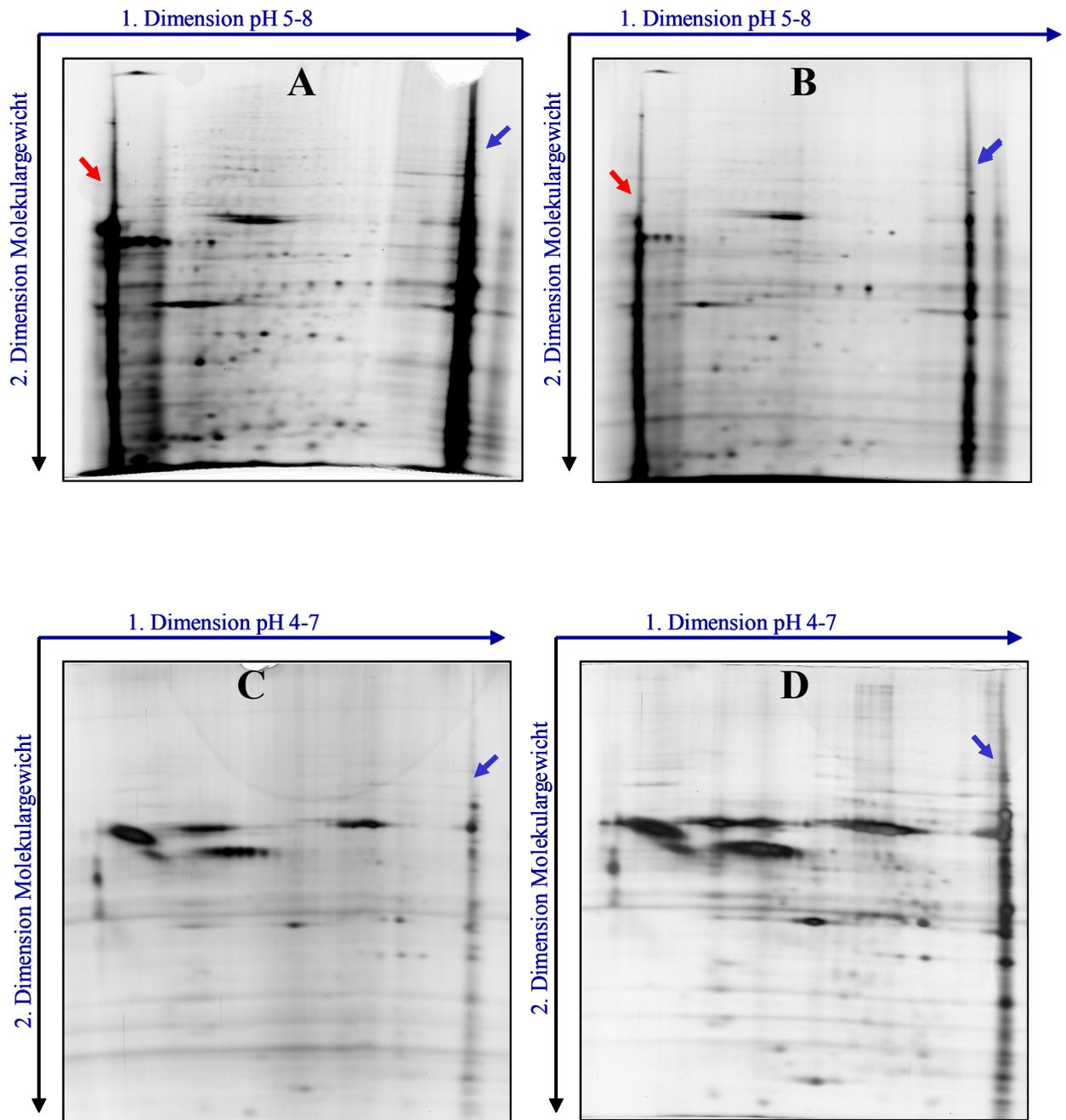
**MCHSF2**



**1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 PNS**

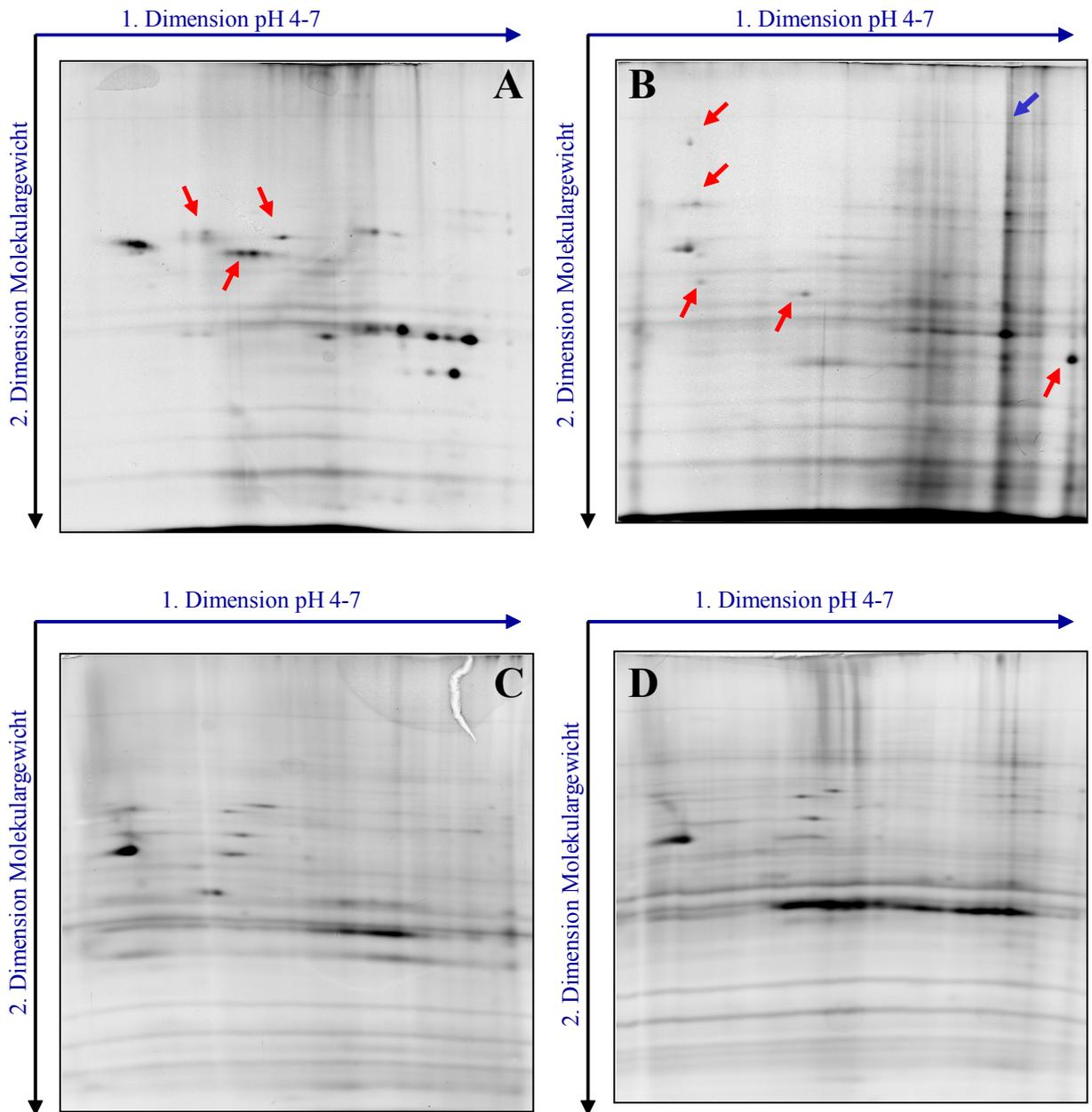
**Abbildung 3.26: Überprüfung der Anreicherung lysosomaler Komponenten mit einem saure Phosphatase-Assay und einem LAMP 1 Western Blot in C57-F2- und MCHSF2-Zellen.** Die Fraktionen wurden aus dem postnukleären Überstand (PNS), welcher über eine Dichtegradienten-Zentrifugation separiert wurde, gewonnen. **A:** Fraktionen aus C57-F2-Fibroblasten. **B:** Fraktionen aus MCHSF2-Fibroblasten. Die Berechnung der sauren Phosphatase-Aktivität [U/mg] ist in 2.2.4.11 angegeben.

Nach der Überprüfung der Anreicherung lysosomaler Bestandteile wurden die jeweiligen Fraktionen (20 µg Protein) und parallel die dazu gehörigen postnukleären Überstände (PNS) in die Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D) eingesetzt (2.2.4.10). Entsprechend dem sauren Milieu der Lysosomen wurden für die isoelektrische Fokussierung (1. Dimension) pH Gradienten von 4-7 bzw. 5-8 verwendet. Anschließend wurden die Proteine anhand ihres Molekulargewichts separiert (2. Dimension) und mit Silbernitrat gefärbt. Die Ergebnisse der Silberfärbung der postnukleären Überstände aus C57-F2-, MCHSF2-, wt- und FAN-defizienten Fibroblasten sind in Abbildung 3.27 dargestellt. Die Proteine der PNS aus C57-F2- (Abb. 3.27 A) und MCHSF2-Zellen (Abb. 3.27 B) wurden mit einem Gradienten von pH 5-8 aufgetrennt. Die Silberfärbung verdeutlicht ein übereinstimmendes Proteinmuster der beiden Zelllinien. Im PNS befinden sich mit Ausnahme des Zellkerns sämtliche Bestandteile einer Zelle. Bei Verwendung eines Gradienten von pH 5-8 bzw. 4-7 erfolgt somit keine komplette Separation aller vorhandener Proteine. Dies wird bei pH 8 deutlich. Hier ist eine Ansammlung von Proteinen zu erkennen (blauer Pfeil), deren isoelektrischer Punkt im basischen Bereich liegt. Ebenfalls zeigt sich bei pH 5 eine Aggregation von Proteinen (roter Pfeil), deren isoelektrischer Punkt unterhalb von pH 5 liegt. Die Postnukleären Überstände von Wildtyp- und FAN-defizienten Fibroblasten wurden über einen Gradient von pH 4-7 separiert. Die Silberfärbung dieser 2D dokumentiert ein übereinstimmendes Proteinmuster (Abb. 3.27 C und D). Bei pH 7 ist bei beiden Zelllinien eine Ansammlung von Proteinen zu erkennen (blauer Pfeil), die mit ihrem isoelektrischen Punkt oberhalb von pH 7 migrieren.



**Abbildung 3.27: Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D) mit postnukleären Überständen (PNS).**  
**A:** PNS aus C57-F2-Zellen. 1. Dimension über pH Gradient 5-8. **B:** PNS aus MCHSF2-Zellen. 1. Dimension über pH Gradient 5-8. **C:** PNS aus wt-Fibroblasten. 1. Dimension über pH Gradient 4-7. **D:** PNS aus FAN-defizienten Fibroblasten. 1. Dimension über pH Gradient 4-7. Es wurden 30 µg Protein in die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt. Nach der SDS-PAGE wurde eine Silberfärbung zur Detektion der Proteine durchgeführt. Die Pfeile weisen auf eine Ansammlung von Proteinen, die über den verwendeten pH Gradienten nicht separiert wurden. Die Ergebnisse repräsentieren jeweils drei unabhängige Experimente.

Je 20  $\mu\text{g}$  der angereicherten lysosomalen Fraktionen aus C57-F2-, MCHSF2-, wt- und FAN-defizienten Fibroblasten wurden in die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt und die aufgetrennten Proteine mittels Silberfärbung nachgewiesen (Abb. 3.28).



**Abbildung 3.28: Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D) mit Fraktionen angereicherter lysosomaler Bestandteile.** **A:** Fraktion 3 aus C57-F2-Zellen. **B:** Fraktion 4 aus MCHSF2-Zellen. **C:** Fraktion 8 aus wt-Fibroblasten. **D:** Fraktion 3 aus FAN-defizienten Fibroblasten. Es wurden 20  $\mu\text{g}$  Protein in die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt. Die 1. Dimension erfolgte über einen immobilen Gradienten von pH 4-8. Nach der SDS-PAGE wurde eine Silberfärbung zur Detektion der Proteine durchgeführt. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

In der Separation der angereicherten Lysosomenfraktionen aus C57-F2-(Abb. 3.28 A) und MCHSF2-Fibroblasten (Abb. 3.28 B) sind klare Unterschiede zu erkennen. Mit den roten Pfeilen sind jeweils Protein-Punkte gekennzeichnet, die in der zu vergleichenden Zelllinie nicht zu finden sind. Interessanterweise zeigen die lysosomalen Anreicherungen aus MCHSF2-Zellen (Abb. 3.28 B) eine Ansammlung von Proteinen bei pH 7, welche mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet ist. Diese Protein-Aggregation ist ungewöhnlich, da ein Proteingemisch aus lysosomalen Komponenten ein Optimum im sauren Milieu haben sollte. Diese Ansammlung von Proteinen bei pH 7 ist bei allen anderen Zelllinien nicht zu beobachten. Dagegen zeigen die aufgetrennten lysosomalen Proteine aus wt- (Abb. 3.28 C) und FAN-defizienten Zellen (Abb. 3.28 D) ein ähnliches Proteinmuster nach der Silberfärbung. Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass sich die Zusammensetzung der Proteine in FAN-defizienten Lysosomen nicht wesentlich von Wildtyp-Lysosomen unterscheidet.

In diesen 2D-Analysen wurde zum ersten Mal eine unterschiedliche Proteinzusammensetzung der Lysosomen in Lyst-defizienten Zellen gezeigt. Die Lysosomen der FAN-defizienten Zellen zeigen dagegen eine annähernd identische Proteinzusammensetzung wie die lysosomalen Fraktionen der wt-Zellen. Demnach spiegelt eine Defizienz von FAN sich nicht in einer geänderten Zusammensetzung von lysosomalen Proteinen wieder.

### **3.5 Untersuchung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen**

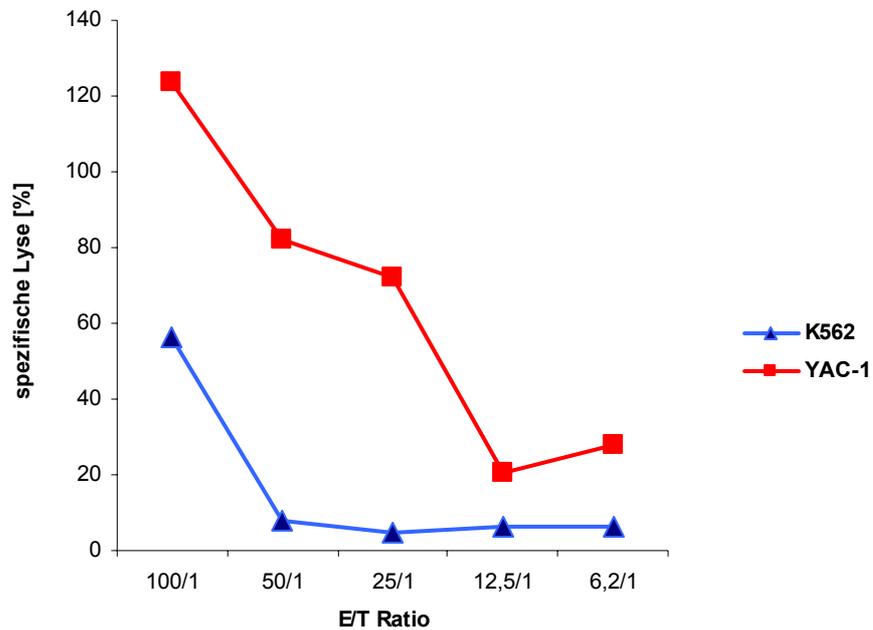
In Lyst-defizienten Zellen wurde eine gestörte Fusion von Lysosomen mit der Plasmamembran (Exozytose) beschrieben. Dieser Defekt resultiert unter anderem in einer mangelnden zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen. Sekretorische Lysosome sind nicht in der Lage, über Exozytose ihre Granzyme bzw. Perforin zu entlassen. Vor kurzem wurde eine Fehlfunktion der Barrierereparatur in Lyst-defizienten Zellen beschrieben (Huynh, *et al.*, 2004). Dieser Defekt beruht ebenfalls auf einer gestörten Fusion von Lysosomen mit der Plasmamembran. Kreder *et al.* dokumentierte ebenfalls eine fehlerhafte Barrierereparatur in FAN-defizienten Mäusen (Kreder *et al.* 1999). Der molekulare Mechanismus dieser Beobachtung ist nicht klar. Es ist möglich, dass diese mangelnde Barrierereparatur aus ähnlichen zellulären Defekten wie bei Lyst-defizienten Zellen herrührt (z. B. fehl geregelte Exozytose). Es schließt sich die Frage an, ob auch

NK-Zellen in FAN-defizienten Mäusen in ihrer Aktivität eingeschränkt sind? Um dies zu klären, wurden im Folgendem NK-Zellen aus FAN-defizienten Mäusen auf ihre zytotoxische Aktivität hin untersucht.

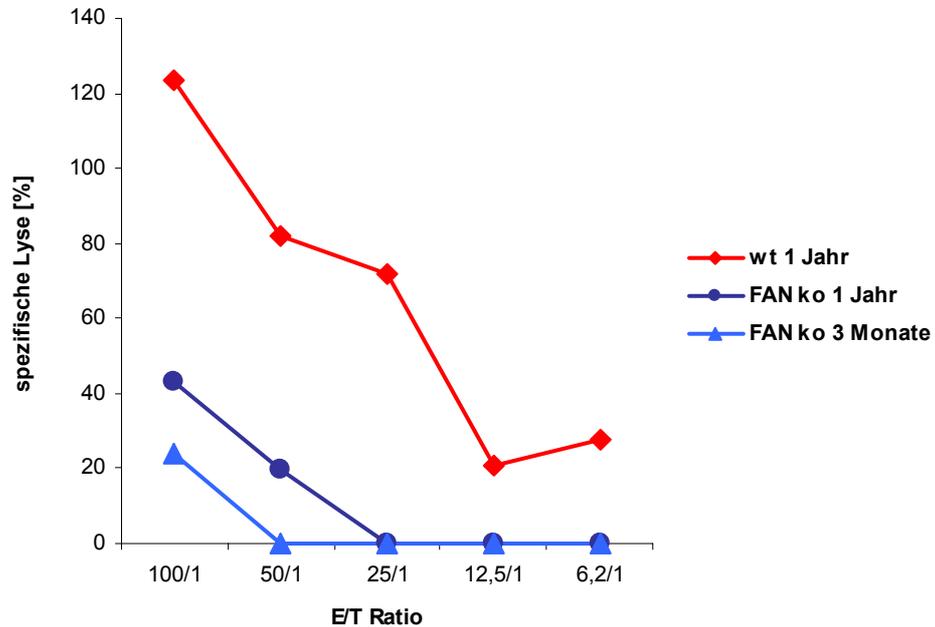
NK-Zellen wurden über Negativ Selektion (Miltenyi Biotec) aus einer Lymphozytensuspension gewonnen. Diese wurde aus Milzen von wt- und FAN-defizienten Mäusen hergestellt (2.2.3). Die frisch isolierten NK-Zellen wurden als Effektorzellen in einem Chromfreisetzung-Assay eingesetzt (2.2.4.1). Als Ziel wurde die murine Lymphom Zelllinie YAC-1 verwendet. Die Qualität der generierten NK-Zellen wurde überprüft, indem wt-NK-Zellen als Effektor und zwei verschiedene Ziel-Zelllinien - YAC-1 und K562 - eingesetzt wurden. YAC-1-Zellen werden spezifisch von murinen NK-Zellen lysiert, nicht dagegen K562-Zellen, die im humanen System angewandt werden und nicht als spezifische Zielzellen für murine NK-Zellen gelten. Die Spezifität der generierten murinen NK-Zellfraktion ist in Abbildung 3.29 A gezeigt. Die spezifische Lyse der YAC-1-Zellen beträgt über 120% bei einem Effektor/Target (E/T) Verhältnis von 100:1 und nimmt proportional mit einem geringeren E/T Verhältnis ab. Dagegen ist die lytische Aktivität bezogen auf K562-Zellen um die Hälfte geringer, knapp 60% bei E/T von 100:1 und fällt bei geringerem E/T Verhältnis steil auf fast 0 ab.

Zur Untersuchung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen in FAN-defizienten Mäusen wurden Tiere unterschiedlicher Alterstufen (drei Monate und ein Jahr) verwendet. In Abbildung 3.29 B ist eine deutliche verringerte lytische Aktivität der NK-Zellen aus FAN-defizienten Mäusen beider Alterstufen zu erkennen.

A



B



**Abbildung 3.29: Chromfreisetzung-Assay.** Als Effektorzellen wurden frisch isolierte murine NK-Zellen aus wt- und FAN-defizienten Mäusen verwendet. Als Zielzellen fungierten YAC-1- und K562-Zellen. **A:** Überprüfung der Qualität der NK-Zellen. In der Legende sind die jeweiligen Zielzellen angegeben. **B:** Als Effektorzellen wurden NK-Zellen aus Wildtypmäusen (1 Jahr) und FAN-defizienten Mäusen (1 Jahr bzw. 3 Monate) und als Zielzellen YAC-1 eingesetzt. E: Effektorzellen, T: Targetzellen

Diese Befunde zeigen deutlich, dass NK-Zellen aus FAN-defizienten Mäusen eine gestörte zytotoxische Aktivität besitzen. Die spezifische Lyse der NK-Zellen aus den drei Monate alten Mäusen ist um die Hälfte geringer als die NK-Zellen aus den ein Jahr alten Mäusen. Der molekulare Mechanismus dieser Störung ist unklar. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von FAN und Lyst liegt die Vermutung nahe, dass eine fehl geregelte Exozytose erfolgt.

## 4. Diskussion

Das Chediak-Higashi Syndrom (CHS) zeichnet sich unter anderem durch eine gestörte zytotoxische Aktivität von NK- und T-Zellen aus (Targan & Oseas, 1983, Baetz *et al.*, 1995). Der zelluläre Phänotyp des CHS ist durch eine abnormale Vergrößerung von Lysosomen, sekretorischen Lysosomen, Melanosomen und sekretorischen Granula charakterisiert (Huizing *et al.*, 2001, Pastural *et al.*, 1997). Molekular wird diese Immundefizienz auf einen Defekt im lysosomalen Vesikeltransport (insbesondere der Exozytose), bedingt durch die Mutation des WD-repeat Proteins CHS/Beige/Lyst, zurückgeführt (Perou *et al.*, 1996, Barbosa *et al.*, 1996). Das Lyst-Protein besitzt eine ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit mit dem WD-repeat Protein FAN, welches Teil des Signalweges des TNF-R55 ist (Adam-Klages *et al.*, 1996). Sowohl Lyst als auch FAN gehören zur Familie der BEACH-Domänen Proteine. Diese Proteine besitzen einen variablen N-terminalen Bereich und einen konservierten C-Terminus. Dieser beinhaltet das BEACH-Motiv, welches C-terminal von WD-repeats und N-terminal von einer PH-Domäne benachbart ist. Obwohl die strukturelle Ähnlichkeit von FAN und Lyst überlappende Funktionen nahe legt, waren für FAN-defiziente Mäuse weder generelle Defekte der NK-Zellen zu beobachten, noch phänotypische Auffälligkeiten wie Riesenlysosomen beschrieben.

Als spezifischer Interaktionspartner von FAN wurde das WD-repeat Protein RACK1 identifiziert (Tcherkasowa *et al.*, 2002), welches spezifisch die PKC  $\beta 2$  an die Zellmembran rekrutiert (Ron *et al.*, 1994, Mochly-Rosen & Gordon, 1998). Eine gestörte Membrantranslokation und Membran-assoziierte Aktivität der cPKCs wurde als ursächlich für die Bildung von Riesenlysosomen und die Defekte der NK-Zellen beschrieben (Ito *et al.*, 1988, Ito *et al.*, 1989, Sato *et al.*, 1990, Tanabe *et al.*, 1998, Tanabe *et al.*, 2000, Cui *et al.*, 2001).

Den meisten bis dato identifizierten BEACH-Proteinen wird eine Funktion im lysosomalen Vesikelverkehr zugeschrieben (Tab. 1.2), allerdings ist bislang kein molekularer Wirk-Mechanismus bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war daher, zu untersuchen, wie BEACH-Proteine, spezifisch die Proteine Lyst und FAN und das WD-repeat Protein RACK1, sowie Isotypen der PKC zum lysosomalen Vesikeltransport und zur Aktivierung von NK-Zellen beitragen.

## **4.1 Bedeutung der PKC $\beta$ 2 in der Bildung eines molekularen Komplexes aus Lyst/FAN und RACK1**

Die biochemischen Defekte des Chediak-Higashi Syndroms sind in mehreren Arbeiten anhand von Zellen aus CHS-Patienten bzw. beige Mäusen von der Arbeitsgruppe von Fuminori Tanabe untersucht worden. Beschrieben wurde eine gestörte Aktivierung der cPKC, insbesondere der PKC  $\beta$ 2 (Tanabe *et al.*, 1998). Die Membran-assoziierte PKC-Aktivität nahm nach kürzester Zeit dramatisch ab. Die Ursache der mangelnden PKC-Aktivierung wurde in einer schnelleren Proteolyse der PKC durch Calpain vermutet (Ito *et al.*, 1988, Ito *et al.*, 1989, Sato *et al.*, 1990). In Inhibitionsversuchen wurde Calpain und somit der PKC-Abbau blockiert. In diesen Studien wurde sowohl eine Wiederherstellung der Membran-assoziierten PKC-Aktivierung als auch eine Reduktion der Lysosomengröße auf die von Wildtypzellen gezeigt (Tanabe *et al.*, 2000, Cui *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Befunde postulierte diese Arbeitsgruppe, dass PKC eine entscheidende Rolle in der Bildung von Riesenlysosomen spielt.

Eine Erklärung der postulierten schnelleren Proteolyse der Membran-assoziierten aktiven PKC und somit der Bildung abnormaler großer Lysosomen könnte eine gestörte Interaktion der PKC, insbesondere der PKC  $\beta$ 2 (Tanabe *et al.*, 1998), und seinem Stützprotein RACK1, einem WD-repeat Protein, mit der Zellmembran sein. Da bei einer solchen Störung die PKC nicht in einer stabilen Konformation „geschützt“ vorliegt, kann sie schneller von Calpain gespalten werden. Interessanterweise wurde eine Interaktion von FAN und RACK1 über ihre jeweiligen WD-Motive nachgewiesen (Tcherkasowa *et al.*, 2002). Es ist vorstellbar, dass ein Komplex von FAN, RACK1 und PKC  $\beta$ 2 vorliegt, der ausgehend von der PMA- bzw. DAG-induzierten Aktivierung der PKC  $\beta$ 2 an die Membran transloziert und mit weiteren Zielmolekülen interagiert. Über die PH-Domäne, die sich N-terminal der BEACH-Domäne befindet, ist eine Verankerung von FAN in der Plasmamembran denkbar. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von FAN zu Lyst könnte analog ein Komplex aus Lyst, RACK1 und PKC  $\beta$ 2 vorliegen. Lyst könnte ebenfalls über seine PH-Domäne mit der Lipidmembran verankert sein und über seine C-terminalen WD-Motive mit RACK1 interagieren. Bei Defizienz von Lyst bzw. FAN wäre eine gestörte Komplexbildung aus Lyst/FAN mit RACK1 und PKC denkbar, die in einer instabilen und ungeschützten Konformation von Membran-assoziiierter PKC resultiert. Somit wäre

eine schnellere Proteolyse der PKC durch Calpain und damit die beschriebene dramatische Aktivitätsabnahme erklärbar.

#### **4.1.1 Intrazelluläre Lokalisation und Aktivierung der PKC-Isotypen**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in FAN-defizienten Fibroblasten weder eine gestörte Membrantranslokation der cPKCs noch eine Abnahme der Membran-assoziierten Aktivität der cPKCs vorliegt. Die Aktivierung der cPKCs in FAN-defizienten Fibroblasten entspricht der von Wildtypzellen, was den Schluss zulässt, dass die Defizienz für FAN keine Störung der PKC-Aktivierung nach sich zieht, wie sie für CHS beschrieben ist. In Kontrollexperimenten wurde die Aktivierung der cPKCs in Lyst-defizienten Fibroblasten untersucht. In Abweichung von den durch Fuminori Tanabe und Mitarbeitern publizierten Daten zeigten sich auch in Lyst-defizienten Zellen weder eine gestörte Membrantranslokation noch eine schnellere Aktivitätsabnahme der cPKCs. Diese Befunde der Lyst-defizienten Zellen entsprechen den Ergebnissen der Wildtypzellen.

Tanabe *et al.*, postulierten, dass die gestörte PKC-Aktivierung beim CHS spezifisch auf die Aktivität der PKC  $\beta 2$  zurückzuführen ist (Tanabe *et al.*, 1998). Dies wurde in dieser Arbeit überprüft, indem die PKC  $\beta 2$  selektiv angereichert und auf ihre Aktivität und Membrantranslokation untersucht wurde. Sowohl in FAN-, als auch in Lyst-defizienten Zellen wurde keine gestörte Aktivierung der PKC  $\beta 2$  bzw. keine gestörte Membrantranslokation beobachtet. Die erhaltenen Ergebnisse entsprachen wiederum denen der Wildtypzellen.

Die in dieser Arbeit erhobenen Aktivitätsdaten der cPKCs bzw. spezifisch der PKC  $\beta 2$  aus FAN- und Lyst-defizienten Fibroblasten und ihren dazu gehörigen Wildtypzellen stimmen miteinander überein und bestätigen nicht die publizierten Befunde der Arbeitsgruppe um Tanabe (Ito *et al.*, 1988, Ito *et al.*, 1989, Sato *et al.*, 1990, Tanabe *et al.*, 1998, Tanabe *et al.*, 2000, Cui *et al.*, 2001). Somit sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit gegen eine Funktion von PKC in der Bildung von Riesenlysosomen bzw. in Störungen des Vesikeltransports, die mit einer Interaktion von RACK1/Lyst bzw. FAN zusammenhängen könnte. Die Befunde der vorliegenden Arbeit decken sich mit Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Jerry Kaplan (Utah, USA), die Lyst ursprünglich isoliert hat. Diese Arbeitsgruppe konnte ebenfalls keine gestörte PKC-Aktivität in Lyst-

defizienten Fibroblasten nachweisen (persönliche Mitteilung). Es besteht die Möglichkeit, dass die beschriebenen biochemischen Defekte des CHS in anderen Zellen als den hier verwendeten murinen Fibroblasten auftreten. Die Arbeitsgruppe um Tanabe benutzten verschiedene murine und humane Zellsysteme, z. B. Leukozyten, Granulozyten und NK-Zellen. Allerdings ist dies eher unwahrscheinlich, da sie die gestörte PKC-Aktivierung ebenfalls in murinen und humanen Fibroblasten beschrieben. Des Weiteren besitzen die in dieser Arbeit verwendeten Lyst-defizienten Fibroblasten den charakteristischen Phänotyp des CHS, die Riesenlysosomen, somit müsste eine gestörte PKC-Aktivierung auch in diesen Zellen zu beobachten sein. Daher muss die Validität der von Tanabe *et al.* publizierten Daten hinterfragt werden.

#### **4.1.2 Bedeutung der PKC-Proteolyse bei der Bildung von Riesenlysosomen**

Tanabe *et al.* und Cui *et al.* sahen eine schnellere Proteolyse der Membran-assoziierten PKC durch Calpain als ursächlich für die dramatische Abnahme der Aktivität und die Bildung von Riesenlysosomen an (Tanabe *et al.*, 1998, Tanabe *et al.*, 2000, Cui *et al.*, 2001). Durch Inhibition von Calpain mit E64d in Lyst-defizienten Zellen konnten die Autoren einen Verlauf der PKC-Aktivität wiederherstellen, der dem von Wildtypzellen entsprach. Zusätzlich beobachteten die Autoren eine Verringerung der Lysosomengröße in den E64d-behandelten Lyst-defizienten Zellen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche in E64d-behandelten Lyst-defizienten Fibroblasten zeigten nach 15 Minuten PMA-Stimulation keinen Unterschied in der Membran-assoziierten Aktivität der PKC  $\beta 2$  bei unbehandelten und bei E64d vorinkubierten Zellen. In Immunfluoreszenzstudien wurde ebenfalls keine Abnahme der Lysosomengröße in E64d-behandelten Lyst-defizienten Zellen beobachtet. Diese Befunde entsprechen den vorigen Daten (4.1.1) und untermauern die Vermutung, dass die Funktion der PKC nicht essentiell für die Vergrößerung der Lysosomen in Lyst-defizienten Zellen ist. Dies spricht gegen eine Rolle der PKC bei der Regulation der Lysosomengröße. Allerdings wurde in Übereinstimmung mit Tanabe *et al.* eine Volumenzunahme der Lysosomen bei Wildtypzellen beobachtet, nachdem sie mit Chelerythrin, einem PKC-Inhibitor, behandelt wurden. Dabei ist zu beachten, dass Chelerythrin die PKC-Isotypen aller drei Gruppen der PKC-Familie inhibiert, was eine Vielzahl von Signalwegen beeinträchtigt. Zusätzlich wurde beschrieben, dass

Chelerythrin DNA-Fragmentierung (Freeman *et al.*, 1996) und Apoptose (Jarvis *et al.*, 1994, Yamamoto *et al.*, 2001) induziert. Die beobachteten vergrößerten Lysosomen in Wildtypzellen nach Chelerythrin-Behandlung könnten unspezifische Nebeneffekte sein. Dafür spricht, dass Tanabe *et al.* diese Studien nicht mit weiteren PKC-Inhibitoren überprüft haben (Tanabe *et al.*, 2000). Somit ist fraglich, ob cPKCs, insbesondere die PKC  $\beta 2$ , tatsächlich eine Rolle in der Regulation der Lysosomengröße spielten.

#### **4.1.3 Membranrekrutierung von RACK1 und PKC**

Wie weiter oben bereits ausgeführt, könnte eine fehlerhafte Komplexbildung von RACK1/PKC  $\beta 2$  und Lyst bzw. FAN verantwortlich für einen möglichen schnelleren Abbau Membran-assoziiierter PKC beim CHS sein.

In dieser Arbeit durchgeführte Koimmunpräzipitationen zeigten sowohl in Lyst- als auch in FAN-defizienten Fibroblasten eine PMA-induzierte Translokation von RACK1 und PKC  $\beta 2$  an die Zellmembran. Diese Rekrutierung der aktivierten PKC  $\beta 2$  mit seinem Stützprotein RACK1 entsprach der der Wildtypzellen.

Diese Daten sprechen dafür, dass eine Defizienz von FAN und Lyst demnach nicht essentiell für die Rekrutierung des Komplexes aus RACK1 und PKC an die Zellmembran ist.

#### **4.1.4 Bedeutung der PKC-Isotypen im TNF-R55 Signalweg**

Tcherkasowa *et al.* zeigten eine Kolo-kalisation von FAN, RACK1 und TNF-R55 (Tcherkaowa *et al.*, 2002). Die Frage ist, ob sich PKC-Isotypen, speziell die PKC  $\beta 2$ , aktivierungsabhängig in diesem Komplex nachweisen lassen. Wie von Adam-Klages *et al.* gezeigt, bindet FAN an die NSD-Domäne des TNF-R55 und induziert die Aktivierung der nSMase (Adam-Klages *et al.*, 1996). Diese hydrolysiert Sphingomyelin zu Phosphorylcholin und Ceramid (Goni & Alonso, 2002). Bei Defizienz von FAN wurde ein vollständiger Block der TNF-induzierten nSMase-Aktivität gemessen. Dagegen wurde in Lyst-defizienten Zellen ein erhöhter Umsatz von SMasen (neutrale und saure) und eine daraus resultierende erhöhte Konzentration von Ceramid gemessen (Tanabe *et al.*, 2000, Cui *et al.*, 2001). Ceramid verkörpert einen intrazellulären Lipid-Botenstoff, der in zahlreichen Signalwegen involviert ist, wie z. B. Zelldifferenzierung,

Zellwachstum, aber auch Apoptose (Hannun & Luberto, 2000, Kolesnick *et al.*, 2000). Tanabe *et al.* und Cui *et al.* postulierten, dass Ceramid für die schnellere Proteolyse der PKC in Lyst-defizienten Zellen verantwortlich ist (Tanabe *et al.*, 1998, Cui *et al.*, 2001). Nach den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit, die im Widerspruch zu den publizierten Daten von Tanabe *et al.* stehen, wurde auf eine Messung des Ceramidspiegels verzichtet. Die hier durchgeführten Analysen in mit TNF-behandelten Wildtypzellen ließen weder eine PKC-Membrantranslokation noch eine Membran-assoziierte Aktivitätszunahme erkennen. Identische Ergebnisse wurden in FAN- und Lyst-defizienten Zellen erhalten. Diese Daten stimmen mit anderen Untersuchungen überein, die ebenfalls beschreiben, dass in Fibroblasten keine TNF-induzierte Membrantranslokation der PKC erfolgt (Schütze *et al.*, 1990). Daher muss die Frage, ob PKC-Isotypen Teil des TNF-induzierten Komplexes aus TNF-R55, FAN und RACK1 sind, in anderen Zelltypen aus FAN-defizienten und Wildtypmäusen untersucht werden, in denen TNF eine Translokation von PKC an die Zellmembran auslöst, z. B. in lymphoiden Zellen (Schütze *et al.*, 1990).

Die bisherigen Daten verdeutlichen, dass sich die Membrantranslokation und Membran-assoziierte Aktivität der cPKCs sowohl in Lyst- als auch in FAN-defizienten Fibroblasten entsprechend der Wildtypzellen verhält. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Einklang mit publizierten Daten zur PKC-Aktivierung und Membrantranslokation nach PMA-Behandlung (Dekker & Parker, 1994, Jaken, 1996). Ebenfalls wurde die Interaktion von PKC  $\beta 2$  und RACK1 bestätigt, wie auch die gemeinsame Rekrutierung zur Membran (Ron *et al.*, 1994, Mochly-Rosen & Gordon, 1998). Auch wurde gezeigt, dass bei Behandlung Lyst-defizienter Zellen mit E64d keine unterschiedliche PKC-Aktivierung oder Verringerung der Lysosomengröße stattfindet. Die Vergrößerung der Lysosomen in Chelerythrin-behandelten Wildtypzellen könnte auf einen unspezifischen Effekt von Chelerythrin zurückgeführt werden.

Demnach sind die Lysosomenstörungen in Lyst-defizienten Zellen nicht an eine PKC-Aktivierung gekoppelt. Dies steht im Widerspruch zu den publizierten Daten um Tanabe *et al.*, aber im Einklang mit den Daten von Kaplan *et al.* (persönliche Mitteilung).

## 4.2 Bedeutung von FAN und Lyst im lysosomalen Vesikeltransport

Die strukturellen Ähnlichkeiten von FAN und Lyst legen ähnliche zellbiologische bzw. biochemische Funktionen der beiden Proteine nahe.

In dieser Arbeit durchgeführte Immunfluoreszenzstudien bestätigten den Phänotyp der Lyst-defizienten Zellen. Deutlich konnten vergrößerte Lysosomen beobachtet werden. In FAN-defizienten Fibroblasten ließen sich Tendenzen von zahlreicheren und leicht vergrößerten Lysosomen im Vergleich zu Lysosomen aus wt-Zellen erkennen. Diese Beobachtung könnte als möglicher Hinweis auf eine funktionelle Bedeutung von FAN für den Vesikeltransport gewertet werden, wenn die Größenzunahme der Lysosomen auch weit weniger ausgeprägt ist als in Lyst-defizienten Zellen. Eventuell besitzen die Lysosomen der Lyst- und FAN-defizienten Fibroblasten eine unterschiedliche lumenale bzw. integrale Proteinzusammensetzung, welche eine Exozytose nicht ermöglicht.

Die Untersuchung der postnukleären Überstände (PNS) mittels einer 2D-Gelelektrophorese aus Lyst- und FAN-defizienten und den dazu gehörigen Wildtypzellen zeigten eine übereinstimmende Proteinzusammensetzung. Postnukleäre Überstände beinhalten das Gesamtprotein aller zellulären Bestandteile mit Ausnahme des Kerns. Der lysosomale Proteingehalt innerhalb des PNS ist zu gering, um mögliche Unterschiede zu identifizieren. Dagegen wurden in lysosomal angereicherten Fraktionen aus Lyst-defizienten Zellen deutliche Unterschiede in der Proteinausstattung im Vergleich zu Wildtypzellen beobachtet. Um genauere Aussagen treffen zu können, welche Proteine betroffen sind, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Angereicherte lysosomale Fraktionen aus FAN-defizienten und ihren Wildtypzellen zeigten ein annähernd identisches Proteinmuster. Eine mögliche Rolle von FAN im lysosomalen Vesikelverkehr wird in 4.3 diskutiert.

Die in dieser Arbeit durchgeführten 2D-Analysen zeigen zum ersten Mal eine unterschiedliche Zusammensetzung lysosomaler Bestandteile in Lyst-defizienten und Wildtypzellen. In der Literatur wurde beschrieben, dass sich die Biogenese und Proteinzusammensetzung von Lysosomen aus Lyst-defizienten Zellen entsprechend der Wildtypzellen verhält (Stinchcombe *et al.*, 2000). Allerdings untersuchten die Autoren lediglich bestimmte lysosomale Markerenzyme wie Cathepsin D und LAMP 2 und verfolgten mittels markierter Meerrettich-Peroxidase den endozytotischen und sekretorischen Weg. Somit ist das in dieser Arbeit gezeigte unterschiedliche Proteinmuster von Lyst-defizienten und Wildtyp-Fibroblasten der erste Hinweis auf

eine unterschiedliche lysosomale Proteinausstattung, die eventuell die Exozytose beeinflusst.

Eine weiteres auffälliges Ergebnis der 2D-Analysen ist die Ansammlung von Proteinen bei pH 7 in den lysosomalen Fraktionen der Lyst-defizienten Zellen. Daraus ist zu schließen, dass der isoelektrische Punkt dieser Proteine oberhalb von PK 7 befindet. Dies ist ungewöhnlich, da lysosomale Proteine im Allgemeinen einen isoelektrischen Punkt von 4,5 bis 5 besitzen. Es ist möglich, dass in lyst-defizienten Zellen bei verändertem lumenalem pH die Enzyme und sonstige Komponenten der Lysosomen nicht vollständig prozessiert wurden und somit einen anderen isoelektrischen Punkt besitzen. Dies könnte das veränderte Proteinmuster in der 2D-Analyse erklären.

Ein möglicher erhöhter pH innerhalb der Lysosomen in Lyst-defizienten Zellen könnte auf eine gestörte Funktion der Protonenpumpe innerhalb der Lysosomenmembran zurückzuführen sein. Die Protonenpumpen von Lysosomen und Vakuolen gehören zu der Klasse der V-ATPasen (Anraku, 1996). Diese halten das saure Milieu innerhalb der Lysosomen aufrecht, indem sie Protonen unter ATP-Verbrauch in das lysosomale Lumen pumpen. Die V-ATPasen bestehen aus zwei funktionellen Hauptsektoren, dem peripheren  $V_1$  und Membran-integralen  $V_0$  Sektor. Der  $V_1$  Bereich besteht aus acht Untereinheiten, ragt in das Zytosol und ist verantwortlich für die ATP-Hydrolyse. Der  $V_0$  Abschnitt beinhaltet fünf Untereinheiten, liegt innerhalb der Membran und ist verantwortlich für die Protonentranslokation durch die Membran in das Lumen der Lysosomen (Cross & Müller, 2004, Stevens & Forgac, 1997). In Studien mit *Dictyostelium* wurde beschrieben, dass bei erhöhtem „lysosomalem“ pH ( $\text{pH} \geq 6,5$ ) die Fusion der Vakuole mit der Zellmembran (Exozytose) blockiert ist (Temesvari *et al.*, 1996). Zusätzlich beobachteten die Autoren beim Block der V-ATPase die Bildung vergrößerter Vakuolen. Die Autoren postulierten, dass ein erhöhter pH innerhalb der Vakuolen die Fusionsmaschinerie stört, indem NSF und Rab-Proteine nicht korrekt zu ihrem Zielkompartiment gelangen und somit die Bildung des SNARE-Komplexes verhindert wird. Zeuzem *et al.* zeigte, dass die Membranassoziation von GTPasen, wie Rab-Proteine oder ARFs, über den intravesikulären pH reguliert wird (Zeuzem *et al.*, 1992). Eine Regulation der Vesikelfusion über die V-ATPase wurde in neueren Studien in *Dictyostelium* bestätigt. Peters *et al.* wiesen eine Interaktion des  $V_0$  Sektors der V-ATPase mit einem v-SNARE nach (Peters *et al.*, 2001). Diese Interaktion wurde von Muller *et al.* bestätigt, zudem postulieren die Autoren, dass ebenfalls eine Regulation

der NSF-Proteine und SM-Proteine über die V-ATPase stattfindet (Muller *et al.*, 2002). NSF- und SM-Proteine sind essentiell für die korrekte Ausbildung des SNARE-Komplexes der letztlich in der Fusion bzw. in der Exozytose resultiert. In murinen Zellen wurden ebenfalls Hinweise einer Beteiligung der lysosomalen V-ATPase am Vesikelverkehr gefunden. Miura *et al.* zeigten eine Interaktion des  $V_0$  Abschnitts mit GEF-Proteinen (Miura *et al.*, 2001).

Das endolysosomale Transportsystem ist bis jetzt nicht gut verstanden, aber die V-ATPasen scheinen in dieser Maschinerie involviert zu sein (Sun-Wada *et al.*, 2003). Eventuell resultiert ein möglicher erhöhter pH in den Lysosomen der Lyst-defizienten Fibroblasten in einer falschen Rekrutierung von Lysosomen-spezifischen Proteinen innerhalb des biosynthetisch-sekretorischen Weges. Diese mögliche Fehl-Regulation und somit veränderte Proteinausstattung der Lysosomen würde die beobachteten Unterschiede der Proteinmuster in den 2D-Analysen erklären.

Die mögliche Beteiligung der V-ATPase an der Bildung von Riesenlysosomen und einer gestörten Exozytose in Lyst-defizienten Fibroblasten ist ein neuer Erklärungsansatz. Ursächlich für das CHS gilt das zytosolische Lyst-Protein (Perou *et al.*, 1996, Barbosa *et al.*, 1996). Eventuell besteht eine mögliche Verbindung des Lyst-Proteins mit der Funktion der V-ATPase und einem veränderten lysosomalen pH.

Wu *et al.* zeigten in Studien mit *Dictyostelium* erstmals, dass ein Mitglied der BEACH-Protein Familie, LvsA, mit der Membran der Vakuole assoziiert und verantwortlich für die Osmoregulation ist (Wu *et al.*, 2004). Bei Defizienz von LvsA erfolgt eine gestörte Osmoregulation und die Vakuolen schwellen an. Die Autoren zeigten über Struktur-Funktionsanalysen, dass der N-terminale Bereich des LvsA für die transiente Membranassoziation während der Expulsionsphase wichtig ist. Die kontraktile Vakuole der Protozoen ist mit den Lysosomen der „höheren“ Eukaryota gleichzusetzen und die Expulsionsphase entspricht der Exozytose, d. h. der Fusion der Lysosomen mit der Plasmamembran. Interessanterweise konnten die Autoren eine große Menge von LvsA bei leicht sauren Pufferbedingungen von pH 6,5 Membran-assoziiert aus der Gesamt-Membranfraktion sedimentieren, während sie bei pH 7,5 nur einen wesentlich geringeren Anteil von LvsA erhielten. Anscheinend ist der pH entscheidend für die Membranassoziation und Wirkungsweise von LvsA.

Wu *et al.* beschrieben die N-terminale Region von LvsA als diejenige, die mit der Membran assoziiert vorliegt (Wu *et al.*, 2004). Der N-terminale Bereich von BEACH-

Proteinen ist im Gegensatz zu dem hoch konservierten C-Terminus sehr variabel und nimmt ca. 75% der jeweiligen Proteine in Anspruch. FAN dagegen besitzt einen wesentlich kleineren N-terminalen Bereich. Eventuell fehlen dem BEACH-Protein FAN spezifische Motive, die eine ähnliche Funktion wie Lyst haben. Lyst besitzt N-terminal mehrere HEAT/ARM-Motive und eine Perilipin-Domäne, allen wird eine Funktion in Membranassoziation und Vesikelverkehr nachgesagt (Pfeifer *et al.*, 1994, Andrade *et al.*, 2001, Andrade *et al.*, 1995). Diese Protein-Motive fehlen FAN und somit ist eine mögliche N-terminale Membranassoziation von FAN fraglich.

Die Vermutung liegt nahe, dass analog zu *LvsA* aus *Dictyostelium* auch Lyst N-terminal Membran-assoziiert an Lysosomen vorliegt und über einen unbekanntem Mechanismus deren Exozytose reguliert. Zugleich könnte Lyst eine Interaktion mit der V-ATPase eingehen und über einen unbekanntem Mechanismus eine Rolle in der Funktionsweise dieser Protonenpumpe spielen, damit ein saurer pH aufrecht erhalten wird, der für die Fusion von Bedeutung erscheint. Dabei ist eine direkte aber auch indirekte Interaktion von Lyst mit der V-ATPase über Proteine die in der Bildung des SNARE-Komplexes beteiligt sind (Tchernev *et al.*, 2002) denkbar.

### **4.3 Untersuchungen zur Exozytose im NK-Zellen System**

FAN-defiziente Lysosomen scheinen keine offensichtliche veränderte Protein-ausstattung zu besitzen und ebenfalls wurde in 2D-Analysen keine Proteinansammlung bei pH 7 beobachtet. In Immunfluoreszenzstudien im Rahmen dieser Arbeit wurden allerdings Unterschiede in der Lysosomengröße in FAN-defizienten Zellen beobachtet. Die Lysosomen erscheinen zahlreicher und vergrößert, allerdings ist die Größe nicht so stark ausgeprägt, wie in Lyst-defizienten Zellen. Eine vor kurzem veröffentlichte Studie gibt wiederum Hinweise auf eine gemeinsame Funktion von FAN und Lyst. In murinen Lyst-defizienten Zellen wurde eine gestörte Barrierereparatur aufgrund einer mangelnden Exozytose beschrieben (Huynh *et al.*, 2004). Eine mangelnde Barrierereparatur wurde ebenfalls bei FAN-defizienten Mäusen festgestellt (Kreder *et al.*, 1999, Kreder, Dissertation, 1998). Der molekulare Mechanismus dieser Störung ist nicht klar. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von FAN und Lyst wird ebenfalls eine gestörte Exozytose als ursächlich vermutet. Um dieser Hypothese nach zu gehen, wurden NK-Zellen als Modellsystem zur Untersuchung einer defekten Exozytose

verwendet. Im CHS wurde beschrieben, dass die NK-Zellen eine gestörte zytotoxische Aktivität besitzen, da die sekretorischen Lysosomen nicht in der Lage sind, mit der Plasmamembran zu fusionieren und daher keine lytischen Proteine ausschütten. Überraschenderweise zeigten NK-Zellen aus FAN-defizienten Mäusen unterschiedlicher Altersstufen (drei Monate und ein Jahr) ebenfalls eine stark eingeschränkte zytotoxische Aktivität. Zum ersten Mal wurden somit Hinweise auf eine ähnliche Funktion der BEACH-Proteine FAN und Lyst gefunden. Es scheint, dass der Effekt bei FAN-Defizienz keine essentiellen Auswirkungen auf die Vitalität der Mäuse hat. Dagegen zeigen Lyst-defiziente Mäuse aufgrund ihrer Immundefizienz schwerwiegende klinische Symptome. Neben den NK-Zellen sind auch die T-Zellen Lyst-defizienter Mäuse in ihrer zytotoxischen Aktivität gestört. In dieser Arbeit wurden zytotoxische T-Zellen aus FAN-defizienten Mäusen nicht untersucht. Es wäre denkbar, dass diese die gestörte Aktivität der NK-Zellen kompensieren und somit eine „ausreichende“ Immunabwehr FAN-defizienter Mäuse erfolgt. In Lyst-defizienten Mäusen sind zudem auch Melanosomen von einer gestörten Exozytose betroffen, d. h. sie sind nicht in der Lage Melanin zu entlassen (Swank *et al.*, 1998). Dieser Defekt resultiert in einer abnormalen grauen Fellfarbe und tritt bei FAN-defizienten Mäusen nicht auf.

Neuere Studien zeigten, dass „konventionelle“ Lysosomen über eine regulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Exozytose in der Reparatur von Plasmamembran-Läsionen beteiligt sind (Reddy *et al.*, 2001, Chakrabarti *et al.*, 2003). Dies spricht dafür, dass eine gestörte Exozytose ursächlich für die mangelnde Membranreparatur bei FAN-defizienten Mäusen (Kreder *et al.*, 1999) analog zu Lyst-defizienten (Huynh *et al.*, 2004) ist. Daraus ist zu vermuten, dass der gestörten zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen aus FAN-defizienten Mäusen ein ähnlicher molekularer Mechanismus wie in Lyst-defizienten Zellen zu Grunde liegt.

Als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor der regulierten Exozytose wurden auch in nicht-sekretorischen Zellen Synaptotagmine identifiziert (Martinez *et al.*, 2000, Chakrabarti *et al.*, 2003, Rao *et al.*, 2004). Synaptotagmine sind Transmembranproteine von Vesikeln, die über ihre  $\text{C}_2$ -Domänen  $\text{Ca}^{2+}$  binden (Ybe *et al.*, 2000). Daraus resultiert eine Bindung von SNARE-Proteinen (Rothman, 1994) und fördert bzw. erleichtert die Bildung des SNARE-Komplexes (Davis *et al.*, 1999, Gerona *et al.*, 2000). Das bedeutet, dass sowohl die Exozytose der sekretorischen Lysosomen, z. B. in NK-Zellen, als auch in Fibroblasten

unter anderem abhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist. In früheren Studien mit *Dictyostelium* wurde demonstriert, dass die V-ATPase direkt oder indirekt die zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reguliert (Temesvari *et al.*, 1996). Somit könnte eine mögliche gestörte Funktion der V-ATPase in Lyst- bzw. FAN-defizienten Fibroblasten einen Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration besitzen. Diese wiederum ist notwendig für eine korrekt regulierte Exozytose.

Eine mögliche Funktion von Lyst könnte aufgrund des N-Terminus und der enormen Größe (ca. 400 kDa) die eines „Tethering Faktors“ sein. Diese sind große Proteine mit einem Molekulargewicht von 300 bis 1000 kDa (Whyte & Munro, 2002). Sie repräsentieren die ersten „Kontrolleure“ einer Fusion und stellen einen physikalischen Kontakt zwischen Donor- und Zielmembran her (Guo *et al.*, 2000, Waters & Hughson, 2000). Dabei sind die tethering Faktoren mit der Membran verankert und suchen mit dem restlichen zytoplasmatischen Bereich das Zytosol nach geeigneten Fusionspartnern ab. Bis jetzt sind relativ wenige Moleküle als tethering Faktoren identifiziert worden. Alle besitzen eine enorme Größe, ihre Aminosäuresequenz ist sehr variabel und beinhaltet keine gemeinsamen funktionelle Protein-Motive. Diese Variabilität deutet auf verschiedene Mechanismen des Tetherings hin. Lyst könnte mit seinen N-terminalen HEAT/ARM-Motiven und/oder der Perilipin-Domäne an Membranen verankert sein und der C-terminale Bereich die Funktion des Durchsuchens des Zytosols nach geeigneten Fusionspartnern ausführen. Es ist denkbar, dass Lyst einen Komplex bzw. Interaktion mit Proteinen des SNARE-Komplexes (Tchernev *et al.*, 2002) und dem  $V_0$  Sektor der V-ATPase eingeht, dieser ist verantwortlich für die Protonentranslokation und somit der Aufrechterhaltung des sauren lysosomalen Milieus. In *Saccharomyces* wurden so genannte Vtc-Proteine (vacuolar transporter chaperons) beschrieben, die eine Bindung mit vakuolären SNAREs und dem  $V_0$  Sektor der V-ATPase eingehen (Peters *et al.*, 2001, Muller *et al.*, 2002). Allerdings sind keine Sequenzähnlichkeiten der Vtc-proteine und Lyst bekannt.

#### 4.4 Expressionsanalysen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das BEACH-Protein FAN ebenfalls eine Rolle in exozytotischen Ereignissen spielt. Trotz der gestörten zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen aus FAN-defizienten Mäusen und der beschriebenen mangelnden Barriere-reparatur der Haut in FAN-defizienten Mäusen (Kreder *et al.*, 1999) sind keine schwerwiegenden klinischen Symptome der FAN-defizienten Mäuse bekannt.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass FAN gewebsspezifisch und zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung benötigt wird. Die in dieser Arbeit durchgeführten mRNA-Expressionsanalysen in verschiedenen Geweben aus Mäusen unterschiedlicher Alterstufen zeigten, dass FAN tatsächlich differenziert exprimiert wird. In Lungengewebe wurde eine 22-fache mRNA-Expression von fan in der neun Monate alten Wildtyp- und sogar eine 42-fache in der vier Monate alten Lyst-defizienten Maus im Vergleich zu der drei Monate alten Wildtypmaus ermittelt. Es stellt sich die Frage, was das Lungengewebe im Gegensatz zu den anderen Geweben auszeichnet und weshalb FAN dort in größerem Maßstab benötigt werden könnte. Die Lungen-Alveoli sind terminale Sack-ähnliche Ausstülpungen der respiratorischen Äste der Bronchiolen, die für den Gasaustausch verantwortlich sind. Die Oberfläche der Alveoli ist mit einem Phospholipid-Film (Lungen-Surfactant) ausgekleidet. Dieser wird von Epithelzellen synthetisiert und in spezialisierten sekretorischen Granula, den Lamellarkörpern, gespeichert (Chander & Fisher, 1990). Die Lamellarkörper gehören zu den sekretorischen Lysosomen, sie besitzen V-ATPasen und einen pH um 5,5. Der saure pH ist notwendig für das Verpacken der Surfactant-Phospholipide, deren Prozessierung und letztlich für die Ansammlung dieser Lipide an der Membran über Exozytose (Wadsworth & Chander, 2000). Bei einer fibrillären Lungenkrankheit wurden abnormal vergrößerte Lamellarkörper beobachtet, diese waren nicht mehr in der Lage, das notwendige Lungen-Surfactant über Exozytose zu bilden (Nakatani *et al.*, 2000). Im CHS wurden ebenfalls vergrößerte Lamellarkörper entdeckt (Sun-Wada *et al.*, 2003). Während der Anfertigung dieser Arbeit wurden von einer anderen Arbeitsgruppe in Lyst-defizienten Mäusen ebenfalls vergrößerte Lamellarkörper entdeckt. Diese zeigen eine gestörte Exozytose, d. h. es kann kein Lungen-Surfactant mehr gebildet werden. Dies führt in einen Zusammenbruch der Alveolen (Tang *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde allerdings keine erhöhte mRNA-Expression von Lyst im Lungengewebe von Wildtypmäusen im Vergleich zu anderen Geweben gemessen. Im Lungengewebe

aus Lyst-defizienten Mäusen wurde jedoch eine fast doppelt so hohe mRNA-Expression von fan gemessen als in Wildtypmäusen. Eventuell wird fan benötigt, um die Defizienz von lyst zu kompensieren.

## 5. Ausblick

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten der beiden BEACH-Proteine Lyst und FAN wurden mögliche überschneidende biochemische bzw. zellbiologische Funktionen dieser Proteine vermutet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass weder FAN noch Lyst essentiell ist für eine - in der Literatur beschriebene – gestörte Membrantranslokation und Membran-assoziierte Aktivität der cPKCs, die als ursächlich für die Bildung von Riesenlysosomen und die Defekte der NK-Zellen angesehen wurden. Dagegen wurden Hinweise gefunden, dass FAN analog zu Lyst eine Funktion im lysosomalen Vesikelverkehr haben könnte. In FAN-defizienten Fibroblasten wurden zahlreichere und leicht vergrößerte Lysosomen im Vergleich zu Wildtyp-Fibroblasten beobachtet. Zudem wurde eine gestörte zytotoxische Aktivität der NK-Zellen aus FAN-defizienten Mäusen demonstriert. Daher soll in zukünftigen Experimenten untersucht werden, ob die Defizienz von FAN in einer möglichen gestörten Exozytose analog zu Lyst-defizienten Zellen resultiert. Durch Verwendung von GFP-Konstrukten lysosomaler Markerproteine, wie z. B. LAMP 1, Perforin oder Granzym, soll die Fusion von Lysosomen mit der Zellmembran und die Ausschüttung von Perforin bzw. Granzym in Immunfluoreszenzstudien beobachtet werden. Die Exozytose soll durch einen externen Stimulus, wie  $Ca^{2+}$ , induziert werden.

Lysosomen aus Lyst-defizienten Fibroblasten zeigten den typischen zellulären Phänotyp des Chediak-Higashi Syndroms, die Riesenlysosomen. Zum ersten Mal wurden auch in 2D-Analysen Unterschiede in der Proteinausstattung der lysosomalen Fraktionen von Wildtyp- und Lyst-defizienten Zellen identifiziert. Um eine Aussage über die betroffenen Proteine treffen zu können, sollen massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt werden. Zusätzlich soll eine optimierte Anreicherung der Lysosomen die Identifizierung von weniger prominenten lysosomalen Proteinen ermöglichen, z. B. im Vergleich von Wildtyp- und FAN-defizienten Zellen. Weiterhin sollen Studien zur Reifung der Lysosomen mit GFP-Konstrukten lysosomaler Markerproteine, z. B. LAMP 1 oder aus der 2D-Analyse aufgeklärten Proteinen, durchgeführt werden. Parallel soll der pH der jeweiligen zellulären Kompartimente bestimmt werden, um zu klären, ob die beobachtete Ansammlung von bei pH 7 migrierenden Proteinen in der 2D-Analyse von Lyst-defizienten Zellen auf einen veränderten lysosomalen pH zurückzuführen ist.

Um Hinweise auf die beteiligten Protein-Motive sowohl von Lyst als auch von FAN in einer möglichen gestörten Exozytose zu erhalten, sollen Lyst- bzw. FAN-defiziente Fibroblasten mit Deletionsmutanten dieser Proteine transfiziert werden und die Exozytose wie oben beschrieben in Immunfluoreszenzstudien verfolgt werden.

Weitere Einblicke in die Funktion der Protein-Domänen von Lyst und FAN sollen Hefe Two Hybrid Studien ergeben, in denen mögliche Interaktionspartner dieser Protein-Motive identifiziert werden sollen.

Die mRNA-Expressionsanalysen lassen auf eine differentielle Genexpression von FAN im Lungengewebe schließen. Um einen möglichen Defekt innerhalb der Lungengewebe zu analysieren, sollen Gewebeschnitte angefertigt und diese auf ihre Morphologie mikroskopisch untersucht werden.

## Zusammenfassung/Summary

Das Chediak-Higashi Syndrom resultiert aus einem seltenen autosomal-rezessiven Gendefekt, welcher Spezies-übergreifend auftritt. Molekular wird die im CHS beobachtete Immundefizienz auf einen Defekt im lysosomalen Vesikeltransport (insbesondere der Exozytose), bedingt durch die Mutation des WD-repeat Proteins CHS/Beige/Lyst, zurückgeführt. Das Lyst-Protein besitzt eine ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit mit dem WD-repeat Protein FAN, welches Teil des Signalweges des TNF-R55 ist. Sowohl Lyst als auch FAN gehören zur Familie der BEACH-Domänen Proteine. Obwohl die strukturelle Ähnlichkeit von FAN und Lyst überlappende Funktionen nahe legt, sind für FAN-defiziente Mäuse bisher weder generelle Defekte der NK-Zellen, noch phänotypische Auffälligkeiten wie Riesenlysosomen beschrieben. Als spezifischer Interaktionspartner von FAN war das WD-repeat Protein RACK1 identifiziert worden, welches aktivierte konventionelle PKCs (cPKC), spezifisch die PKC  $\beta$ 2, an die Zellmembran rekrutiert. Eine gestörte Membrantranslokation und Membran-assoziierte Aktivität der cPKCs war als ursächlich für die Bildung von Riesenlysosomen und die Defekte der NK-Zellen beschrieben worden.

Das Ziel dieser Arbeit war daher, die molekularen Mechanismen zu untersuchen, über die BEACH-Proteine, spezifisch die Proteine Lyst und FAN und das WD-repeat Protein RACK1, sowie Isotypen der PKC zum lysosomalen Vesikeltransport und zur Aktivierung von NK-Zellen beitragen.

Als Zellmodell wurden murine Fibroblasten verwendet (Lyst-, FAN-defiziente und entsprechende Wildtypzellen). Der publizierte biochemische Defekt des CHS, die gestörte PKC-Aktivierung, konnte weder in FAN-defizienten noch in Lyst-defizienten Fibroblasten bestätigt werden, was im Einklang mit Befunden einer kollaborierenden Arbeitsgruppe steht. In Immunfluoreszenzstudien wurden Hinweise auf vergrößerte Lysosomen in FAN-defizienten Zellen gefunden. Allerdings war die Größenzunahme nicht so stark ausgeprägt wie bei den Lyst-defizienten Zellen. NK-Zellen aus FAN-defizienten Mäusen zeigten in einem Chromfreisetzung-Versuch eine gestörte zytotoxische Aktivität. Über 2D-Gelelektrophorese wurden lysosomal angereicherte Fraktionen der jeweiligen Zelllinien analysiert. Das Proteinmuster aus FAN-defizienten Fibroblasten entsprach – soweit detektierbar – dem der Wildtypzellen. Die Proteinausstattung lysosomaler Fraktionen aus Lyst-defizienten Zellen zeigte dagegen

deutliche Unterschiede zu den entsprechenden Wildtypzellen. Zudem wurde eine bei pH 7 migrierende Ansammlung von Proteinen in den lysosomalen Fraktionen der Lyst-defizienten Zellen gesehen. Daraus ist zu schließen, dass sich ihr isoelektrischer Punkt oberhalb von pH 7 befindet. Dies ist ungewöhnlich, da Lysosomen einen pH von 4,5 bis 5 besitzen. In der Literatur ist beschrieben, dass ein saurer pH in den Lysosomen essentiell für Fusions-Ereignisse ist, unter anderem für Proteine, die in der SNARE-Komplex Bildung involviert sind. Es gibt Hinweise in der Literatur, dass vor allem die N-terminale Region in BEACH-Proteinen an Membranen der Vakuolen/Lysosomen assoziiert und zu der Bildung des SNARE-Komplexes beiträgt. Der N-terminale Bereich in Lyst nimmt 75% des gesamten Proteins ein und besitzt Protein-Motive, die Membranassoziationen ermöglichen. Dagegen fehlen FAN diese Motive und der N-terminale Bereich ist wesentlich kürzer. In zukünftigen Untersuchungen soll geklärt werden, in wie weit die gestörte NK-Zellen Aktivität aus FAN-defizienten Mäusen und die Beobachtung vergrößerter Lysosomen auf einen ähnlichen molekularen Mechanismus (gestörte Exozytose) analog zu Lyst zurückzuführen ist.

## Summary

A rare autosomal gene defect is responsible for Chediak-Higashi syndrome (CHS), a disease that has been described in a variety of different species. The immunodeficiency observed in CHS derives molecularly from a defect in the lysosomal vesicle transport, i.e. exocytosis, due to a mutation in the WD-repeat protein CHS/Beige/Lyst. This protein shows striking structural similarities to the WD-repeat protein FAN, a protein involved in the TNF-R55 signaling pathway. Both FAN and Lyst belong to the family of BEACH domain proteins. Although the structural similarities of FAN and Lyst support the notion of overlapping functions, general defects in NK-cells or giant lysosomes have not been described in FAN-deficient mice.

RACK1, a WD-repeat protein, was shown to be a specific partner for interaction with FAN. RACK1 recruits activated cPKCs, specifically PKC  $\beta$ 2, to the cell membrane. The formation of giant lysosomes and the defects in NK-cells were proposed to be derived from a malfunction in membrane translocation and membrane associated activity of cPKCs.

The aim of this thesis was to analyse the molecular mechanisms of lysosomal vesicle transport and the activation of NK-cells with particular emphasis on the BEACH proteins Lyst and FAN and the WD-repeat protein RACK1 as well as the PKC isotypes. Murine fibroblasts (Lyst- and FAN-deficient cells and the respective wild type forms) served as a cell model. Malfunction in PKC activation was proposed as a biochemical defect in CHS in various publications. This was not confirmed by either using FAN-deficient or Lyst deficient cells, but the results shown in this thesis are consistent with data from the group of J. Kaplan (Utah, USA).

Immunofluorescence studies revealed evidence of enlarged lysosomes in FAN deficient cells, but the increase in size was not as striking as in Lyst-deficient cells. Chrome-release assays from NK-cells of FAN-deficient mice demonstrated a defective cytotoxic activity of the cells. Lysosomal fractions of the respective cell lines were further analysed by 2D gel electrophoresis. The proteins from FAN-deficient fibroblasts and wildtype cells showed corresponding patterns. On the other hand, distinct differences were found between lysosomal fractions from Lyst-deficient and wildtype cells. Furthermore, in the lysosomal fractions of Lyst-deficient cells, an aggregation of proteins was observed migrating at pH 7, leading to the conclusion that the isoelectric point of these proteins is at or above pH 7. This is unusual, since lysosomes typically have a pH of 4.5 to 5. As described in the literature, an acidic pH in lysosomes is essential for fusion events and specifically for proteins involved in formation of SNARE complexes. Evidence from the literature points to an association of the 5'-end of BEACH proteins with membranes of vacuoles and lysosomes, this association being involved in the formation of SNARE complexes. The 5'-end of Lyst consists of 75% of the whole protein and contains protein motifs enabling association with the membrane. FAN, on the other hand, lacks these motifs and contains a significantly shorter 5'-end. Further investigations will address the possibility of a comparable molecular mechanism (i.e. defective exocytosis) underlying the malfunction of NK-cell activity and the enlarged lysosomes of FAN-deficient mice in analogy to Lyst.

## Literatur

- Adam-Klages S, Adam D, Wiegmann K, Struve S, Kolanus W, Schneider-Mergener J, Kronke M. (1996). FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell*. 86:937-947.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Andrade MA, Bork P. (1995). HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nature Genet.* 11:115-116.
- Andrade MA, Petosa C, O'Donoghue SI, Muller CW, Bork P. (2001). Comparison of ARM and HEAT protein repeats. *J. Mol. Biol.* 309:1-18.
- Anraku Y, Hirata R, Wada Y, Ohya Y. (1992). Molecular genetics of the yeast vacuolar H(+)-ATPase. *J. Exp. Biol.* 172:67-81.
- Antonin W, Fasshauer D, Becker S, Jahn R, Schneider TR. (2002). Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nat. Struct. Biol.* 9:107-111.
- Aridor M, Hannan LA. (2002). Traffic jams II: an update of diseases of intracellular transport. *Traffic*. 3:781-790.
- Baetz K, Isaaz S, Griffiths GM. (1995). Loss of cytotoxic T lymphocyte function in Chediak-Higashi syndrome arises from a secretory defect that prevents lytic granule exocytosis. *J. Immunol.* 154:6122-6131.
- Barclay JW, Craig TJ, Fisher RJ, Ciufo LF, Evans GJ, Morgan A, Burgoyne RD. (2003). Phosphorylation of Munc18 by protein kinase C regulates the kinetics of exocytosis. *J. Biol. Chem.* 278:10538-10545.
- Barbosa MD, Nguyen QA, Tchernev VT, Ashley JA, Detter JC, Blaydes SM, Brandt SJ, Chotai D, Hodgman C, Solari RC, Lovett M, Kingsmore SF. (1996). Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes. *Nature*. 382:262-265.

- Barbosa MD, Barrat FJ, Tchernev VT, Nguyen QA, Mishra VS, Colman SD, Pastural E, Dufourcq-Lagelouse R, Fischer A, Holcombe RF, Wallace MR, Brandt SJ, de Saint Basile G, Kingsmore SF. (1997). Identification of mutations in two major mRNA isoforms of the Chediak-Higashi syndrome gene in human and mouse. *Hum. Mol. Genet.* 6:1091-1098.
- Barlowe, C. (1998). COP II and selective export from the endoplasmatic reticulum. *Biochem. Biophys. Acta.* 1404:67-76.
- Barrat FJ, Le Deist F, Benkerrou M, Bouso P, Feldmann J, Fischer A, de Saint Basile G. (1999). Defective CTLA-4 cycling pathway in Chediak-Higashi syndrome: a possible mechanism for deregulation of T lymphocyte activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:8645-8650.
- Belden WJ, Barlowe C. (2001). Role of Erv29p in collecting soluble secretory proteins into ER-derived transport vesicles. *Science.* 294:1528-1531.
- Bock JB, Matern HT, Peden AA, Scheller RH. (2001). A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature.* 404:839-841.
- Bonifacino JS, Glick BS. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell.* 116:153-166.
- Bracher A, Weissenhorn W. (2002 ). Structural basis for the Golgi membrane recruitment of Sly1p by Sed5p. *EMBO J.* 21:6114-6124.
- Burgoyne RD, Morgan A. (1998). Calcium sensors in regulated exocytosis. *Cell. Calcium.* 24:367-376.
- Burgoyne RD, Fisher RJ, Graham ME. (2001). Regulation of kiss-and-run exocytosis. *Trends Cell. Biol.* 11:404-405.
- Ceci M, Gaviraghi C, Gorrini C, Sala LA, Offenhauser N, Marchisio PC, Biffo S. (2003). Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature.* 426:579-584.
- Chakrabarti S, Kobayashi KS, Flavell RA, Marks CB, Miyake K, Liston DR, Fowler KT, Gorelick FS, Andrews NW. (2003). *J. Cell. Biol.* 162:543-549.
- Chander A, Fisher AB. (1990). Regulation of lung surfactant secretion. *Am. J. Physiol.* 258:L241-L253.

- Chomczynski P, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Clark RH, Stinchcombe JC, Day A, Blott E, Booth S, Bossi G, Hamblin T, Davies EG, Griffiths GM. (2003). Adaptor protein 3-dependent microtubule-mediated movement of lytic granules to the immunological synapse. *Nat. Immunol.* 4:1111-1120.
- Cross RL, Muller V. (2004). The evolution of A-, F-, and V-type ATP synthases and ATPases: reversals in function and changes in the H<sup>+</sup>/ATP coupling ratio. *FEBS Lett.* 576:1-4.
- Csukai M, Chen CH, De Matteis MA, Mochly-Rosen D. (1997). The coatomer protein beta'-COP, a selective binding protein (RACK) for protein kinase Cepsilon. *J. Biol. Chem.* 272:29200-29206.
- Cui SH, Tanabe F, Terunuma H, Iwatani Y, Nuno H, Agematsu K, Komiyama A, Nomura A, Hara T, Onodera T, Iwata T, Ito M. (2001). A thiol proteinase inhibitor, E-64-d, corrects the abnormalities in concanavalin A cap formation and the lysosomal enzyme activity in leucocytes from patients with Chediak-Higashi syndrome by reversing the down-regulated protein kinase C activity. *Clin. Exp. Immunol.* 125:283-290.
- Dacks JB, Doolittle WF (2004). Molecular and phylogenetic characterization of syntaxin gens from parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* 136:123-136.
- Davis AF, Bai J, Fasshauer D, Wolowick MJ, Lewis JL, Chapman ER.(1999). Kinetics of synaptotagmin response to Ca<sup>2+</sup> and assembly with the core SNARE complex onto membranes. *Neuron* 24:363-376.
- Deacon SW, Serpinskaya AS, Vaughan PS, Lopez Fanarraga M, Vernos I, Vaughan KT, Gelfand VI. (2003). Dynactin is required for bidirectional organelle transport. *J. Cell. Biol.* 160:297-301.
- Dekker LV, Parker PJ. (1994). Protein kinase C--a question of specificity. Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem. Sci.* 19:73-77.
- Dell'Angelica EC, Shotelersuk V, Aguilar RC, Gahl WA, Bonifacino JS. (1999). Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol. Cell.* 3:11-21.

- Dell'Angelica EC, Aguilar RC, Wolins N, Hazelwood S, Gahl WA, Bonifacino JS. (2000 ). Molecular characterization of the protein encoded by the Hermansky-Pudlak syndrome type 1 gene. *J. Biol. Chem.* 275:1300-1306.
- De Lozanne A. (2003 ). The role of BEACH proteins in Dictyostelium. *Traffic.* 4:6-12.
- Detter JC, Zhang Q, Mules EH, Novak EK, Mishra VS, Li W, McMurtrie EB, Tchernev VT, Wallace MR, Seabra MC, Swank RT, Kingsmore SF. (2000 ). Rab geranylgeranyl transferase alpha mutation in the gunmetal mouse reduces Rab prenylation and platelet synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:4144-4149.
- Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J. (2000). Sorting and signaling at the Golgi complex. *Cell.* 101:693-696.
- Dulubova I, Yamaguchi T, Arac D, Li H, Huryeva I, Min SW, Rizo J, Sudhof TC. (2003). Convergence and divergence in the mechanism of SNARE binding by Sec1/Munc18-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:32-37.
- Eckerskorn G, Strupat K, Schleuder D, Hochstrasser D, Sanchez JC, Lottspeich F, Hillenkamp F. (1997). Analysis o proteins by direct-scanning infrared-MALDI Mass spectrometry after 2D-PAGE separation and electroblotting. *Anal. Chem.* 69:2888-2892.
- Evans GJO, Wilkinson MC, Graham ME, Turner KM, Chamberlain LH, Burgoyne RD, Morgan A. (2001). *J. Biol. Chem.* 276:47877-47885.
- Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:15781-15786.
- Freemerman AJ, Turner AJ, Birrer MJ, Szabo E, Valerie K, Grant S. (1996). Role of c-jun in human myeloid leukemia cell apoptosis induced by pharmacological inhibitors of protein kinase C. *Mol. Pharmacol.* 49:788-7895.
- Fujimoto T, Kogo H, Nomura R, Une T. (2000). Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *J. Cell. Sci.* 19:3509-3517.
- Gassen HG, Sachse GE, Schulte A. (1994). PCR: Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion. *Gustav Fischer Verlag.*
- Gebauer D, Li J, Jogl G, Shen Y, Myszka DG, Tong L. (2004). Crystal structure of the PH-BEACH domains of human LRBA/BGL. *Biochemistry.* 43:14873-14880.

- Gerald NJ, Siano M, De Lozanne A. (2002). The Dictyostelium LvsA protein is localized on the contractile vacuole and is required for osmoregulation. *Traffic*. 3:50-60.
- Gerona RR, Larsen EC, Kowalchuk JA, Martin TF. (2000). The C terminus of SNAP25 is essential for Ca(2+)-dependent binding of synaptotagmin to SNARE complexes. *J. Biol. Chem.* 275:6328-6336.
- Geuze HJ. (1998). The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol. Today*. 19: 282-287.
- Girod A, Storrie B, Simpson JC, Johannes L, Goud B, Roberts LM, Lord JM, Nilsson T, Pepperkok R. (1999). Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nat. Cell. Biol.* 1:423-430.
- Goodnight JA, Mischak H, Kolch W, Mushinski JF. (1995). Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isozymes overexpressed in NIH 3T3 fibroblasts. Isoform-specific association with microfilaments, Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J. Biol. Chem.* 270:9991-10001.
- Goni FM, Alonso A. (2002). Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Lett.* 531:38-46.
- Griffiths GM. (2002). Albinism and immunity: what's the link? *Curr. Mol. Med.* 2:479-483.
- Guo W, Sacher M, Barrowman J, Ferro-Novick S, Novick P. (2001). Protein complexes in transport vesicle targeting. *Trends Cell. Biol.* 10: 251-255.
- Harris E, Wang N, Wu WL, Weatherford A, De Lozanne A, Cardelli J. (2002). Dictyostelium LvsB mutants model the lysosomal defects associated with Chediak-Higashi syndrome. *Mol. Biol. Cell.* 13:656-669.
- Hannun YA, Luberto C. (2000). Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell. Biol.* 10:73-80.
- Heukeshoven J, Dernick R. (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*. 9:28-32.
- Hilfiker S, Greengard P, Augustine GJ. (1999). Coupling calcium to SNARE-mediated synaptic vesicle fusion. *Na. Neurosci.* 2:104-106.

- Huizing M, Boissy RE, Gahl WA. (2002 ). Hermansky-Pudlak syndrome: vesicle formation from yeast to man. *Pigment. Cell. Res.* 15:405-419.
- Huizing M, Anikster Y, Gahl WA. (2001). Hermansky-Pudlak syndrome and Chediak-Higashi syndrome: disorders of vesicle formation and trafficking. *Thromb. Haemost.* 86:233-245.
- Huynh C, Roth D, Ward DM, Kaplan J, Andrews NW. (2004). Defective lysosomal exocytosis and plasma membrane repair in Chediak-Higashi/beige cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:16795-16800.
- Ito M, Tanabe F, Takami Y, Sato A, Shigeta S. (1988 ). Rapid down-regulation of protein kinase C in (Chediak-Higashi syndrome) beige mouse by phorbol ester. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:648-656.
- Ito M, Sato A, Tanabe F, Ishida E, Takami Y, Shigeta S. (1989). The thiol proteinase inhibitors improve the abnormal rapid down-regulation of protein kinase C and the impaired natural killer cell activity in (Chediak-Higashi syndrome) beige mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160:433-440.
- Jaken S. (1996 ). Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8:168-173.
- Jaken S, Parker PJ. (2000). Protein kinase C binding partners. *Bioessays.* 22:245-254.
- Jaiswal JK. (2001). Calcium: How and why? *J. Bioscience.* 26: 357-363.
- Jaiswal J K, Andrews NW, Simon SM. (2002). Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in non-secretory cells. *J. Cell. Biol.* 159:625-635.
- Jarvis WD, Turner AJ, Povirk LF, Traylor RS, Grant S. (1994). Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by pharmacological inhibitors of protein kinase C. *Cancer Res.* 54:1707-1714.
- Jogl G, Shen Y, Gebauer D, Li J, Wiegmann K, Kashkar H, Kronke M, Tong L. (2002). Crystal structure of the BEACH domain reveals an unusual fold and extensive association with a novel PH domain. *EMBO J.* 21:4785-4795.

- Kaiser C, Ferro-Novick S. (1998). Transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:477-482.
- Karim MA, Nagle DL, Kandil HH, Burger J, Moore KJ, Spritz RA. (1997). Mutations in the Chediak-Higashi syndrome gene (CHS1) indicate requirement for the complete 3801 amino acid CHS protein. *Hum. Mol. Genet.* 6:1087-1089.
- Kiely PA, Leahy M, O'Gorman D, O'Connor R. (2005). RACK1-mediated integration of adhesion and insulin-like growth factor I (IGF-I) signaling and cell migration are defective in cells expressing an IGF-I receptor mutated at tyrosines 1250 and 1251. *J. Biol. Chem.* 280:7624-7633.
- Kolesnick RN, Goni FM, Alonso A. (2000). Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J. Cell. Physiol.* 184:285-300.
- Kreder D. (1998). Untersuchung der *in vivo* Funktion des TNF-R55 assoziierten Proteins FAN. *Dissertation. Universität Stuttgart.*
- Kreder D, Krut O, Adam-Klages S, Wiegmann K, Scherer G, Plitz T, Jensen JM, Proksch E, Steinmann J, Pfeffer K, Kronke M. (1999). Impaired neutral sphingomyelinase activation and cutaneous barrier repair in FAN-deficient mice. *EMBO J.* 18:2472-2479.
- Krise JP, Sincock PM, Orsel JG, Pfeffer SR. (2000). Quantitative analysis of TIP47-receptor cytoplasmic domain interactions: implications for endosome-to-trans Golgi network trafficking. *J. Biol. Chem.* 275:25188-25193.
- Kwak E, Gerald N, Larochelle DA, Vithalani KK, Niswonger ML, Maready M, De Lozanne A. (1999). LvsA, a protein related to the mouse beige protein, is required for cytokinesis in Dictyostelium. *Mol. Biol. Cell.* 10:4429-4439.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lafer EM. (2002 ). Clathrin-protein interactions. *Traffic.* 3:513-520.
- Lambright DG, Sondek J, Bohm A, Skiba NP, Hamm HE, Sigler PB. (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature.* 379:311-319.
- Lem L, Riethof DA, Scidmore-Carlson M, Griffiths GM, Hackstadt T, Brodsky FM. (1999). Enhanced interaction of HLA-DM with HLA-DR in enlarged vacuoles of hereditary and infectious lysosomal diseases. *J. Immunol.* 162:523-532.

- Lemmon MA, Ferguson KM, Schlessinger J. (1996). PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell*. 85:621-624.
- Lewin B. (1998). Molekularbiologie der Gene. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*.
- Li W, Zhang Q, Oiso N, Novak EK, Gautam R, O'Brien EP, Tinsley CL, Blake DJ, Spritz RA, Copeland NG, Jenkins NA, Amato D, Roe BA, Starcevic M, Dell'Angelica EC, Elliott RW, Mishra V, Kingsmore SF, Paylor RE, Swank RT. (2003). Hermansky-Pudlak syndrome type 7 (HPS-7) results from mutant dysbindin, a member of the biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 (BLOC-1). *Nat. Genet.* 35:84-89.
- Ligon LA, Tokito M, Finklestein JM, Grossman FE, Holzbaur EL. (2004). A direct interaction between cytoplasmic dynein and kinesin I may coordinate motor activity. *J. Biol. Chem.* 279:19201-19208.
- Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, Kimmel AR. (1999). Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 10:51-58.
- Martinez, I., Chakrabarti, S., Hellevik, T., Morehead, J., Fowler, K., Andres, N. W. (2000). Synaptotagmin VII regulates Ca(2+)-dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 148:1141-1149.
- Maxfield FR, McGraw TE. (2004). Endocytic Recycling. *Nature Reviews, Mol. Cell Biol.* 5:121-132.
- Menasche G, Pastural E, Feldmann J, Certain S, Ersoy F, Dupuis S, Wulffraat N, Bianchi D, Fischer A, Le Deist F, de Saint Basile G. (2000). Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat. Genet.* 25:173-176.
- Menasche G, Ho CH, Sanal O, Feldmann J, Tezcan I, Ersoy F, Houdusse A, Fischer A, de Saint Basile G. (2003 ). Griscelli syndrome restricted to hypopigmentation results from a melanophilin defect (GS3) or a MYO5A F-exon deletion (GS1). *J. Clin. Invest.* 112:450-456.
- Michelsen JW, Schmeichel KL, Beckerle MC, Winge DR. (1993). The LIM motif defines a specific zinc-binding protein domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:4404-4408.

- Miura K, Miyazawa S, Furuta S, Mitsushita J, Kamijo K, Ishida H, Miki T, Suzukawa K, Resau J, Copeland TD, Kamata T. (2001). The Sos1-Rac1 signaling. Possible involvement of a vacuolar H(+)-ATPase E subunit. *J. Biol. Chem.* 276:46276-46283.
- Mochly-Rosen D, Gordon AS. (1998). Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J.* 12:35-42.
- Mourton T, Hellberg CB, Burden-Gulley SM, Hinman J, Rhee A, Brady-Kalnay SM. (2001). The PTPmu protein-tyrosine phosphatase binds and recruits the scaffolding protein RACK1 to cell-cell contacts. *J. Biol. Chem.* 276:14896-14901.
- Muller O, Bayer MJ, Peters C, Anderesen JS, Mann M, Mayer A. (2002). The Vtc proteins in vacuole fusion: coupling NSF activity to V0 trans-complex formation. *EMBO J.* 21:259-269.
- Munro, S. (2004). Organelle identity and the organization of membrane traffic. *Nature Cell Biology.* 6:469-472.
- Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K. (1995). VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:10339-10343.
- Murk JLAN, Humbel BM, Ziese U, Griffith JM, Posthuma G, Slot JW, Koster AJ, Verkleij AJ, Geuze HJ, Kleijmeer MJ. (2003). Endosomal compartmentalization in three dimensions: Implications for membrane fusion. *PNAS.* 100:13332-13337.
- Nagle DL, Karim MA, Woolf EA, Holmgren L, Bork P, Misumi DJ, McGrail SH, Dussault BJ Jr, Perou CM, Boissy RE, Duyk GM, Spritz RA, Moore KJ. (1996). Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak-Higashi syndrome. *Nat. Genet.* 14:307-311.
- Nakatani Y, Nakamura N, Sano J, Inayama Y, Kawano N, Yamanaka S, Miyagi Y, Nagashima Y, Ohbayashi C, Mizushima M, Manabe T, Kuroda M, Yokoi T, Matsubara O. (2000). Interstitial pneumonia in Hermansky-Pudlak syndrome: significance of florid foamy swelling/degeneration (giant lamellar body degeneration) of the type-2 pneumocytes. *Virchows Arch.* 437:304-313.
- Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF. (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature.* 371:297-300.

- Neher, E. (1998). Vesicle pools and Ca<sup>2+</sup> microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron*. 20:389-399.
- Newton AC. (1995). Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 270:28495-28498.
- Newton AC. (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9:161-167.
- Nielander HB, Onofri F, Valtorta F, Schiavo G, Montecucco C, Greengard P, Benfenati F. (1995). Phosphorylation of VAMP/synaptobrevin in synaptic vesicles by endogenous protein kinases. *J. Neurochem.* 65:1712-1720.
- Nishizuka Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*. 233:305-312.
- Nishizuka Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*. 258:607-614.
- Ohno S, Nishizuka Y. (2002 ). Protein kinase C isoforms and their specific functions: prologue. *J. Biochem.* 132:509-511.
- Orci L, Stames M, Ravazzola M, Amherdt M, Perrelet A, Sollner TH, Rothman JE. (1997) Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell*. 90:335-349.
- Pappa H, Murray-Rust J, Dekker LV, Parker PJ, McDonald NQ. (1998). Crystal structure of the C2 domain from protein kinase C-delta. *Structure*. 6:885-894.
- Parekh DB, Katso RM, Leslie NR, Downes CP, Procyk KJ, Waterfield MD, Parker PJ. (2000). Beta1-integrin and PTEN control the phosphorylation of protein kinase C. *Biochem. J.* 352:425-433.
- Parton RG, Richards AA. (2003). Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic*. 4:724-738.
- Pastural E, Barrat FJ, Dufourcq-Lagelouse R, Certain S, Sanal O, Jabado N, Seger R, Griscelli C, Fischer A, de Saint Basile G. (1997). Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nat. Genet.* 16:289-292.
- Pawson T. (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature*. 373:573-580.

- Pawson T, Scott JD. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*. 278:2075-2080.
- Pereira-Leal JB, Seabra MC. (2001). Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.* 313:889-901.
- Perou CM, Kaplan J. (1993). Complementation analysis of Chediak-Higashi syndrome: the same gene may be responsible for the defect in all patients and species. *Somat. Cell. Mol. Genet.* 19:459-468.
- Perou CM, Moore KJ, Nagle DL, Misumi DJ, Woolf EA, McGrail SH, Holmgren L, Brody TH, Dussault BJ Jr, Monroe CA, Duyk GM, Pryor RJ, Li L, Justice MJ, Kaplan J. (1996). Identification of the murine beige gene by YAC complementation and positional cloning. *Nat. Genet.* 13:303-308.
- Perou CM, Justice MJ, Pryor RJ, Kaplan J. (1996). Complementation of the beige mutation in cultured cells by episomally replicating murine yeast artificial chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:5905-5909.
- Perou CM, Leslie JD, Green W, Li L, Ward DM, Kaplan J. (1997). The Beige/Chediak-Higashi syndrome gene encodes a widely expressed cytosolic protein. *J. Biol. Chem.* 272:29790-20794.
- Peters C, Bayer MJ, Buhler S, Andersen JS, Mann M, Mayer A. (2001). Trans-complex Formation by proteolipidchannels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature*. 409:581-588.
- Pfeffer SR. (1999). Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat. Cell. Biol.* 1:17-22.
- Pfeffer S. (2003). Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. *Cell*. 112:507-517.
- Peifer M, Berg S, Reynolds AB. (1994). A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell*. 76:789-791.
- Platzbecker U, Ward JL, Deeg HJ. (2003). Chelerythrin activates caspase-8, downregulates FLIP long and short, and overcomes resistance to tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in KG1a cells. *Br. J. Haematol.* 122:489-497.
- Powers J, Barlowe C. (2002). Erv14p directs a transmembrane secretory protein into COPII-coated transport vesicles. *Mol. Biol. Cell*. 13:880-891.

- Rao SK, Huynh C, Proux-Gillardeaux V, Galli T, Andrews NW. (2004). Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. *J. Biol. Chem.* 279:20471-20479.
- Reddy A, Caler E, Andrews N. (2001). Plasma membrane repair is mediated by Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell.* 106:157-169.
- Reed GL, Hough AK, Fitzgerald ML. (1999). Human platelets contain SNARE proteins and a Sec1p homologue that interacts with syntaxin 4 and is phosphorylated after thrombin activation: implications for platelet secretion. *Blood.* 193:2617-2626.
- Rodriguez A, Webster P, Ortego J, Andrews NW. (1997). Lysosomes behave as Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J. Cell Biol.* 137:93-104.
- Ron D, Chen CH, Caldwell J, Jamieson L, Orr E, Mochly-Rosen D. (1994). Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:839-843.
- Ron D, Luo J, Mochly-Rosen D. (1995). C2 region-derived peptides inhibit translocation and function of beta protein kinase C in vivo. *J. Biol. Chem.* 270:24180-24187.
- Ron D, Jiang Z, Yao L, Vagts A, Diamond I, Gordon A. (1999). Coordinated movement of RACK1 with activated betaIIPKC. *J. Biol. Chem.* 274:27039-27046.
- Rothman JE. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature.* 372:55-63.
- Sacher M, Barrowman J, Wang W, Horecka J, Zhang Y, Pypaert M, Ferro-Novick S. (2001). TRAPP I implicated in the specificity of tethering in ER-to-Golgi transport. *Mol. Cell.* 7:433-442.
- Sato A, Tanabe F, Ito M, Ishida E, Shigeta S. (1990). Thiol proteinase inhibitors reverse the increased protein kinase C down-regulation and concanavalin A cap formation in polymorphonuclear leukocytes from Chediak-Higashi syndrome (beige) mouse. *J. Leukoc. Biol.* 48:377-381.
- Schechtman D, Mochly-Rosen D. (2001). Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene.* 20:6339-6347.
- Schekman R, Mellman I. (1997). Does COPI go both ways? *Cell.* 90:197-200.

- Schraw TD, Lemons PP, Dean WL, Whiteheart SW. (2003). A role for Sec1/Munc18 proteins in platelet exocytosis. *Biochem. J.* 374:207-217.
- Schutze S, Nottrott S, Pfizenmaier K, Kronke M. (1990). Tumor necrosis factor signal transduction. Cell-type-specific activation and translocation of protein kinase C. *J. Immunol.* 144:2604-2608.
- Seals DF, Eitzen G, Margolis N, Wickner WT, Price A. (2000). A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:9402-9407.
- Shiflett SL, Kaplan J, Ward DM. (2002). Chediak-Higashi Syndrome: a rare disorder of lysosomes and lysosome related organelles. *Pigment. Cell. Res.* 15:251-257.
- Shiflett SL, Vaughn MB, Huynh D, Kaplan J, Ward DM. (2004). Bph1p, the *Saccharomyces cerevisiae* homologue of CHS1/beige, functions in cell wall formation and protein sorting. *Traffic.* 5:700-710.
- Shimazaki Y, Nishiki T, Omori A, Sekiguchi M, Kamata Y, Kozaki S, Takahashi M. (1996 ). Phosphorylation of 25-kDa synaptosome-associated protein. Possible involvement in protein kinase C-mediated regulation of neurotransmitter release. *J. Biol. Chem.* 271:14548-14553.
- Shiraishi M, Ikeda M, Ogawa H, Tu CH, Ito K. (1998 ). Impaired cytosolic calcium mobilization and aggregation in response to collagen in platelets from Japanese black cattle with Chediak-Higashi syndrome. *Am. J. Vet. Res.* 59:744-749.
- Shiraishi M, Ogawa H, Ikeda M, Kawashima S, Ito K. (2002 ). Platelet dysfunction in Chediak-Higashi syndrome-affected cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 64:751-760.
- Sondek J, Bohm A, Lambright DG, Hamm HE, Sigler PB. (1996). Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution. *Nature.* 379:369-374.
- Sonnichsen B, Lowe M, Levine T, Jamsa E, Dirac-Svejstrup B, Warren G. (1998). Role of giantin in docking COP I vesicles to Golgi membranes. *J. Cell. Biol.* 140:1013-1021.
- Springer S, Spang A, Schekman R. (1999). A primer on vesicle budding. *Cell.* 97:145-148
- Stenmark H, Olkkonen VM. (2001). The Rab GTPase family. *Genome Biol.* 2:REVIEWS3007.

- Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F, Bhawan S, Certain S, Mathew PA, Henter JI, Bennett M, Fischer A, de Saint Basile G, Kumar V. (1999). Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science*. 286:1957-1959.
- Stevens TH, Forgac M. (1997). Structure, function and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13:779-808.
- Stinchcombe JC, Griffiths GM. (1999). Regulated secretion from hemopoietic cells. *J. Cell. Biol.* 147:1-6.
- Stinchcombe JC, Page LJ, Griffiths GM. (2000). Secretory lysosome biogenesis in cytotoxic T lymphocytes from normal and Chediak Higashi syndrome patients. *Traffic*. 1:435-444.
- Stinchcombe JC, Griffiths GM. (2001). Normal and abnormal secretion by haemopoietic cells. *Immunology*. 103:10-16.
- Su Y, Balice-Gordon RJ, Hess DM, Landsman DS, Minarcik J, Golden J, Hurwitz I, Liebhaber SA, Cooke NE. (2004). Neurobeachin is essential for neuromuscular synaptic transmission. *J. Neurosci.* 24:3627-3636.
- Sun-Wada GH, Wada Y, Futai M. (2003 ). Vacuolar H<sup>+</sup> pumping ATPases in luminal acidic organelles and extracellular compartments: common rotational mechanism and diverse physiological roles. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35:347-358.
- Swank RT, Novak EK, McGarry MP, Rusiniak ME, Feng L. (1998). Mouse models of Hermansky Pudlak syndrome: a review. *Pigment Cell Res. Apr; 11(2):60-80.*
- Tanabe F, Cui SH, Ito M. (2000). Abnormal down-regulation of PKC is responsible for giant granule formation in fibroblasts from CHS (beige) mice--a thiol proteinase inhibitor, E-64-d, prevents giant granule formation in beige fibroblasts. *J. Leukoc. Biol.* 67:749-755.
- Tang X, Yamanaka S, Miyagi Y, Nagashima Y, Nakatani Y. (2005). Lung pathology of Pale ear mouse (model of Hermansky-Pudlak syndrome 1) and beige mouse (model of Chediak-Higashi syndrome): severity of giant lamellar body degeneration of type II pneumocytes correlates with interstitial inflammation. *Pathol. Int.* 55:137-143.

- Tanigawa G, Orci L, Amherdt M, Ravazzola M, Helms JB, Rothman JE. (1993). Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *J. Cell. Biol.* 123:1365-1371.
- Targan SR, Oseas R. (1983). The "lazy" NK cells of Chediak-Higashi syndrome. *J. Immunol.* 130:2671-2674.
- Tcherkasowa AE, Adam-Klages S, Kruse ML, Wiegmann K, Mathieu S, Kolanus W, Kronke M, Adam D. (2002). Interaction with factor associated with neutral sphingomyelinase activation, a WD motif-containing protein, identifies receptor for activated C-kinase 1 as a novel component of the signaling pathways of the p55 TNF receptor. *J. Immunol.* 169:5161-5170.
- Tchernev VT, Mansfield TA, Giot L, Kumar AM, Nandabalan K, Li Y, Mishra VS, Detter JC, Rothberg JM, Wallace MR, Southwick FS, Kingsmore SF. (2002). The Chediak-Higashi protein interacts with SNARE complex and signal transduction proteins. *Mol. Med.* 8:56-64.
- Temesvari LA, Rodriguez-Paris JM, Bush JM, Zhang L, Cardelli JA. (1996). Involvement of the vacuolar proton-translocating ATPase in multiple steps of the endo-lysosomal system and in the contractile vacuole system of *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell. Sci.* 109:1479-1495.
- Thornton C, Tang KC, Phamluong K, Luong K, Vagts A, Nikanjam D, Yaka R, Ron D. (2004). Spatial and temporal regulation of RACK1 function and N-methyl-D-aspartate receptor activity through WD40 motif-mediated dimerization. *J. Biol. Chem.* 279:31357-31364.
- Tjelle TE, Brech A, Juvet LK, Griffiths G, Berg T. (1996). Isolation and Characterization of early endosomes, late endosomes and terminal lysosomes: Their role in protein degradation. *J. Cell Sci.* 109: 2905-2914.
- Trigatti BL, Anderson RG, Gerber GE. (1999). Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255:34-39.
- Wadsworth SJ, Chander A. (2000). H<sup>+</sup>-and K<sup>+</sup>-dependence of Ca<sup>2+</sup> uptake in lung lamellar bodies. *J. Membr. Biol.* 174:41-51.
- Wang N, Wu WI, De Lozanne A. (2002). BEACH family of proteins: phylogenetic and functional analysis of six *Dictyostelium* BEACH proteins. *J. Cell. Biochem.* 86:561-570.

- Wang JW, Howson J, Haller E, Kerr WG. (2001). Identification of a novel lipopolysaccharide-inducible gene with key features of both A kinase anchor proteins and chs1/beige proteins. *J. Immunol.* 166:4586-4595.
- Wang X, Herberg FW, Laue MM, Wullner C, Hu B, Petrasch-Parwez E, Kilimann MW. (2000). Neurobeachin: A protein kinase A-anchoring, beige/Chediak-Higashi protein homolog implicated in neuronal membrane traffic. *J. Neurosci.* 20:8551-8565.
- Ward DM, Griffiths GM, Stinchcombe JC, Kaplan J. (2000 ). Analysis of the lysosomal storage disease Chediak-Higashi syndrome. *Traffic.* 1:816-822.
- Ward DM, Shiflett SL, Kaplan J. (2002). Chediak-Higashi syndrome: a clinical and molecular view of a rare lysosomal storage disorder. *Curr. Mol. Med.* 2:469-477.
- Waters MG, Hughson FM. (2000). Membrane tethering and fusion in the secretory and endocytic pathways. *Traffic.* 1:588-597.
- Whyte RC, Munro S. (2002). Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J. Cell Sci.* 115:2627-2637.
- Wu WI, Yajnik J, Siano M, De Lozanne A. (2004). Structure-function analysis of the BEACH protein LvsA. *Traffic.* 5:346-355.
- Wurmser AE, Sato TK, Emr SD. (2000). New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *J. Cell. Biol.* 151:551-562.
- Yabe I, Horiuchi K, Nakahara K, Hiyama T, Yamanaka T, Wang PC, Toda K, Hirata A, Ohsumi Y, Hirata R, Anraku Y, Kusaka I. (1999). Patch clamp studies on V-type ATPase of vacuolar membrane of haploid *Saccharomyces cerevisiae*. Preparation and utilization of a giant cell containing a giant vacuole. *J. Biol. Chem.* 274:34903-34910.
- Yaka R, Thornton C, Vagts AJ, Phamluong K, Bonci A, Ron D. (2002). NMDA receptor function is regulated by the inhibitory scaffolding protein, RACK1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:5710-5715.
- Yaka R, Phamluong K, Ron D. (2003). Scaffolding of Fyn kinase to the NMDA receptor determines brain region sensitivity to ethanol. *J. Neurosci.* 23:3623-3632.

- Yamamoto S, Seta K, Morisco C, Vatner SF, Sadoshima J. (2001). Chelerythrine rapidly induces apoptosis through generation of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33:1829-1848.
- Yarwood SJ, Steele MR, Scotland G, Houslay MD, Bolger GB. (1999). The RACK1 signaling scaffold protein selectively interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5 isoform. *J. Biol. Chem.* 274:14909-14917.
- Ybe JA, Wakeham DE, Brodsky FM, Hwang PK. (2000) Molecular structures of proteins involved in vesicle fusion. *Traffic.* 1:474-479.
- Zeuzem S, Feick P, Zimmermann P, Haase W, Kahn RA, Schulz I. (1992 ). Intravesicular acidification correlates with binding of ADP-ribosylation factor to microsomal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:6619-6623.

## **Danksagung**

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Dieter Adam für das Überlassen eines sehr interessanten Themas, welches mir viel Spielraum in molekularbiologischen und proteinchemischen Techniken ermöglichte.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Matthias Leippe für die Übernahme des Koreferats.

Prof. Dr. Dieter Kabelitz, Direktor des Instituts für Immunologie, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Sabine Mathieu danke ich für die Einführung in die Geheimnisse der Zellkultur und für ihre verständnisvolle Art bei der Bewältigung alltäglicher Labor-Problematiken.

Durch die Hilfsbereitschaft und Diskussionsbereitschaft aller Doktoranden des Instituts für Immunologie wurde diese Doktorarbeit erst möglich. Besonderer Dank gilt Susan-Beatrice Csehi, Ivonne Suckstorff, Ute Weingartz, Markus Falk und Jens Neumeyer, die mir gute Freunde geworden sind.

Bei Cora Hallas bedanke ich mich für wertvolle Impulse beim Schreiben meiner Arbeit.

Die Achse Bremen/Oldenburg/München in Namen Jose Alberto Velez, Werner Hoppenstedt und Christoph Töpert hat mir zugehört, Kraft gegeben und mich wieder angetrieben. Euch allen gilt ein mehr als herzlicher Dank.

Meinem Sport, besonders dem UWR, verdanke ich Vieles, ohne ihn wäre ich nicht da, wo ich jetzt stehe. Besonders möchte ich mich bei meinen Mannschaftskollegen aus Kiel und „meinen Mädels“ bedanken, ohne Euch wäre Vieles stecken geblieben. Danke.

Meinen Eltern danke ich für ihre Geduld und für viele aufmunternde Worte und Taten.

## Lebenslauf

Name: Heike Möhlig  
Anschrift: Kieler Str. 12  
24143 Kiel  
geboren am 14. 09. 1973  
geboren in Bad Kreuznach

## Ausbildung

**Allgemeine Hochschulreife,** 1993  
Altsprachliches Gymnasium, Bad Kreuznach

AuPair Aufenthalt in Irland 1993-1994

Beginn des Studiums Diplom-Biologie 10/1994  
an der Technischen Universität Darmstadt

Abschluß: **Vordiplom** 10/1996

Hauptstudium an der Universität Oldenburg 04/1997-2001  
Diplomarbeit bei Prof. Dr. P. P. Jaros in der 06/2000-06/2001  
Arbeitsgruppe Zoophysiologie und Verhalten  
(„Lokalisierung von Crustaceen Hyperglykämischen Hormon  
(CHH)-Transkripten im Nervengewebe der Strandkrabbe  
*Carcinus maenas* mittels *in situ* Hybridisierung“)

Abschluß: **Diplom** 07/2001

Wissenschaftliche Mitarbeiterin 12/2001-06/2002  
am Institut für Meereskunde, Kiel

**Beginn der Promotionsarbeit** 07/2002  
am Institut für Immunologie der Universität Kiel

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich gemäß § 9 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Universität zur Begutachtung vorgelegt.

Kiel, 17.04.05

Heike Möhlig