

Untersuchungen zum Lysosom als Funktionsträger bei der Cholesterinhomöostase und der angeborenen Immunabwehr



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

vorgelegt von
Marion Willenborg

Kiel, März 2007

Referent/in:.....

Korreferent/in:.....

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Zum Druck genehmigt, Kiel,.....

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abkürzungsverzeichnis | IV |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Das Lysosom | 1 |
| 1.2 Das Lysosom als Endpunkt zellulärer Transportprozesse | 1 |
| 1.3 Zellulärer Transport durch Mannose-6-Phosphatrezeptoren | 7 |
| 1.4 Transport lysosomaler Proteine durch MPRs | 8 |
| 1.5 Die lysosomale Membran und lysosomale Membranproteine | 9 |
| 1.6 Bedeutung des Lysosoms für Cholesterintransport und -homöostase | 13 |
| 1.7 Neutrophile Granulozyten: Phagozyten mit spezialisierten Lysosomen | 18 |
| 1.8 Parodontitis als Folge gestörter Phagozytenfunktionen | 19 |
| 2. Fragestellung | 22 |
| 3. Material und Methoden | 23 |
| 3.1 Material | 23 |
| 3.1.1 Chemikalien, Enzyme und Materialien | 23 |
| 3.1.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide | 24 |
| 3.1.3 Antikörper | 25 |
| 3.1.4 Zelllinien | 27 |
| 3.1.5 Mäusestämme | 28 |
| 3.1.6 Medien und Lösungen | 28 |
| 3.2 Methoden | 29 |
| 3.2.1 Molekularbiologische Methoden | 29 |
| 3.2.2 Biochemische Methoden | 35 |
| 3.2.3 Zellbiologische Methoden | 45 |
| 3.2.4 Immunologische Methoden | 52 |
| 4. Ergebnisse | 56 |
| 4.1 Mannose-6-Phosphatrezeptoren, Niemann-Pick C2 Protein und lysosomale Cholesterinakkumulation | 56 |
| 4.1.1 Verlust von Mannose-6-Phosphatrezeptoren in embryonalen Mausfibroblasten | 56 |
| 4.1.2 Endogenes NPC2 in MPR-defizienten Zellen | 58 |
| 4.1.3 Glykosylierung von NPC2 in MPR-defizienten Zellen | 60 |

| | |
|--|------------|
| 4.1.4 NPC1-Expression in MPR-defizienten Fibroblasten | 62 |
| 4.1.5 NPC2-Immunfärbung in MPR-defizienten MEFs | 63 |
| 4.1.6 Subzelluläre NPC2-Lokalisation | 64 |
| 4.1.7 Expression von MPR46 oder MPR300 in MPR-defizienten Fibroblasten | 67 |
| 4.1.8 Cholesterinakkumulation in MPR-doppeldefizienten Fibroblasten | 68 |
| 4.1.9 Lipidlokalisation in MPR-defizienten Fibroblasten | 75 |
| 4.1.10 NPC2 und Cholesterin in MPR-defizienten Geweben | 77 |
| 4.2 Erhöhte Anfälligkeit für Plaquebildung und Parodontitis bei LAMP-2-defizienten Mäusen | 79 |
| 4.2.1 Parodontitis bei LAMP-2-defizienten Mäusen | 80 |
| 4.2.2 Isolation von neutrophilen Granulozyten | 83 |
| 4.2.3 Akkumulation von autophagozytotischen Vakuolen in LAMP-2- defizienten Neutrophilen | 88 |
| 4.2.4 Geringe Abtötung von <i>E. coli</i> -Bakterien durch LAMP-2-defiziente Neutrophile | 91 |
| 4.2.5 Untersuchung der Fähigkeit von Neutrophilen zur Nutzung von sauerstoffabhängigen Abtötungsmechanismen | 94 |
| 4.2.6 Charakterisierung vesikulärer und granulärer Strukturen in LAMP-2-defizienten Neutrophilen | 96 |
| 4.2.7 Phagozytose von Latexkügelchen durch Neutrophile | 99 |
| 4.2.8 Untersuchung des Zytoskeletts in LAMP-2-defizienten Neutrophilen | 103 |
| 5. Diskussion | 105 |
| 5.1.1 Subzelluläre Lokalisation von NPC2 und dessen Rolle im Cholesterintransport | 105 |
| 5.1.2 Lipidakkumulation in MPR-defizienten Zellen | 107 |
| 5.1.3 Untersuchung zur Glykosylierung von NPC2 | 108 |
| 5.1.4 MPR-abhängiger intrazellulärer Transport von NPC2 | 110 |
| 5.1.5 NPC2 in Geweben MPR-defizienter Mäuse | 111 |
| 5.1.6 Therapiemöglichkeiten für Niemann-Pick Typ C2 | 112 |
| 5.2.1 Erhöhte Anfälligkeit für Parodontitis bei LAMP-2-defizienten Mäusen | 113 |
| 5.2.2 Gewinnung von primären neutrophilen Granulozyten | 114 |

| | |
|---|------------|
| 5.2.3 Akkumulation autophagozytotischer Vakuolen in neutrophilen Granulozyten LAMP-2-defizienter Mäuse | 116 |
| 5.2.4 Abtötungsmechanismen in neutrophilen Granulozyten | 117 |
| 5.2.5 Rolle der LAMP-Proteine in neutrophilen Granula | 120 |
| 5.2.6 Rolle der LAMP-Proteine bei der phagosomalen Reifung | 121 |
| 5.3 Ausblick | 125 |
| 6. Zusammenfassung | 127 |
| 7. Summary | 129 |
| 8. Literaturverzeichnis | 131 |
| Anhang | 147 |
| Lebenslauf | 153 |
| Danksagung | 154 |
| Erklärung | 155 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---|
| A | Österreich |
| Abb. | Abbildung |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| Asn | Asparagin |
| BHK | Babyhamsterniere (<i>Baby hamster kidney</i>) |
| BMP | Bis(monoacylglycerol)phosphat |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bp | Basenpaare |
| CA | Kalifornien |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| CD-MPR | kationenabhängiger MPR |
| CH | Schweiz |
| CHO | <i>Chinese hamster ovary</i> |
| CI-MPR | kationenunabhängiger MPR |
| Cys | Cystein |
| DABCO | Diazobicyclooctan |
| DAMP | N-(3-[(2,4-Dinitrophenyl)amino]propyl)-N-(3-aminopropyl)methylaminedihydrochlorid |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid |
| ddH ₂ O | doppelt-destilliertes H ₂ O |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DK | Dänemark |
| DMEM | <i>Dulbeccos Modified Eagles Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| DSHB | <i>Developmental Studies Hybridoma Bank</i> |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EEA1 | <i>Early Endosomal Antigen 1</i> |
| Endo H | Endoglykosidase H |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| FIN | Finnland |

| | |
|------------------|--|
| FITC | Fluoreszeinisothiocyanat |
| FKS | fetales Kälberserum |
| GFP | grünfluoreszierendes Protein |
| G-CSF | Granulozyten koloniestimulierender Faktor |
| HBSS | <i>Hank's buffered saline solution</i> |
| HEPES | 2-[4-(Hydroxyethyl)-1-Piperaziny]-Ethansulfonsäure |
| HMGCoA-Reduktase | 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase |
| HRPO | Meerrettichperoxidase |
| IF | Immunfluoreszenz |
| IVC | <i>Individually Ventilated Cages</i> |
| J | Japan |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| LB | <i>Luria Broth</i> |
| LBPA | Lysobisphosphatidsäure |
| LC3 | <i>Light Chain Protein 3</i> |
| LDL | <i>Low density lipoprotein</i> |
| MEF | muriner embryonaler Fibroblast |
| Met | Methionin |
| MPR | Mannose-6-Phosphatrezeptor |
| MPR46 | kationenabhängiger MPR |
| MPR300 | kationenunabhängiger MPR |
| N | Asparagin |
| N-Cadherin | Neuronales Cadherin |
| NPC | Niemann-Pick Typ C |
| NPC1 | Niemann-Pick Typ C Protein 1 |
| NPC2 | Niemann-Pick Typ C Protein 2 |
| OR | Oregon |
| PBS | phosphatgepufferte Kochsalzlösung |
| PDI | Proteindisulfidisomerase |
| PE | Phycoerythrin |
| PFA | Paraformaldehyd |
| Phe | Phenylalanin |
| PMA | Phorbol-12-Myristat-13-Acetat |

| | |
|----------|---|
| PNGase F | N-Glykosidase F |
| PS | Presenilin |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| Q | Glutamin |
| RFP | rotfluoreszierendes Protein |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>) |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| S | Schweden |
| S1P | <i>Site-1-Protease</i> |
| S2P | <i>Site-2-Protease</i> |
| SCAP | <i>SREBP-Cleavage-Activating-Protein</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SPF | <i>Specific Pathogen Free</i> |
| SRE-1 | sterolregulatorisches Element 1 |
| SREBP | <i>Sterol Regulating Element Binding Proteine</i> |
| SSD | Sterolsensordomäne |
| START | Lipidtransferdomäne |
| Taq | <i>Thermophilus aquaticus</i> |
| TBS | trisgepufferte Kochsalzlösung |
| TGN | <i>trans-Golgi-Netzwerk</i> |
| Tyr | Tyrosin |
| UK | United Kingdom |
| USA | <i>United States of America</i> |
| Val | Valin |
| WB | Westernblot |
| v/v | <i>volume per volume</i> |
| w/v | <i>weight per volume</i> |

1. Einleitung

1.1 Das Lysosom

Die eukaryotische Zelle ist in verschiedene Kompartimente gegliedert. Atmung, Assimilation, Energie- und Stofffluss sowie genetische Funktionen sind an spezifische, membranumgrenzte Organellen gebunden (Weber, 1997). Lysosomen sind die wichtigsten Verdauungsorgane der tierischen Zelle, in denen alle Arten von Makromolekülen abgebaut werden. Sie wurden 1959 erstmalig von De Duve beschrieben und sind durch den sauren pH-Wert von 5 sowie ihren hohen Anteil an Hydrolasen gekennzeichnet (de Duve, 1959). Bei einer Größe von $< 1 \mu\text{m}$ und einer sphärischen bis ovalen oder zuweilen tubulären Form sind sie von einer einfachen Membran begrenzt (de Duve, 1983). In der Literatur werden Lysosomen auch als Organellen mit speziellen Membranglykoproteinen und ohne Mannose-6-Phosphatrezeptoren definiert (Kornfeld und Mellman, 1989). Neben seiner Funktion als das terminale Abbaukompartiment des Endozytoseweges (Kornfeld und Mellman, 1989) spielt das Lysosom auch eine wichtige Rolle bei der Hydrolyse von phagozytiertem Material (Funato et al., 1997), bei der Autophagozytose (Lawrence und Brown, 1992), beim Abbau überschüssiger sekretorischer Proteine (Crinophagie) (Noda und Farquhar, 1992) sowie bei der Proteolyse von zytosolischen Proteinen, die spezifisch ins Lysosom transportiert werden (Cuervo und Dice, 1996). Für die Aufrechterhaltung der enzymatischen Funktionen im Lysosom ist unter anderem ein im Vergleich zum Zytosol angesäuertes Milieu notwendig. Ebenso sind Fusionen von Lysosomen mit anderen Vesikeln, z.B. Endosomen, Phagosomen und Autophagosomen zur Aufrechterhaltung lysosomaler Funktionen unerlässlich.

1.2 Das Lysosom als Endpunkt zellulärer Transportprozesse

Das Lysosom ist der Endpunkt für eine Vielzahl von Transportprozessen in der tierischen Zelle (Abb. 1). Von der Zelloberfläche aus beginnt der Vorgang der Endozytose. Durch Einstülpung der Plasmamembran bildet sich ein Vesikel, der das aufzunehmende Material einhüllt. Am besten beschrieben ist die rezeptorvermittelte Endozytose über clathrinumhüllte Einstülpungen. Hat sich ein Vesikel ins Zellinnere abgeschnürt, spricht man von einem endozytotischen Vesikel (frühes Endosom). Diese Organellen können unter anderem durch

die Markerproteine Rab5 oder EEA1 (*early endosome antigen 1*) identifiziert werden (Mills et al., 2001) (Tab. 1) und werden, je nach weiterer Aufgabe, auch sortierende oder rezyklisierende Endosomen genannt. Sie haben oft eine tubulovesikuläre Form, ihr Lumen ist relativ arm an Proteasen und ihr pH-Wert liegt bei ca. 6,0 (Mellman, 1996). Von den frühen Endosomen gelangen die zum Abbau bestimmten Makromoleküle zu den späten Endosomen (Mellman, 1996), die je nach Beschaffenheit auch multivesikuläre Körperchen genannt werden (Piper und Luzio, 2001). Unklar ist bei diesem Prozess, ob die Makromoleküle über vesikulären Transport vom frühen zum späten Endosom gelangen oder ob es sich um eine Reifung des Endosoms handelt (Mullins und Bonifacino, 2001). Späte Endosomen weisen einen pH-Wert von 5,5 auf und sind im Vergleich zu frühen Endosomen mit hydrolytischen Enzymen angereichert. Charakteristische Markermoleküle sind Rab7, Rab9, Bis(monoglycero)phosphat (BMP), Mannose-6-Phosphatrezeptoren (MPRs) und lysosomenassoziierte Membranproteine (LAMPs) (Mukherjee et al., 1997).

Tab. 1: Subzelluläre Marker für frühe und späte Endosomen, Lysosomen sowie für frühe und späte Phagosomen und Phagolysosomen. Modifizierte Tabelle aus (Vieira et al., 2002).

| Organell | typische Marker | pH |
|-------------------------|---|-------------|
| frühes Endosom/Phagosom | EEA1, Rab5, Phosphatidylinositol-3-Phosphat, Syntaxin 13, Transferrin | ca. 6,0 |
| spätes Endosom/Phagosom | Rab7, Rab9, MPR, Syntaxin7, LAMPs, LBPA | 5,5 bis 6,0 |
| Lysosom/Phagolysosom | LAMPs, reifes Cathepsin D, <i>fluid-phase</i> Marker nach \geq 2 h Inkubation | 4,5 bis 5,5 |

Der Übergang vom späten Endosom zum Lysosom wird in der Literatur vielfach diskutiert. Murphy (Murphy, 1991) postuliert eine Reifung vom späten Endosom zum Lysosom. Weiterhin wird ein vesikulärer Transport zwischen den beiden Kompartimenten beschrieben (Mellman und Warren, 2000). Die „*kiss and run*“-Hypothese von Storrie und Desjardins (Storrie und Desjardins, 1996) beschreibt eine kontinuierliche partielle Fusion von späten Endosomen und Lysosomen, wobei Material ausgetauscht wird. Mullock und Kollegen (Mullock et al., 1998) schildern hingegen eine vollständige Fusion der beiden Kompartimente zu einem Hybridorganell. Durch Reifung entstehen aus diesen Hybridorganellen wieder Lysosomen (Pryor et al., 2000). Ungeachtet des exakten Ablaufs des Reifungsprozesses sind die Lysosomen der Endpunkt des endozytotischen Weges (Abb. 1). Sie enthalten eine Reihe aktiver Proteasen und Lipasen und ihr pH-Wert liegt bei pH 5,5. Reifes Cathepsin D und die

LAMPs gelten als charakteristische Marker. Eine Anfärbung der Lysosomen ist ebenfalls mit einem fluoreszierenden *fluid-phase*-Marker wie z.B. Fluoreszeinisothiocyanatdextran (FITC-Dextran) nach einer mindestens zweistündigen Inkubationszeit möglich (Vieira et al., 2002).

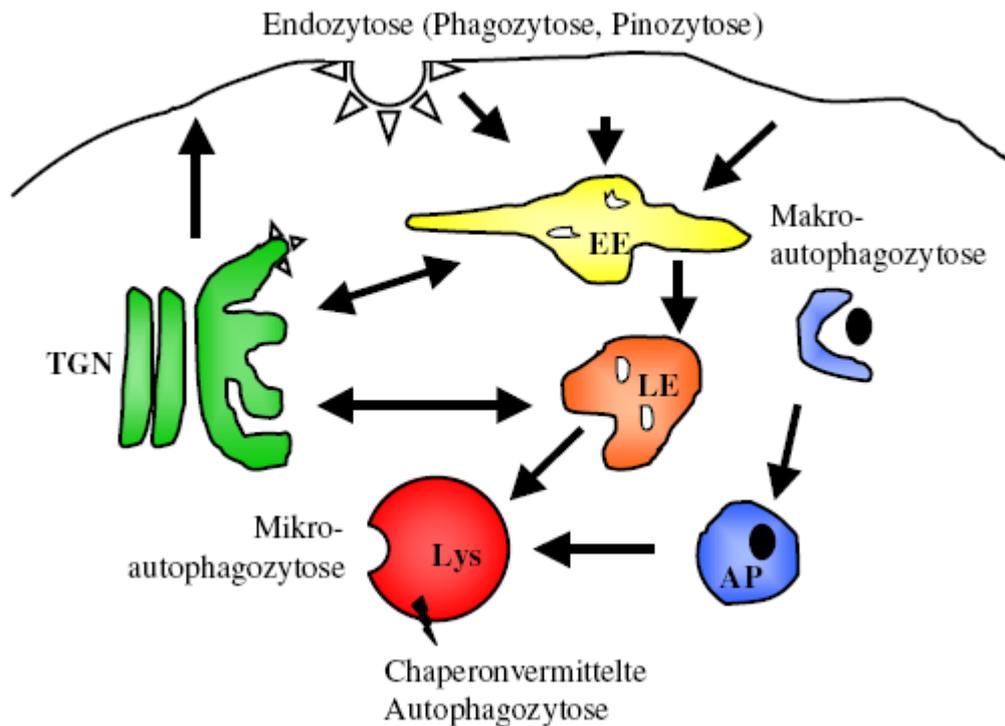


Abb. 1: Transportwege zum Lysosom. Das Lysosom ist der Endpunkt für eine Vielzahl von Transportprozessen. Durch Endozytose können extrazelluläre Partikel (Phagozytose) und Flüssigkeiten (Pinozytose) aufgenommen werden. Über das frühe Endosom (EE) gelangt das endozytierte Material zum späten Endosom (LE) und wird schließlich im Lysosom (Lys) abgebaut. Lösliche lysosomale Proteine gelangen über den biosynthetischen Weg vom *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) über LE zum Lysosom. Zytoplasmatische Partikel können über Autophagozytose zum Lysosom gelangen. Bei der ungerichteten Makroautophagozytose wird ein Teil des Zytoplasmas von einer Membran umschlossen und bildet schließlich das Autophagosom (AP). Wird das zytoplasmatische Material direkt vom Lysosom aufgenommen, spricht man von Mikroautophagozytose. Gerichtete Aufnahme ins Lysosom ist über chaperonvermittelte Autophagozytose möglich. Abbildung modifiziert nach Luzio et al. (2003).

Je nach Größe der Endozytosevesikel unterscheidet man auch zwischen Pinozytose und Phagozytose. Bei der Pinozytose werden Flüssigkeiten und gelöste Stoffe aufgenommen. Werden große Partikel, wie Mikroorganismen oder tote Zellen, aufgenommen, spricht man

von Phagozytose. Während die Pinozytose in den meisten eukaryotischen Zellen ständig abläuft, wird die Phagozytose hingegen vor allem von spezialisierten phagozytierenden Zellen, den Makrophagen und Neutrophilen, durchgeführt (Alberts et al., 2004). Die Eliminierung von Pathogenen durch Makrophagen und Neutrophile wird durch die Aufnahme des Organismus in eine phagozytotische Vakuole eingeleitet. Diese Vakuole und ihre aus der Plasmamembran abgeleitete Membran werden in der Folge einem ausgiebigen Remodelierungsprozess unterworfen, der mit dem Erhalt von antimikrobiellen und lytischen Eigenschaften einhergeht. Eine solche Reifung bedarf der sequentiellen Fusion mit verschiedenen Komponenten des endolysosomalen Weges (Abb. 2) (Tjelle et al., 2000; Vieira et al., 2002). Frühe Phagosomen interagieren bevorzugt mit frühen Endosomen und verhalten sich wie diese. Als Marker dienen die gleichen Proteine wie bei frühen Endosomen (Tab. 1) (Pitt et al., 1992). Phagosomen verlieren schnell die Eigenschaften von frühen Endosomen und erhalten jene von späten Endosomen und schließlich von Lysosomen (Desjardins et al., 1997). So folgern Vieira und Kollegen, dass die phagosomale Reifung in der gleichen Hierarchie abläuft wie die Endozytose (Vieira et al., 2002).

Beim Ablauf der Phagozytose und der Endozytose spielen außerdem Mikrotubuli, Mikrofilamente und Motorproteine eine Rolle für die intrazelluläre Lokalisation und Dynamik der Vesikel (Abb. 2). Dabei sind die Motorproteine Dynein und Kinesin für den Transport entlang der Mikrotubuli verantwortlich. Eine Depolymerisation der Mikrotubuli führt zu einer gestörten Wechselwirkung zwischen Endosomen und Lysosomen (Matteoni und Kreis, 1987; Gruenberg und Howell, 1989). Eine Fehlfunktion von Dynein hat eine Störung der Fusion von multivesikulären Körperchen mit späten Endosomen zur Folge (Burkhardt et al., 1997; Aniento et al., 1993). Moller und Kollegen nehmen ferner an, dass Aktin neben seiner Rolle bei der Bildung des Phagosoms an der Zelloberfläche auch eine Aufgabe bei der Mobilität von Phagosomen in der Zelle spielt (Moller et al., 2000).

Weiterhin wird im Zusammenhang mit der phagosomalen Reifung eine Interaktion mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) diskutiert. So wurden bei Analysen des Proteoms von Phagosomen ER-spezifische Marker entdeckt (Desjardins, 2003; Gagnon et al., 2005). Touret und Kollegen stellten allerdings in diversen Studien keine Fusionen zwischen dem ER und Phagosomen fest (Touret et al., 2005). Die Regulation der phagosomalen Reifung ist außerdem von der Konzentration an freiem Calcium im Zytoplasma ($[Ca^{2+}]_i$) abhängig (Pryor et al., 2000; Lundqvist-Gustafsson et al., 2000). Bei Störungen in der Regulation des $[Ca^{2+}]_i$ konnten Jaconi et al. eine verminderte Fusion von Phagosomen und Lysosomen feststellen

Die Autophagozytose ist ein lysosomaler Abbauweg, um zytoplasmatische Bestandteile zu degradieren (Eskelinen, 2005; Klionsky und Emr, 2000; Mizushima et al., 2002). In Säugetierzellen ist die Autophagozytose ein wichtiger Überlebensmechanismus während kurzer Hungerzeiten (Eskelinen, 2005). Durch den Abbau von nicht überlebenswichtigen Komponenten erhält die Zelle Nährstoffe für lebensnotwendige biosynthetische Reaktionen. Nach einem Induktionssignal beginnt die Autophagozytose, indem eine flache Membranzisterne einen Teil des Zytoplasmas umschließt (Phagophor). Es bildet sich eine geschlossene, von einer Doppelmembran umgebene Vakuole, die Zytoplasma (und auch Zellorganellen) enthält (Arstila und Trump, 1968). Diese Vakuole wird als frühes Autophagosom (frühe autophagozytotische Vakuole, Avi) bezeichnet und besitzt keine lysosomalen Membranproteine. Die Autophagosomen unterliegen nun einem schrittweisen Reifungsprozess, der Fusionen mit endosomalen und/oder lysosomalen Vesikeln mit sich bringt. Autophagosomen mit bereits teilweise abgebautem Material werden als späte Autophagosomen (späte autophagozytotische Vakuolen, Avd) bezeichnet. Auf diesem Weg gelangt der zytoplasmatische Inhalt der Autophagosomen schließlich ins lysosomale Kompartiment (Autolysosom), wo er vollständig abgebaut wird (Abb. 2) (Dunn, Jr., 1994). Die Abbauprodukte werden wieder ins Zytoplasma transportiert. Inwieweit die Autophagozytose vom Transport über Mikotubuli abhängt, ist bisher wenig untersucht und wird derzeit diskutiert. Von Webb et al. konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit der mikotubulidepolymerisierenden Substanz Nocodazol die Fusion zwischen Autophagosomen und Lysosomen inhibiert (Webb et al., 2004). Fass et al. hingegen fanden bei Zugabe von Nocodazol keinen Effekt auf die Fusion der Autophagosomen mit Lysosomen. Sie konnten jedoch zeigen, dass Autophagosomen (nicht aber Phagophore) mit Mikotubuli assoziieren und mit deren Hilfe transportiert werden (Fass et al., 2006).

Neben der soeben dargestellten Makroautophagozytose wurden die Mikroautophagozytose und die chaperonvermittelte Autophagozytose beschrieben. Bei der Mikroautophagozytose gelangt ein kleiner Teil des Zytoplasmas durch Invagination der Lysosomenmembran in die lysosomale Matrix und die zytosolischen Komponenten werden nach Zerstörung der Vesikelmembran abgebaut (Cuervo und Dice, 1998). Im Gegensatz zu diesen nicht-selektiven lysosomalen Abbauwegen zeigt die chaperonvermittelte Autophagozytose einen direkten Transport von spezifischen Proteinen aus dem Zytosol in die Lysosomen. Die zytosolischen Proteine tragen dabei ein charakteristisches KFERQ-ähnliches Motiv (Dice, 1990), welches von einem Rezeptor in der lysosomalen Membran erkannt wird. Dabei handelt es sich vermutlich um den C-terminalen Teil von LAMP-2A (Cuervo und Dice,

1996). Außerdem wurde beschrieben, dass das Hitzeschockprotein hsc73 eine stimulierende Rolle im selektiven Transport zu dem Lysosomen und bei der Aufnahme in das Kompartiment spielt (Chiang et al., 1989).

Ein weiterer Weg, auf dem Proteine zum Lysosom gelangen, ist der biosynthetische Weg, der im Folgenden näher erläutert wird.

1.3 Zellulärer Transport durch Mannose-6-Phosphatrezeptoren

Säugetierzellen besitzen zwei Arten von Mannose-6-Phosphatrezeptoren (MPRs). Den 46 kD MPR (MPR46) und den 300 kD MPR (MPR300) (Ghosh et al., 2003). MPR46 wird auch kationenabhängiger MPR (CD-MPR) genannt, da er zur Bindung seines Liganden zweiwertige Kationen benötigt. Dagegen wird MPR300 als kationenunabhängiger MPR (CI-MPR) bezeichnet. Es handelt sich bei beiden Rezeptoren um Typ-I-Membranproteine (Wickner und Lodish, 1985), die nach Bindung von Hydrolasen und anderen löslichen Molekülen für deren Transport ins lysosomale Lumen verantwortlich sind. MPRs konnten in hohen Konzentrationen in den Membranen des *trans*-Golgi-Netzwerks (TGN) und in Endosomenmembranen nachgewiesen werden. In geringen Konzentrationen sind sie auch in der Plasmamembran zu finden, während die lysosomale Membran durch ein Fehlen von MPRs charakterisiert ist (Hille-Rehfeld, 1995).

MPR46 hat je nach Spezies 267 bis 284 Aminosäuren und wird in vier Domänen aufgeteilt: die ER-Signalsequenz, eine luminalen Domäne, eine Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Domäne. Die luminalen Domäne beinhaltet das Mannose-6-Phosphat-Bindungsmotiv. Die 46 kD Mannose-6-Phosphatrezeptoren bilden in den Membranen meistens Homodimere aus (Dahms und Kornfeld, 1989; Gong et al., 2006; Roberts et al., 1998).

MPR300 besteht aus einer kurzen NH₂-terminalen Signalsequenz, einer 2269 Aminosäuren langen luminalen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer 167 Aminosäuren langen zytoplasmatischen Domäne. Die luminalen Domäne enthält 15 repetitive Segmente, die jeweils aus ca. 147 Aminosäuren bestehen und in 16-38 % ihrer Reste übereinstimmen (Lobel et al., 1988). Auch zur luminalen Domäne von MPR46 weisen sie eine hohe Homologie auf. Nur zwei Wiederholungseinheiten können jeweils einen Liganden binden (Westlund et al., 1991). MPR300 besitzt 19 potentielle Glykosylierungsstellen, von denen mindestens zwei benutzt werden, was etwa 8 % des Molekulargewichts ausmacht

(Lobel et al., 1988). MPR300 ist daneben in der Lage, den nicht-glykosylierten insulinähnlichen Wachstumsfaktor II (IGF II) zu binden und dadurch dessen extrazellulären Gehalt zu kontrollieren (Tong et al., 1988).

1.4 Transport lysosomaler Proteine durch MPRs

Mehr als 50 verschiedene saure Hydrolasen sind am Abbau von Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten und Nukleinsäuren in den Lysosomen beteiligt. Die Hydrolasen werden als inaktive Vorläuferproteine im rauen ER synthetisiert, wo sie mit Oligosacchariden versehen werden, die terminale Mannosereste enthalten. Vom ER gelangen sie über vesikuläre tubuläre *Cluster* zu den *cis*-Zisternen des Golgi-Apparates (Abb. 3), in denen sie über eine bestimmte Signalregion von der golgiresidenten Glucose-N-Acetyl(GlcNAc)-Phosphotransferase gebunden werden (Kornfeld, 1987; Lazzarino und Gabel, 1988). Die GlcNAc-Phosphotransferase versieht die Hydrolasen (und auch andere lösliche lysosomale Proteine) anschließend mit GlcNAc-Phosphatresten, die an die terminalen Mannosereste der N-Glykane angefügt werden. Bei anschließender Abtrennung des GlcNAc-Rests durch ein zweites Golgi-Enzym entsteht ein terminaler Mannose-6-Phosphatrest. Die so markierten Proteine werden von den Mannose-6-Phosphatrezeptoren (MPRs) im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) erkannt. Nach Bindung an die MPRs schnüren sich die entsprechenden Membranen als clathrinumhüllte Vesikel vom TGN ab. Die Clathrinhüllen dissoziieren anschließend ab, wodurch Transportvesikel entstehen (Campbell et al., 1983; Lemansky et al., 1987), die mit Endosomen fusionieren. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes dissoziieren die lysosomalen Proteine von den MPRs (Dahms und Kornfeld, 1989) und die Rezeptoren gelangen über retrograde Transportvesikel zurück zum TGN (Abb. 3). In den späten Endosomen wird durch eine nicht identifizierte Mannose-6-Phosphatase der terminale Phosphatrest von den Mannoseeinheiten der Proteine abgetrennt (Bresciani et al., 1997), was zusätzlich dafür sorgt, dass die lysosomalen Proteine nicht mit den MPRs zurück zum TGN transportiert werden. Durch proteolytische Prozessierung in späten Endosomen beginnt die Reifung der Hydrolasen zu ihrer aktiven Form, die in den Lysosomen abgeschlossen wird (Gieselmann et al., 1983; Hasilik, 1992; Delbruck et al., 1994). Die MPRs zyklisieren nicht nur zwischen späten Endosomen und dem TGN, sondern unterliegen zusätzlich einem Kreislauf zwischen dem TGN und der Plasmamembran. Fälschlich sekretierte Hydrolasen/Proteine können so auch über einen indirekten Weg zu den Lysosomen transportiert werden. Sie werden an der

Zelloberfläche nur von MPR300 gebunden und endozytiert, obwohl auch MPR46 in der Plasmamembran nachgewiesen werden konnte (Stein et al., 1987; Duncan und Kornfeld, 1988; Ma et al., 1991).

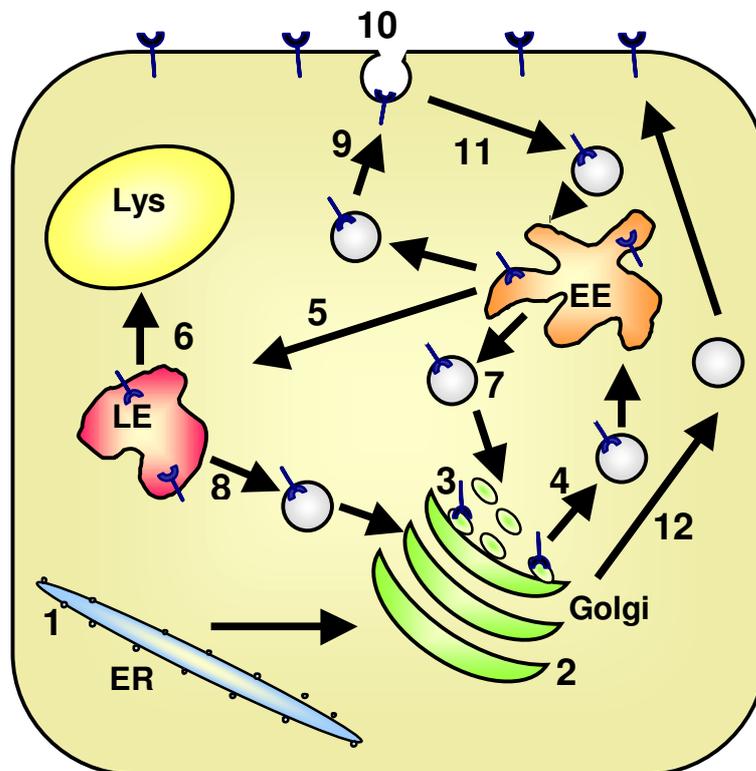


Abb. 3: Intrazellulärer Transport von MPRs und Proteinen zu den Lysosomen. Lösliche lysosomale Proteine werden synthetisiert und in das ER-Lumen transportiert (1). Im TGN (2) erhalten die Proteine den M6P-Erkennungsmarker (3) und binden an die MPRs. Der Rezeptor-Liganden-Komplex wird zum frühen Endosom (EE, 4) befördert. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes dissoziiert der Rezeptor-Liganden-Komplex und die lysosomalen Proteine gelangen über das späte Endosom (LE, 5) zum Lysosom (Lys, 6). Die MPRs werden zurück zum TGN transportiert (7, 8) oder erreichen die Plasmamembran (9). Extrazelluläre Proteine mit Mannose-6-Phosphatrest können über MPR300 internalisiert werden (10) und werden über den Endozytoseweg (11) zu den Lysosomen befördert. Lysosomale Enzyme, die der Bindung an MPRs im TGN entgehen, werden sekretiert (12). Abbildung modifiziert nach Storch und Braulke (2005).

1.5 Die lysosomale Membran und lysosomale Membranproteine

Die lysosomale Membran hat viele Funktionen wie die Ansäuerung der lysosomalen Matrix, die Weitergabe von lysosomalen Enzymen, die Vermittlung der Verschmelzung von Lysosomen mit anderen Organellen und den Transport von Abbauprodukten ins Zytoplasma

(Saftig, 2005). Sie beinhaltet spezifische integrale Proteine wie V-Typ H^+ -ATPasen, glykosylierte Proteine und Transporter (Abb. 4). Neben Cholesterin und Phospholipiden (Bleistein et al., 1980) wurde auch ein hoher Gehalt an Kohlenhydraten nachgewiesen (Lloyd und Forster, 1986). Die Aufgabe der H^+ -ATPasen ist es, das pH-Optimum für die sauren Hydrolasen im Lumen der Lysosomen aufrechtzuerhalten. Unter ATP-Verbrauch entsteht ein ständiger Protonentransport aus dem Zytoplasma über die lysosomale Membran in das Lumen und bewirkt so den dort herrschenden pH-Wert von etwa 5,0 (Forgac, 2000). Durch integrale Transportmoleküle wird der Export von Aminosäuren (Schneider et al., 1984), Sacchariden (Renlund et al., 1986), Nukleosiden (Adra et al., 1996), Cholesterin, Cobalamin (Vitamin B12) (Rosenblatt et al., 1985) und anderen Molekülen, die aus dem hydrolytischen Abbau hervorgehen, ins Zytoplasma ermöglicht. Die hohe Glykosylierung der luminalen Domänen einiger Membranproteine führt zur Ausbildung einer Art von Glykokalyx, die wahrscheinlich den Schutz der Proteine vor Degradierung durch die sauren Hydrolasen gewährleistet (Neiss, 1984). Zu den Membranglykoproteinen gehören die lysosomalen integralen Membranproteine LIMP-1 und LIMP-2 und die lysosomal assoziierten Membranproteine LAMP-1 und LAMP-2, die zusammen mehr als 50 % der lysosomalen Membranproteine ausmachen.

Die beiden LAMP-Proteine wurden bisher intensiver untersucht als andere Proteine der lysosomalen Membran. Beide sind Typ-I-Membranproteine mit einer großen luminalen Ektodomäne, einer Transmembrandomäne und einem kurzen zytoplasmatischen Teil. Die luminal Domäne ist mit einigen O-Glykanen und zahlreichen N-Glykanen glykosyliert (Saftig, 2005). Das konservierte zytosolische Ende hat 11 Reste und enthält ein Glycin-Tyrosin-Motiv, welches wichtig für den intrazellulären Transport zu den Lysosomen ist (Guarnieri et al., 1993; Honing und Hunziker, 1995). Die starke Glykosylierung der LAMP-Proteine verhindert einen Abbau durch lysosomale Hydrolasen (Fukuda, 1991; Kornfeld und Mellman, 1989). Trotz ihrer 37%igen Homologie innerhalb der Aminosäuresequenz sind LAMP-1 und LAMP-2 unterschiedliche Proteine, die sich vermutlich relativ früh in der Evolution getrennt haben, was die Lokalisation auf unterschiedlichen Chromosomen erklärt (Fukuda, 1991).

LAMP-1 (LGP107, LGP120) hat eine molekulare Masse von 90-120 kDa. Der luminal Abschnitt besitzt sechs O-Glykane und 17-20 potentielle N-Glykosylierungsstellen, die zum großen Teil Zucker des komplexen Poly-N-Acetylactosamintyps tragen. Die N-Glykane nehmen etwa 55 % der Proteinmasse ein. Alle bisher untersuchten Funktionen von LAMP-1 konnten bei einer Defizienz durch das in seiner Struktur ähnliche LAMP-2-Protein kompensiert werden. Die Expression von LAMP-2 bei LAMP-1-defizienten Mäusen ist in

Niere, Leber und Herz im Vergleich zum Wildtyp hochreguliert (Andrejewski et al., 1999). Daher zeigen diese keinen auffälligen Phänotyp, bis auf die Entwicklung einer leichten Astrogliose und geringe Unterschiede der Cathepsin D-Immunoreaktivität im Gehirn (Andrejewski et al., 1999). Auch bei Experimenten bezüglich der lysosomalen Stabilität, des intralysosomalen pH-Wertes und der Aktivität von Hydrolasen mit LAMP-1-defizienten Fibroblasten wurden keinerlei Unterschiede zu den Kontrollen festgestellt.

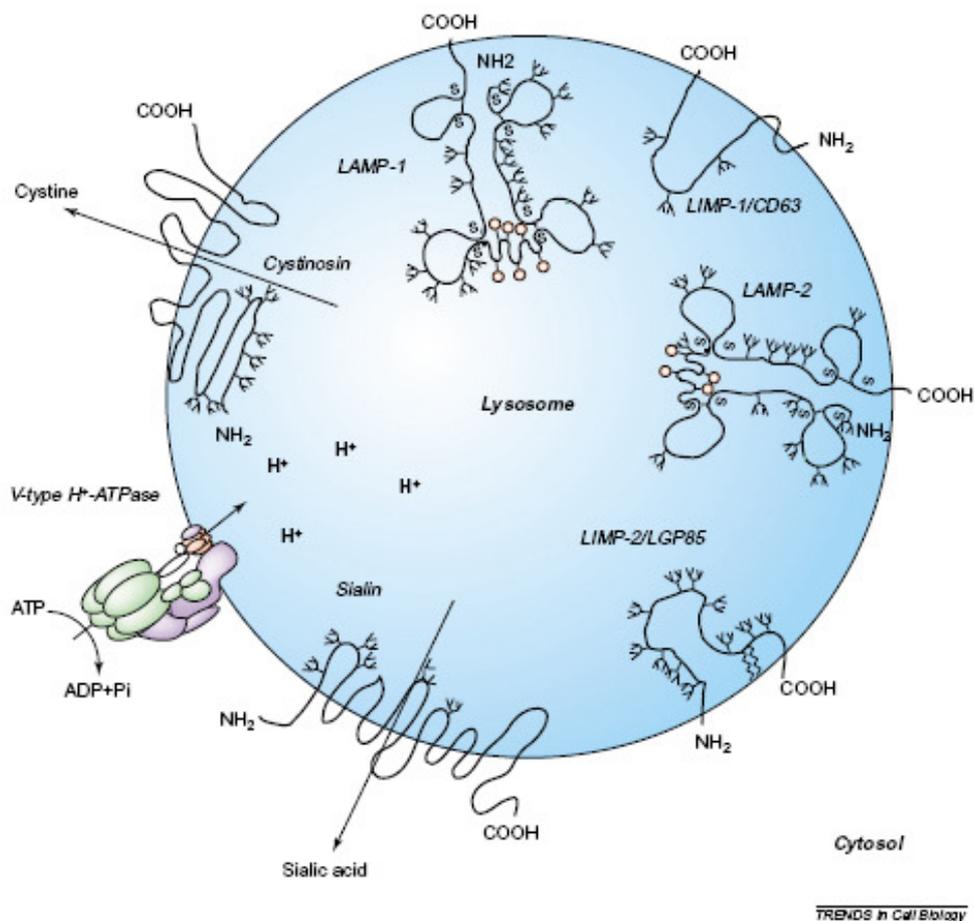


Abb. 4: Schematische Darstellung wichtiger lysosomaler Membranproteine. Die Abbildung stellt das lysosomale Kompartiment mit den Membranproteinen LIMP-1, LIMP-2, Cystinosin, Sialin, der V-Typ H⁺-ATPase sowie LAMP-1 und LAMP-2 dar. Abbildung aus Eskelinen et al. (2003).

LAMP-2 (LGP96, LGP110, 96 und 110 kDa bei der Ratte) hat eine molekulare Masse von 95-120 kDa und mehrere potentielle Glykosylierungsstellen. Das LAMP-2-Protein existiert in drei Isoformen, die durch unterschiedliches Spleißen der Boten-RNA zustande

kommen (Cuervo und Dice, 2000b). LAMP-2A, -2B und -2C unterscheiden sich in ihren Transmembrandomänen und zytosolischen Domänen sowie der subzellulären Lokalisation (Gough und Fambrough, 1997). LAMP-2C zeigt vorwiegend lysosomale Lokalisation, LAMP-2A und LAMP-2B sind dagegen auch an der Zelloberfläche zu finden (Gough und Fambrough, 1997). LAMP-2A wurde als Rezeptor für den selektiven Import und den Abbau von zytosolischen Proteinen in den Lysosomen (chaperonvermittelte Autophagozytose) beschrieben (Cuervo und Dice, 1996; Cuervo und Dice, 1998). LAMP-2-defiziente Mäuse (Defizienz aller Isoformen) zeigen im Gegensatz zu den LAMP-1-defizienten Mäusen einen deutlichen Phänotyp mit einer 50%igen Mortalität zwischen Tag 20 und 40 (Tanaka et al., 2000). Die Mäuse sind insgesamt kleiner als Wildtyptiere. Überlebende Tiere sind fertil und haben eine fast normale Lebenserwartung. Das auffälligste pathologische Charakteristikum ist eine Akkumulation von frühen (Avi) und späten (Avd) autophagozytotischen Vakuolen in zahlreichen Geweben wie z.B. Leber, Pankreas, Milz, Herz und neutrophilen Granulozyten. Die physiologische Bedeutung von LAMP-2 wird durch die Entdeckung, dass ein LAMP-2-Defekt die Ursache der Danon-Krankheit ist, unterstrichen. Bei der Danon-Krankheit handelt es sich um eine lysosomale Speicherkrankheit mit Herzmuskelschwäche, Muskelschwäche und geistiger Retardierung. Die Krankheit zeichnet sich durch eine Akkumulation von Vakuolen mit nicht abgebautem zytoplasmatischen Material in Skelett- und Herzmuskulatur aus (Nishino et al., 2000; Danon et al., 1981; Saftig et al., 2001; Eskelinen et al., 2002).

Mäuse mit einer Defizienz in LAMP-1 und LAMP-2 zeigen eine embryonale Letalität am Embryonaltag 15 und weisen ebenfalls eine Akkumulation von autophagozytotischen Vakuolen in fast allen embryonalen Geweben auf. Die frühe Letalität bestärkt die Hypothese, dass LAMP-1 einen Teil der LAMP-2-Abwesenheit kompensieren könnte (Eskelinen et al., 2004).

Im *steady-state* sind die LAMPs und LAMP-2 hauptsächlich in der spätendosomalen und der lysosomalen Membran zu finden (Fukuda, 1991). Geringe Mengen wurden auch in der Plasmamembran (Lippincott-Schwartz und Fambrough, 1987; Furuno et al., 1989) sowie in der Membran von frühen Endosomen (Griffiths, 1989) detektiert. LAMP-1 und LAMP-2 sind außerdem in der Membran von späten autophagozytotischen Vakuolen entdeckt worden (Tanaka et al., 2000; Eskelinen et al., 2002). Zusätzlich zu ihrer Lokalisation in der lysosomenbegrenzenden Membran wurden LAMP-1 und LAMP-2 auch im endosomalen/lysosomalen Lumen nachgewiesen (Cuervo und Dice, 2000a; Jadot et al., 1996). Es wird vermutet, dass die luminalen LAMP-Moleküle löslich sind, aber es ist auch möglich,

dass sie mit den internen Membranen der Lysosomen oder Endosomen assoziiert sind, was bei LAMP-1 überwiegend der Fall ist (Escola et al., 1998).

Neu synthetisierte LAMPs werden vom TGN hauptsächlich über die intrazelluläre Route zu den Endosomen/Lysosomen transportiert, ohne an der Zelloberfläche zu erscheinen (Fukuda, 1991). LAMP-1 und LAMP-2 Moleküle werden im TGN meist in Vesikel verpackt, die sich von clathrinumhüllten Vesikeln mit MPRs und AP-1-Adaptoren unterscheiden (Karlsson und Carlsson, 1998). Der Transport zum Lysosom hängt dabei von einer Tyrosinsignalsequenz in der zytoplasmatischen Domäne ab (Peters und von Figura, 1994; Hunziker et al., 1996; Le Borgne et al., 1998).

1.6 Bedeutung des Lysosoms für Cholesterintransport und -homöostase

Cholesterin kann von der Zelle entweder durch *de novo* Synthese im ER oder durch Aufnahme von cholesterinhaltigen Lipoproteinen (vor allem *low density lipoprotein*, LDL) über rezeptorvermittelte Endozytose gewonnen werden (Abb. 5). Zelluläres Cholesterin wird vielseitig verwertet. Es wird in Membranen eingebaut, zu extrazellulären Akzeptoren transportiert oder in Cholesterinester, Gallensäuren oder Steroidhormone umgewandelt. Außerdem wird Cholesterin eine Rolle bei der Signaltransduktion und beim intrazellulären Vesikeltransport zugesprochen (Storch und Cheruku, 2005).

Bei der Aufnahme von extrazellulärem Cholesterin werden die mit veresterten Cholesterinmolekülen beladenen LDL-Partikel von den LDL-Rezeptoren auf den Zielzellen erkannt (Chan, 1992). Der Rezeptor-LDL-Komplex gelangt durch Endozytose in clathrinumhüllte Vesikel und über frühe Endosomen zu den späten Endosomen. Durch den dortigen pH-Abfall dissoziiert der LDL-Partikel vom Rezeptor ab, woraufhin dieser über retrograde Transportvesikel wieder an die Zelloberfläche gelangt, wo er weitere LDL-Moleküle binden und in die Zelle führen kann (Brown und Goldstein, 1986). Das LDL wird dagegen zu Lysosomen weiter transportiert, in denen die Cholesterinester durch eine saure Lipase hydrolysiert werden. Das Cholesterin muss nun die Lysosomen verlassen, um die homöostatischen Antworten, die den intrazellulären Cholesterinpool regulieren, auszulösen. Wie der Transport von lysosomalem Cholesterin in der Zelle abläuft, ist bisher noch unklar (Goldstein et al., 1975). Endozytiertes Cholesterin findet sich nach Verlassen des Lysosoms sowohl in der Plasmamembran als auch im ER, wo es teilweise wieder verestert wird. Dabei ist nicht klar, ob das Cholesterin direkt zum ER wandert oder zuerst die Plasmamembran

passieren muss (Abb. 5). Der Transport vom ER zur Plasmamembran, wo im *steady state* 60-80 % des freien Cholesterins zu finden ist (Liscum und Faust, 1994), ist energieabhängig (Liscum und Munn, 1999). Bei der endogenen Biosynthese wird im ER aus 14 Molekülen Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) in einem komplexen, aus vielen Teilschritten bestehenden Prozess ein Cholesterinmolekül produziert (Stryer, 2003). Die zelluläre Cholesterinhomöostase wird durch ein Zusammenwirken vom ER, dem Golgi-Apparat und dem endosomalen/lysosomalen Kompartiment erzielt und ist in Abb. 5 dargestellt.

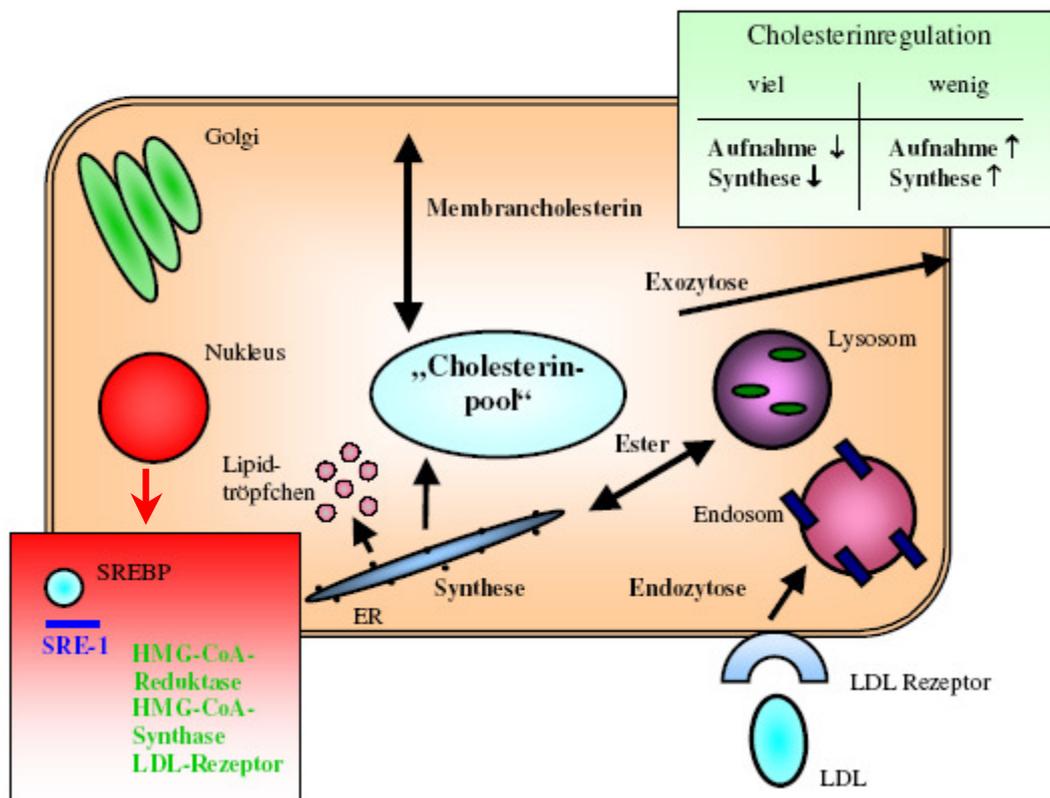


Abb. 5: Cholesterinhomöostase in tierischen Zellen. Nach der Bindung von LDL-Partikeln an den LDL-Rezeptor wird der Komplex über Endozytose in die Zelle aufgenommen und gelangt über frühe und späte Endosomen zum Lysosom. Das in den Lysosomen freigesetzte LDL wird im ER verestert und in Form von Lipidtröpfchen im Zytosol gespeichert. Beim Cholesterintransport aus den Endosomen/Lysosomen heraus sind möglicherweise NPC2 (grüne Ovale) und NPC1 (blaue Rechtecke) beteiligt. Die endogene Cholesterinsynthese findet im ER statt und kann von der Zelle als Membranbestandteil genutzt oder exozytiert werden. Der Cholesterinpool der Zelle wird genau reguliert. Ist der Cholesteringehalt im ER niedrig, wird der Transkriptionsfaktor SREBP frei und kann im Kern an Sterolregulationselemente (SRE-1) in der Promotorregion von cholesterinregulierenden Genen binden. Die endogene Cholesterinsynthese wird gesteigert und die Expression von LDL-Rezeptoren an der Oberfläche erhöht. Bei ausreichend Cholesterin im ER bleibt SREBP gebunden und die Cholesterinsynthese und -aufnahme geht zurück.

Beim Cholesterintransport aus dem Lysosom heraus spielen die Proteine NPC1 (Niemann-Pick Typ C Protein 1) und NPC2 (Niemann-Pick Typ C Protein 2) eine wichtige Rolle. Mutationen in den Genen *NPC1* und *NPC2* führen zu der seltenen, autosomal-rezessiv vererbten Niemann-Pick-Erkrankung (Vanier und Millat, 2003). Die Niemann-Pick-Erkrankung gehört zu den endosomalen/lysosomalen Speicherkrankheiten. Sie ist charakterisiert durch eine starke Anreicherung von freiem Cholesterin und anderen Lipiden in späten Endosomen und Lysosomen dieser Patienten. Man unterscheidet bei der Krankheit vier verschiedene Typen (NPA, NPB, NPC, NPD). Alle Formen sind durch Organomegalie und Neurodegeneration gekennzeichnet. Niemann-Pick Typ A und B sind auf ein Fehlen der lysosomalen Sphingomyelinase zurückzuführen. Da NPC und NPD ein verwandtes klinisches Erscheinungsbild aufweisen, werden sie ebenfalls in die Gruppe der Niemann-Pick-Erkrankungen eingeordnet, wobei NPD eine genetische Unterform von NPC darstellt. Das klinische Erscheinungsbild von NPC-Patienten ist durch eine früh einsetzende Neurodegeneration gekennzeichnet, die langsam fortschreitet, mit Ataxie, epileptischen Anfällen und Schlafstörungen einhergeht und in später Adoleszenz oder im frühen Erwachsenenalter zum Tod führt (Garver und Heidenreich, 2002).

Bei der Mehrheit der Patienten (95 %) wurde eine Mutation im *NPC1* Gen gefunden. Das NPC1-Protein ist ein 1278 Aminosäuren großes Membranglykoprotein, das in LAMP-positiven Vesikeln lokalisiert ist (Zhang et al., 2001). Der hochkonservierte N-Terminus des Proteins enthält ein Leucinzippermotiv und wird NPC1-Domäne genannt (Abb. 6A). Es schließt sich ein Abschnitt mit 13 Transmembrandomänen an, welcher Sequenzen enthält, die eine starke Homologie zu den Sterolsensordomänen (SSD) vom SREBP-*Cleavage-Activating-Protein* (SCAP) und der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMGCoA-Reduktase) aufweisen. Stromabwärts der SSD liegt eine zytoplasmatische Schleife mit acht Cysteinen. Es folgt schließlich ein C-Terminus mit einem Dileucinmotiv, welches für den Transport von NPC1 zu den Endosomen von Bedeutung ist (Watari et al., 1999). NPC1 bindet Cholesterin mit einer geringen Affinität (Ohgami et al., 2004) und wurde als transmembrane Pumpe für Lipide vorgeschlagen (Davies et al., 2000).

5 % der NPC-Patienten tragen eine Mutation im *NPC2*-Gen, welches ein 13-18 kDa kleines, lösliches, lysosomales Glykoprotein kodiert. Zunächst wurde NPC2 als cholesterinbindendes Protein HE1 (humanes epididymales Protein 1) in der epididymalen Flüssigkeit (Nebenhoden) von Säugetieren beschrieben (Okamura et al., 1999), bis es im Jahr 2000 von Naureckiene et al. mit der NPC-Krankheit in Zusammenhang gebracht wurde (Naureckiene et

al., 2000). NPC2 bindet Cholesterin mit hoher Affinität (Abb. 6C) in einer 1:1-Stöchiometrie und ist wichtig für die Kontrolle des lysosomalen Cholesterinspiegels. Interessanterweise wurde NPC2 in vielen Geweben als sekretorisches Protein beschrieben, obwohl es einen lysosomalen Mannose-6-Phosphatrest trägt und im lysosomalen Kompartiment lokalisiert ist (Naureckiene et al., 2000; Okamura et al., 1999; Zhang et al., 2003).

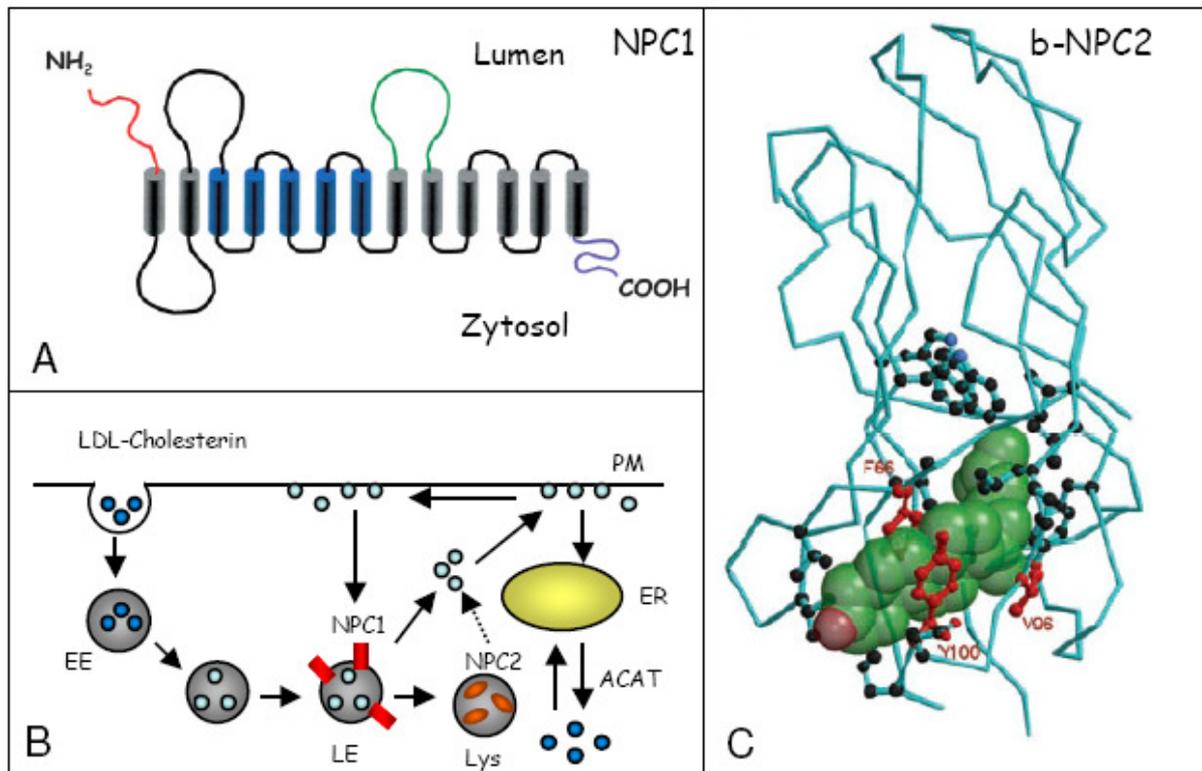


Abb. 6: NPC1 und NPC2 im zellulären Cholesterintransport. A: Membrantopologie von NPC1. NPC1 hat 13 Transmembrandomänen (gezeigt als Zylinder), von denen fünf eine Homologie zu den SSD der HMG-CoA-Reduktase, SCAP und Patched (blau) zeigen. Der luminal N-Terminus (rot) enthält ein Leucinzippermotiv, welches bei NPC1 hochkonserviert ist. NPC1 besitzt außerdem eine große, cysteinreiche luminal Schleife, die ein Ringfingermotiv (grün) enthält und ein C-terminales Dileucinmotiv. Abbildung aus Ory et al. (2004). B: Modell zur Funktion von NPC1 und NPC2 im Cholesterintransport der Zelle nach Ory et al. (2004). LDL-Partikel werden über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen und gelangen vom frühen Endosom (EE) zum späten Endosom (LE). LDL-Cholesterin wird im spätendosomalen Kompartiment von Cholesterinestern (blaue Kreise) zu freiem Cholesterin (hellblaue Kreise) hydrolysiert. NPC1 (rote Balken) spielt eine Rolle beim Transport von LDL-freiem Cholesterin über die Plasmamembran (PM) zum ER. Im ER wird das freie Cholesterin durch die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) wieder verestert und als Lipidtröpfchen im Zytosol gespeichert. Obwohl NPC2 (orange Ovale) zur Wiederveresterung von LDL-Cholesterin benötigt wird, ist es hauptsächlich in Lysosomen (Lys) zu finden. Seine exakte Rolle im Cholesterintransport ist bisher noch nicht bekannt. C: Strukturmodell von bovinem NPC2 mit möglicher Cholesterinbindestelle. Die

Seitenketten Phe66, Val96 und Tyr100 spielen eine essentielle Rolle bei der Cholesterinbindung und sind in rot dargestellt. Ein semitransparentes Cholesterinmolekül (grün) wurde manuell an die vorgeschlagene Sterolbindestelle angepasst. Es ist zu bedenken, dass das Cholesterinmolekül aufgrund von sterischen Zusammenstößen zwischen den Seitenketten, die die Tasche auskleiden, trotz seiner passenden Größe und Form, nicht in die Bindetasche passt. Daher ist es wahrscheinlich, dass sich die Tasche dehnen muss, um Cholesterin zu binden (Friedland et al., 2003).

Subzelluläre Fraktionierungen von Rattenlebern (Naureckiene et al., 2000) sowie immunozytochemische Untersuchungen an humanen Fibroblasten und CHO-Zellen ergaben, dass NPC2 hauptsächlich in Cathepsin D-positiven Lysosomen lokalisiert war und NPC1 eher in späten Rab7-positiven, Cathepsin D-negativen Endosomen zu finden war. Es wurde nur eine geringe Kolo-kalisation von NPC1 und NPC2 detektiert (Zhang et al., 2003). Eine Transfektion von NPC2-RFP (rotfluoreszierendes Protein) in Fibroblasten mit NPC2-Mutation ergab eine Abnahme der Cholesterinakkumulation in den Lysosomen. In Fibroblasten mit *NPC1*-Mutation konnte dieser Effekt durch eine Transfektion mit NPC2-RFP nicht erzielt werden (Zhang et al., 2003). Es wurde vorgeschlagen, dass NPC1 und NPC2 an zwei verschiedenen Stellen des Cholesterin- und Lipidtransportes aus späten Endosomen und Lysosomen wirken. NPC2 könnte Cholesterin von internen spätendosomal/lysosomal Membranen binden und eine Interaktion mit NPC1 oder einem anderen Protein ermöglichen, welches das Cholesterin weiterleitet (Abb. 6B) (Vanier und Millat, 2004). Es wurde allerdings in einer anderen Studie gezeigt, dass NPC1 Cholesterin auch in NPC2-defizienten Zellen binden konnte und somit nicht von einer Wechselwirkung mit NPC2 abhängig war (Ohgami et al., 2004). Zhang et al. fanden heraus, dass NPC1 in lipoproteinfreiem Medium im Gegensatz zum lysosomal NPC2 in der ganzen Zelle verteilt war und nur bei LDL-Aufnahme in späten Endosomen lokalisierte. NPC1 könnte daher als Sterolsensor bei erhöhtem zellulären Cholesterintransport dienen. Nach dieser Hypothese erreicht überschüssiges Cholesterin, das nicht von NPC1 mobilisiert werden kann die Lysosomen, in denen NPC2 den Transport übernimmt (Zhang et al., 2003). Die exakten Funktionen von NPC1 und NPC2 auf zellulärer und molekularer Ebene sowie ihr Zusammenspiel untereinander und mit anderen Proteinen sind bisher noch nicht aufgeklärt.

1.7 Neutrophile Granulozyten: Phagozyten mit spezialisierten Lysosomen

Neutrophile Granulozyten (segmentkernige Leukozyten, PMNs) sind hoch spezialisierte weiße Blutzellen, die durch einen segmentierten Kern und granuläres Zytoplasma gekennzeichnet sind (Abb. 7A) (Stengel, 1905). Sie sind Bestandteile des angeborenen, unspezifischen Abwehrsystems des Körpers und gehören zu den ersten Immunzellen, die am Ort einer Infektion eintreffen. Ihre Aufgabe besteht unter anderem in der Bekämpfung von meist bakteriellen Infektionen (Janeway et al., 2002). Um diese Aufgabe zu erfüllen, besitzen Neutrophile eine Reihe von antimikrobiellen Eigenschaften. Sie haben die Fähigkeit zur Phagozytose, indem sie durch Ausstülpung der Membran als Pseudopodium das Pathogen umhüllen. Für eine effiziente Phagozytose ist die Interaktion von Komplement- und F_C-Rezeptoren des Granulozyten mit opsonisierenden Strukturen (Immunglobuline, Komplement) auf der Oberfläche des Pathogens förderlich (Janeway et al., 2002). Granulozyten verdanken ihren Namen der ausgeprägten zytoplasmatischen Granulierung. Sie enthalten vier verschiedene Granulatypen, die sich in ihrer Proteinzusammensetzung und Funktion voneinander unterscheiden und zum Teil mit Lysosomen verwandt sind (Dell'angelica et al., 2000). Insgesamt sind bislang mehr als 50 verschiedene Proteine als Bestandteile der diversen Granula bekannt. Die Primärgranula (azurophile Granula), deren Markerprotein die Myeloperoxidase darstellt, verschmelzen mit den Phagosomen nach Phagozytose und entleeren ihren Inhalt (v.a. hydrolytische und bakterizide Proteine) in das neue Kompartiment (Faurischou und Borregaard, 2003). Demgegenüber sind die Sekundärgranula (spezifische Granula, Markerprotein: Laktoferrin) wesentlich für die Exozytose ihrer Inhaltsstoffe vorgesehen. Neben den primären und sekundären Granula wurden auch tertiäre Granula (Gelatinasegranula) und sekretorische Vesikeln beschrieben. Die sekretorischen Vesikel sind vor allem wegen ihrer Membranen wichtig, welche eine hohe Anzahl von Rezeptoren enthalten wie z.B. Mac1 oder fMLP-Rezeptoren, die so an die Zelloberfläche gelangen. Die Exozytose tertiärer Granula ist womöglich für die Migration der Neutrophilen durch die Basalmembranen notwendig, deren Kollagenbestandteile Substrate der Gelatinase sind (Borregaard und Cowland, 1997).

Ausgerüstet mit diesen vielfältigen Granula verfügen Neutrophile über ein breites Spektrum oxidativer und nicht-oxidativer Abwehrmechanismen gegenüber Pathogenen. Durch das Enzymsystem der NADPH-Oxidase werden im sogenannten *respiratorischen Burst* (Abb. 7B) aus molekularem Sauerstoff Superoxidanionen und durch weitere Umsetzung

Hydroxylradikale und Hypochlorsäure gebildet (Roitt et al., 2006). Diese hochreaktiven Verbindungen wirken antimikrobiell, aktivieren Metalloproteinasen und inaktivieren Antiproteinasen, was unter anderem zur Gewebeschädigung im Rahmen einer vermittelten Entzündung führt (Dallegrì und Ottonello, 1997). Neben den oxidativen Abwehrsystemen besitzen Granulozyten in ihren Granula verschiedene nicht-oxidativ operierende antimikrobielle Proteine (Defensine, Cathepsine, Azurocidin, BPI (*bacterial-permeability increasing protein*), Laktoferrin). Nach Verrichtung ihrer Aufgabe im Rahmen der Inflammation sterben Granulozyten rasch durch Apoptose oder Nekrose ab und werden durch Makrophagen phagozytiert (Gemsa, 1997; Janeway et al., 2002).

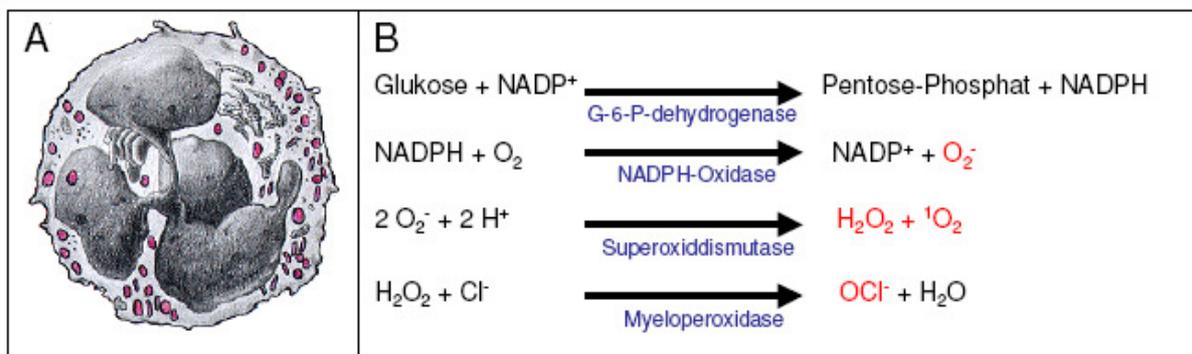


Abb. 7: Neutrophile Granulozyten und respiratorischer Burst. A: Zeichnung eines neutrophilen Granulozyten. Charakteristisch ist der segmentierte Kern. Die einzelnen Segmente sind über Chromatinbrücken verbunden. Im Zytoplasma befinden sich zahlreiche Granula (farbig hervorgehoben), die für die oxidativen und nicht-oxidativen Abwehrfunktionen benötigt werden. Abbildung aus Weather et al. (1987) B: Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, in rot) beim *respiratorischen Burst*. Das über den Pentosephosphatweg gewonnene NADPH wird von der NADPH-Oxidase oxidiert und es entsteht ein Superoxidanion, welches selbst eine limitierte Toxizität besitzt, aber von der Superoxiddismutase in Wasserstoffperoxid umgewandelt wird, welches Chloridionen zur extrem toxischen Hypochlorsäure (HOCl) oxidiert (Hunt, 2006).

1.8 Parodontitis als Folge gestörter Phagozytenfunktionen

In unserer Mundhöhle gibt es eine Vielzahl verschiedener Krankheitserreger und bakterieller Keime, die sich ständig auf der Zahnoberfläche, dem Zahnfleisch und besonders den Zahnbelägen (Plaque) ansiedeln. Neben Karies ist Parodontitis die am weitesten verbreitete Erkrankung der Mundhöhle und tritt hauptsächlich bei Erwachsenen auf. Weltweit leiden etwa 30-50 % der Erwachsenen an einer schweren chronischen Parodontitis (Pilot und

Miyazaki, 1994). Es handelt sich dabei um eine bakteriell bedingte Entzündung, die in einer weitgehend irreversiblen Zerstörung des Zahnhalteapparates (Parodontium) enden kann (Abb. 8). Im Frühstadium kommt es, ausgelöst durch bakteriellen Plaque (Biofilm), zu einer Gingivitis (Zahnfleischentzündung) bei der sich durch die entzündliche Schwellung der Gingivialis (Zahnfleisch) vertiefte Zahnfleischtaschen bilden, sich aber noch kein röntgenologisch nachweisbarer Knochenabbau zeigt. Eine lang andauernde Gingivitis kann auf die Kieferknochen, die Wurzelhaut und den Zahnzement übergreifen. Nicht jede Gingivitis entwickelt sich zur Parodontitis. Milde Formen der Erkrankung sind weit verbreitet. Bei fast jedem Erwachsenen finden sich vereinzelte Verluste der Zahnhalterung, ohne dass funktionelle Probleme entstehen (Müller, 2006). Sowohl bei der Gingivitis als auch bei der Parodontitis werden aus dem Biofilm bakterielle Stoffwechsel- und Zerfallsprodukte freigesetzt, die Abwehrreaktionen des Körpers auslösen. Neutrophile bilden die erste Barriere des Mundraumes gegen eingedrungene Mikroorganismen. Patienten mit Abnormalitäten in der Quantität oder Qualität dieser Phagozyten, wie fehlerhafte Adhäsion, Phagozytose, Chemotaxis oder Degranulierung, zeigen daher eine erhöhte Prädisposition für Parodontitis (Delcourt-Debruyne et al., 2000; Gombart und Koeffler, 2002).

Die Hauptrolle bei der parodontalen Gewebszerstörung spielt das eigene Immunsystem, das versucht, die Bakterien zu beseitigen. Die Immunantwort besteht aus einer vielfältigen Abfolge von Reaktionen und Aktionen, bei der verschiedene proinflammatorische Substanzen und Zellen beteiligt sind. Unter anderem werden Enzyme gebildet, die die Bakterien zerstören sollen, jedoch auch eine Zerstörung des Eigengewebes verursachen, was letztlich zum Verlust von Bindegewebe und Knochen führt (Taubman et al., 2005).

Von den etwa 500 verschiedenen Bakterienspezies, die in der Mundhöhle vorkommen können, sind nur wenige parodontalpathogen. Diese werden als Hauptleitkeime bezeichnet und sind obligat oder fakultativ anaerobe, gramnegative Bakterien wie z.B. *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Bacteroides forsythus* (Müller, 2006).

Im Vergleich zum Menschen sind die interdentalen Abstände bei Mäusen sehr gering, was die Wahrscheinlichkeit für die Bildung parodontaler Taschen minimal hält. Besonders im ersten Lebensjahr sind die Zähne und die Kiefer drastischen physiologischen Veränderungen wie Wachstum, schneller Abnutzung und kontinuierlichem Zahnwechsel unterworfen. Aus diesem Grund wurde Parodontitis bei Mäusen nur selten beobachtet (Page und Schroeder H.E., 1982). Sheppe fand bei Wildmäusen der Rasse *Peromyscus oreas* spontane Parodontitis, was aber eine Ausnahme darstellt (Sheppe, 1965). Greulich und Ershoff beobachteten bei Mäusen, die einer subletalen Dosis Röntgenstrahlung ausgesetzt wurden, eine ausgeprägte

Parodontitis mit starkem Knochenabbau, Taschenbildung und bakteriellen Plaques. Keines dieser Merkmale wurde bei nicht bestrahlten Kontrolltieren gefunden. Diese Experimente deuteten darauf hin, dass eine schlechtere Abwehr und Schädigung des Knochenmarks der Mäuse, sowie die daraus resultierenden Effekte auf die Phagozyten, die Anfälligkeit für Parodontitis stark erhöhten (Greulich und Ershoff, 1961).

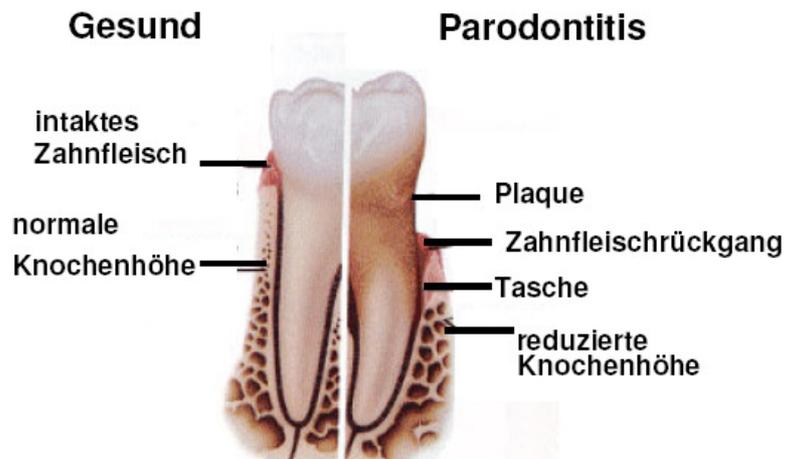


Abb. 8: Merkmale einer aggressiven Parodontitis. Im gesunden Gewebe (links) wird der Zahn von intaktem Zahnfleisch und Bindegewebe in der Alveole (Zahnfach) des Kiefers gehalten. Bei einer Parodontitis sind Zahnfleisch und Knochen reduziert und es bilden sich Taschen zwischen Zahn und Zahnfleisch, in denen sich leicht Bakterien ansiedeln können und schließlich zur Plaquebildung führen. Abbildung modifiziert nach Foutz (2004).

2. Fragestellung

2.1 Wie wirkt sich eine MPR-Defizienz auf die Funktion und den Transport von NPC2 aus?

Die lysosomale Speicherkrankheit Niemann-Pick Typ C (NPC) wird durch Mutationen in den Genen *NPC1* oder *NPC2* verursacht. Charakteristisch bei dieser Krankheit ist die Akkumulation von freiem Cholesterin und anderen Lipiden in endosomalen und lysosomalen Kompartimenten. NPC2 ist ein kleines, lösliches, lysosomales Protein, das womöglich über einen mannose-6-phosphatvermittelten Transport zu diesem Kompartiment gelangt und Cholesterin mit hoher Affinität bindet. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der beiden Mannose-6-Phosphatrezeptoren (MPRs) MPR46 und MPR300 beim NPC2-Transport zu den Lysosomen genauer zu beschreiben. Hierfür wurden der Transport und die Funktion von NPC2 in Fibroblasten mit einer Defizienz in MPR46, MPR300 oder in beiden MPRs untersucht. Es sollte dabei die Lokalisation von NPC2 in den verschiedenen Zelllinien und dessen Rolle beim Cholesterintransport betrachtet werden.

2.2 Welche Rolle spielt LAMP-2 bei der Phagozytose und Prozessierung von Pathogenen?

LAMP-2 gehört zu den lysosomalen Membranproteinen. Bisher wurden Aufgaben bei der lysosomalen Reifung, der Autophagozytose sowie beim Cholesterintransport beschrieben. Bei Mäusen mit einer LAMP-2-Defizienz traten bei konventioneller Haltung Zeichen einer Parodontitis auf, was häufig bei Störungen in der Funktion von neutrophilen Granulozyten beobachtet wird. Das lysosomale System von Neutrophilen enthält eine Vielzahl von hydrolytischen Enzymen, die bei der Phagozytose von Pathogenen ins Phagosom abgegeben werden können und die Abtötung des Pathogens erreichen. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, warum eine LAMP-2-Defizienz eine erhöhte Anfälligkeit Plaqueakkumulation und Parodontitis bei LAMP-2-defizienten Mäusen zur Folge hatte. Hierfür sollte die Entwicklung von Parodontitis bei LAMP-2 Knockoutmäusen charakterisiert und die Rolle von LAMP-2 bei der Phagozytose und bei der Prozessierung von Pathogenen untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Enzyme und Materialien

Für diese Arbeit wurden Chemikalien, Enzyme und Materialien von folgenden Firmen bezogen:

| | |
|--|--|
| Amersham Biosciences, Uppsala, S | ECLplus WB Detection System, ECLadvanced WB Detection System, Protein-G-Sepharose |
| Applichem, Darmstadt | Formaldehydlösung |
| BioRad, München | D _C Protein Assay, Molekulargewichtsmarker |
| Calbiochem, LaJolla, USA | Mowiol, NP-40 |
| Fermentas, St. Leon-Rot | dNTPs, Enzyme, 6x Ladepuffer |
| Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe | LysoTracker Red DND-99, Alexa Fluor Antikörper, DAMP, Cholera toxin |
| PAA Laboratories, Linz, A | Penicillin/Streptomycin 100x, DMEM, Trypsin- EDTA, RPMI-1640, FKS |
| Roche, Mannheim | High Pure PCR Product Purification Kit, Complete Proteaseinhibitor, Endo H, FuGene 6, PNGase F, Ni-NTA |
| Roth, Karlsruhe | Acrylamid Rotiphorese Gel 30, Agarose Ultra- Qualität, β -Mercaptoethanol, Ethidiumbromid- lösung (1%ig), Nitrozellulose, PVDF-Membran, Whatmanpapier |
| Sarstedt, Nümbrecht | 6-, 24- und 96-Well-Platten, Zellkulturschalen (3, 6 und 10 cm), Zellschaber, Kunststoffverbrauchs- materialien |
| Sigma Aldrich, Steinheim | BSA, DABCO, DAPI, Filipin Complex, Saponin, Triton X-100, Tween 20, Latexkügelchen, Zymosan, HRPO |

Eine ausführliche, alphabetische Auflistung der verwendeten Geräte, Chemikalien, Kits und Materialien findet sich im Anhang.

3.1.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 2 aufgelistet. Es handelt sich dabei um *E. coli* K-12 Derivate. Die verwendeten Plasmide sind in Tab. 3 und die verwendeten Oligonukleotide in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 2: Verwendete *E.coli*-Stämme

| Stamm | Genotyp | Referenz |
|--------------|--|----------------------------------|
| DH5 α | F ⁻ ϕ 80dlacZAM15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA endA1 hsdR17 (r _K ⁻ , m _K ⁺) | Takara, Shiga, Japan |
| XL1-blue | RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q ZAM15 Tn10 (Tet ^r)] | Stratagene, La Jolla, CA, USA |
| SG13009 | Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , Lac ⁻ , Ara ⁻ , Gal ⁻ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺ | Qiagen, Hilden |

Tab. 3: Verwendete Plasmide

| Plasmid | Resistenz | Eigenschaften | Referenz |
|-------------|-----------|--|-------------------------------------|
| pEGFP-N1 | Kan | Vektor mit <i>Green Fluorescent Protein</i> GFP aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i> | Clontech, Mountain View, CA, USA |
| pGFPuv | Amp | GFP-Derivat nach Carmeri et al, 1996 im pUC19-Derivat pPD16.43 | Clontech, Mountain View, CA, USA |
| pLAMP-2a | Amp | murines LAMP-2a in pCIneo | Eskelinen et al. (2004) |
| pMPR46 | Amp | humanes MPR46 in PBHE2222 | Breuer et al. (1997) |
| pMPR46HMY | Amp | murines MPR46 in pMES18s | Itin et al. (1997) |
| pMPR300 | Amp | humanes MPR300 in pCIneo | Korner et al. (1995) |
| pRab7-GFP | Kan | Rab7 Hund in pEGFP-C1 | Bucci et al. (2000) |
| pQE31-AcGFP | Amp | pQE31 (Qiagen) mit <i>Aequorea</i> <i>coerelescens</i> GFP (Clontech) | C. Plieth, ZBM, Kiel |

Tab. 4: Verwendete Oligonukleotide

| Oligonukleotid | Sequenz |
|-----------------|--------------------------------------|
| MycoF1 | 5' ACACCATGGGAGCTGGTAAT 3' |
| MycoF2 | 5' GTTCTTTGAAAACCTGAAT 3' |
| MycoR1 | 5' CTTCWTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT 3' |
| MycoR2 | 5' GCATCCACCAWAWACTCT 3' |
| LAMP-2 exon_fw | 5' CAAGGCGACACACGATGGAAGCA 3' |
| LAMP-2 exon_rev | 5' CTTTAGCTACAGCACCAGGAAAT 3' |
| Neo_3 | 5' GTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTG 3' |
| Neo_4 | 5' GCGAACAGTTCGGCTGGCGCGAGCCCCTGA 3' |

3.1.3 Antikörper

Sämtliche Antikörper wurden in wässriger Lösung aufbewahrt. Für die Langzeitlagerung wurden Aliquots bei -20°C bzw. -80°C eingefroren. Die Antikörper wurden für Immunfluoreszenz (IF) in 3 % BSA in PBS und für den Westernblot (WB) in 5 % Milchpulver in TBS-T (TBS, 0,1 % Tween 20) aufgenommen. Die Bezeichnung der Antikörper, ihre Herstellung und Herkunft sowie Verdünnung der Antikörper im Versuch sind in Tab. 5 angegeben.

Tab. 5: Verwendete Antikörper

| Antikörper | erzeugt in | IF | WB | Herkunft |
|--------------------------------------|------------|-------|--------|--|
| Primärantikörper | | | | |
| α-Aktin | Maus | 1:50 | -- | DSHB, Iowa City, USA |
| α-Maus-B220 | Ratte | 1:200 | -- | BD Transduction Laboratories, Heidelberg |
| α-Maus-CD8 | Ratte | 1:50 | -- | BD Transduction Laboratories, Heidelberg |
| α-N-Cadherin | Maus | -- | 1:2500 | BD Transduction Laboratories, Heidelberg |
| α-Disulfidisomerase (1D3) | Maus | 1:20 | -- | Stephen Fuller |
| α-DNP | Kaninchen | 1:200 | -- | ICN Biomedicals, Eschwege |
| α-Dynein, 74 kDa Intermediate Chains | Maus | 1:50 | -- | Chemicon Int. Inc., Temecula, CA, USA |

| | | | | |
|---|-----------|---------------|----------|--|
| α -GM-2 | Kaninchen | 1:50 FACS | -- | Acris Antibodies, Hiddenhausen |
| α -Gr1-PE | Maus | 1:100 FACS | -- | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| α -Maus-F4/80-FITC | Rat | 1:100 | -- | Serotec, Düsseldorf |
| α -Lakto(trans)ferrin | Kaninchen | 1:50 | -- | Upstate, Temecula, CA, USA |
| α -Maus-LAMP-1 (1D4B) | Ratte | 1:50 | -- | DSHB, Iowa City, USA |
| α -Maus-LAMP-2 (ABL93) | Ratte | 1:50 | -- | DSHB, Iowa City, USA |
| α -LBPA/BMP | Maus | 1:10 | -- | Jean Gruenberg |
| α -Ratte-LIMP-2 tail | Kaninchen | 1:50 | -- | Y.Tanaka |
| α -MPO | Kaninchen | 1:50 | -- | Dianova, Hamburg |
| α -Maus-MPR46 (MSC1) | Kaninchen | 1:50 | 1:1000 | Klumperman et al. (1993) |
| α -Mensch-MPR46 (10C6) | Maus | 1:50 | -- | K.von Figura |
| α -Ratte-MPR300 | Kaninchen | 1:100 | 1:400 | Claussen et al. (1995) |
| α -Ratte-MPR300 (I-5) | Kaninchen | 1:50 | -- | K.von Figura |
| α -Mensch-MPR300 (I-2) | Ziege | 1:50 | -- | K.von Figura |
| α -Mensch c-Myc epitop (9E10) | Maus | -- | 1:40 | Santa Cruz, Heidelberg |
| α -Maus-NPC1 | Kaninchen | 1:100 | 1:1000 | W.S. Garver |
| α -Mensch-NPC2 | Kaninchen | 1:100 | 1:1000 | S.Patel |
| α -Syntaxin-6 | Maus | 1:100 | -- | BD Transduction Laboratories |
| α -Maus-Thy1.2-Biotin | Maus | 1:50 FACS | -- | Caltag/Invitrogen, Karlsruhe |
| α -Tubulin | Maus | 1:50 | 1:500 | DSHB, Iowa City, USA |
| Sekundärantikörper | | | | |
| α -Kaninchen, HPR-konjugiert, sc2313 | Esel | -- | 1:10.000 | Santa Cruz, Heidelberg |
| α -Maus, HPR-konjugiert | Kaninchen | -- | 1:10.000 | Santa Cruz, Heidelberg |
| α -Ratte, HPR-konjugiert | Esel | -- | 1:10.000 | Santa Cruz, Heidelberg |
| α -Kaninchen Alexa Fluor 488, 594 | Esel | 1:200 | -- | Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe |
| α -Kaninchen Alexa Fluor 488, 594 | Ziege | 1:200 | -- | Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe |
| α -Maus Alexa Fluor 488, 594 | Esel | 1:200 | -- | Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe |

| | | | | |
|--------------------------------------|-------|---------------|----|--|
| α -Maus Alexa Fluor 488, 594 | Ziege | 1:200 | -- | Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe |
| α -Ratte Alexa Fluor 488, 594 | Esel | 1:200 | -- | Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe |
| α -Ratte Alexa Fluor 488, 594 | Ziege | 1:200 | -- | Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe |
| α -Ratte-IgG2b-FITC | Maus | 1:100 FACS | -- | BD Transduction Laboratories, Heidelberg |
| α -Ratte-IgG2b-PE | Maus | 1:300 FACS | -- | Southern Biotech, Birmingham, AL, USA |
| Streptavidin-PE-Cy7 | -- | 1:100 FACS | -- | Caltag/Invitrogen, Karlsruhe |

3.1.4 Zelllinien

Die in Tab. 6 aufgeführten Zelllinien wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Tab. 6: Verwendete Zelllinien

| Zelllinie | Eigenschaften | Kulturbedingungen | Referenz |
|---------------|--|----------------------------------|------------------------|
| MPR46 -/- | embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40 Antigen | DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep | Pohlmann et al. (1995) |
| MPR300 -/- | embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40 Antigen | DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep | Pohlmann et al. (1995) |
| MPR46/300 -/- | embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40 Antigen | DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep | Pohlmann et al. (1995) |
| PS 1 +/+ SV | embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40 Antigen | DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep | D. Hartmann, Leuven, B |
| # 3 +/+ | embryonale Mausfibroblasten, primär oder spontan transformiert | DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep | eigene Arbeitsgruppe |
| # 5 +/+ | embryonale Mausfibroblasten, primär oder spontan transformiert | DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep | eigene Arbeitsgruppe |
| CHO-K1 | Hamster Ovarzellen | Ham's F12, 10% FKS, 1% Pen/Strep | ATCC, Wesel |
| COS-7 | Nieren-Fibroblasten aus der afrikanischen Grünen Meerkatze <i>Cercopithecus aethops</i> , immortalisiert mit dem großen SV40 T-Antigen | DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep | ATCC, Wesel |
| HeLa | menschliche epithelartige Zelllinie aus einem Zervix-Karzinom | DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep | ATCC, Wesel |

3.1.5. Mausstämme

Die in Tab. 7 aufgeführten Mausstämme wurden in den tierexperimentellen Einrichtungen der Universitäten Göttingen und Kiel in konventioneller Haltung oder unter sterilen Bedingungen in individuell belüfteten Käfigen (*individually ventilated cages*, IVCs) gehalten. Die Temperatur in den Mausräumen betrug 19-21°C und die Luftfeuchtigkeit 45-60 %. Es wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden (6-18 Uhr) Helligkeit und 12 Stunden Dunkelheit eingehalten. Die Tiere erhielten Wasser und Trockenfutter *ad libitum*. Die Versuche wurden gemäß der Richtlinien der europäischen Union durchgeführt und von der deutschen Tierschutzbehörde genehmigt.

Tab. 7: Verwendete Mausstämme

| Stamm | Eigenschaften |
|------------|---|
| LAMP-2 +/+ | Synonym: CD53S; Wildtyp mit einem gemischten genetischen Hintergrund aus C 57 BL/6J x 129 SV/J; eigene Auszucht |
| LAMP-2 -/- | LAMP-2 defizienter Stamm mit einem gemischten genetischen Hintergrund aus C 57 BL/6J x 129 SV/J; eigene Auszucht, Herstellung in Tanaka et al. (2000) beschrieben |

3.1.6 Medien und Lösungen

| | |
|---------------------------|---|
| DMEM | PAA Laboratories, Linz, A |
| RPMI-1640 | PAA Laboratories, Linz, A |
| Erythrozytenlysepuffer | 0,16 M NH ₄ Cl; 0,01 M KHCO ₃ ; 0,1 mM Na-EDTA; pH 7,4 |
| FKS | PAA Laboratories, Linz, A; 30 min hitzeinaktiviert bei 56°C |
| Ham's F12 | PAA Laboratories, Linz, A |
| HBSS | PAA Laboratories, Linz, A |
| Immunpräzipitationspuffer | 20 mM Natriumphosphat; 500 mM NaCl; 0,1% SDS (w/v); 1% NP-40 (v/v); 0,5 % Natriumdesoxycholat; HCl pH 7,5 in H ₂ O |
| LB-Medium | 10 % Trypton/Pepton aus Casein (w/v); 5 % Hefeextrakt (w/v); 10 % NaCl (w/v); pH 7,0 |

| | |
|-------------------------|--|
| 1 x PBS | 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 7,4 |
| PBA | PBS; 0,5 % BSA (w/v); 0,02% NaN ₃ (w/v) |
| PRS | 140 mM NaCl; 10 mM NaH ₂ PO ₄ ; 5,5 mM Saccharose; 0,56 mM Phenolrot; pH 7,0; sterilfiltriert mit 0,22 µm Filter |
| Penicillin/Streptomycin | 100x Stammlösung (10.000 µg/ml), PAA Laboratories, Linz, A |
| SSC | 20x; 0,3 M Trinatriumcitrat; 3 M NaCl; pH 7-8 |
| TBS | 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 25 mM Tris; pH 7,4 |
| TBS-T | TBS; 0,01 % Tween |
| Thioglykolat | Difco, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg |
| Trypsin-EDTA | PAA Laboratories, Linz, A |

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Methoden wurden, soweit nicht anders angegeben, nach den Standardprotokollen von Sambrook, Fritsch und Maniatis durchgeführt (Sambrook et al., 1989).

3.2.1.1 DNA-Gehaltsbestimmung

Die Nukleinsäurekonzentration in einer Lösung wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt (GeneQuant pro, Biochrom, Cambridge, UK). Eine OD von 1,0 bei dieser Wellenlänge entspricht einem Doppelstrang-DNA-Gehalt von 50 µg/ml. Aus dem Verhältnis der OD bei 260 nm zu der OD bei 280 nm konnte die Reinheit der DNA abgeschätzt werden. Reine Doppelstrang-DNA weist ein Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ von 1,8 auf. Das Verhältnis sollte für doppelsträngige DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Abweichende Werte deuteten auf Verunreinigungen besonders durch Proteine hin.

3.2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit 1-2%igen Agarosegelen (w/v) in einer horizontalen Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,11 % Essigsäure (v/v) in H₂O) als Laufmittel. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose (Ultraqualität, Roth, Karlsruhe) unter Erhitzen in TAE-Puffer gelöst und mit 1%iger Ethidiumbromid-Lösung (Roth, Karlsruhe) in einer Endkonzentration von 0,8 µg/ml versetzt. Die leicht abgekühlte noch flüssige Agarose wurde in eine zu diesem Zweck abgeklebte Gelkammer gegossen. Daraufhin wurden zwei Kämmen möglichst luftblasenfrei eingesteckt und das Gel zum Erstarren etwa 45 min bei RT stehengelassen. Die Proben wurden 10:1 mit Auftragspuffer versetzt (Fermentas, St. Leon-Rot). Ein 1 kb-Molekulargewichtsmarker diente als Standard (Roche, Mannheim), von dem 10 µl aufgetragen wurden. Die Auftrennung wurde für ca. 30 min bei einer konstanten Spannung von 120 V durchgeführt. Sollten die Fragmente nicht weiterverwendet werden, wurde die DNA durch das gebundene Ethidiumbromid bei Beleuchtung mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda=312$ nm sichtbar gemacht. Die beleuchteten Gele wurden mit Hilfe der Geldokumentationsanlage Gel Jet Imager (Intas, Göttingen) fotografiert und die Fotos ausgewertet. Sollte mit der DNA weitergearbeitet werden, wurde das entsprechende Fragment zum Schutz vor Mutationen aus dem Gel entfernt (3.2.1.3), bevor das restliche Gel zur Auswertung fotografiert wurde.

3.2.1.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung wurde das Gelstück der gewählten DNA-Bande mit Hilfe eines Skalpellens auf einem UV-Tisch bei Beleuchtung mit einer Wellenlänge von 366 nm (Reprostar, Camag, Muttenz, CH) aus dem Gel herausgeschnitten. Die Verwendung von UV-Licht geringerer Intensität verminderte das Risiko der Mutationsentstehung. Die in den Gelstücken enthaltene DNA wurde mit dem Agarosegeleextraktionskit von Roche (Mannheim) nach Angaben des Herstellers isoliert.

3.2.1.4 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Aus einem bei -80°C gelagerten Aliquot *E. coli* XL1 blue wurde zunächst ein Verdünnungsausstrich auf einer LB-Agarplatte mit 50 μl Tetrazyklin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit einer Einzelkolonie von der Platte eine Vorkultur von 50 ml LB Medium mit 50 μl Tetrazyklin angeimpft und über Nacht angezogen. Aus der Vorkultur wurden dann 20 ml abgenommen und zum Animpfen einer 1 l-Kultur LB-Medium (ohne Tetrazyklin) verwendet. Die Bakterienkultur wurde bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,5 bis 0,6 bei 37°C geschüttelt und anschließend unter Schütteln auf Eis heruntergekühlt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Durch eine Zentrifugation von 15 min bei $4000 \times g$ und 4°C wurden die Zellen pelletiert. Nun wurde das Pellet zweimal mit 250 ml eiskaltem H_2O bidest gewaschen und anschließend in 50 ml eiskalter 10%iger Glycerinlösung resuspendiert. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 20 min bei $1500 \times g$ und 4°C , woraufhin das Zellpellet in 2 ml 10%iger Glycerinlösung aufgenommen wurde. Schließlich wurde die Bakteriensuspension in auf Trockeneis gekühlte Eppendorfgläser aliquotiert (50 μl) und bei -80°C eingefroren.

3.2.1.5 Transformation durch Elektroporation

Vor der Elektroporation wurden die bei -80°C gelagerten *E. coli*-Bakterien des Stammes XL1-Blue auf Eis aufgetaut. Die Bakterien wurden mit 1 μl Vektor-DNA versetzt und in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette transformiert. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 400Ω und 25 μF im Gene Pulser (BioRad, Hercules, USA). Anschließend wurden die transformierten Bakterien in 1 ml antibiotikafreies LB-Medium überführt und für 30 min bei 37°C im Thermoblock geschüttelt. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension 2 min bei $10.500 \times g$ in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. 750 μl des Überstandes wurden abgenommen und die pelletierten Bakterien in den restlichen 250 μl LB-Medium resuspendiert. Schließlich wurde die Bakteriensuspension auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C für 12-16 Stunden bis zur Plasmidamplifikation (3.2.1.6) inkubiert.

3.2.1.6 Plasmidamplifikation und –aufreinigung

Die über Nacht gewachsenen Kolonien der transformierten, auf LB-Agarplatten ausgestrichenen Bakterien wurden mit sterilen Zahnstochern gepickt. Je nach Bedarf wurden 3 ml oder 200 ml ampicillinhaltiges LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin) angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Plasmide wurden bei 3 ml Ansätzen mit dem Miniprep Kit von Peqlab (Erlangen), bei 200 ml Ansätzen mit dem Jet Star Plasmid Purification Kit (Genomed GmbH, Löhne) oder dem Pure Yield Plasmid Midiprep System (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.2.1.7 Präparation genomischer DNA aus Schwanzgewebe

Zur Genotypisierung der LAMP-2-defizienten Mäuse wurde im Alter von ca. drei Wochen ein etwa 0,5-1 cm langes Stück der Schwanzspitze geschnitten. Die DNA wurde nun mit Hilfe des Kits InnuPrep DNA Mini Kit (AJ Innuscreen, Jena) nach Angaben des Herstellers isoliert, wobei mit zweimal 50 µl MilliQ-H₂O (Millipore, Schwalbach) eluiert wurde. Die DNA-Menge konnte anschließend mit dem DNA-Photometer (GeneQuant pro, Biochrom Ltd, Cambridge, UK) bestimmt werden.

3.2.1.8 Genotypisierung von LAMP-2-defizienten Mäusen

Die präparierte DNA aus Schwanzbiopsien von LAMP-2-defizienten Mäusen (3.2.1.7) wurde zur Überprüfung des Genotyps eingesetzt. Durch eine LAMP-2 Exon-PCR kann das intakte *Lamp-2*-Gen mit den ausgewählten Primern (Tabelle 2.3) nachgewiesen werden. Die LAMP-2-defizienten Mäuse wurden durch Einfügen einer Neo-Kassette in das Exon „X“ hergestellt (Tanaka et al., 2000) und konnten mit Neo-spezifischen Primern (Tab. 4) identifiziert werden. Für die jeweilige PCR wurde zunächst ein Premix (wie in Tab. 8 aufgeführt) hergestellt. Anschließend erfolgte die Herstellung des PCR-Ansatzes (Tab. 9). Das PCR-Programm ist in Tab. 10 wiedergegeben. Für die Neo-PCR wurde eine Annealingtemperatur von 58°C und für die LAMP-2-Exon-PCR von 50°C festgesetzt. Nach der PCR folgte eine Zugabe von 6x DNA Loading Buffer (Fermentas, St. Leon-Rot) und die Proben wurden auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und das Ergebnis dokumentiert (3.2.1.2). Bei der Neo-PCR ergab sich eine Bande in Höhe von ca. 290 bp. Die LAMP-2-Exonbande lag bei etwa 250 bp (Abb. 9).

Tab. 8: PCR-Premix-Ansatz

| Substanz | 1x |
|--|--------------|
| Oligo 1 (Exon oder Neo) | 1 µl |
| Oligo 2 (Exon oder Neo) | 1 µl |
| 10x Puffer (+ MgCl ₂), Roche | 5 µl |
| dNTPs, 2 mM Stock, Fermentas | 5 µl |
| Taq DNA Polymerase, Roche | 0,5 µl |
| DMSO | 1 µl |
| Milli-Q H ₂ O | |
| Volumen total | 30 µl |

Tab. 9: PCR-Ansatz

| Substanz | µl |
|----------------------------|--------------|
| Premix (Neo oder Exon) | 30 µl |
| 1,5 µg DNA | x µl |
| H ₂ O add 50 µl | x µl |
| Volumen total | 50 µl |

Tab. 10: PCR-Programm

| | | |
|------------------------|------|-----------------------------|
| 1 | 5' | 95°C |
| 2 | 15'' | 96°C |
| 3 | 30'' | 58°C (Neo) oder 50°C (Exon) |
| 4 | 2' | 72°C |
| 5 | 3' | 72°C |
| 6 | ∞ | 4°C |
| Schritt 2-4 30x | | |

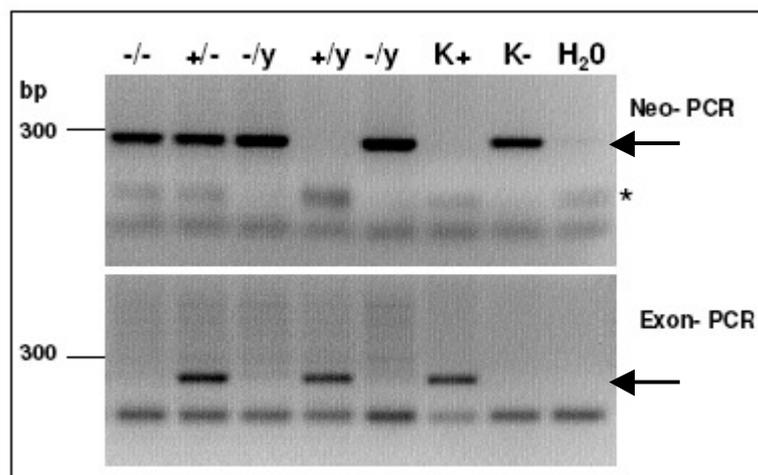


Abb. 9: Genotypisierung von LAMP-2-defizienten Mäusen. Die PCR-Proben wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und durch Elektrophorese aufgetrennt. Der Genotyp, der sich nach Auswertung des Gels ergab, ist über den einzelnen Gelspuren angegeben. Im oberen Feld ist das Ergebnis der Neo-PCR gezeigt. * = unspezifische Bande. Das untere Feld zeigt das Ergebnis der Exon-PCR. Als Kontrollen dienten Wildtyp-DNA (K+) und DNA einer durch Immunfluoreszenz verifizierten LAMP-2-defizienten Maus (K-). Eine Wasserprobe (H₂O), bei der der Premix ohne DNA-Zugabe für die PCR benutzt wurde, wurde ebenfalls aufgetragen.

3.2.1.9 RNA-Isolation

Fibroblasten von einer 10 cm-Schale (50-100 mg) wurden mit 1 ml Trizol geerntet und anschließend 10 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert, um Zelldebris zu entfernen. Nach einer Inkubation des Überstands für 5 min bei RT wurden 200 µl Chloroform pro ml Trizol zugegeben, kurz geschüttelt und der Ansatz 2 bis 3 min bei RT stehen gelassen. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 12.000 x g und 4°C. Es haben sich zwei Phasen gebildet: In der unteren, roten Phase befindet sich die DNA, in der oberen, farblosen, wässrigen Phase die RNA. Die wässrige Phase wurde nun in ein frisches Röhrchen überführt und 500 µl Isopropanol pro ml Trizol zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT und einer zehnminütigen Zentrifugation bei 12.000 x g wurde die RNA als gelartiges Pellet sichtbar. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, das Pellet in 75 % Ethanol (1 ml pro ml Trizol) aufgenommen und sorgfältig resuspendiert. Es wurde nun erneut zentrifugiert (5 min, 7.500 x g, 4°C), der Überstand abgenommen und das Pellet fast vollständig getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 10 bis 50 µl RNase freiem Wasser gelöst, 10 min bei 55°C inkubiert und dann bei -20°C gelagert.

3.2.1.10 Northernblot

| | |
|--------------------------------|---------------------------------|
| 10x Formaldehyd (FA) Gelpuffer | 200m M MOPS |
| | 50 mM Na-Acetat |
| | 10 mM EDTA |
| | pH 7,0 in DEPC-H ₂ O |

Bei der Durchführung musste stets darauf geachtet werden, dass alle Materialien und Reagenzien RNase-frei waren. Dafür wurde zunächst RNase-freies Diethylpyrocarbonat-(DEPC) H₂O hergestellt, indem 0,1 % DEPC-H₂O (v/v) 12 Stunden gerührt und anschließend autoklaviert (Inaktivierung von DEPC in CO₂ und Ethanol) wurde. Alle Plastikmaterialien wurden in RNase-freiem Puffer (0,1 M NaOH und 1 mM EDTA in DEPC-H₂O) gelegt und anschließend mit DEPC-H₂O gespült. Nun wurde ein 1,2%iges FA-Agarosegel (1,2 g Agarose; 10 ml 10x FA Gelpuffer; ad 100 ml mit RNase-freiem H₂O; aufkochen und abkühlen lassen; 1,8 ml 37 % Formaldehyd zugeben; 8 µl Ethidiumbromid zufügen) gegossen. Die wie in 3.2.1.9 hergestellte RNA wurde mit Ladepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt, 3 bis 5 min bei 65°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. 2 bis 10 µg RNA wurden pro Bahn auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese bei 120 V für 60-70 min laufen

gelassen. Überschüssiges Gelmaterial wurde abgeschnitten und die Banden wurden unter UV-Licht fotografiert (mit Lineal zur Markierung). Das Gel wurde nun 15 min in H₂O eingelegt und anschließend zweimal 15 min in 20x SSC äquilibriert. In der Zwischenzeit wurde die Northern-Apparatur, wie im Handbuch für die Hybond N+ Membran (Amersham Pharmacia Biotech) beschrieben, vorbereitet und schließlich mit dem Gel aufgebaut. Es wurde über Nacht geblottet und anschließend, nach einem Waschschrift der Membran, die RNA unter UV-Licht mit der Membran vernetzt und somit fixiert. Die getrocknete Membran wurde dann in Folie eingeschlagen und bei RT gelagert. Die Filter wurden mit *NPC1* oder *NPC2* cDNA sowie β -Aktin cDNA als Kontrolle (Clontec, Palo Alto, CA, USA) hybridisiert. Die Hybridisierung und das Waschen der Filter erfolgten wie bei Lehmann et al. beschrieben (Lehmann et al., 1992) und wurden freundlicherweise von Ellen Eckermann-Felkl (Universität Göttingen) durchgeführt.

3.2.2 Biochemische Methoden

3.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen geerntet und das Zellpellet (3.2.3.4) je nach Größe mit 50-400 μ l Lysispuffer (2 % NP-40 (v/v); 0,2 % SDS (w/v) in PBS mit Proteaseinhibitor) durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren mit einer 100 μ l-Eppendorfpipette lysiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis, gefolgt von einem weiteren Resuspensionsschritt. Im Anschluss wurde das Lysat 5 min zur Abtrennung von Zellkernen und anderem Zelldebris bei höchster Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, mit dem Überstand wurde eine Proteinbestimmung (3.2.2.4) durchgeführt. Je nach Konzentration wurde das Lysat mit 2-5x konzentriertem, reduzierenden SDS-PAGE Probenauftragspuffer (4x Stammlösung: 250 mM Tris/HCl pH 6,8; 9 % SDS (w/v); 40 % Glycin (v/v); eine Spatelspitze Bromphenolblau; 25 % β -Mercaptoethanol (v/v) in H₂O) versetzt und 5 min im Thermoblock bei 95°C erhitzt. Die Proben wurden entweder direkt auf ein Polyacrylamidgel (3.2.2.6) aufgetragen oder bei -20°C verwahrt.

3.2.2.2 Membranpräparation

Für eine Membranpräparation wurden die eingefrorenen Zellpellets auf Eis aufgetaut und mit 500 µl TBS mit Proteaseinhibitor (Roche) versetzt. Es folgte eine zweimalige Ultraschallbehandlung von 10 s mit einem Ultraschallstab (Micro Ultrasonic Cell Disrupter, Kimble/Kontes, Vineland, USA; *Output*-Einstellung 20-40). Die anschließende Membranpräparation erfolgte durch Ultrazentrifugation bei 4°C in einer Beckman Optima™ TLX Ultrazentrifuge (45 min, 100.000 x g, TLA 55-Rotor, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Membranpellet wurde zum Lösen der Proteine je nach anfänglicher Zellpelletgröße mit 100-500 µl Puffer (0,1 % Triton X-100 (v/v) in TBS mit Proteaseinhibitor *Cocktail*) versetzt. Es folgte eine dreimalige Ultraschallbehandlung von 30 s mit anschließender 30-minütiger Inkubation auf Eis. Nach einer erneuten zweimaligen Ultraschallbehandlung wurden die Membranpräparationen 5 min bei höchster Geschwindigkeit in einer auf 4°C gekühlten Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und eine Proteinbestimmung des Überstandes nach 3.2.2.4 durchgeführt. Die Membranpräparationen wurden je nach Konzentration mit 2-5fach konzentriertem, reduzierendem SDS-PAGE Probenauftragspuffer versetzt und 5 min in einem Thermoblock bei 37°C erwärmt. Wurden die Proben nicht im direkten Anschluss auf ein Polyacrylamidgel (3.2.2.6) aufgetragen, erfolgte eine Lagerung bei -20°C.

3.2.2.3 Herstellung von Gewebehomogenaten

Für Westernblots von löslichen Proteinen wurden bei -80°C gelagerte Organe gewogen und durch Zugabe von 9 Volumen (v/w) TBS (mit Proteaseinhibitor) und anschließendes Zerkleinern mit einem Homogenisator (Xenox, Roth, Karlsruhe) ein 10%iger Gewebeextrakt hergestellt. Die Gewebeextrakte wurden bei -20°C eingefroren und auf Eis wieder aufgetaut, 3 x 20 s ultraschallt und 15 min bei 11.000 x g und 4°C in der Eppendorfszentrifuge geklärt. Vom Überstand wurde eine Proteinbestimmung (3.2.2.4) durchgeführt und die Proben mit Probenpuffer versetzt (3.2.2.1).

Für Westernblots lysosomaler Membranproteine wurde der Gewebeextrakt zunächst auf 1 % Triton X-100 eingestellt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Ultraschallbehandlung (3 x 10 s) und eine 15-minütige Zentrifugation bei 18.000 x g und 4°C in der TL-100 Ultrazentrifuge (Beckman, Krefeld) im TLA-55 Rotor. Nach einer Proteinbestimmung wurden die Proben für die SDS-PAGE vorbereitet (3.2.2.6).

3.2.2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehalts von Zelllysaten und Membranpräparationen wurde der D_C Protein Assay (BioRad, München) benutzt. Dieser Assay toleriert gängige Detergenzien wie Triton X-100, SDS, Tween 20 oder NP40 in einer Konzentration von bis zu 1 % und ist daher besonders geeignet für die in Anwesenheit von Detergenz hergestellten Proteinlösungen. Dabei wurde nach dem Protokoll für Mikrotiterplattenassays im Produkthandbuch gearbeitet. Abweichend vom Protokoll wurden statt 5 µl für die Bestimmung 10 µl eingesetzt und die Extinktion wurde bei 650 nm statt bei 750 nm mit dem Mikrotiterplattenleser Sunrise (Tecan, Crailsheim) gemessen. Als Standard dienten selbst hergestellte BSA-Verdünnungen in ddH₂O. Es wurden Doppelwerte gemessen und deren Mittelwert für die Berechnung der Proteinkonzentration verwendet.

3.2.2.5 Deglykosylierung mit N-Glykosidase F und Endoglykosidase H

Für die Deglykosylierung wurden N-Glykosidase F (PNGase F) und Endoglykosidase H (Endo H) von Roche (Mannheim) verwendet. Die gewählten Bedingungen entsprachen dabei den Angaben des Herstellers. Zuvor wurden Zelllysate wie unter 3.2.2.1 beschrieben hergestellt und der Proteingehalt bestimmt (3.2.2.4). Beim Verdau mit PNGase F wurden die Proteine des Zellextrakts zunächst in 50 mM Na₃PO₄-Puffer (pH 7,8; 1 % SDS (w/v); 1 % 2-Mercaptoethanol (v/v); Proteaseinhibitor) durch eine Inkubation für 5 min bei 100°C denaturiert. Die Deglykosylierung erfolgte in 50 mM Na₃PO₄-Puffer (pH 7,5; 0,1 % SDS (w/v); 0,1 % 2-Mercaptoethanol (v/v); 1 % NP-40 (v/v); Proteaseinhibitor). Es wurde 1 Unit (U) PNGase F für 20 µg Protein verwendet und für 3 Stunden bei 37°C verdaut. Bei der Deglykosylierung mit Endo H wurden Denaturierung und Verdau in 100 mM Natriumcitratpuffer (pH 5,5; 0,5 M Natriumrhodanid; 0,1 % 2-Mercaptoethanol; 1 % SDS; Proteinaseinhibitor) durchgeführt. Für 25 µg Protein wurden 6,35 mU eingesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Deglykosylierung konnte schließlich im Westernblot (3.2.2.7) im Vergleich zu unverdaulichem Protein kontrolliert werden.

3.2.2.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE dient zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Dies geschieht mit Hilfe eines SDS-haltigen Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystems nach Laemmli (Laemmli, 1970). Sollten bis zu neun Proben im Gel aufgetrennt werden, wurde ein vertikales Mini-Protean-3-Elektrophoresis-System verwendet (BioRad, Hercules, USA). Für bis zu 19 Proben stand ein vertikales Twin Model L (45-2019i) von peqLab Biotechnology (Erlangen) zur Verfügung. Die 1,5 mm dicken Trenngele besaßen je nach untersuchter Proteingröße einen Acrylamidanteil von 7,5 % (NPC 1) bis 15 % (NPC 2). Im 1,5 mm dicken Sammelgel fand sich stets ein Acrylamidanteil von 4,5 %. Als Proteinstandard diente Precision Plus Protein Standard All Blue Molekulargewichtsmarker von BioRad (München). Der Gellauf wurde mit einem Vorlauf von ca. 10 min bei 80 V und einem Gellauf bei 120-130 V durchgeführt. Durch eine Färbung mit Coomassiefärbelösung (0,1 % Coomassie Brilliant Blue (w/v) (Sigma, Steinheim); 40 % Methanol (v/v); 10 % Essigsäure (v/v) in H₂O) nach Weber und Osborn (Weber und Osborn, 1969) oder durch Immunoblotting (3.2.2.7) konnten die aufgetrennten Proteine anschließend detektiert werden. Coomassiegefärbte Gele wurden in 5 % Methanol (v/v) und 7,5 % Essigsäure (v/v) entfärbt und zur längeren Konservierung zwischen zwei Cellophanfolien in einem SDS-Geltrockner (GelAir Dryer, BioRad, München) getrocknet.

3.2.2.7 Immunoblot (Westernblot)

Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen aus einem 5-15%igen Gel auf eine PVDF-Membran (Roti-PVDF, Roth, Karlsruhe) erfolgte mittels einer *Semi-Dry-Blot*-Apparatur (Transblot SD, BioRad, München). Zuerst wurde das SDS-Gel kurz in Transferpuffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris/HCl pH 8,5; 10 % (v/v) Methanol) äquilibriert und blasenfrei auf die mit Methanol äquilibrierte PVDF-Membran gelegt. Beiderseits wurden zwei Lagen Whatmanpapier der Stärke 1,5 mm hinzugefügt. Die Proteine wurden für 70 min bei 20 Volt geblottet. Die transferierten Proteine wurden mit Ponceau S-Lösung (Ponceau S Solution, Sigma Aldrich, Steinheim) auf der PVDF-Membran angefärbt. Mit dieser Methode konnte zum einen die Übertragungseffizienz des Westernblots abgeschätzt werden, zum anderen konnte kontrolliert werden, ob von den verschiedenen Proben ähnliche Proteinmengen transferiert worden waren. Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese 60 min mit 3 % Magermilchpulver in TBS-T blockiert, um die

unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran zu verhindern. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in einem 50 ml-Röhrchen für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf einem Rundumschüttler (Assistent, Sondheim). Die Antikörper wurden in 3 % Magermilchpulver in TBS-T verdünnt. Die Membran wurde danach dreimal 20 min mit TBS-T gewaschen und für eine Stunde mit dem Meerrettichperoxidase (HRPO) -gekoppelten Sekundärantikörper bei RT im 50 ml-Röhrchen auf einem Rundumschüttler inkubiert. Schließlich wurde die Membran erneut dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen. Durch eine HRPO-katalysierte Chemolumineszenzreaktion (ECLplus- bzw. ECLadvanced Western Blotting Detection Systems, Amersham, Little Chalfont, UK, Durchführung nach Angaben des Herstellers) konnten die markierten Proteine über eine Chemolumineszenzkamera (LAS-1000, Fujifilm, Kanagawa, Japan) visualisiert und die Membran fotografiert werden (Expositionszeit zwischen 1 s und 30 min). Neben einer qualitativen Auswertung erfolgte in einigen Fällen eine densitometrische Auswertung der Banden mit der Software PCBAS (Raytest GmbH, Straubenhardt, Version 2.09g).

3.2.2.8 Strippen von Westernblots

In einigen Fällen wurden Westernblots zur immunologischen Detektion verschiedener Proteine wiederverwendet. Bei dem als *Strippen* bezeichneten Verfahren werden die gebundenen Antikörper mithilfe von thermischer Energie, Detergenzien und Reduktionsmitteln entfernt. Die ursprünglich auf die Membran transferierten Proteine bleiben weitgehend erhalten und können mit einem anderen Antikörperpaar detektiert werden. Zunächst wurde der Westernblot zweimal 10 min mit TBS-Tween gewaschen, um restliches ECLplus-Reagenz von der Detektion des ersten Proteins zu entfernen. Anschließend wurde die Membran 30 min mit *Stripping* Puffer (62,5 mM Tris/HCl; 0,83 % β -Mercaptoethanol (v/v); 2 % SDS (w/v) in H₂O) bei 70°C im Wärmeschrank inkubiert und darauf erneut zweimal 10 min mit TBS-T bei RT gewaschen. Nun konnte die Membran erneut mit Antikörper inkubiert werden.

3.2.2.9 Quantitativer Cholesterinnachweis

Neben der qualitativen Cholesterinuntersuchung durch Fluoreszenzversuche mit Filipin wurde ein quantitativer Nachweis mit dem Amplex-Red Cholesterin Assay Kit A-12216 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) durchgeführt. Durch eine im Reaktionsreagenz enthaltene Cholesterinoxidase wird dabei freies Cholesterin unter H_2O_2 -Entstehung zu dem entsprechenden Keton oxidiert. In einer 1:1 stöchiometrischen Reaktion reagiert das entstandene H_2O_2 in einer HRPO-katalysierten Reaktion mit dem Amplex-Red-Reagenz zu Resorufin, das fluorometrisch nachgewiesen werden kann. Je nachdem, ob Cholesterinesterase den Ansätzen beigelegt wurde, konnte der Gesamtgehalt an Cholesterin oder nur die Menge an freiem Cholesterin in den Zellen bestimmt werden. Bei der Durchführung wurde nach dem vom Hersteller angegebenen Standardprotokoll für Mikrotiterplatten gearbeitet. Die Probenvorbereitung erfolgte weitgehend wie die Zellextrakttherstellung in 3.2.2.1. Für die Lyse wurde ein anderer Puffer verwendet (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 2 mM CaCl₂; 80mM NaCl; 1 % Triton X-100 (v/v)), der im Dunkeln bei 4°C gelagert wurde. Nach Bestimmung des Proteingehalts (siehe 3.2.2.4). wurden die Proben mit Reaktionspuffer aus dem Kit verdünnt. Ziel war es, eine Cholesterinkonzentration von 8 µg/ml Probe zu erhalten, um den linearen Bestimmungsbereich des Amplex-Red-Reagenz nicht zu verfehlen. Hierfür wurde ein ungefährender Cholesteringehalt von 25 µg/mg Protein angenommen und die Proben dementsprechend auf eine Proteinkonzentration von etwa 0,32 mg/ml eingestellt. Der Versuch erfolgte in schwarzen Mikrotiterplatten. Die Ansätze wurden nach einer halbstündigen Inkubation bei 37°C im Dunkeln in dem Fluorolite 1000 Mikrotiterplattenleser von Dynatech (Dynex, Denkendorf) bei einer Anregungswellenlänge von 530-560 nm und einer Emissionswellenlänge von ca. 590 nm gemessen.

3.2.2.10 ³⁵S-Cys/Met-Pulse-Chase mit anschließender NPC2-Immunpräzipitation

Vor Versuchsbeginn wurden dialysiertes, steriles FKS (dFKS), kalte Zellysate (3.2.2.1) und blockierte Sepharose vorbereitet. Es wurden pro Zelllinie drei 60 mm-Schalen bis zur 70-80%igen Subkonfluenz kultiviert. Von jeder Zelllinie wurden Immunpräzipitationen von Medium und Zellextrakten direkt nach dem *Pulse* und nach zwei unterschiedlich langen *Chase*-Perioden durchgeführt.

Die Schalen wurden zunächst auf Eis gestellt, die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 3 ml Immunpräzipitationspuffer (20 mM Natriumphosphat; 500 mM

NaCl; 0,1% SDS (w/v); 1% NP-40 (v/v); 0,5 % Natrium-desoxycholat; HCl pH 7,5 in H₂O) geerntet (3.2.3.4). Nach dem Lysieren (3.2.2.1) wurde das Zellpellet verworfen und der Überstand bis zum Blockieren der Protein-G-Sepharose bei -20°C eingefroren. Für den Versuch wurde eine Protein-G-Sepharose-Suspension in 20 % Ethanol verwendet (Amersham, Uppsala, S). Von der gut geschüttelten Protein-G-Sepharose-Suspension wurde ein Aliquot abgenommen und zweimal in Immunpräzipitationspuffer gewaschen. Daraufhin wurde die Sepharose mit gleichem Volumen Puffer als 1:1 Suspension resuspendiert und mit kalten Zellextrakten 1 h unter Schütteln mit einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation in einer Tischzentrifuge wurde der Überstand verworfen und die pelletierte Protein-G-Sepharose zweimal in Immunpräzipitationspuffer gewaschen. Die auf diese Weise vorbehandelte Protein-G-Sepharose wurde für die Immunpräzipitation eingesetzt.

Vor dem ³⁵S-*Pulse* wurden die Zellen 1 h in Methionin und Cystein (Met/Cys) freiem DMEM (PAA Laboratories, Linz, A) inkubiert, um während der *Pulse*-Periode einen verstärkten ³⁵S-Cys/Met-Einbau in Proteine zu gewährleisten. Das Met/Cys-freie Medium wurde abgenommen und verworfen, und in jede Schale wurden 1,5 ml *Pulse*-Medium (2 % dFKS, 100µCi tran ³⁵S-Cys/Met label von ICN Biomedicals aus Eschwege in DMEM ohne Cys/Met) gegeben. Die Zellen wurden 1 h oder 2 h im Brutschrank mit dem *Pulse*-Medium inkubiert. Von jeder Zelllinie wurde eine 60 mm-Schale direkt nach dem *Pulse* auf Eis gestellt, der *Pulse*-Mediumüberstand abgenommen und anschließend in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Der Überstand wurde 2 min bei höchster Geschwindigkeit in einer auf 4°C gekühlten Tischzentrifuge (Eppendorf) zum Entfernen von Zelldebris zentrifugiert und bis zur Immunpräzipitation auf Eis aufgehoben. Die Zellen wurden mit Immunpräzipitationspuffer lysiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zur Immunpräzipitation auf Eis gelagert. Das Pellet wurde verworfen.

Das Medium der restlichen Schalen wurde nach dem *Pulse* abgenommen und nach zweimaligem Waschen mit PBS durch 1,5 ml *Chase*-Medium (1,5 mg/ml Met/Cys; 10 % FKS; 100 U/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin in DMEM) ersetzt. Im Anschluss erfolgten unterschiedlich lange *Chase*-Perioden im Brutschrank. Nun wurde das Medium von Zelldebris befreit und die Zellen homogenisiert. Zu allen Ansätzen, Medien und Zellextrakten, wurde dann 1 µl NPC2-Antikörper gegeben, und die Proben wurden über Nacht bei 4°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Ansätze auf die vorbehandelte Protein-G-Sepharose verteilt. Die Proben wurden 2 h bei RT unter starkem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde 2 min bei höchster Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge

(Eppendorf) zentrifugiert und das Pellet zweimal mit Immunpräzipitationspuffer, zweimal mit PBS und einmal mit ddH₂O gewaschen. Nach den Waschgängen wurden 20 µl reduzierender SDS-PAGE 1x Auftragspuffer (3.2.2.1) zu den Pellets gegeben und die Ansätze 5 min bei 95°C im Thermoblock erhitzt, um die Antikörper-Protein-Komplexe von der Protein-G-Sepharose zu lösen. Daraufhin wurde 2 min bei höchster Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dem Pellet wurden 10 µl reduzierender SDS-PAGE 1x Auftragspuffer beigelegt und der Ansatz erneut 5 min bei 95°C im Thermoblock erhitzt. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand mit dem ersten Überstand *gepoolt*.

Die Proteine wurden nun in einem 15%igen Trenngel nach 3.2.2.6 aufgetrennt und anschließend getrocknet. Die getrockneten Gele wurden in einer 24x30 cm Kassette (Dr. Goos Suprema, Heidelberg) festgeklebt. Anschließend wurde ein 20x25 cm *Phosphoimagerscreen* (Imaging Plate, BAS-MP 2025P, Fujifilm, Kanagawa, J) eingelegt. Die Kassette wurde 4-25 Tage verschlossen liegen gelassen, um einen ausreichenden Signaltransfer von den Gelen auf den *Screen* zu ermöglichen. Die Entwicklung des *Screens* erfolgte in einem BAS-1000-Phosphoimager (Fujifilm, Kanagawa, J) mit der BAS-Reader Version 2.8 Software. Das erstellte Bild konnte mit dem Programm PCBAS (Raytest GmbH, Straubenhardt, Version 2.09g) als tif-Datei gespeichert und anschließend mit der Adobe Photoshop Version 7.0 Software weiterbearbeitet werden. Die Signale auf den *Screens* wurden vor und nach jedem Gebrauch mit einem *Eraser* (Raytest, Straubenhardt) gelöscht.

3.2.2.11 Dünnschichtchromatographie

Von jeder Zelllinie wurden die Lipide von fünf dicht bewachsenen 10 cm Schalen nach der Methode von Folch, Less und Sloane extrahiert (Folch et al., 1957) und in 1 ml N-Hexan aufgenommen. Für die Dünnschichtchromatographie wurden TLC-Platten (*Silica Gel (F254) high performance*, Merck, Darmstadt) zunächst in Chloroform-Methanol (1:1) vorinkubiert, auf 110°C erhitzt und danach auf RT abgekühlt. Anschließend wurden die Platten mit Standard und 10 µl der präparierten Lipidextrakte beladen und in 0,25 % (w/v in H₂O) Methylacetat-N-Propanol-Chloroform-Methanol-Kaliumchlorid (25:25:28:10:7) laufen gelassen. Die Platten wurden dann getrocknet und sorgfältig mit 10 % Kupfersulfat (w/v) in 8 % Orthophosphorsäure besprüht. Schließlich wurden die Lipide durch Schwärzung bei

180°C für 12 min sichtbar gemacht. Die Dünnschichtchromatographie wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Jobst Landgrebe (Göttingen) durchgeführt.

3.2.2.12 Elektronenmikroskopie

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden Zellen in 60 mm-Schalen ausgesät und kultiviert. Die anschließende Fixierung erfolgte für 15 min bei RT mit 2 ml 2%iger Glutaraldehydlösung (Agar Scientific, Stansted, UK) in 0,2 M HEPES/NaOH pH 7,4. Gegebenenfalls schloss sich eine Filipinfärbung (0,5 mg/ml) für 2 h unter leichtem Schütteln an. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 1 h in 1 % Osmiumtetroxid (Plano, Wetzlar) in H₂O inkubiert. Nun folgten zwei Waschschritte mit H₂O und zur Verstärkung des Kontrastes eine optionale einstündige Inkubation im Dunkeln mit 3%igem Uranylacetat (Agar Scientific, Stansted, UK). Die Einbettung erfolgte in Agar100 nach Standardprotokoll. Das auspolymerisierte Harz wurde mit einem Ultramikrotom (Ultracut E, ehemals Reichert Jung, jetzt Leica, Wien, A) mit einem Diamantmesser (45°, Diatome US, Fort Washington, PA, USA) in 90 nm dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden auf Pioloform (Agar Scientific, Stansted, UK) beschichteten Gittern getrocknet, zunächst 15 min mit 3%igem Uranylacetat, dann 4 min mit einer frisch angesetzten 0,3%igen Bleicitratlösung (Agar Scientific, Stansted, UK) in CO₂-freier Atmosphäre gefärbt. Die Einbettung und Betrachtung (Zeiss EM-900, LEO Elektronenmikroskopie, Oberkochen) der Schnitte erfolgte durch Dr. Eeva-Liisa Eskelinen.

3.2.2.13 Bestimmung der Wasserstoffperoxidproduktion von Neutrophilen

Der Assay wurde modifiziert nach Pick & Mizel (Pick und Mizel, 1981) durchgeführt. 1×10^5 Neutrophile pro *Well* wurden zunächst für 2 h in RPMI-Medium (ohne FKS und Antibiotika) in einer 96-*Well*-Platte kultiviert. Nicht-adhärenente Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit 0,1 ml warmen Phenolrot-freiem HBSS entfernt und mit 2×10^7 opsonierten *E. coli*-Bakterien XL1 blue oder 0,1 mg Zymosan in 100 µl Phenolrotlösung (PRS) (140 mM NaCl; 10 mM NaH₂PO₄; 5,5 mM Saccharose; 0,56 mM Phenolrot; pH 7,0; sterilfiltriert mit 0,22 µm Filter; 19 U/ml HRPO) weiter inkubiert. Nach 1 h bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 1M NaOH pro *Well* gestoppt und die Absorption mit dem Mikrotiterplattenleser

(Sunrise, Tecan, Crailsheim) bei 600 nm bestimmt. Parallel wurde aus einer 30%igen H₂O₂-Lösung (entspricht 9,97 M) eine Verdünnungsreihe in PRS erstellt, 5 min bei 37°C im Inkubator gehalten, die Reaktion mit 1 M NaOH gestoppt und ebenfalls bei 600 nm gemessen. Aus den gemessenen Werten wurde nun eine Eichgerade erstellt, mit dessen Hilfe die von den Neutrophilen produzierte Wasserstoffperoxidmenge nach Stimuluszugabe berechnet werden konnte.

3.2.2.14 Messung des *respiratorischen Bursts* mittels luminolverstärkter Chemolumineszenz

Zunächst wurden murine neutrophile Granulozyten wie unter 3.2.4.3 beschrieben gewonnen und die Zellzahl bestimmt (3.2.4.7). Daraufhin erfolgte eine FACS-Analyse (3.2.4.1) zur Bestimmung der Granulozytenausbeute. Die Zellsuspension wurde dann in HBSS auf 2×10^6 Zellen eingestellt. 2×10^7 Zymosanpartikel/ml (10 mg entsprechen 5×10^8 Partikeln) wurden 30 min in HBSS bei 100°C gekocht und anschließend dreimal mit HBSS gewaschen. Die Oponierung des Zymosans oder der Bakterien erfolgte für 30 min bei 37°C unter Schütteln im Thermoblock in HBSS mit 10 % humanem Serum. Nach einem Waschschrift in HBSS wurden die Zymosanpartikel/Bakterien in HBSS aufgenommen. Zur Messung der Chemolumineszenz wurde folgender Ansatz in Lumac Polystyrenröhrchen (Bio-Vials, USA) hergestellt: 450 µl HBSS, 50 µl Granulozyten (2×10^6 /ml), 50 µl Luminol (2×10^{-5} M) und 500 µl Zymosan (1×10^7 /ml) oder Bakterien (4×10^7 /ml). Dabei wurde der Ansatz vor der Zymosan-/Bakterienzugabe 5 min dunkeladaptiert und die Hintergrundchemolumineszenz im Lumino-meter (Biolumat LB 9505, Bertold, Wildbad) gemessen. Die Bestimmung der Chemolumineszenz (CL) erfolgte anschließend über 60 min bei Messungen in 20-Sekunden Abständen. Die Messwerte wurden aus Dreifachwerten berechnet. Die Messungen erfolgten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rainer Podschun (Universität Kiel).

3.2.3 Zellbiologische Methoden

3.2.3.1 Passagieren von adhärennten Zellen

Zunächst wurde das Medium aus einer Schale mit konfluenten Zellen abgesaugt und die Zellen anschließend mit 5-10 ml 1 x PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 0,5-1 ml (je nach Schalengröße) Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen abrundeten und vom Untergrund ablösten. Der Ablösungsprozess wurde stetig mit einem inversen Mikroskop (Eclipse TS 100, Nikon, Düsseldorf) kontrolliert. Die Trypsinreaktion wurde durch eine Verdünnung mit dem 10-fachen Volumen an Zellkulturmedium gestoppt. Es folgte eine Vereinzelnung der Zellen durch mehrfaches Auf- und Absaugen mit einer Pipette. Die entstandene Suspension wurde schließlich in der gewünschten Verdünnung mit zusätzlichem frischem Medium in neue Zellkulturschalen ausgesät.

3.2.3.2 Einfrieren von Zellen

Neben den in Zellkultur gehaltenen Zellen, wurden von allen Zelllinien Aliquots zur Aufbewahrung und späteren Wiederverwendung eingefroren. Dazu ließ man die zum Einfrieren bestimmten Zellen bis zu einer etwa 80%igen Konfluenz in 100 mm Schalen wachsen. Nach der Trypsinierung (siehe 3.2.3.1) und der Aufnahme der Zellen in 5 ml Medium wurde die Suspension 5 min bei 600 x g zentrifugiert (Universal 32, Typ 1605, Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 0,5 ml Zellkulturmedium pro wegzufrierendem Röhrchen resuspendiert und für 10 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die gleiche Menge Gefriermedium (20 % DMSO (Dimethylsulfoxid) in vollständigem Zellkulturmedium) zugegeben. Diese Suspension wurde zu 1 ml Portionen in 1,5 ml Schraubdeckelröhrchen aliquotiert und zunächst für 24 Stunden in Styroporbehältern bei -80 °C gelagert, bevor die Röhrchen zur langfristigen Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff bei -196°C überführt wurden.

3.2.3.3 Auftauen von Zellen

Die aufzutauenden Röhren wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und kurz unter der Sterilbank geöffnet, um den bei der Lagerung möglicherweise entstandenen Druck in Form von Gas entweichen zu lassen. Das wieder verschlossene Gefäß wurde anschließend im 37°C-Wasserbad fast vollständig aufgetaut. Unter der Sterilbank wurde nun die aufgetaute Zellsuspension in ein 15 ml Röhren mit 5 ml Zellkulturmedium gegeben und für 3-5 min bei 600 x g (Universal 32, Typ 1605, Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und zur Kultivierung in einer 25 mm²-Flasche im Brutschrank überführt. Am nächsten Tag wurde das Anwachsen der aufgetauten Zellen kontrolliert und tote Zellen durch Mediumwechsel entfernt.

3.2.3.4 Ernten von eukaryotischen Zellen

Die im Folgenden beschriebenen Schritte wurden alle auf Eis durchgeführt, um eine proteolytische Degradierung der Proteine zu vermeiden. Ein weiterer Schutz vor Proteindegradierung wurde erreicht, indem den Lysaten Complete Proteaseinhibitor (Roche, Basel, CH) zugesetzt wurde. Möglichst dicht bewachsene Zellkulturschalen wurden auf Eis gestellt und die Zellen nach Absaugen des Mediums zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem biegsamen Zellschaber abgeschabt und mit 2 x 0,5 ml eiskaltem PBS in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die Eppendorfgefäße wurden 5 min bei 4°C und 7.500 x g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet entweder direkt weiterverwendet oder auf Trockeneis abgekühlt und anschließend bei -80°C eingefroren.

3.2.3.5 Mycoplasmendetektion und –behandlung

Alle in Kultur gehaltenen Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf Mycoplasmeninfektionen untersucht. Für einen genauen Nachweis wurde ein Mycoplasmentest mit Hilfe einer Nested-PCR durchgeführt, bei der in Anwesenheit von Mycoplasmen Fragmente mit einer Länge von 300-500 bp entstanden.

Die Zellen wurden zunächst zwei Tage kultiviert und dann 200 µl des Mediums abgenommen. Diese Überstandsproben wurden 1 min bei 95°C im Thermoblock inkubiert

und danach 1 min bei 7.000 x g in der Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. 1 µl des Überstands wurde für die erste PCR verwendet. Es wurden zwei PCR-Schritte, PCR1 und PCR2, durchgeführt, wobei mycoplasmaspezifische DNA-Bereiche amplifiziert wurden. Das Produkt der ersten PCR wurde dabei als Template für die zweite PCR verwendet. In Tab. 11 und Tab. 12 sind die Standardprotokolle für die Nested-PCR aufgeführt. Bei jedem Versuch wurden eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle (1 µl H₂O statt Überstand) mitgeführt. Die hohe Sensitivität des Verfahrens ermöglichte eine sichere Detektion schon in frühen Infektionsstadien.

Tab. 11: Nested-PCR Programm für PCR 1 und PCR2

| Schritt | Temperatur (°C) | Zeit(min) |
|----------------------|-----------------|-----------|
| 1 | 94 | 3,0 |
| 2 | 94 | 0,5 |
| 3 | 55 | 2,0 |
| 3 | 72 | 1,0 |
| 4 | 72 | 6,0 |
| 5 | 10 | ∞ |
| Schritt 2 bis 4 x 36 | | |

Tab. 12: Ansatz für eine PCR Reaktion für PCR 1 (PCR 2)

| Substanz | µl |
|---|------|
| ddH ₂ O (autoklaviert) | 39,0 |
| 10x <i>Taq</i> -Puffer (+MgSO ₄) | 5,0 |
| dNTPs | 4,0 |
| Primer MycoF1 (F2), 10µM | 1,0 |
| Primer MycoR1 (R2), 10µM | 1,0 |
| <i>Taq</i> -Polymerase (5U/µl) | 0,3 |
| Gesamtvolumen | 50,3 |
| 49 µl des Mastermixes wurden mit 1 µl des gekochten Zellkulturüberstandes (1 µl des Produktes aus PCR1) versetzt. | |

In einem relativ späten Stadium der Infektion konnten die Mycoplasmen außerdem durch eine Färbung mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzmarker 4',6-Diamidino-2-phenylindol- (DAPI) sichtbar gemacht werden (Russell et al., 1975). Der Vorteil dieser Methode besteht in der einfachen Durchführung. Die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und in einem Mowiol/Diazobicyclooctan (DABCO)-Gemisch (17 % Mowiol; 33 % Glycerol; 50 mg/ml DABCO in PBS), das 1 µg/ml DAPI enthielt, auf Objektträgern fixiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200, Zeiss, Göttingen) betrachtet. Waren zusätzlich zu den Zellkernen weite Bereiche des Zytoplasmas und zum Teil auch extrazelluläre Bereiche unregelmäßig angefärbt, wurde auf eine Infektion mit Mycoplasmen geschlossen. Die Versuche mit infizierten Zellen wurden eingestellt und eine neue Charge der Zelllinie aufgetaut. War diese ebenfalls mit Mycoplasmen infiziert oder

standen keine eingefrorenen Vorräte der benutzten Zelllinie mehr zu Verfügung, wurden die Zellen mit Ciprobay 100 (Bayer, Leverkusen) nach Herstellerangaben behandelt. Die Behandlung wurde für einen Zeitraum von etwa zehn Tagen durchgeführt. Anschließend erfolgten erneut DAPI- und PCR-Tests. Konnten keine Mycoplasmen nachgewiesen werden, wurden die Zellen wieder auf normales Zellkulturmedium umgestellt und die Untersuchungen fortgesetzt.

3.2.3.6 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Für die Transfektion wurden die Zellen in einer 6-Well-Schale bis zu einer Dichte von etwa 60 % kultiviert. Vor Zugabe des Transfektionsreagenz erfolgte ein Mediumwechsel. Sollten die transfizierten Zellen später für eine indirekte Immunfluoreszenz (3.2.3.7) verwendet werden, wurden vorher 4 Deckgläschen in jedes Well gelegt. Die Transfektion erfolgte mit dem Reagenz FuGene (Roche, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers. Hierbei wurden 100 µl DMEM ohne Serum mit 3 µl FuGene und 1,0 µg DNA in einem Eppendorfgefäß gemischt und für mindestens 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Das lipophile Reagenz bildet mit der zu transfizierenden DNA einen Lipid-DNA-Komplex, der zu einer effizienten DNA-Aufnahme in die Zelle und anschließender Expression in dieser führen soll. Das Transfektionsreagenz blieb für 24 bis 72 Stunden auf den Zellen. Wurden die Zellen zu dicht, wurden die Zellen wie beim Passagieren (3.2.3.1) verdünnt und bis zur gewünschten Dichte kultiviert. Schließlich wurden die für Immunfluoreszenzfärbungen bestimmten Zellen, nach einem Waschschrift mit PBS, mit 4% PFA in PBS für 30 min bei RT fixiert. Für Westernblotanalysen wurden die Zellen wie unter 3.2.3.4 beschrieben geerntet.

3.2.3.7 Indirekte Immunfluoreszenz an Zellkulturzellen

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz können Proteine in der Zelle lokalisiert werden. Alle beschriebenen Schritte erfolgten bei RT. Zunächst wurden die Zellen auf runden Deckgläschen (Ø 13 mm) in 6-Well-Platten ausgesät und kultiviert, bis ein semikonfluenter Zellrasen entstanden war. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und entweder für 30 min mit 4 % PFA in PBS (w/v) oder bei Zellen, die später mit NPC2-Antikörper gefärbt werden sollten, für eine Stunde mit *Bouin's* Fixierlösung (Pikrinsäure, Formalin, Eisessig,

15:5:1, 25 % in PBS) fixiert. Bei einer Färbung gegen Tubulin wurden die Zellen wie bei Ding et al. beschrieben fixiert (Fixierungsprotokoll 8) (Ding et al., 1995). Nach der Fixation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um das Fixativ zu entfernen. Die Zellen konnten nun bis zur Antikörperfärbung in ausreichend PBS bei 4°C gelagert werden.

Für die Immunfärbung wurden die fixierten Zellen 5 min mit 0,1 % Triton X-100 (v/v) in PBS permeabilisiert. Bei einer Permeabilisierung mit 0,02 % Saponin (w/v) (Sigma Aldrich, Steinheim) in PBS muss in allen folgenden Wasch- und Inkubationsschritten Saponin zugesetzt werden, um die Zellen permeabel zu halten. Bei einer Tritonpermeabilisierung war keine ständige Zugabe nötig. Nach der Permeabilisierung folgte die Absättigung der freien Aldehydgruppen mit 0,12 % Glycin in PBS für 10 min. Zwischen den Schritten wurde jeweils einmal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern, wurden die Zellen 15 min mit 3 % BSA (w/v) in PBS blockiert. Zur Bindung des primären Antikörpers (Tab. 5) wurden 30 µl der Antikörperverdünnung in 3 % BSA auf Parafilm pipettiert und die Deckgläschen, mit der Zellseite zur Lösung gewandt, auf das Parafilm gelegt. Nach einer Inkubationszeit von 1-2 Stunden in einer feuchten Kammer wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurde auf die gleiche Weise wie der Primärantikörper für 60 min im Dunkeln inkubiert. Vor der Einbettung der Zellen, wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS und einmal mit dest. H₂O gewaschen sowie kurz auf Zellstoffpapier abgetupft. Anschließend wurden die Deckgläschen in einem Gemisch aus Mowiol, DABCO (17 % Mowiol, 33 % Glycerin, 50 mg/ml DABCO) eingebettet. DABCO enthält Antibleichmittel, Stabilisatoren und Signalverstärker. Sollten auch die Zellkerne der Zellen angefärbt werden, wurde dem Mowiol/DABCO-Gemisch noch 1 µl einer 1 µg/ml DAPI-Lösung in DMSO zugesetzt. Die auf den Objektträgern fixierten Deckgläschen wurden bei 4°C oder -20°C im Dunkeln gelagert und schließlich mit dem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Zeiss, Göttingen) ausgewertet.

3.2.3.8 Fluoreszenzmarkierung von Cholesterin in Zellkulturzellen

Freies Cholesterin wurde in fixierten Zellen mit dem Antibiotikum Filipin nachgewiesen. Filipin gehört zur Gruppe der makroliden Polyene und wird aus dem Bakterium *Streptomyces filipinensis* extrahiert (Abb. 10). Es bindet sehr spezifisch an freies Cholesterin, wobei ein blau-fluoreszierender Filipin-Cholesterin-Komplex entsteht. Verestertes Cholesterin wird nicht gebunden. Da es sich bei Filipin um eine licht- und sauerstoffempfindliche Substanz

handelt, wurde die 100-fach konzentrierte Stammlösung (50 mg/ml) in DMSO bei -20°C im Dunkeln in Stickstoffatmosphäre verwahrt. Die fixierten Zellen (3.2.3.7) wurden in einer Filipinlösung (0,5 mg/ml) in PBS eine Stunde unter sanftem Schütteln und Lichtausschluss inkubiert. Es schlossen sich zwei PBS- und drei H₂O-Waschgänge an, bevor die Deckgläschen mit einem Mowiol/DABCO-Gemisch (3.1.3.7) auf Objektträgern fixiert wurden. Bei vielen Cholesterinfärbungen folgte auf die Filipinfärbung eine Antikörperfärbung. Dabei wurden die Deckgläschen nach der Filipinfärbung zweimal mit PBS gewaschen und im Anschluss mit 3 %iger BSA-Blockierlösung (3 % BSA in PBS) inkubiert. Daraufhin erfolgte die Antikörperfärbung nach 3.1.3.7, wobei alle Schritte möglichst unter Lichtausschluss durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Göttingen) mit den Filtern G365 und BP445/59, da Filipin Licht der Wellenlänge 350 nm emittiert.

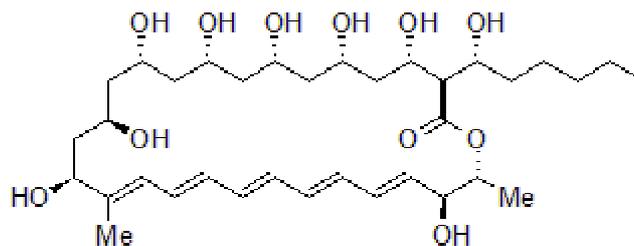


Abb. 10: Strukturformel von Filipin III. Bei Filipin III handelt es sich um die wichtigste Komponente in dem aus *Streptomyces filipinensis* extrahierten Filipingemisch.

3.2.3.9 Phagozytoseassay mit Latexkügelchen

Latexkügelchen mit einem Durchmesser von 0,8 oder 3 µm (Sigma, Steinheim) wurden zunächst in RPMI-1640 Medium (ohne Antibiotika und FKS) mit 10 % humanem Serum für 30 min bei 37°C opsoniert. Anschließend wurden die Kügelchen dreimal mit Medium gewaschen. $1-5 \times 10^5$ primäre peritoneale neutrophile Granulozyten wurden 2 h in 24-Well-Platten auf Deckgläschen in RPMI-1640 Medium (ohne Antibiotika und FKS) kultiviert, um zu adhären. Nicht-adhärenente Zellen wurden nun durch Waschen entfernt (Adhärenzreinigung) und die opsonierten Kügelchen wurden zugegeben (0,05 % Endkonzentration). Durch Zentrifugation für 1 min bei 300 x g wurden die Kügelchen in Kontakt mit den Phagozyten gebracht. Es folgte eine Phagozytosezeit von 60 min bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen mehrmals mit warmen PBS gewaschen und mit 4 % warmen

Paraformaldehyd in PBS für 20 – 30 min fixiert. Die Deckgläschen konnten nun einer Immunofluoreszenzfärbung (3.2.3.7) unterzogen werden. Externe Kügelchen wurden vor der Permeabilisierung der Zellen mit fluoreszierendem Marker (goat anti-human IgG Alexa Fluor 594, Molecular Probes, 1:500) in PBS für 1 h bei RT angefärbt.

Sollte die Azidifizierung der Phagosomen überprüft werden, wurden die Zellen nach der Inkubation mit den Latexkügelchen noch 30 min in mit 20 mM HEPES gepuffertem RPMI-Medium mit 0,1 mM N-(3-[(2,4-Dinitrophenyl)amino]propyl)-N-(3-aminopropyl)methylaminedihydrochlorid (DAMP, Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe) inkubiert. Durch anti-DNP-Antikörper konnte DAMP in der Fluoreszenzfärbung detektiert werden.

3.2.1.10 Intrazelluläre Abtötung von *E. coli*-Bakterien durch Neutrophile

20 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur *E. coli* XL1 blue angeimpft und für 4 bis 6 h bis zur exponentiellen Phase wachsen gelassen. 1 ml Zellsuspension wurde nun auf $OD_{600nm} = 1$ gebracht (entspricht ca. 1×10^9 Zellen) und zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem Resuspendieren in RPMI-1640 (ohne FKS und Antibiotika) wurden 1×10^8 *E. coli*-Bakterien für 30 min mit humanem Serum opsoniert und anschließend dreimal mit Medium gewaschen. 5×10^5 primäre peritoneale neutrophile Granulozyten wurden pro Well einer 24-Well-Platte für zwei Stunden kultiviert. Nicht-adhärenente Zellen wurden nun durch Waschen entfernt (Adhärenzreinigung), bevor 5×10^6 *E. coli*-Bakterien zugegeben wurden. Mit einer zweiminütigen Zentrifugation bei $720 \times g$ wurde die Phagozytose synchronisiert und eine Internalisierung der Bakterien für 60 min bei $37^\circ C$ ermöglicht. Die Platte wurde dann auf Eis gestellt, um die Phagozytose abzustoppen. Nun wurden extrazelluläre Bakterien durch zweimaliges Waschen mit sterilem PBS sowie einer 30-minütigen Inkubation mit $100 \mu l$ Gentamicin pro ml entfernt. Die Phagozyten wurden dann in RPMI-1640 mit 0,1 % FKS bei $37^\circ C$ kultiviert. Nach verschiedenen Zeitabschnitten (für jeden Zeitpunkt eine eigene Platte mit Versuchsansatz) wurde das Medium abgenommen und durch 0,1 % BSA in H_2O_{dest} ersetzt, was zur Lyse der Granulozyten führte. Die Platten wurden dann bei $-80^\circ C$ eingefroren. Schließlich wurde warmes RPMI (ohne Antibiotika und FKS) in die Wells gegeben und diese bei $37^\circ C$ schnell aufgetaut. $100 \mu l$ des Lysates wurden nun auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bebrütet. Am nächsten Tag wurden die koloniebildende Einheiten (CFU) gezählt.

3.2.4 Immunologische Methoden

3.2.4.1 Durchflusszytometrie

Durch FACS-Analyse (Fluorescence-Activated Cell Sorting) können einzelne Zellen aufgrund ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenz, welche durch spezifische Bindung von fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern an Oberflächenmoleküle bewirkt wird, charakterisiert werden. Aus der Intensität der Fluoreszenz kann auf die Menge der gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörper und somit auf die Expression der Antigene geschlossen werden. Bei der FACS-Messung werden die gefärbten Zellen in einer Einzelzellsuspension an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration wird durch einen Photodetektor registriert. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße (im „Forward-Scatter“) und die Granularität der Zelle (im „Sideward-Scatter“) gewonnen.

3.2.4.2 Immunfärbung für die Durchflusszytometrie

Mit Hilfe von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern, die mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind und unterschiedliche Spezifitäten besitzen, ist es möglich, verschiedene Zellen im selben Ansatz zu färben. Ebenso können verschiedene Antigene auf einer Zelle dargestellt werden. Die Färbungen wurden in 96-Well-Rundbodenplatten durchgeführt. Es wurden zunächst pro Färbung $1-5 \times 10^5$ Zellen für 5 min bei $200 \times g$ zentrifugiert und in $10 \mu\text{l}$ Blockingreagenz (α Fc-Rezeptor, Hybridomüberstand von 2.4G2) resuspendiert. Die Zellen wurden nun für 10 min inkubiert, um unspezifische Bindung der Antikörper an Fc-Rezeptoren zu verhindern. Nach der Zugabe der fluoreszenzmarkierten Antikörper wurden die Zellen für 15 min unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer (0,5 % BSA, 0,02% Natriumazid in PBS) gewaschen, in Röhrchen überführt und bis zur Messung in Dunkelheit auf Eis gehalten. Im Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) wurden pro Ansatz 10000 lebende Zellen gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software CellQuest.

3.2.4.3 Gewinnung von neutrophilen Granulozyten aus der Peritonealhöhle

Aufgrund des geringen Blutvolumens einer Maus (ca. 1-1,5 ml), gestaltet sich die Isolation von Neutrophilen aus Mausblut schwierig und erfordert eine hohe Zahl an Tieren. Eine wesentlich einfachere Methode zur Gewinnung von neutrophilen Granulozyten stellt die Isolation von infiltrierenden Neutrophilen aus der Peritonealhöhle nach Induktion einer Peritonitis dar. In der Regel lassen sich ca. 1×10^7 Neutrophile pro Maus aus der Peritonealhöhle isolieren, das Blut einer Maus liefert hingegen nur $0,5-1 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten (Watt et al., 1979). Die physiologischen Eigenschaften peritonealer Zellen können allerdings durch die Exposition mit inflammatorischen Agentien verändert sein (Elzouki et al., 1994). Die Induktion mit Thioglykolat liefert partiell aktivierte Zellen.

Zwei bis vier Monate alten Mäusen wurde zunächst 1 ml 4 % Thioglykolatlösung intraperitoneal gespritzt. Nach 4 Stunden wurden die Mäuse getötet und das Peritoneum chirurgisch freigelegt. Nach der Injektion von 5-10 ml eiskaltem PBS/0,02 % EDTA in die Peritonealhöhle wurden die Mäuse sorgfältig geschüttelt. Anschließend wurde mit einer Pasteurpipette das Bauchfell (Peritoneum) durchstochen, die Peritonealflüssigkeit vorsichtig abgesaugt und in ein auf Eis stehendes Röhrchen überführt. Der Spülvorgang wurde nun noch zweimal wiederholt. Die gesammelte Peritonealflüssigkeit wurde 5 Minuten bei $200 \times g$ zentrifugiert und schließlich einmal mit PBS gewaschen. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen in RPMI-1640 Medium (10 % FKS, mit Pen/Strep) aufgenommen und bis zur Kultivierung auf Eis gehalten. Die Zellzahl des Peritonealexsudats wurde nun mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt (3.2.4.7). Der Granulozytengehalt wurde entweder durch Durchflusszytometrie (3.2.4.1) oder durch Färbung (Diff-Quik, Medion Diagnostics, Düdingen, CH) und mikroskopische Auswertung bestimmt und lag in der Regel bei 60-80 %. Eine weitere Anreicherung konnte durch Adhärenzreinigung (3.2.3.9) oder über einen Dichtegradienten (3.2.4.6) erreicht werden, woraus ein Anteil von 90-95 % Granulozyten resultierte.

3.2.4.4 Gewinnung von neutrophilen Granulozyten aus dem Blut nach Stimulation mit G-CSF

Granulozyten koloniestimulierender Faktor (G-CSF) ist ein Stoff, der u.a. bei Entzündungen vom Körper ausgeschüttet wird und die Bildung weißer Blutkörperchen anregt (Basu et al., 2002). Eine wichtige Unterart dieser sind die neutrophilen Granulozyten. Ihre Entwicklung wird durch den Faktor G-CSF gesteuert. Sind die Zellen voll funktionstüchtig, werden sie ins

Blut geschwemmt. Neupogen (Filgrastim, Amgen, München) entspricht weitgehend dem körpereigenen Wachstumsfaktor G-CSF. Es regt das Knochenmark an, neutrophile Granulozyten zu produzieren. Pro Maus wurden 2,5 µg Neupogen verdünnt in 5 % Dextroselösung über drei Tage jeden Tag subkutan injiziert. Am vierten Tag wurde durch kardiale Punktion soviel Blut wie möglich mit einer heparinisierten (Liquemin N5000, Roche, Grenzach-Wyhlen) Spritze entnommen. Die Erythrozyten wurden mit Lysepuffer (0,16 M Ammoniumchlorid; 0,01 M Kaliumbicarbonat; 0,1 M Na-EDTA; pH 7,4) lysiert und die restlichen Zellen in RPMI aufgenommen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahl sowie eine FACS-Analyse.

3.2.4.5 Anreicherung von neutrophilen Granulozyten

Peritoneale Granulozyten wurden über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten von kontaminierenden Zellen getrennt. Durch die Schichtung zweier Polysaccharoselösungen unterschiedlicher Dichte können die Zellen entsprechend ihrer spezifischen Dichte aufgetrennt werden. Mononukleäre Zellen mit der geringsten Dichte finden sich nach Zentrifugation in der oberen Plasmaphase wieder, Erythrozyten hingegen sammeln sich aufgrund ihrer hohen spezifischen Dichte am Gefäßboden. Granulozyten mit einer spezifischen Dichte von ca. 1,1 können aus der Interphase der beiden Polysaccharoselösungen isoliert werden. Eine Trennung der neutrophilen Granulozyten von anderen polymorphkernigen Zellen ist mit dieser Methode nicht möglich. Kontaminationen durch Eosinophile und Mastzellen im Peritonealexsudat belaufen sich in der Regel auf nicht mehr als je 1 % (Watt et al., 1979).

In einem Polypropylengefäß (15 ml) wurden 3 ml Histopaque 1077 (Sigma, Steinheim) vorsichtig auf 3 ml Histopaque 1119 geschichtet. Das wie oben beschrieben hergestellte Peritonealexsudat (3.2.4.3) wurde noch zweimal mit PBS gewaschen und anschließend auf die obere Histopaque-Schicht gegeben. Die Zellpopulationen wurden durch Zentrifugation (30 min, 700 x g, ungebremst) aufgetrennt und die Granulozyten aus der Interphase zwischen beiden Polysaccharoselösungen mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt (3.2.4.7). Weiterhin wurde die Zellsuspension durch Färbung mit dem Kit Diff-Quik (Medion Diagnostics, Düdingen, CH) nach Anleitung des Herstellers mit anschließender mikroskopischer Auswertung auf kontaminierende Zellen untersucht. Bei der Diff-Quik-

Färbung handelt es sich um eine polychromatische Schnellfärbung. Sie hat den Vorteil, dass die Präparate nach wenigen Minuten untersucht werden können. Die Präparate werden luftgetrocknet und in einer Methanollösung fixiert, dann wird mit Eosin das Plasma rötlich und zuletzt werden mit Thiazin Kernstrukturen blau gefärbt. Die Auszählung ergab einen Anteil von 95 % polymorphkernigen Zellen.

3.2.4.6 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Um die Zellzahl einer Zellsuspension zu bestimmen, wurden die Zellen zunächst 1:1 mit 0,4%iger Trypanblaulösung gemischt und in die Zählkammer pipettiert. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Er dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytoplasma und färbt diese Zellen tiefblau. Bei der Auszählung wurden nur die lebenden Zellen berücksichtigt. Die durchschnittliche Anzahl von Zellen in einem Großquadrat $\times 10^4$ entspricht der Zellzahl pro ml. Anschließend wurde der Verdünnungsfaktor, der durch das Mischen mit Trypanblau entstand, noch mit eingerechnet.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden in zwei getrennten Studien verschiedene lysosomale Funktionen im intrazellulären Transport untersucht. Die erste Studie befasste sich mit dem Transport des lysosomalen Proteins NPC2 über Mannose-6-Phosphatrezeptoren und dessen Aufgabe bei der intrazellulären Cholesterinhomöostase. Die zweite Studie hatte das Ziel eine erhöhte Anfälligkeit LAMP-2-defizienter Mäuse für Parodontitis näher zu charakterisieren und mögliche Ursachen aufzuzeigen. Dabei sollte hauptsächlich die Rolle von LAMP-2 bei der Phagozytose von Pathogenen durch neutrophile Granulozyten untersucht werden sollte.

4.1 Mannose-6-Phosphatrezeptoren, Niemann-Pick C2 Protein und lysosomale Cholesterinakkumulation

Die autosomal-rezessiv vererbte neuroviscerale Lipidspeicherkrankheit Niemann-Pick Typ C wird charakterisiert durch eine Akkumulation von freiem Cholesterin und Glykolipiden in späten Endosomen und Lysosomen, die in Mutationen in den Genen *NPC1* und *NPC2* begründet liegt. Das lösliche NPC2 ist im Lysosom lokalisiert und trägt einen Mannose-6-Phosphatrest. Es stellte sich daher die Frage, ob NPC2 ebenfalls über Mannose-6-Phosphatrezeptoren zu den Lysosomen transportiert wird. Dieser Fragestellung wurde im Folgenden nachgegangen, indem NPC2 in MPR-einzeldefizienten (MPR46 oder MPR300) und MPR46/MPR300-doppeldefizienten Fibroblasten und Geweben untersucht wurde.

4.1.1 Verlust von Mannose-6-Phosphatrezeptoren in embryonalen Mausfibroblasten

Zur Untersuchung der Eigenschaften von NPC2 in MPR-defizienten Zellen wurden murine embryonale Fibroblasten (MEFs) mit einer Defizienz in MPR46, MPR300 oder in beiden Rezeptoren sowie eine passende Kontrollzelllinie verwendet (Tab. 6). Um zunächst den Genotyp zu verifizieren, wurden die Zellen durch Immunfluoreszenzmikroskopie mit anti-MPR46- und anti-MPR300-Antikörpern untersucht (3.2.3.7 und Tab. 5).

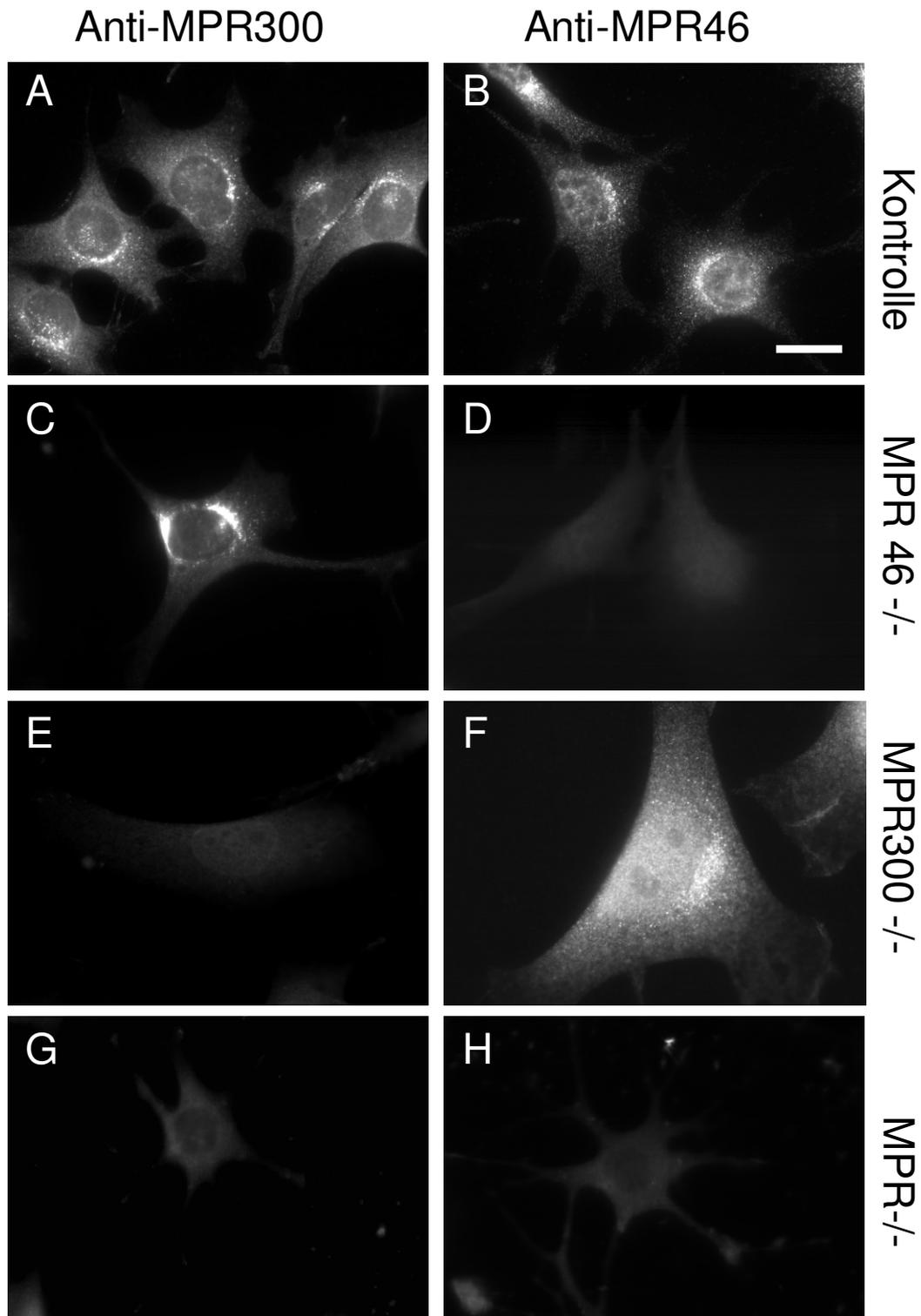


Abb. 11: Immunfluoreszenzfärbung von endogenem MPR46 und MPR300 in murinen Fibroblasten: Nach der Fixierung mit 4 % PFA in PBS wurden die auf Deckgläschen kultivierten Zellen mit anti-MPR46- und anti-MPR300-Antikörpern detektiert und mit fluoreszenzgekoppeltem Sekundärantikörper markiert. Maßstabballen = 10 µm (gilt für A-H). Der Genotyp ist auf der rechten Seite angegeben. **A, C, E** und **G** zeigt die Immunfärbung mit anti-MPR300-Antikörper, **B, D, F** und **H** die Färbung mit anti-MPR46-Antikörper.

Wie Abb. 11 zeigt, fand sich in der Kontrollzelllinie sowohl mit dem anti-MPR46- als auch mit dem anti-MPR300-Antikörper eine Färbung von unterschiedlich großen vesikulären Strukturen, die sich netzartig um den Kern der Zelle und als einzelne kleine Vesikel im Zytoplasma anordneten (Abb. 11A und B). Diese Lokalisation entspricht der Funktion der Rezeptoren in der Zirkulation vom Golgi-Apparat zu den Endosomen/Lysosomen und zurück. MPR300 ist zusätzlich in der Lage, Enzyme von der Zelloberfläche ins Zellinnere zu transportieren (Hille-Rehfeld, 1995). Die geringe Konzentration von MPR300 in der Zellmembran reichte allerdings nicht aus, um bei der Immunfluoreszenz sichtbar zu werden. In den MPR46-defizienten Zellen ergab nur der anti-MPR300-Antikörper ein Signal, welches dem der Kontrollzellen entsprach (Abb. 11C und D). Vergleichbares ergab die Färbung der MPR300-defizienten Zellen mit einem Antikörper gegen MPR46 (Abb. 11E und F). In den MPR46/MPR300-doppeldefizienten MEFs ergab keiner der benutzten anti-MPR-Antikörper ein Signal (Abb. 11G und H). Die so überprüften Fibroblasten wurden für die folgenden Experimente verwendet.

4.1.2 Endogenes NPC2 in MPR-defizienten Zellen

Bei NPC2 handelt es sich um ein lösliches glykosyliertes lysosomales Protein mit einem Mannose-6-Phosphatrest (Naureckiene et al., 2000). Es ist daher anzunehmen, dass NPC2 über die Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren MPR46 und/oder MPR300 zu den Lysosomen transportiert wird. NPC2-Westernblotanalysen mit Zelllysaten MPR-defizienter Zelllinien (Abb. 12A) zeigten für die Kontrollfibroblasten zwei Proteinbanden von etwa 18 kDa und 16 kDa, was der in der Literatur beschriebenen Größe von NPC2 entsprach (Naureckiene et al., 2000; Okamura et al., 1999). Die 16 kDa-Bande war dabei um ein Vielfaches stärker als die 18 kDa-Bande. Dieses Bandenmuster kam durch die verschiedenen glykosylierten Varianten des Proteins zustande (Chikh et al., 2004). In MPR46-defizienten Zellen konnten Banden in gleicher Höhe wie bei der Kontrollzelllinie detektiert werden, wobei die Intensität der 16 kDa-Bande etwa 25 % geringer war als bei der Kontrolle. In den Zelllysaten von MPR300-defizienten Zellen, zeigte die 16 kDa-Bande ein leicht erhöhtes Molekulargewicht und die Intensität war noch geringer als bei den MPR46-defizienten Zellen (etwa 50 % der Intensität der 16 kDa-Bande in Kontrollzellen). Im Zelllysate der MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen konnte keine 16 kDa-Bande detektiert werden. Die 18 kDa-Bande war allerdings noch vorhanden und stärker als in den anderen getesteten Zelllinien. Die Quantifizierung der

Bandenintensitäten ist in Abb. 12C dargestellt. MPR300 spielt möglicherweise eine wichtigere Rolle im intrazellulären Transport von NPC2 als MPR46. Die geringe Menge an NPC2 in den doppeldefizienten Zellen könnte durch eine Sekretion von NPC2 ins Medium verursacht worden sein. Aus diesem Grund wurde eine Westernblotanalyse des Kulturmediums angeschlossen. Wie Abb. 12B zeigt, konnte eine deutliche Menge NPC2 im Medium der doppeldefizienten Zellen detektiert werden. Im Medium der anderen Zelllinien fand sich nur ein sehr schwaches Signal für NPC2. Dieses lässt vermuten, dass das Vorhandensein eines der beiden Rezeptoren genügt, um NPC2 in der Zelle zu halten. Eine metabolische Markierung von NPC2 in Kontrollzellen und MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen mit ^{35}S -Methionin/Cystein und anschließender Immunpräzipitation ergab bei der Kontrolle ebenfalls die 16 und 18 kDa-Doppelbande und beim MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellysate nur die 18 kDa-Bande und bestätigte so die Ergebnisse der Westernblotanalysen. Auch nach einer *Chase*-Zeit von bis zu zwei Stunden konnte kein NPC2-Signal im Medium gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

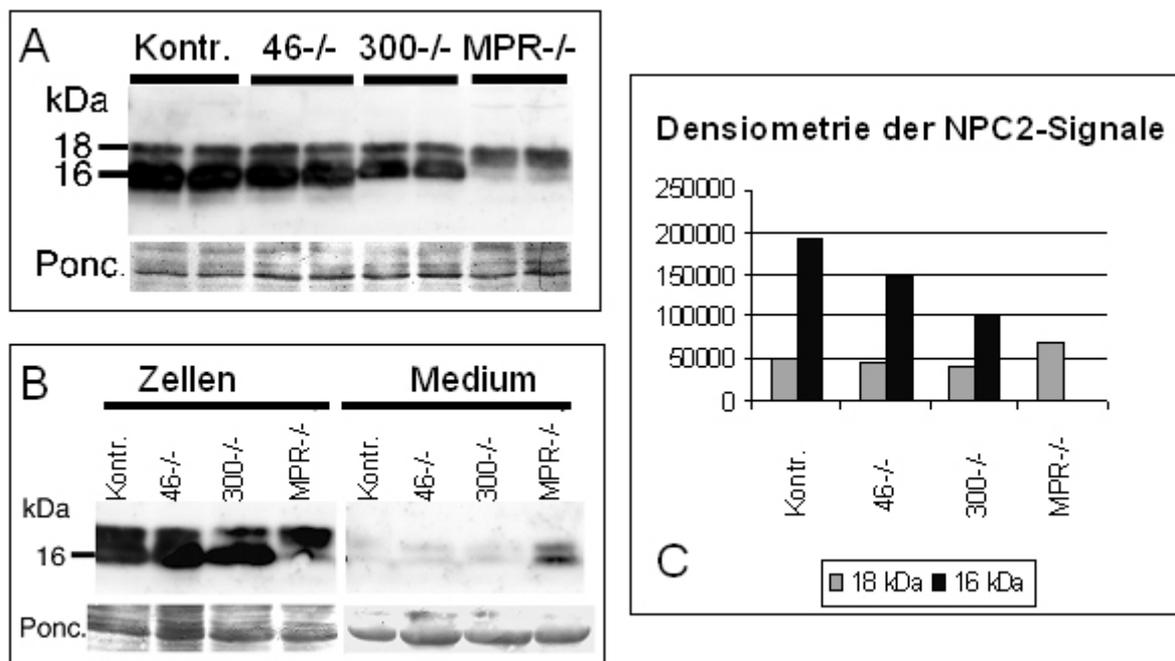


Abb. 12: Endogenes NPC2 in MPR-defizienten Zellen. Pro Spur wurden gleiche Menge an Protein aufgetragen, was durch eine Ponceaufärbung überprüft wurde (Ponc.; A, B). **A:** Westernblot mit anti-NPC2-Antikörper von Zellextrakten der verwendeten MPR-defizienten Zelllinien sowie der Kontrollzelllinie. **B:** Nach einem Tag Kultivierung der Zellen wurde das Medium durch DMEM mit 1 % FCS ersetzt und die Zellen vier Stunden weiterkultiviert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen geerntet. Nach der Proteinbestimmung der Zellextrakte wurde die aufzutragende Menge an Medium abgestimmt und ein

Westernblot mit anti-NPC2-Antikörper durchgeführt. Man beachte, dass die Banden der Zellextrakte in B überexponiert wurden, um die NPC2-Bande im Medium sichtbar zu machen. Die Banden aus A wurden mit der Software PCBAS (3.2.2.7) quantifiziert und sind in C dargestellt.

Zusammengenommen ergibt sich, dass nur MPR46 und MPR300 zusammen einen maximalen NPC2-*Pool* ermöglichen, sie aber auch einzeln eine beträchtliche NPC2-Menge in der Zelle halten.

4.1.3 Glykosylierung von NPC2 in MPR-defizienten Zellen

Lysosomale und sekretorische Proteine werden zuerst im endoplasmatischen Retikulum (ER) glykosyliert. Die Enzyme im Golgi-Apparat modifizieren die angehängten Zuckerketten weiter, wenn das Protein vom ER zum Golgi-Netzwerk transportiert wurde. Mit dem Enzym Endoglykosidase H (Endo H) können diejenigen N-glykosylierten Proteine einer Zelle deglykosyliert werden, die den medialen Golgi-Komplex noch nicht erreichen haben und deren Zuckerketten somit noch nicht zu komplexen Zuckerketten umgebaut wurden (Trimble et al., 1978). Alle N-glykosylierten Proteine werden dagegen von N-Glykosidase F (PNGase F) deglykosyliert, welches alle N-gebundenen Kohlenhydratketten abspaltet und ein Polypeptid mit eventuellen O-gebundenen Zuckern zurücklässt (Tarentino et al., 1985). Endo H und PNGase F wurden für die Untersuchung der Glykosylierung von NPC2 in den MPR-defizienten Zelllinien und Kontrollzellen eingesetzt (3.2.2.5). Murines NPC2 besitzt drei potentielle Glykosylierungsstellen: Asn38, Asn58 und Asn69. Chikh et al. fanden, dass der Transport von humanem NPC2 von der Glykosylierung des Asparaginrestes 58 abhängt (Chikh et al., 2004). Die Behandlung der MPR-Zelllinien mit PNGase F ergab eine Bande von etwa 14 kDa in allen vier Zelllinien (Abb. 13A), was auf eine Glykosylierung von NPC2 bei gleicher Größe des Polypeptids in allen vier Zelllinien schließen ließ.

Nach Endo H-Behandlung war ein großer Teil der NPC2-Proteine im Kontrollzell-extrakt zu einer 14 kDa-Bande deglykosyliert (Abb. 13B), was dafür sprach, dass die angehängten Zuckerketten vom Mannose- oder Hybridtyp waren. Zusätzlich konnten zwei Endo H-resistente Formen mit einer Größe von 15 kDa und 15-16 kDa ermittelt werden. Die Oligosaccharide dieser zwei Formen konnten nur teilweise durch Endo H abgespalten werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass einige Formen von NPC2 nur Endo H-sensitive Oligosaccharide enthalten und andere eine Mischung von sensitiven und resistenten

Zuckerketten besitzen. Die Banden in der MPR46-defizienten Zelllinie entsprachen denen der Kontrolle, was dafür spricht, dass das Fehlen von MPR46 das Glykosylierungsschema von NPC2 nicht beeinflusst. In MPR300-defizienten Zellen konnte keine Endo H-resistente Bande in Höhe von 15-16 kDa detektiert werden und nur die 14 kDa-Bande war vorhanden (Abb. 13B). Das NPC2 dieser Zellen hatte also im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Endo H-Sensitivität und einen geringeren Anteil an komplexen Kohlenhydraten. Auch in den MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen konnten keine komplexen Zuckerketten gefunden werden, denn im Westernblot ergab sich nur eine Endo H-sensitive Bande.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anwesenheit der MPRs das Glykosylierungsschema von NPC2 beeinflusst, wobei MPR300 eine besondere Rolle bei der Bildung von komplexen Oligosaccharidketten spielen könnte. Die Abwesenheit von komplexen Zuckerketten erklärt auch das etwas unterschiedliche Bandenmuster der MPR300-defizienten Zelllinie im Westernblot (Abb. 12A). Eine denkbare Aufgabe der komplexen Oligosaccharide wäre z.B. der Schutz gegen die hydrolytischen Enzyme im Lysosom.

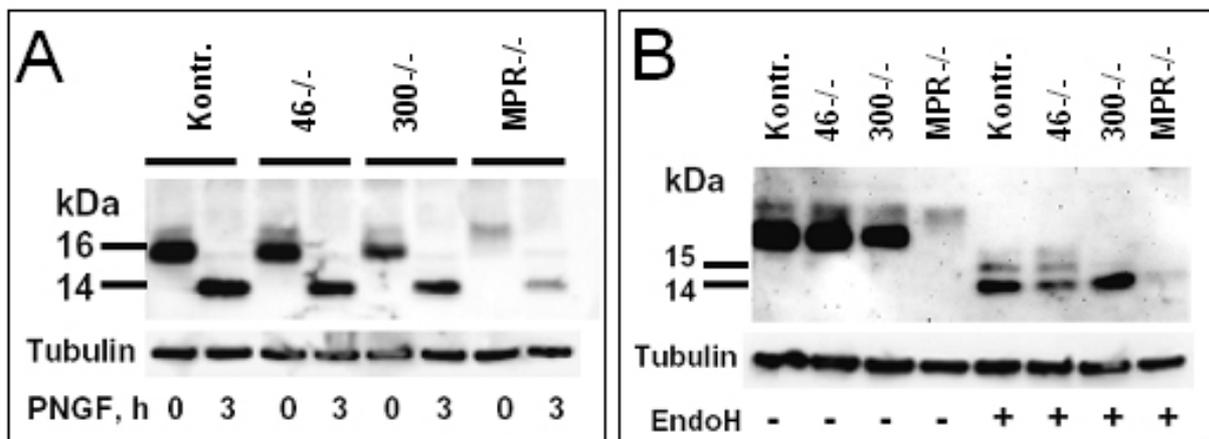


Abb. 13: Deglykosylierung von endogenem NPC2 mit PNGase F und Endo H. A: 20 µg Protein wurden für drei Stunden bei 37°C mit 1 Unit N-Glykosidase F (PNGase F, PNGF) deglykosyliert und zusammen mit einer unbehandelten Probe aufgetragen. Der Blot wurde anschließend *gestrippt* und mit anti-Tubulinantikörper erneut detektiert, um zu überprüfen, ob in jeder Spur die gleiche Menge an Protein aufgetragen wurde. B: 25 µg Protein wurden über Nacht bei 37°C mit 6,35 mU Endoglykosidase H (Endo H) behandelt und zusammen mit einer unbehandelten Probe aufgetragen. Der Blot wurde anschließend *gestrippt* und die aufgetragene Proteinmenge mit anti-Tubulinantikörper kontrolliert.

4.1.4 NPC1-Expression in MPR-defizienten Fibroblasten

Es wird vermutet, dass die Proteine NPC1 und NPC2 eine Funktion an zwei unterschiedlichen Zwischenstufen desselben Transportprozesses von Cholesterin und anderen Lipiden aus dem Lysosom heraus einnehmen (Vanier und Millat, 2003). Daher wurde in dieser Arbeit auch die Expression von NPC1 in den verwendeten MPR-Zelllinien untersucht. Westernblotanalysen (3.2.2.7) ergaben für MPR46-defiziente Fibroblasten eine 0,6fach geringere Menge an NPC1 als im Zellextrakt der Kontrolle (Abb. 14A). Die NPC1-Menge in MPR300-defizienten Zellen war 1,4mal so hoch wie bei der Kontrolle und in den doppeldefizienten Fibroblasten ließ sich sogar eine 2,3mal höhere NPC1-Menge als bei der Kontrollzelllinie nachweisen. Die Zellen kompensierten also womöglich die Fehlsortierung von NPC2 mit einer erhöhten Synthese von NPC1. Daher wurde im Anschluss mittels Northernblotanalyse (3.2.1.10) die NPC1-mRNA-Menge der eingesetzten Zelllinien untersucht.

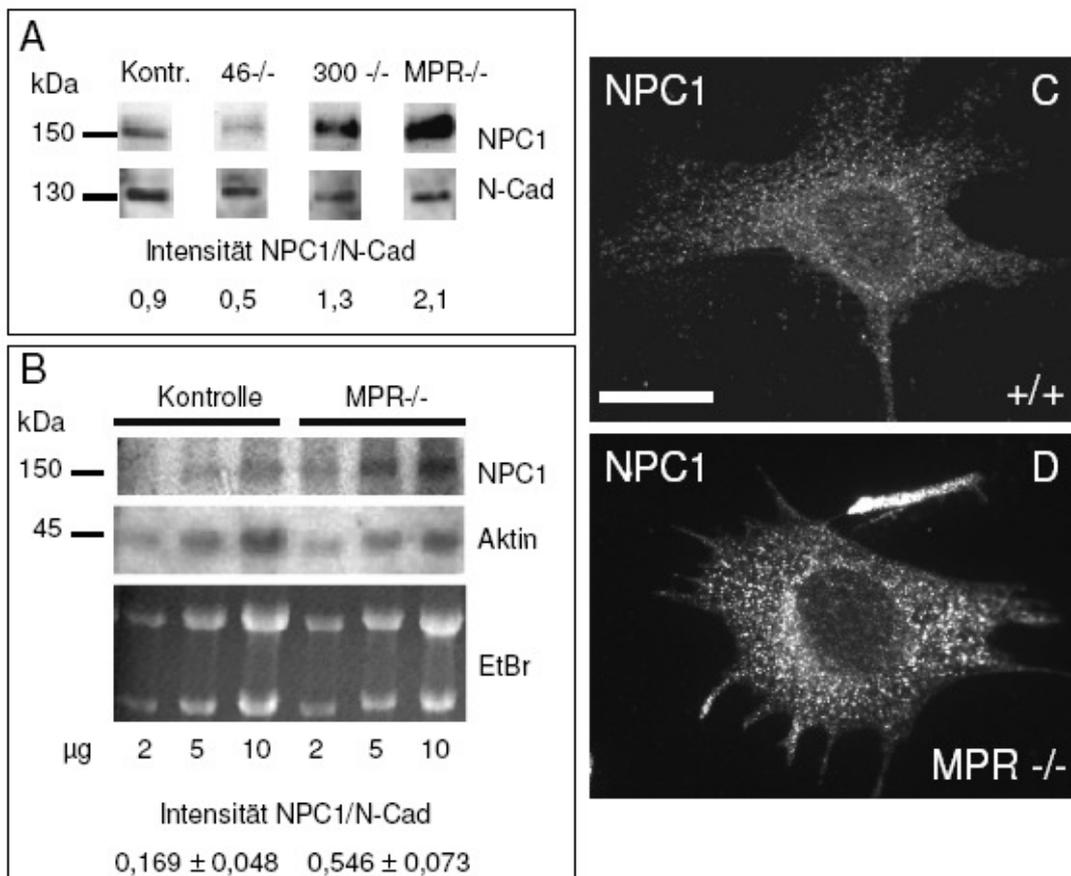


Abb. 14: NPC1 in MPR-defizienten Zellen. **A:** Bestimmung der NPC1-Proteinmenge in MPR-defizienten Zellen und Kontrollzellen durch Westernblotanalyse mit einem anti-NPC1-Antikörper. Als Ladekontrolle wurde derselbe Blot nach einem *Stripping* mit einem anti-N-Cadherinantikörper inkubiert. Eine Quantifizierung der Banden erfolgte mit der Software PCBAS (3.2.2.7). **B:** Northernblotanalyse zur Untersuchung der NPC1 mRNA. Für die Ladekontrolle wurde eine Aktinsonde verwendet. Von der Kontrollzelllinie (Kontr.) und der MPR-defizienten Zelllinie wurden jeweils 2, 5 und 10 µg RNA aufgetragen. Die Integrität der RNA wurde durch eine Ethidiumbromidfärbung (EtBr) überprüft. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit der Software PCBAS und das Verhältnis von NPC1 zu Aktin wurde für jede Spur berechnet. Der angegebene Wert ergab sich aus dem Mittelwert der NPC1/Aktin-Verhältnisse der drei aufgetragenen RNA-Mengen pro Zelllinie ± Standardabweichung. Students t-test ($P = 0,002$). **C, D:** Immunfluoreszenzfärbung von endogenem NPC1 in Kontrollzellen (C) und MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen (D). Maßstabbalken = 10 µm (gilt für C und D).

Wie Abb. 14B zeigt, waren die mRNA-Signale in den MPR46/MPR300-doppeldefizienten Fibroblasten 3,2mal stärker als bei der Kontrolle. Die erhöhte Proteinmenge in den MPR46/MPR300-doppeldefizienten Fibroblasten könnte also zumindest teilweise auf eine erhöhte Transkription und der damit einhergehenden Proteinsynthese zurückzuführen sein. Zusätzlich wurde die subzelluläre Lokalisation von NPC1 in Kontrollzellen und MPR46/MPR300-doppeldefizienten Fibroblasten mit Hilfe von indirekter Immunfluoreszenz (3.2.3.7) verglichen (Abb. 14C und D). In beiden Zelllinien zeigte sich eine ähnliche Verteilung von kleinen zytoplasmatischen Vesikeln. In den MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen war diese Färbung allerdings stärker als bei den Kontrollzellen, was mit den Ergebnissen der Northern- und Westernblotanalysen (Abb. 14A und B) übereinstimmte.

4.1.5 NPC2-Immunfärbung in MPR-defizienten MEFs

Um die subzelluläre Lokalisation von endogen exprimiertem NPC2 in den untersuchten Zelllinien näher zu charakterisieren, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung (3.2.3.7) durchgeführt. Vorher wurden die Zellen mit *Bouin's* Fixierlösung (Pikrinsäure, Formalin, Eisessig, 15:5:1) fixiert, da in Vorexperimenten herausgefunden wurde, dass mit anderen Fixiermethoden kein Signal für NPC2 detektiert werden konnte. In der Kontrollzelllinie und in MPR46-defizienten Fibroblasten konnte NPC2 in kleinen Vesikeln angefärbt werden, die in der ganzen Zelle verteilt waren (Abb. 15A und B). Auch in MPR300-defizienten Zellen konnten deutlich angefärbte Vesikel nachgewiesen werden (Abb. 15C). Die durchschnittliche

Zahl an Vesikeln pro Zelle war allerdings leicht reduziert. Zusätzlich zeigte sich eine schwache retikuläre Färbung um den Nukleus herum. Die vesikuläre NPC2-Färbung konnte in den MPR46/MPR300-doppeldefizienten Fibroblasten gar nicht mehr beobachtet werden (Abb. 15D). Stattdessen ergab die NPC2-Färbung nur ein schwaches retikuläres Signal.

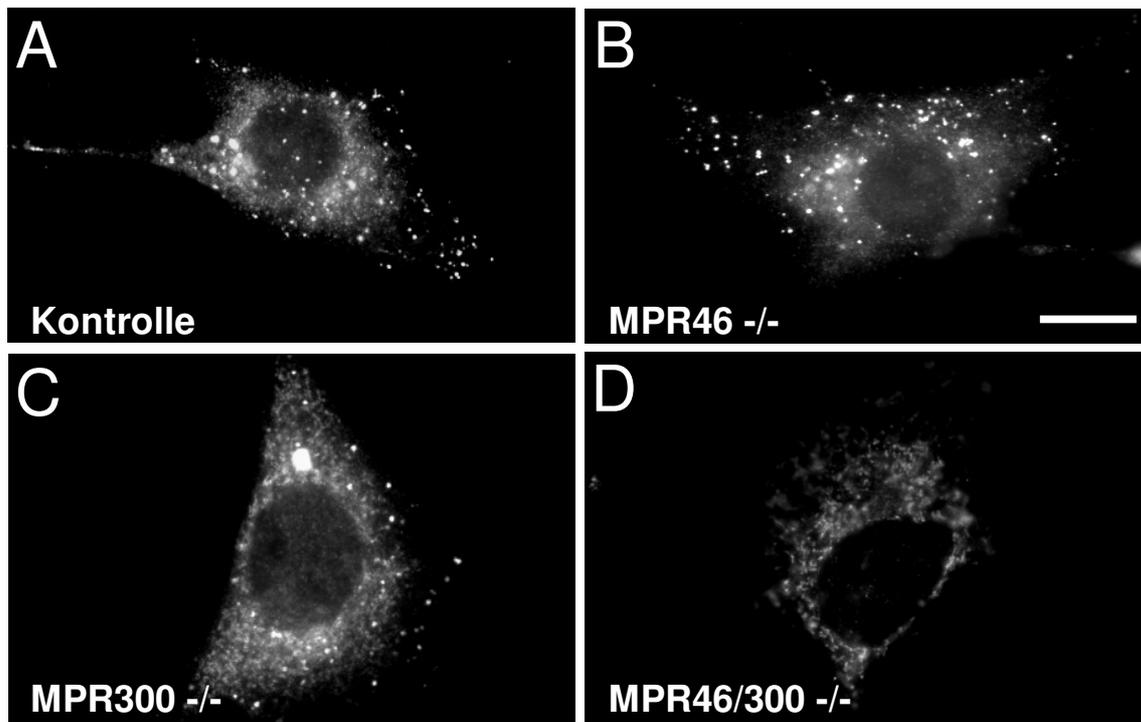


Abb. 15: Subzelluläre Lokalisation von endogenem NPC2. Mit *Bouin's* Fixierlösung (25 % in PBS) fixierte Kontrollzellen und MPR-defiziente Zellen wurden eine Stunde mit einem anti-NPC2-Antikörper (1:100) und anschließend eine Stunde mit fluoreszenzgekoppeltem Sekundärantikörper markiert. **A:** Kontrollfibroblast. **B:** MPR46-defizienter Fibroblast. **C:** MPR300-defizienter Fibroblast. **D:** MPR46/MPR300-doppeldefizienter Fibroblast. Maßstab Balken = 10 μ m (gilt für A-D).

4.1.6 Subzelluläre NPC2-Lokalisation

Zur genaueren Analyse der subzellulären Lokalisation von NPC2 in den untersuchten Zelllinien, wurde eine Doppelfärbung mit NPC2 und Markern für verschiedene Zellkompartimente durchgeführt. Die Doppelfärbung mit dem lysosomalen Membranprotein LAMP-1 ergab, dass die NPC2-Vesikel in Kontrollzellen mit LAMP-1 kolokalisieren und sich somit in späten Endosomen oder Lysosomen befanden (Abb. 16A). Auch in MPR46-defizienten und MPR300-defizienten Fibroblasten kolokalisierten LAMP-1 und NPC2 (Abb.

16D und G). In den MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen konnte keine Kolokalisation festgestellt werden (Abb. 16J), was darauf hindeutet, dass NPC2 in diesen Zellen nicht zu den Lysosomen transportiert wurde. Dieses Ergebnis bestätigte die Westernblotanalysen (Abb. 12) und die Hypothese, dass NPC2 von beiden MPRs zum Lysosom transportiert wird. Mit dem TGN-Marker Syntaxin 6 (Bock et al., 1997) und NPC2 konnte in allen getesteten Zelllinien nur eine sehr geringe Kolokalisation festgestellt werden (Abb. 16B, E, H und K), was darauf schließen lässt, dass NPC2-Proteine im TGN von Fibroblasten nicht angereichert vorliegen.

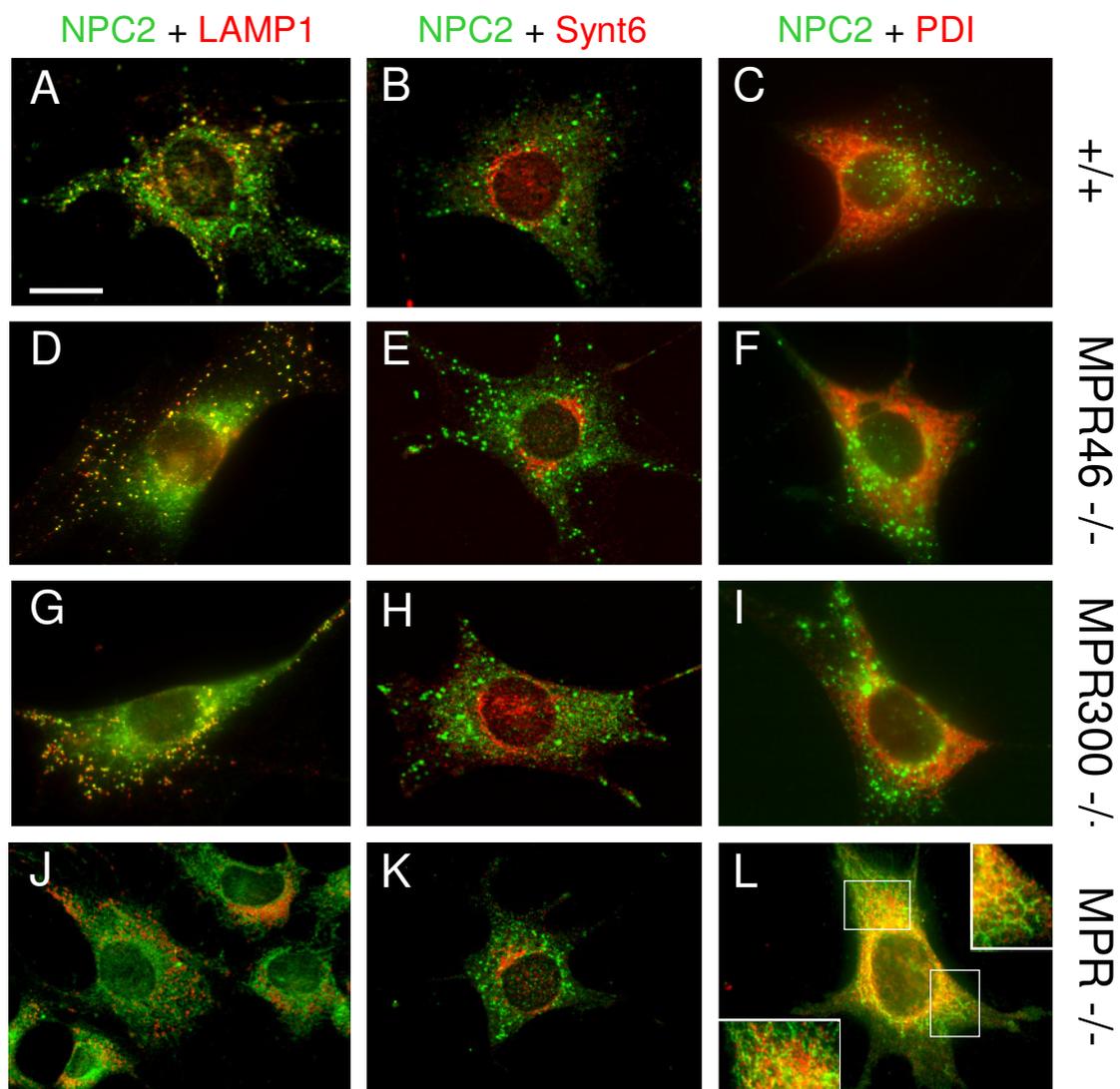


Abb. 16: Subzelluläre Lokalisation von NPC2. Endogenes NPC2 wurde in mit *Bouin's* Fixierlösung (25 % in PBS) fixierten Kontrollzellen (A-C), MPR46-defizienten (D-F), MPR300-defizienten (G-I) sowie MPR46/MPR300-doppeldefizienten Fibroblasten (J-L) angefärbt. Dabei wurde eine Doppelfärbung mit jeweils LAMP-1 als endosomalen/lysosomalen Marker (A, D, G, J), Syntaxin 6 als TGN-Marker (B, E, H, K) und Proteindisulfidisomerase (PDI) als ER-Marker (C, F, I, L) durchgeführt. Im Unterschied zu der NPC2-Lokalisation in Kontrollzellen und MPR-einzeldefizienten Zellen wurde NPC2 in den MPR46/MPR300-

doppeldefizienten Fibroblasten verstärkt in Kolokalisation mit dem ER-Marker PDI gefunden, was in **L** zusätzlich durch Vergrößerungen gezeigt ist. Maßstabalken = 10 µm (gilt für A-L).

Bei der Doppelfärbung mit dem ER-Marker Proteindisulfidisomerase (PDI) und NPC2 konnte in den Kontrollzellen und den MPR-einzeldefizienten Fibroblasten ebenfalls kaum eine Kolokalisation gezeigt werden (Abb. 16C, D und I). Nur in den MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen wurde ein Anteil von NPC2 im ER nachgewiesen, was mit der fehlerhaften Sortierung von NPC2 in diesen Zellen erklärt werden kann. Die erhöhte Menge an NPC2 im ER könnte durch eine vermehrte Synthese von NPC2 verursacht worden sein, die das Fehlen von NPC2 in den Lysosomen auszugleichen versuchte. Ebenso ist es denkbar, dass das Fehlen der MPRs den Transport aus dem ER und dem Golgi-Netzwerk heraus behindert. Um diese beiden Alternativen näher zu untersuchen, wurde eine Northernblotanalyse (3.2.1.10) der NPC2-mRNA durchgeführt (Abb. 17). Es zeigte sich kein Unterschied in der Menge an NPC2-mRNA zwischen den Kontrollzellen und den MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen.

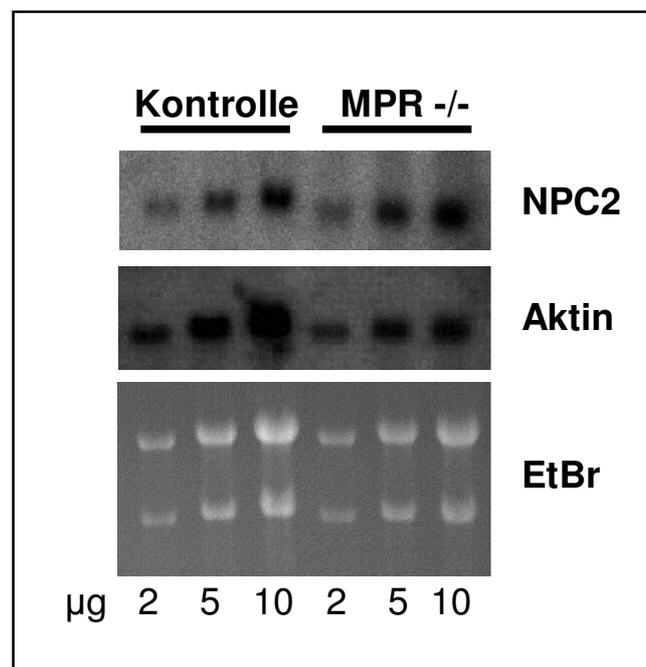


Abb. 17: Northern Blot von NPC2-mRNA. Im obersten Northernblot wurde mit RNA-Isolaten von Kontrollzellen und MPR-defizienten Zellen die NPC2-mRNA mit einer NPC2-Sonde detektiert. Dabei wurden je Zelllinie drei verschiedene Mengen (2, 5 und 10 µg) aufgetragen. Anschließend wurde derselbe Blot zur Kontrolle mit einer Aktinsonde detektiert. Das Ergebnis ist im zweiten Northernblot gezeigt. Um die Integrität der RNA zu überprüfen, wurde das RNA-Gel mit Ethidiumbromid (EtBr) angefärbt.

Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die erhöhte ER-Lokalisation von NPC2 in den MPR-defizienten Fibroblasten in einem verlangsamten Transport aus dem ER heraus begründet ist. Zusammengefasst ergeben die Immunfluoreszenzdaten, dass in Kontrollzellen und MPR-einzeldefizienten Zellen NPC2 zu LAMP-1-positiven Endosomen/Lysosomen gelangte, wohingegen kein endosomales/lysosomales NPC2 in MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen detektiert werden konnte.

4.1.7 Expression von MPR46 oder MPR300 in MPR-defizienten Fibroblasten

Um zu bestätigen, dass tatsächlich das Fehlen der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren die Fehlsortierung und die veränderte subzelluläre Lokalisation von NPC2 verursachte, wurden MPR46/MPR300-doppeldefizienten MEFs transient mit humanem MPR46 bzw. MPR300 transfiziert (3.2.3.6). Die Untersuchung der NPC2-Lokalisation erfolgte anschließend durch Immunfluoreszenzfärbung (3.2.3.7). Dabei wurde eine gleichzeitige Färbung mit einem anti-MPR46-Antikörper bzw. anti-MPR300-Antikörper zur Überprüfung der Expression sowie dem anti-NPC2-Antikörper zur Anfärbung des endogenen NPC2-Proteins durchgeführt.

Abb. 18A zeigt links eine Zelle, die das transfizierte MPR300 exprimiert (mit * markiert) und daneben eine Zelle, die nicht transfiziert wurde. Bei Färbung mit NPC2-Antikörpern konnte in den transfizierten Zellen eine vesikuläre Lokalisation gezeigt werden (Abb. 18B), wie sie für endogenes NPC2 gefunden wurde (Abb. 15A). Die nicht transfizierten Zellen wiesen hingegen eine schwache retikuläre Färbung auf. Wurden die MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen mit MPR46 transfiziert (Abb. 18C und D), so konnte ebenfalls nur in den transfizierten Zellen eine vesikuläre NPC2-Färbung erkannt werden. Die Transfektion von MPR46/MPR300-doppeldefizienten Fibroblasten mit einem der beiden MPR-Rezeptoren führte also zu einer Wiederherstellung der NPC2-Lokalisation. Die Signale waren allerdings in den reexprimierenden Zellen, anders als in untransfizierten Kontrollzellen und MPR46-defizienten Zellen (Abb. 15A und B), nicht im Zytoplasma verteilt, sondern stark im perinukleären Raum konzentriert mit wenigen zytoplasmatischen Vesikeln.

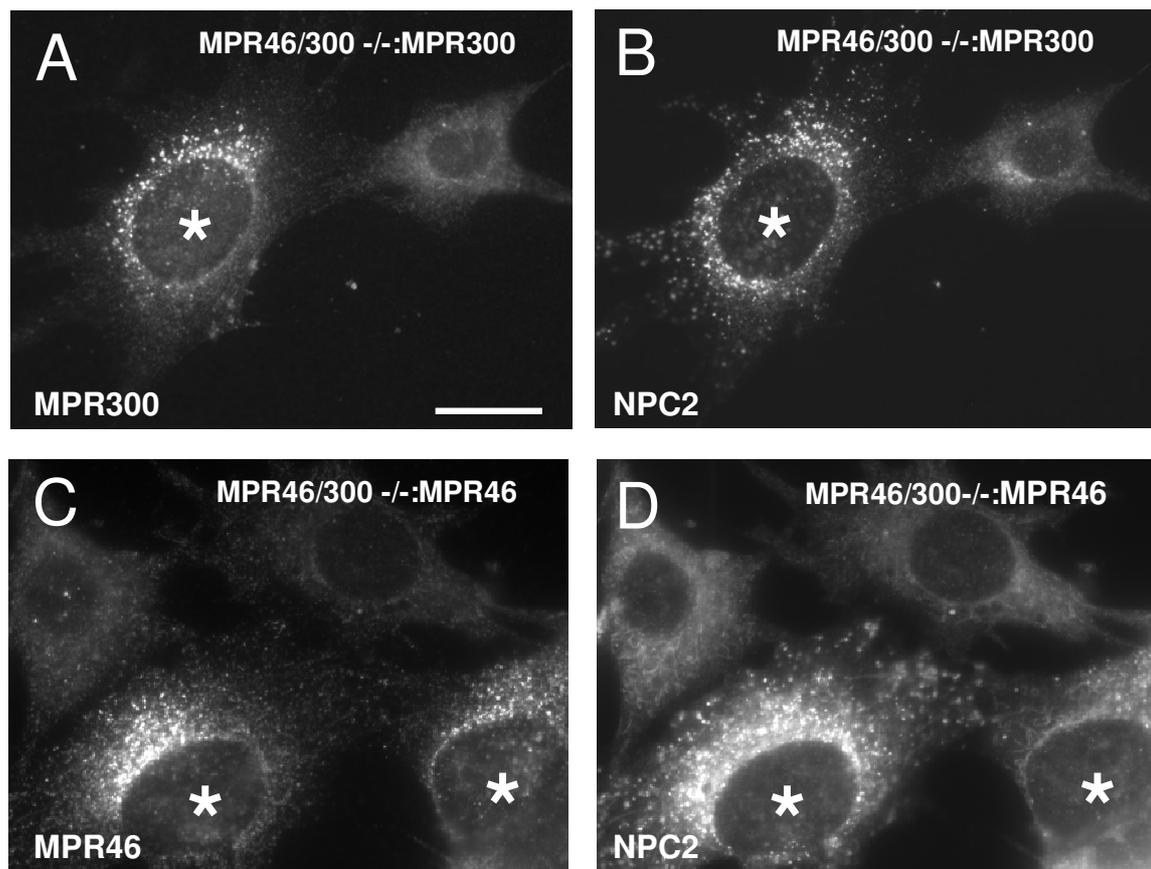


Abb. 18: NPC2-Lokalisation nach transienter Transfektion von MPR-defizienten Fibroblasten mit MPR46 bzw. MPR300. A-D: MPR46/MPR300-doppeldefiziente Zellen wurden mit humanem MPR46 oder humanem MPR300 transfiziert und vier Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen eine Stunde mit *Bouin's* Fixierlösung (25 % in PBS) fixiert. Transfizierte Zellen sind mit * gekennzeichnet. **A, B:** Transfektion von MPR46/MPR300-doppeldefizienten Fibroblasten mit humanem MPR300. **A:** Anfärbung der transfizierten Zellen mit anti-MPR300-Antikörper und sekundärem Fluoreszenzantikörper. **B:** Anfärbung der Zellen aus A mit anti-NPC2-Antikörper und sekundärem Fluoreszenzantikörper. **C, D:** Transfektion mit von MPR46/300-doppeldefizienten Fibroblasten mit humanem MPR46. **C:** Anfärbung der transfizierten Zellen mit anti-MPR46-Antikörper und sekundärem Fluoreszenzantikörper. **D:** Anfärbung der Zellen aus C mit anti-NPC2-Antikörper und sekundärem Fluoreszenzantikörper. Maßstab Balken = 10 µm.

4.1.8 Cholesterinakkumulation in MPR-doppeldefizienten Fibroblasten

Es ist bekannt, dass Mutationen in NPC2 oder eine NPC2-Defizienz zu einer Akkumulation von freiem Cholesterin in spätendosomalen oder lysosomalen Kompartimenten führen (Garver und Heidenreich, 2002). Um zu testen, ob Cholesterin in den untersuchten MPR-defizienten Zelllinien akkumuliert, wurden die Zellen mit Filipin gefärbt (3.2.3.8). Dieses

Antibiotikum aus dem Bakterium *Streptomyces filipinensis* bindet spezifisch an freies Cholesterin, wobei ein blaufluoreszierender Komplex entsteht. In Kontrollzellen ergab sich eine Färbung der Plasmamembran sowie von vesikulären retikulären Strukturen in der Perinuklearregion (Abb. 19A), wie es für normale Fibroblasten beschrieben wurde (Eskelinen et al., 2004). Im Gegensatz dazu konnte in einigen MPR-einzeldefizienten Fibroblasten eine vesikuläre Färbung, die sich hauptsächlich um den Kern akkumulierte, mit einigen Vesikeln im peripheren Zytoplasma (Abb. 19B und C), beobachtet werden. In den MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen waren die Vesikel in fast allen Zellen sehr stark akkumuliert (Abb. 19D). Eine Quantifizierung der Zellen mit vesikulärer Färbung ergab, dass mehr als 80 % der doppeldefizienten Zellen eine vesikuläre Cholesterinakkumulation aufwiesen (Abb. 19D). In MPR46-defizienten Fibroblasten zeigten etwa 20 % der ausgezählten Zellen eine Cholesterinakkumulation, in MPR300-Fibroblasten waren es 38 %. In Kontrollzellen konnte eine solche Akkumulation nur in weniger als 5 % der Zellen detektiert werden (Abb. 19D).

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass beide MPRs für einen effizienten lysosomalen Cholesterinefflux benötigt werden, welcher womöglich vom lysosomalen Transport von NPC2 abhängt. Jeder der beiden MPRs alleine ist demzufolge in der Lage, den Cholesterintransport aufrechtzuerhalten und eine lysosomale Akkumulation von freiem Cholesterin in den meisten Zellen zu verhindern. MPR300 könnte dabei eine wichtigere Rolle spielen, da in MPR300-defizienten Zellen häufiger eine Cholesterinakkumulation gefunden wurde als in MPR46-defizienten Fibroblasten. Es ist also möglich, dass MPR300 mehr NPC2 transportiert als MPR46.

Zur Verifizierung der mikroskopischen Daten, wurde ein biochemischer Cholesterinassay durchgeführt (3.2.2.9), mit dem sowohl freies als auch verestertes Cholesterin ermittelt werden konnte (Abb. 19F). Die Gesamtmengen an Cholesterin in MPR-einzeldefizienten Zellen waren dabei ungefähr gleich hoch wie bei der Kontrolle. Die Cholesterinmengen pro Zellprotein in den doppeldefizienten Fibroblasten waren hingegen mehr als doppelt so hoch. Obwohl also die Anzahl der Zellen mit Cholesterinakkumulation in den MPR-einzeldefizienten Zelllinien im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht war (Abb. 19A-C), waren die Gesamtcholesterinmengen vergleichbar. In den doppeldefizienten Fibroblasten hingegen war sowohl die Verteilung des freien Cholesterins als auch die Cholesteringesamtmenge stark verändert.

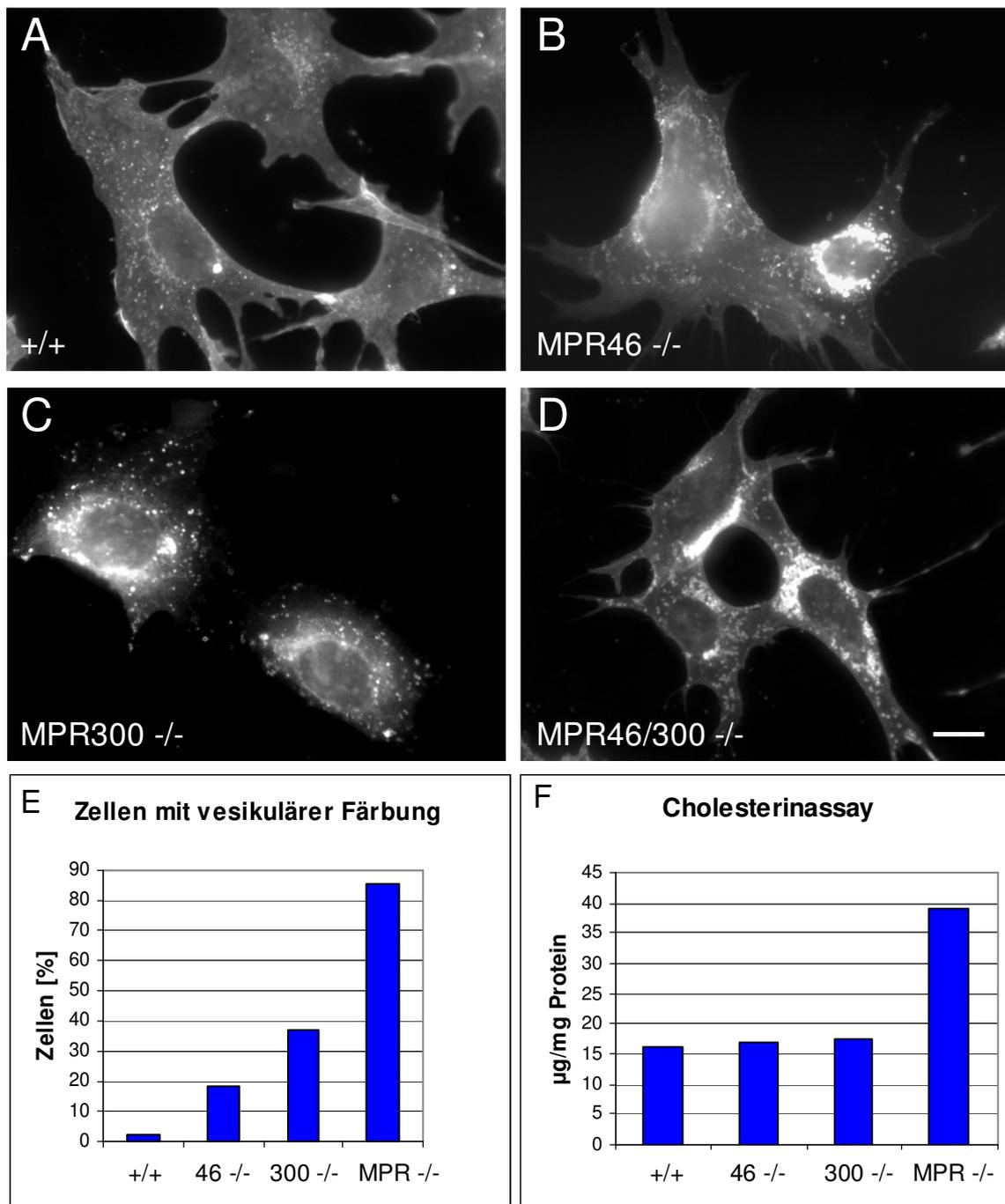


Abb. 19: Cholesterinakkumulation in MPR-defizienten Zellen. **A-D:** Filipinfärbung des freien Cholesterins. Fixierte Zellen wurden eine Stunde in einer Filipinlösung (0,5 mg/ml in PBS) bei RT inkubiert und nach mehreren Waschschriften mit PBS in Mowiol eingebettet. **A:** Filipinfärbung in Kontrollzellen. **B:** Filipinfärbung in MPR46-defizienten Zellen. **C:** Filipinfärbung in MPR300-defizienten Zellen. **D:** Filipinfärbung in MPR46/MPR300-doppeldefizienten Fibroblasten. **E:** Mikroskopische Quantifizierung der vesikulären Färbung. **F:** Biochemischer Cholesterinassay der verschiedenen MEF-Zelllinien. Der Assay detektierte freies und verestertes Cholesterin und wurde in μg Cholesterin pro mg Zellprotein bestimmt. Maßstabbalken = 10 μm (gilt für A-D).

Um die Rolle von MPR46 und MPR300 in der Cholesterinhomöostase näher zu charakterisieren, wurden MPR46/MPR300-doppeldefiziente MEFs mit MPR46 oder MPR300 transfiziert und anschließend einer Filipinfärbung unterzogen. Abb. 20 zeigt die Reexpression von MPR300 (Abb. 20A) und MPR46 (Abb. 20B) sowie das freie Cholesterin in den gleichen Zellen nach der Filipinfärbung (Abb. 20C und D). Es war offensichtlich, dass diejenigen MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen, die MPR46 bzw. MPR300 reexprimierten, eine deutlich geringere Cholesterinakkumulation aufwiesen, als die nicht-transfizierten Zellen.

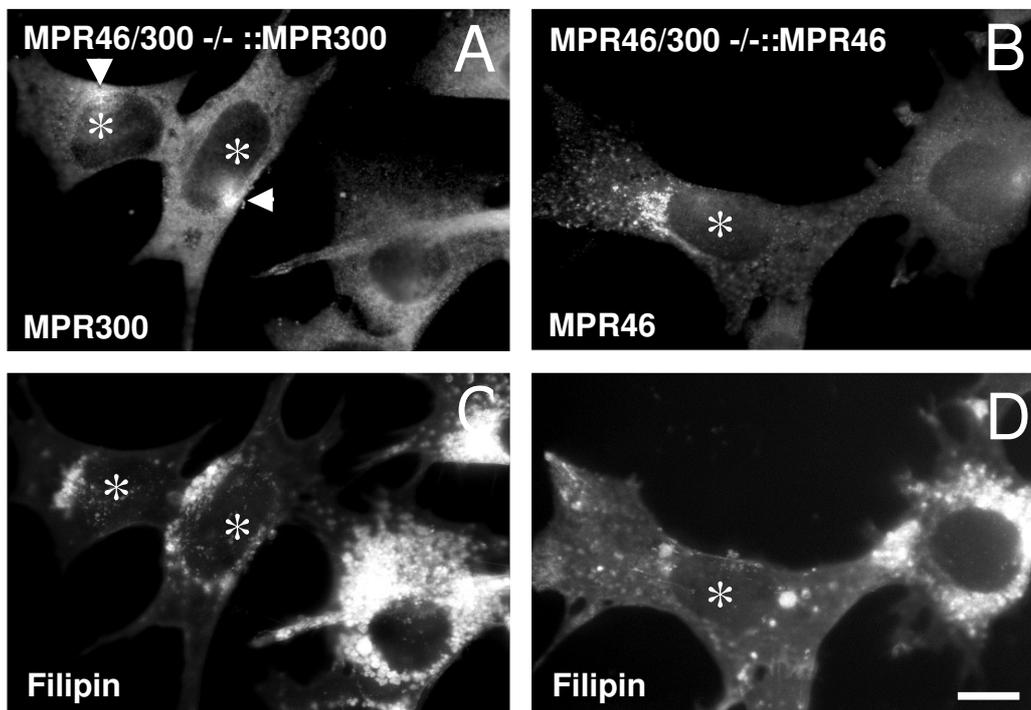


Abb. 20: Rückgang der Cholesterinakkumulation nach Transfektion mit MPR46 bzw. MPR300. A-D: MPR46/MPR300-doppeldefiziente Fibroblasten wurden transient mit humanem MPR46 bzw. humanem MPR300 transfiziert und zwei weitere Tage in Kultur gehalten. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % PFA in PBS fixiert und mit Filipin gefärbt. Die reexprimierenden Zellen sind mit * gekennzeichnet. **A, C:** Transfektion mit humanem MPR300. **A:** Anfärbung der transfizierten Fibroblasten mit anti-MPR300-Antikörpern. Es stellte sich außerdem heraus, dass die Filipinfärbung störend auf die Färbung von MPR300 einwirkte. Es konnte in den filipinbehandelten Zellen lediglich ein heller Punkt in der Nähe des Zellkerns detektiert werden (Pfeile), nicht aber das für MPR300-typische vesikuläre retikuläre Muster (Abb. 11). **C:** Filipinfärbung der mit MPR300-transfizierten Zellen aus A. Die transfizierten Zellen (*) zeigten eine geringere Cholesterinakkumulation als die nicht transfizierten Zellen. **B, D:** Transfektion mit humanem MPR46. **B:** Anfärbung der transfizierten Fibroblasten mit anti-MPR46-Antikörpern. **D:** Filipinfärbung der mit MPR46-transfizierten Zellen aus B. Die transfizierte Zelle (*) zeigte eine geringere Cholesterinakkumulation als die nicht transfizierte Zelle. Maßstabballen = 10 μ m (gilt für A-D).

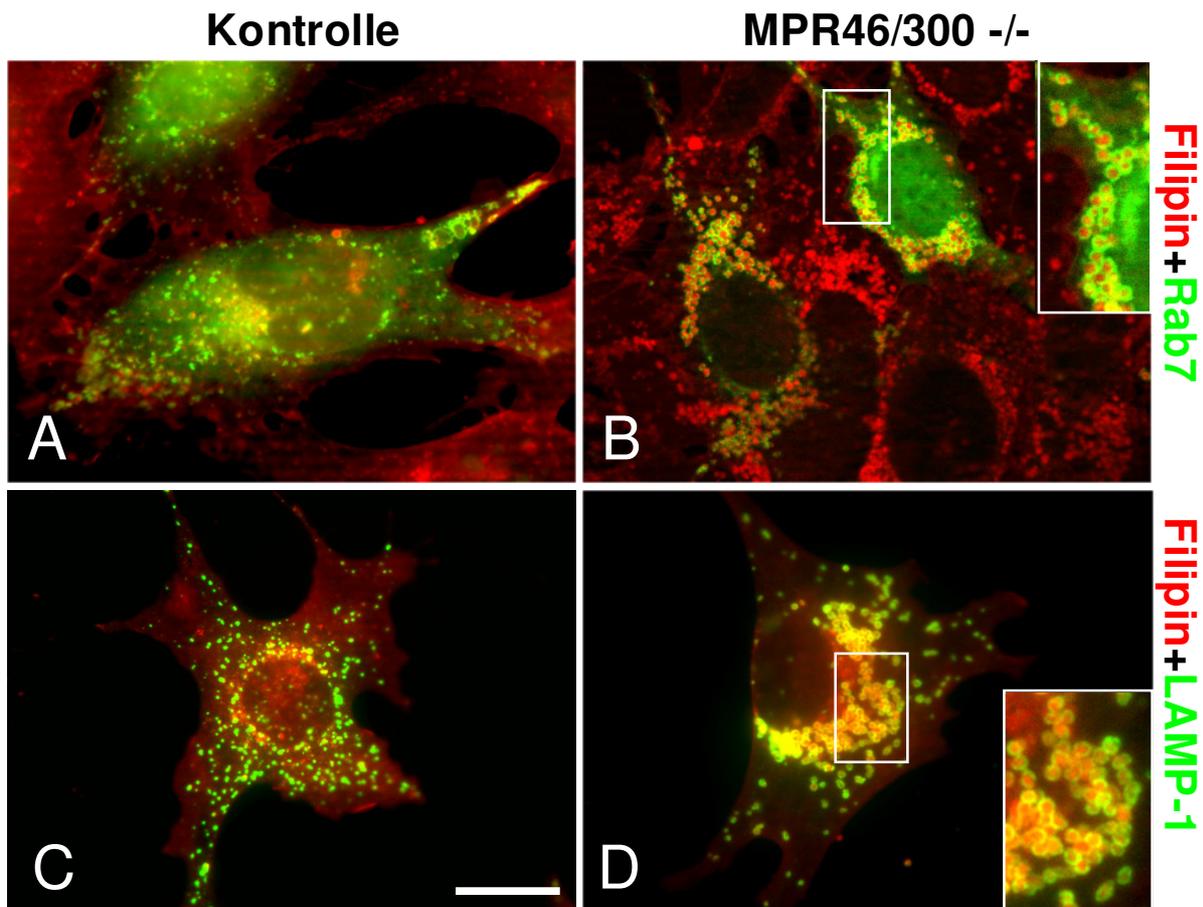


Abb. 21: Cholesterinakkumulation in MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen in endosomalen/lysosomalen Vesikeln. **A, B:** Kontrollzellen (**A**) und MPR46/MPR300-defiziente Zellen (**B**) wurden transient mit GFP-Rab7 transfiziert (grün). Die Filipinfärbung ist in rot dargestellt. **B:** Die Lokalisation von Filipin in Rab7-positiven Vesikeln ist zusätzlich in Vergrößerung gezeigt. **C, D:** Kontrollzellen (**C**) und MPR46/MPR300-defiziente Zellen (**D**) wurden mit Filipin angefärbt (rot) und anschließend einer Antikörperfärbung mit einem anti-LAMP-1-Antikörper und fluoreszenzgekoppeltem Sekundärantikörper (grün) unterzogen. In den MPR46/MPR300-defizienten Zellen (**D**) akkumulierte Filipin in LAMP-1-positiven Vesikeln (Vergrößerung). Maßstabballen = 10 μ m (gilt für A-D).

Um die filipingefärbten Vesikel in den doppeldefizienten Zellen näher zu charakterisieren, wurden weitere Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. In NPC1 und NPC2 Patientenfibroblasten (Ikonen und Holtta-Vuori, 2004) und LAMP-1/LAMP-2-doppeldefizienten Fibroblasten (Eskelinen et al., 2004) akkumuliert das freie Cholesterin in spätendosomalen Vesikeln. Daher wurde getestet, ob spätendosomale Marker mit den filipingefärbten Vesikeln in MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen kolokalisierten. Zur Untersuchung der Kolokalisation mit der spätendosomalen GTPase Rab7 wurden die Zellen transient mit Rab7-GFP transfiziert. In den Kontrollzellen konnte eine geringe Kolokalisation

von Rab7 mit den Filipinsignalen entdeckt werden (Abb. 21A). In den MPR46/MPR300-doppeldefizienten Fibroblasten war diese Kolokalisation weit stärker ausgeprägt (Abb. 21B), wobei die Rab7-Färbung meist um die Filipinvesikel herum zu beobachten war, was die Vergrößerung in Abb. 21B deutlich macht. Ein ähnliches Färbemuster wie mit Rab7 und Filipin ergab die Doppelfärbung mit Filipin und dem lysosomalen Membranprotein LAMP-1 (Abb. 21C und D). Es zeigte sich eine schwache Kolokalisation zwischen Filipin und LAMP-1 in den Kontrollfibroblasten. In den MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen konnte LAMP-1 um die Filipinvesikel herum detektiert werden, was in Abb. 21D zusätzlich in der Vergrößerung dargestellt ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in den MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen freies Cholesterin in endosomalen/lysosomalen Vesikeln akkumulierte. Weiterhin unterstützen sie die Hypothese, dass das Fehlen von endosomalem/lysosomalem NPC2 direkt oder indirekt die Cholesterinakkumulation auslöst.

Zur weiteren Charakterisierung der cholesterinakkumulierenden Kompartimente in den MPR46/MPR300-doppeldefizienten Fibroblasten wurden filipingefärbte Zellen mit dem Elektronenmikroskop untersucht (3.2.2.12). Durch Transmissionselektronenmikroskopie konnte mit Filipin membranassoziiertes Cholesterin detektiert werden. Die Bindung von Filipin an Membrancholesterin führt zu einer Deformation der Membran, die an ihrer welligen Gestalt zu erkennen ist (Orci et al., 1980). Die perinukleäre Filipinfärbung in Kontrollzellen ist, wie schon vorher gezeigt (Eskelinen et al., 2004), auf kleine Vesikel, die meistens nahe des Golgi-Apparates lokalisiert sind, zurückzuführen (Abb. 22A und A'). In den MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen konnte eine Akkumulation von sehr charakteristischen, elektronendichten, im Durchmesser etwa 1 μm großen Vesikeln festgestellt werden, die kleine interne Vesikel und amorphes Material enthielten (Abb. 22B). Die Morphologie dieser multivesikulären Strukturen entspricht einer spätendosomalen Gestalt. Hohe Vergrößerung ergab, dass die begrenzenden Membranen stark mit Filipin angefärbt wurden (Abb. 22B und B'), was darauf hin deutet, dass sie der Ort der Cholesterinakkumulation in den MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen waren. Die elektronenmikroskopische Untersuchung bestätigte also die spätendosomale Natur der cholesterinakkumulierenden Organellen.

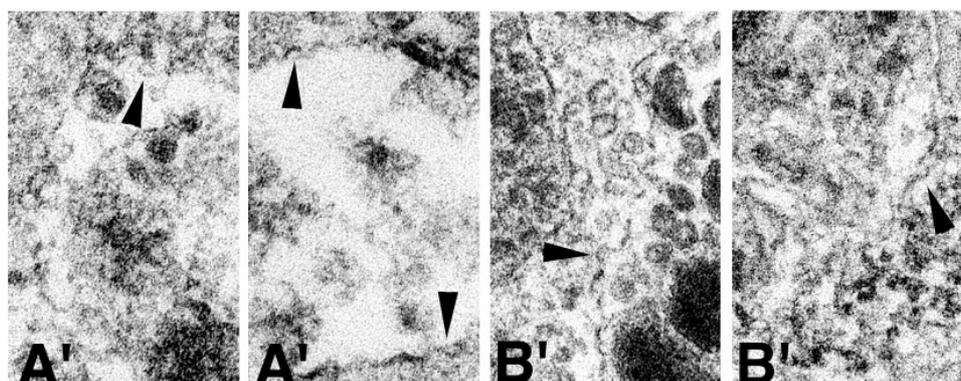
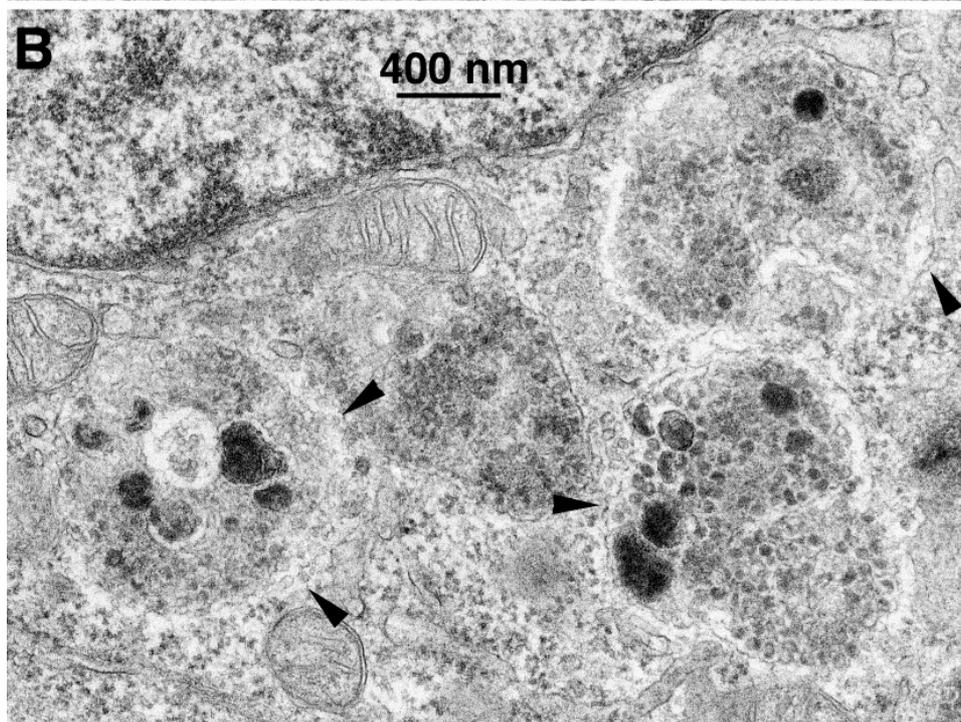
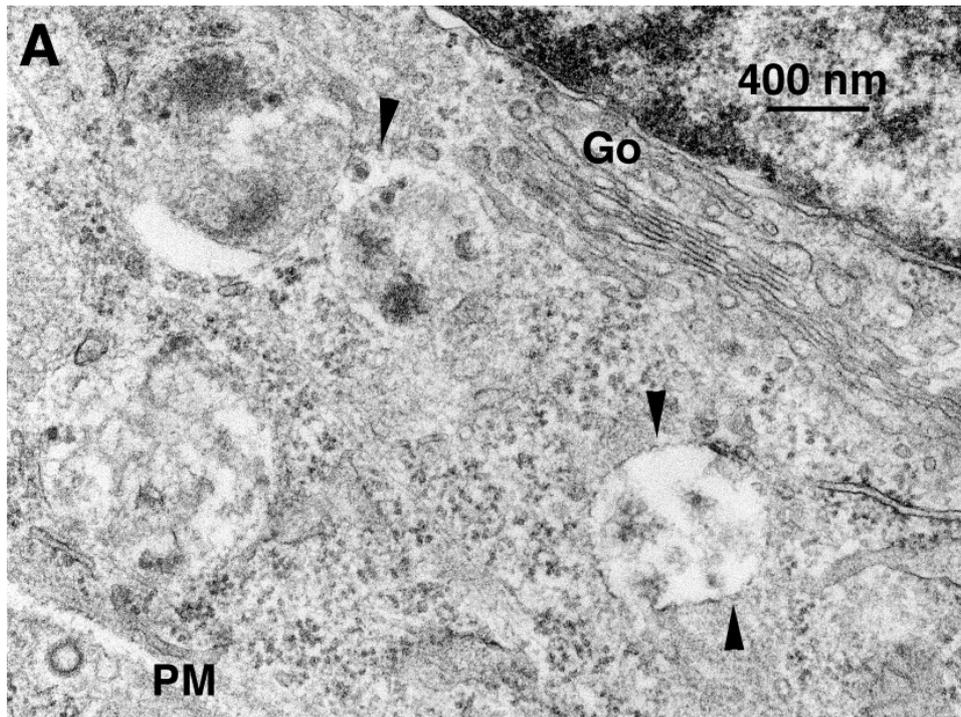


Abb. 22: Transmissionselektronenmikroskopie von filipin gefärbten Fibroblasten. Kontrollzellen (A) und MPR46/MPR300-doppeldefiziente Zellen (B) wurden mit Filipin gefärbt. Die Filipinfärbung zeigt sich in der geriffelten Gestalt der cholesterinreichen Membranen (Pfeile). Go = Golgi-Apparat, PM = Plasmamembran. A' zeigt höhere Vergrößerungen der in A markierten Ausschnitte. B' höhere Vergrößerungen der in B markierten Ausschnitte. In B werden außerdem die für MPR46/MPR300-doppeldefiziente Zellen typischen multivesikulären Strukturen deutlich, die durch Filipin angefärbt wurden (B', Pfeile). Die Einbettung und Betrachtung der Schnitte erfolgte durch Dr. Eeva-Liisa Eskelinen.

4.1.9 Lipidlokalisation in MPR-defizienten Fibroblasten

Neben Cholesterin akkumulieren NPC-defiziente Zellen Glykolipide und andere Lipide wie Bis(monoacylglycerol)phosphat (BMP) und Sphingolipide (Vanier und Millat, 2003). Um festzustellen, ob sich eine derartige Akkumulation ebenfalls bei MPR-defizienten Zellen zeigt, wurden die MPR46/MPR300-doppeldefizienten Fibroblasten und Kontrollzellen mit anti-BMP-Antikörper gefärbt (3.2.3.7). Abbildung 23A und B zeigt die BMP-Verteilung in Kontrollzellen und MPR-defizienten Zellen. In den doppeldefizienten Fibroblasten konnte im Vergleich zur Kontrolle mehr BMP angefärbt werden. Zur Detektion des Sphingolipids GM1 wurde fluoreszierendes Choleratoxin verwendet. Das von *Vibio cholerae* produzierte Choleratoxin bindet spezifisch an GM1 (Hansson et al., 1977). Es ergab sich eine geringe Akkumulation mit perinukleären Vesikeln in den doppeldefizienten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 23C und D). Bei einer Färbung mit anti-GM2-Antikörper konnte kein deutlicher Unterschied zwischen Kontrolle und MPR46/MPR300-doppeldefizienten Fibroblasten festgestellt werden (Abb. 23D und E).

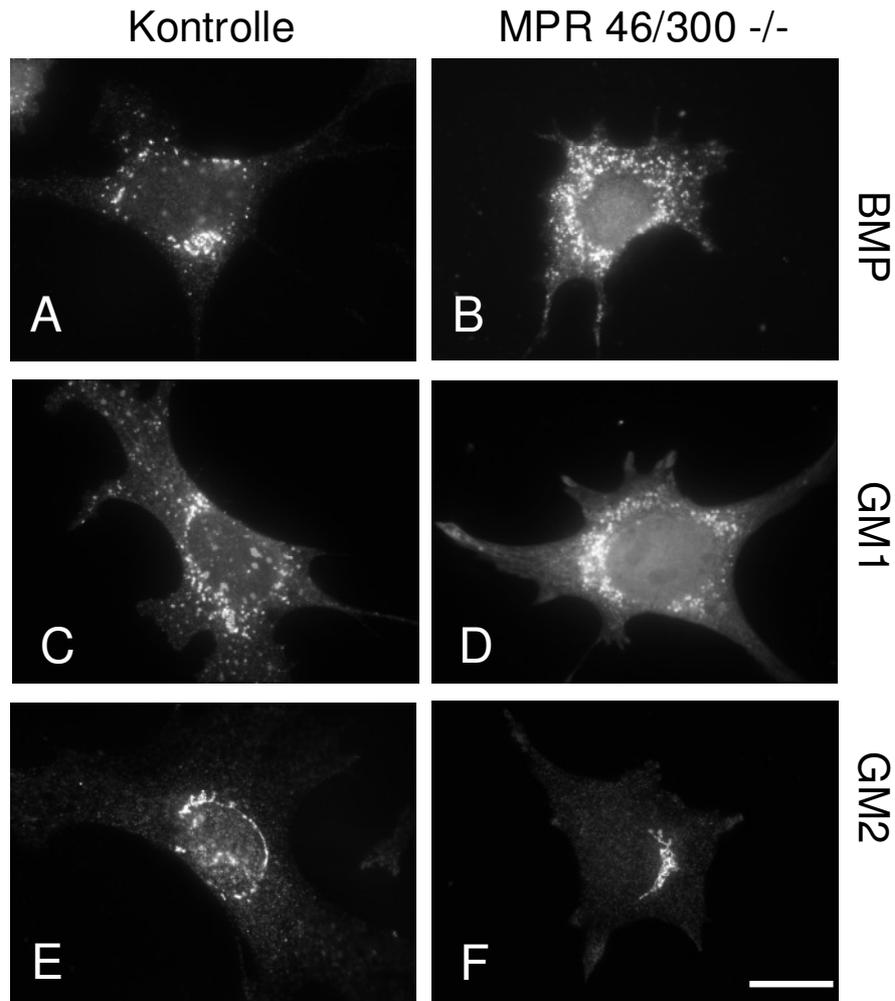


Abb. 23: Lipidlokalisation in Kontrollzellen und MPR 46/300-defizienten Zellen. A-F: Die Zellen wurden für 24 h auf Deckgläschen wachsen gelassen und mit 4 % PFA in PBS fixiert. A, B: Färbung von Kontrollzellen (A) und MPR-defizienten Zellen (B) mit anti-BMP-Antikörper und fluoreszenzgekoppeltem Sekundärantikörper. C, D: Färbung von Kontrollzellen (C) und MPR-defizienten Zellen (D) mit Alexa Fluor594-gekoppeltem Choleratoxin (7,5 µg/ml) zur Detektion von GM1. E, F: Färbung von Kontrollzellen (E) und MPR-defizienten Zellen (F) mit anti-GM2-Antikörper (E, F) sowie fluoreszenzgekoppeltem Sekundärantikörper. Maßstab Balken = 10 µm (gilt für A-F).

Eine Dünnschichtchromatografie (3.2.2.11) aus extrahierten Lipiden von Kontrollzellen und MPR-defizienten Zellen wurde unter Bedingungen durchgeführt, die Sphingomyelin, Cerebrosid, Glycocerebrosid und Phosphatidsäure sowie Phosphatidylcholin, -inosid, -serin, und -ethanolamin aufzutrennen vermögen. Wie aus Abb. 24 deutlich wird, konnten keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Lipidmengen der beiden Zelllinien festgestellt werden.

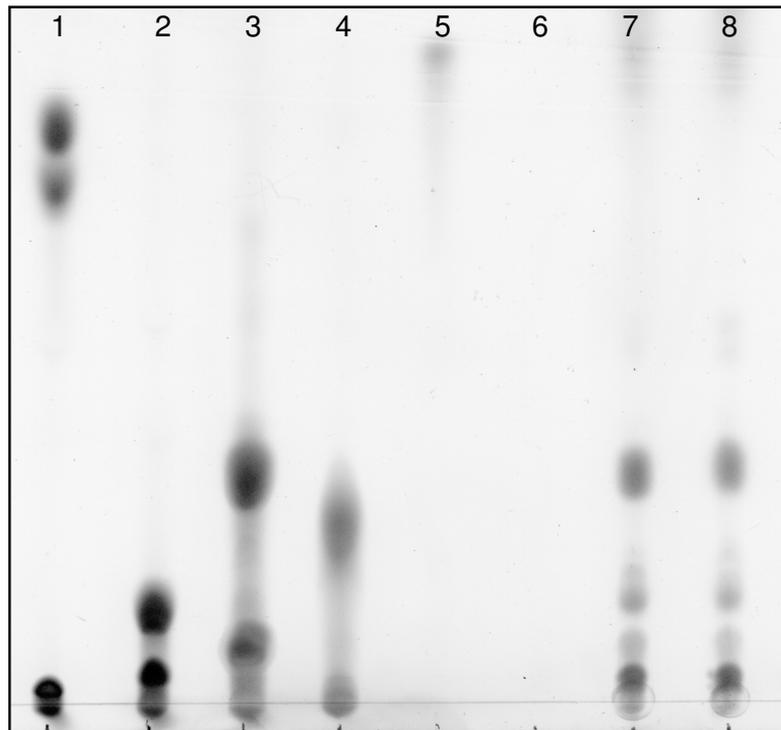


Abb. 24: Dünnschichtchromatographie von Lipidextrakten aus MPR-defizienten Fibroblasten. Lipidextrakte von Kontrollzellen und MPR-defizienten MEFs wurden zusammen mit Standardlipiden auf präparierte Dünnschichtplatten aufgetragen. Die einzelnen Bahnen wurden nummeriert. 1: Sphingomyelin, Cerebrosid; 2: Phosphatidylcholin, -inositol; 3: Phosphatidylserin, -ethanolamin; 4: Phosphatidsäure; 5: Glukocerebrosid; 6: leere Spur; 7: Lipidextrakt aus Wildtyp-MEFs; 8: Lipidextrakt aus MPR46/MPR300-doppeldefizienten MEFs. Die Dünnschichtchromatographie wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Jobst Landgrebe (Göttingen) durchgeführt.

Die Ergebnisse aus den immunozytochemischen Anfärbungen (Abb. 23) und der Dünnschichtchromatografie (Abb. 24) weisen darauf hin, dass in MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen neben Cholesterin auch BMP (aber keine Phosphatidsäure) akkumuliert wird. Die GM1-Menge ist nur leicht erhöht und GM2, Cerebrosid, Sphingoyelin und andere Phospholipide werden nicht angereichert.

4.1.10 NPC2 und Cholesterin in MPR-defizienten Geweben

Um den MPR-vermittelten intrazellulären NPC2-Transport *in vivo* zu untersuchen, wurde die Proteinexpression in Gewebenextrakten von drei Wochen alten MPR46/MPR300-doppeldefizienten Mäusen (Dittmer et al., 1998) sowie von Kontrollmäusen mittels

Immunoblot betrachtet (3.2.2.3 und 3.2.2.7). In Gehirn, Leber, Milz und Muskel von MPR46/MPR300-doppeldefizienten Mäusen fanden sich normale Mengen an NPC2 (Abb. 25A) im Vergleich zur Kontrolle. In der Niere war der NPC2-Gehalt stark erhöht und im Pankreas leicht. Im Herz fand sich bei der MPR46/MPR300-doppeldefizienten Probe ein geringerer NPC2-Gehalt als bei der Kontrolle. Eine Messung des Cholesteringehalts (3.2.2.9) der verschiedenen Gewebe ergab leicht erhöhte Gesamtcholesterinmengen in Gehirn, Niere, Leber, Milz, Pankreas und Muskel (Abb. 25B). Der Cholesteringehalt im MPR46/MPR300-doppeldefizienten Herz zeigte eine starke Erhöhung im Vergleich zum Herzgewebeextrakt aus der Kontrollmaus.

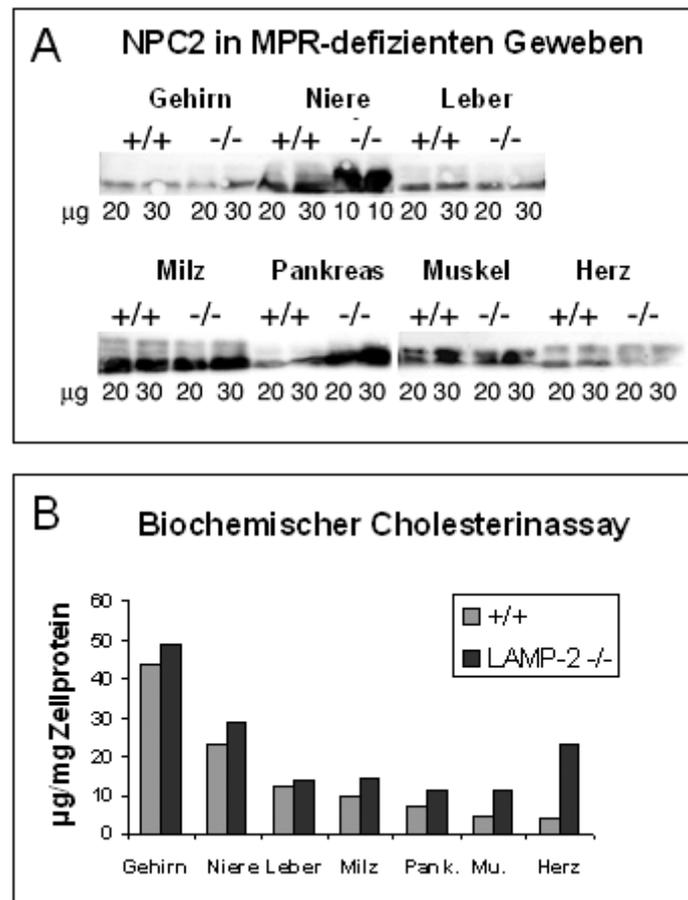


Abb. 25: NPC2-Proteinmenge und Cholesteringehalt in MPR-defizienten Geweben von drei Wochen alten MPR-defizienten Mäusen (-/-) sowie Kontrollmäusen (+/+). **A:** Westernblot von Kontrollgewebeextrakten und MPR-defizienten Gewebeextrakten mit anti-NPC2-Antikörper. Die aufgetragene Menge an Protein ist angegeben. Vom MPR-defizienten Nierenextrakt wurden nur 10 µg aufgetragen. **B:** Messung der Gesamtmenge (verestert und nicht verestert) an Cholesterin durch einen biochemischen Cholesterinassay von Kontrolleextrakten und MPR-defizienten Gewebeextrakten.

Insgesamt konnte in den untersuchten Geweben nur in der Niere und dem Pankreas MPR46/MPR300-doppeldefizienter Tiere eine veränderte Menge des NPC2-Proteins festgestellt werden. Die Cholesteringehalte waren in allen untersuchten Geweben MPR46/MPR300-doppeldefizienter Mäuse leicht erhöht. Im Gegensatz zu den kultivierten MPR46/MPR300-doppeldefizienten Fibroblasten konnte in den Geweben weder eine Fehlsortierung von NPC2 noch eine massive Cholesterinakkumulation nachgewiesen werden. Dittmer et al. fanden in frisch isolierten Hepatozyten und in Gewebehomogenaten von MPR46/MPR300-doppeldefizienten Mäusen normale intrazelluläre Mengen an lysosomalen Enzymen. Im Gegensatz dazu zeigten kultivierte Fibroblasten MPR46/MPR300-doppeldefizienter Mäuse stark reduzierte Aktivitäten lysosomaler Enzyme und eine hohe Menge an lysosomalen Enzymen im Medium (Dittmer et al., 1998). Diese Beobachtungen unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

Eine charakteristische Akkumulation von freiem Cholesterin in späten Endosomen und Lysosomen, wie sie in NPC-Patientenzellen (Blom et al., 2003) und MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen (Abb. 19D) gezeigt wurde, konnten wir auch in Fibroblastenzellen mit einer Doppeldefizienz in den lysosomalen Membranproteinen LAMP-1 und LAMP-2 feststellen (Eskelinen et al., 2004). Dabei war nur eine Reexpression von LAMP-2, nicht aber von LAMP-1, in der Lage, die Cholesterinakkumulation zu reduzieren. Neben dieser möglichen Aufgabe im Cholesterintransport wurde für LAMP-2 bereits gezeigt, dass es eine Rolle bei der Autophagozytose, der Verteilung von MPRs sowie beim lysosomalen Enzymtransport spielt (Eskelinen et al., 2002; Eskelinen et al., 2003; Vieira et al., 2002; Kasper et al., 1996; Schweizer et al., 1996; Schweizer et al., 1997).

Im Folgenden sollte die noch unbekannt Rolle von LAMP-2 bei der phagosomalen Reifung in neutrophilen Granulozyten näher untersucht werden.

4.2 Erhöhte Anfälligkeit für Plaquebildung und Parodontitis bei LAMP-2-defizienten Mäusen

Eskelinen und Kollegen zeigten in murinen Hepatozyten, dass eine LAMP-2-Defizienz zu einer Fehlsortierung von lysosomalen Enzymen führt. Sie fanden in diesen Zellen eine Akkumulation von späten autophagozytotischen Vakuolen, welche in einem gestörten lysosomalen Abbau des autophagozytierten Materials begründet liegen könnte (Eskelinen et al., 2002). Eine große Ähnlichkeit zur autophagosomalen Reifung zeigt die Reifung von

Phagosomen (Abb. 2), die in professionellen Phagozyten (Makrophagen und Neutrophile) die Abtötung von Pathogenen ermöglicht. Ein fehlerhafter Ablauf der Phagozytose kann einen ungenügenden Abbau von Krankheitserregern zur Folge haben und so unter anderem die Entstehung von bakteriellen Plaques und Entzündungen begünstigen.

4.2.1 Parodontitis bei LAMP-2-defizienten Mäusen

Die in unserer Arbeitsgruppe generierten LAMP-2-defizienten Mäuse zeigten eine erhöhte postnatale Letalität sowie eine verzögerte Gewichtszunahme im Vergleich zu Kontrolltieren (Tanaka et al., 2000). Nach dem Absetzen vom Muttertier konnte die Zahl der überlebenden Tiere durch Fütterung mit eingeweichtem Futter erhöht werden. Es stellte sich die Frage, warum diese Umstellung der Nahrungszugabe nötig war. Die Kiefer und Zähne der Mäuse wurden daher genauer untersucht.

Die morphologischen Untersuchungen der Kiefer fanden in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Prof. Vincent Everts und Prof. Wouter Beertsen (Akademisches Zentrum für Zahnheilkunde, Amsterdam) statt. Es wurden in erster Linie Mäuse untersucht, die in einer keimbelasteten Tierhaltung an der Georg-August-Universität Göttingen (Biochemie 2) gehalten wurden. Alle untersuchten LAMP-2-defizienten Tiere, jedoch keine der unter den gleichen Bedingungen gehaltenen Kontrollmäuse, zeigten eine aggressive Parodontitis. Die Krankheit (Abb. 8) äußerte sich in mehreren typischen Merkmalen. Wie Abb. 26B zeigt, trat bei 12 Monate alten LAMP-2-defizienten Tieren eine deutliche Wanderung der Molaren auf, wie sie bei gleichaltrigen Wildtyptieren nicht zu finden war (Abb. 26A). Die Analyse histologischer Schnitte des Kiefers bekräftigte den Verdacht, dass bei den LAMP-2-defizienten Mäusen eine Parodontitis vorlag. In Abb. 26F sieht man, dass das Gewebe zwischen den Zähnen (Z) nicht vollständig angeheftet war (rote Linien), und dass der alveolare Knochen stark reduziert war (rK). MicroCT-Scans bestätigten einen deutlichen Knochenverlust um die Molaren herum (Abb. 26D). Anzeichen von Parodontitis wurden nicht gefunden, wenn dem Trinkwasser LAMP-2-defizienter Tiere das Breitbandpenicillin Amoxicillin zugesetzt wurde. Die Antibiotikabehandlung begann dabei bereits bei den Muttertieren der untersuchten Mäuse. Bei Haltung LAMP-2-defizienter Mäuse unter SPF-Bedingungen (frei von spezifischen Pathogenen) konnten keine Anzeichen von Parodontitis nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Wildtyptiere aus keimbelasteter Haltung wiesen ebenfalls keine Anzeichen von Parodontitis auf. Die Zähne waren fest im umliegenden Gewebe eingebettet und der Knochen war normal entwickelt (Abb. 26C und E).

Ein weiteres Anzeichen für Parodontitis ist die Bildung von bakteriellen Plaques. Abb. 26F zeigt die massive Plaquebildung in den Zahnzwischenräumen eines LAMP-2-defizienten Tieres aus konventioneller keimbelasteter Haltung. Im Gegensatz dazu zeigten Wildtyptiere keine mit Licht- und Elektronenmikroskopie feststellbare Plaquebildung (Abb. 26E). Außerdem konnte im erkrankten Kiefergewebe der LAMP-2-defizienten Tiere eine starke Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das entzündete Zahnfleisch (Gingivitis) nachgewiesen werden (Abb. 26I). Abb. 26G zeigt die Plaqueschicht eines Zahnes aus einer LAMP-2-defizienten Maus in hoher Vergrößerung. Es wurde eine Akkumulation von Kokken, Stäbchen und Filamenten deutlich. Die Kultivierung von Plaqueproben ergab keine Anreicherung von klassischen parodontalen Keimen wie *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* oder *Bacteroides forsythus*. Hauptsächlich wurden nicht näher bestimmte fakultativ anaerobe Bakterien mit einem hohen Anteil an gramnegativen Stäbchen gefunden.

Histologische Oberflächenmessungen ergaben eine starke Plaqueakkumulation in den LAMP-2-defizienten Tieren, die in den Wildtypkontrollen nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 26H). Außerdem wurde bei den untersuchten LAMP-2-defizienten Tieren eine um ein Vierfaches größere Oberfläche des mit Neutrophilen infiltrierte Epitheliums festgestellt als bei den Wildtyptieren. Das supraalveoläre Bindegewebe war bei den LAMP-2-defizienten Mäusen ebenfalls stärker ausgebildet. Die Oberfläche der Alveolarknochen (dünne massive Knochenschicht, die die Zahnfassung um die Zahnwurzel bildet) war bei den LAMP-2-defizienten Mäusen geringer als bei den Wildtypmäusen (Abb. 26H), was mit steigendem Alter noch zunahm (Daten nicht gezeigt). Das parodontale Ligament nahm bei den LAMP-2-defizienten Mäusen eine größere Oberfläche ein als bei den Kontrolltieren (Abb. 26H). Es konnten keine Unterschiede zwischen den unteren und oberen Molaren gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

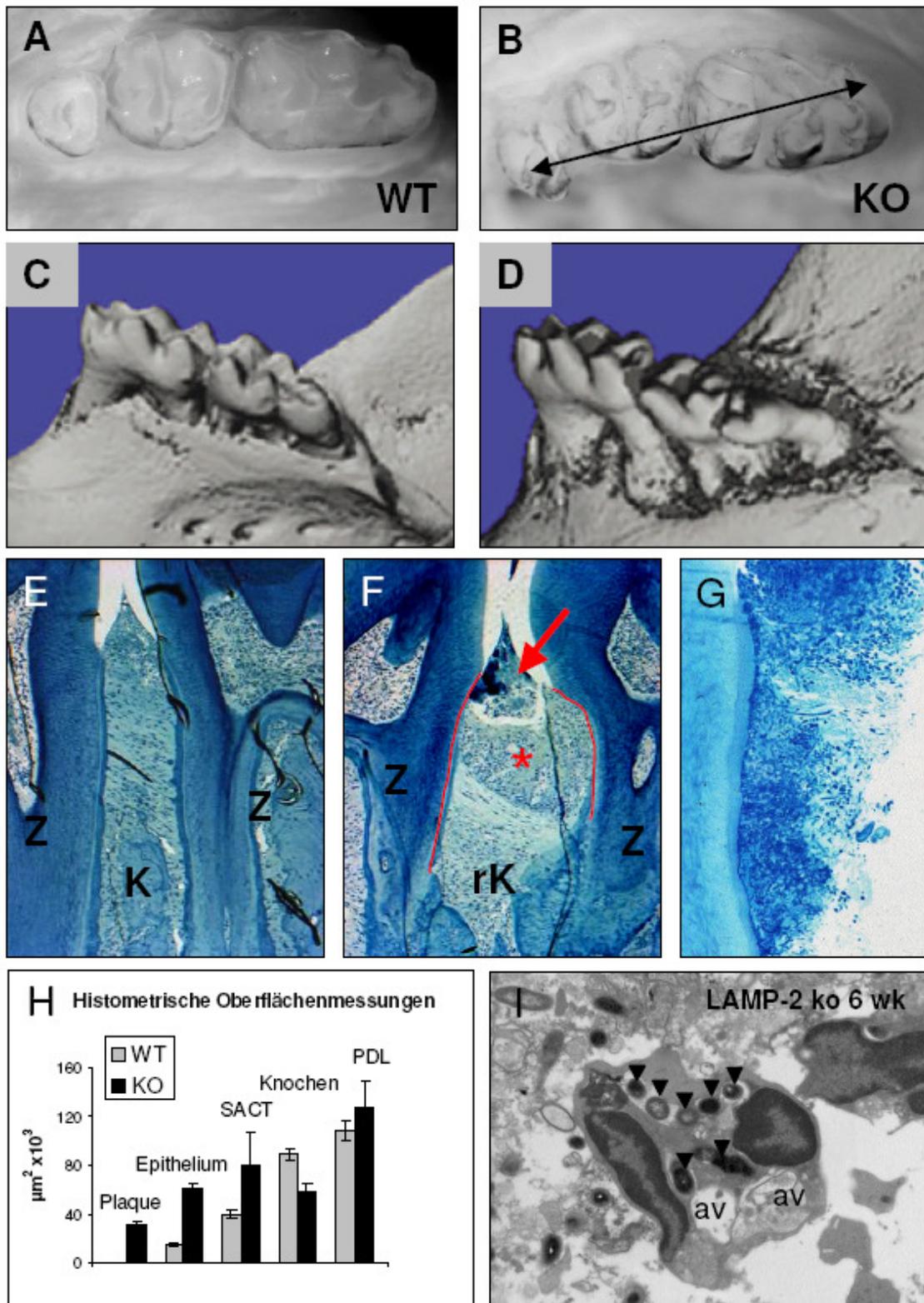


Abb. 26: Charakteristische Anzeichen für Parodontitis bei LAMP-2-defizienten Mäusen. **A, B:** Erste, zweite und dritte Molaren (von rechts nach links). **A:** Normale Bezahnung bei 12 Monate altem Wildtypier (WT). **B:** Pathologische Migration der Molaren bei 12 Monate altem LAMP-2-defizienten Tier (KO). Durch den eingezeichneten Pfeil wird die Migration verdeutlicht. **C, D:** MicroCT-Aufnahmen (Computertomografie) der Unterkiefer von einer vier Monate alten Wildtypmaus (**C**) und einer gleichaltrigen LAMP-2-defizienten Maus (**D**). In **D** fällt ein deutlicher Knochenverlust um die Molaren herum auf. **E, F:** Mittlerer Schnitt durch

Molarblock einer Wildtypmaus (**E**) und einer LAMP-2-defizienten Maus (**F**) betrachtet mit x10 Objektiv. K = alveolarer Knochen (in D resorbier, rK); Z = Zahn. Die Parodontitis beim LAMP-2-defizienten Tier (F) zeigt sich durch Plaqueakkumulation (roter Pfeil), reduzierte Anheftung des Gewebes an die Zähne (rote Linien) und entzündetes Zahnfleisch (*). **G**: Aufnahme eines histologischen Schnittes von LAMP-2-defizientem Molargewebe. Kokken, Stäbchen und Filamente sind erkennbar. **H**: Histometrische Messungen von Oberflächen präparierter Kiefer von Wildtypmäusen und LAMP-2-defizienten Mäusen. SACT = *supra alveolar connective tissue*, PDL = parodontales Ligament (Wurzelhaut), WT = Wildtyp, KO = LAMP-2-defiziente Maus. **I**: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines neutrophilen Granulozyten aus dem parodontitisaufweisenden Kiefergewebe einer sechs Wochen alten LAMP-2-defizienten Maus. Im Zellinneren sind phagozytierte Bakterien (Pfeilköpfe) und autophagozytotische Vakuolen (av) zu erkennen. Maßstabbalken = 2 µm. Alle Daten entstanden in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Prof. Vincent Everts und Prof. Wouter Beertsen (Akademisches Zentrum für Zahnheilkunde, Amsterdam, NL).

Die Ansammlung von Granulozyten im Gewebe ist ein Zeichen für eine Entzündung, welche ein weiteres Charakteristikum der Parodontitis darstellt (Taichman et al., 1977). Eine genauere Betrachtung des mit Neutrophilen infiltrierten Epithelgewebes der LAMP-2-defizienten Mäuse ergab, dass viele dieser Zellen Bakterien phagozytiert hatten, wie es in Abb. 26I zu sehen ist. Die Anreicherung von unvollständig abgebauten Pathogenen im Zellinneren der neutrophilen Granulozyten lässt eine eventuelle Störung im Ablauf der Phagozytose in LAMP-2-defizienten Mäusen vermuten. Aus diesem Grund sollte der Phagozytose- und Abtötungsprozess in diesen spezialisierten Phagozyten näher untersucht werden.

4.2.2 Isolation von neutrophilen Granulozyten

Für die mikroskopischen und funktionellen Untersuchungen an murinen neutrophilen Granulozyten war es nötig, diese Zellen in einer möglichst großen Anzahl und Reinheit zu gewinnen. In Vorversuchen wurden zunächst zwei in der Literatur beschriebene Methoden verglichen (Melnicoff et al., 1989; van Spruiel et al., 2000).

Eine Injektion von Thioglykolat ins Peritoneum der Maus ruft innerhalb kurzer Zeit eine lokale Entzündung (Peritonitis) hervor, die eine erhebliche Einwanderung von neutrophilen Granulozyten zur Folge hat (Baron und Proctor, 1982; Potter et al., 2003). Vier Stunden nach der Injektion wurden die peritonealen Zellen von Wildtypmäusen und LAMP-2-defizienten Mäusen durch Spülung des Peritoneums isoliert (3.2.4.3). Die Auszählung in der Neubauerkammer ergab eine Gesamtzellzahl von $1-2 \times 10^7$ Zellen pro Maus. Anschließend

wurden die isolierten Zellen einer FACS-Analyse unterzogen (3.2.4.1 bis 3.2.4.3). Abb. 27 zeigt Immunfärbungen der gesammelten peritonealen Zellen aus jeweils drei Wildtypmäusen und drei LAMP-2-defizienten Mäusen mit verschiedenen zelltypspezifischen Markern. Im Streudiagramm (Abb. 27A) sieht man, sowohl beim Isolat aus den Wildtypmäusen als auch beim Isolat aus LAMP-2-defizienten Mäusen, überwiegend große granuläre Zellen, die mit verschiedenen Markern näher charakterisiert wurden. Wie die Färbung mit dem Granulozytenmarker Gr-1 aufzeigte, konnte mit dieser Isolationsmethode eine Anreicherung von 78 % beim Kontrollisolat und 82 % bei der LAMP-2-defizienten Probe erreicht werden (Abb. 27B). Als Marker für Makrophagen wurde der Antikörper F4/80 benutzt und ergab einen Anteil von 8 % (Wildtyp) bzw. 11 % (LAMP-2-defizient) (Abb. 27C). B-Zellen wurden mit dem Marker B220 angefärbt. Ihr Anteil lag bei 11 % (Wildtyp) und 14 % (LAMP-2-defizient) (Abb. 27D). Cytotoxische T-Zellen konnten mit anti-CD8-Antikörper detektiert werden und machten im gesammelten Isolat der Kontrolltiere einen Anteil von 6 % aus. Die gesammelte Peritonealflüssigkeit aus LAMP-2-defizienten Mäusen enthielt 9 % CD8-positive Zellen. (Abb. 27E).

Die Auswertung der Färbungen machte deutlich, dass die gesammelten peritonealen Zellen bei LAMP-2-defizienten Mäusen und Wildtypkontrollen ähnliche Anteile der untersuchten Zelltypen enthielten. Die auf diese Weise gewonnenen neutrophilen Granulozyten können also für vergleichende funktionelle Untersuchungen verwendet werden.

Eine weitere Methode zur Anreicherung neutrophiler Granulozyten ist die Isolation aus dem Blut nach dreitägiger Stimulation mit dem Zytokin G-CSF (Granulozyten koloniestimulierender Faktor) (3.2.4.4). G-CSF regt das Knochenmark an, Granulozyten zu produzieren und diese ins Blut abzugeben (Basu et al., 2002). Es wurde etwa 1 ml Blut pro Maus durch kardiale Punktion gewonnen. Die Gesamtzellzahl belief sich nach Lyse der Erythrozyten auf etwa 6×10^6 Zellen pro Maus. Im Streudiagramm dominierten, im Unterschied zur Thioglykolat isolation, kleinere und weniger granuläre Zellen (Abb. 28A). Die Färbung mit Gr-1 ergab für die Wildtyptiere einen Anteil von 29 % und für die LAMP-2-defizienten Mäuse einen Anteil von 45 % (Abb. 28B). Der Makrophagenanteil lag nach F4/80-Färbung bei 4 % (Wildtyp) bzw. 11 % (LAMP-2-defizient) (Abb. 28C). B-Zellen konnten in beiden Isolaten ein Wert von etwas unter 30 % ermittelt werden (Abb. 28D). Als T-Zellmarker wurde Thy 1.2 verwendet und ergab einen Anteil von 34 % beim Isolat aus den Wildtypmäusen und 26 % bei LAMP-2-defizienten Tieren (Abb. 28E). Insgesamt konnte also mit dieser Methode eine geringe Anreicherung von neutrophilen Granulozyten erreicht werden.

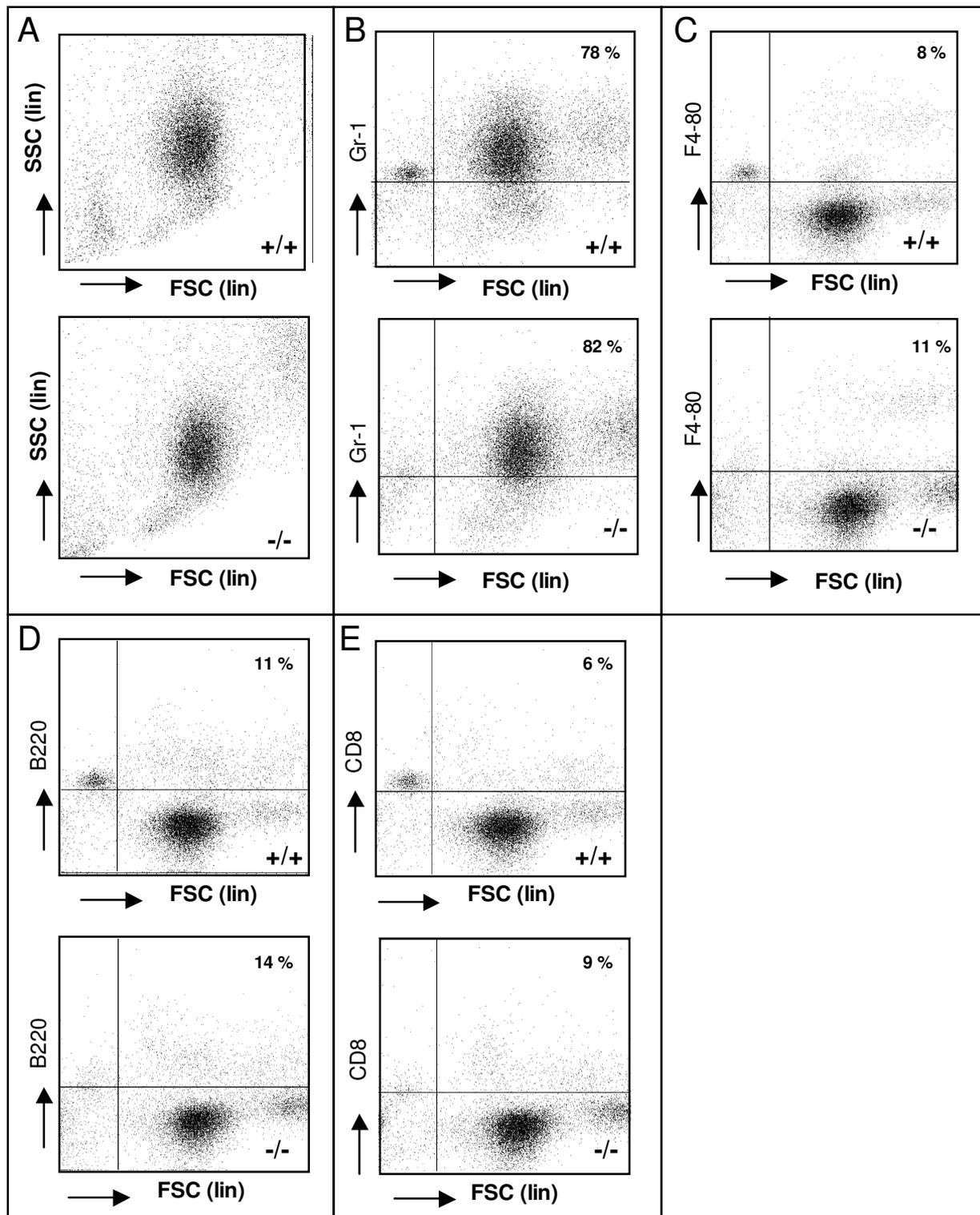


Abb. 27: Vergleichende FACS-Analyse peritonealer Zellen aus Wildtypmäusen und LAMP-2-defizienten Mäusen nach Thioglykolinjektion. A-E: Peritoneale Zellen wurden vier Stunden nach intraperitonealer (i.p.) Injektion von 4 % Thioglykolat aus drei Wildtypmäusen und drei LAMP-2-defizienten Mäusen isoliert, vereinigt und mit verschiedenen zelltypspezifischen Markern inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit

phykoerythrinmarkierten oder fluoreszeinisothiocyanatmarkierten Sekundärantikörpern. Der Anteil der positiven Zellen ist in Prozent angegeben. Die obere Abbildung zeigt jeweils die Wildtypisolation und die untere die Isolation aus LAMP-2-defizienten Mäusen. **A:** Streudiagramm. SSC = *side scatter* (gibt Auskunft über die Granularität der Zellen), FSC = *forward scatter* (gibt Auskunft über die Zellgröße). **B:** Färbung mit dem Granulozytenmarker Gr-1. **C:** Bestimmung der Menge an Makrophagen mit dem Antikörper F4/80. **D:** Bestimmung der B-Zellmenge mit dem Antikörper B220. **E:** Anteil an cytotoxischen T-Zellen nach Färbung mit anti-CD8-Antikörper.

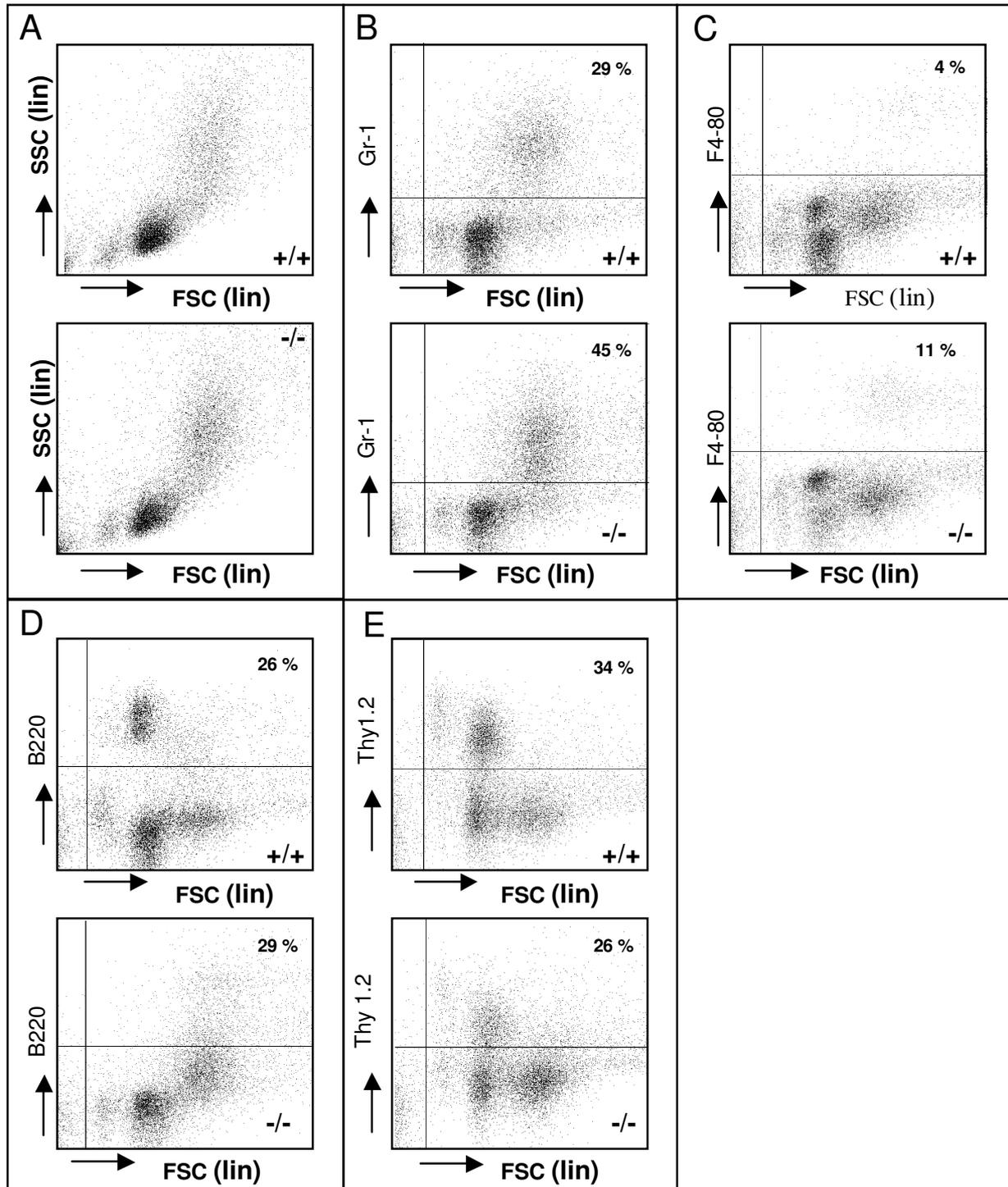


Abb. 28: Vergleichende FACS-Analyse der Granulozytenanreicherung im Blut von Wildtypmäusen und LAMP-2-defizienten Mäusen nach Stimulation mit G-CSF. A-E: Drei Wildtypmäusen und drei LAMP-2-defizienten Mäusen wurde über einen Zeitraum von drei Tagen täglich subkutan 2,5 µg Neupogen (G-CSF) verabreicht. Am vierten Tag wurde den Mäusen durch kardiale Punktion Blut entnommen und die Proben aus den drei Tieren vereinigt. Die Anreicherung von Granulozyten im Blut wurde mit verschiedenen zelltypspezifischen Markern überprüft. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit phykoerythrinmarkierten oder fluoreszeinisothiocyanatmarkierten Sekundärantikörpern. Der Anteil der positiven Zellen ist in Prozent angegeben. Die obere Abbildung zeigt jeweils die Wildtypisolation und die untere die Isolation aus LAMP-2-defizienten Mäusen. **A:** Streudiagramm. SSC = *side scatter*, FSC = *forward scatter*. **B:** Färbung mit dem Granulozytenmarker Gr-1. **C:** Bestimmung der Menge an Makrophagen mit dem Antikörper F4/80. **D:** Bestimmung der B-Zellmenge mit dem Antikörper B220. **E:** Anteil an T-Zellen nach Färbung mit dem Antikörper Thy 1.2.

Bei Betrachtung der Daten ist zu beachten, dass sich bei Addition der Prozentzahlen kein Wert von genau 100 % ergibt, da für jede Färbung ein getrennter Ansatz gemessen wurde.

Wie aus Tab. 13 deutlich wird, konnte mit der Methode der Granulozytenisolation aus dem Peritoneum nach Thioglykolatinjektion eine wesentlich höhere Menge an neutrophilen Granulozyten gewonnen werden als aus dem Blut nach G-CSF-Stimulation.

Tab. 13: Vergleich der Anreicherung von neutrophilen Granulozyten (PMNs) nach verschiedenen Isolationsmethoden.

| Isolationsmethode | Gesamtzellzahl (pro Maus) | % PMNs |
|--|----------------------------------|---------------|
| Peritonealspülung 4 h nach Thioglykolatinjektion | 1 bis 2 x 10 ⁷ | 70 bis 80 |
| Blutisolation nach G-CSF Behandlung | ca. 6 x 10 ⁶ | 10 bis 30 |

Zusätzlich zur FACS-Analyse wurde der Anteil an neutrophilen Granulozyten in den Isolaten durch mikroskopische Auszählung nach polychromatischer Schnellfärbung mit dem Kit Diff-Quik (Medion Diagnostics, Düringen, CH) (siehe 3.2.4.6) kontrolliert und ein Anteil von über 80 % Granulozyten bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Für die folgenden Versuche wurde die Methode der Neutrophilenisolation aus dem Peritoneum zur Granulozytengewinnung ausgewählt. Dabei wurde der Anteil an Granulozyten in den Isolaten durch FACS-Analyse (3.2.4.1 bis 3.2.4.3), Diff-Quik-Färbung

(3.2.4.6) oder immunozytochemische Anfärbung (3.2.3.7) der isolierten Zellen kontrolliert (Abb. 29).

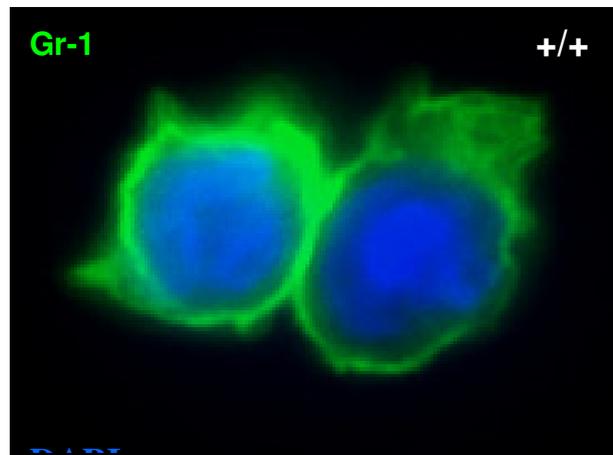


Abb. 29: Kontrolle der Granulozytenausbeute durch immunozytochemische Färbung. Peritoneale Zellen wurden vier Stunden nach Thioglykolininjektion aus dem Peritoneum isoliert und für zwei Stunden bei 37°C im CO₂-Inkubator gehalten, um die Zellen auf Deckgläschen adhären zu lassen. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit 4 % PFA fixiert. Die Färbung erfolgte mit FITC-markiertem anti-Gr-1-Antikörper. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

4.2.3 Akkumulation von autophagozytotischen Vakuolen in LAMP-2-defizienten Neutrophilen

Es wurde bereits von Tanaka et al. beschrieben, dass LAMP-2-defiziente Mäuse eine auffallende Akkumulation von autophagozytotischen Vakuolen in diversen Geweben zeigten (Tanaka et al., 2000). Bei der elektronenmikroskopischen Betrachtung des entzündeten parodontalen Gewebes LAMP-2-defizienter Mäuse fiel auch in den dort eingewanderten Neutrophilen eine Akkumulation von autophagozytotischen Vakuolen auf (Abb. 26I).

LAMP-2-defiziente Neutrophile, die vier Stunden nach einer Thioglykolininjektion aus dem Peritoneum von LAMP-2-defizienten Mäusen isoliert wurden, zeigten ebenfalls auffällige autophagozytotische Strukturen im Zytoplasma (Abb. 30B). Aus Wildtypmäusen isolierte Neutrophile zeigten diese Veränderung selten (Abb. 30A). Durch immunozytochemische Färbungen (3.2.3.7) mit einem Antikörper gegen LC3, der frühe Autophagosomen markiert (Kabeya et al., 2000), konnten bei den Wildtypzellen nur sehr schwache zytoplasmatische Signale detektiert werden (Abb. 30C). Bei den LAMP-2-defizienten Zellen hingegen konnten definierte vesikuläre Strukturen angefärbt werden (Abb. 30D).

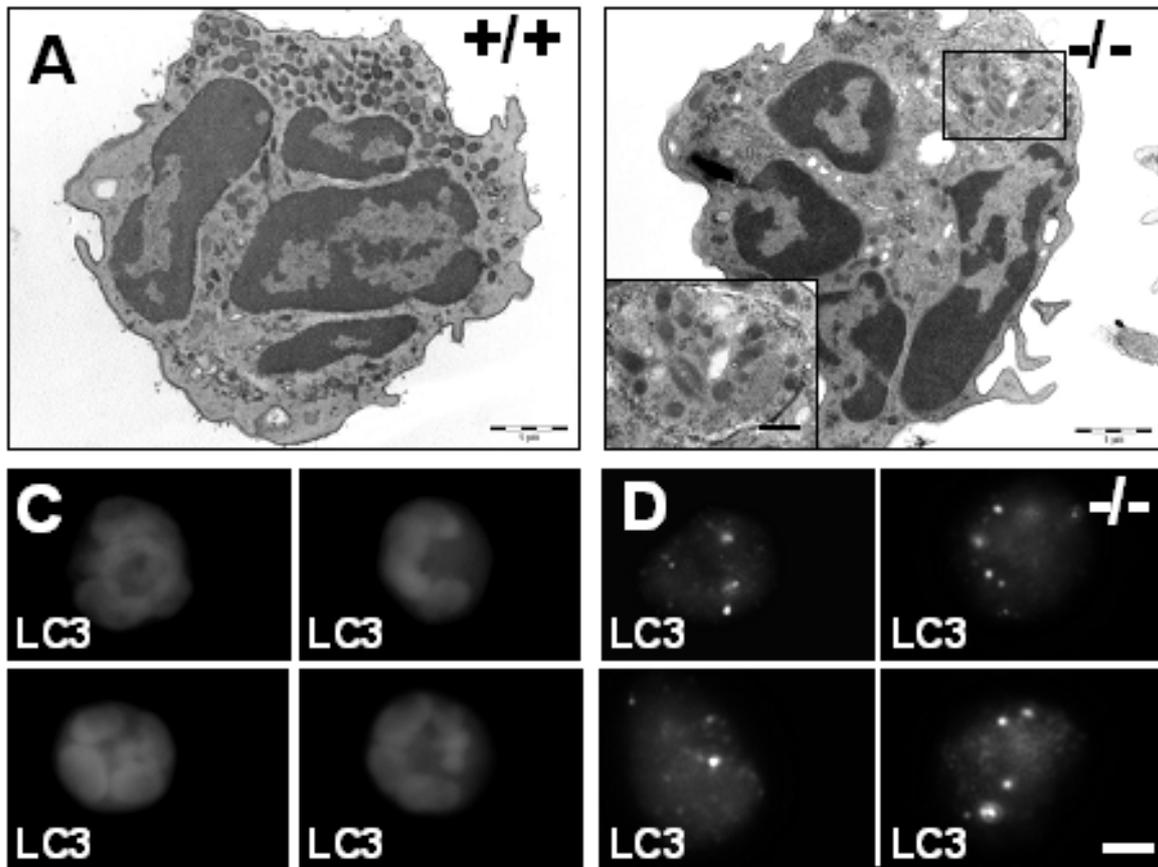


Abb. 30: Akkumulation von autophagozytotischen Vakuolen in LAMP-2-defizienten Neutrophilen. **A, B:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von peritonealen Neutrophilen, die vier Stunden nach Thioglykolininjektion aus dem Peritoneum isoliert wurden. Die EM-Aufnahmen entstanden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Vincent Everts (Akademisches Zentrum für Zahnheilkunde, Amsterdam, NL). **A:** Neutrophiler Granulozyt aus einer drei Monate alten Wildtypmaus. **B:** LAMP-2-defizienter Granulozyt aus einer drei Monate alten LAMP-2-defizienten Maus. Im Zytoplasma ist eine große autophagozytotische Vakuole zu sehen (auch in Vergrößerung gezeigt). Maßstabballen = 1 µm. **C, D:** Neutrophile Granulozyten aus Wildtypmäusen und LAMP-2-defizienten Mäusen wurden vier Stunden nach Thioglykolininjektion aus dem Peritoneum isoliert und für zwei Stunden bei 37°C im CO₂-Inkubator gehalten, um die Zellen auf Deckgläschen adhären zu lassen. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert. Die Anfärbung früher autophagozytotischer Vakuolen erfolgte durch anti-LC3-Antikörper sowie fluoreszenzgekoppeltem Sekundärantikörper. **C:** Wildtypneutrophile. **D:** LAMP-2-defiziente Neutrophile. Maßstabballen = 3 µm (gilt für C und D).

Autophagozytotische Vakuolen können in frühe (Avi) und späte/reife autophagozytotische Vakuolen (Avd) eingeteilt werden (auch frühe und späte Autophagosomen) (Dunn, Jr., 1990). Im elektronenmikroskopischen Bild zeigen sich Avi als Vakuolen, die durch eine

Doppelmembran eingeschlossenes, noch nicht abgebautes, zytosolisches Material enthalten. Ist das eingeschlossene Material bereits weiter abgebaut, werden diese Strukturen als Avd identifiziert (Liou et al., 1997). Die elektronenmikroskopische Auswertung von Neutrophilen aus Wildtypmäusen und LAMP-2-defizienten Mäusen ergab, dass in den Wildtypneutrophilen nur selten autophagozytotische Strukturen identifiziert werden konnten (Abb. 31A). In den LAMP-2-defizienten Neutrophilen hingegen fanden sich in fast allen untersuchten Zellen autophagozytotische Vakuolen (Abb. 31B).

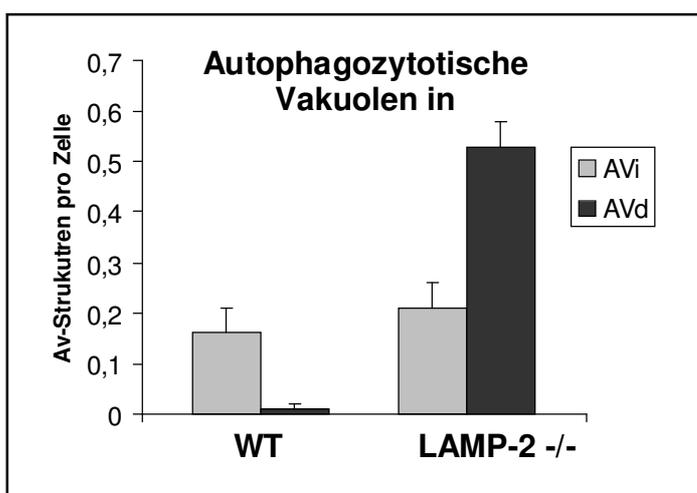
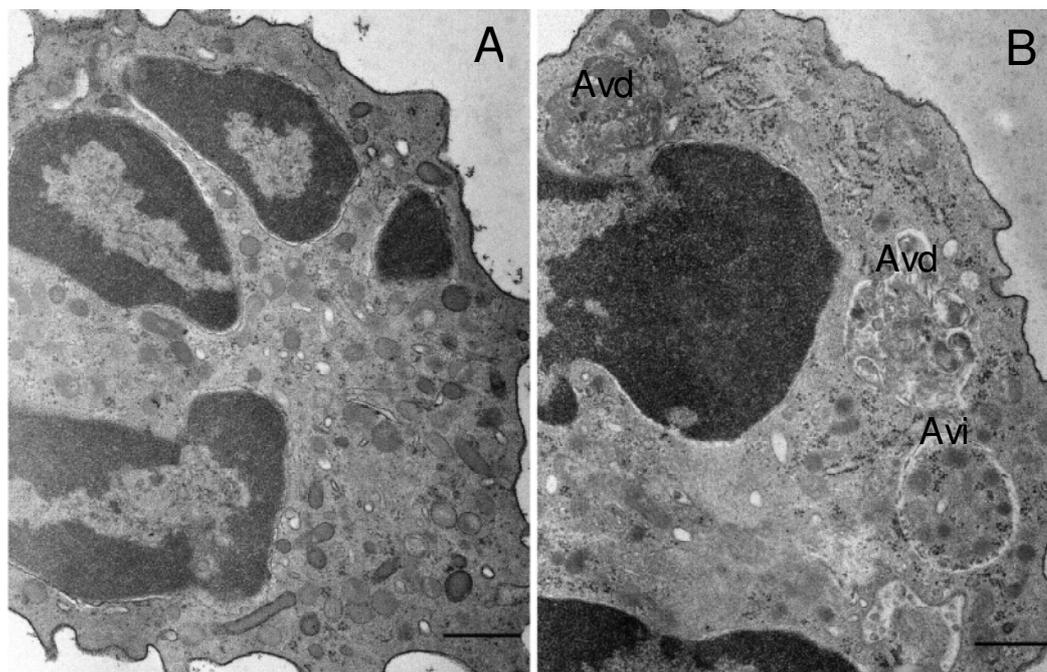


Abb.31: Quantifizierung der Akkumulation von autophagozytotischen Vakuolen in LAMP-2-defizienten Neutrophilen. **A:** Neutrophiler Granulozyt aus dem Peritoneum einer Wildtypmaus vier Stunden nach Thioglykolininjektion. Es sind keine autophagozytotischen Vakuolen erkennbar. Maßstabballen =500 nm **B:**

Neutrophiler Granulozyt aus dem Peritoneum einer LAMP-2-defizienten Maus vier Stunden nach Thioglykolinjektion. Es sind sowohl frühe unreife autophagozytotische Vakuolen zu erkennen (Avi) als auch späte autophagozytotische Vakuolen (Avd). Maßstab balken = 500 nm C: Quantitative Auswertung der Anteile an Avi und Avd in Wildtypneutrophilen und LAMP-2-defizienten Neutrophilen. Die EM-Aufnahmen und die Auswertung erfolgten durch Dr. Eeva-Liisa Eskelinen (Helsinki, FIN).

In einer Auszählung von Avi und Avd konnten in den Wildtypzellen hauptsächlich Avi gezählt werden, obwohl die meisten Zellen gar keine autophagozytotischen Vakuolen enthielten (Abb. 31C). In den LAMP-2-defizienten Neutrophilen waren sowohl Avi als auch Avd vorhanden, wobei die Anzahl der Avd mehr als doppelt so hoch war wie die Anzahl der Avi (Abb. 31C). Durch Fusion mit Lysosomen erhalten Avi lysosomale Membranproteine, einen sauren pH-Wert und Hydrolasen und reifen so zu Avd (auch Autolysosomen genannt), die das eingeschlossene Material abbauen (Liou et al., 1997). Die erhöhte Anzahl an Avd in LAMP-2-defizienten Neutrophilen spricht für eine verlängerte Halblebenszeit dieser Strukturen, wie es bereits von Eskelinen et al. für isolierte murine LAMP-2-defiziente Hepatozyten beschrieben wurde (Eskelinen et al., 2002).

4.2.4 Geringere Abtötung von *E.coli*-Bakterien durch LAMP-2-defiziente Neutrophile

Bei der mikroskopischen Untersuchung des parodontalen Gewebes fiel die Ansammlung von neutrophilen Granulozyten mit einer hohen Anzahl an phagozytierten Bakterien auf (Abb. 26G). Um festzustellen, ob diese Beobachtung auf einen gestörten Abbau von Pathogenen durch Neutrophile zurückzuführen war, wurde bei neutrophilen Granulozyten aus Wildtyptieren und LAMP-2-defizienten Tieren die Fähigkeit, *E. coli*-Bakterien abzutöten, überprüft.

In Vorversuchen wurde zunächst bestimmt, welches Zahlenverhältnis zwischen *E. coli*-Bakterien und Neutrophilen für den Versuch gewählt werden sollte. Dazu wurden Neutrophile aus Kontrollmäusen mit verschiedenen Anzahlen an *E. coli*-Bakterien inkubiert. Die nicht aufgenommenen Bakterien wurden durch mehrmaliges Waschen entfernt, die Neutrophilensuspension auf LB-Platten ausplattiert und die koloniebildenden Einheiten (CFU) am nächsten Tag ausgezählt (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde mikroskopisch kontrolliert, welche Anzahl an *E. coli*-Bakterien zu einer Schädigung der Neutrophilen führte.

Für anschließende Versuche wurde nach Auswertung der gewonnenen Daten ein Verhältnis von 10:1 (*E. coli*-Bakterien:Neutrophiler) gewählt.

In einem weiteren Vorversuch wurde die Inkubationszeit der Gentamicinbehandlung bestimmt und untersucht, welche Gentamicinmenge unter den gewählten Versuchsbedingungen zu einer effizienten Abtötung extrazellulärer *E. coli*-Bakterien nötig war. Eine Behandlung mit 80 µg/ml für 30 min war ausreichend (Daten nicht gezeigt).

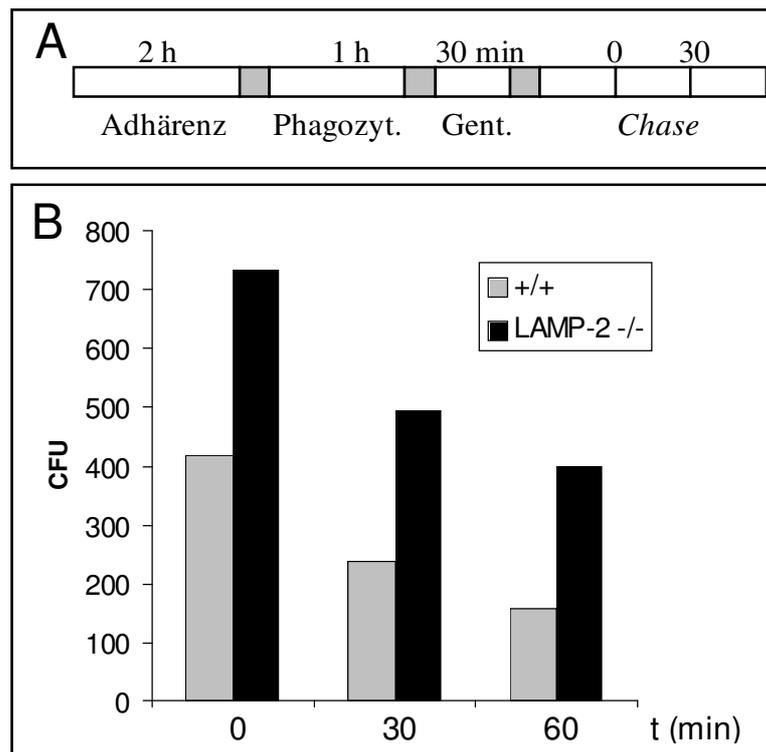


Abb. 32: Abtötung von *E. coli*-Bakterien durch neutrophile Granulozyten aus Wildtypmäusen und LAMP-2-defizienten Mäusen. **A:** Schema zum Versuchsablauf. Waschschrte sind als graue Kästchen dargestellt. Nach der zweistündigen Adhärenzzeit folgte eine Phagozytosezeit von einer Stunde. Anschließend wurden extrazelluläre Bakterien durch Gentamicin (Gent.) abgetötet. Das Gentamicin wurde anschließend durch Waschen mit warmem PBS entfernt und die Neutrophilen für 30 bzw. 60 min in antibiotikafreiem Medium weiterinkubiert (*Chase*) und schließlich lysiert. Die phagozytierten, nicht abgetöteten *E. coli*-Bakterien konnten nach Ausplattierung des Lysats und Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C am nächsten Tag als CFU gezählt werden. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (CFU) ist in **B** dargestellt.

Wie unter 3.2.1.10 beschrieben wurden adhärenzte peritoneale Neutrophile eine Stunde mit einer zehnfachen Menge an *E. coli*-Bakterien inkubiert. Nicht phagozytierte Bakterien konnten im Anschluss durch mehrere Waschschrte und einer Behandlung mit Gentamicin

abgetötet werden. Nach Lyse der Phagozyten wurde das Lysat, das die phagozytierten, nicht abgetöteten *E. coli*-Bakterien enthielt, auf LB-Platten ausplattiert (Versuchsschema Abb. 32A). Am nächsten Tag wurden die koloniebildenden Einheiten (CFU) gezählt (Abb. 32B). Es ergab sich, dass die peritonealen Neutrophilen aus Wildtypmäusen in der gleichen Zeit mehr *E. coli*-Bakterien abtöteten als Neutrophile mit einer LAMP-2-Defizienz (Abb. 32B). In den ausplattierten Lysaten von LAMP-2-defizienten Neutrophilen befanden sich zu den ausgewählten Zeitpunkten mehr überlebende *E. coli*-Bakterien als bei den Kontrollen. So war die Zahl der koloniebildenden Einheiten (CFU) bei den LAMP-2-defizienten Phagozyten nach einer *Chase-Zeit* von 60 min etwa so hoch wie bei den Wildtypzellen zu Beginn der *Chase-Zeit* (0 min). Diese Daten ließen darauf schließen, dass die Abtötung von Bakterien bei den LAMP-2-defizienten Neutrophilen verlangsamt war.

Zur Überprüfung dieser Überlegung wurden in einem anderen Experiment Neutrophile mit GFP-markierten *E. coli*-Bakterien inkubiert und nach 60 min fixiert. Nach mikroskopischer Auszählung (Abb. 33) befanden sich bei den Kontrollansätzen im Durchschnitt etwa 0,21 *E. coli*-Bakterien pro Granulozyt. Für LAMP-2-defiziente Neutrophile lag dieser Wert bei 0,39. Dieses Ergebnis bestätigte, dass die Abtötung von Bakterien in LAMP-2-defizienten Granulozyten gestört war.

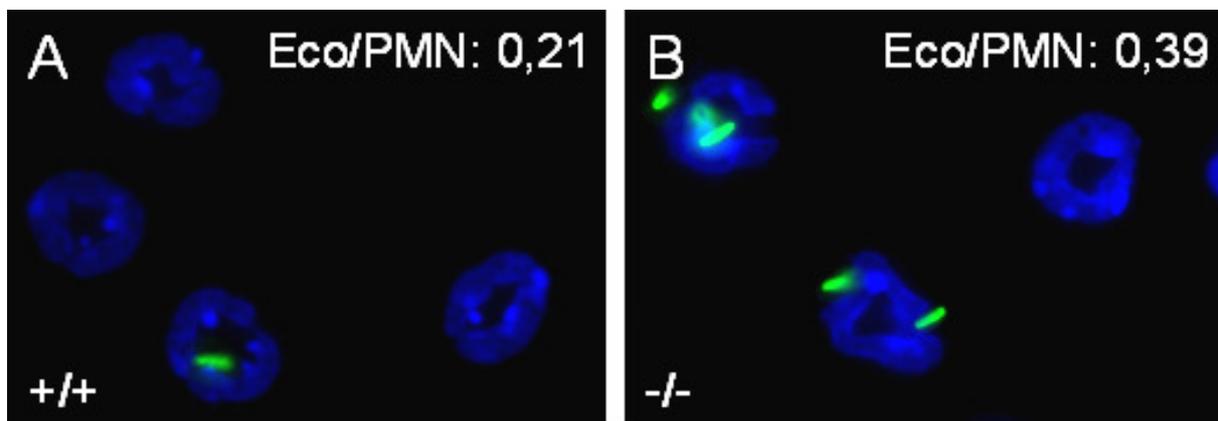


Abb. 33: Phagozytose und Prozessierung von GFP-markierten *E. coli*-Bakterien durch Neutrophile. A, B: 5×10^5 peritoneale Neutrophile aus Wildtypmäusen (A) und LAMP-2-defizienten Mäusen (B) wurden vier Stunden nach Thioglykolininjektion aus dem Peritoneum isoliert und für zwei Stunden bei 37°C im CO₂-Inkubator gehalten, um die Zellen auf Deckgläschen adhären zu lassen. Anschließend wurden nicht adhärierte Zellen durch Waschen mit PBS (37°C) entfernt und die Zellen für 60 min mit 5×10^6 GFP-markierten *E. coli*-Bakterien inkubiert. Extrazelluläre Bakterien wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS (37°C) entfernt und die Neutrophilen für eine Stunde in antibiotikahaltigem Medium weiterinkubiert. Die Zellen wurden dann mit 4 % PFA fixiert und in Mowiol/DABCO eingebettet (Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt). Die Anzahl

der aufgenommenen, nicht abgebauten *E. coli*-Bakterien pro Zelle wurde ausgezählt. Dabei wurden mindestens 100 Neutrophile pro Genotyp untersucht.

4.2.5 Untersuchung der Fähigkeit von Neutrophilen zur Nutzung von sauerstoffabhängigen Abtötungsmechanismen

Zur effizienten Abtötung von Pathogenen verfügen neutrophile Granulozyten über sauerstoffabhängige und sauerstoffunabhängige Abtötungsmechanismen. Durch das System der NADPH-Oxidase und verschiedene Bestandteile zytoplasmatischer Granula sind sie in der Lage, hohe Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie Sauerstoffanionen, Wasserstoffperoxid und Hypochlorsäure herzustellen. Dabei steigt der Sauerstoffverbrauch der Zellen an, was man als *respiratorischen Burst* bezeichnet (Hampton et al., 1998). Über eine Meerrettichperoxidase (HRPO)-vermittelte Oxidation von Phenolrot konnte die von Neutrophilen hergestellte Menge an Wasserstoffperoxid ermittelt werden (3.2.2.13). Nach Zugabe von *E. coli*-Bakterien zu adhärennten Neutrophilen aus Wildtypmäusen und LAMP-2-defizienten Mäusen wurde nach einer Inkubationszeit von einer Stunde eine H₂O₂-Produktion von etwa 0,25 µM gemessen (Abb. 34A). Dabei zeigten Wildtypzellen und LAMP-2-defiziente Neutrophile keine signifikanten Unterschiede in der Menge an produziertem Wasserstoffperoxid. Als weiterer Stimulus diente das aus Hefezellwänden gewonnene Polysaccharid Zymosan. Es ergab sich eine etwa gleich hohe H₂O₂-Produktion in Wildtypneutrophilen und LAMP-2-defizienten Neutrophilen. Mit den gewählten Versuchsbedingungen konnten also keine Unterschiede zwischen der hergestellten Wasserstoffperoxidemengen durch Neutrophile aus Wildtypmäusen und LAMP-2-defizienten Mäusen ermittelt werden.

Die Gesamtmenge an produzierten reaktiven Sauerstoffspezies konnte über luminolverstärkte Chemilumineszenz festgestellt werden (3.2.2.14). Als Stimulus diente hier ebenfalls Zymosan. Die ROS-Produktion war bei Wildtypzellen höher als bei den LAMP-2-defizienten Neutrophilen (Abb. 34B). Statistische Auswertungen ergaben allerdings, dass dieser Unterschied nicht signifikant war. Als weiterer Parameter wurde die Reaktion auf bekapselte und unbekapselte Mutanten von *Klebsiella pneumoniae* bestimmt (Podschun et al., 1992). Die Mutante mit Kapsel löste weder bei den Wildtypzellen noch bei den defizienten Neutrophilen eine *Burstreaktion* aus. Die unbekapselten Klebsiellen riefen bei den Neutrophilen aus Wildtypmäusen eine im Vergleich zu den LAMP-2-defizienten Zellen stärkere Produktion von ROS hervor, die jedoch nicht signifikant höher war.

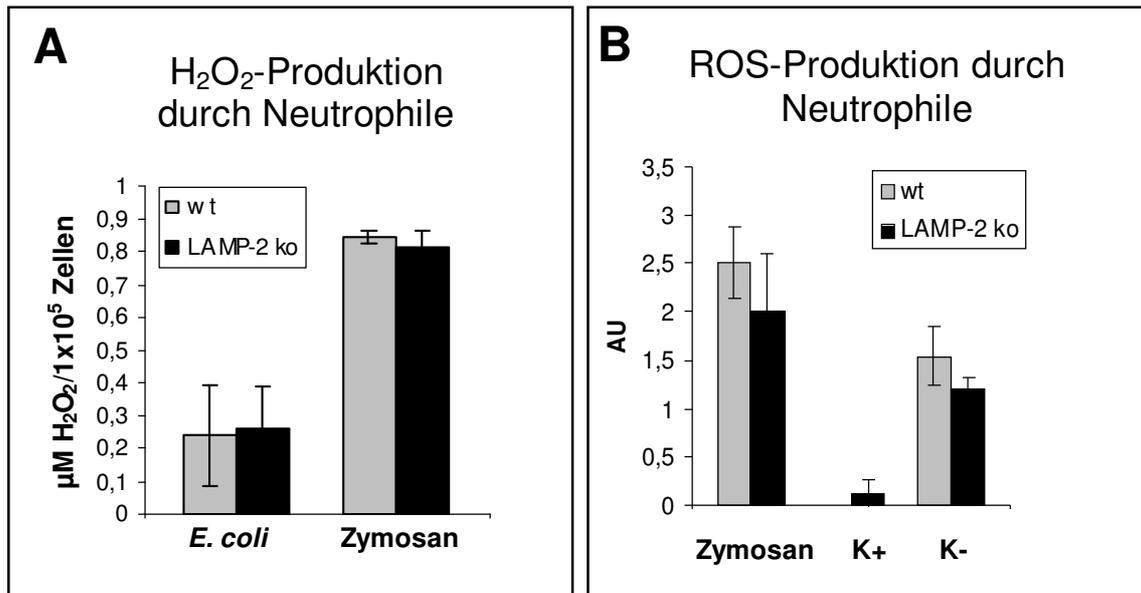


Abb. 34: Bestimmung der ROS-Produktion durch Neutrophile aus Wildtypmäusen und LAMP-2-defizienten Mäusen. **A:** Wasserstoffperoxidproduktion durch Neutrophile nach einstündiger Inkubation mit einer zehnfachen Menge an *E. coli*-Bakterien oder 1 mg/ml Zymosan. Die Zellen wurden in einem phenolrot-haltigen Medium gehalten. Durch H₂O₂-Abgabe ins Medium wird Phenolrot über eine HRPO-vermittelte Reaktion in ein bisher nicht genau bekanntes Derivat überführt, welches Licht bei einer Wellenlänge von 600 nm absorbiert. Die H₂O₂-Menge wurde anhand einer Eichgerade bestimmt. **B:** Die Gesamtmenge beim *Burst* produzierter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurde durch luminolvermittelte Chemilumineszenz gemessen. Dabei dienten Zymosan sowie bekapselte (K+) und unbekapselte (K-) Mutanten von *Klebsiella pneumoniae* zur Stimulation. In den Diagrammen sind die ± Standardabweichungen eingezeichnet. Die statistische Signifikanz wurde durch Students t-Test überprüft.

Insgesamt konnte aus den gewonnenen Daten geschlossen werden, dass die sauerstoffabhängigen Mechanismen zur Abtötung von Pathogenen bei LAMP-2-defizienten Neutrophilen nicht auffällig verändert waren. Auch wurde keine Verstärkung dieses Mechanismus im Vergleich zu Wildtypzellen festgestellt. Die Probleme bei der Elimination von Pathogenen durch LAMP-2-defiziente Neutrophile lagen also vermutlich an einer Störung des Pathogenabbaus durch sauerstoffunabhängige Mechanismen, was im Folgenden näher untersucht wurde.

4.2.6 Charakterisierung vesikulärer und granulärer Strukturen in LAMP-2-defizienten Neutrophilen

Um die Ursachen für die bei LAMP-2-defizienten Mäusen gefundene Parodontitis genauer zu bestimmen, wurden peritoneale neutrophile Granulozyten eingehend mikroskopisch untersucht.

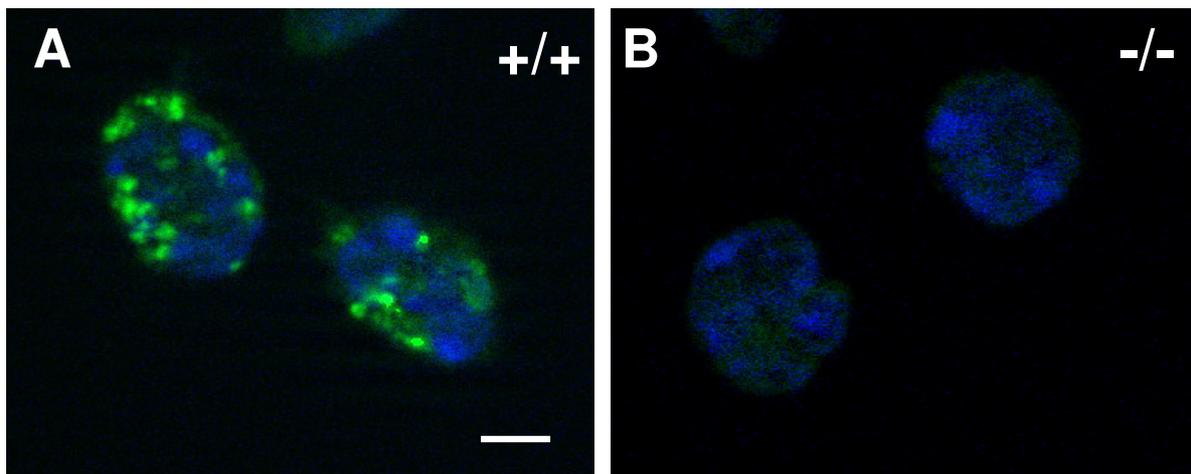


Abb. 35: Überprüfung der LAMP-2-Defizienz isolierter peritonealer neutrophiler Granulozyten. A, B: Neutrophile Granulozyten aus Wildtypmäusen und LAMP-2-defizienten Mäusen wurden vier Stunden nach Thioglykolininjektion aus dem Peritoneum isoliert und für zwei Stunden bei 37°C im CO₂-Inkubator gehalten, um die Zellen auf Deckgläschen adhären zu lassen. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert. Die Färbung erfolgte mit anti-LAMP-2-Antikörper und fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Maßstabbalken = 3 µm.

Zur Verifizierung des Genotyps der verwendeten Mäuse, wurden die Zellen standardmäßig bei jeder immunozytochemischen Färbung einer neuen Granulozytenisolation auch gegen LAMP-2 gefärbt. Wie Abbildung 35A zeigt, konnte in den Neutrophilen aus Wildtypmäusen eine deutliche vesikuläre Verteilung detektiert werden. Die LAMP-2-defizienten Zellen zeigten erwartungsgemäß keine Anfärbung mit anti-LAMP-2-Antikörper (Abb. 35B).

Eine nähere Betrachtung des lysosomalen Kompartiments erfolgte durch eine Färbung gegen das mit LAMP-2 strukturell verwandte lysosomale Membranprotein LAMP-1. In den aus Wildtypmäusen isolierten Neutrophilen war eine Verteilung der lysosomalen Vesikel im gesamten Zytoplasma sowie in der Nähe der Plasmamembran zu beobachten (Abb. 36A). Bei

den LAMP-2-defizienten Granulozyten konnten in den meisten Zellen ungewöhnlich große LAMP-1-positive Vesikel festgestellt werden, die auch oft in einem oder mehreren Bereichen innerhalb der Zelle aggregierten. Signale in der Nähe der Plasmamembran wurden in diesen Zellen selten beobachtet (Abb. 36B).

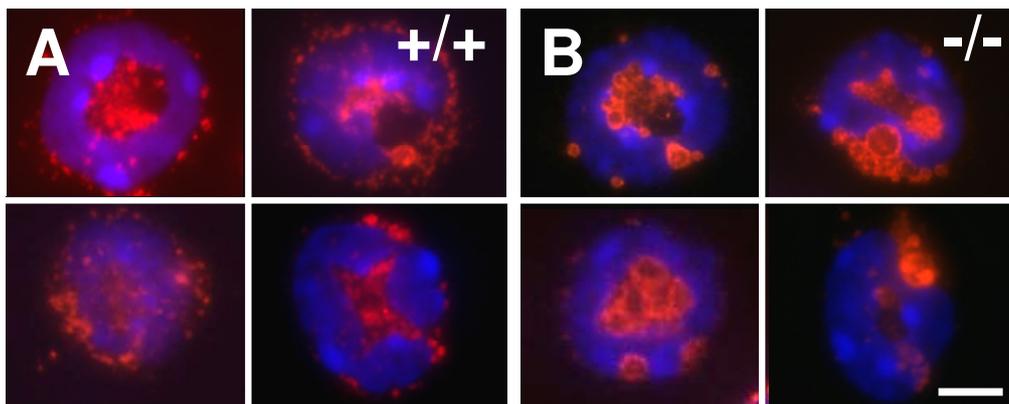


Abb. 36: Immunfluoreszenzfärbung gegen das lysosomale Membranprotein LAMP-1. A, B: Neutrophile Granulozyten wurden vier Stunden nach Thioglykolatinjektion aus dem Peritoneum isoliert und für zwei Stunden bei 37°C im CO₂-Inkubator gehalten, um die Zellen auf Deckgläsern adhären zu lassen. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit 4 % PFA fixiert. Die Färbung erfolgte mit anti-LAMP-1-Antikörper und fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. A: Bei Wildtypneutrophilen zeigten sich vesikuläre LAMP-1-Signale verstreut über die gesamte Zelle. B: Bei LAMP-2-defizienten neutrophilen Granulozyten waren große, zum Teil aggregierte Vesikel zu beobachten. Maßstabbalken = 3 µm (gilt für A und B).

Durch die Ausstattung mit verschiedenen zytoplasmatischen Granula verfügen neutrophile Granulozyten über eine Vielzahl an antibakteriell wirkenden Substanzen. Bei der Abtötung von Pathogenen werden hauptsächlich die primären und sekundären Granula eingesetzt (Segal, 2005). Als Markerprotein für primäre Granula, die wegen ihrer Anfärbbarkeit mit dem basischen Farbstoff Azur A auch azurophile Granula genannt werden (Spicer und Hardin, 1969), wurde für Immunfluoreszenzfärbungen Myeloperoxidase (MPO) verwendet. Dieses 150 kDa große antimikrobiell wirkende Protein wird bei Aktivierung von Neutrophilen hauptsächlich ins Phagosom, aber zum Teil auch in den extrazellulären Raum abgegeben (Faurichou und Borregaard, 2003). Es reagiert mit dem über das System der NADPH-Oxidase mit anschließender Superoxiddismutasereaktion hergestellten Wasserstoffperoxid und wandelt dieses in Substanzen mit einer hohen Toxizität um. Durch Oxidation von

Chlorid, Tyrosin und Nitrit generiert das H_2O_2 -MPO-System Hypochlorsäure, Tyrosinradikale, reaktive Stickstoffspezies und andere Substanzen, die die Oberfläche von Mikroorganismen angreifen (Faurichou und Borregaard, 2003; Klebanoff, 1999). Wie Abb. 37 zeigt, wurden in Wildtypzellen (Abb. 37A) und in LAMP-2-defizienten (Abb. 37B) Neutrophilen keine offensichtlichen Unterschiede in der Verteilung der primären Granula im Zytoplasma deutlich. Eine Doppelfärbung mit Antikörpern gegen den lysosomalen Marker LAMP-1 ergab bei den Neutrophilen aus beiden Mausstämmen z.T. eine Kolokalisation der MPO- und LAMP-1-positiven Vesikel.

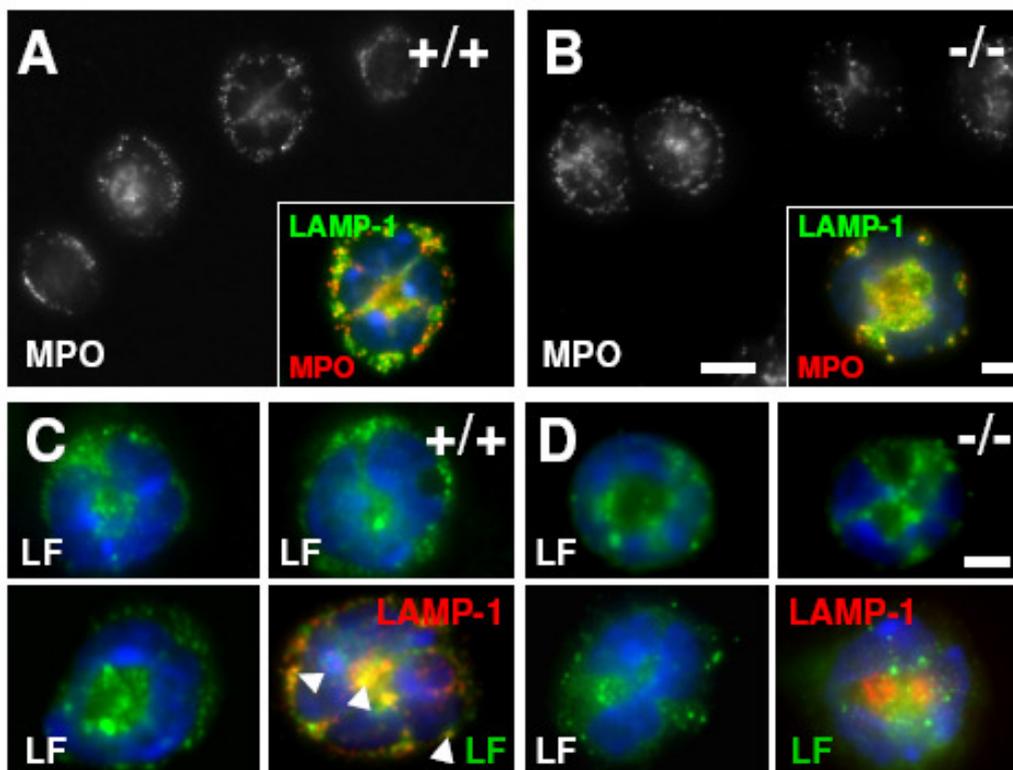


Abb. 37: Immunocytochemische Anfärbung primärer und sekundärer Granula. A-D: Neutrophile Granulozyten wurden vier Stunden nach Thioglykolinjektion aus dem Peritoneum von Wildtypmäusen und LAMP-2-defizienten Mäusen isoliert und für zwei Stunden bei 37°C im CO₂-Inkubator gehalten, um die Zellen auf Deckgläschen adhären zu lassen. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert. **A, B:** Färbung mit anti-MPO-Antikörper sowie fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Maßstabbalken = 3 μm (gilt für A und B). Eine Doppelfärbung gegen MPO (grün) und LAMP-1 (rot) in höherer Vergrößerung ist eingefügt. Maßstabbalken (Vergrößerung) = 2 μm (gilt für A und B). **A:** Wildtypneutrophile. **B:** LAMP-2-defiziente Neutrophile. **C, D:** Färbung mit einem anti-Laktoferrinantikörper (LF) sowie fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper (grün). Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. **C:** Immunfärbung gegen Laktoferrin in Granulozyten aus einem Kontrolltier. Eine Doppelfärbung mit LAMP-1 ist rechts unten gezeigt. Die Kolokalisation der Signale ist mit Pfeilköpfen gekennzeichnet. **D:** Immunfärbung gegen Laktoferrin in LAMP-2-defizienten neutrophilen Granulozyten. Die Doppelfärbung mit LAMP-1 (rechts

unten) zeigt, dass Laktoferrin nicht mit LAMP-1-positiven Vesikeln kolokalisiert. Maßstab Balken = 2,5 µm. (gilt für C und D).

Zur Markierung von sekundären Granula (spezifische Granula) wurde ein anti-Laktoferrinantikörper benutzt. Laktoferrin gehört zur Familie der eisenbindenden Transferrine und wirkt antibakteriell gegen ein breites Spektrum an grampositiven und gramnegativen Bakterien, indem es durch Eisenentzug ihr Wachstum hemmt (Oram und Reiter, 1968). In den untersuchten Wildtypzellen konnten laktoferrinpositive Vesikel im gesamten Zytoplasma der Zelle und an der Plasmamembran detektiert werden, die zum Teil mit LAMP-1 kolokalisierten (Abb. 37C). In LAMP-2-defizienten Neutrophilen (Abb. 37D) waren die Vesikel ebenfalls im Zytoplasma verteilt, jedoch seltener in der Nähe der Plasmamembran zu finden. Bei der Doppelfärbung mit LAMP-1 konnten, wie bereits in Abb. 36B dargestellt, große und z.T. aggregierte LAMP-1-positive Vesikel detektiert werden. Die laktoferrinpositiven Vesikel zeigten überwiegend keine Kolokalisation mit diesen Strukturen.

Zusammengefasst konnten in der Lokalisation der Granula nur Unterschiede bei laktoferrinpositiven nicht aber bei MPO-positiven Granula zwischen Kontrollneutrophilen und LAMP-2-defizienten Neutrophilen festgestellt werden.

4.2.7 Phagozytose von Latexkügelchen durch Neutrophile

Neutrophile Granulozyten werden zusammen mit Makrophagen als die professionellen Phagozyten des Organismus bezeichnet (Krause, 2000). Als Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind sie in der Lage, körperfremde Substanzen und tote Zellen unspezifisch aufzunehmen. Diese Eigenschaft wurde ausgenutzt, um die Aufnahme von Latexkügelchen mit einer Größe von 3 µm sowie die Reifung der daraus resultierenden Phagosomen mikroskopisch zu verfolgen (3.2.3.9). Die Auswertungen zeigten, dass Wildtypneutrophile und LAMP-2-defiziente neutrophile Granulozyten gleichermaßen in der Lage waren, Latexkügelchen aufzunehmen. In Abb. 38 (A und B) sind elektronen-mikroskopische Aufnahmen von Neutrophilen aus Wildtypmäusen und LAMP-2-defizienten Mäusen gezeigt, die ein Latexkügelchen aufgenommen hatten. Eine lichtmikroskopische Auszählung von internalisierten Latexkügelchen pro Zelle ergab einen Phagozytoseindex (Latexkügelchen pro Zelle) von 2,73 bei Wildtypneutrophilen und 2,81 bei den LAMP-2-defizienten Zellen. Die

Effizienz der Aufnahme von Partikeln durch LAMP-2-defiziente neutrophile Granulozyten war also nicht generell beeinträchtigt.

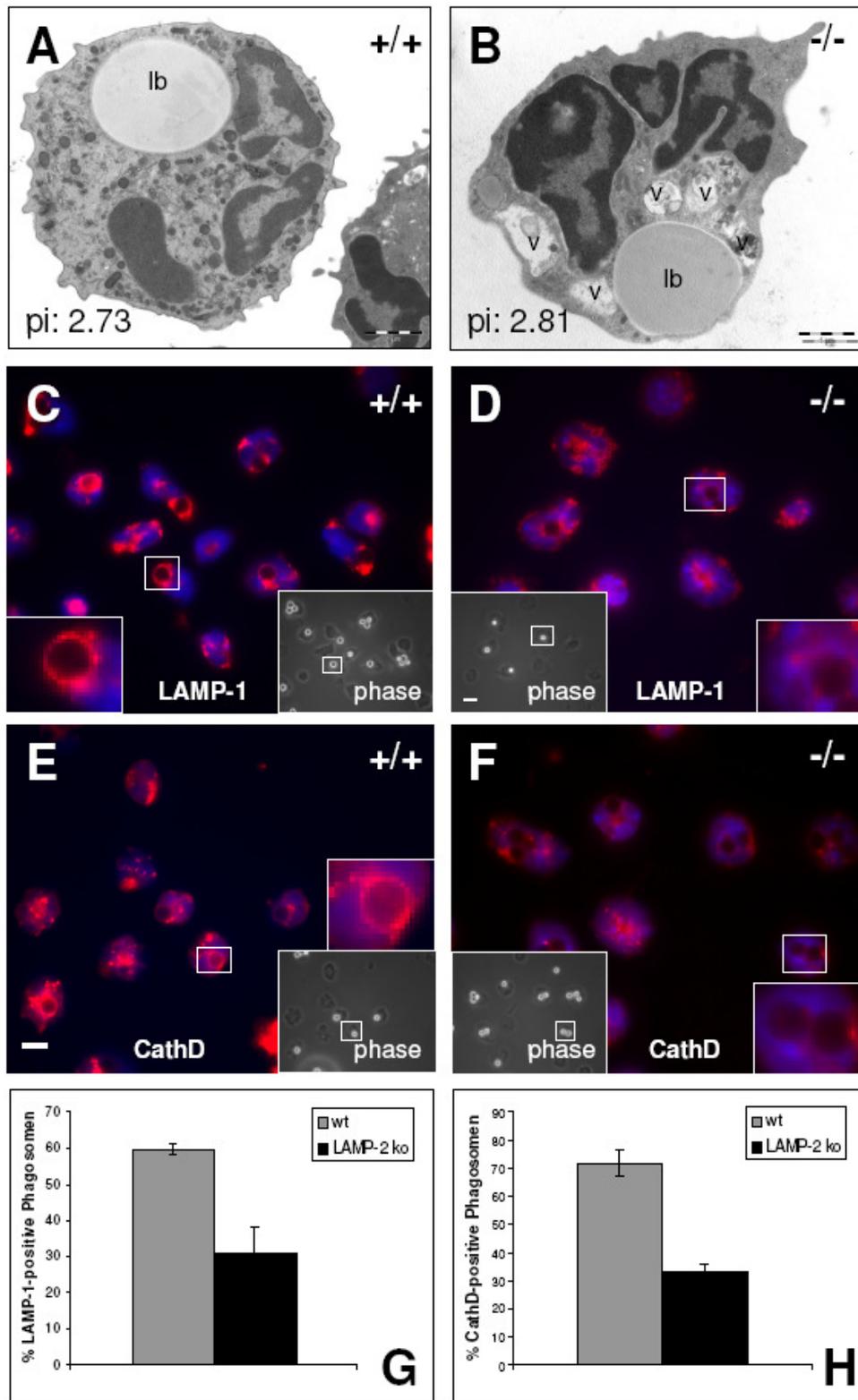


Abb. 38: Gestörte Phagosomenreifung in LAMP-2-defizienten Neutrophilen. A-F: Neutrophile Granulozyten wurden vier Stunden nach Thioglykolinjektion aus dem Peritoneum von Wildtypmäusen und LAMP-2-

defizienten Mäusen isoliert. **A, B:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen. lb: Latexkügelchen; pi: Phagozytoseindex (Anzahl der Latexkügelchen pro neutrophiler Granulozyt). Die EM-Aufnahmen entstanden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Vincent Everts (Akademisches Zentrum für Zahnheilkunde, Amsterdam, NL). **A:** Neutrophiler Granulozyt aus einer Wildtypmaus. Maßstab balken = 1 µm. **B:** LAMP-2-defizienter neutrophiler Granulozyt. Neben dem phagozytierten Latexkügelchen fielen noch die akkumulierten Vakuolen (v) auf. Maßstab balken = 1 µm. **C-F:** Peritoneale Neutrophile wurden zunächst und für zwei Stunden bei 37°C im CO₂-Inkubator gehalten, um die Zellen auf Deckgläschen adhären zu lassen. Anschließend wurden opsonierte Latexkügelchen (0,05 % Endkonzentration) zugegeben und die Phagozytose durch Zentrifugation synchronisiert. Nicht aufgenommene Kügelchen wurden nach einer Inkubationszeit von einer Stunde durch mehrmaliges Waschen mit warmem PBS entfernt bevor die Zellen mit 4 % PFA fixiert wurden. Die Färbung erfolgte mit anti-LAMP-1-Antikörper (**C, D**) oder anti-Cathepsin D-Antikörper (**E, F**) sowie fluoreszenzmarkierten Sekundäntikörpern. Maßstab balken = 5 µm (gilt für C bis F). Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Phasenkontrastaufnahmen sind eingefügt (phase, Maßstab balken = 5 µm, gilt für C bis F). **G, H:** Quantitative Auswertung der Fluoreszenzfärbungen mit LAMP-1 (**G**) und Cath D (**H**). Die Werte ergaben sich aus jeweils drei unabhängigen Auszählungen von mindestens 100 Phagosomen.

Um die Reifung der Phagosomen genauer zu verfolgen, wurden neutrophile Granulozyten für eine Stunde mit opsonierten Latexkügelchen inkubiert, fixiert und anschließend durch immunozytochemische Färbungen (3.2.3.7) gegen die lysosomalen Proteine Cathepsin D (CathD) und LAMP-1 angefärbt. Wie in Abb. 38 (C und E) zu sehen ist, wiesen die meisten Neutrophilen aus Wildtypmäusen rund um die internalisierten Latexkügelchen Signale für LAMP-1 und CathD auf. Bei den LAMP-2-defizienten Granulozyten hingegen konnten deutlich weniger LAMP-1- oder CathD-positive Phagosomen beobachtet werden (Abb. 38 D und F). Auszählungen ergaben bei Wildtypzellen ca. 60 % LAMP-1-positive Phagosomen. Bei den LAMP-2-defizienten Neutrophilen lag der Wert nur bei etwa 30 % (Abb. 38G). Nach Auswertungen der CathD-Färbungen besaßen Neutrophile aus Wildtypmäusen über 70 % CathD-positive Phagosomen, die aus LAMP-2-defizienten Mäusen hingegen nur etwa 30 %. Die Reifung der Phagosomen, die eine Rekrutierung lysosomaler Hydrolasen und Membranproteinen benötigt, war also in LAMP-2-defizienten neutrophilen Granulozyten deutlich gestört oder verlangsamt.

Die Ursache der verminderten Reifung der Phagosomen in LAMP-2-defizienten neutrophilen Granulozyten könnte in einer gestörten Azidifizierung der Phagosomen begründet liegen. Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Ansäuerung der Phagosomen wichtig für die Fusion von Endosomen und Lysosomen sowie für die Aktivität lysosomaler Enzyme ist (McNeil et al., 1983; Hart und Young, 1991; Gordon et al., 1980; Tapper und Sundler, 1995; van Weert et al., 1995). Mit Hilfe der schwachen Base DAMP, die

sich in sauren Kompartimenten ansammelt, kann die Azidifizierung der Phagosomen in neutrophilen Granulozyten untersucht werden. Das Dinitrophenolderivat DAMP wird bei saurem pH-Wert protoniert und kann in diesem Zustand die Membran nicht mehr passieren, was zu einer Akkumulation in sauren Kompartimenten führt (Anderson und Orci, 1988). Die Zellen wurden nach einer einstündigen Phagozytosezeit eine halbe Stunde in DAMP-haltigem Medium kultiviert (3.2.3.9) und anschließend einer immunocytochemischen Färbung mit anti-Dinitrophenolantikörper unterzogen. Es ergab sich, dass etwa 80 % der Phagosomen in Wildtypneutrophilen DAMP-positiv waren (Abb. 39A und C), wohingegen bei den LAMP-2-defizienten Neutrophilen nur etwa 60 % der Phagosomen DAMP enthielten (Abb. 39B und C). Die Ansäuerung der Phagosomen war also in diesen Zellen leicht verlangsamt oder behindert.

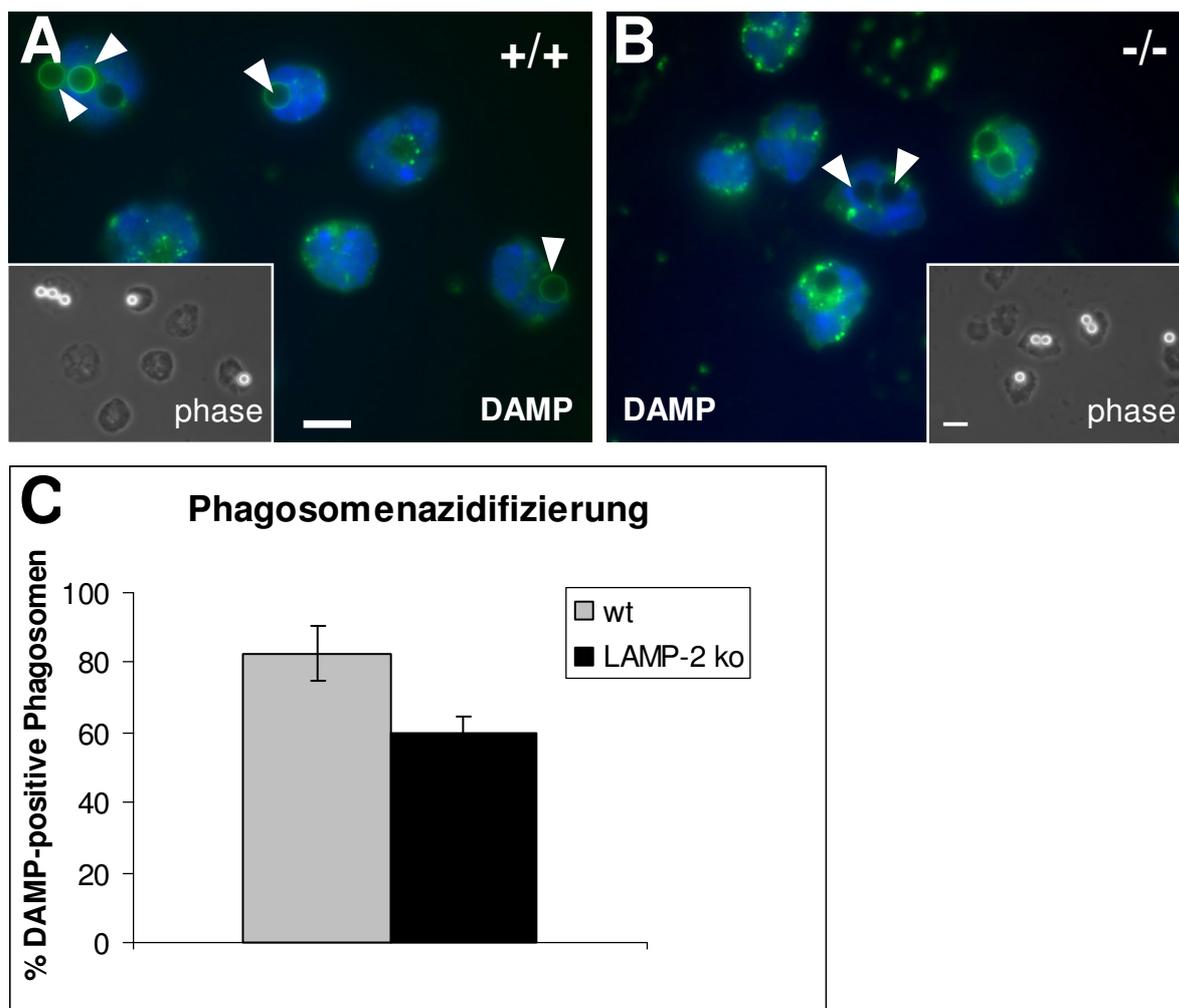


Abb. 39: Gestörte Ansäuerung von Phagosomen in LAMP-2-defizienten Neutrophilen. A, B: Neutrophile Granulozyten wurden vier Stunden nach Thioglykolatinjektion aus dem Peritoneum von Wildtypmäusen und

LAMP-2-defizienten Mäusen isoliert und für zwei Stunden bei 37°C im CO₂-Inkubator gehalten, um die Zellen auf Deckgläschen adhären zu lassen. Anschließend wurden opsonierte Latexkügelchen (0,05 % Endkonzentration) zugegeben und die Phagozytose durch Zentrifugation synchronisiert. Nicht aufgenommene Kügelchen wurden nach einer Inkubationszeit von einer Stunde durch mehrmaliges Waschen mit warmem PBS entfernt, bevor die Zellen für 30 min mit 0,1 M DAMP (in RPMI gepuffert mit 20 mM HEPES) inkubiert wurden. Die Fixierung erfolgte schließlich mit 4 % PFA. DAMP wurde mit anti-Dinitrophenolantikörper sowie fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper detektiert. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Maßstabbalken = 3 µm (gilt für A und B). Verkleinerte Darstellungen der Phasenkontrastaufnahme sind als Ausschnitte eingefügt. Maßstabbalken = 5 µm (gilt für A und B). **A:** Wildtyp. **B:** LAMP-2-defizient. **C:** Quantitative Auszählung von DAMP-positiven Phagosomen. Die Werte ergeben sich aus zwei unabhängigen Auszählungen von mindestens 100 Phagosomen.

4.2.8 Untersuchung des Zytoskeletts in LAMP-2-defizienten Neutrophilen

Huynh et al. untersuchten die Verteilung und Mobilität von Lysosomen und Phagosomen in Wildtypfibroblasten und LAMP-doppeldefizienten Fibroblasten durch Abstandsmessungen zwischen markierten Vesikeln und dem Nukleus (Huynh et al., 2007). Eine derartige Untersuchung ist mit Neutrophilen wegen der geringen Größe dieser Zellen und der segmentierten Form des Zellkerns nur schwer durchzuführen. Im Rahmen dieser Studie wurde daher zunächst die Tubulinverteilung in LAMP-2-defizienten Neutrophilen und Kontrollneutrophilen nach immunocytochemischer Färbung verglichen.

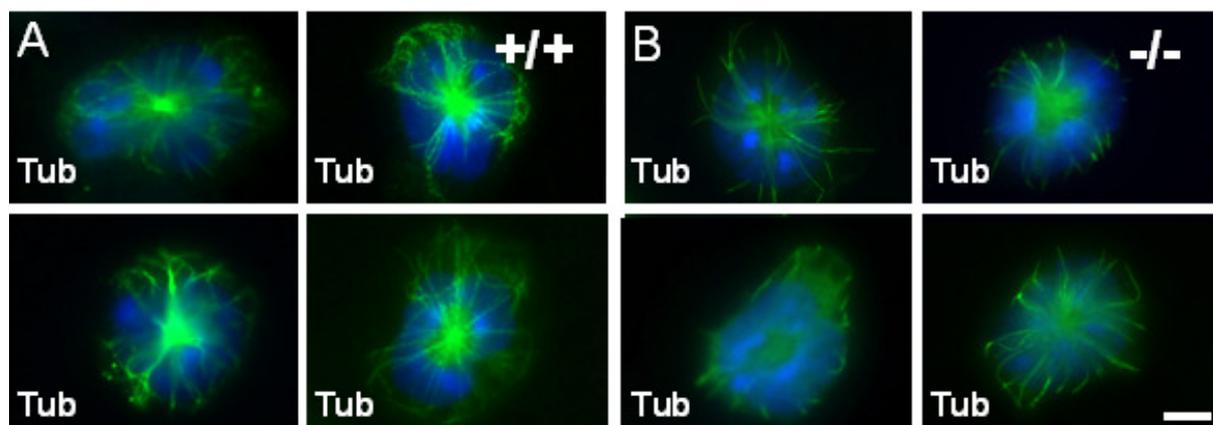


Abb. 40: Immunfluoreszenzfärbung gegen Tubulin . A, B: Neutrophile Granulozyten wurden vier Stunden nach Thioglykolinjektion aus dem Peritoneum isoliert und für zwei Stunden bei 37°C im CO₂-Inkubator gehalten, um die Zellen auf Deckgläschen adhären zu lassen. Anschließend wurden die Zellen für 15 min mit 0,7 % Glutaraldehyd in PBS fixiert und anschließend 15 min mit 0,5 % Triton-100 in PBS lysiert.

Ungesättigte Aldehydgruppen wurden für 20-30 min mit 1 mg/ml NaBH₄ in TBS reduziert. Die Färbung erfolgte mit anti-Tubulin-Antikörper und fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. **A:** Wildtypneutrophile. **B:** Bei LAMP-2-defizienten neutrophilen Granulozyten. Maßstabbalken = 3 µm (gilt für A und B).

Wie Abb. 40 zeigt, ließen sich mit dieser Methode keine offensichtliche Unterschiede in der Ausbildung von Mikrotubulifilamenten nachweisen. Die Filamente verliefen vom mikrotubulioorganisierenden Zentrum, welches zumeist in der Mitte der Zelle lokalisiert war, zur Peripherie der Zelle. Weitere Experimente sind erforderlich, um eine mögliche Rolle von LAMP-2 beim intrazellulären Transport über Mikrotubuli (oder Aktinfilamente) aufzuklären.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden in zwei getrennten Studien lysosomale Funktionen bei der zellulären Cholesterinhomöostase und der angeborenen Immunabwehr untersucht.

Extrazelluläres verestertes LDL-Cholesterin kann über LDL-Rezeptoren und Endozytose in die eukaryotische Zelle aufgenommen werden (Chan, 1992). Durch den pH-Abfall in den Endosomen dissoziiert der LDL-Partikel vom Rezeptor ab und das LDL gelangt zu den Lysosomen, wo die Cholesterinester hydrolysiert werden. Um homöostatische Antworten, die den intrazellulären Cholesterinpool regulieren, auszulösen, muss das Cholesterin die Lysosomen verlassen. Wie der Transport von lysosomalem Cholesterin in der Zelle abläuft, ist bisher noch unklar. Eine wichtige Rolle wird dem lysosomalen Protein NPC2 zugesprochen (Vanier und Millat, 2004).

5.1.1 Subzelluläre Lokalisation von NPC2 und dessen Rolle im Cholesterintransport

Die subzelluläre Lokalisation des Proteins NPC2 wurde bereits durch Zellfraktionierung und Immunfluoreszenzmikroskopie näher untersucht (Naureckiene et al., 2000). Für endogenes NPC2 aus Rattenleber konnte eine Kofraktionierung mit lysosomalen Enzymen gezeigt werden. Durch Immunfluoreszenzfärbungen fand man in humanen Fibroblasten eine NPC2-Lokalisation sowohl in LAMP-1-positiven als auch in LAMP-1-negativen Vesikeln, im TGN (Blom et al., 2003) sowie in Cathepsin D-positiven Vesikeln (Zhang et al., 2003). Ebenso konnte endozytiertes NPC2-RFP (rotfluoreszierendes NPC2-Protein) im Lumen von Vesikeln nachgewiesen werden, die von NPC1-GFP-Signalen begrenzt waren. Zhang et al. zeigten in einer anderen Studie, dass es nur eine sehr geringe Kolo­kalisierung von endogenem NPC1 und NPC2 gab (Zhang et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass endogenes NPC2 in MEF-Zellen in LAMP-1-positiven Vesikeln lokalisiert war. Es konnte keine Kolo­kalisierung mit dem TGN-Marker Syntaxin 6 (Bock et al., 1997) oder dem ER-Marker PDI festgestellt werden. Zusammenge­nommen deuten diese Ergebnisse auf eine Lokalisation von endogenem NPC2 in LAMP-1- und Cathepsin D-positiven Vesikeln hin, welche späte Endosomen und/oder Lysosomen darstellen. Die Kolo­kalisierung von NPC1 und NPC2 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden, da eine Färbung von NPC2 nur bei Fixierung mit *Bouin's* Fixierlösung möglich war. Diese Fixiermethode eignete sich allerdings nicht für die Immunfärbung mit den vorhandenen Antikörpern gegen NPC1. Da endogenes NPC1 und

NPC2 nach der Studie von Zhang und Kollegen kaum kolokalisieren, ist es möglich, dass NPC1 nur in denjenigen späten Endosomen lokalisiert ist, die kein NPC2 enthalten. NPC1 und NPC2 kolokalisierten allerdings in cholesterinbeladenen Kompartimenten (Zhang et al., 2001).

Blom et al. beobachteten, dass die Protein- und mRNA-Spiegel von NPC2 in NPC1-Patientenzellen im Vergleich zu Kontrollzellen erhöht waren (Blom et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die NPC1-Proteinmenge sowie die NPC1-mRNA-Menge in MPR46/MPR300-doppeldefizienten Fibroblasten, in denen der intrazelluläre NPC2-Transport gestört war, höher waren. Zusammen sprechen diese Ergebnisse dafür, dass NPC1 und NPC2 gemeinsam reguliert werden. Das eine Protein könnte stärker exprimiert werden, um das Fehlen des anderen zu kompensieren. Diese Überlegung unterstützt die Hypothese, dass die beiden Proteine im gleichen Lipidtransportweg eine Rolle spielen (Storch und Cheruku, 2005).

Es wurde vorgeschlagen, dass NPC1 und NPC2 eine Rolle im Cholesterintransport aus dem späten Endosom/Lysosom heraus spielen. So könnte NPC2 das Cholesterin von den internen Membranen des Lysosoms zur begrenzenden Membran transportieren, wo es an NPC1 bindet und mit dessen Hilfe zu einem zytoplasmatischen Akzeptor transferiert wird (Storch und Cheruku, 2005). In diesem Zusammenhang ist es überraschend, dass die subzelluläre Verteilung von NPC1 in MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen nicht verändert war, obwohl diese Zellen eine starke Cholesterinakkumulation in vergrößerten spätendosomal Kompartimenten zeigten. Es ist ebenso denkbar, dass funktionelles NPC2 wichtig für den Transport von NPC1 zu den cholesterinbeladenen späten Endosomen ist. Diese Unklarheiten im Zusammenspiel zwischen NPC1 und NPC2 bedürfen weiterer Untersuchungen.

Der Transport von Cholesterin aus den Lysosomen heraus könnte ferner ein Zusammenwirken von NPC1 und NPC2 mit einem dritten Protein wie z.B. MLN64 benötigen. MLN64 ist ein spätendosomales/lysosomales Membranprotein und besitzt eine Lipidtransferdomäne (START) (Strauss et al., 2002). Kishida et al. stellten allerdings bei Mäusen mit einer Mutation in der START-Domäne von MLN64 keine gravierenden Veränderungen im Cholesterinmetabolismus oder der zellulären Verteilung von Cholesterin fest (Kishida et al., 2004), was gegen eine direkte Rolle von MLN64 im Cholesterintransport aus den Lysosomen heraus spricht. Ein weiterer potentieller Beteiligter im intralysosomalen Cholesterintransport könnte Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP, in der Literatur zum Teil auch Lysobisphosphatidsäure (LBPA) genannt) sein. Dieses Phospholipid ist in hohen

Konzentrationen im internen Membrannetzwerk von Endosomen/Lysosomen zu finden (Kobayashi et al., 1998). Eine Behandlung von BHK-Zellen (Babyhamster-nierenzellen) mit anti-BMP-Antikörpern ergab eine Akkumulation von Cholesterin in späten Endosomen (Kobayashi et al., 1999). Außerdem konnte ein schneller Cholesterintransfer von NPC2 zu BMP-enthaltenden Modellmembranen gemessen werden (Storch und Cheruku, 2005), was dafür spricht, dass dieses Lipid die Interaktion von NPC2 und Cholesterin vermitteln könnte.

In unserer Arbeitsgruppe konnten wir des Weiteren in Fibroblastenzellen mit einer Doppeldefizienz in den lysosomalen Membranproteinen LAMP-1 und LAMP-2 eine massive Cholesterinakkumulation in spätendosomalen/lysosomalen Kompartimenten beobachten (Eskelinen et al., 2004; Schmidt, 2004). Interessanterweise fanden wir auch in einigen dieser Zellen eine veränderte Lokalisation von MPR300 (Neu, 2005). Die erhöhte Cholesterinmenge in den späten Endosomen führt also möglicherweise zu einem gestörten Rücktransport von MPR300 zum TGN, was wiederum eine Störung des Transportes von lysosomalen Enzymen wie z.B. NPC2 zur Folge hat. Diese Störung bewirkt schließlich eine weitere Cholesterinakkumulation.

Durch eine Behandlung von gesunden Zellen mit dem hydrophoben Amin U18666A kann die Akkumulation von freiem Cholesterin in späten Endosomen, wie sie in NPC-Zellen beschrieben ist, nachgeahmt werden (Liscum und Faust, 1989). Kobayashi et al. stellten sowohl in NPC-Fibroblasten als auch in U18666A-behandelten BHK-Zellen eine veränderte intrazelluläre Lokalisation von MPR300 fest (Kobayashi et al., 1999). So war die *steady state* Lokalisation von MPR300 nicht vorwiegend im TGN, sondern in LIMP-1-positiven späten Endosomen zu finden.

Insgesamt lässt sich aus diesen Daten schließen, dass nicht nur der intrazelluläre Transport von NPC2 von den MPRs abhängt, sondern auch der Rücktransport der MPRs (besonders von MPR300) zum TGN indirekt von NPC2 abhängig ist, welches den Cholesterintransport aus den späten Endosomen vermittelt.

5.1.2 Lipidakkumulation in MPR-defizienten Zellen

Neben Cholesterin akkumulieren in NPC-defizienten Zellen auch andere Lipide (Vanier und Millat, 2003). Für das Glykosphingolipid GM1 konnte von Sugimoto et al. eine Akkumulation in frühen Endosomen von NPC1-defizienten CHO-Zellen nachgewiesen

werden (Sugimoto et al., 2001). Taniguchi et al. fanden eine GM1-Anreicherung in Neuronen von NPC1-defizienten Mäusen (Taniguchi et al., 2001). In NPC2-defizienten humanen Fibroblasten ist eine Akkumulation von GM1 in späten Endosomen und Lysosomen beschrieben worden (Berger et al., 2005), welche durch das NPC2-Homolog aus Hefe *scNpc2p* reduziert werden konnte. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergaben eine leichte Akkumulation von GM1 in MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen. NPC2 spielt also möglicherweise auch in murinen Fibroblasten eine gewisse Rolle bei der Sortierung von GM1.

Zhang et al. zeigten in normalen humanen Fibroblasten und NPC2-defizienten Fibroblasten, dass das endozytierte Glykosphingolipid GM2 aus der Plasmamembran in NPC-1-positive späte Endosomen transportiert wurde. In Fibroblastenzellen mit mutiertem NPC1 hingegen war GM2 zwar an der Plasmamembran zu finden, wurde aber nicht endozytiert (Zhang et al., 2003). Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen führte die Fehlsortierung von NPC2 zu keiner offensichtlichen Akkumulation oder Fehlsortierung von GM2 im Vergleich zu Kontrollzellen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass NPC1, nicht aber NPC2, für den intrazellulären Transport von GM2 mitverantwortlich ist.

Eine Anfärbung von BMP ergab eine erhöhte Anzahl an BMP-positiven Vesikeln in MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen. Von Kobayashi und Kollegen wurde beschrieben, dass LBPA (entspricht BMP) in den internen Membranen von multivesikulären Körperchen stark angereichert war (Kobayashi et al., 1998). In elektronenmikroskopischen Analysen fanden wir eine erhöhte Zahl dieser Körperchen in den MPR-defizienten Fibroblasten, was die vermehrte Anzahl an BMP-positiven Signalen bei Immunfluoreszenzfärbungen in dieser Zelllinie erklärt.

5.1.3 Untersuchung zur Glykosylierung von NPC2

Die Peptidsequenz von humanem NPC2 zeigt drei potentielle N-Glykosylierungsstellen (Asn38, Asn58 und Asn135). Chikh et al. transfizierten NPC2-cDNA mit Mutationen in den jeweiligen Glykosylierungsstellen in NPC2-Patientenfibroblasten. Eine Mutation von Asn38 (N38Q) ergab, dass diese Aminosäure nicht zur N-Glykosylierung genutzt wurde (Chikh et al., 2004). Im Westernblot konnten sie bei dieser Mutante das gleiche Bandenmuster wie beim Wildtyp-NPC2 nachweisen. Bei Mutationen in den anderen beiden potentiellen

Glykosylierungsstellen hingegen (N58Q, N135Q) zeigte sich eine um zwei bis drei kDa geringere molekulare Masse. Chikh und Kollegen fanden durch Deglykosylierung mit Endo H, welches nur Zuckerketten vom Mannose- oder Hybridtyp abspaltet, dass sich bei der NPC2-Mutante N58Q sowohl die deglykosylierte Form von 14,5 kDa als auch eine 21 kDa große Bande fand, die eine nicht von Endo H deglykosylierte Variante des Proteins darstellte und somit komplexe Zuckerketten trug. Bei der Mutante N135Q hingegen konnte nur die 14,5 kDa-Bande gefunden werden, was auf eine Glykosylierung mit Zuckern vom Mannose- oder Hybridtyp schließen lässt. Sie folgerten daraus, dass Asn58 nur mit einfachen Zuckerketten glykosyliert ist, Asn135 hingegen zwei Arten von Zuckerketten trägt. Die Deglykosylierung von Zelllysaten aus den in der vorliegenden Arbeit verwendeten murinen Fibroblasten mit Endo H ergab in Kontrollzellen eine ca. 14 kDa große Bande und eine zusätzliche Bande von etwa 15 kDa. Dabei handelt es sich bei der 14 kDa-Bande vermutlich um das deglykosylierte Protein, denn eine Behandlung mit PNGase F, welches sowohl Zuckerketten vom Mannose- oder Hybridtyp als auch komplexe Zuckerketten abspaltet, ergab eine Bande in gleicher Höhe. Die 15 kDa-Bande könnte, wie von Chikh et al. beschrieben, durch das Vorhandensein komplexer Zuckerketten begründet sein. Das gleiche Bandenmuster wie bei Kontrollzellen fand sich bei den MPR46-defizienten Zellen. Bei den MPR300-defizienten Fibroblasten hingegen konnte nach Deglykosylierung nur die 14 kDa-Bande nachgewiesen werden. NPC2 trägt in diesen Zellen somit nur Zuckerketten vom Mannose- bzw. Hybridtyp. Auch in den Zelllysaten aus MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen ließ sich nur die 14 kDa-Bande nachweisen, wobei diese sehr schwach war. Die Verknüpfung an einer oder mehreren der drei potentiellen Glykosylierungsstellen des murinen NPC2-Proteins (Asn38, Asn58 und Asn69) mit komplexen Zuckerketten könnte also in MPR300-defizienten und MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen gestört sein. Da die Verknüpfung mit komplexen Zuckerketten erst im medialen Golgi-Komplex stattfindet, sind alle Proteine, deren Zuckerketten von Endo H abgespalten werden, in der Zelle im ER oder *cis*-Golgi lokalisiert. In MPR300-defizienten und MPR-doppeldefizienten Fibroblasten konnten keine Endo H-resistenten NPC2-Banden nachgewiesen werden, was auf eine Störung des Transportes zum medialen Golgi-Apparat in diesen Zellen schließen lässt.

Welche potentiellen Glykosylierungsstellen mit welchen Zuckerresten glykosyliert werden ist in murinen Fibroblasten nicht untersucht. Insgesamt lassen die in dieser Untersuchung gefundenen Ergebnisse vermuten, dass MPR300 bei der Glykosylierung von NPC2 vor allem mit komplexen Zuckerketten eine wichtigere Rolle spielt als MPR46.

5.1.4 MPR-abhängiger intrazellulärer Transport von NPC2

Neben der Entdeckung, dass es sich bei dem HE1-Gen um das zweite für die Niemann-Pick Krankheit verantwortliche Gen handelt (NPC2), beobachteten Naureckiene und Mitarbeiter auch, dass die Cholesterinakkumulation in NPC2-defizienten Fibroblasten durch Zugabe von NPC2 zum Kulturmedium reduziert werden konnte (Naureckiene et al., 2000). Eine zusätzliche Zugabe von Mannose-6-Phosphat verhinderte diesen Effekt. Da alle bisher analysierten Säugetierzellen beide MPRs mehr oder weniger stark exprimieren (Wenk et al., 1991), ist es schwer, die genaue Rolle des einzelnen Rezeptors bei der Lysosomenbiogenese zu bestimmen. Beide MPRs spielen eine Rolle in der Aufrechterhaltung eines ausreichenden Spiegels an lysosomalen Proteinen in der Zelle sowie deren Transport zu den Lysosomen. Es konnte gezeigt werden, dass lysosomale Proteine mit Mannose-6-Phosphatrest an beide MPRs binden können, wenn auch mit unterschiedlichen Affinitäten. So führt das Fehlen von MPR46 oder MPR300 zur Sekretion der gleichen lysosomalen Proteine, allerdings in unterschiedlichen Mengen (Pohlmann et al., 1995). Eine Sekretion des potentiellen MPR-Liganden NPC2 konnte in der vorliegenden Studie nur in den MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen nachgewiesen werden. Bei einer Defizienz in nur einem der beiden Rezeptoren wurde keine im Vergleich zu Kontrollzellen erhöhte NPC2-Abgabe ins Medium festgestellt. Für die Aufrechterhaltung des intrazellulären NPC2-Gehaltes sind demnach beide MPRs zusammen wichtig.

Eine Akkumulation an freiem Cholesterin in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten wie sie in den NPC-Patientenzellen beobachtet wurde, konnte auch in I-Zellen gezeigt werden. Bei der I-Zell Krankheit (*inclusion cell disease*, Mukopolipidose II) verhindert eine Mutation im Phosphotransferasegen das Anhängen des Mannose-6-Phosphatrestes an alle MPR-abhängigen löslichen lysosomalen Proteine (Reitman et al., 1981) und damit auch an NPC2. In der Tat konnte durch die Zugabe von NPC2 zum Medium von I-Zellen die endolysosomale Akkumulation von Cholesterin vermindert werden (Chikh et al., 2004), was dafür spricht, dass NPC2 von MPR-vermittelter Aufnahme und Transport abhängig ist. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse stimmen mit diesem Modell überein und deuten darauf hin, dass die MPRs für den korrekten intrazellulären Transport des NPC2-Proteins verantwortlich sind. Das Fehlen von beiden MPRs führte zu einem kompletten Fehltransport von NPC2 ins Medium und zu einer Akkumulation von freiem Cholesterin im Endosom/Lysosom. Durch Transfektion mit MPR46 oder MPR300 konnte die Cholesterinakkumulation in Endosomen/Lysosomen MPR46/MPR300-

doppeldefizienter Zellen auf das Niveau von Kontrollzellen reduziert werden. Ebenso konnte die retikuläre NPC2-Färbung der MPR46/MPR300-doppeldefizienten Zellen durch Transfektion mit einem der beiden MPRs in eine vesikuläre Färbung, wie sie auch bei Kontrollzellen zu finden war, verändert werden. Dabei fiel auf, dass die NPC2-Vesikel in den transformierten Zellen, im Gegensatz zu den Vesikeln in Kontrollzellen, nicht im gesamten Zytoplasma verteilt waren, sondern im perinukleären Raum akkumulierten. Dieses könnte in der Überexpression der Rezeptoren durch den Transfektionsvektor begründet sein. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass auch MPR46 oder MPR300 alleine den Transport zum endolysosomalen Kompartiment gewährleisten können, wobei MPR300 effizienter war als MPR46. Zellen ohne MPR300 wiesen sowohl eine höhere vesikuläre Cholesterinfärbung als auch ein verändertes Glykosylierungsmuster auf.

Durch EM-Analyse fanden wir eine Akkumulation von elektronendichten multivesikulären Körperchen in MPR-doppeldefizienten Fibroblasten. Ähnliche Strukturen konnten in kultivierten Fibroblasten von I-Zellen Patienten detektiert werden (Brown und Farquhar, 1984). Diese Untersuchungen machen deutlich, dass Störungen des MPR-abhängigen Transportes, sei es durch einen Defekt im Enzym, das für die Addition des Mannose-6-Phosphatrestes an den Liganden verantwortlich ist, oder durch einen Defekt im Rezeptor, das gleiche ultrastrukturelle Bild ergeben.

5.1.5 NPC2 in Geweben MPR-defizienter Mäuse

In dieser Untersuchung wurde der *in vivo* NPC2-Gehalt sowie die Gesamtmenge an Cholesterin in Geweben aus MPR-defizienten Mäusen analysiert. Es sollte dabei erwähnt werden, dass es sich um Gewebe tripeldefizienter Mäusen handelte. Zusätzlich zu den Genen *Mpr46* und *Mpr300* wurde auch das Gen für *Igf 2* (*Insulin-like Growth Factor II*) deletiert. MPR300 ist unter anderem ein Rezeptor für IGF II und ist in der Lage, dessen extrazelluläre Konzentration zu kontrollieren. Ein Fehlen von MPR300 führt daher zu einer Akkumulation von IGF II im Serum, was als Grund für die perinatale Sterblichkeit von MPR300-defizienten Mäusen gesehen wird (Filson et al., 1993). Eine zusätzliche IGF II-Defizienz konnte diese perinatale Sterblichkeit verhindern (Wang et al., 1994). IGF II-defiziente Mäuse zeigen zwar ein um etwa 30 % reduziertes Körpergewicht, sind aber in ihrer Viabilität und Fertilität nicht beeinträchtigt (DeChiara et al., 1990). Bei der Generierung MPR46/MPR300-doppeldefizienter Mäuse wurde daher ebenso *Igf 2* deletiert. Frisch isolierte Hepatozyten

sowie Gewebehomogenate von MPR/IGF II-defizienten Mäusen zeigen normale intrazelluläre Mengen an lysosomalen Enzymen (Dittmer et al., 1998). Ebenso wurde das MPR-transportierte NPC2 in den Studien der vorliegenden Arbeit den meisten der untersuchten Gewebe in normalen Mengen gefunden. Im Gegensatz dazu zeigen kultivierte Fibroblasten MPR/IGF II-defizienter Mäuse stark reduzierte Aktivitäten lysosomaler Enzyme und eine hohe Menge an lysosomalen Enzymen im Medium (Dittmer et al., 1998). Vergleichbares konnte in den untersuchten MPR-doppelfizienten Fibroblasten der vorliegenden Studie in einer erhöhten NPC2-Sekretion gezeigt werden konnte.

Auch in Fibroblasten von Patienten mit der I-Zell-Krankheit, bei der das Fehlen der Phosphotransferase zu lysosomalen Enzymen ohne Mannose-6-Phosphatrest führt, werden vermehrt Proteine ins Medium sekretiert. Die Enzymaktivitäten in den Geweben dieser Patienten waren allerdings normal (Kornfeld und Sly, 1985). Es wurde daher vermutet, dass es in einigen Zellen und Geweben einen MPR-unabhängigen Transportweg zu den Lysosomen gibt. Dieser ist zelltypabhängig und beruht auf Zelle-zu-Zelle- oder Sekretion-Wiederaufnahme-Prinzipien (Dittmer et al., 1999). Derartige Transportwege könnten auch für NPC2 benutzt werden. Durch den weitgehend normalen Transport von NPC2 waren die Gesamtmengen an Cholesterin in der untersuchten MPR/IGF II-defizienten Geweben nicht oder nur leicht erhöht. Nur im Herz wurde eine stark erhöhte Menge an Cholesterin gemessen. Die NPC2-Menge in diesem Gewebe war im Vergleich zum Kontrollgewebe vermindert. Die alternativen Transportwege werden also im Herzgewebe möglicherweise nicht genutzt.

5.1.6 Therapiemöglichkeiten für Niemann-Pick Typ C2

Viele der über 40 lysosomalen Speicherkrankheiten werden durch Mutationen in Genen, die lösliche lysosomale Proteine kodieren, hervorgerufen (Matzner, 2005). Durch die Markierung mit einem Mannose-6-Phosphatrest werden diese Proteine nicht nur intrazellulär vom Golgi-Apparat zum Lysosom transportiert, sondern es können auch extrazelluläre Proteine mit Mannose-6-Phosphatrest durch MPR300 an der Plasmamembran über Endozytose aufgenommen werden (Hille-Rehfeld, 1995). Diese Tatsache führte zu der Überlegung, ob einige lysosomale Speicherkrankheiten durch äußere Zugabe des entsprechenden intakten lysosomalen Enzyms geheilt werden könnten (Matzner, 2005). Diese als Enzymsubstitutionstherapie bezeichnete Behandlungsform wurde bereits an Tiermodellen verschiedener lysosomaler Speicherkrankheiten getestet, wobei intravenös verabreichte

lysosomale Enzyme schnell in die Leber, Milz und andere periphere Gewebe aufgenommen wurden (Kakkis et al., 2001; Yu et al., 2000; Ioannou et al., 2001; Miranda et al., 2000; Bijvoet et al., 1999). Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sprechen dafür, dass die NPC2-Krankheit in Zukunft über eine ähnliche Substitutionstherapie behandelt werden könnte, wie sie bei anderen lysosomalen Speicherkrankheiten eingesetzt wird. Das Problem dieser Art der Therapie ist bisher, dass keine therapeutisch effektiven Mengen an verabreichten Enzymen das Gehirn erreichen und somit Störungen im zentralen Nervensystem unterbinden (Matzner, 2005). Die Überwindung dieses Hindernisses ist zur Zeit Gegenstand intensiver Forschung.

5.2.1 Erhöhte Anfälligkeit für Parodontitis bei LAMP-2-defizienten Mäusen

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit waren Untersuchungen zum Zusammenhang einer LAMP-2-Defizienz und der Bildung von Plaque mit daraus resultierender Parodontitis bei Mäusen. Natürlich auftretende Parodontitis wurde bei Mäusen bisher nur selten beschrieben (Page und Schroeder H.E., 1982). Baer und Bernick fanden bei 12 Monate alten C57BR/dcJN-Mäusen den Abbau des Alveolarknochens (Baer und Bernick, 1957). Die meisten anderen untersuchten Stämme waren entweder resistent oder zeigten eine mäßige und unregelmäßig auftretende Form von Parodontitis, die nicht vor einem Alter von 26-39 Wochen auftrat (Baer und Liebermann, 1959; Baer und Liebermann, 1960; Gilbert und Sofaer, 1988; Gilbert und Sofaer, 1989). Nach den in der vorliegenden Studie gemachten Beobachtungen zeigten Wildtypmäuse keinerlei Plaquebildung, wohingegen diese bei den LAMP-2-defizienten Tieren bereits in frühem Alter massiv ausgebildet war. Beide Mausstämme wurden unter gleichen Bedingungen gehalten und erhielten das gleiche Futter. Eine wichtige Voraussetzung für die Bildung bakterieller Biofilme war die Haltung der Mäuse unter konventionellen keimbelasteten Bedingungen. Durch die Verabreichung von Antibiotika im Trinkwasser konnte die Plaqueakkumulation in LAMP-2-defizienten Tieren bei gleichen Haltungsbedingungen verhindert werden. LAMP-2-defiziente Mäuse, die unter SPF-Bedingungen gehalten wurden, zeigten wie die untersuchten Wildtypiere keinerlei Plaquebildung oder Gewebeabbau. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass die Parodontitis in LAMP-2-defizienten Mäusen auf eine bakterielle Plaquebildung zurückzuführen ist. Die in dieser Studie gefundenen Daten sprechen für eine reduzierte Abtötung der Bakterien durch Neutrophile. So wurde eine Akkumulation von phagozytierten

Bakterien in Neutrophilen von Gewebeschnitten der Gingiva beobachtet und die Abtötungskapazität peritonealer Neutrophiler aus LAMP-2-defizienten Mäusen war im Vergleich zu Neutrophilen aus Kontrolltieren vermindert.

Es ist zu erwähnen, dass die ungehinderte Plaqueakkumulation in LAMP-2-defizienten Mäusen vielerlei Ursachen haben kann. So kann z.B. auch eine veränderte Zusammensetzung des Speichels zu einer Anreicherung von Bakterien führen (Saxen et al., 1990).

Histometrische Oberflächenmessungen ergaben neben der Plaqueakkumulation und dem Rückgang des alveolaren Knochens bei den LAMP-2-defizienten Mäusen eine Zunahme des supraalveolaren Bindegewebes und des Epitheliums im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren. Diese Zunahme ist zum einen auf die Entzündung des Gewebes zurückzuführen, was eine Schwellung zur Folge hat (Junquerira et al., 2002). Außerdem konnte eine starke Vermehrung von Blutgefäßen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auf diese Weise können mehr Neutrophile in die mit Bakterien befallenen Regionen gelangen und ihrerseits die Bildung weiterer Blutgefäße fördern (McCourt et al., 1999). Die leicht erhöhte Oberfläche des parodontalen Ligaments (PDL, Wurzelhaut) bei den LAMP-2-defizienten Tieren ist ungewöhnlich, da das PDL in seiner Höhe aufgrund des Knochenabbaus reduziert war. Eine mögliche Erklärung könnte eine erweiterte Breite des PDLs der erkrankten Tiere sein, was wiederum in der verstärkten Wanderung der Molaren begründet sein könnte.

5.2.2 Gewinnung von primären neutrophilen Granulozyten

In vielen Studien an Mausmodellen für humane Krankheiten werden neutrophile Granulozyten verwendet. Die Granulozytenmenge, die aus murinem Blut gewonnen werden kann, ist jedoch limitiert (Serrander et al., 2000). Im Unterschied zu humanem Blut, wo Neutrophile bis zu 70 % der Leukozyten ausmachen (Junquerira et al., 2002), gehören in murinem Blut in der Regel nur etwa 10 % der Leukozyten zu den neutrophilen Granulozyten (Bogue et al., 2007). So können für Studien mit humanen Neutrophilen mit geringem Aufwand große Granulozytenmengen aus dem Blut isoliert werden (Otto, 1970). Bei Versuchen mit Neutrophilen aus Mausblut muss aufgrund des geringen Granulozytenanteils im Blut eine hohe Zahl an Mäusen eingesetzt werden. Alternativ wurden daher in vielen Studien Neutrophile aus dem Peritoneum oder dem Knochenmark verwendet (Baron und

Proctor, 1982; Gao et al., 1999; Hartt et al., 1999; Lowell et al., 1996; Tanaka et al., 2004). Dabei war nicht klar, ob sich murine Neutrophile aus dem Knochenmark für funktionelle Studien eignen. Bei humanen Knochenmarksneutrophilen handelt es sich um zum Teil funktionell unreife Zellen, zirkulierende Neutrophile sind meist ruhende Zellen und peritoneale Neutrophile sind voraktiviert (Cowland und Borregaard, 1999). Dieses könnte auch für murine Neutrophile gelten.

Zur Gewinnung der Granulozyten für die vorliegende Studie wurden zunächst zwei Isolationsmethoden in Hinblick auf die Ausbeute an Granulozyten verglichen. Zum einen wurden Neutrophile nach Induktion einer Peritonitis durch Injektion von Thioglykolat aus dem Peritoneum isoliert. Pro Maus konnten so etwa $1-2 \times 10^7$ peritoneale Zellen gewonnen werden, mit einem Neutrophilenanteil von bis zu 80 %. Zum anderen sollten Neutrophile nach vorheriger Behandlung mit dem Zytokin G-CSF aus dem Blut gewonnen werden. G-CSF regt das Knochenmark an, Granulozyten zu produzieren und diese ins Blut abzugeben. Bei dieser Methode waren nur 30-45 % der aus dem Blut isolierten Zellen Neutrophile, bei einer Gesamtzellzahl von 6×10^6 pro Maus. Diese geringe Anreicherung von Neutrophilen könnte an einem nicht mehr voll funktionstüchtigen G-CSF oder an einer falschen Verabreichung dieser Substanz liegen. Die Thioglykolatmethode ergab also nach diesen Vorversuchen eine höhere Neutrophilenausbeute. Aufgrund einer limitierten Zahl an vorhandenen LAMP-2-defizienten Mäusen wurden für die Untersuchungen in dieser Arbeit peritoneale Neutrophile verwendet.

Alternativ zur Isolation aus dem Blut können Neutrophile auch aus dem Knochenmark gewonnen werden, wobei sich die Frage stellt, inwiefern diese Zellen funktionell aktiv sind. Boxio und Kollegen konnten 2004 zeigen, dass murines Knochenmark ein großes Reservoir an Neutrophilen darstellt (Boxio et al., 2004), die in ihrer funktionellen Aktivität den Neutrophilen aus dem peripheren Blut ähnlich sind. Bei Stimulation von murinen peritonealen Neutrophilen mit chemotaktischen Peptiden wie fMLP fanden Itou et al. eine verstärkte Aktivität im Vergleich zu Neutrophilen, die aus dem Knochenmark isoliert wurden. Sie schlossen daraus, dass die Neutrophilen aus der Thioglykolat-isolation bereits voraktiviert waren und daher eine verstärkte Reaktion zeigten (Itou et al., 2006).

Bei den in dieser Arbeit gewonnenen Daten sollte daher bedacht werden, dass die verwendeten Neutrophilen durch die Verwendung der Thioglykolatmethode bereits voraktiviert waren.

5.2.3 Akkumulation autophagozytotischer Vakuolen in neutrophilen Granulozyten LAMP-2-defizienter Mäuse

Die von Tanaka et al. beschriebene Akkumulation von autophagozytotischen Vakuolen in diversen LAMP-2-defizienten Geweben (Tanaka et al., 2000) konnte in der vorliegenden Studie für neutrophile Granulozyten bestätigt werden. Sowohl Neutrophile, die sich im entzündeten Gewebe fixierter Kieferproben befanden, als auch Neutrophile, die aus dem Peritoneum LAMP-2-defizienter Tiere nach Induktion einer Peritonitis isoliert wurden, zeigten im Vergleich zu Proben aus Kontrolltieren eine auffällig erhöhte Anzahl autophagozytotischer Strukturen im Zytoplasma. Dabei ergab eine elektronenmikroskopische Auswertung, bei der frühe (Avi) und späte (Avd) autophagozytotische Vakuolen unterschieden wurden, dass in LAMP-2-defizienten Neutrophilen vor allem Avd zu finden waren. In LAMP-2-defizienten Hepatozyten fanden Tanaka et al. ebenfalls eine auffällige Akkumulation autophagozytotischer Vakuolen im Zytoplasma (Tanaka et al., 2000). Sie stellten außerdem fest, dass die Membran von Avd in Kontrollzellen eine hohe Menge an LAMP-2 aufwies. Weiterhin zeigte sich in den LAMP-2-defizienten Hepatozyten ein verminderter Abbau langlebiger Proteine, was darauf schließen lässt, dass die Akkumulation der autophagozytotischen Vakuolen in einem beeinträchtigten Abbau von autophagozytierten Material begründet ist. Der pH-Wert in Avi und Avd dieser Zellen zeigte keine auffälligen Veränderungen, und auch LAMP-1 konnte in den Membranen autophagozytotischer Strukturen nachgewiesen werden. Der Transport von Membranproteinen wie der V-Typ H^+ -ATPase oder LAMP-1 war in den Hepatozyten also generell möglich. Die Menge an LAMP-1-Protein in den Membranen von Avi und Avd war allerdings geringer als bei Kontrollhepatozyten. Ferner konnte eine verminderte Rekrutierung von Cathepsin D festgestellt werden (Tanaka et al., 2000).

Eskelinen und Kollegen stellten durch quantitative Elektronenmikroskopie in LAMP-2-defizienten Hepatozyten einen verlangsamten Abbau von Avd fest und fanden eine verlängerte Halblebenszeit für Avi und Avd. Außerdem konnten sie nachweisen, dass der Transport von endosomalem Material zu Autophagosomen prinzipiell stattfand (Eskelinen et al., 2002). Es ist zu bedenken, dass die Anwesenheit des mit LAMP-2 strukturell verwandten Membranproteins LAMP-1 den LAMP-2 Verlust zum Teil kompensieren kann (Andrejewski et al., 1999). So fanden wir in Fibroblasten mit einer Defizienz in LAMP-1 und LAMP-2 eine extreme Akkumulation von autophagozytotischen Vakuolen. LAMP-1/LAMP-2-doppeldefiziente Mäuse waren nicht lebensfähig und starben zwischen Embryonaltag 14,5 und 16,5 (Eskelinen et al., 2004).

Die in der vorliegenden Studie gefundenen Daten deuten darauf hin, dass die Autophagozytose in neutrophilen Granulozyten in vergleichbarer Weise gestört ist wie es bereits für LAMP-2-defiziente Hepatozyten beschrieben wurde (Tanaka et al., 2000; Eskelinen et al., 2002). Die genauen Ursachen dieser Störung sind bisher noch nicht bekannt. LAMP-2 könnte z.B. eine Rolle beim Transport von autophagozytotischen Vesikeln durch Mikrotubuli spielen. Kochl et al. fanden, dass Mikrotubuli wichtig für die Bildung und Reifung von Autophagosomen sind. Durch eine Inkubation mit der mikrotubuli-depolymerisierenden Substanz Nocodazol konnte die Bildung von Autophagosomen verlangsamt werden. Die Fusion von Autophagosomen mit Endosomen war ebenfalls inhibiert (Kochl et al., 2006).

5.2.4 Abtötungsmechanismen in neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind wichtige Bestandteile des angeborenen, unspezifischen Immunsystems (Janeway et al., 2002). Sie sind in der Lage, Pathogene extrazellulär und intrazellulär abzutöten. Hierbei spielen sowohl sauerstoffabhängige als auch sauerstoffunabhängige Mechanismen eine Rolle. Im Zytoplasma dieser spezialisierten Zellen befinden sich zahlreiche Granula, die ihren Inhalt ins extrazelluläre Medium oder intrazellulär in die phagozytotische Vakuole abgeben können (Dahlgren und Karlsson, 1999). Dabei spielen vor allem die primären (azurophilen) und die sekundären (spezifischen) Granula eine Rolle (Segal, 2005). Primärgranula werden bei Stimulation nur selten exozytiert, sondern tragen vornehmlich zur Abtötung und zum Abbau aufgenommener Mikroorganismen im Phagosom bei (Joiner et al., 1989). Im Inneren dieser Granula befinden sich antibakterielle Proteine wie z.B. Defensine, Cathepsine und Lysozym. Ein weiterer Bestandteil ist außerdem das 150 kDa große Hämoprotein Myeloperoxidase (MPO), das bei Aktivierung ins Phagosom oder zum Teil auch in den extrazellulären Raum abgegeben wird. MPO reagiert mit Wasserstoffperoxid und erzeugt diverse für Mikroorganismen toxische Verbindungen (HOCl, Tyrosinradikale, reaktive Stickstoffverbindungen) (Hampton et al., 1998). In der vorliegenden Studie wurde durch immunozytochemische Färbung die Verteilung MPO-positiver Granula untersucht. Beim Vergleich von Neutrophilen aus Kontrollmäusen und LAMP-2-defizienten Neutrophilen fanden sich keine auffälligen Unterschiede in der Lokalisation und Größe dieser Granula. Bei beiden konnten außerdem MPO-Signale in LAMP-1-positiven Vesikeln nachgewiesen werden. MPO wurde nach Phagozytose von Latexkügelchen gleichermaßen zu

den Phagosomen LAMP-2-defizienter Neutrophiler rekrutiert wie zu Phagosomen in Kontrollzellen (Daten nicht gezeigt). Die LAMP-2-Defizienz hatte demnach keine offensichtlichen fluoreszenzmikroskopisch nachweisbaren Folgen für die Verteilung und Rekrutierung primärer Granula.

Die sekundären Granula (spezifische Granula) neutrophiler Granulozyten wurden als sekretorische Vesikel beschrieben, die eine wichtige Rolle beim Auslösen einer Entzündungsreaktion spielen (Gallin, 1984). Ein wichtiger Bestandteil sekundärer Granula ist Laktoferrin, welches Eisen bindet und so durch Eisenentzug das Wachstum von Bakterien hemmt und als Markerprotein für diese Granula verwendet werden kann (Oram und Reiter, 1968). In Neutrophilen aus Kontrollmäusen konnten laktoferrinpositive Granula in der gesamten Zelle und in der Nähe der Plasmamembran detektiert werden. In LAMP-2-defizienten Neutrophilen waren die Vesikel ebenfalls im Zytoplasma verteilt, jedoch seltener in der Nähe der Plasmamembran zu finden. Außerdem wurde bei diesen Granula kaum eine Kolo-kalisation mit LAMP-1-positiven Vesikeln festgestellt, was bei Kontrollzellen jedoch häufig der Fall war. Die intrazelluläre Dynamik dieser Granula ist demnach in LAMP-2-defizienten Neutrophilen verändert. LAMP-2 könnte z.B. am Transport sekundärer Granula über Interaktion mit Bestandteilen des Zytoskeletts beteiligt sein.

Die Membran sekundärer Granula enthält neben zahlreichen Rezeptoren auch wichtige Bestandteile der für sauerstoffabhängige Abtötungsmechanismen wichtigen NADPH-Oxidase (Faurischou und Borregaard, 2003). Im ruhenden Zustand der Zelle besteht die NADPH-Oxidase aus einem membrangebundenen (*b*-Typ Cytochrom Heterodimer) und vier zytosolischen Komponenten (p47, p67, p40 und Rac2). Bei Aktivierung des Phagozyten werden die membrangebundenen Untereinheiten der NADPH-Oxidase aus den Membranen sekundärer Granula zur Plasmamembran bzw. zur Phagosomenmembran transportiert (Borregaard und Cowland, 1997). Zusammen mit den zytosolischen Bestandteilen entsteht ein funktionelles Elektronentransfersystem (Dahlgren und Karlsson, 1999). Elektronen werden über *b*-Cytochrom vom zytosolischen NADPH durch die Membran befördert und auf Sauerstoff im Phagosom oder im extrazellulären Milieu übertragen (Babior, 1999). Sauerstoffanionen können nun durch die Superoxiddismutase in Wasserstoffperoxid umgewandelt werden, welches ein Substrat der MPO ist. Die soeben beschriebenen Prozesse führen zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch der Zelle, was als *respiratorischer Burst* bezeichnet wird.

In dieser Untersuchung wurde überprüft, ob und in welchem Maße LAMP-2-defiziente Neutrophile zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Lage waren.

Dabei wurde sowohl die Gesamtmenge der beim *respiratorischen Burst* produzierten ROS als auch die spezielle Bildung von Wasserstoffperoxid gemessen. Durch Inkubation der Zellen mit *E. coli*-Bakterien oder Zymosan wurden diese zur Produktion von Wasserstoffperoxid angeregt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Wasserstoffperoxidproduktion von Wildtypneutrophilen und Neutrophilen aus LAMP-2-defizienten Mäusen festgestellt werden. Die Gesamtmenge an gebildeten ROS konnte über luminolabhängige Chemilumineszenz bestimmt werden. Luminol wird durch ROS angeregt und gibt Energie in Form von Licht ab (Dahlgren und Karlsson, 1999). Der *respiratorische Burst* wurde durch Zugabe von Zymosan oder bekapselte und unbekapselte Mutanten von *Klebsiella pneumoniae* ausgelöst. Dabei konnte bei Stimulation mit Zymosan eine nicht signifikant verminderte *Burstreaktion* bei den LAMP-2-defizienten Neutrophilen im Vergleich zu den Kontrollzellen gemessen werden. Podschun und Kollegen untersuchten bekapselte und unbekapselte Mutanten von *Klebsiella pneumoniae* und fanden einen erhöhten *Burst* bei Mutanten ohne K2-Antigen (unbekapselt) im Gegensatz zu bekapselten Klebsiellen vom Serotyp K2 (Podschun et al., 1992). In der vorliegenden Untersuchung wurde durch die bekapselte Klebsiellenmutante sowohl bei den Kontrollzellen als auch bei den LAMP-2-defizienten Neutrophilen nur eine sehr geringe *Burstreaktion* gemessen. Die unbekapselte Mutante rief, wie bei Podschun et al. beschrieben, einen höheren *Burst* hervor, der bei den LAMP-2-defizienten Zellen niedriger war als bei den Kontrollzellen.

Insgesamt ergab sich, dass LAMP-2-defiziente Neutrophile gleichermaßen wie Wildtypneutrophile in der Lage waren, einen *respiratorischen Burst* auszulösen, und somit in diesen Zellen keine Störungen bei der Bildung von ROS vorlagen. Es sollte allerdings beachtet werden, dass mit den verwendeten Methoden nicht zwischen phagosomalen und extrazellulären ROS unterschieden werden konnte. Für die Untersuchung des phagosomalen *Bursts* könnten Phagosomen aus Neutrophilen isoliert und die Menge an rekrutiertem Rac2 in der Phagosomenmembran bestimmt werden, welche Auskunft über die Aktivität der NADPH-Oxidase liefert (Prada-Delgado et al., 2001).

Im Zusammenhang mit parodontalen Erkrankungen sollte beachtet werden, dass in der sauerstoffarmen Umgebung parodontaler Taschen sauerstoffabhängige Abtötungsmechanismen eher von geringer Bedeutung sind (Smalley, 1994). Die bakterielle Plaquebildung, die bei LAMP-2-defizienten Mäusen festgestellt wurde, konnte mit den in der vorliegenden Studie durchgeführten Versuchen nicht auf eine Störung in den sauerstoffabhängigen Abtötungsmechanismen der LAMP-2-defizienten Neutrophilen zurückgeführt werden.

5.2.5 Rolle der LAMP-Proteine in neutrophilen Granula

Durch den hohen Anteil an Proteasen in den primären Granula werden diese auch häufig als spezialisierte Lysosomen dargestellt (Dahlgren et al., 1995; Borregaard und Cowland, 1997). Durch eine subzelluläre Fraktionierung mit einem diskontinuierlichen Percollgradienten konnten die verschiedenen Granulatypen aus humanen neutrophilen Granulozyten aufgetrennt werden. Es zeigte sich, dass LAMP-1 und LAMP-2 nicht in der Fraktion der primären Granula, sondern in der Fraktion der sekundären Granula zu finden waren (Dahlgren et al., 1995; Cieutat et al., 1998). EM-Untersuchungen der Fraktion der sekundären Granula ergaben, dass LAMP-1 und LAMP-2 nicht in den Membranen dieser Granula lokalisiert waren, sondern in anderen Vesikeln, die aufgrund gleicher Dichte kofraktioniert wurden (Cieutat et al., 1998). Cieutat und Kollegen beschrieben die LAMP-Proteine in neutrophilen Granulozyten als Bestandteil multilamellarer Kompartimente (MLC) und multivesikulärer Körperchen (MVB). Dabei zeigten sich diese Strukturen hauptsächlich in unreifen Neutrophilen. Die genaue Funktion von MLC und MVB ist bisher nicht beschrieben, aber Cieutat et al. vermuten in ihnen Vorstufen neutrophiler Lysosomen und schlagen vor, dass sie als frühe oder späte Endosomen dienen könnten. Weiterhin fanden sie LAMPs in Vesikeln verschiedener Größe, die nicht weiter identifiziert wurden (Cieutat et al., 1998). Das Fehlen der LAMPs in primären Granula lässt vermuten, dass diese nicht Teil des dynamischen endosomalen/lysosomalen Kompartiments sind, sondern eher als regulierte Speichervesikel dienen, die ihren Inhalt während des Abbaus von Mikroorganismen ins Phagosom abgeben. In weiteren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass Vakuolen mit abgebauten Bakterien LAMPs enthielten (Bainton, 1999). Die von Cieutat et al. (Cieutat et al., 1998) beschriebenen LAMP-positiven Vesikel, MLBs und MVBs müssen also in der Lage sein, mit Phagosomen zu fusionieren.

In dieser Arbeit konnte in Neutrophilen aus Kontrollmäusen sowohl eine teilweise Kolo-kalisation von MPO als auch von Laktoferrin mit LAMP-1-positiven Vesikeln festgestellt werden. Dieser Widerspruch zu den Ergebnissen von Cieutat et al. (Cieutat et al., 1998) und Dahlgren et al. (Dahlgren et al., 1995) könnte z.B. daran liegen, dass sich die Granula in murinen Neutrophilen womöglich anders verhalten als Granula in humanen Neutrophilen. So wurden bereits zahlreiche Unterschiede zwischen der Funktionalität muriner und humaner Neutrophiler beschrieben (Itou et al., 2006). Außerdem basieren die Aussagen über die Granula aus humanen Neutrophilen hauptsächlich auf Westernblotanalysen nach Zellfraktionierung (Cieutat et al., 1998; Dahlgren et al., 1995), wohingegen in der vorliegenden Studie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen ausgewertet wurden. Ferner

wurden in den Untersuchungen von Cieutat et al. (Cieutat et al., 1998) und Dahlgren et al. (Dahlgren et al., 1995) vorwiegend unreife, nicht voraktivierte Neutrophile analysiert, in der vorliegenden Arbeit wurden hingegen voraktivierte peritoneale Granulozyten untersucht. Aus den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten lässt sich schließen, dass MPO und LAMP-1 in den gleichen Vesikeln auftreten können. Ob LAMP-1 bereits in unreifen Neutrophilen in primären Granula lokalisiert war oder ob die primären Granula der untersuchten Neutrophilen LAMP-1 erst durch Fusion mit anderen Vesikeln erhielten, konnte aus den gewonnenen Daten nicht abgelesen werden.

Sekundäre Granula, die im Gegensatz zu den Primärgranula in der Literatur nicht als lysosomale Strukturen, sondern eher als sekretorische Vesikel beschrieben werden (Gallin, 1984), wiesen in den Untersuchungen von Cieutat et al. und Dahlgren et al. in ihren Membranen ebenfalls keine LAMP-Proteine auf (Cieutat et al., 1998; Dahlgren et al., 1995). Auch für diese Granula konnten in der vorliegenden Untersuchung eine Kolo-kalisation mit LAMP-1-positiven Vesikeln beobachtet werden. Als mögliche Begründungen für diese gegensätzlichen Ergebnisse können die gleichen Überlegungen wie für die primären Granula gelten (siehe oben). Auch hier ließ sich mit den gewonnenen Daten nicht klären, ob LAMP-1 bereits in unreifen Neutrophilen in sekundären Granula lokalisiert war oder ob diese LAMP-1 erst durch Fusion mit anderen Vesikeln erhielten. Zur Klärung dieser Frage könnten z.B. unreife bzw. nicht voraktivierte Neutrophile aus dem Knochenmark fluoreszenz-mikroskopisch untersucht werden.

5.2.6 Rolle der LAMP-Proteine bei der phagosomalen Reifung

Obwohl die lysosomalen Membranproteine LAMP-1 und LAMP-2 in Phagolysosomen angereichert sind, ist ihre Rolle in der phagosomalen Reifung bisher unklar (Huynh et al., 2007). Durch Transfektion mit dem Phagozytenrezeptor Fc γ A (FcR) ist es möglich, Zellen, die normalerweise keine Phagozytose durchführen, zur Phagozytose zu befähigen. IgG-opsonierte Partikel werden von den transfizierten Zellen spezifisch aufgenommen und durchlaufen einen ähnlichen Reifungsprozess wie in den „professionellen Phagozyten“, Neutrophilen und Makrophagen (Downey et al., 1999). Huynh et al. konnten auf diese Weise den Phagozytoseprozess in murinen LAMP-1- oder LAMP-2-einzeldefizienten und LAMP-1/LAMP-2-doppeldefizienten Fibroblasten genauer untersuchen. Sie fanden zunächst heraus, dass sowohl LAMP-1- und LAMP-2-einzeldefiziente als auch LAMP-1/LAMP-2-

doppeldefiziente Fibroblasten gleichermaßen wie der Wildtyp in der Lage waren, Latexkügelchen zu internalisieren. Auch peritoneale Makrophagen aus LAMP-1- oder LAMP-2-defizienten Mäusen konnten im gleichem Maße wie Makrophagen aus Wildtypmäusen Latexkügelchen aufnehmen (Huynh et al., 2007).

Die einzelnen Reifungsphasen der Phagozytose wurden von Huynh et al. mikroskopisch untersucht. Der frühendosomale Marker Rab5 konnte sowohl in Wildtypzellen und LAMP-1- oder LAMP-2-einzeldefizienten Fibroblasten als auch in LAMP-1/LAMP-2-doppeldefizienten MEFs im gleichen Ausmaß gefunden werden. Hingegen konnten die spätendosomalen Marker Rab7 und RILP sowie die lysosomalen Marker LIMP-1 (CD63), LIMP-2 und Cathepsin D in den Phagosomen LAMP-1/LAMP-2-doppeldefizienter MEFs kaum nachgewiesen werden (Huynh et al., 2007). Weiterhin fanden Huynh und Kollegen, dass LysoTracker, ein Marker für Kompartimente mit niedrigen pH-Werten, bei LAMP-1/LAMP-2-doppeldefizienten Fibroblasten zwar in Lysosomen normal detektierbar war, jedoch nicht in Phagosomen. Es ist also zu vermuten, dass die Phagosomen LAMP-1/LAMP-2-doppeldefizienter MEFs nicht in der Lage sind, mit späten Endosomen/Lysosomen zu fusionieren. LAMP-einzeldefiziente Phagosomen zeigten eine vergleichbare phagosomale Rekrutierung spätendosomaler und lysosomaler Proteine wie der Wildtyp. Das Vorhandensein eines des beiden LAMP-Proteine reicht also aus, um die Fusion zwischen Phagosomen und Endosomen/Lysosomen zu gewährleisten.

Durch eine Reexpression von LAMP-2 in LAMP-1/LAMP-2-doppeldefizienten Fibroblasten konnten Huynh et al. die Rab7-Rekrutierung zu den Phagosomen zum Teil (ca. 50 %) wiederherstellen. Eine genauere Untersuchung der Rab7-Lokalisation in LAMP-1/LAMP-2-doppeldefizienten MEFs ergab, dass Rab7-GFP in späten Endosomen vorhanden war. Die Defekte in der phagosomalen Reifung in diesen Zellen beruhen also nicht auf einer generellen Fehlsortierung von Rab7 (Huynh et al., 2007).

Huynh et al. fiel außerdem auf, dass Rab7-positive Organellen in LAMP-1/LAMP-2-doppeldefizienten Zellen eine andere Verteilung in der Zelle zeigten, als es in Wildtypzellen zu beobachten war. In Wildtypzellen befanden sich die Endosomen und Lysosomen in der perinukleären Region, wohingegen sie in den LAMP-1/LAMP-2-doppeldefizienten Zellen diffus im Zytoplasma verteilt waren. Huynh et al. schlugen vor, dass diese eher periphere Verteilung durch eine defekte Dyneinfunktion in den LAMP-1/LAMP-2-doppeldefizienten MEFs verursacht worden sein könnte. Die Phagosomenmobilität war in diesen Zellen ebenso wie die Lysosomenmobilität stark beeinträchtigt, was zusammen die gestörte Reifung der Phagosomen begründen könnte (Huynh et al., 2007). Binker et al. stellten eine inhibierte

phagosomale Reifung in LAMP-1/LAMP-2-doppeldefizienten Fibroblasten fest, die eine gestörte Abtötung von *Neisseria gonorrhoeae* zur Folge hatte (Binker et al., 2007).

Aus den gesammelten Erkenntnissen entwickelten Huynh et al. ein Phagozytosemodell, nach dem späte Phagosomen vor der Rekrutierung von Rab7 zunächst LAMP-1 und LAMP-2 erhalten, die die Anlagerung von Phagosomen an Mikrotubuli und die Bewegung ins Zellinnere über eine Interaktion mit Dynein/Dynactin, die direkt oder über unbekannte Adapterproteine stattfinden könnte, fördern. LAMP-1 und LAMP-2 vermitteln nach dieser Modellvorstellung des weiteren die Fusion mit herkömmlichen Rab7-positiven späten Endosomen. Schließlich entsteht das Phagolysosom, welches die Fähigkeit zur Abtötung der aufgenommenen Pathogene besitzt (Huynh et al., 2007).

In der vorliegenden Studie konnte eine gestörte Rekrutierung von LAMP-1 und Cathepsin D in LAMP-2-defizienten Neutrophilen festgestellt werden. Auch die Azidifizierung der Phagosomen war in diesen Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen inhibiert. Die von Huynh und Kollegen untersuchten LAMP-2-defizienten Fibroblasten und Makrophagen zeigten diese Störungen nicht (Huynh et al., 2007). Da es sich bei neutrophilen Granulozyten um hochspezialisierte Zellen handelt (Zychlinsky et al., 2003), ist es denkbar, dass sich eine LAMP-2-Defizienz in diesen Zellen stärker äußert als in den anderen untersuchten LAMP-2-defizienten Zellarten. So zeigt sich eine Akkumulation von autophagozytotischen Vakuolen zwar in LAMP-2-defizienten Neutrophilen, nicht aber in Fibroblasten und Makrophagen mit einer LAMP-2-Defizienz (Tanaka et al., 2000).

Die Durchführung vergleichbarer Untersuchungen wie sie von Huynh et al. beschrieben wurden, stellte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Neutrophilen aus mehreren Gründen als schwierig heraus. So können Neutrophile nicht für längere Zeit kultiviert werden (Savill et al., 1989) und müssen für funktionelle Untersuchungen bei jedem Versuch neu isoliert werden. Neutrophile sind ausdifferenzierte Zellen, weshalb es keine Zelllinien gibt, die glaubhafte Studien *in vitro* ermöglichen (Zychlinsky et al., 2003). Weiterhin lassen sich Neutrophile nur schwer transfizieren (Zychlinsky et al., 2003), was eine *Live Cell Imaging*-Untersuchung mit fluoreszenzmarkierten Proteinen im Rahmen der vorliegenden Arbeit bisher nicht ermöglichte. Johnson et al. konnten humane Neutrophile durch Nukleofektion transfizieren und anschließend die Funktionalität dieser Zellen beweisen (Johnson et al., 2006). Es ist denkbar, dass auch murine Neutrophile durch Nukleofektion transfiziert werden können und so eine *Live Cell Imaging*-Analyse dieser Zellen möglich wäre. Vorversuche mit GFP-Kontrollplasmiden zeigten bereits eine hohe Anzahl transfizierter

Zellen. Versuche mit z.B. Rab7-GFP sowie die Kontrolle der Funktionalität der transfizierten Zellen stehen allerdings noch aus.

Huynh et al. untersuchten außerdem die Verteilung und Mobilität von Lysosomen und Phagosomen in Wildtypzellen und LAMP-1/LAMP-2-doppeldefizienten Zellen durch Abstandsmessungen zwischen markierten Vesikeln und dem Nukleus (Huynh et al., 2007). Eine derartige Untersuchung ist mit Neutrophilen wegen der geringen Größe dieser Zellen und der segmentierten Form des Zellkerns nur schwer durchzuführen. Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Ausbildung von Mikrotubuli in LAMP-2-defizienten Neutrophilen und Neutrophilen aus Wildtypmäusen ergab keine offensichtlichen Unterschiede. Weiterführende Analysen sind erforderlich, um mögliche Wechselwirkungen zwischen LAMP-2 und dem Zytoskelett genauer zu definieren.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die gestörte Abtötungskapazität in Neutrophilen LAMP-2-defizienter Mäuse nicht auf einer Störung in sauerstoffabhängigen Abtötungsmechanismen beruht, sondern in einer Beeinträchtigung der sauerstoffunabhängigen Abtötungsmechanismen begründet liegt (Abb. 41), die sich in einer gestörten phagosomalen Reifung mit verminderter LAMP-1- und Cathepsin D-Rekrutierung und geringerer Azidifizierung darstellte. Eine verlangsamte oder gestörte Abwehr von Pathogenen durch Neutrophile macht LAMP-2-defiziente Mäuse anfälliger für Infektionskrankheiten wie die Parodontitis.

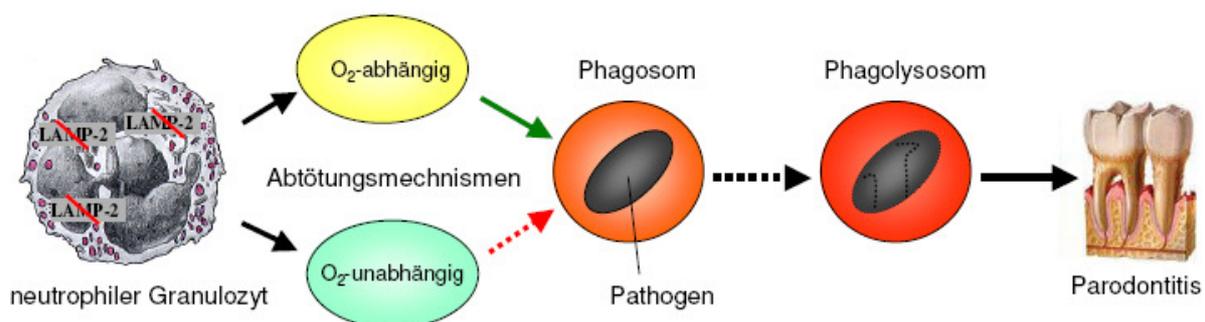


Abb. 41: Eine gestörte phagosomale Reifung in LAMP-2-defizienten Neutrophilen erhöht die Anfälligkeit für Parodontitis bei Mäusen. Neutrophile Granulozyten können phagozytierte Pathogene durch sauerstoffabhängige und sauerstoffunabhängige Mechanismen abtöten. In LAMP-2-defizienten Granulozyten konnte keine Beeinträchtigungen in sauerstoffabhängigen Abtötungsmechanismen festgestellt werden (grüner Pfeil). Behinderungen in sauerstoffunabhängigen Abtötungsmechanismen (roter, gestrichelter Pfeil) äußerten sich in einer verzögerten Reifung der Phagosomen (schwarzer gestrichelter Pfeil), was eine geringe

Abtötungskapazität der Neutrophilen gegenüber Pathogenen zur Folge hatte und sich in einer erhöhten Anfälligkeit für Parodontitis bei diesen Mäusen äußerte.

Es ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, dass bei Patienten, die an der Danon-Krankheit leiden, welche auf einen Defekt im *LAMP-2*-Gen zurückzuführen ist, bisher keine Anzeichen von Parodontitis beobachtet wurden. Dieses könnte in den bereits oben erwähnten Unterschieden zwischen humanen und murinen Neutrophilen begründet liegen.

Eine Möglichkeit, die in der vorliegenden Studie beschriebene gestörte phagosomale Reifung genauer zu analysieren und die Aufgabe von LAMP-2 in diesem Prozess zu klären, könnte die Isolation von Latexkügelchen-Phagosomen aus Kontrollneutrophilen und LAMP-2-defizienten Neutrophilen und anschließender Westernblotanalyse darstellen.

Außerdem könnte die Identifizierung möglicher Bindungspartner von LAMP-2 weitere Aufschlüsse über dessen Rolle bei der phagosomalen Reifung liefern.

5.3 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zur Rolle von LAMP-2 bei der phagosomalen Reifung sollen durch weitere Analysen ergänzt werden. So könnte nach Etablierung der Nukleofektion von murinen Neutrophilen die phagosomale Reifung in lebenden Neutrophilen durch *Live Cell Imaging* verfolgt werden. Durch Isolation von Phagosomen und anschließender Westernblotanalyse könnten zudem verschiedene endosomale (Rab7, RILP) und lysosomale Marker (LAMP-1, LAMP-2, LAMP-2) in der phagosomalen Membran nachgewiesen und vergleichende Analysen zwischen Phagosomen aus Wildtypneutrophilen und LAMP-2-defizienten Neutrophilen angestellt werden.

Die Ergebnisse von Huynh et al. und Binker et al. deuten auf eine Funktion von LAMP-2 beim dyneinvermittelten Transport von Phagosomen entlang von Mikrotubuli hin (Huynh et al., 2007; Binker et al., 2007). Durch mikroskopische Untersuchungen mit zytoskelettspezifischen Markern, auch nach Behandlung der Zellen mit spezifischen Inhibitoren der Zytoskelettbildung, soll die Rolle von LAMP-2 beim Transport entlang von Mikrotubuli oder Aktinfilamenten in Neutrophilen aus Wildtypmäusen und LAMP-2-defizienten Mäusen charakterisiert werden.

Viele intrazelluläre Pathogene sind in der Lage, die phagosomale Abtötung zu umgehen (Scott et al., 2003; Urban et al., 2006). Untersuchungen der Phagozytose von verschiedenen intrazellulären Pathogenen in Neutrophilen oder Makrophagen aus Wildtypmäusen und LAMP-2-defizienten Mäusen könnten weitere Aufschlüsse über die Funktion von LAMP-2 bei der phagosomalen Reifung liefern.

Schließlich können die in dieser Arbeit etablierten Methoden für Untersuchungen des Phagozytoseprozesses in Zellen mit einer Defizienz in anderen endosomalen/lysosomalen Proteinen angewendet werden.

6. Zusammenfassung

Als Endpunkt der Endozytose spielt das Lysosom in der eukaryotischen Zelle eine wichtige Rolle bei verschiedenen Abbau- und Transportprozessen. Störungen in lysosomalen Funktionen führen unter anderem zu Anreicherungen von nicht abgebauten Substanzen, die die Ursache von einer Vielzahl von Krankheiten sein können. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei spezielle Fehlfunktionen in endolysosomalen Kompartimenten genauer betrachtet.

6.1. Cholesterinakkumulation im Lysosom durch Fehlsortierung von NPC2 in MPR-defizienten Fibroblasten

Die autosomal vererbte Erkrankung Niemann-Pick Typ C (NPC) gehört zu den endolysosomalen Speicherkrankheiten. Sie ist charakterisiert durch eine starke Anreicherung von freiem Cholesterin und anderen Lipiden in späten Endosomen und in Lysosomen vieler Gewebe. Als Ursache für diese Krankheit wurden Mutationen in den Genen *NPC1* und *NPC2* beschrieben.

In dieser Arbeit wurde der Transport und die Funktion des löslichen lysosomalen cholesterinbindenden Proteins NPC2 in Mausfibroblasten untersucht, die eine Defizienz in den Mannose-6-Phosphatrezeptoren MPR46, MPR300 oder in beiden MPRs aufwiesen. Durch Reexpressionsversuche in MPR-doppeldefizienten Fibroblasten, konnte gezeigt werden, dass einer der beiden Rezeptoren ausreichte, um NPC2 zum endolysosomalen Kompartiment zu transportieren, wobei MPR300 eine höhere Effizienz zeigte als MPR46. In Abwesenheit beider MPRs wurde NPC2 ins Medium sekretiert und nur eine geringe Menge konnte intrazellulär, hauptsächlich im ER, detektiert werden. Außerdem ergab sich für die verschiedenen Zelllinien ein unterschiedliches Glykosierungsmuster. Dabei schien MPR300 vor allem bei der Glykosylierung mit komplexen Zuckerketten eine Rolle zu spielen. Die Fehlsortierung von NPC2 führte zu einer massiven Anreicherung von freiem Cholesterin in späten Endosomen und Lysosomen von MPR-doppeldefizienten Fibroblasten, wie sie auch für Fibroblasten von NPC-Patienten typisch ist. Die Cholesterinakkumulation sowie die NPC2-Sortierung konnte in den MPR-defizienten Fibroblasten durch Expression von MPR46 oder MPR300 auf ein normales Niveau gebracht werden.

Insgesamt ergaben die gefundenen Daten, dass der Transport von NPC2 strikt von Mannose-6-Phosphatrezeptoren abhängt und somit dem Transport anderer löslicher lysosomaler Proteine sehr ähnlich ist. Es ist daher denkbar, dass die NPC2-Erkrankung durch eine ähnliche

Substitutionstherapie behandelt werden könnte, wie sie bei anderen lysosomalen Speicherkrankheiten zum Einsatz kommt.

6.2. Inhibierte phagosomale Reifung bei LAMP-2-defizienten Neutrophilen

Ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind zirkulierende neutrophile Granulozyten. Diese Phagozyten sind in der Lage, Pathogene aufzunehmen. Durch Fusion von zytoplasmatischen Granula mit der phagozytotischen Vakuole werden Bedingungen geschaffen, die eine Abtötung der Pathogene ermöglichen.

Es wurde bereits im Vorfeld die Beobachtung gemacht, dass eine LAMP-2-Defizienz zu einer Fehlsortierung von lysosomalen Enzymen führte und in einem gestörten lysosomalen Abbau resultierte. Eine große Ähnlichkeit zum Endozytoseweg zeigt die Reifung von Phagosomen, die in professionellen Phagozyten (Makrophagen und Neutrophile) die Abtötung von Pathogenen ermöglicht. Ein fehlerhafter Ablauf der Phagozytose kann einen ungenügenden Abbau von Krankheitserregern zur Folge haben und so die Entstehung von bakteriellen Plaques und Entzündungen begünstigen.

Bei LAMP-2-defizienten Mäusen konnten wir eine aggressive Parodontitis und Plaquebildung beobachten, die sich bereits im frühen Lebensalter manifestierten. In dieser Arbeit sollte dieser Befund näher untersucht und möglichen Ursachen nachgegangen werden. Untersuchungen des parodontalen Gewebes LAMP-2-defizienter Tiere zeigten eine starke Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und ließen eine nicht effiziente Abtötung von Bakterien vermuten. In Versuchen mit peritonealen Neutrophilen konnte eine geringere Abtötungskapazität gegenüber Bakterien bei den LAMP-2-defizienten Granulozyten bestätigt werden. Zur effizienten Abtötung von Pathogenen verfügen neutrophile Granulozyten über sauerstoffabhängige und sauerstoffunabhängige Abtötungsmechanismen. Bestimmungen der Menge an produzierten reaktiven Sauerstoffspezies, ergaben keine gravierenden Unterschiede zwischen Kontrollzellen und Neutrophilen aus LAMP-2-defizienten Mäusen. Durch mikroskopische Analyse wurde eine starke Akkumulation von autophagozytotischen Vakuolen in den LAMP-2-defizienten Neutrophilen gefunden. Bei einer Aufnahme von opsonierten Latexkügelchen konnte eine gestörte Azidifizierung und eine verminderte Rekrutierung von spätendosomalen/lysosomalen Markerproteinen festgestellt werden. Diese Störungen in der phagosomalen Reifung könnte die Ursache für die verminderte antimikrobielle Aktivität LAMP-2-defizienter neutrophiler Granulozyten sein, welche die Anfälligkeit für eine Parodontitis erhöht.

7. Summary

The lysosome, the terminal compartment of the endocytic route, plays an important role in the degradation of macromolecules and in the regulation of transport processes in the eukaryotic cell. Impairment of lysosomal functions often causes the accumulation of non-degraded material inside these vesicles leading to a number of different lysosomal storage diseases. In the present study two new aspects of impaired functions of late endosomes/lysosomes are described and analysed in detail.

7.1. Niemann-Pick Type C- Protein 2 (NPC2) missorting in Mannose 6-phosphate receptor deficient fibroblasts leads to an accumulation of cholesterol

Patients suffering from the autosomally inherited lipid storage disease Niemann-Pick Type C (NPC) show a strong late endosomal/lysosomal accumulation of free cholesterol and other lipids in many tissues. This disease belongs to the lysosomal storage diseases. It is caused by mutations in the genes *NPC1* and *NPC2*, respectively.

In this project, the transport and the function of the soluble lysosomal NPC2 protein, which efficiently binds cholesterol, is analysed in embryonic mouse fibroblasts with deficiencies for the mannose 6-phosphate receptors MPR46, MPR300 or MPR46 and MPR300. Experiments with re-expression of these receptors demonstrated that one receptor is sufficient to drive NPC2 into the lysosomal compartment. It appeared that MPR300 sorted NPC2 to the lysosome with a higher efficiency as compared to MPR46. If both receptors are missing NPC2 was secreted into the medium and only minor intracellular amounts, which were localised to the ER could be observed. An additional finding was the differential glycosylation pattern of NPC2 depending on the presence or absence of MPR receptors. MPR300 appeared to be of major importance for the NPC2 glycosylation with complex carbohydrates. Similar to the observations in cells derived from NPC-patients missorting of NPC2 in MPR double deficient fibroblasts led to a huge increase of free cholesterol in late endosomes and lysosomes. Transfection of MPR46 or MPR300 expression vectors could rescue the cholesterol accumulation phenotype.

In conclusion, we observed that similar to other lysosomal proteins the transport of NPC2 is strictly dependent on mannose 6-phosphate receptors. It is therefore conceivable that NPC patients with a mutated NPC2 may be treated with an enzyme replacement like therapy,

which was shown to be the most effective therapy for a number of other lysosomal storage disorders.

7.2. Impaired phagosomal maturation in LAMP-2-deficient neutrophils

Circulating neutrophils (PMNs) are an essential component of the innate immune system. These phagocytes are able to take up pathogens. Formation of phagolysosomes by fusion of the phagocytic vacuole with endocytic vesicles, lysosomes and distinct granules generates suitable conditions for an efficient bacterial killing.

It was reported earlier that a deficiency of one of the major lysosomal membrane proteins, LAMP-2 leads to a missorting of lysosomal enzymes which results in impaired lysosomal degradation. The endocytic pathway was shown to be very similar to the phagosomal maturation process which is used mainly by professional phagocytes (macrophages and neutrophils) to kill internalised pathogens. A defective phagocytosis can lead to an insufficient degradation of pathogens which may increase the susceptibility for inflammation.

LAMP-2-deficient mice developed an aggressive periodontitis with massive plaque accumulation early in life. In the present study the periodontitis phenotype was examined in detail and possible causes for the increased susceptibility of LAMP-2-deficient mice to develop this disease were addressed.

Examination of the periodontal tissues of LAMP-2-deficient animals showed a massive infiltration of neutrophils, which were apparently unable to efficiently clear bacterial pathogens. This impression was confirmed by demonstrating an impaired killing capacity of isolated peritoneal neutrophils incubated with bacteria. For efficient degradation of pathogens neutrophils use oxygen dependent and oxygen independent killing mechanisms. Determinations of the level of reactive oxygen species revealed no significant differences between LAMP-2-deficient neutrophils and wildtype cells. However, microscopical investigations showed a strong accumulation of autophagic vacuoles in LAMP-2-deficient neutrophils. Further, latex beads feeding experiments revealed a reduced ability of the phagosomes to acquire an acidic pH and to recruit late endocytic markers, suggesting that an impaired fusion of late endosomes/lysosomes with developing phagosomes may be the cause for impaired killing of the phagocytosed bacteria. This is the likely cause for the increased susceptibility of LAMP-2-deficient mice for periodontal disease.

Literaturverzeichnis

- Adra, C. N., Zhu, S., Ko, J. L., Guillemot, J. C., Cuervo, A. M., Kobayashi, H., Horiuchi, T., Lelias, J. M., Rowley, J. D., and Lim, B. (1996). LAPTM5: a novel lysosomal-associated multispinning membrane protein preferentially expressed in hematopoietic cells. *Genomics* 35, 328-337.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., und Walter, P. (2004). *Molekularbiologie der Zelle*. 4. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Anderson, R. G. and Orci, L. (1988). A view of acidic intracellular compartments. *J. Cell Biol.* 106, 539-543.
- Andrejewski, N., Punnonen, E. L., Guhde, G., Tanaka, Y., Lullmann-Rauch, R., Hartmann, D., von Figura, K., and Saftig, P. (1999). Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 274, 12692-12701.
- Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G., and Gruenberg, J. (1993). Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J. Cell Biol.* 123, 1373-1387.
- Arstila, A. U. and Trump, B. F. (1968). Studies on cellular autophagocytosis. The formation of autophagic vacuoles in the liver after glucagon administration. *Am. J. Pathol.* 53, 687-733.
- Babior, B. M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood* 93, 1464-1476.
- Baer, P. N. and Bernick, S. (1957). Age changes in the periodontium of the mouse. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 10, 430-436.
- Baer, P. N. and Liebermann, J. E. (1959). Observation of some genetic characteristics of the periodontium in three strains of inbred mice. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 12, 820-829.
- Baer, P. N. and Liebermann, J. E. (1960). Periodontal disease in six strains of inbred mice. *J. Dent. Res.* 39, 215-225.
- Bainton, D. F. (1999). Distinct granule populations in human neutrophils and lysosomal organelles identified by immuno-electron microscopy. *J. Immunol. Methods* 232, 153-168.
- Baron, E. J. and Proctor, R. A. (1982). Elicitation of peritoneal polymorphonuclear neutrophils from mice. *J. Immunol. Methods* 49, 305-313.
- Basu, S., Dunn, A., and Ward, A. (2002). G-CSF: function and modes of action (Review). *Int. J. Mol. Med.* 10, 3-10.
- Berger, A. C., Vanderford, T. H., Gernert, K. M., Nichols, J. W., Faundez, V., and Corbett, A. H. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* Npc2p is a functionally conserved homologue of the human Niemann-Pick disease type C 2 protein, hNPC2. *Eukaryot. Cell* 4, 1851-1862.

- Bijvoet, A. G., Van Hirtum, H., Kroos, M. A., Van de Kamp, E. H., Schoneveld, O., Visser, P., Brakenhoff, J. P., Weggeman, M., van Corven, E. J., Van Der Ploeg, A. T., and Reuser, A. J. (1999). Human acid alpha-glucosidase from rabbit milk has therapeutic effect in mice with glycogen storage disease type II. *Hum. Mol. Genet.* 8, 2145-2153.
- Binker, M. G., Cosen-Binker, L. I., Terebiznik, M. R., Mallo, G. V., McGraw, S. E., Eskelinen, E. L., Willenborg, M., Brumell, J. H., Saftig, P., Grinstein, S., and Gray-Owen, S (2007). Arrested maturation of *Neisseria*-containing phagosomes in the absence of the lysosome-associated membrane proteins, LAMP-1 and LAMP-2. *under submission Cellular Microbiology*.
- Bleistein, J., Heidrich, H. G., and Debuch, H. (1980). The phospholipids of liver lysosomes from untreated rats. *Hoppe Seylers. Z. Physiol Chem.* 361, 595-597.
- Blom, T. S., Linder, M. D., Snow, K., Pihko, H., Hess, M. W., Jokitalo, E., Veckman, V., Syvanen, A. C., and Ikonen, E. (2003). Defective endocytic trafficking of NPC1 and NPC2 underlying infantile Niemann-Pick type C disease. *Hum. Mol. Genet.* 12, 257-272.
- Bock, J. B., Klumperman, J., Davanger, S., and Scheller, R. H. (1997). Syntaxin 6 functions in trans-Golgi network vesicle trafficking. *Mol. Biol. Cell* 8, 1261-1271.
- Bogue, M. A., Grubb, S. C., Maddatu, T. P., and Bult, C. J. (2007). Mouse Phenome Database (MPD). *Nucleic Acids Res.* 35, D643-D649.
- Borregaard, N. and Cowland, J. B. (1997). Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89, 3503-3521.
- Boxio, R., Bossenmeyer-Pourie, C., Steinckwich, N., Dournon, C., and Nusse, O. (2004). Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 75, 604-611.
- Bresciani, R., Denzer, K., Pohlmann, R., and von Figura, K. (1997). The 46 kDa mannose-6-phosphate receptor contains a signal for basolateral sorting within the 19 juxtamembrane cytosolic residues. *Biochem. J.* 327 (Pt 3), 811-818.
- Breuer, P., Korner, C., Boker, C., Herzog, A., Pohlmann, R., and Braulke, T. (1997). Serine phosphorylation site of the 46-kDa mannose 6-phosphate receptor is required for transport to the plasma membrane in Madin-Darby canine kidney and mouse fibroblast cells. *Mol. Biol. Cell* 8, 567-576.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34-47.
- Brown, W. J. and Farquhar, M. G. (1984). Accumulation of coated vesicles bearing mannose 6-phosphate receptors for lysosomal enzymes in the Golgi region of I-cell fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 81, 5135-5139.
- Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J., and van Deurs, B. (2000). Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol. Biol. Cell* 11, 467-480.
- Burkhardt, J. K., Echeverri, C. J., Nilsson, T., and Vallee, R. B. (1997). Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J. Cell Biol.* 139, 469-484.

- Campbell, C. H., Fine, R. E., Squicciarini, J., and Rome, L. H. (1983). Coated vesicles from rat liver and calf brain contain cryptic mannose 6-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* 258, 2628-2633.
- Chan, L. (1992). Apolipoprotein B, the major protein component of triglyceride-rich and low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 267, 25621-25624.
- Chiang, H. L., Terlecky, S. R., Plant, C. P., and Dice, J. F. (1989). A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 246, 382-385.
- Chikh, K., Vey, S., Simonot, C., Vanier, M. T., and Millat, G. (2004). Niemann-Pick type C disease: importance of N-glycosylation sites for function and cellular location of the NPC2 protein. *Mol. Genet. Metab* 83, 220-230.
- Cieutat, A. M., Lobel, P., August, J. T., Kjeldsen, L., Sengelov, H., Borregaard, N., and Bainton, D. F. (1998). Azurophilic granules of human neutrophilic leukocytes are deficient in lysosome-associated membrane proteins but retain the mannose 6-phosphate recognition marker. *Blood* 91, 1044-1058.
- Claussen, M., Buergisser, D., Schuller, A. G., Matzner, U., and Bräulke, T. (1995). Regulation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-6 and mannose 6-phosphate/IGF-II receptor expression in IGF-IL-overexpressing NIH 3T3 cells. *Mol. Endocrinol.* 9, 902-912.
- Cowland, J. B. and Borregaard, N. (1999). Isolation of neutrophil precursors from bone marrow for biochemical and transcriptional analysis. *J. Immunol. Methods* 232, 191-200.
- Cuervo, A. M. and Dice, J. F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273, 501-503.
- Cuervo, A. M. and Dice, J. F. (1998). Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J. Mol. Med.* 76, 6-12.
- Cuervo, A. M. and Dice, J. F. (2000a). Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic.* 1, 570-583.
- Cuervo, A. M. and Dice, J. F. (2000b). Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. *J. Cell Sci.* 113 Pt 24, 4441-4450.
- Dahlgren, C., Carlsson, S. R., Karlsson, A., Lundqvist, H., and Sjölin, C. (1995). The lysosomal membrane glycoproteins Lamp-1 and Lamp-2 are present in mobilizable organelles, but are absent from the azurophil granules of human neutrophils. *Biochem. J.* 311 (Pt 2), 667-674.
- Dahlgren, C. and Karlsson, A. (1999). Respiratory burst in human neutrophils. *J. Immunol. Methods* 232, 3-14.
- Dahms, N. M. and Kornfeld, S. (1989). The cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Structural requirements for mannose 6-phosphate binding and oligomerization. *J. Biol. Chem.* 264, 11458-11467.
- Dallegri, F. and Ottonello, L. (1997). Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm. Res.* 46, 382-391.

- Danon, M. J., Oh, S. J., DiMauro, S., Manaligod, J. R., Eastwood, A., Naidu, S., and Schliselfeld, L. H. (1981). Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase. *Neurology* 31, 51-57.
- Davies, J. P., Chen, F. W., and Ioannou, Y. A. (2000). Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein. *Science* 290, 2295-2298.
- de Duve, C. Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles. 128-159. 1959. *Subcellular Particles*, Hayashi, T., ed., Ronald Press.
- de Duve, C. (1983). Lysosomes revisited. *Eur. J. Biochem.* 137, 391-397.
- DeChiara, T. M., Efstratiadis, A., and Robertson, E. J. (1990). A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 345, 78-80.
- Delbruck, R., Desel, C., von Figura, K., and Hille-Rehfeld, A. (1994). Proteolytic processing of cathepsin D in prelysosomal organelles. *Eur. J. Cell Biol.* 64, 7-14.
- Delcourt-Debruyne, E. M., Boutigny, H. R., and Hildebrand, H. F. (2000). Features of severe periodontal disease in a teenager with Chediak-Higashi syndrome. *J. Periodontol.* 71, 816-824.
- Dell'angelica, E. C., Mullins, C., Caplan, S., and Bonifacino, J. S. (2000). Lysosome-related organelles. *FASEB J.* 14, 1265-1278.
- Desjardins, M. (2003). ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 280-291.
- Desjardins, M., Nzala, N. N., Corsini, R., and Rondeau, C. (1997). Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 18), 2303-2314.
- Dice, J. F. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 15, 305-309.
- Ding, M., Robinson, J. M., Behrens, B. C., and Vandre, D. D. (1995). The microtubule cytoskeleton in human phagocytic leukocytes is a highly dynamic structure. *Eur. J. Cell Biol.* 66, 234-245.
- Dittmer, F., Hafner, A., Ulbrich, E. J., Moritz, J. D., Schmidt, P., Schmahl, W., Pohlmann, R., and Figura, K. V. (1998). I-cell disease-like phenotype in mice deficient in mannose 6-phosphate receptors. *Transgenic Res.* 7, 473-483.
- Dittmer, F., Ulbrich, E. J., Hafner, A., Schmahl, W., Meister, T., Pohlmann, R., and von Figura, K. (1999). Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient mice are cell type-specific. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 10), 1591-1597.
- Downey, G. P., Botelho, R. J., Butler, J. R., Molyaner, Y., Chien, P., Schreiber, A. D., and Grinstein, S. (1999). Phagosomal maturation, acidification, and inhibition of bacterial growth in nonphagocytic cells transfected with Fc γ RIIA receptors. *J. Biol. Chem.* 274, 28436-28444.

- Duncan, J. R. and Kornfeld, S. (1988). Intracellular movement of two mannose 6-phosphate receptors: return to the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 106, 617-628.
- Dunn, W. A., Jr. (1990). Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* 110, 1935-1945.
- Dunn, W. A., Jr. (1994). Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.* 4, 139-143.
- Elzouki, A. N., Segelmark, M., Wieslander, J., and Eriksson, S. (1994). Strong link between the alpha 1-antitrypsin PiZ allele and Wegener's granulomatosis. *J. Intern. Med.* 236, 543-548.
- Escola, J. M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O., and Geuze, H. J. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 20121-20127.
- Eskelinen, E. L. (2005). Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy.* 1, 1-10.
- Eskelinen, E. L., Illert, A. L., Tanaka, Y., Schwarzmann, G., Blanz, J., von Figura, K., and Saftig, P. (2002). Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol. Biol. Cell* 13, 3355-3368.
- Eskelinen, E. L., Schmidt, C. K., Neu, S., Willenborg, M., Fuertes, G., Salvador, N., Tanaka, Y., Lullmann-Rauch, R., Hartmann, D., Heeren, J., von Figura, K., Knecht, E., and Saftig, P. (2004). Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* 15, 3132-3145.
- Eskelinen, E. L., Tanaka, Y., and Saftig, P. (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* 13, 137-145.
- Fass, E., Shvets, E., Degani, I., Hirschberg, K., and Elazar, Z. (2006). Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes. *J. Biol. Chem.* 281, 36303-36316.
- Faurschou, M. and Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes. Infect.* 5, 1317-1327.
- Filson, A. J., Louvi, A., Efstratiadis, A., and Robertson, E. J. (1993). Rescue of the T-associated maternal effect in mice carrying null mutations in *Igf-2* and *Igf2r*, two reciprocally imprinted genes. *Development* 118, 731-736.
- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Forgac, M. (2000). Structure, mechanism and regulation of the clathrin-coated vesicle and yeast vacuolar H(+)-ATPases. *J. Exp. Biol.* 203, 71-80.
- Foutz, B. H. (2004). Periodontal Therapy & Maintenance.
http://www.drffoutz.com/periodontal_therapy.html

- Friedland, N., Liou, H. L., Lobel, P., and Stock, A. M. (2003). Structure of a cholesterol-binding protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 2512-2517.
- Fukuda, M. (1991). Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* 266, 21327-21330.
- Funato, K., Beron, W., Yang, C. Z., Mukhopadhyay, A., and Stahl, P. D. (1997). Reconstitution of phagosome-lysosome fusion in streptolysin O-permeabilized cells. *J. Biol. Chem.* 272, 16147-16151.
- Furuno, K., Ishikawa, T., Akasaki, K., Yano, S., Tanaka, Y., Yamaguchi, Y., Tsuji, H., Himeno, M., and Kato, K. (1989). Morphological localization of a major lysosomal membrane glycoprotein in the endocytic membrane system. *J. Biochem. (Tokyo)* 106, 708-716.
- Gagnon, E., Bergeron, J. J., and Desjardins, M. (2005). ER-mediated phagocytosis: myth or reality? *J. Leukoc. Biol.* 77, 843-845.
- Gallin, J. I. (1984). Neutrophil specific granules: a fuse that ignites the inflammatory response. *Clin. Res.* 32, 320-328.
- Gao, J. L., Lee, E. J., and Murphy, P. M. (1999). Impaired antibacterial host defense in mice lacking the N-formylpeptide receptor. *J. Exp. Med.* 189, 657-662.
- Garver, W. S. and Heidenreich, R. A. (2002). The Niemann-Pick C proteins and trafficking of cholesterol through the late endosomal/lysosomal system. *Curr. Mol. Med.* 2, 485-505.
- Gemsa, D. *Immunologie: Grundlagen - Klinik - Praxis.* (1997). Stuttgart: Thieme.
- Ghosh, P., Dahms, N. M., and Kornfeld, S. (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 202-212.
- Gieselmann, V., Pohlmann, R., Hasilik, A., and von Figura, K. (1983). Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts. *J. Cell Biol.* 97, 1-5.
- Gilbert, A. D. and Sofaer, J. A. (1988). Host genotype, pathogenic challenge and periodontal bone loss in the mouse. *Arch. Oral Biol.* 33, 855-861.
- Gilbert, A. D. and Sofaer, J. A. (1989). Neutrophil function, genotype and periodontal bone loss in the mouse. *J. Periodontal Res.* 24, 412-414.
- Goldstein, J. L., Brunschede, G. Y., and Brown, M. S. (1975). Inhibition of proteolytic degradation of low density lipoprotein in human fibroblasts by chloroquine, concanavalin A, and Triton WR 1339. *J. Biol. Chem.* 250, 7854-7862.
- Gombart, A. F. and Koeffler, H. P. (2002). Neutrophil specific granule deficiency and mutations in the gene encoding transcription factor C/EBP(epsilon). *Curr. Opin. Hematol.* 9, 36-42.
- Gong, Y., Duvvuri, M., Duncan, M. B., Liu, J., and Krise, J. P. (2006). Niemann-pick c1 protein facilitates the efflux of the anticancer drug daunorubicin from cells according to a novel vesicle-mediated pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 242-247.

- Gordon, A. H., Hart, P. D., and Young, M. R. (1980). Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* 286, 79-80.
- Gough, N. R. and Fambrough, D. M. (1997). Different steady state subcellular distributions of the three splice variants of lysosome-associated membrane protein LAMP-2 are determined largely by the COOH-terminal amino acid residue. *J. Cell Biol.* 137, 1161-1169.
- Greulich, R. C. und Ershoff, B. H. (1961). Delayed Effects of Multiple Sublethal Doses of Total Body X-Irradiation on the Periodontium and Teeth of Mice. *J Dent Res.* 40, 1211-1224.
- Griffiths, G. (1989). The structure and function of a mannose 6-phosphate receptor-enriched, pre-lysosomal compartment in animal cells. *J. Cell Sci. Suppl* 11, 139-147.
- Gruenberg, J. and Howell, K. E. (1989). Membrane traffic in endocytosis: insights from cell-free assays. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 453-481.
- Guarnieri, F. G., Arterburn, L. M., Penno, M. B., Cha, Y., and August, J. T. (1993). The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. *J. Biol. Chem.* 268, 1941-1946.
- Hampton, M. B., Kettle, A. J., and Winterbourn, C. C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92, 3007-3017.
- Hansson, H. A., Holmgren, J., and Svennerholm, L. (1977). Ultrastructural localization of cell membrane GM1 ganglioside by cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 3782-3786.
- Hart, P. D. and Young, M. R. (1991). Ammonium chloride, an inhibitor of phagosome-lysosome fusion in macrophages, concurrently induces phagosome-endosome fusion, and opens a novel pathway: studies of a pathogenic mycobacterium and a nonpathogenic yeast. *J. Exp. Med.* 174, 881-889.
- Hartt, J. K., Barish, G., Murphy, P. M., and Gao, J. L. (1999). N-formylpeptides induce two distinct concentration optima for mouse neutrophil chemotaxis by differential interaction with two N-formylpeptide receptor (FPR) subtypes. Molecular characterization of FPR2, a second mouse neutrophil FPR. *J. Exp. Med.* 190, 741-747.
- Hasilik, A. (1992). The early and late processing of lysosomal enzymes: proteolysis and compartmentation. *Experientia* 48, 130-151.
- Hille-Rehfeld, A. (1995). Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1241, 177-194.
- Honing, S. and Hunziker, W. (1995). Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat Igpl20 (lamp-I) in MDCK cells. *J. Cell Biol.* 128, 321-332.
- Hunt, R. (2006). Immunology - Chapter One - Innate (non-specific) Immunity. <http://www.med.sc.edu:85/ghaffar/inate.htm>.
- Hunziker, W., Simmen, T., and Honing, S. (1996). Trafficking of lysosomal membrane proteins in polarized kidney cells. *Nephrologie* 17, 347-350.

- Huynh, K. K., Eskelinen, E. L., Scott, C. C., Malevanets, A., Saftig, P., and Grinstein, S. (2007). LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J.* 26, 313-324.
- Ikonen, E. and Holtta-Vuori, M. (2004). Cellular pathology of Niemann-Pick type C disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 445-454.
- Ioannou, Y. A., Zeidner, K. M., Gordon, R. E., and Desnick, R. J. (2001). Fabry disease: preclinical studies demonstrate the effectiveness of alpha-galactosidase A replacement in enzyme-deficient mice. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 14-25.
- Itin, C., Rancano, C., Nakajima, Y., and Pfeffer, S. R. (1997). A novel assay reveals a role for soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein in mannose 6-phosphate receptor transport from endosomes to the trans Golgi network. *J. Biol. Chem.* 272, 27737-27744.
- Itou, T., Collins, L. V., Thoren, F. B., Dahlgren, C., and Karlsson, A. (2006). Changes in activation states of murine polymorphonuclear leukocytes (PMN) during inflammation: a comparison of bone marrow and peritoneal exudate PMN. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 575-583.
- Jaconi, M. E., Lew, D. P., Carpentier, J. L., Magnusson, K. E., Sjogren, M., and Stendahl, O. (1990). Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosome-lysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils. *J. Cell Biol.* 110, 1555-1564.
- Jadot, M., Wattiaux, R., Mainferme, F., Dubois, F., Claessens, A., and Wattiaux-De Coninck, S. (1996). Soluble form of Lamp II in purified rat liver lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223, 353-359.
- Janeway, C. A., Travers, P., und Walport, M. (2002). *Immunologie*. Auflage: 5. Spektrum Akademischer Verlag.
- Johnson, J. L., Ellis, B. A., Munafo, D. B., Brzezinska, A. A., and Catz, S. D. (2006). Gene transfer and expression in human neutrophils. The phox homology domain of p47phox translocates to the plasma membrane but not to the membrane of mature phagosomes. *BMC. Immunol.* 7, 28.
- Joiner, K. A., Ganz, T., Albert, J., and Rotrosen, D. (1989). The opsonizing ligand on *Salmonella typhimurium* influences incorporation of specific, but not azurophil, granule constituents into neutrophil phagosomes. *J. Cell Biol.* 109, 2771-2782.
- Junquerira, L. C., Carneiro, J., und Kelly, R. O. (2002). 5. Auflage. *Histologie*. Springer Verlag Berlin.
- Kabaya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720-5728.
- Kakkis, E. D., Muenzer, J., Tiller, G. E., Waber, L., Belmont, J., Passage, M., Izykowski, B., Phillips, J., Doroshov, R., Walot, I., Hoft, R., and Neufeld, E. F. (2001). Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *N. Engl. J. Med.* 344, 182-188.

- Karlsson, K. and Carlsson, S. R. (1998). Sorting of lysosomal membrane glycoproteins lamp-1 and lamp-2 into vesicles distinct from mannose 6-phosphate receptor/gamma-adaptin vesicles at the trans-Golgi network. *J. Biol. Chem.* 273, 18966-18973.
- Kasper, D., Dittmer, F., von Figura, K., and Pohlmann, R. (1996). Neither type of mannose 6-phosphate receptor is sufficient for targeting of lysosomal enzymes along intracellular routes. *J. Cell Biol.* 134, 615-623.
- Kishida, T., Kostetskii, I., Zhang, Z., Martinez, F., Liu, P., Walkley, S. U., Dwyer, N. K., Blanchette-Mackie, E. J., Radice, G. L., and Strauss, J. F., III (2004). Targeted mutation of the MLN64 START domain causes only modest alterations in cellular sterol metabolism. *J. Biol. Chem.* 279, 19276-19285.
- Klebanoff, S. J. (1999). Myeloperoxidase. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 111, 383-389.
- Klionsky, D. J. and Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290, 1717-1721.
- Klumperman, J., Hille, A., Veenendaal, T., Oorschot, V., Stoorvogel, W., von Figura, K., and Geuze, H. J. (1993). Differences in the endosomal distributions of the two mannose 6-phosphate receptors. *J. Cell Biol.* 121, 997-1010.
- Kobayashi, T., Beuchat, M. H., Lindsay, M., Frias, S., Palmiter, R. D., Sakuraba, H., Parton, R. G., and Gruenberg, J. (1999). Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat. Cell Biol.* 1, 113-118.
- Kobayashi, T., Stang, E., Fang, K. S., de Moerloose, P., Parton, R. G., and Gruenberg, J. (1998). A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* 392, 193-197.
- Kochl, R., Hu, X. W., Chan, E. Y., and Tooze, S. A. (2006). Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic*. 7, 129-145.
- Korner, C., Nurnberg, B., Uhde, M., and Braulke, T. (1995). Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor fails to interact with G-proteins. Analysis of mutant cytoplasmic receptor domains. *J. Biol. Chem.* 270, 287-295.
- Kornfeld, S. (1987). Trafficking of lysosomal enzymes. *FASEB J.* 1, 462-468.
- Kornfeld, S. and Mellman, I. (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 483-525.
- Kornfeld, S. and Sly, W. S. (1985). Lysosomal storage defects. *Hosp. Pract. (Off Ed)* 20, 71-82.
- Krause, K. H. (2000). Professional phagocytes: predators and prey of microorganisms. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 130, 97-100.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Lawrence, B. P. and Brown, W. J. (1992). Autophagic vacuoles rapidly fuse with pre-existing lysosomes in cultured hepatocytes. *J. Cell Sci.* 102 (Pt 3), 515-526.
- Lazzarino, D. A. and Gabel, C. A. (1988). Biosynthesis of the mannose 6-phosphate recognition marker in transport-impaired mouse lymphoma cells. Demonstration of a two-step phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 263, 10118-10126.
- Le Borgne, R., Alconada, A., Bauer, U., and Hoflack, B. (1998). The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 273, 29451-29461.
- Lehmann, L. E., Eberle, W., Krull, S., Prill, V., Schmidt, B., Sander, C., von Figura, K., and Peters, C. (1992). The internalization signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase consists of the hexapeptide PGYRHHV. *EMBO J.* 11, 4391-4399.
- Lemansky, P., Hasilik, A., von Figura, K., Helmy, S., Fishman, J., Fine, R. E., Kedersha, N. L., and Rome, L. H. (1987). Lysosomal enzyme precursors in coated vesicles derived from the exocytic and endocytic pathways. *J. Cell Biol.* 104, 1743-1748.
- Liou, W., Geuze, H. J., Geelen, M. J., and Slot, J. W. (1997). The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J. Cell Biol.* 136, 61-70.
- Lippincott-Schwartz, J. and Fambrough, D. M. (1987). Cycling of the integral membrane glycoprotein, LEP100, between plasma membrane and lysosomes: kinetic and morphological analysis. *Cell* 49, 669-677.
- Liscum, L. and Faust, J. R. (1989). The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one. *J. Biol. Chem.* 264, 11796-11806.
- Liscum, L. and Faust, J. R. (1994). Compartmentation of cholesterol within the cell. *Curr. Opin. Lipidol.* 5, 221-226.
- Liscum, L. and Munn, N. J. (1999). Intracellular cholesterol transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1438, 19-37.
- Lloyd, J. B. und Forster, S. (1986). The Lysosome Membrane. *TIBS* 11, 365-368.
- Lobel, P., Dahms, N. M., and Kornfeld, S. (1988). Cloning and sequence analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 263, 2563-2570.
- Lowell, C. A., Fumagalli, L., and Berton, G. (1996). Deficiency of Src family kinases p59/61hck and p58c-fgr results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. *J. Cell Biol.* 133, 895-910.
- Lundqvist-Gustafsson, H., Gustafsson, M., and Dahlgren, C. (2000). Dynamic Ca^{2+} changes in neutrophil phagosomes A source for intracellular Ca^{2+} during phagolysosome formation? *Cell Calcium* 27, 353-362.
- Luzio, J. P., Poupon, V., Lindsay, M. R., Mullock, B. M., Piper, R. C., and Pryor, P. R. (2003). Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes. *Mol. Membr. Biol.* 20, 141-154.

- Ma, Z. M., Grubb, J. H., and Sly, W. S. (1991). Cloning, sequencing, and functional characterization of the murine 46-kDa mannose 6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 266, 10589-10595.
- Matteoni, R. and Kreis, T. E. (1987). Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules. *J. Cell Biol.* 105, 1253-1265.
- Matzner, U. (2005). *Therapy of Lysosomal Storage Diseases*. Lysosomes, P.Saftig (ed), Landes Bioscience/Eurekah.com; Springer Science + Business Media, New York, USA. 112-129.
- McCourt, M., Wang, J. H., Sookhai, S., and Redmond, H. P. (1999). Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. *Arch. Surg.* 134, 1325-1331.
- McNeil, P. L., Tanasugarn, L., Meigs, J. B., and Taylor, D. L. (1983). Acidification of phagosomes is initiated before lysosomal enzyme activity is detected. *J. Cell Biol.* 97, 692-702.
- Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 575-625.
- Mellman, I. and Warren, G. (2000). The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* 100, 99-112.
- Melnicoff, M. J., Horan, P. K., and Morahan, P. S. (1989). Kinetics of changes in peritoneal cell populations following acute inflammation. *Cell Immunol.* 118, 178-191.
- Mills, I. G., Urbe, S., and Clague, M. J. (2001). Relationships between EEA1 binding partners and their role in endosome fusion. *J. Cell Sci.* 114, 1959-1965.
- Miranda, S. R., He, X., Simonaro, C. M., Gatt, S., Dagan, A., Desnick, R. J., and Schuchman, E. H. (2000). Infusion of recombinant human acid sphingomyelinase into niemann-pick disease mice leads to visceral, but not neurological, correction of the pathophysiology. *FASEB J.* 14, 1988-1995.
- Mizushima, N., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* 27, 421-429.
- Moller, W., Nemoto, I., Matsuzaki, T., Hofer, T., and Heyder, J. (2000). Magnetic phagosome motion in J774A.1 macrophages: influence of cytoskeletal drugs. *Biophys. J.* 79, 720-730.
- Mukherjee, S., Ghosh, R. N., and Maxfield, F. R. (1997). Endocytosis. *Physiol Rev.* 77, 759-803.
- Mullins, C. and Bonifacino, J. S. (2001). The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays* 23, 333-343.
- Müller, H. P. (2006). *Parodontologie*. 2. Auflage. Thieme, Stuttgart.
- Mullock, B. M., Bright, N. A., Fearon, C. W., Gray, S. R., and Luzio, J. P. (1998). Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J. Cell Biol.* 140, 591-601.

- Murphy, R. F. (1991). Maturation models for endosome and lysosome biogenesis. *Trends Cell Biol.* 1, 77-82.
- Naureckiene, S., Sleat, D. E., Lackland, H., Fensom, A., Vanier, M. T., Wattiaux, R., Jadot, M., and Lobel, P. (2000). Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science* 290, 2298-2301.
- Neiss, W. F. (1984). A coat of glycoconjugates on the inner surface of the lysosomal membrane in the rat kidney. *Histochemistry* 80, 603-608.
- Neu, S. (2005). Die Rolle der lysosomalen Membranproteine LAMP-1 und LAMP-2 im intrazellulären Cholesterintransport. Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Nishino, I., Fu, J., Tanji, K., Yamada, T., Shimojo, S., Koori, T., Mora, M., Riggs, J. E., Oh, S. J., Koga, Y., Sue, C. M., Yamamoto, A., Murakami, N., Shanske, S., Byrne, E., Bonilla, E., Nonaka, I., DiMauro, S., and Hirano, M. (2000). Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* 406, 906-910.
- Noda, T. and Farquhar, M. G. (1992). A non-autophagic pathway for diversion of ER secretory proteins to lysosomes. *J. Cell Biol.* 119, 85-97.
- Ohgami, N., Ko, D. C., Thomas, M., Scott, M. P., Chang, C. C., and Chang, T. Y. (2004). Binding between the Niemann-Pick C1 protein and a photoactivatable cholesterol analog requires a functional sterol-sensing domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 12473-12478.
- Okamura, N., Kiuchi, S., Tamba, M., Kashima, T., Hiramoto, S., Baba, T., Dacheux, F., Dacheux, J. L., Sugita, Y., and Jin, Y. Z. (1999). A porcine homolog of the major secretory protein of human epididymis, HE1, specifically binds cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* 1438, 377-387.
- Oram, J. D. and Reiter, B. (1968). Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents. *Biochim. Biophys. Acta* 170, 351-365.
- Orci, L., Miller, R. G., Montesano, R., Perrelet, A., Amherdt, M., and Vassalli, P. (1980). Opposite polarity of filipin-induced deformations in the membrane of condensing vacuoles and zymogen granules. *Science* 210, 1019-1021.
- Ory, D. S. (2004). The niemann-pick disease genes; regulators of cellular cholesterol homeostasis. *Trends Cardiovasc. Med.* 14, 66-72.
- Otto, F. (1970). Granulozytenisolierung aus dem Blut des Menschen und der Tiere. *Blut* 21, 290-294.
- Page, R. C. und Schroeder H.E. (1982). Periodontitis in Other Mammalian Animals. *Periodontitis in man and other animals*, Karger. 58-71.
- Peters, C. and von Figura, K. (1994). Biogenesis of lysosomal membranes. *FEBS Lett.* 346, 108-114.
- Pick, E. and Mizel, D. (1981). Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol. Methods* 46, 211-226.

- Pilot, T. and Miyazaki, H. (1994). Global results: 15 years of CPITN epidemiology. *Int. Dent. J.* 44, 553-560.
- Piper, R. C. and Luzio, J. P. (2001). Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies. *Traffic*. 2, 612-621.
- Pitt, A., Mayorga, L. S., Schwartz, A. L., and Stahl, P. D. (1992). Transport of phagosomal components to an endosomal compartment. *J. Biol. Chem.* 267, 126-132.
- Podschun, R., Penner, I., and Ullmann, U. (1992). Interaction of *Klebsiella* capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes. *Microb. Pathog.* 13, 371-379.
- Pohlmann, R., Boeker, M. W., and von Figura, K. (1995). The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 27311-27318.
- Potter, P. K., Cortes-Hernandez, J., Quartier, P., Botto, M., and Walport, M. J. (2003). Lupus-prone mice have an abnormal response to thioglycolate and an impaired clearance of apoptotic cells. *J. Immunol.* 170, 3223-3232.
- Prada-Delgado, A., Carrasco-Marin, E., Bokoch, G. M., and Alvarez-Dominguez, C. (2001). Interferon-gamma listericidal action is mediated by novel Rab5a functions at the phagosomal environment. *J. Biol. Chem.* 276, 19059-19065.
- Pryor, P. R., Mullock, B. M., Bright, N. A., Gray, S. R., and Luzio, J. P. (2000). The role of intraorganellar Ca(2+) in late endosome-lysosome heterotypic fusion and in the reformation of lysosomes from hybrid organelles. *J. Cell Biol.* 149, 1053-1062.
- Reitman, M. L., Varki, A., and Kornfeld, S. (1981). Fibroblasts from patients with I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy are deficient in uridine 5'-diphosphate-N-acetylglucosamine: glycoprotein N-acetylglucosaminylphosphotransferase activity. *J. Clin. Invest* 67, 1574-1579.
- Renlund, M., Tietze, F., and Gahl, W. A. (1986). Defective sialic acid egress from isolated fibroblast lysosomes of patients with Salla disease. *Science* 232, 759-762.
- Roberts, D. L., Weix, D. J., Dahms, N. M., and Kim, J. J. (1998). Molecular basis of lysosomal enzyme recognition: three-dimensional structure of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *Cell* 93, 639-648.
- Roitt, I. M., Brostoff, J., and Male, D. (2006). *Immunology*. 6th edition. Mosby, London.
- Rosenblatt, D. S., Hosack, A., Matiaszuk, N. V., Cooper, B. A., and Laframboise, R. (1985). Defect in vitamin B12 release from lysosomes: newly described inborn error of vitamin B12 metabolism. *Science* 228, 1319-1321.
- Russell, W. C., Newman, C., and Williamson, D. H. (1975). A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature* 253, 461-462.
- Saftig, P. (2005). *Lysosomal Membrane Proteins*. Lysosomes, P. Saftig (ed), Landes Bioscience/Eurekah.com, Springer Science + Business Media, New York, USA. 64-77.

- Saftig, P., Tanaka, Y., Lullmann-Rauch, R., and von Figura, K. (2001). Disease model: LAMP-2 enlightens Danon disease. *Trends Mol. Med.* 7, 37-39.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Savill, J. S., Wyllie, A. H., Henson, J. E., Walport, M. J., Henson, P. M., and Haslett, C. (1989). Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest* 83, 865-875.
- Saxen, L., Tenovuo, J., and Vilja, P. (1990). Salivary defense mechanisms in juvenile periodontitis. *Acta Odontol. Scand.* 48, 399-407.
- Schmidt, C. K. (2004). In vivo Funktionsanalyse der lysosomalen Membranproteine Lamp1 und Lamp2. Unveröffentlichte Diplomarbeit, Institut für Biochemie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Schneider, J. A., Jonas, A. J., Smith, M. L., and Greene, A. A. (1984). Lysosomal transport of cystine and other small molecules. *Biochem. Soc. Trans.* 12, 908-910.
- Schweizer, A., Kornfeld, S., and Rohrer, J. (1996). Cysteine³⁴ of the cytoplasmic tail of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is reversibly palmitoylated and required for normal trafficking and lysosomal enzyme sorting. *J. Cell Biol.* 132, 577-584.
- Schweizer, A., Kornfeld, S., and Rohrer, J. (1997). Proper sorting of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor in endosomes depends on a pair of aromatic amino acids in its cytoplasmic tail. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 14471-14476.
- Scott, C. C., Botelho, R. J., and Grinstein, S. (2003). Phagosome maturation: a few bugs in the system. *J. Membr. Biol.* 193, 137-152.
- Segal, A. W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 197-223.
- Serrander, L., Skarman, P., Rasmussen, B., Witke, W., Lew, D. P., Krause, K. H., Stendahl, O., and Nusse, O. (2000). Selective inhibition of IgG-mediated phagocytosis in gelsolin-deficient murine neutrophils. *J. Immunol.* 165, 2451-2457.
- Sheppe, W. (1965). Periodontal Disease in th Deer Mouse, *Peromyscus*. *J. Dent. Res.* 44, 506-508.
- Smalley, J. W. (1994). Pathogenic mechanisms in periodontal disease. *Adv. Dent. Res.* 8, 320-328.
- Spicer, S. S. and Hardin, J. H. (1969). Ultrastructure, cytochemistry, and function of neutrophil leukocyte granules. A review. *Lab Invest* 20, 488-497.
- Stein, M., Braulke, T., Krentler, C., Hasilik, A., and von Figura, K. (1987). 46-kDa mannose 6-phosphate-specific receptor: biosynthesis, processing, subcellular location and topology. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 368, 937-947.
- Stengel, A., Ehrlich, P., Noorden, C.V., Lazarus, A., Pinkus, F. (1905). *Disease of the Blood*. Philadelphia, PA, W.B. Saunders.

- Storch, J. and Cheruku, S. R. (2005) Cholesterol Transport in Lysosomes. *Lysosomes*, P. Saftig (ed.), Landes Bioscience/Eurekah.com, Springer Science + Business Media, New York, USA. 18-29.
- Storch, S. and Braulke, T. (2005). Transport of Lysosomal Enzymes. P. Saftig (ed.), Landes Bioscience/Eurekah.com, Springer Science + Business Media, New York, USA. 17-26.
- Storrie, B. and Desjardins, M. (1996). The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *Bioessays* 18, 895-903.
- Storrie, B. and Desjardins, M. (1996). The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *Bioessays* 18, 895-903.
- Strauss, J. F., III, Liu, P., Christenson, L. K., and Watari, H. (2002). Sterols and intracellular vesicular trafficking: lessons from the study of NPC1. *Steroids* 67, 947-951.
- Stryer, L. (2003). *Biochemie*. 4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag.
- Sugimoto, Y., Ninomiya, H., Ohsaki, Y., Higaki, K., Davies, J. P., Ioannou, Y. A., and Ohno, K. (2001). Accumulation of cholera toxin and GM1 ganglioside in the early endosome of Niemann-Pick C1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 12391-12396.
- Taichman, N. S., Tsai, C. C., Baehni, P. C., Stoller, N., and McArthur, W. P. (1977). Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. IV. In vitro release of lysosomal constituents from polymorphonuclear leukocytes exposed to supragingival and subgingival bacterial plaque. *Infect. Immun.* 16, 1013-1023.
- Tanaka, S., Deai, K., Konomi, A., Takahashi, K., Yamane, H., Sugimoto, Y., and Ichikawa, A. (2004). Expression of L-histidine decarboxylase in granules of elicited mouse polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Immunol.* 34, 1472-1482.
- Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E. L., Hartmann, D., Lullmann-Rauch, R., Janssen, P. M., Blanz, J., von Figura, K., and Saftig, P. (2000). Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* 406, 902-906.
- Taniguchi, M., Shinoda, Y., Ninomiya, H., Vanier, M. T., and Ohno, K. (2001). Sites and temporal changes of gangliosides GM1/GM2 storage in the Niemann-Pick disease type C mouse brain. *Brain Dev.* 23, 414-421.
- Tapper, H. and Sundler, R. (1995). Protein kinase C and intracellular pH regulate zymosan-induced lysosomal enzyme secretion in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 58, 485-494.
- Tarentino, A. L., Gomez, C. M., and Plummer, T. H., Jr. (1985). Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochemistry* 24, 4665-4671.
- Taubman, M. A., Valverde, P., Han, X., and Kawai, T. (2005). Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J. Periodontol.* 76, 2033-2041.
- Tjelle, T. E., Lovdal, T., and Berg, T. (2000). Phagosome dynamics and function. *Bioessays* 22, 255-263.
- Tong, P. Y., Tollefsen, S. E., and Kornfeld, S. (1988). The cation-independent mannose 6-phosphate receptor binds insulin-like growth factor II. *J. Biol. Chem.* 263, 2585-2588.

- Touret, N., Paroutis, P., Terebiznik, M., Harrison, R. E., Trombetta, S., Pypaert, M., Chow, A., Jiang, A., Shaw, J., Yip, C., Moore, H. P., van der, W. N., Houben, D., Peters, P. J., de Chastellier, C., Mellman, I., and Grinstein, S. (2005). Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* 123, 157-170.
- Trimble, R. B., Tarentino, A. L., Plummer, T. H., Jr., and Maley, F. (1978). Asparaginyglycopeptides with a low mannose content are hydrolyzed by endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. *J. Biol. Chem.* 253, 4508-4511.
- Urban, C. F., Lourido, S., and Zychlinsky, A. (2006). How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol.* 8, 1687-1696.
- van Spriël, A. B., van den Herik-Oudijk IE, and van de Winkel, J. G. (2000). A single injection of polyethylene-glycol granulocyte colony-stimulating factor strongly prolongs survival of mice with systemic candidiasis. *Cytokine* 12, 666-670.
- van Weert, A. W., Dunn, K. W., Gueze, H. J., Maxfield, F. R., and Stoorvogel, W. (1995). Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump. *J. Cell Biol.* 130, 821-834.
- Vanier, M. T. and Millat, G. (2003). Niemann-Pick disease type C. *Clin. Genet.* 64, 269-281.
- Vanier, M. T. and Millat, G. (2004). Structure and function of the NPC2 protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1685, 14-21.
- Vieira, O. V., Botelho, R. J., and Grinstein, S. (2002). Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem. J.* 366, 689-704.
- Wang, D., Nagpal, M. L., Lin, T., Shimasaki, S., and Ling, N. (1994). Insulin-like growth factor-binding protein-2: the effect of human chorionic gonadotropin on its gene regulation and protein secretion and its biological effects in rat Leydig cells. *Mol. Endocrinol.* 8, 69-76.
- Watari, H., Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Watari, M., Neufeld, E. B., Patel, S., Pentchev, P. G., and Strauss, J. F., III (1999). Mutations in the leucine zipper motif and sterol-sensing domain inactivate the Niemann-Pick C1 glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 274, 21861-21866.
- Watt, S. M., Burgess, A. W., and Metcalf, D. (1979). Isolation and surface labeling of murine polymorphonuclear neutrophils. *J. Cell Physiol* 100, 1-21.
- Weather, P. R., Burkiott, H. G., and Daniels, V. G. (1987). *Functional histology: a text and color atlas.* 2nd Edition. Churchill Livingstone, New York, N.Y.
- Webb, J. L., Ravikumar, B., and Rubinsztein, D. C. (2004). Microtubule disruption inhibits autophagosome-lysosome fusion: implications for studying the roles of aggregates in polyglutamine diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2541-2550.
- Weber, H. (1997). *Wörterbuch der Mikrobiologie.* Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Weber, K. and Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.

- Wenk, J., Hille, A., and von Figura, K. (1991). Quantitation of Mr 46000 and Mr 300000 mannose 6-phosphate receptors in human cells and tissues. *Biochem. Int.* 23, 723-731.
- Westlund, B., Dahms, N. M., and Kornfeld, S. (1991). The bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. Localization of mannose 6-phosphate binding sites to domains 1-3 and 7-11 of the extracytoplasmic region. *J. Biol. Chem.* 266, 23233-23239.
- Wickner, W. T. and Lodish, H. F. (1985). Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes. *Science* 230, 400-407.
- Yu, W. H., Zhao, K. W., Ryazantsev, S., Rozengurt, N., and Neufeld, E. F. (2000). Short-term enzyme replacement in the murine model of Sanfilippo syndrome type B. *Mol. Genet. Metab* 71, 573-580.
- Zhang, M., Dwyer, N. K., Neufeld, E. B., Love, D. C., Cooney, A., Comly, M., Patel, S., Watari, H., Strauss, J. F., III, Pentchev, P. G., Hanover, J. A., and Blanchette-Mackie, E. J. (2001). Sterol-modulated glycolipid sorting occurs in niemann-pick C1 late endosomes. *J. Biol. Chem.* 276, 3417-3425.
- Zhang, M., Sun, M., Dwyer, N. K., Comly, M. E., Patel, S. C., Sundaram, R., Hanover, J. A., and Blanchette-Mackie, E. J. (2003). Differential trafficking of the Niemann-Pick C1 and 2 proteins highlights distinct roles in late endocytic lipid trafficking. *Acta Paediatr. Suppl* 92, 63-73.
- Zychlinsky, A., Weinrauch, Y., and Weiss, J. (2003). Introduction: Forum in immunology on neutrophils. *Microbes. Infect.* 5, 1289-1291.

Anhang

Geräte

| | |
|--------------------------------------|--|
| Agarosegeldokumentationsanlage | Gel Jet Imager, Intas, Göttingen |
| Elektrophoresekammer für Agarosegele | HU13W Wide Format Midi horizontal gel unit, SCIE-PLAS, Warwickshire, UK Modell H5, Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, USA Kern & Sohn, Dürrwangen |
| Analysenwaage | Tecnomara Integra, Fernwald |
| Autoklav | Heraeus, Hanau |
| Brutschrank | LAS-1000, Fujifilm, Carrollton, USA |
| Chemoluminiszenzkamera | GeneQuant pro, Biochrom Ltd, Cambridge, UK |
| DNA-Photometer | FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg |
| Durchflusszytometer | Gene Pulser™, BioRad, München |
| Elektroporationsgerät | Raytest, Straubenhardt |
| Eraser | Axiovert 200M, Zeiss, Göttingen |
| Fluoreszenzmikroskop | Fluorolite 1000, Dynatech, Dynex, Denckendorf |
| Fluoreszenzmikrotiterplattenleser | GelAir Dryer, BioRad, München |
| Geltrockner | Roth, Karlsruhe |
| Homogenisator Xenox | RM 5 Assistent, Sondheim |
| Horizontalschüttler | Heraeus, Hanau |
| Inkubatoren | SalvisLab, Renggli AG, Rotkreuz, CH |
| Mikropipetten | Gilson, Middleton, USA Eppendorf, Hamburg |
| 96-Well-Mikrotiterplattenleser | Sunrise, Tecan, Crailsheim |
| Mikrowellenherd | Panasonic, Japan |
| Multipette | Eppendorf, Hamburg |
| Neubauer Zählkammer | Assistent, Sondheim |
| Parafilm M | Aclan Packaging, Neenah, WI, USA |
| PCR-Cycler | GeneAmp PCR System 2400, PerkinElmer, Wellesley, MA, USA Krick, Langelselbold |
| pH-Meter | Mini-Protean 3-Elektrophoresis-System BioRad, Hercules, USA |
| SDS-PAGE Kammer | Model Twin L, PeqLab Biotechnology, Erlangen |
| Semi-dry-Blot-Aparatur | TransblotSD, BioRad, München |
| Spannungsquelle | PowerPac 200/300, BioRad, München |

| | |
|----------------------------------|--|
| Sterilbänke | danLAF VFR 1806, Claus Damm A/S, Humlebæk, Dk; danLAF VFR 1206 GS, Claus Damm A/S, Humlebæk, Dk |
| Thermoblock | Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg |
| Tischzentrifuge 5415C | Eppendorf, Hamburg |
| TLC-Platten | <i>Silica Gel (F254) high performance</i> , Merck, Darmstadt |
| Transmissionselektronenmikroskop | Zeiss EM-900, Leo Elektronen-mikroskopie, Oberkochen |
| Ultramikrotom | Ultracut E, ehemals Reichert Jung, jetzt Leica, Wien, A |
| Ultraschallstab | Micro Ultrasonic Cell Disrupter, Kimble/Kontes, Vineland, USA High Intensity Ultrasonic Processor (50-Watt Modell), Walter F. C., Ebel, Hamburg |
| UV-Tisch, Kamera und Drucker | Intas UV-Systeme, Göttingen |
| Waage | Sartorius, Göttingen |
| Wärmeschrank | Memmert, Schwabach |
| Wasserbad | GFL, Burgwedel |
| Zentrifugen | Biofuge fresco, Heraeus, Hanau Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg CS-6KR Zentrifuge, Beckman, Fullerton, CA, USA (GH3.8-Rotor) Optima LE-80K-Ultrazentrifuge, Beckman Fullerton, USA (SW41 Ti- und 70.1 Ti-Rotor) Optima TLX-Ultrazentrifuge, Beckman Fullerton, USA (TLA 55-Rotor) Universal 32, Typ 1605, Hettich, Tuttlingen |

Reagenzien

| | |
|--|--|
| Acrylamid | Rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe |
| Agarose | Ultra-Qualität, Roth, Karlsruhe |
| Ampicillin | Melford Laboratories, Chelsworth, UK |
| APS | p. a., Roth, Karlsruhe |
| Bleicitrat | Agar Scientific, Stansted, UK |
| BSA | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Calciumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Choleratoxin Untereinheit B, Alexa Fluor 594 | Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe |
| Ciprobay100 | Bayer, Leverkusen |

| | |
|-------------------------------------|--|
| Complete Proteaseinhibitor | Roche, Mannheim |
| Coomassie-Brilliant-Blau | Sigma Aldrich, Steinheim |
| L-Cystein | Merck, Darmstadt |
| DAMP | Molecular Probes/Invotrogen, Karlsruhe |
| DABCO | Sigma Aldrich, Steinheim |
| DAPI | Sigma Aldrich, Steinheim |
| D _C Protein Assay | BioRad, München |
| DEPC | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma Aldrich, Steinheim |
| dNTPs | Fermentas, St. Leon-Rot |
| DMSO | Serva, Heidelberg |
| DMEM High Glucose | PAA Laboratories, Linz, A |
| DMEM High Glucoes ohne Met/Cys | Gibco, Paisley, Schottland |
| DNA 1kb Marker | Roche, Mannheim |
| EDTA | Roth, Karlsruhe |
| 1,2-Epoxypropan für EM | Roth, Karlsruhe |
| Enzyme | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Ethanol (99,8% p. a.) | Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromidlösung | 1%ig, Roth, Karlsruhe |
| FKS | Biochrom, Berlin |
| Fugene6 | PAA Laboratories, Linz, A |
| Gentamicin 200 mM (100x) | Roche, Mannheim |
| D-Glukose | PAA Laboratories, Linz, A |
| Glutaraldehyd | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Glutardialdehyd | 25% EM-Grad, Agar Scientific, Stansted, UK |
| Glycerol 99,9% | für EM Merck, Darmstadt |
| Glycin p. a. | ACS Reagent, Sigma Aldrich, Steinheim |
| HEPES | Roth, Karlsruhe |
| Histopaque 1077 | Biomol GmbH, Hamburg |
| Histopaque 1119 | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Humanes ImmunglobulinG | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Isopropanol (p. a.) | Baxter Hyland Immuno, Heidelberg |
| Kaliumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Kaliumdihydrogenphosphat wasserfrei | Roth, Karlsruhe |
| Kanamycin | Merck, Darmstadt |
| 2-Mercaptoethanol (p. a.) | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Methanol | Roth, Karlsruhe |
| Ladepuffer für Agarosegele (6x) | Roth, Karlsruhe |
| Latexkügelchen (0,8 µm und 3,0 µm) | Fermentas, St. Leon-Rot |
| L-Methionin | Sigma Aldrich, Steinheim |
| | Sigma Aldrich, Steinheim |

| | |
|---|---|
| Magermilchpulver | Roth, Karlsruhe |
| Magnesiumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Mowiol | Calbiochem, Bad Soden |
| Natriumcarbonat | Riedel-de Haën, Seelze |
| Natriumazid | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Natriumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Natriumdesoxycholat | Merck, Darmstadt |
| Natriumhydrogenphosphat | Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid-Plätzchen (p.a.) | Merck, Darmstadt |
| Natriumpyruvat | Biochrom, Berlin |
| Nickel-NTA | Roche, Mannheim |
| NP-40 | Calbiochem, La Jolla, USA |
| Osmiumtetroxid 4%ig | Plano, Wetzlar |
| Paraformaldehyd reinst | Merck, Darmstadt |
| Percoll | Amersham Biosciences, Uppsala, S |
| Pen/Strep 100x | PAA Laboratories, Linz, A |
| Phenolrot | ICN Biomedicals, Eschwege |
| Pioloform | Agar Scientific, Stansted, UK |
| Ponceau S-Lösung 0,1%ig in 5% HAc | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Precision Plus Protein Standard All Blue | BioRad, München |
| Proteaseinhibitor | Roche, Mannheim |
| Protein-G-Sepharose | Amersham Biosciences, Uppsala, S |
| RPMI-1640, high Glucose, with L-Glutamine | PAA Laboratories, Linz, A |
| | Gibco BLR, Life Technologies, Karlsruhe |
| Salzsäure 37%ig reinst | Riedel-de Haën, Seelze |
| SDS | Roth, Karlsruhe |
| Temed 99% für SDS-PAGE, p.a. | Roth, Karlsruhe |
| Tetrazyklin | Merck, Darmsadt |
| Thioglycollate Medium without Dextrose | Difco TM , BD, Heidelberg |
| Tris | Roth, Karlsruhe |
| Triton X-100 | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Trypanblau 0,4%ig | Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe |
| Trypsin/EDTA 1x | PAA Laboratories, Linz, A |
| Tween-20 | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Uranylacetat | Agar Scientific, Stansted, UK |
| Zymosan | Sigma Aldrich, Steinheim |

Kits

Agarosegeleextraktionskit High Pure PCR Product Purification Kit: Roche, Mannheim
 Amplex-Red Cholesterol Assay Kit A-12216, Molecular Probes, Eugene, OR, USA
 Einbettungskit für EM Agar 100, Agar Scientific, Stansted, UK
 Diff-Quik, Medion Diagnostics, Düdingen, CH
 Human Monocyte Nukleofektor Kit, Amaxa GmbH, Köln
 InnuPrep DNA Mini Kit, AJ Innuscreen, Jena
 Jet Star - The Novel Plasmid Purification Kit (Midi), Genomed, Löhne
 Plasmid Miniprep Kit I (Classic Line) E.Z.N.A, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
 Pure Yield Plasmid Midiprep System, Promega, Mannheim
 Western Blotting Detektionskit ECLplus WB Detection System, Amersham, Little Chalfont, UK
 Western Blotting Detektionskit ECLadvanced WB Detection System, Amersham, Little Chalfont, UK

Labormaterialien

| | |
|---|---|
| DAKO-Pen | DAKO, Glustrup, Dk |
| Deckgläschen rund, Durchmesser d=13 mm | Assistent, Sondheim |
| Diamantmesser für EM 45° | Diatome US, Fort Washington, PA, USA |
| Einbettungsgefäße für EM | Agar Scientific, Stansted, UK |
| Einmalspritzen | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Einmalkanülen Microlace (20G, 23G, 27G) | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Folien zum Geltrocknen | Cellophane Support, BioRad, München |
| Immersionsöl | Zeiss, Jena |
| Kassette 24x30cm | Dr. Goos Suprema, Heidelberg |
| Kunststoffverbrauchsmaterial | Sarstedt, Nümbrecht |
| Neubauer Zählkammer | Brand, Wertheim |
| Objektträger | Assistent, Sondheim |
| Parafilm M | American National Can, Greenwich, UK |
| Pasteurpipetten | Assistent, Sondheim |
| Polystyrenröhrchen (5ml) | Sarstedt, Nümbrecht |
| PVDF-Membranen | Roth, Karlsruhe |
| Rasierklingen für EM | Plano, Wetzlar |
| <i>Screens</i> 20x25cm | Imaging Plates, BAS-MP 2025P, Fujifilm, Kanagawa, J |
| Western Blot Filterpapiere | Schleicher & Schuell, Dassel |
| Microfuge Tubes | Polyallomer, Beckman, Palo Alto, CA, USA |
| Zellschaber | Sarstedt, Nümbrecht |
| Zentrifugenröhrchen+ Adaptoren | Kontron, Zürich, CH |

Lebenslauf

Marion Willenborg
Lützwstr. 6
24105 Kiel

Geboren am 12.07.1977 in Lohne (Oldb.)
Staatsangehörigkeit: deutsch

Hochschulbildung

| | |
|------------------|--|
| 1997 - 2003 | Studium der Biologie an der Universität Osnabrück Abschluß: Diplom Thema der Diplomarbeit: Die Untereinheit KtrA des K ⁺ -Aufnahmesystems KtrAB aus <i>Vibrio alginolyticus</i> |
| seit August 2003 | Promotion am Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel |

Schulbildung

| | |
|-------------|-----------------------------|
| 1984 – 1988 | Gertrudenschule, Lohne |
| 1988 – 1990 | Orientierungsstufe I, Lohne |
| 1990 – 1997 | Gymnasium Lohne |
| 1997 | Abitur |

Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mir dabei geholfen haben, bis hierher zu kommen.

Prof. Paul Saftig danke ich für die Betreuung und die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe. Seine wertvollen fachlichen Ratschläge und die stete Diskussionsbereitschaft haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich möchte Herrn Prof. Matthias Leippe recht herzlich danken für sein Interesse an meiner Arbeit und seine Bereitschaft, das Korreferat zu übernehmen.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Eeva-Liisa Eskelinen für die vielen hilfreichen Tipps, Anregungen und Anmerkungen.

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitglieder der AG Saftig für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders danke ich Marlies und Jenny für die gute Gemeinschaft in unserem Büro sowie den Mädels vom „Froop-Club“ für die heiteren Mittagspausen.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt Annette, Kathi, Anne, Cathrin, Jenny, Alex, Andrea, Marc und Beimi, mit denen ich auch außerhalb des Labors viele nette gemeinsame Stunden verbracht habe.

Bei Prof. Vincent Everts und Prof. Wouter Beertsen bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit bei der Bearbeitung und Auswertung der Knochenproben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Carmen Alvarez-Dominguez für unzählige Tipps sowie für die ausführliche und geduldige Beantwortung all meiner Fragen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Ellen Eckermann-Felkl für die Koordination der Maustransporte aus Göttingen sowie die technische Unterstützung beim Northernblotting.

Herrn Prof. Rainer Podschun und Andrea Hölsgen danke ich für die Unterstützung bei den Chemolumineszenzmessungen.

Weiterhin möchte ich Stella Koppel für die Anleitungen der ersten Schritte bei der Granulozytenisolation danken.

Bei Sebastian Held bedanke ich mich für unzählige DNA-Präps und andere Laborarbeiten.

Ein ganz persönliches Dankeschön möchte ich an meine Familie richten, die mich stets unterstützt und immer für mich da ist.

Hiermit erkläre ich,

- dass ich diese Abhandlung selbständig und nur unter Verwendung der hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt habe.
- dass diese Abhandlung noch nicht an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde.
- dass Teilergebnisse der vorliegenden Abhandlung zur Veröffentlichung eingereicht wurden.
- dass es keine Promotionsversuche in der gleichen Fakultät oder vergleichbaren Fachbereichen gab.
- dass ich für die mündliche Prüfung die Form der Disputation wähle.

Kiel, den 19.03.07

Marion Willenborg