

Leben ohne LAMPs
**Die Folgen des Fehlens der Lysosomal Assoziierten
Membran Proteine LAMP-1 und LAMP-2 auf
endosomale/lysosomale Prozesse**



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

vorgelegt von
Alexander Schneede

Kiel, Dezember 2008

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. DIE LYSOSOMALE MEMBRAN UND DIE LYSOSOMAL ASSOZIIERTEN MEMBRANPROTEINE LAMP-1 UND LAMP-2	2
1.3. ALLE WEGE FÜHREN ZUM LYSOSOM.....	5
1.3.1. Die Endozytose.....	6
1.3.2. Die Phagozytose	7
1.3.3. Die Autophagozytose	8
1.4. INTRAZELLULÄRER TRANSPORT VON ENDOSOMEN	10
1.5. DER INTRAZELLULÄRE CHOLESTEROLTRANSPORT UND DIE CHOLESTEROLHOMÖOSTASE	13
1.5.1. Exogenes Cholesterol	13
1.5.2. Endogenes Cholesterol	14
1.5.3. Vesikuläre und nicht-vesikuläre Tranportmechanismen von freiem Cholesterol gehen „Hand-in-Hand“	15
1.6. NIEMANN PICK TYP C-PROTEINE NPC1 UND NPC2.....	16
2. FRAGESTELLUNG.....	18
2.1. LEBEN OHNE LAMPs	18
2.2. WELCHE FOLGEN HAT DAS FEHLEN DER LAMP-PROTEINE AUF WICHTIGE ENDOSOMALE PROZESSE?	18
3. MATERIAL UND METHODEN.....	19
3.1. MATERIAL.....	19
3.1.1. Chemikalien, Enzyme und Materialien	19
3.1.2. Bakterienstämme, Plasmide, Oligonukleotide und Zelllinien.....	20
3.1.3. Oligonukleotide	21
3.2. METHODEN	23
3.2.1. Molekularbiologische Methoden.....	23
3.2.1.1. Bestimmung des DNA-Gehalts	24

3.2.2.	Zellbiologische Methoden	27
3.2.3.	Biochemische Methoden	34
4.	ERGEBNISSE	39
4.1.	GENERELLE CHARAKTERISIERUNG VON LAMP-DEFIZIENTEN EMBRYONALEN MAUSFIBROBLASTEN	39
4.2.	DIE LAMP-PROTEINE UND DER INTRAZELLULÄRE CHOLESTEROLVERKEHR.....	46
4.2.1.	Verteilung des freien Cholesterols innerhalb der Zelle.....	47
4.2.2.	Dünnschichtchromatografische Auftrennung gereinigter Lipide.....	48
4.2.3.	Lipidtröpfchen als Speicherort der veresterten Lipide in LAMP- doppeldefizienten embryonalen Mausfibroblasten	51
4.2.4.	Unverestertes Cholesterol akkumuliert in der Leber LAMP-2-defizienter Mäuse	53
4.2.5.	Charakterisierung der Filipin-positiven Vesikel	55
4.2.6.	NPC2-Lokalisation in embryonalen Mausfibroblasten.....	57
4.2.7.	Cholesterol- <i>rescue</i> nach Expression von LAMP-1 und LAMP-2.....	58
4.2.8.	Identifizierung der in den Cholesterolstoffwechsel involvierten Domäne von LAMP-2A.....	60
4.2.9.	Charakterisierung der Rolle der luminalen Domäne von LAMP-2A im Cholesterolstoffwechsel	62
4.2.10.	Herstellung von löslichem LAMP-2	65
4.2.11.	Die Überexpression von LAMP-2 in HeLa-Zellen verringert die U18666A- induzierte Cholesterolakkumulation.....	69
4.2.12.	Die Behandlung von LAMP-defizienten MEFs mit 25-Hydroxycholesterol kann die Cholesterolhomöostase teilweise wiederherstellen	72
4.3.	PHAGOZYTULOSE OHNE LAMPS	76
4.3.1.	Etablierung des Phagozytoseexperimente für embryonale Mausfibroblasten	76
4.3.2.	Maturierungsdefekt in Phagosomen von LAMP-defizienten embryonalen Mausfibroblasten	78
4.3.3.	Wiederherstellung der phagosomalen Cathepsin D-Rekrutierung in LAMP- defizienten MEFs durch Transfektion mit LAMP-1 und LAMP-2A.....	83

5.	DISKUSSION.....	86
5.1.	DIE GENERELLE CHARAKTERISIERUNG LAMP-DEFIZIENTER EMBRYONALER MAUSFIBROBLASTEN	86
5.2.	DIE AKKUMULATION VON FREIEM CHOLESTEROL IN LAMP-DEFIZIENTEN MAUSFIBROBLASTEN UND DIE LAMP-PROTEINE.....	90
5.2.1.	Die besondere Bedeutung der luminalen Domäne von LAMP-2.....	91
5.2.2.	Der entscheidende Teilbereich von LAMP-2 ist die membranproximale Hälfte der luminalen Domäne	93
5.2.3.	LAMP-2 und die NPC-Proteine	94
5.3.	DIE ROLLE DER LAMP-PROTEINE IN DER PHAGOZYTOSE.....	96
6.	ZUSAMMENFASSUNG	102
7.	SUMMARY	104
8.	LITERATUR	106
	ANHANG.....	119

Abkürzungsverzeichnis

A	Östereich
Abb.	Abbildung
ACAT	Acyl-CoA:Cholesterol-Acyltransferase
Amp	Ampizilin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BMP	Bis(monoacylglycero)phosphate
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyklische Adenosinmonophosphat
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CIAP	<i>Calv intestin alkaline phosphatase</i>
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAMP	N-(3-[(2,4-Dinitrophenyl)amino]porpyl)-N-(3-aminopropyl)methylaminedihydrochlorid
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes H ₂ O
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	Dinitrophenol
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSHB	<i>Developmental Studies Hybridoma Bank</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA1	<i>early endosom antigen 1</i>
EGF-R	<i>Epidermal-Growth-Factor-Receptor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	fetales Kälberserum
GTP	Guanosintriphosphat

HMGR	Hydroxy-3-Methylglutaryl CoA
HRP	Meerrettichperoxidase
hsc70	<i>heat shock cognate protein 70</i>
IF	Immunfluoreszenz
KAP	Kinesin-assoziiertes Protein
LAMP	Lysosom assoziiertes Membranprotein
LB	<i>Luria Broth</i>
LBPA	Lysobisphosphatidsäure
LDL	Low Density Lipoprotein
LIMP	Lysosomales integriertes Membranprotein
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MEF	muriner embryonaler Fibroblast
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MPR	Mannose-6-Phosphatrezeptor
MTOZ	Mikrotubuli organisierendes Zentrum
MVB	<i>multi vesicular body</i>
neo	Neomycin
NEU	Neuraminidase
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NP-40	Nonidet-P40
NPC	Niemann-Pick Typ C
OD	optische Dichte
ORP1	<i>oxysterol-binding protein-related protein 1</i>
PAGE	Polyakrylamid-Gelelektrophorese
PB	Phospatpuffer
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PS1	Presenilin 1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rab	Ras-related in brain
RILP	Rab interagierendes lysosomales Protein
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

RT	Raumtemperatur
S	Schweden
SCREB	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSD	Sterolsensordomäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	trisgepufferte Kochsalzlösung
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
WB	Westernblot

1. Einleitung

1.1. Das Lysosom

Lysosomen sind membranumgrenzte Organellen, die in allen Säugerzellen außer den roten Blutzellen vorkommen. Lysosomen werden eher aufgrund funktioneller denn struktureller Eigenschaften definiert. Erstmalig 1959 von Christian de Duve beschrieben, wurden ihr niedriger pH-Wert von 5, der von einer v-H⁺-ATPase generiert wird, sowie ihr hoher Anteil an Hydrolasen mit einem pH-Optimum von unter 6 als ihre herausragenden Merkmale charakterisiert (de Duve, 1959; Melmann et al., 1986). Lysosomen haben eine durchschnittliche Größe von 1 µm, besitzen eine runde bis ovale oder zuweilen tubuläre Form (de Duve, 1983) und werden in neuerer Literatur als Teil des hochdynamischen endosomalen Systems aufgefasst. Dieses endosomale System, besteht aus unterschiedlichen vesikulären Strukturen, die teilweise untereinander Membranbestandteile und Inhalte austauschen und daher oft überlappende Eigenschaften besitzen (Lüllmann-Rauch, 2005). Nach aktueller Definition werden die Lysosomen innerhalb dieses Systems als Organellen mit speziellen Glykoproteinen und ohne Mannose-6-Phosphatrezeptoren bezeichnet (Kornfeld und Mellman, 1989; Luzio, 2008).

Lysosomen erfüllen die Aufgabe, Makromoleküle zu degradieren, die entweder aus dem extrazellulären Raum über Endozytose oder Phagozytose (Funato et al., 1997) in das Zellinnere gelangen, oder aus dem Cytoplasma der Zelle stammen, wie im Fall der Makroautophagozytose (Lawrence und Brown, 1992) und der chaperonvermittelten Autophagozytose (Cuervo und Dice, 1998). Lysosomen sind dadurch an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, wie der ständigen Erneuerung zellulärer Proteine, der Herunterregulierung von Oberflächenrezeptoren, dem Freisetzen endozytierter Nährstoffe, der Inaktivierung von pathogenen Organismen, der Reparatur der Plasmamembran und an der Beladung von MHC-II-Molekülen mit prozessierten Antigenen (Mullins, et al., 2001; Saftig, 2005; Zhou et al., 2005; Bandyopadhyay et al., 2008).

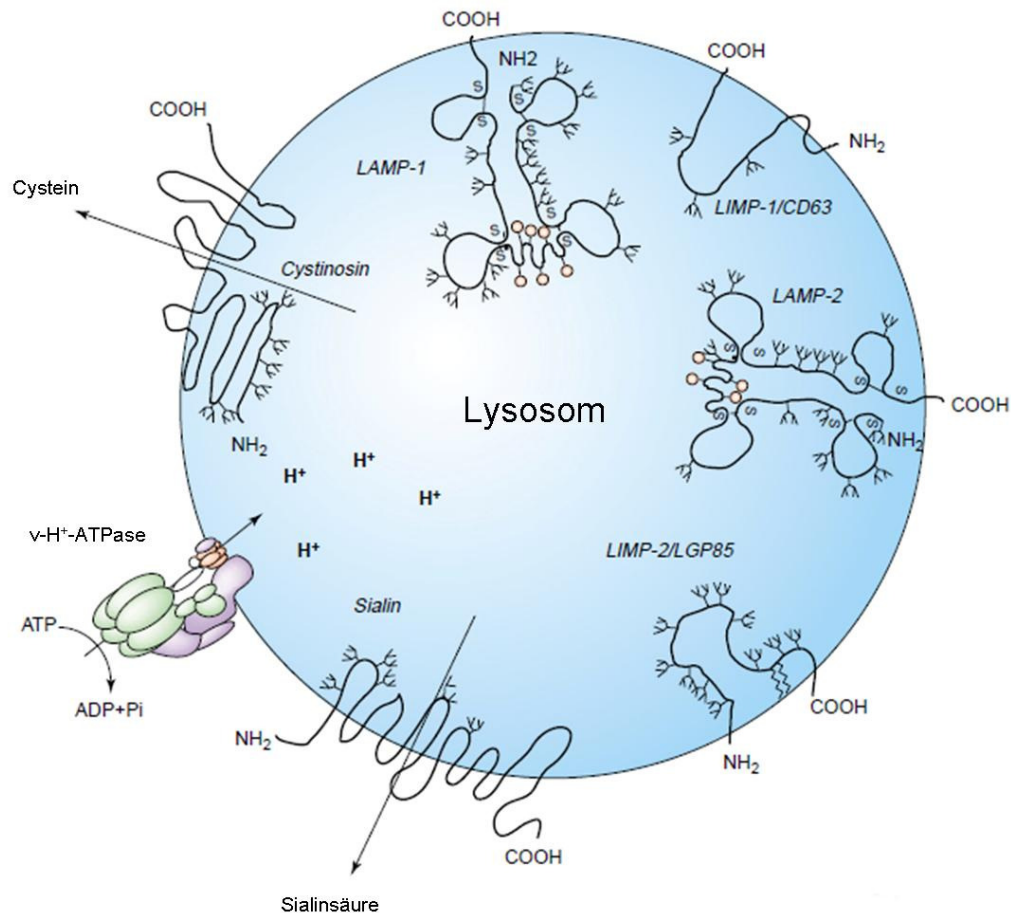


Abbildung 1: Das Lysosom und seine wichtigsten Membranproteine. Schematisch dargestellt ist das Lysosom mit den lysosomalen Membranproteinen LAMP-1 und LAMP-2, sowie LIMP-1 und -2, der Cysteintransporter Cystinosin, der Sialinsäuretransporter Sialin und die v-H⁺-ATPase. (Abbildung nach Eskelinen et al., 2003)

1.2. Die lysosomale Membran und die lysosomal assoziierten Membranproteine LAMP-1 und LAMP-2

Seit der Entdeckung der Lysosomen wurden verschiedene Funktionen der lysosomalen Membran erforscht. Die Trennung der lysosomalen degradierenden Hydrolasen von anderen zellulären Kompartimenten und der dadurch gewährte Schutz der Zelle vor unerwünschter Degradierung war eine der ersten postulierten Aufgaben und wird auch weiterhin als die herausragende Funktion angesehen (Eskelinen et al., 2003). Weitere, über diese allgemeine Funktion hinausgehende Aufgaben sind die Generierung des sauren pH-Wertes durch die v-H⁺-ATPase und der Transport von Aminosäuren, Fettsäuren, Kohlenhydraten und anderer Nährstoffe, die aus der lysosomalen Degradierung von Makromolekülen entstehen, über die lysosomale Membran (Eskelinen et al., 2004) (Abb. 1). Des Weiteren nimmt man an, dass die

lysosomalen Membranproteine an der Interaktion und Fusion von Lysosomen untereinander und mit anderen Zellkompartimenten, wie Endosomen, Phagosomen und der Plasmamembran beteiligt sind (Fukuda et al., 1991). Auch die Bereitstellung spezifischer Bindemotive für die Assoziation an Motorproteinkomplexe der Mikrotubuli- und Aktinnetzwerke durch lysosomale Membranlipide und -proteine wird diskutiert (Munro, 2004).

In den frühen 1980er Jahren wurden zwei abundante Glykoproteine mit großer Molekülmasse beschrieben (Burnside und Schneider, 1982). Nachdem gegen die lysosomale Membran gerichtete mono- und polyklonale Antikörper produziert worden waren, konnten diese Proteine genauer als hochglykosylierte, integrale Membranproteine mit einer Masse von 90 – 120 kD charakterisiert werden (Lewis et al., 1985). Diese Proteine waren angereichert in späten Endosomen und Lysosomen und wurden lysosomal assoziierte Membranproteine, kurz LAMPs, genannt. Aus verschiedenen Spezies konnten deren cDNAs kloniert werden, die für die beiden distinkten, aber mit einer Sequenzhomologie von 37 % sehr homologen Proteine LAMP-1 und LAMP-2 kodieren (Fukuda, 1988).

Beide Proteine sind Typ-I-Membranproteine und besitzen einen 11-aminosäurelangen cytoplasmatischen Schwanz, der die für den intrazellulären Transport der beiden Proteine unerlässlichen Signalsequenzen enthält (Fukuda, 1991). Die große luminale Ektodomäne wird durch eine *hinge*-Region in zwei homologe Domänen geteilt, die einige O-Glykosylierungsstellen und 16-20 putative N-Glykosylierungsstellen aufweisen, was den niedrigen isoelektrischen Punkt von 2-4 der beiden Proteine erklärt. Diese Glykosylierungen tragen ca. 60 % der molekularen Masse der beiden LAMP-Proteine und machen sie damit zu den am höchstglykosylierten Proteinen, die bekannt sind (Eskelinen et al., 2003). Trotz einer Sequenzhomologie von 37 % sind die für LAMP-1 und LAMP-2 kodierenden Gene deutlich getrennt voneinander auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert, so dass man annimmt, dass sich diese relativ früh in der Evolution voneinander getrennt haben (Fukuda, 1991).

Die Aufgabe der Lysosomal Assoziierten Membranproteine LAMP-1 und LAMP-2, die zusammen mit den Lysosomal Integrierten Membranproteinen über 50 % der Masse der lysosomalen Membranproteine ausmachen (Eskelinen et al., 2006), ist bisher weitestgehend ungeklärt. Da die LAMPs eine Glykokalix bilden, indem sie eine kontinuierliche Kohlenhydratschicht auf der Innenseite der Membran von späten Endosomen und Lysosomen generieren, wurde ihre ursprüngliche Aufgabe in der Erhaltung der strukturellen Integrität dieser Membran durch den Schutz vor dem degradierenden lysosomalen Lumen gesehen (Saftig, 2005). Allerdings hatte die Entfernung der N-Glykane von LAMP-1 und LAMP-2 mittels Endoglykosidase H keinen Einfluß auf die lysosomale Integrität, was zu der Annahme

fürte, dass die LAMP-Proteine weitere Funktionen besitzen müssten (Kundra and Kornfeld, 1999).

LAMP-1-defiziente Mäuse zeigen keinen auffälligen Phänotyp, bis auf die Entwicklung einer leichten Astroglieose 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. In Niere, Leber und Herz LAMP-1-defizienter Mäuse wurde eine im Vergleich zum Wildtyp hochregulierte, kompensatorische Expression von LAMP-2 bemerkt, was möglicherweise das Fehlen eines auffälligen Phänotyps erklärt (Eskelinen, 2006).

In hämatopoetischen Zellen scheint der Status der Sialinsäuremodifikationen des LAMP-1-Proteins die lysosomale Exozytose zu regulieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Neuraminidase NEU1 die lysosomale Exozytose negativ reguliert, indem dieses Enzym die Sialinsäuremoleküle von LAMP-1 prozessiert (Yogalingam et al., 2008).

Das LAMP-2-Protein existiert in den drei Isoformen LAMP-2A, -2B und -2C, die durch unterschiedliches Spleißen der Boten-RNA zustande kommen (Cuervo und Dice, 2000). 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; Bandyopadhyay et al., 2008).

LAMP-2-defiziente Mäuse zeigen im Gegensatz zu den LAMP-1-defizienten Mäusen einen deutlichen Phänotyp mit einer 50 %igen Mortalität zwischen Tag 20 und 40 nach der Geburt (Tanaka et al., 2000). Die Mäuse sind insgesamt kleiner als Wildtypiere. Überlebende Tiere sind fertil und haben eine fast normale Lebenserwartung. Das auffälligste pathologische Charakteristikum ist eine Akkumulation von frühen und späten autophagozytotischen Vakuolen in zahlreichen Geweben wie z.B. Leber, Pankreas, Milz, Herz und neutrophilen Granulozyten. Es konnte gezeigt werden, dass LAMP-2-defiziente Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit für Parodontitis, aufgrund einer gestörten phagosomalen Reifung in Neutrophilen aufweisen (Beertsen et al., 2008).

Die physiologische Bedeutung von LAMP-2 wird durch die Entdeckung, dass ein LAMP-2-Defekt die Ursache der Danon-Krankheit ist, unterstrichen (Malicdan et al., 2008). 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, 2006). LAMP-2 wurde außerdem als unterstützendes Protein in der MHC-II-Präsentation von zytosolischen Antigenen (Zhou et al., 2005) identifiziert. Wie in der Chaperon-vermittelten Autophagozytose scheint die Isoform LAMP-2A zusammen mit dem *heat shock cognate protein 70* (hsc70) als Rezeptor für die lysosomale Aufnahme von cytosolischen Peptiden zu fungieren, und die so die Präsentation von cytosolischen Antigenen mit dem MHCII-Komplex zu unterstützen.

Mäuse mit einer Defizienz in beiden LAMP-Proteinen zeigen eine Letalität am Embryonaltag 15 und weisen ebenfalls eine Akkumulation von autophagozytischen 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). In LAMP-doppel-defizienten Mausfibroblasten konnte eine gestörte phagosomale Reifung als Ursache dafür gefunden werden, dass der humanpathogene Erreger *Neisseria gonorrhoeae* nicht in Phagosomen abgetötet wurde. Dies konnte auf eine mangelnde Rekrutierung von Rab7 und dessen Effektor RILP zurückgeführt werden, wodurch Phagosomen nicht durch den Dynein/Dynactin-vermittelten retrograden Transport entlang der Mikrotubuli transportiert werden konnten und in einer peripheren Lokalisation verblieben.

1.3. Alle Wege führen zum Lysosom

Bereits einige Jahre nach seiner Entdeckung wurde die Bedeutung des Lysosoms als das terminale Degradierungsorganell der Endozytose, der Phagozytose und der Autophagozytose erkannt (De Reuck et al., 1963). Von Endozytose und Phagozytose spricht man, wenn aus dem Extrazellulärraum Material in das Innere der Zelle aufgenommen und dem endosomalen Netzwerk zugeführt wird. Bei der Autophagozytose hingegen werden cytosolische Bestandteile in Vesikel aufgenommen (Abb. 2).

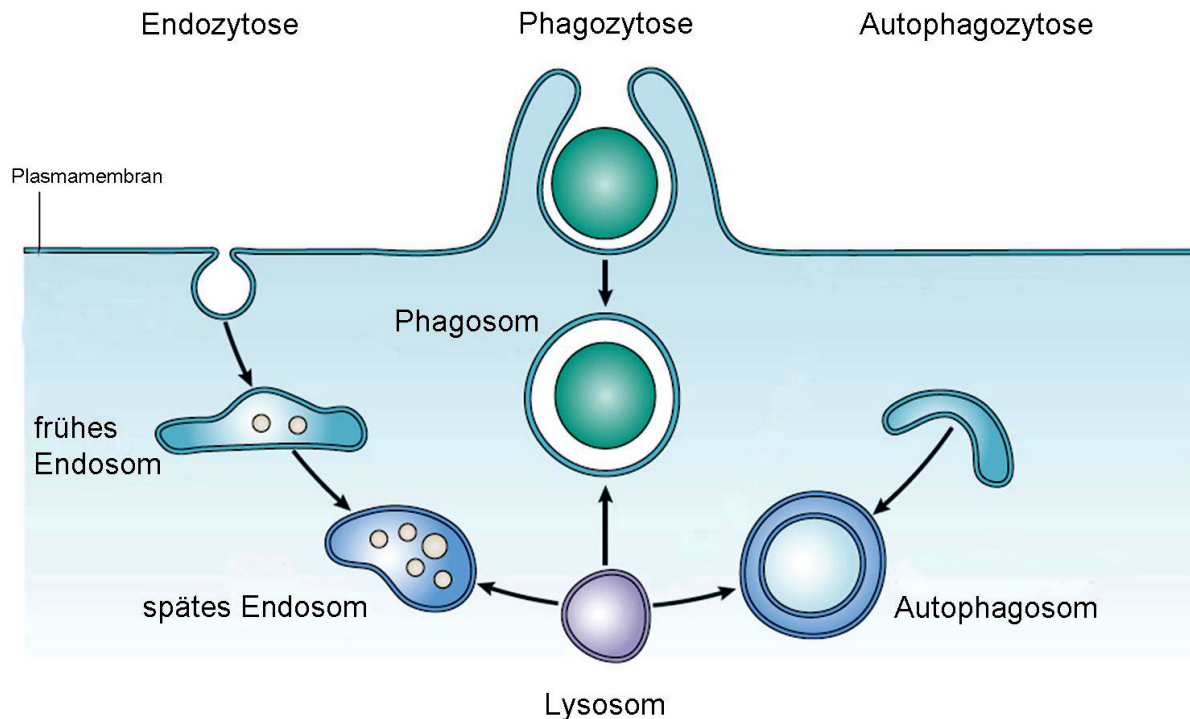


Abbildung 2: Alle Wege führen zum Lysosom. Das Lysosom stellt das terminale Degradierungsorganell sowohl der Endozytose und der Phagozytose, als auch der Autophagozytose dar. Über die Endo- und die Phagozytose gelangt Material aus dem Extrazellulärraum in das Innere der Zelle, wohingegen bei der Autophagozytose zytosolische Bestandteile von einer Membran umschlossen werden. (Abbildung nach Luzio et al. 2007).

1.3.1. Die Endozytose

Der endozytotische Weg (Abb. 3) beginnt durch Einstülpung der Plasmamembran, wodurch ein Vesikel entsteht, das das aufzunehmende Material umschließt. Am besten beschrieben ist die rezeptorvermittelte Endozytose über clathrinumhüllte Gruben der Plasmamembran. Hat sich ein Vesikel ins Zellinnere abgeschnürt, spricht man von einem endozytotischen Vesikel. Dieses Organell, zu diesem Zeitpunkt auch frühes Endosom genannt, kann unter anderem durch die Markerproteine Rab5 oder EEA1 (early endosome antigen 1) identifiziert werden (Mills et al., 2001). Die frühen Endosomen haben oft eine tubulovesikuläre Form, ihr Lumen ist relativ arm an Proteasen und weist einige interne Vesikel auf und ihr pH-Wert liegt bei ca. 6,0 (Luzio et al., 2007; Mellman, 1996). Frühe Endosomen stellen eine erste Sortierungsstation dar, wo es aufgrund des erniedrigten pH-Werts oft zu einer Dissoziation von Rezeptor und Ligand kommt. Einige Rezeptoren, wie z.B. der LDL-Rezeptor, gelangen mittels rezyklierenden Endosomen zurück zur Plasmamembran. Andere Rezeptoren, wie der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R) bleiben an ihren Liganden gebunden (Huang et al., 2006). Der Inhalt der frühen Endosomen gelangt in weiterer Folge in multivesikuläre

Körperchen (MVB), einem ebenfalls tubulovesikuläres Kompartiment, welches zunehmend interne Vesikel bildet.

Der zu degradierende Inhalt konzentriert sich in den intraluminalen Vesikeln, während rezyklierende Proteine über die tubulären Domänen entfernt und rezyklierenden Endosomen zugeführt werden (Woodman et al., 2008). Unklar ist bei diesem Prozess, ob die Makromoleküle über vesikulären Transport von frühen Endosomen zu den MVB gelangen oder ob es sich um einen Reifungsprozess des Endosoms handelt (Mullins und Bonifacino, 2001). Verbunden mit diesen Sortierungsprozessen ist der Transport der MVB von der Zellperipherie entlang der Mikrotubuli zum Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOZ) (Driskell et al., 2007). Wenn alle rezyklierenden Proteine entfernt worden sind, kommt es zu einem Austausch von Rab5 und Rab7, was einen Wechsel der Rab-Effektorproteine der endosomalen Membran zur Folge hat (Woodman et al., 2008).

Die Degradierung der internen Vesikel ist der terminale Schritt der Endozytose. Es ist nach heutigem Stand der Forschung umstritten, ob dies durch die Fusion mit Lysosomen eingeleitet wird oder ob zur Degradierung benötigte Proteine vom Lysosom während eines kurzen Kontakts der beiden Vesikel übertragen werden (Bright et al., 2005; Piper et al., 2007, Luzio et al., 2008). In Lysosomen herrscht ein pH-Wert von pH 5,0, welcher das pH-Optimum der lysosomalen Proteasen und Lipasen darstellt. Charakteristisch für Lysosomen sind reifes Cathepsin D und die beiden Lysosomal Assoziierten Membran-Proteine LAMP-1 und LAMP-2 bei gleichzeitiger Abwesenheit von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren, die Bestandteil früher und später Endosomen sind.

1.3.2. Die Phagozytose

Die Phagozytose unterscheidet sich von der geschilderten rezeptorvermittelten Endozytose lediglich durch die Größe und Art der aufgenommenen Partikel. Die Phagozytose ist ein essentieller Teil der angeborenen Immunantwort und beschreibt einen Vorgang, in dem spezialisierte Zellen eindringende Pathogene, apoptotische Zellen und weitere fremde Partikel, die größer als 0,5 μM im Durchmesser sind, nach Rezeptor-Liganden-Interaktionen aufnehmen (Luzio et al., 2007). Die Phagozytose findet vor allem in Makrophagen und Neutrophilen, statt (Alberts et al., 2004).

Die Eliminierung von Pathogenen durch Makrophagen und Neutrophile wird durch die Aufnahme in eine phagozytotische Vakuole eingeleitet. Diese Vakuole und ihre aus der Plasmamembran abgeleitete Membran ist einem ausgiebigen Remodelierungsprozess

unterworfen, der mit dem Erhalt von antimikrobiellen und lytischen Eigenschaften einhergeht. Diese Reifung bedarf der sequentiellen Fusion mit verschiedenen Komponenten des endolysosomalen Weges (Tjelle et al., 2000; Vieira et al., 2002). Frühe Phagosomen interagieren bevorzugt mit frühen Endosomen, verhalten sich wie diese und weisen die gleichen Markerproteine auf wie frühe Endosomen (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).

Während der Phagozytose und der Endozytose spielen Mikrotubuli, Aktinfilamente und Motorproteine eine entscheidende Rolle für die intrazelluläre Lokalisation und Dynamik der Vesikel. 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).

Die Regulation der phagosomalen Reifung ist außerdem von der Konzentration an freiem Calcium im Zytoplasma abhängig (Pryor et al., 2000; Lundqvist-Gustafsson et al., 2000). Bei Störungen in der Regulation der zytosolischen Calciumkonzentration konnten Jaconi et al. eine verminderte Fusion von Phagosomen und Lysosomen feststellen (Jaconi et al., 1990).

1.3.3. Die Autophagozytose

Die Autophagozytose ist ein lysosomaler Abbauweg, um zytoplasmatische Bestandteile zu degradieren (Mizushima et al., 2002; Eskelinen, 2005; Galluzzi et al., 2008). In Säugetierzellen ist die Autophagozytose ein wichtiger Überlebensmechanismus während kurzer Hungerzeiten (Eskelinen, 2005; Saftig und Eskelinen, 2008). 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; Lock et al., 2008). Diese Vakuole wird als frühes Autophagosom 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 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 Makroautophagozytose werden 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 Carboxy-terminalen Teil von LAMP-2A (Bandyopadhyay und Cuervo, 2008). 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, Zhang et al., 2008).

1.4. Intrazellulärer Transport von Endosomen

In eukaryotischen Zellen werden Zellkomponenten, wie membranumschlossene Vesikel und Organellen, zu bestimmten intrazellulären Orten transportiert, indem sie an molekulare Motoren binden, die die Beförderung entlang von Mikrotubuli und Aktinfilamenten vermitteln (Cross et al., 2005). Generell sind Mikrotubuli für den Transport über längere und die Aktinfilamente für kürzere Strecken zuständig. Mikrotubuli bilden ein die Zelle durchspannendes, radiales Netzwerk, das seinen Ursprung, das sog. Mikrotubuliorganisationszentrum (MTOZ) in der Nähe des Zellkerns hat und von wo aus die Mikrotubuli wie die Speichen eines Rads in die Zellperipherie führen. Mikrotubuli können ihre Last also entweder in Richtung des Zellzentrums transportieren, auch Plus-Ende genannt, oder in entgegengesetzter Richtung zur Zellperipherie, Minus-Ende genannt. Dahingegen zeigen Aktinfilamente keine distinkte Orientierung (Kashina und Rodionov, 2005).

Der Transport entlang beider Filamente wird von Motorproteinkomplexen vermittelt (Abb. 4). Zu diesen Motorproteinkomplexen gehören Myosin, Dynein und Kinesin, die alle Mechanoenzyme darstellen und in der Lage sind, chemische Energie in mechanische Energie umzuwandeln. Während Myosin mit Aktinfilamenten interagiert, nutzen Dynein und Kinesin Mikrotubuli als Filamente (Vale, 2003). Alle drei besitzen den gleichen modularen Aufbau: eine Kopfgruppe mit ATPase-Aktivität, die an Mikrotubuli oder Aktinfilamente bindet, gefolgt von einer stielähnlichen Domäne, die an ihrem anderen Ende an Adapterproteine bindet, die wiederum die selektive Bindung an die zu transportierende Ladung vermitteln. Die Identität von Vesikeln wie Endosomen und Lysosomen, wie auch anderer größerer Organellen, ist unter anderem durch eine typische Zusammensetzung der Membranlipide und -proteine, sowie GTPasen bestimmt, die von den molekularen Motoren, vermittelt durch Adapterproteine, erkannt werden (Munro, 2004).

Die Richtung des Transports, also entweder in Richtung des Zellkerns (retrograd) oder in Richtung der Zellperipherie (anterograd) wird durch die Art der Motorproteinkomplexe bestimmt. Die meisten Mitglieder der Kinesin-Motorproteine vermitteln hierbei anterograden Transport, Dynein bewegt seine Ladung in retrograder Richtung (Kamal und Goldstein, 2002). Es wurde gezeigt, dass Aktinfilament- und Mikrotubuli-Motoren beiderlei Polarität gleichzeitig an ein Organell binden und der Transport von jedem Organell zu einem spezifischen Bestimmungsort innerhalb der Zelle folglich die Koordination aller Motorproteine erfordert (Welte, 2004; Mallik und Gross, 2004).

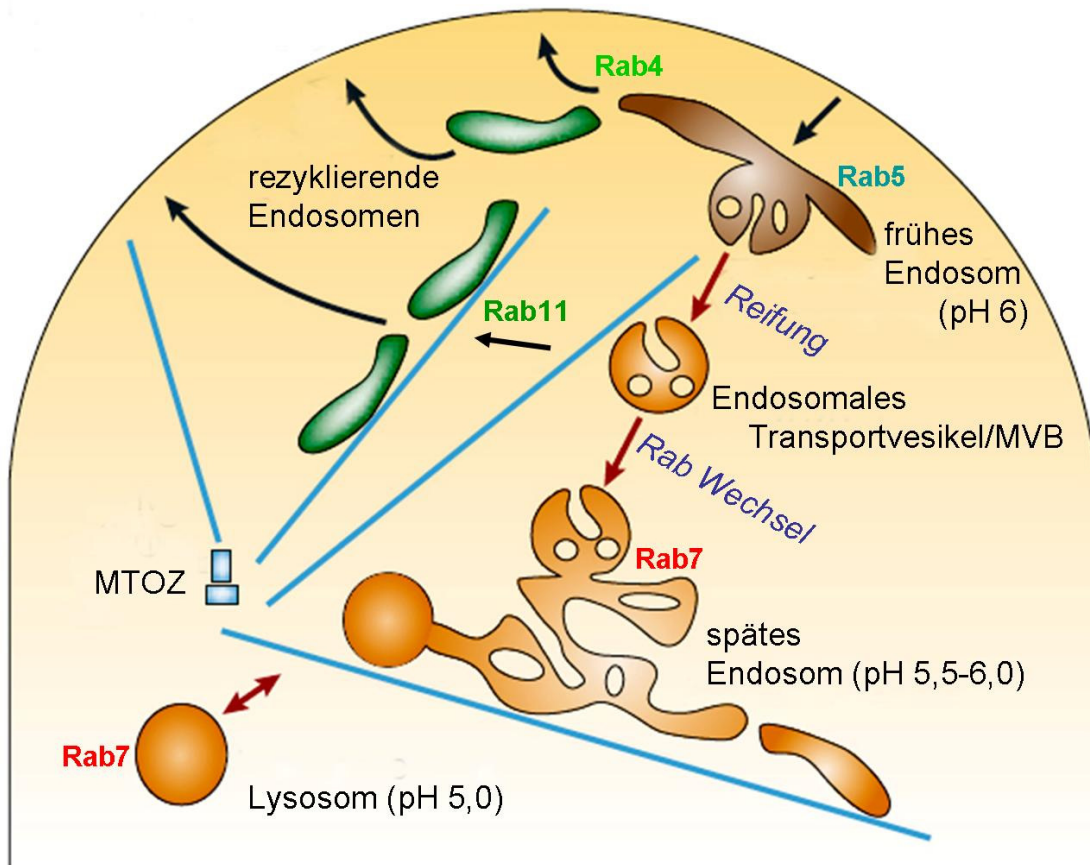


Abbildung 3: Der endozytotische Vesikeltransport. In höheren Eukaryonten findet die Internalisierung von Rezeptoren und anderer Zelloberflächenbestandteile meistens über Clathrin-vermittelte Endozytose statt. Internalisierte Moleküle gelangen so zunächst zu frühen Endosomen, wo es aufgrund des erniedrigten pH-Werts oft zu einer Dissoziation von Rezeptor und Ligand kommt. Während einige Rezeptoren mittels rezyklierenden Endosomen zur Plasmamembran zurückgelangen, werden andere Rezeptoren degradiert, indem sie zu späten Endosomen und Lysosomen transportiert werden. Die späten Endosomen stellen die letzte Sortierungsstation dar, von wo ein Transport in andere Zellbereiche stattfinden kann, Lysosomen sind hingegen der Endpunkt des endozytotischen Weges. MTOZ Mikrotubuliorganisationszentrum, MVB multivesikuläres Körperchen, Abbildung nach Gruenberg et al. (2001).

Eines der am besten verstandenen Beispiele für dieses komplexe Zusammenspiel ist die Bewegung von Melanosomen in Pigmentzellen. Die Bewegungsrichtung der Melanosomen, Melanin-transportierender Vesikel, ist abhängig von der Konzentration an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), so dass das Umschalten zwischen anterogradem und retrogradem Vesikeltransport gut untersucht werden kann (Deacon et al., 2003).

Der Dyneinmotor interagiert mit den Melanosomen über den Dynactinkomplex, einem Multimer aus Adapter- und Motorproteinen, welches durch die Vermittlung des Arp-Filaments an das Spectrin-Netzwerk der Melanosomenmembran bindet. Die KAP-Untereinheit von Kinesin-2 bindet an P150^{glued}, welches ebenfalls mit dem Dynactinkomplex assoziiert ist. Myosin V verbindet das Melanosom mit dem Aktinfilament (Cross et al., 2005).

Die Verteilung der Melanosomen innerhalb der Melanozyten ist von der Konzentration von cAMP abhängig, da diese die Aktivität der Motorproteinkomplex unterschiedlich beeinflusst: steigende cAMP-Konzentrationen verschieben das Gleichgewicht zu Gunsten von Kinesin und Myosin, fallende cAMP-Konzentrationen führen einer Steigerung der Dyneinaktivität. cAMP-regulierte Signale koordinieren hierbei den Organellentransport, indem die in retrograden und anterograden Transport involvierte Motorproteine reguliert werden. Dynein wird direkt oder indirekt von der organelgebundenen Proteinkinase A (PKA), möglicherweise über inaktivierende Phosphorylierung reguliert (Kashina et al., 2004). Kinesin scheint direkt von PKA reguliert zu werden und Myosin wahrscheinlich über einen indirekten Weg ebenfalls von PKA. Zusätzlich zu PKA hat auch die organelgebundene Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) einen Einfluss auf die Transportrichtung der Vesikel (Andersson et al., 2003), so dass es scheint, dass der bidirektionale Organellentransport von einer hierarchischen Kaskade von Signalwegen reguliert wird.

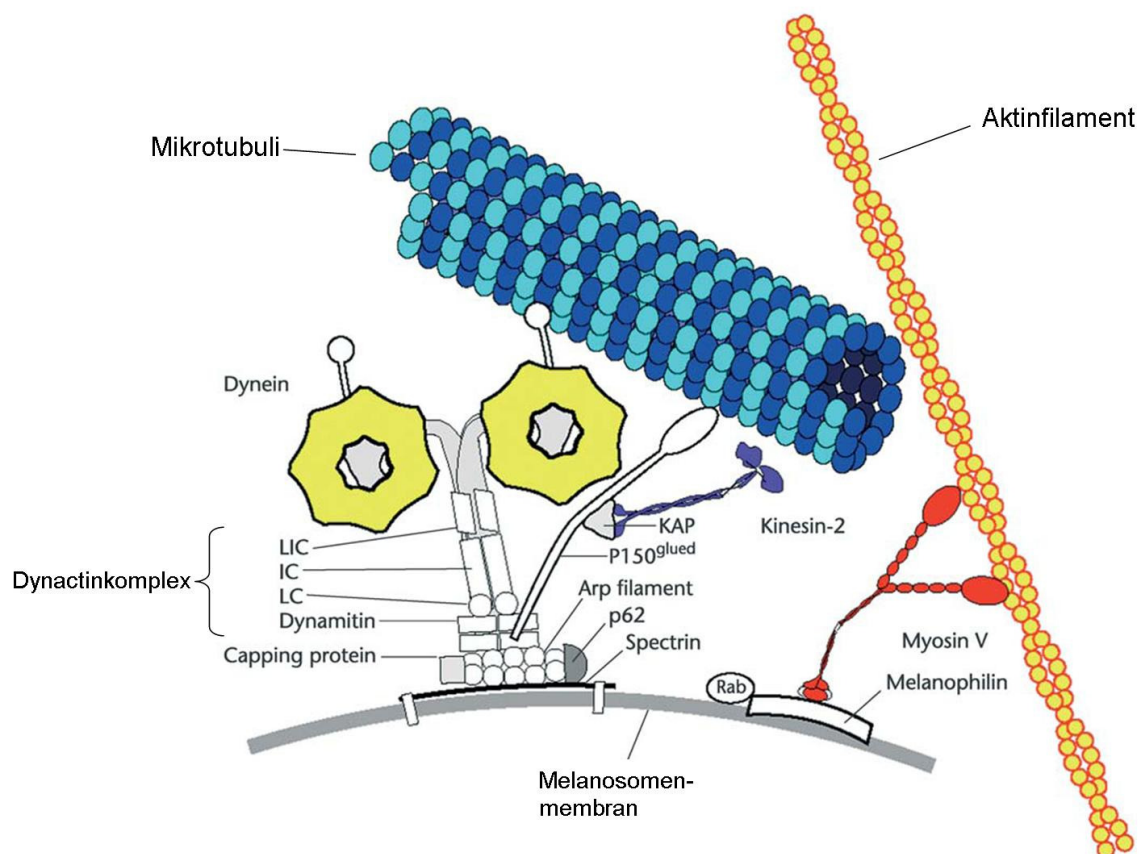


Abbildung 4: Die Motorproteinkomplexe am Beispiel eines Melanosoms. Der Dyneinmotor interagiert mit den Melanosomen über den Dynactinkomplex, einem Multimer aus Adapter- und Motorproteinen, welches durch die Vermittlung des Arp-Filaments an das Spectrin-Netzwerk der Melanosomenmembran bindet. Die KAP-Untereinheit von Kinesin-2 bindet an P150^{glued}, welches ebenfalls mit dem Dynactinkomplex assoziiert ist. Myosin V verbindet das Melanosom mit dem Aktinfilament. Die Rekrutierung von Myosin V wird von Rab27a kontrolliert. Die GTP-gebundene Form von Rab27a rekrutiert Melanophilin, welches wiederum Myosin V bindet. Abbildung nach Robert A. Cross (2005).

1.5. Der intrazelluläre Cholesteroltransport und die Cholesterolhomöostase

Zellen erhalten Cholesterol entweder durch *de novo*-Synthese im endoplasmatischen Retikulum oder über rezeptorvermittelte Endozytose von cholesterolesterbeladenen Lipoproteinen, vor allem den Lipoproteinen geringer Dichte, den sog. LDL-Partikeln. Innerhalb der Zelle wird Cholesterol u.a. in Zellmembranen integriert, zu Cholesterolestern modifiziert oder zu Gallensäuren oder Steroidhormonen umgewandelt. Zudem wird Cholesterol eine Rolle bei der Signaltransduktion und beim intrazellulären Vesikeltransport zugesprochen (Storch und Cheruku, 2005). Die Menge an intrazellulärem Cholesterol beeinflusst und wird seinerseits reguliert durch die Interaktion mit Sterol Response Element-Binding Proteins (SREBPs), Transkriptionsfaktoren, die die Expression verschiedenener Gene des Lipidstoffwechsels steuern (Chang et al., 2006).

1.5.1. Exogenes Cholesterol

Exogenes Cholesterol gelangt hauptsächlich in Form von Cholesterolestern über rezeptorvermittelte Endozytose von LDL-Partikeln in die Zelle (Chan, 1992, Ikonen, 2008). LDL-Rezeptoren befinden sich an der Plasmamembran in spezialisierten Bereichen, den clathrinumhüllten Gruben (*clathrin coated pits*). Bei Bindung von LDL-Partikeln an den Rezeptor invaginieren die *clathrin coated pits* und schnüren sich als Vesikel von der Plasmamembran in das Zellinnere ab (Abb. 4). Durch Fusion mit frühen und späten Endosomen treten diese Vesikel in den endozytotischen Weg ein. Durch das Absinken des pH-Wertes ($\text{pH} \leq 6$) dissoziiert der LDL-Partikel vom Rezeptor, woraufhin dieser über retrograde Transportvesikel innerhalb von 10 Minuten wieder an die Zelloberfläche gelangt, wo er weitere LDL-Moleküle binden und in die Zelle führen kann (Brown & Goldstein 1986; Ikonen, 2008). Durch weitere endosomale Reifungsprozesse, u.a. die Fusion mit Lysosomen, gelangen die Cholesterolester schließlich in ein hydrolytisches Kompartiment, das reich an saurer Lipase ist (Sugii et al. 2003) und in dem freies Cholesterol freigesetzt wird. Von dort gelangt das freie Cholesterol über späte Endosomen an die Plasmamembran (Sugii et al. 2003) oder in das ER, wo es von dem Enzym Acyl-CoA:Cholesterol-Acyltransferase (ACAT)-1 durch die Übertragung einer freien Fettsäure auf die freie Hydroxylgruppe wieder verestert wird (Chang et al. 1997). Beim Verlassen des Cholesterols aus späten Endosomen spielen die Proteine NPC1 und NPC2, die nach der seltenen Lipidspeichererkrankung

Niemann Pick Typ C benannt sind, eine wichtige Rolle (Patterson et al., 2001, Chang et al. 2005).

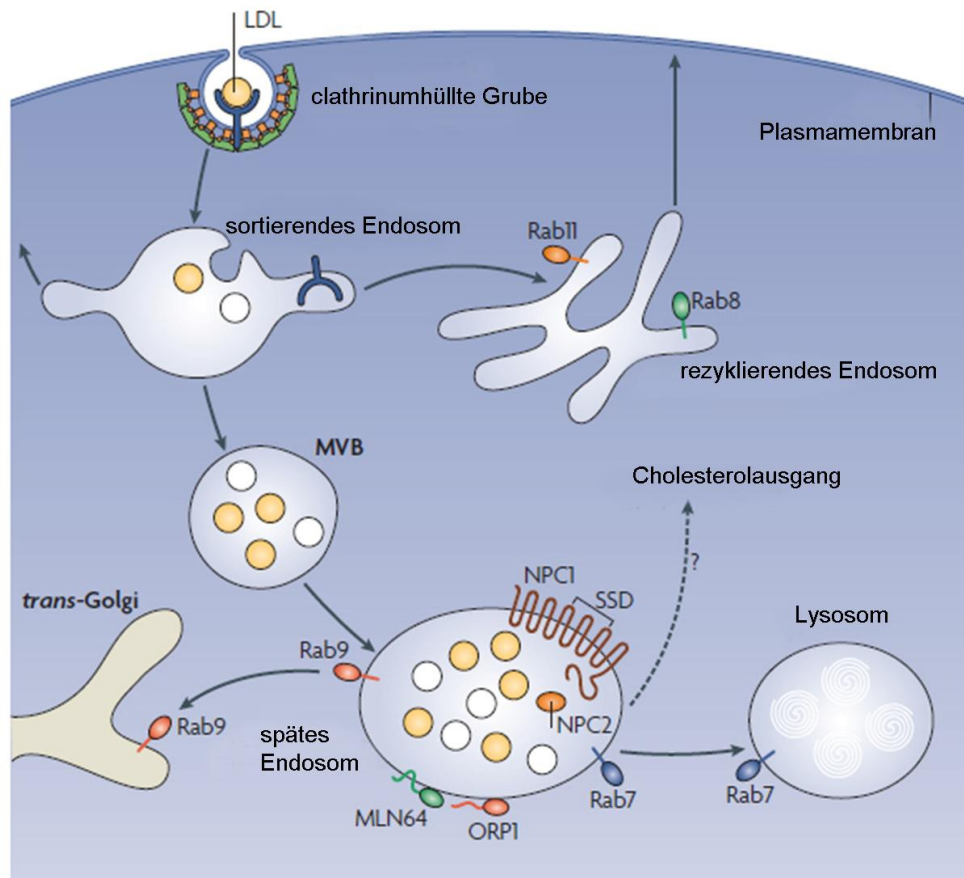


Abbildung 5 Endosomaler Cholesteroltransport. Lipoproteine geringer Dichte (Low Density Lipoproteins, LDL, gelb) binden in clathrinumhüllten Gruben an LDL-Rezeptoren, um von dort in sortierende Endosomen gebracht zu werden. Der LDL-Rezeptor rezykliert zur Plasmamembran und das LDL über multivesikuläre Körperchen (MVB) zu den späten Endosomen transportiert. Dabei werden Cholesterolester von der sauren Lipase in freies Cholesterol und freie Fettsäuren hydrolysiert und freies Cholesterol kann das endosomale Kompartiment verlassen, um andere Zellkompartimente zu erreichen. Über den Export aus späten Endosomen ist nur sehr wenig bekannt, außer, dass dieser ohne die Niemann Pick Typ C-Proteine NPC1 (SSD, *sterol sensing domain*) und NPC2 inhibiert ist. Die Dynamik des späten endosomalen Kompartiments ist sehr sensitiv gegenüber dem lokalen Cholesterolgehalt und einige Sterol-bindende Proteine, MLN64 und ORP1, sind an der Organisation des spätendosomalen Membranverkehrs beteiligt. Zudem lenken verschiedene Rab-GTPasen sterolabhängigen, endosomalen Verkehr: Rab8 und Rab11 in rezyklierenden Endosomen, Rab7 und Rab9 in späten endosomalen Kompartimenten. Abbildung nach Ikonen (2008).

1.5.2. Endogenes Cholesterol

Die letzten Schritte der Biosynthese endogenen Cholesterols (endoCholesterol) finden im endoplasmatischen Retikulum statt. Die Abnahme der zellulären Cholesterolmenge löst den Cholesteroltransport vom ER zum Golgi-Netzwerk und die proteolytische Spaltung der SREBPs im Golgi-Netzwerk aus. Die daraus entstehenden löslichen N-terminalen Domänen gelangen in den Nukleus und aktivieren als reife Transkriptionfaktoren u.a. die Expression

des Schlüsselenzyms der Cholesterolsynthese, der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMGR) (Goldstein et al. 2006). Das neusynthetisierte endoCholesterol verlässt sehr schnell das ER und wird innerhalb von 10 bis 20 Minuten über einen energieabhängigen, nicht-vesikulären Mechanismus zur Plasmamembran transportiert. Außer dass in diesen Prozess Caveolin-1, sowie andere, lösliche Proteine involviert sind, ist über den molekularen Zusammenhang wenig bekannt (Matveev et al., 2001). Von der Plasmamembran wird das endoCholesterol vermutlich zelltypabhängig über Endozytoseprozesse entweder mittels Caveosomen (Pelkmans et al. 2001, Pelkmans & Helenius 2003), d.h. unabhängig von späten Endosomen/Lysosomen, oder Clathrin-abhängig unter Beteiligung später Endosomen/Lysosomen internalisiert (Lange et al. 1998).

1.5.3. Vesikuläre und nicht-vesikuläre Transportmechanismen von freiem Cholesterol gehen „Hand-in-Hand“

Wie in den vorangegangenen Abschnitten über exogenes und endogenes Cholesterol beschrieben, finden sowohl vesikelabhängige und unabhängige Cholesteroltransportprozesse innerhalb der Zelle statt. Das zunächst über einen vesikelabhängigen Endozytoseweg von LDL-Partikeln in die Zelle aufgenommene exogene Cholesterol gelangt in späte Endosomen. Aber auch ohne Lipoproteine wird Cholesterol ständig mit Hilfe von Endosomen zwischen der Plasmamembran und Endosomen innerhalb der Zelle transportiert (Hao et al., 2003). Parallel scheint aber auch ein weiterer Transportmechanismus von der Plasmamembran zu anderen Organellen, wie z.B. den Cholesterolesterspeicherorten, den sog. Lipidtröpfchen und auch den Endosomen selbst stattzufinden. Für diesen Weg wurden die typischen Merkmale eines vesikelunabhängigen Mechanismus gezeigt, nämlich, dass er sehr schnell stattfindet und dass er unabhängig von metabolischem Energieverbrauch ist (Hao et al., 2002; Wustner et al., 2005). Aufgrund der hohen Hydrophobizität von Cholesterol müssen dabei entweder Donor- und Akzeptormembranen in enger räumlicher Nähe sein und/oder dieser Prozess wird von cholesterolbindenden Proteinen unterstützt (Hamilton et al., 2003). Cholesterolbindende Proteine für die eine solche Funktion postuliert wurden, sind NPC2 (Ko et al., 2003) und MLN64 (Aply et al., 2005).

Ein sehr interessantes Modell für die enge Verknüpfung von vesikulären und nicht-vesikulären Mechanismen wurde für den intra-endosomal Cholesteroltransport entworfen (Holttä-Vuori und Ikonen, 2006). In späten Endosomen unterscheidet sich die äußere, limitierende Membran bezüglich der Protein- und der Lipidzusammensetzung sehr von den

internen Membranen. Nach derzeitigem Verständnis befindet sich der größte Teil des endosomalen freien Cholesterols in den internen Membranen (Kobayashi et al., 1999). Um innerhalb der Zelle weitertransportiert werden zu können, muss Cholesterol von diesen intra-endosomalen Membranen der limitierenden Membran zugeführt werden (Gruenberg et al., 2001). Endo/lysosomale Proteine, für die eine Funktion in diesem vesikelinternen Zusammenspiel vorgeschlagen wurden, sind das lösliche Protein NPC2 (Ko et al., 2003) und das in der limitierenden Membran inserierte MLN64 (Alpy et al., 2005). Auch das in den internen Membranen lokalisierte Lipid Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP) scheint in diesen Prozess involviert zu sein (Kobayashi et al., 1999). Nach heutigem Verständnis muss das endosomale Cholesterol aus den internen Membranen zu der limitierenden Membran gebracht werden, um innerhalb der Zelle weiter transportiert werden zu können (Gruenberg, 2001). In diesem Szenario könnte NPC2 die Rolle eines löslichen Cholesteroltransporters übernehmen, der das Cholesterol den internen, BMP-reichen Membranen entzieht und es der limitierenden Membran zuführt (Cheruku et al., 2006), wo es von weiteren cholesterolbindenden Proteinen wie MLN64 (Alpy et al., 2005) oder ORP1 (Johansson et al., 2003) gebunden wird und dadurch einen anschließenden vesikelabhängigen Transport einleitet (Ikonen, 2008).

1.6. Niemann Pick Typ C-Proteine NPC1 und NPC2

Die Niemann-Pick-Erkrankung gehört zu den endosomalen/lysosomalen Speicherkrankheiten. Die Erkrankung ist charakterisiert durch eine starke Anreicherung von freiem Cholesterin und anderen Lipiden in späten Endosomen und Lysosomen dieser Patienten. Bei 95 % 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). Es besitzt 13 Transmembrandomänen. In diesem Bereich sind Sequenzen enthalten, 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).

Neuere Studien lassen vermuten, dass NPC1 in den Sphingosin-Export aus späten Endosomen involviert ist, da ein Fehlen des NPC1-Proteins zunächst zu einer endosomalen Akkumulation von Sphingosin führt, der eine drastisch erniedrigter Calciumgehalt in späten Endosomen folgt. Dies resultiert in der sekundären Einlagerung anderer Lipide, wie Cholesterol, Sphingomyelin und Glykosphingolipiden in diesen Organellen (Lloyd-Evans et al., 2008).

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 des Nebenhodens 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 in einer 1:1-Stöchiometrie und ist wichtig für die Kontrolle des lysosomalen Cholesterinspiegels. NPC2 ist in der Lage, Cholesterin Phospholipidmembranen zuzuführen und wird als löslicher Cholesteroltransporter zwischen Membranen diskutiert (Cheruku et al., 2003, Vanier und Millat, 2004).

2. Fragestellung

2.1. Leben ohne LAMPs

Lysosomal-Assoziiertes-Membran-Protein-1 (LAMP-1) und LAMP-2 stellen den größten Proteinanteil der lysosomalen Membran dar. Im Vorfeld dieser Arbeit sind Mäuse generiert worden, die defizient für LAMP-1, LAMP-2 und für beide LAMP-Proteine sind.

Während LAMP-1-defiziente Mäuse keinen auffälligen Phänotyp zeigen, sterben die Hälfte der LAMP-2-defizienten Mäuse zwischen Tag 20 und 40 nach der Geburt. LAMP-2-defiziente Mäuse sind kleiner als ihre Wildtypgeschwister und weisen das pathologische Charakteristikum einer Akkumulation von frühen und späten autophagozytotischen Vakuolen in zahlreichen Geweben auf. Mäuse mit einer Doppeldefizienz in LAMP-1 und LAMP-2 zeigen eine Letalität um den Embryonaltag 15 und weisen ebenfalls eine Akkumulation von autophagozytotischen Vakuolen in fast allen embryonalen Geweben auf.

2.2. Welche Folgen hat das Fehlen der LAMP-Proteine auf wichtige endosomale Prozesse?

Im Rahmen dieser Arbeit sollen mögliche Auswirkungen des Fehlens der abundanten lysosomalen Membranproteine LAMP-1 und LAMP-2 auf die Funktion später Endosomen und Lysosomen untersucht werden.

Der erste Abschnitt befasst sich mit der generellen Charakterisierung der LAMP-defizienten embryonalen Mausfibroblasten mit Blick auf die Eigenschaften des endosomalen Kompartiments.

Im zweiten Abschnitt werden die Auswirkungen der Defizienz der beiden Proteine auf die Cholesterolhomöostase untersucht. Es soll der Frage nachgegangen werden, warum in embryonalen Mausfibroblasten bei Fehlen des LAMP-2-Proteins, freies Cholesterol in spätendosomalen Vesikeln akkumuliert und welcher Teil des LAMP-2-Proteins für die Funktion des Proteins in diesem Stoffwechselprozess essentiell ist.

Eine weitere herausragende Funktion besitzen Endosomen während der Phagozytose. Der dritte Abschnitt behandelt daher die Funktion von LAMP-1 und LAMP-2 in diesem essentiellen Teil der angeborenen Immunantwort. Hierzu sollen Phagozytoseexperimente mit Latexkügelchen durchgeführt werden, um den phagosomalen Reifungsprozess näher zu beleuchten.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien, Enzyme und Materialien

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

Amersham Biosciences, Uppsala, S	ECLplus WB Detection System, ECLadvanced WB Detection System, Protein-G-Sepharose
Applichem, Darmstadt	Formaldehydlösung
BioRad, München	Dc Protein Assay, Molekulargewichtsmarker
Calbiochem, LaJolla, USA	Mowiol, NP-40
Fermentas, St. Leon-Rot	dNTPs, Enzyme, 6x DNA-Ladepuffer
Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe	<i>LysoTrackerRed</i> DND-99, Alexa Fluor Antikörper, DAMP, Nile Red
PAA Laboratories, Linz, A	Penicillin/Streptomycin 100x, Gentamycin, DMEM, Trypsin-EDTA, RPMI-1640, FKS
Roche, Mannheim	High Pure PCR Product Purification Kit, Complete Proteaseinhibitor, Endo H, FuGene 6, Fugene 6 HD, Ni-NTA
Roth, Karlsruhe	Acrylamid Rotiphorese Gel 30, Agarose Ultra-Qualität, β -Mercaptoethanol, Ethidium-Bromidlösung (1 %ig), Nitrozellulose, PVDF-Membran, Whatmanpapier
Sarstedt, Nümbrecht	6-, 24- und 96-Well-Platten, Zellkulturschalen, Zellschaber, Kunststoffverbrauchsmaterialien
Sigma Aldrich, Steinheim	BSA, DABCO, DAPI, Filipin Complex, Saponin, Triton X-100, Tween 20, Latex-Kügelchen, Amphotericin B

3.1.2. Bakterienstämme, Plasmide, Oligonukleotide und Zelllinien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 1 aufgelistet. Es handelt sich dabei um *E. coli* K-12 Derivate. Die verwendeten Plasmide sind in Tab. 2 und die verwendeten Oligonukleotide in Tab. 3 aufgeführt.

Stamm	Genotyp	Referenz
XL1-blue	RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI ^q ZAM15 Tn10(Tet ^r)]	Statagene, La Jolla, CA, USA

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

Plasmid	Resistenz	Eigenschaften	Referenz
pFcR-myc		Fc-Rezeptor in pcDNA3.1	
pmLAMP-1	Amp	murines LAMP-1 in pCIneo	Eskelinen et al. (2004)
pLAMP-2A	Amp	murines LAMP-2A in pCIneo	Eskelinen et al. (2004)
prLAMP-1	Amp	Ratten-LAMP-1 in pCB6	Dr. Stefan Höning (Biochemie, Universität Köln)
pL2A(LA1ct)	Amp	LAMP-1/2 Chimäre #1 in pCIneo	
pL1(LA2ct)	Amp	LAMP-1/2 Chimäre #2 in pCIneo	
pL1(LA2ALUM)	Amp	LAMP-1/2 Chimäre #3 in pCIneo	
pL2(L1LUM)	Amp	LAMP-1/2 Chimäre #4 in pCIneo	
pL1(1.ViertelL2A)	Amp	LAMP-1/2 Chimäre #5 in pCIneo	
pL1(1.HälfteL2A)	Amp	LAMP-1/2 Chimäre #6 in pCIneo	
pL1(4.ViertelL2A)	Amp	LAMP-1/2 Chimäre #7 in pCIneo	
pL1(2.HälfteL2A)	Amp	LAMP-1/2 Chimäre #8 in pCIneo	

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Antikörper	Erzeugt in	IF	WB	Herkunft
Primärantikörper				
α -c-myc (9B11)	Maus	1:200	-	Santa Cruz, Heidelberg
α -Cathepsin D SII-10	Kaninchen	1:50	-	Pohlmann, R., Göttingen
α -DNP	Kaninchen	1:200	-	ICN Biochemicals, Eschwege
α -Maus-MPR46 (MSC1)	Kaninchen	1:50	-	Klumperman et al., 1993
α -Maus-MPR300	Kaninchen	1:50	-	Figura, K. von
α -Maus-LAMP-1 (ID4B)	Ratte	1:50	-	DSHB, Iowa City, USA
α -Maus-LAMP-2 (Ab193)	Ratte	1:50	1:500	DSHB, Iowa City, USA

α -LBPA/BMP (6C4)	Maus	1:100	-	Jean Gruenberg
α -LIMP-2 c-tail	Kaninchen	1:50	-	Y. Tanaka
α -NPC2	Kaninchen	1:50	-	Shutish Patel
Sekundärantikörper				
α -Kaninchen, AlexaFluor488, 594	Esel	1:500	-	Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe
α -Kaninchen, AlexaFluor488, 594	Ziege	1:500	-	Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe
α -Maus, AlexaFluor488, 594	Esel	1:500	-	Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe
α -Maus, AlexaFluor488, 594	Ziege	1:500	-	Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe
α -Ratte, AlexaFluor350, 488, 594	Esel	1:500	-	Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe
α -Ratte, AlexaFluor350, 488, 594	Ziege	1:500	-	Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 3: Eingesetzte Antikörper

3.1.3. Oligonukleotide

Klonierungsprimer zur Herstellung der LAMP-Chimären

Chimäre #1

pCI-neo f1	CGTGGTACCTCTAGAGTCGAC
L2a (L1CT) r1	GTGACTCCTCTTCCCTGCCAATAAAATAAGCCAGCAAC
L1CT f1	GGCAGGAAGAGGAGTCAC
pCB6 NotI r1	AAGGAAAAAAGCGGCCGCTAGAGGGGTCACAGGGATGC

Chimäre #2

L1 (L2aCT) f1	CTCATCGCCTACCTCATCGGTCTCAAGCGCCATCATAC
pCI-neo XhoI r1	CCGCTCGAGTACTTATCATGTCTGCTCGAAG
pCB6 XhoI f1	AACTCGCTCGAGATGAGGTCTATATAGCAGAG
L1 r1 (vor CT)	GATGAGGTAGGCGATGAGGAC

Chimäre #3

pCI-neo f1	CGTGGTACCTCTAGAGTCGAC
L2a (L1CT) r1	GTGACTCCTCTTCCCTGCCAATAAAATAAGCCAGCAAC
L1CT f1	GGCAGGAAGAGGAGTCAC
pCB6 NotI r1	AAGGAAAAAAGCGGCCGCTAGAGGGGTCACAGGGATGC

Chimäre #4

L1 (L2aTM) fl	GTACAGGACGGTAACAACATGCTTGTGCCCATAGCGGTG
pCI-neo XhoI r1	CCGCTCGAGTACTTATCATGTCTGCTCGAAG
pCB6 XhoI fl	AACTCGCTCGAGATGAGGTCTATATAGCAGAG
L1 r1 (vorTM)	CATGTTGTTACCGTCCTG

Chimäre #5

pCI-neo fl	CGTGGTACCTCTAGAGTCGAG
L1L2 ¼(1)	TTTTTTGTGAAGGTGAGTTTCCAAGAGACAGCGAATCC
L1L2 ¼(2)	AAACTCACCTTCACAAAAACAC
PCB6 NotI r1	AAGGAAAAAAGCGGCCGCTAGAGGGGTCACAGGGATGC

Chimäre #6

pCI-neo fl	CGTGGTACCTCTAGAGTCGAG
Lum2L1lum1L2a r1	GTGGCCCAGTAGTTGGGGAAGTTTGGTCTTCTTCACAC
Lum2L1lum1L2a fl	TTCCCCAACTACTGGGCCAC
PCB6 NotI r1	AAGGAAAAAAGCGGCCGCTAGAGGGGTCACAGGGATGC

Chimäre #7

CMVfor	CACGGGGATTTCCAAGTCTCCA
L1(4.ViertelL2A)r	ATTAGCCAAATACATGTAAGTCATATTCAAGCGCAC
L1(4.ViertelL2A)f	GTGCGCTTGAATATGACTTACATGTATTTGGCTAAT
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGG

Chimäre #8

CMVfor	CACGGGGATTTCCAAGTCTCCA
L1(2.HälfteL2A)r	GGGTGCCACAGTGGTGGGAGGTCCATCCTGTGTGCA
L1(2.HälfteL2A)f	TGCACACAGGATGGACCTCCCACCACTGTGGCACCC
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGG

Zelllinie	Eigenschaften	Kulturbedingungen	Referenz
PS1 +/+	embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40 Antigen	DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep	D. Hartmann, Leuven, B
#5 +/+	embryonale Mausfibroblasten, primär oder spontan transformiert	DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep	eigene Arbeitsgruppe
LAMP-1 -/-	embryonale Mausfibroblasten, primär oder spontan transformiert	DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep	eigene Arbeitsgruppe
LAMP-2 -/-	embryonale Mausfibroblasten, primär oder spontan transformiert	DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep	eigene Arbeitsgruppe
LAMP-1/2 -/- #48	embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40 Antigen	DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep	eigene Arbeitsgruppe
LAMP-1/2 -/- #79	embryonale Mausfibroblasten, primär oder spontan transformiert	DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep	eigene Arbeitsgruppe
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

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien

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. Bestimmung des DNA-Gehalts

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 durch eine horizontale Elektrophorese in 1,5 %igen Agarosegelen mit TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl pH 8; 1 mM EDTA; 0,1 % Essigsäure (v/v) in H₂O) als Laufmittel. Die Proben wurden mit Auftragspuffer versetzt (Fermentas, St. Leon-Rot). Ein 1 kb-Molekulargewichtsmarker diente als Standard (Fermentas, St. Leon-Rot), von dem 6 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 UV-induzierten Mutationen aus dem Gel bei sehr schwacher UV-Bestrahlung isoliert (3.2.3.3), bevor das restliche Gel zur Auswertung fotografiert wurde.

3.2.1.3. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung wurde das Gelstück mit der erwünschten DNA-Bande mit Hilfe eines Skalpell auf einem UV-Tisch bei Beleuchtung mit einer Wellenlänge von 366 nm (Reprostar, Camag, Muttenz, Schweiz) 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 Qiaquick Gelextraktionskit (Qiagen, Hilden) isoliert.

3.2.1.4. Herstellung elektrokompetenter Zellen

Aus einem bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Aliquot *E. coli* XL1 blue wurde zunächst ein Verdünnungsausstrich auf einer LB-Agarplatte mit $50\text{ }\mu\text{l}$ Tetrazyklin ausgestrichen und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit einer Einzelkolonie von der Platte eine Vorkultur von 50 ml LB Medium mit $50\text{ }\mu\text{l}$ 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 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ geschüttelt und anschließend unter Schütteln auf Eis heruntergekühlt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Durch eine Zentrifugation von 15 min bei 5000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 3200 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ worauf das Zellpellet in 2 ml 10% iger Glycerinlösung aufgenommen wurde. Schließlich wurde die Bakteriensuspension zu $50\text{ }\mu\text{l}$ Aliquots in auf Trockeneis gekühlte Eppendorfgefäße gegeben und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

3.2.1.5. Transformation durch Elektroporation

Vor der Elektroporation wurden die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten *E. coli*-Bakterien des Stammes XL1-Blue auf Eis aufgetaut. Die Bakterien wurden mit $1\text{ }\mu\text{l}$ Vektor-DNA versetzt und in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette transformiert. Die Elektroporation erfolgte bei $2,5\text{ kV}$, $400\text{ }\Omega$ und $25\text{ }\mu\text{F}$ im Gene Pulser (BioRad, Hercules, USA). Anschließend wurden die transformierten Bakterien in 1 ml antibiotikafreies LB-Medium überführt und für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Thermoblock geschüttelt. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension 2 min bei 10000 rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. $750\text{ }\mu\text{l}$ des Überstandes wurden abgenommen und die pelletierten Bakterien in den restlichen $250\text{ }\mu\text{l}$ LB-Medium resuspendiert. Schließlich wurde die Bakteriensuspension auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für $12-16$ Stunden zur Plasmidamplifikation inkubiert.

3.2.1.6. Plasmidaufreinigung

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 ($50\text{ }\mu\text{g/ml}$ Ampicillin) angeimpft und über Nacht unter Schütteln (etwa 250 Umdrehungen pro Minute) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Plasmide

wurden bei 3 ml Ansätzen mit dem peqGold Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab), bei 200 ml Ansätzen mit dem Pure Yield Plasmid Midiprep Kit (Promega) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.2.1.7. Fusionspolymerasekettenreaktion (Fusions-PCR)

Die Fusionspolymerasekettenreaktion wurde für die Herstellung der Lamp1/2-Chimären angewendet. Für diese Methode wurden zwei PCR-Protokolle verwendet, die im folgenden als PCR1 und PCR2 bezeichnet werden.

Im Verlaufe der PCR1 wurden in zwei Ansätzen jeweils die einzelnen zu fusionierenden Teilsequenzen amplifiziert. Dabei wurde der Rückwärtsprimer der PCR1 der einen Teilsequenz so konzipiert, dass er teilweise komplementär zum Vorwärtsprimer der PCR1 der anderen Teilsequenz war. Durch diese Komplementarität konnte in der PCR2, der Fusions-PCR, die erwünschte Lamp1/2-Chimäre fusioniert und amplifiziert werden. Durch Benutzung von flankierenden Primern, die Schnittstellen für Restriktionsenzyme aufweisen oder gegebene Restriktionsschnittstellen mit einschließen, kann das entstandene Fragment in einen gewünschten Vektor inseriert werden. Für alle Klonierungen wurde die Pfu-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

3.2.1.8. Restriktionsverdau

Die Reaktionsbedingungen für die verwendeten Enzyme entsprachen den Angaben des Herstellers Fermentas (St. Leon-Rot). Die Restriktionsverdaue wurden in einem Ansatzvolumen von 30 µl durchgeführt. Dabei wurde 1 µg DNA mit 10 U Restriktionsenzym bei 37 °C für eine Mindestdauer von zwei Stunden unter Schütteln im Thermoblock inkubiert.

3.2.1.9. Dephosphorylierung

Wurde der zur Ligation zu verwendende Plasmidvektor mit nur einem Restriktionsenzym linearisiert, wurde nach dem Restriktionsverdau eine Dephosphorylierung mit der alkalischen Phosphatase CIAP (Fermentas, St. Leon-Rot) dephosphoryliert. Dazu erfolgte eine halbstündige Inkubation des Restriktionsansatzes bei 37 °C mit 2 U CIAP (Fermentas, St. Leon-Roth) im Thermoblock. Anschließend wurde das Plasmid nach erfolgter Agarosegelelektrophorese (3.2.1.2) nach 3.2.1.6 aufgereinigt.

3.2.1.10. Ligation

Für Ligationen wurden 1 µl (\cong 1U) T4 DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot), 1 µl 10x Ligasepuffer, 7 µl restriktionsverdautes (nach 3.2.1.8) und aufgereinigtes (3.2.1.6) zu 1 µl verdautes, dephosphoryliertem und aufgereinigtem Leervektor pipettiert. Es erfolgte eine Inkubation bei 17 °C über Nacht im Wasserbad. Als Negativkontrolle wurde anstelle des zu inserierenden Fragments Wasser eingesetzt. Nach Ablauf der Ligation wurde der Ansatz zur Inaktivierung der Ligase 10 min bei 65 °C erhitzt.

3.2.2. Zellbiologische Methoden

Sämtliche Zellen wurden bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in DMEM-Medium, das 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v) und 10 % FKS (v/v) enthielt.

3.2.2.1. Passagieren von adhärennten Zellen

Das Medium einer konfluent bewachsenen Schale wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA Lösung bei 37 °C bis zum Ablösen inkubiert. Nach Ablösung der Zellen wurde zur Inhibition des Trypsins serumhaltiges Medium zugegeben, die Zellen hierin resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung in neue Zellkulturschalen mit frischem Medium ausgesät.

3.2.2.2. Einfrieren von Zellen

Zur Aufbewahrung der Zellen in flüssigem Stickstoff ließ man die zum Einfrieren bestimmten Zellen bis zu einer etwa 80 %igen Konfluenz in 100 mm Schalen wachsen. Nach der Trypsinierung (siehe 3.2.2.1) 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 frischem Zellkulturmedium resuspendiert und für 10 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die gleiche Menge Gefriermedium (20 % DMSO (Dimethylsulfoxid) in vollständigem Zellkulturmedium) zugegeben. 1ml Aliquots wurden in Schraubdeckelröhrchen zunächst für 24 Stunden in Styroporbehältern bei -80 °C eingefroren, bevor die Röhrchen zur langfristigen Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C überführt wurden.

3.2.2.3. Auftauen von Zellen

Die gefrorenen Schraubdeckelröhrchen wurden bei 37 °C im Wasserbad fast vollständig aufgetaut. Unter der Sterilbank wurde die Zellsuspension dann in ein 15 ml Röhrchen mit 5 ml Zellkulturmedium gegeben und für 3-5 min bei 600 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und zur Kultivierung in einer 25 mm²-Zellkulturflasche im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Anwachsen der aufgetauten Zellen kontrolliert. Tote Zellen wurden durch Mediumwechsel entfernt.

3.2.2.4. Ernten von eukaryotischen Zellen

Die mit den zu erntenden Zellen bewachsenen 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 5000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das so erhaltene Zellpellet entweder direkt weiterverwendet oder auf Trockeneis abgekühlt und anschließend bei -80 °C eingefroren.

3.2.2.5. Herstellung von Zelllysaten

Zur Gewinnung von Zelllysaten wurde das Zellpellet (3.2.2.3) je nach Größe in etwa 50-400 µl Lysispuffer (1:25 mit Complete-Proteaseinhibitor) durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Es folgte eine 10-30 minütige Inkubation auf Eis, gefolgt von einem weiteren Resuspensionsschritt. Im Anschluss wurde das Lysat 5 min bei 14000 rpm bei 4 °C zur Abtrennung von Zellkernen und anderem Zelldebris in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und der Proteingehalt ermittelt (3.2.3.1). Das Lysat wurde je nach Konzentration mit konzentriertem, reduzierendem SDS-PAGE Probenauftragspuffer (4x Stammlösung: 250 mM Tris/HCl pH 6,8; 9 % SDS; 40 % Glycin; eine Spatelspitze Bromphenolblau; 25 % β-Mercaptoethanol in H₂O) versetzt und 5 min im Thermoblock bei 95 °C erhitzt. Die Proben wurden entweder direkt auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen oder bei -20 °C verwahrt.

3.2.2.6. Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

Für die Transfektion wurden die Zellen bis zu einer Dichte von etwa 60-80 % kultiviert und vor der Transfektion mit neuem Zellkulturmedium versorgt. Für die Verwendung der transfizierten Zellen in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie wurden diese auf Deckgläschen kultiviert. Die Transfektion erfolgte mit FuGene6 (Roche, Heidelberg), FuGeneHD (Roche, Heidelberg) oder Turbofect (Fermentas, St. Leon-Roth) entsprechend der jeweiligen Anleitung des Herstellers. Das Transfektionsreagenz verblieb für 6 bis 24 Stunden auf den Zellen. Nach 24 bis 72 Stunden Expressionszeit wurden die transfizierten Zellen entweder für die Immunfluoreszenz fixiert (3.2.2.7) oder zur Gewinnung des Zellpellets geerntet (3.2.2.4).

3.2.2.7. Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie in kultivierten Zellen

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie können Proteine in der Zelle lokalisiert werden.

Alle beschriebenen Schritte erfolgten bei RT. Zunächst wurden die Zellen auf runden Deckgläschen (\varnothing 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. Nach der Fixierung 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. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Zellen 15 min mit 3 % BSA (w/v) in PBS blockiert. Zur Bindung des primären Antikörpers (Tab. 3) wurden 30 μ l der Antikörperverdünnung in 3 % BSA auf Parafilm pipettiert und die Deckgläschen, mit der Zellseite auf den Tropfen der Lösung gelegt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h 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 nun folgenden 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 und DABCO (17 % Mowiol, 33 % Glycerin, 50 mg/ml DABCO) eingebettet. Sollten auch die Zellkerne der Zellen angefärbt werden, wurde auf 1 ml 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 im Dunkeln gelagert.

Für die Betrachtung aller fluoreszenzgefärbten Zellen wurde das inverse Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Carl Zeiss, Jena) verwendet, das mit der Axio Vision 4.1 beta Version 08.2003 Software bedient wurde. Mit Hilfe eines Apotoms, das die Erstellung „optischer Schnitte“ durch Fluoreszenzpräparate erlaubt, konnten Kolokalisierungsstudien durchgeführt werden. Bei dieser Technologie wird das Prinzip der ‚Streifenprojektion‘ umgesetzt, indem eine Gitterstruktur mit definierter Gitter-streifenbreite mit Hilfe eines Apotomschiebers in die Ebene der Leuchtfeldblende des Auflichtstrahlenganges des Mikroskops eingebracht wird. Die Ebene der Leuchtfeldblende ist konjugiert zu der Fokusebene, so dass bei dem Blick durch die Okulare das Gitter überlagert mit der Probe gesehen werden kann. Über einen *Scanning*-Mechanismus im Apotomschieber wird die Gitterstruktur in der Präparatebene in drei definierten Schritten verschoben, wobei an jeder Gitterposition ein digitales Bild aufgenommen wird. Die drei Rohbilder werden von dem Computer zu einem Ergebnisbild verrechnet. Das berechnete Bild stellt einen optischen Schnitt durch die Probe dar.

Die Bilder wurden mit dem Axio Vision Viewer LE Rel. 4.6 und mit der Adobe Photoshop Version 7.0 Software bearbeitet.

3.2.2.8. Fluoreszenzmarkierung von Cholesterol in kultivierten Zellen

Freies Cholesterol 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. 6). Es bindet sehr spezifisch an freies Cholesterol, wobei ein blau fluoreszierender Filipin-Cholesterol-Komplex entsteht. Verestertes Cholesterol 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.

Zur Färbung wurden die fixierten Zellen (3.2.2.7) 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 (3.2.2.7) auf Objektträgern fixiert wurden.

Bei vielen Cholesterolfärbungen folgte auf die Filipinfärbung eine Antikörperfärbung. Dabei wurden die Deckgläschen nach der Filipinfärbung zweimal mit PBS gewaschen und es erfolgte die Antikörperfärbung nach 3.2.2.7, wobei alle Schritte 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.

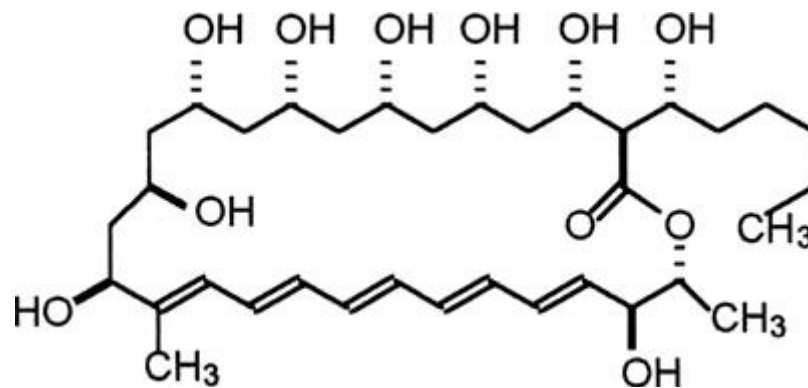


Abbildung 6: Strukturformel von FilipinIII. Bei FilipinIII handelt es sich um die wichtigste Komponente in dem aus *Streptomyces filipinensis* extrahierten Filipingemisch. Es dient der spezifischen Markierung von freiem Cholesterol für die Immunfluoreszenz.

3.2.2.9. Fluoreszenzmarkierung von neutralen Lipiden in kultivierten Zellen

Bei Nilrot handelt es sich um ein Phenoxazin (Abb. 7), das selektiv neutrale Lipide innerhalb von Zellen anfärbt (Greenspan et al., 1985). Nilrot bindet so auch an die unpolaren Cholesterolester, nicht aber an unverestertes Cholesterol.

Der Feststoff wurde von Molecular Probes (Eugene, OR, USA) bezogen und bei -20 °C in einer 0,5 mg/ml Stammlösung in Aceton gelagert. Zur Färbung wurde die Nilrotstammlösung 1:100 in PBS verdünnt und auf die auf Deckgläschen kultivierten und fixierten Zellen gegeben. Die Färbung erfolgte für 1 h im Dunkeln unter sanftem Schütteln. Anschließend wurde entweder in PBS und dreimal in ddH₂O gewaschen, bevor die Deckgläschen mit einem

Mowiol/DABCO-Gemisch (17 % Mowiol; 33 % Glycerol; 50 mg/ml DABCO in PBS) auf Objektträgern eingebettet wurden oder es folgte eine Antikörperfärbung. Dabei wurden die Deckgläschen nach der Nilrotfärbung zweimal mit PBS gewaschen und es erfolgte die Antikörperfärbung nach 3.2.2.7, wobei alle Schritte unter Lichtausschluss durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Göttingen).

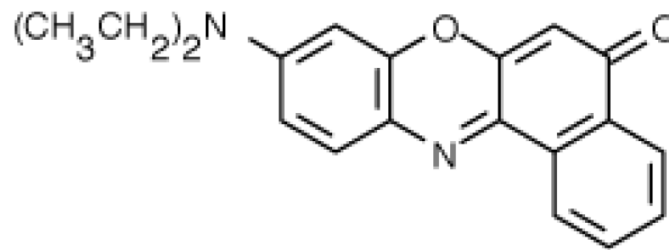


Abbildung 7: Strukturformel von Nilrot Nilrot ist eine lipophile Reagenz, die die Markierung neutraler Lipide für die Immunfluoreszenz markiert.

3.2.2.10. Fluoreszenzmarkierung saurer Kompartimente mittels *LysoTrackerRed*

Saure Kompartimente einer Zelle lassen sich für die Fluoreszenzmikroskopie mittels *LysoTrackerRed* (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe) anfärben. Auf Glasplättchen kultivierte Zellen wurden nach Anleitung des Herstellers für einige Minuten mit *LysoTrackerRed*-haltigem Kulturmedium (DMEM, 10 % FKS (v/v), 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v), 1:3000 verdünnte *LysoTrackerRed*-Originalstocklösung) inkubiert, mehrmals mit PBS gewaschen und für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit 4 %iger PFA-Lösung in PBS fixiert.

3.2.2.11. Fluoreszenzmarkierung saurer Kompartimente mittels DAMP

Mit Hilfe der membrangängigen, schwachen Base N-(3-[(2,4-Dinitrophenyl)amino]propyl)-N-(3-aminopropyl)methylaminedihydrochlorid (DAMP), die unter sauren Bedingungen zu dem Dinitrophenol (DNP), das nicht membrangängig ist, protoniert wird, können saure Kompartimente mittels indirekter Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden (Anderson und Orci, 1988). Auf Glasplättchen kultivierte Zellen wurden hierzu für eine halbe Stunde in mit 20 mM HEPES gepuffertem Zellkulturmedium mit 0,1 mM DAMP inkubiert. Nach

mehrmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese mit 4 %iger PFA-Lösung fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung (3.2.2.7) mit einem gegen DNP gerichteten Primärantikörper markiert.

3.2.2.12. Phagozytose-Assay mit Latexkügelchen

Embryonale Mausfibroblasten wurden auf Glasplättchen in 6 well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit dem Expressionsplasmid, das für den humanen Fc γ IIA-Rezeptor kodiert, transfiziert (3.2.2.6). Nach 24 Stunden Expressionszeit wurde der Phagozytose-Assay durchgeführt.

Zur Durchführung dieses Phagozytose-Assays mit MEFs wurden zunächst Latexkügelchen (Carboxylate-modified, 3,0 μ m, Sigma-Aldrich, Steinheim) mit humanem Immunglobulin (humanes IgG 1 mg/ml in PBS, Sigma-Aldrich, Steinheim) für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Rollen opsoniert. Nach mehrmaliger Zentrifugation (15.000 rpm bei Raumtemperatur) und Resuspendierung in PBS wurden die Latexkügelchen in PBS aufgenommen und nach Austausch des DMEM-Mediums (DMEM mit 10 % FKS (v/v), 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v)) durch DMEM (ohne FKS und Antibiotika) auf die 50 % konfluenten MEFs gegeben. Zur Synchronisation und Induktion der Phagozytose wurden die Zellkulturplatten für 5 min bei Raumtemperatur und 1500 rpm zentrifugiert. Nach einer 15 minütigen Inkubation im Zellinkubator bei 37 °C wurden die nicht aufgenommenen Latexkügelchen durch dreimaliges Waschen der Zellen mit Kulturmedium entfernt. Zur Phagosomenreifung folgte eine weitere Inkubation bei 37 °C für eine Stunde. Die Zellen wurden dann für die Immunfluoreszenzfärbung (3.2.2.7) mit 4 % PFA in PBS fixiert. Optional erfolgte vor der Fixierung für die Markierung von nicht aufgenommenen Latexkügelchen eine 5 minütige Inkubation mit fluorophorkonjugiertem Antikörper (in Esel hergestellter anti-human IgG Antikörper, AlexaFluor594-gekoppelt, Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe) der gegen humanes IgG gerichtet ist, in PBS bei 4 °C. Zur Untersuchung der Phagosomenreifung wurde die Rekrutierung von lysosomalen Markerproteinen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (3.2.2.7) überprüft. Optional wurde die Ansäuerung der Phagosomen durch eine 10 minütige Inkubation mit *LysotrackerRed* (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe) nach Anleitung des Herstellers vor der Fixierung durchgeführt.

3.2.2.13. Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten

Die Mäuse wurden mit PBS vorperfundiert und mit 4 % PFA in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7,4, PB) fixiert. Die entnommenen Gewebe wurden 1-2 h bei 4 °C nachfixiert. Es folgte eine Inkubation der Gewebe in 30 % Sucrose / 0.1 M PB über Nacht. Die Organe wurden auf dem zuvor mit Trockeneis vorgekühlten Schnitttisch des Microtoms auf einer Schicht fünfprozentiger Sucrose festgefroren. Die erhaltenen Schnitte (30 µm) wurden mit einem Pinsel in mit 500 µl 0,1 M PB (mit 0,02 % Na-Azid) gefüllte Vertiefungen einer 24-*well*-Platte überführt. Die Schnitte konnten so bis zu vier Wochen bei 4 °C gelagert werden.

Zur Immunhistochemischen Färbung wurden zunächst die unspezifischen Bindungsstellen der Schnitte mit dem Blockierungspuffer (0,1 M PB / 0,25 % Triton X-100 / 3-5 % NGS) blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C in Blockierungspuffer. Der Inkubation mit Primärantikörper schloss sich zehnmütiges, dreimaliges Waschen mit Waschpuffer an. Die Inkubation mit Alexafluor-gekoppeltem Sekundärantikörper (1:2000) erfolgte für zwei Stunden in Waschpuffer. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden die Schnitte mit dem Pinsel auf Objektträger (Superfrost, Brand) aufgebracht, in Einbettmedium (Fluoromount) eingebettet und mit einem Glasplättchen abgedeckt.

Optional wurden die Schnitte nach der Inkubation mit Sekundärantikörper und dreimaligem Waschen mit Waschpuffer zur Markierung von freiem Cholesterol in einer Filipinlösung (0,5 mg/ml in PBS), bzw. zur Markierung von Neutrallipiden in einer Nilrotlösung (5 µg/ml in PBS) eine Stunde unter sanftem Schütteln und Lichtausschluss inkubiert, bevor die Einbettung erfolgte.

Lösungen:

Blockierungspuffer: 0,1 M PB / 0,25 % Triton X-100 / 3-5 % NGS

Waschpuffer: 0,1 M PB / 0,25 % Triton X-100

3.2.3. Biochemische Methoden

3.2.3.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Proteingehaltsbestimmung erfolgte nach der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode mit einem Kit der Firma Pierce (Rockford, USA) im 96-*well*-Format. Es wurde die Extinktion bei 562 nm gemessen. Als Standard dienten serielle BSA-Verdünnungen in ddH₂O (Sigma

Aldrich, Steinheim). Es wurden Dreifachwerte gemessen und der Mittelwert wurde für die Berechnung der Proteinkonzentration verwendet.

3.2.3.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels der diskontinuierliche SDS-PAGE können Proteine unabhängig von ihrer Ladung nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dies geschieht mit Hilfe eines elektrischen Feldes, das an ein Polyacrylamidgel angelegt wird, sowie einem SDS-haltigen Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem nach Laemmli, 1977. Es wurde ein vertikales Mini-Protean-3-Elektrophoresis-System verwendet (BioRad, Hercules, USA). Die Porengröße der 1,5 mm dicken Trenngele wurde über den Acrylamidanteil festgelegt, wobei für die Auftrennung großer Proteine ein niedriger Anteil an Acrylamid (10 %) verwendet wurde, für kleinere Proteine wurden 15 %ige Gele verwendet. 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 120-150 V durchgeführt. Durch eine Färbung mit Coomassiefärbelösung (0,1 % Coomassie Brilliant Blue (w/v) (Sigma, Steinheim), 40 % Methanol, 10 % Essigsäure in H₂O) nach Weber & Osborn (1969) oder durch Immunoblotting (3.2.3.3) konnten die aufgetrennten Proteine anschließend detektiert werden. Coomassie gefärbte Gele wurden in 5 % Methanol und 7,5 % Essigsäure entfärbt.

3.2.3.3. Immunoblot (Westernblot)

Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran (Roti-PVDF, Roth, Karlsruhe) erfolgte mittels einer *Semi-Dry-Blot*-Apparatur (Transblot SD, Bio-Rad, München). Zuerst wurde die PVDF-Membran mit Methanol und Transferpuffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris/HCl pH 8,5; 10 % (v/v) Methanol) äquilibrierte, das SDS-Gel ebenfalls kurz in Transferpuffer gespült und blasenfrei auf die Membran gelegt. Beiderseits wurden je zwei Lagen Whatmanpapier der Stärke 1,5 mm angefügt. Bei einer Spannung von 20 V wurde die Proteine für 70 min übertragen, anschließend konnten die transferierten Proteine mit Ponceau S-Lösung (Ponceau S Solution, Sigma Aldrich, Steinheim) auf der PVDF-Membran angefärbt werden. So wurde sowohl der erfolgreiche Proteintransfer als auch eine gleichmäßige Beladung der Spuren kontrolliert. Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese 60 min mit 3 % Magermilchpulver in TBS-T blockiert, um die direkte 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 10 min mit TBS-T gewaschen und für eine Stunde mit dem HRP-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 Meerrettichperoxidase-katalysierte Chemolumineszenzreaktion (ECLplus- bzw. ECLadvanced Western Blotting Detection Systems, Amersham, Braunschweig; 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).

3.2.3.4. Silberfärbung von SDS-Gelen nach Blum (Blum et al., 1987)

Bei sehr geringen Proteinmengen im SDS-Gel wurde eine Silberfärbung vorgenommen, mit der Proteinmengen im ng-Bereich nachweisbar sind.

Das SDS-Gel wurde für eine Stunde in Fixierlösung fixiert und dreimal für 20 Minuten in 30 %igem Ethanol gewaschen. Durch eine Inkubation für eine Minute in 0,02 %iger Natriumsulfatlösung wurde die Hintergrundfärbung minimiert, da unlösliche Proteinpräzipitate reduziert werden. Es folgte dreimaliges Waschen mit Wasser. Es folgte die eigentliche Färbung in Silbernitratlösung für 20 Minuten. Zweimaliges Waschen in Wasser für jeweils 20 Sekunden folgte. Die Banden wurden in Entwicklerlösung entwickelt. Die Entwicklungszeit betrug ca. 15 Minuten und wurde durch zehnmünütige Inkubation in Stopplösung beendet, sobald die Banden gut sichtbar waren. Das Gel wurde mehrmals in Wasser gewaschen.

3.2.3.5. Aufkonzentrierung von Zellüberständen

Die Aufkonzentrierung von Zellkulturüberständen erfolgte mit VIVASPIN 2 ml Konzentratoren (50.000 MWCO, VivaScience/Sartorius, Göttingen). 2 ml Zellkulturüberstand wurden in die zuvor mit Zellkulturmedium äquilibrierten Konzentratoren pipettiert und solange bei 5000 x g zentrifugiert, bis das gewünschte Volumen erreicht worden war.

3.2.3.6. Aufreinigung His-getaggtter Proteine

Der His-tag besteht aus 6 – 12 direkt aufeinander folgenden Histidinen. Proteine, die einen His-tag enthalten lassen sich mittels immobilisierter Metal-Ionenaffinitäts-Chromatographie

(IMAC) aufreinigen, da der His-tag Affinität zu doppelt geladenen Nickel-Kationen besitzt. In dieser Arbeit fand Nickel-NTA-Agarose als Matrix Verwendung.

10 ml serumfreier Zellkulturüberstand, der nach 48 Stunden Expressionszeit geerntet worden war, wurde mit 1,5 ml Nickel-NTA-Agarose für 3 Stunden rollend bei 4 °C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde dann in eine Säule überführt und der Durchlauf aufgefangen. Die Agarosekügelchen wurden viermal mit je 10 ml Waschpuffer gewaschen. Die an der Ni-NTA-Agarose gebundenen Proteine wurden in 11 Fraktionen mit jeweils 500 µl Elutionspuffer eluiert. Dabei verdrängte das im Elutionspuffer enthaltene Imidazol kompetitiv die an die Ni-NTA-Agarose gebundenen Proteine.

3.2.3.7. U18666A

Der Cholesteroltransport aus dem spätendozytotischen Kompartiment zum endoplasmatischen Retikulum und zur Plasmamembran wird durch hydrophobe Amine wie U18666A (3b-(2-diethylaminoethoxy)-androst-3-en-20-one-HCl, Biomol, USA) gehemmt (Ganley et al., 2003). U18666A ist daher eine in der Forschung genutzte Substanz, um den Phänotyp der Niemann Pick Typ C-Erkrankung zu imitieren.

HeLa-Zellen wurden auf Glasplättchen kultiviert und mit dem murinen LAMP-2A-Expressionsplamid transfiziert. Nach 24 Stunden Expression wurden die Zellen für 24 Stunden mit U18666A-haltigem Kulturmedium (0,3 µM bzw. 3 µM in DMEM, 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin) inkubiert. Die Wirkung von U18666A in Form einer Cholesterollakkumulation in spät-endosomalen/lysosomalen Vesikeln konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie (3.2.2.7) in Zellen, in denen zuvor freies Cholesterol durch Filipinfärbung (3.2.2.8) markiert worden war, beobachtet werden.

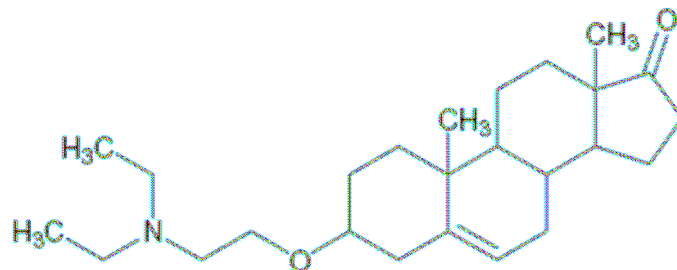


Abbildung 8: Strukturformel von U18666A (3b-(2-diethylaminoethoxy)-androst-3-en-20-one-HCl). U18666A bewirkt in vielen Zelltypen eine Inhibition des Cholesteroltransportes und führt zu einer spät-endosomalen/lysosomalen Cholesterollakkumulation, wie sie auch in NPC-defizienten Zellen zu beobachten ist.

3.2.3.8. Lipidanalyse mittels Dünnschichtchromatografie

Die Lipide wurden mit Chloroform:Methanol:Wasser (2:5:1, v/v/v) bei 37 °C für 24 h extrahiert. Die gleichen Mengen Protein wurden in jede Spur der Dünnschichtplatte aufgetragen. Die Lipide wurden in einem Gemisch aus Chloroform/Methanol/Eisessig (190:9:1) aufgetrennt. Die aufgetrennten Lipide wurden sichtbar gemacht, indem die Dünnschichtplatten mit einer wässrigen Lösung mit 8 % H₃PO₄ und 10 % CuSO₄ besprüht wurden und für 10 Minuten bei 180 °C entwickelt. Die Banden wurden densitometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm quantifiziert (Shimadzu CS 9301 PC, Kyoto, Japan).

Zur metabolischen Markierung wurden Fibroblasten mit [1-¹⁴C]acetate (61 Ci/mol; 1 µCi/ml, Amersham Corp., Braunschweig, Germany) in Kulturmedium (0.3% FKS) für 48 h inkubiert. In jeder Spur der Dünnschichtchromatografieplatte wurden gleiche Mengen Radioaktivität aufgetragen. Die radioaktiven Banden wurden mit einem Bio Imaging Analyser 1000 (Fuji, Japan) sichtbar gemacht und mittels der „Tina software“ (Raytest, Staubenhardt, Germany) quantifiziert.

Die Lipide wurden mittels Vergleich mit ebenfalls aufgetragenen kommerziell erhältlichen Standardlipiden identifiziert und quantifiziert (Cholesterol, Cholesterololeat und Stearinsäure).

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Auswirkungen des Fehlens der abundanten lysosomalen Membranproteine LAMP-1 und LAMP-2 auf die Funktion später Endosomen und Lysosomen untersucht. Der erste Abschnitt befasst sich mit der generellen Charakterisierung der LAMP-defizienten embryonalen Mausfibroblasten. Im zweiten Abschnitt wurden die Auswirkungen der Defizienz der beiden Proteine auf die Cholesterollhomöostase, speziell während des Effluxes von Cholesterol aus spätendosomalen und lysosomalen Vesikeln untersucht. Im dritten Abschnitt wurde die Funktion von LAMP-1 und LAMP-2 in der Phagozytose behandelt. Hierzu wurden Phagozytoseexperimente mit Latexkügelchen durchgeführt.

4.1. Generelle Charakterisierung von LAMP-defizienten embryonalen Mausfibroblasten

Um Funktionen der beiden lysosomalen Membranproteine LAMP-1 und LAMP-2 zu untersuchen, die über die bisher postulierten, eher allgemeinen Aufgaben des Schutzes der lysosomalen Membran vor Degradierung durch lysosomale Enzyme hinausgehen, wurden im Vorfeld dieser Arbeit Mäuse generiert, denen beide LAMP-Proteine (LAMP-1 und LAMP-2) fehlten. Diese Mäuse starben zwischen dem Tag 14,5 und Tag 16,5 der Embryonalentwicklung (Eskelinen et al., 2004). Untersuchungen an embryonalen Mausfibroblasten, die aus LAMP-defizienten Embryonen hergestellt worden waren, zeigten, dass viele Funktionen der Lysosomen unbeeinflusst blieben. So war anscheinend die lysosomale Degradierung von Proteinen nicht verändert. Die lysosomale Hydrolase Cathepsin D wurde in gleichem Maße wie in Kontrollzellen prozessiert (Eskelinen et al., 2004).

Die Überprüfung des Genotyps der in dieser Arbeit verwendeten embryonalen Mausfibroblasten erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz (3.2.2.7) mit LAMP-spezifischen Antikörpern. Hierzu wurden Wildtyp-MEFs, LAMP-1- und LAMP-2-einzeldefiziente, sowie LAMP-doppeldefiziente MEFs auf Glasplättchen kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 4 % PFA in PBS für eine halbe Stunde fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde allen folgenden Lösungen 0,2 % Saponin zugesetzt. Die

Absättigung der freien Aldehydgruppen erfolgte mit 0,12 % Glycin in PBS für 10 min. Es wurde einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden 15 min mit 3 % BSA (w/v) in PBS blockiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde mit dem primären Antikörper wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurde wie der Primärantikörper für 60 min im Dunkeln inkubiert. Die Deckgläschen wurden dreimal mit PBS und einmal mit dest. H₂O gewaschen und anschließend in einem Gemisch aus Mowiol und DABCO (17 % Mowiol, 33 % Glycerin, 50 mg/ml DABCO) eingebettet. Sollten auch die Zellkerne der Zellen angefärbt werden, wurde auf 1 ml 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 im Dunkeln gelagert.

Für die Betrachtung aller fluoreszenzgefärbten Zellen wurde das inverse Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Carl Zeiss, Jena, D) verwendet, das mit der Axio Vision 4.1 beta Version 08.2003 Software bedient wurde.

In der Wildtypzelllinie wurden sowohl mit LAMP-1-, als auch mit LAMP-2-spezifischen Antikörpern vesikuläre Strukturen detektiert, die tendenziell in der Nähe des Zellkerns lokalisiert waren (Abb. 9 A und B).

Es sei darauf hingewiesen, dass bei genauer Betrachtung in einigen dieser Vesikel die begrenzende Membran ringförmig zu erkennen ist, wie es für die Lokalisierung der beiden lysosomal assoziierten Membranproteine LAMP-1 und LAMP-2 typischerweise zu erwarten war.

In den LAMP-1-defizienten MEFs wurde in der Färbung gegen LAMP-1 (Abb. 9 C) kein Signal detektiert. Es war in dieser Färbung lediglich das Signal unspezifischer Hintergrundfärbung in Form der Zellumrisse zu erkennen. Die LAMP-2-Färbung in diesen Zellen (Abb. 9 D) detektierte die Membran vesikulärer Strukturen, die ebenso wie in den Wildtypzellen tendenziell perinukleär waren. In den MEFs, die defizient für LAMP-2 waren, zeigte sich in der Detektion des LAMP-2-Proteins lediglich eine unspezifische Hintergrundfärbung, die die Umrisse der Zellen schwach erkennen ließ (Abb. 9 E). Die Detektion des LAMP-1-Proteins in diesen LAMP-2 defizienten Zellen wies vesikuläre Strukturen nach, die sich nach Zahl und Lokalisierung von der LAMP-1-Färbung in den Wildtypzellen unterschied. Die LAMP-1-positiven Vesikel erschienen kleiner und wesentlich zahlreicher als in den Wildtypzellen. Die Lokalisierung dieser LAMP-1-positiven Vesikel zeigte sich nicht wie in den Wildtypzellen (Abb. 9 A) eher in der Nähe des Zellkerns, sondern vermehrt auch in der Peripherie der Zellen.

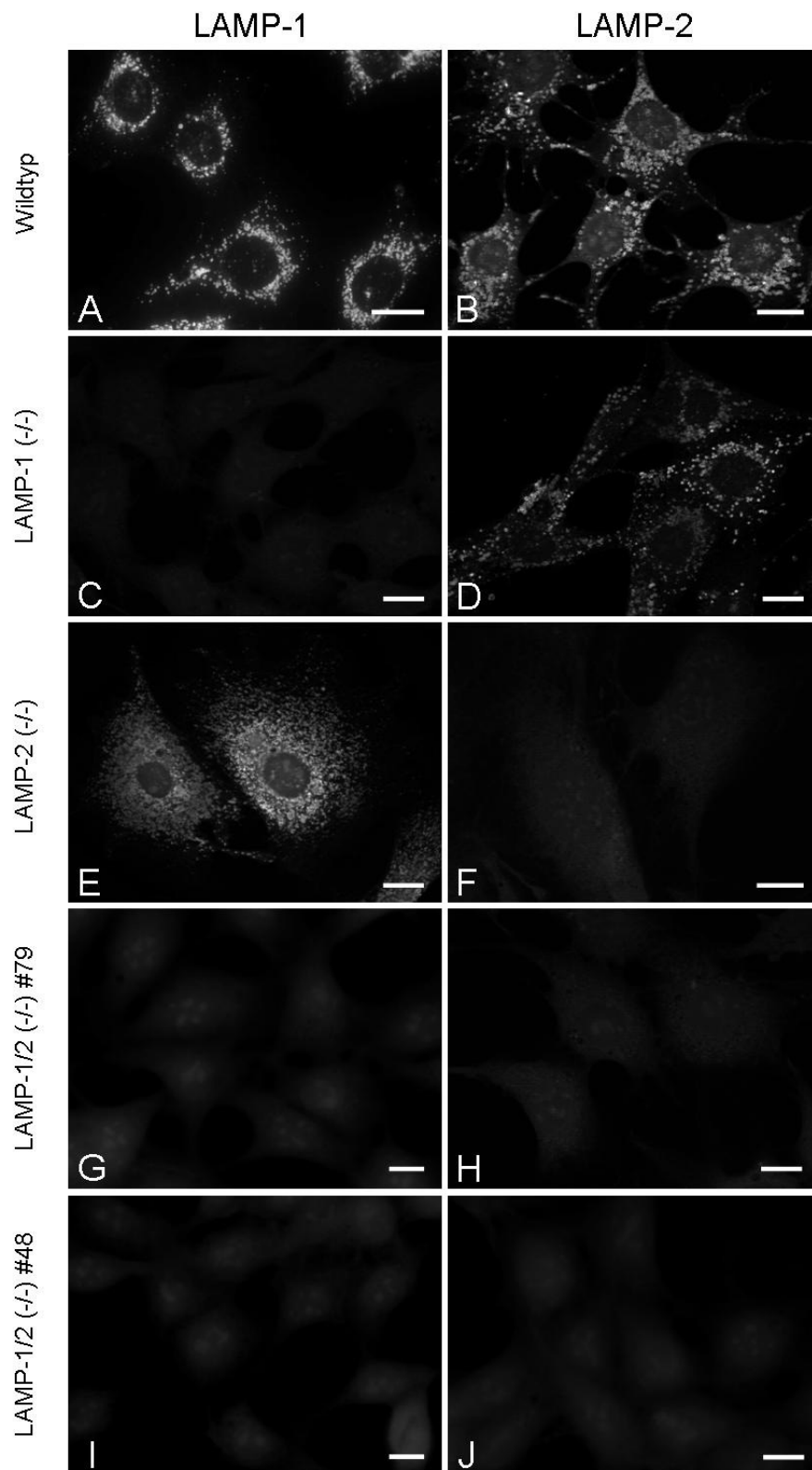


Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung von endogenem LAMP-1 und LAMP-2 in embryonalen Mausfibroblasten Die in dieser Arbeit verwendeten embryonalen Mausfibroblasten wurden auf Glasplättchen kultiviert, mit 4 % PFA in PBS fixiert und mit Primärantikörper gegen LAMP-1 (A, C, E, G und I), bzw. gegen LAMP-2 (B, D, F, H und J) inkubiert (3.2.2.7). Als Sekundärantikörper wurde der α -Ratte AlexaFluor594 verwendet. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μ M.

Zur generellen Charakterisierung der LAMP-defizienten MEFs und zur Überprüfung, ob das Fehlen der LAMP-Proteine Auswirkungen auf den endozytotischen Transport hat, wurde mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie (3.2.2.7) die intrazelluläre Lokalisierung ausgewählter lysosomaler Proteine und der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren überprüft. Hierzu wurden Wildtyp-MEFs, sowie LAMP-einzeldefiziente und LAMP-doppeldefiziente MEFs auf Glasplättchen in 6 well-Platten ausgesät und nach Erreichen 50 %iger Konfluenz mit 4 %iger PFA-Lösung in PBS fixiert. Dem Protokoll der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie (3.2.2.7) folgend wurden die fixierten Zellen mit Primärantikörpern gegen das lysosomale Membranlipid Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP) (Abb. 10 A, C, E, G und I), bzw. das lysosomale Membranprotein CD63 (Abb. 10 B, D, F und H) markiert. In den Färbungen der beiden Marker BMP und CD63 sowohl in den Wildtypzellen, als auch in den verschiedenen LAMP-defizienten Zellen, zeigten sich vesikuläre Strukturen. Bezüglich Signalstärke der Färbungen und Größe der dargestellten Vesikel zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Wildtypzellen und den LAMP-defizienten Zellen. In der Kontrollzelllinie und den LAMP-1-defizienten Zellen schienen die BMP- und CD63-positiven Vesikel jedoch eher perinukleär, in den LAMP-2- und den LAMP-doppeldefizienten Zellen hingegen über die gesamte Fläche der Zelle, so auch in der Peripherie.

Da die Anwesenheit von lysosomalen Proteasen und die gleichzeitige Ansäuerung wichtige Voraussetzungen für das Funktionieren der Lysosomen sind, wurden als weitere lysosomale Marker die lysosomale Protease Cathepsin D, sowie die korrekte Funktion der für die Generierung des sauren pH-Wertes verantwortlichen $v\text{-H}^+$ -ATPase mittels Immunfluoreszenzfärbung (3.2.2.7) untersucht. Die azidotrophe Reagenz *LysoTrackerRed* akkumuliert in Kompartimenten mit niedrigem pH-Wert und wurde daher zur Detektion der Ansäuerung zellulärer Strukturen verwendet. Es zeigte sich dabei sowohl in den Kontrollzellen, als auch in den untersuchten LAMP-defizienten Zellen eine vesikuläre, nahezu vollständige Kollokalisierung von Cathepsin D und *LysoTrackerRed*. In Abbildung 10 C, F, I und L an der durch die Überlagerung (gelb) der in grün dargestellten Lokalisation von Cathepsin D und der in rot von *LysoTrackerRed* zu erkennen ist. Die Zellkerne sind in blau dargestellt.

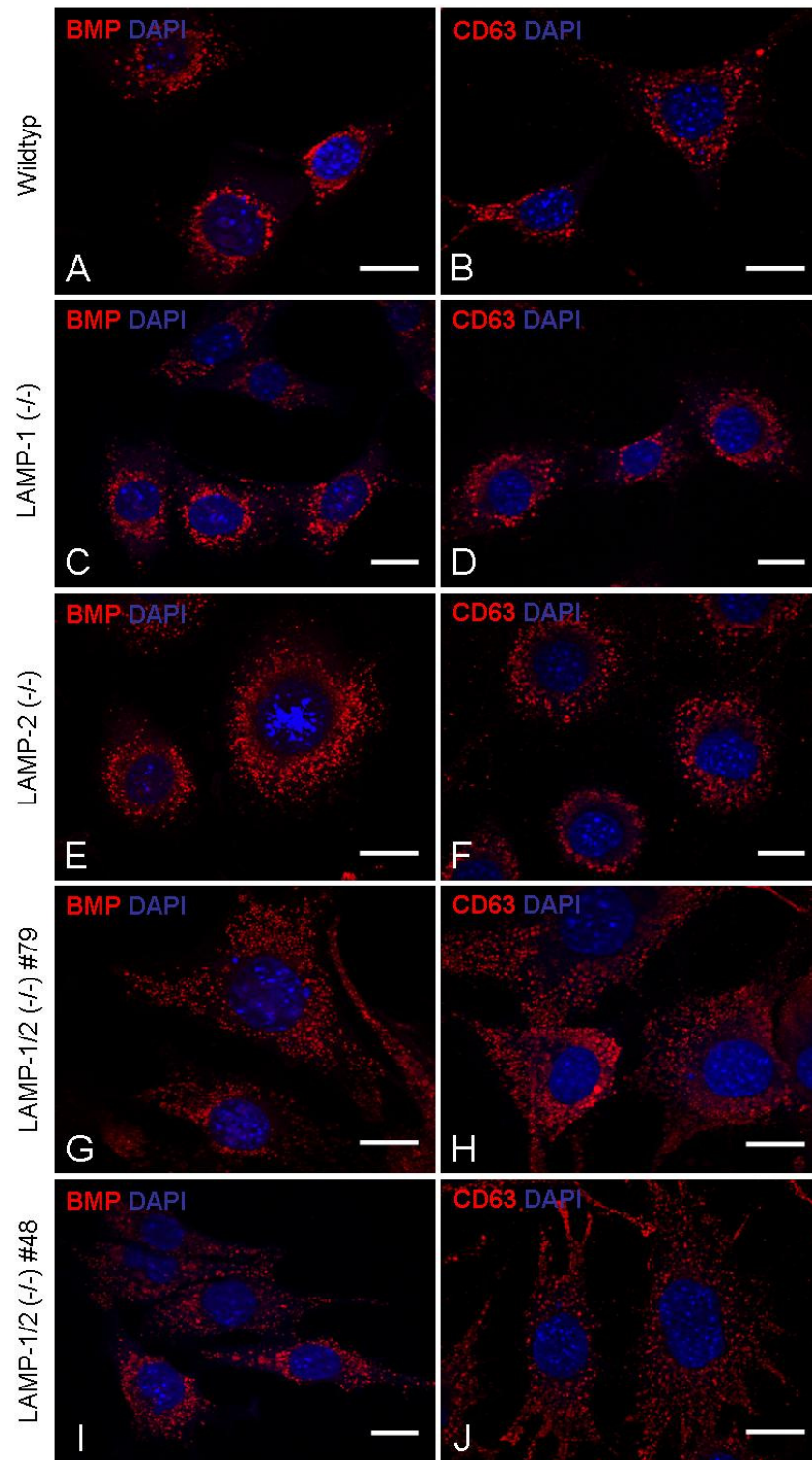


Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung des endo/lysosomalen Membranlipids Bis(monoacylglycero)-phosphat (BMP) und des endo/lysosomalen Membranproteins CD63. Auf Glasplättchen kultivierte embryonale Mausfibroblasten wurden mit 4 % PFA in PBS fixiert und mit Primärantikörper gegen BMP, bzw. CD63 dem Immunfluoreszenzprotokoll (3.2.2.7) folgend inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde der α -Maus AlexaFluor594 für die BMP-Färbung und der α -Kaninchen, AlexaFluor594 für die CD63-Färbungen verwendet. Zur Färbung der Zellkerne wurde der Farbstoff DAPI dem Einbettungsmedium zugefügt (siehe 3.2.2.7). **A, C, E, G und I** zeigen die BMP-Färbungen (BMP in rot, Zellkern Blau), **B, D, F, H und J** die CD63-Färbungen (CD63 rot, Zellkern blau). Der jeweilige Genotyp der abgebildeten Zellen ist links neben der Abbildung notiert. Der Maßstabbalken in A entspricht 10 μ m (gilt für A-J).

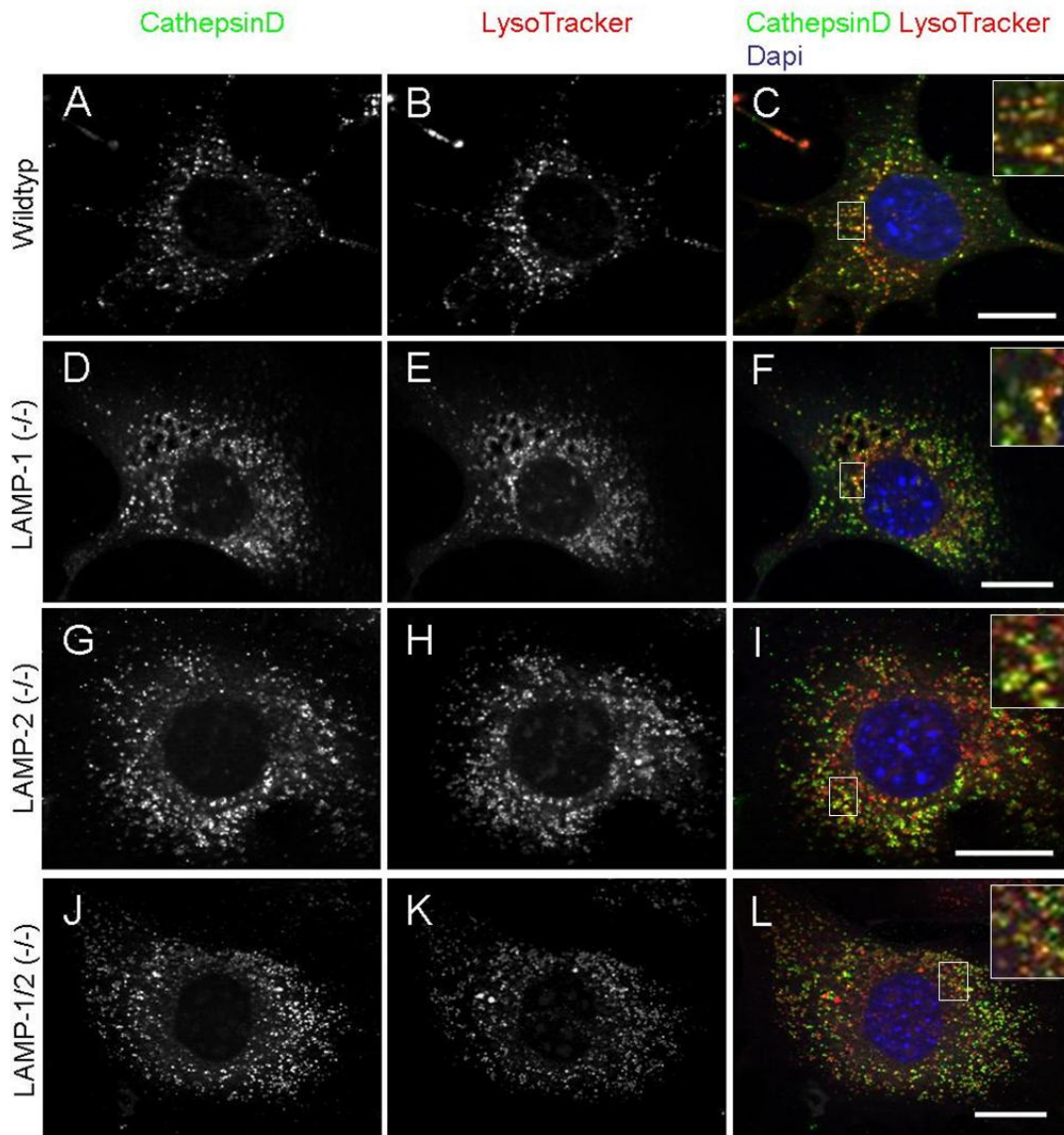


Abbildung 11: Lokalisation der lysosomalen Protease Cathepsin D in sauren Kompartimenten Embryonale Mausfibroblasten wurden auf Glasplättchen kultiviert. Die Kompartimente mit niedrigem pH-Wert wurden durch eine zehnmünütige Inkubation mit LTR-Lösung (*LysoTrackerRed*, Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe, 1:3000 in PBS) markiert und die Zellen dann mit 4 %iger PFA-Lösung in PBS fixiert. Es folgte eine Färbung mittels Immunfluoreszenz (3.2.2.6) mit einem gegen Cathepsin D gerichteten Primärantikörper, der mit dem fluoreszenzgekoppeltem Sekundärantikörper α -Kaninchen, AlexaFluor488 (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe) markiert wurde. Die Zellkerne wurden mittels DAPI-Färbung markiert (3.2.2.7). **A, D, G und J** zeigen die Immunfluoreszenzfärbungen von Cathepsin D; **B, E, H und K** zeigen die Färbung mit *LysoTrackerRed*; in **C, F, I und L** sind die Überlagerungen der beiden Färbungen dargestellt und die DAPI-Färbung der Zellkerne (Cathepsin D grün, *LysoTrackerRed* rot, Zellkerne blau). Links neben der Abbildung ist jeweilige Genotyp der gezeigten Zellen notiert. Der Maßstab balken aus C entspricht 10 μ M und gilt für alle Bilder.

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 (CIMPR) 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 in das 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).

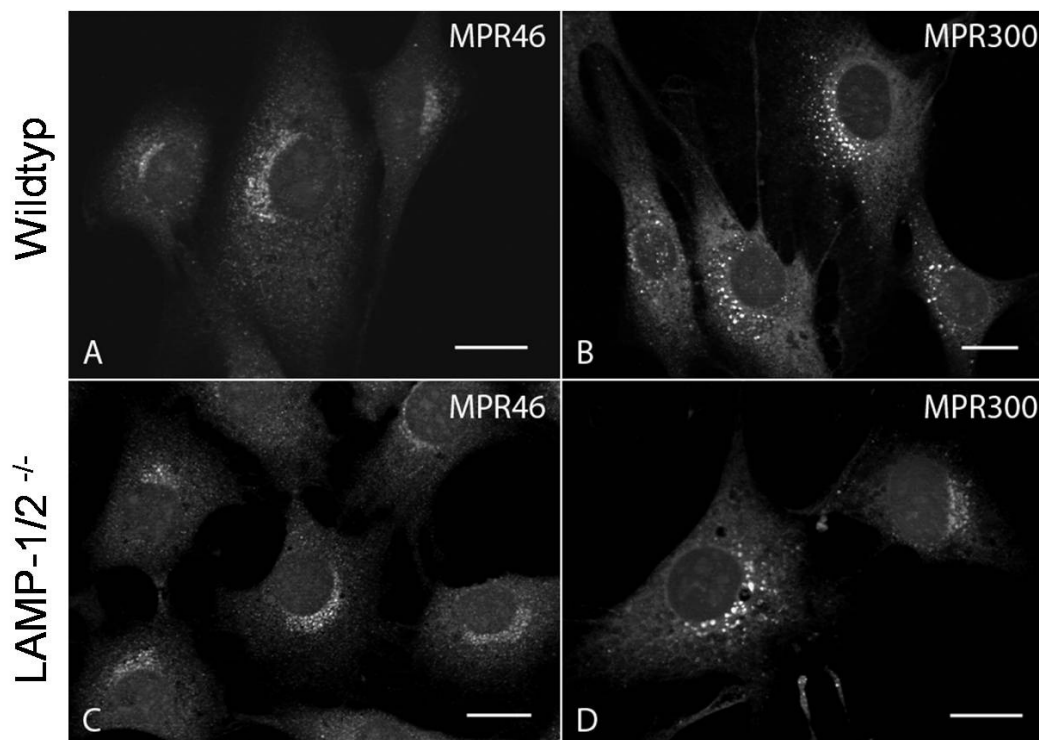


Abbildung 12: Mannose 6-Phosphat-Rezeptoren in Wildtyp-MEFs und LAMP-defizienten MEFs Zur Überprüfung der subzellulären Lokalisation der Mannose 6-Phosphat-Rezeptoren MPR46 und MPR300 wurden Wildtyp-MEFs und LAMP-defiziente MEFs auf Glasplättchen kultiviert und am nächsten Tag mit 4 % PFA fixiert. Zur Detektion der Mannose 6-Phosphat-Rezeptoren mittels indirekter Immunfluoreszenz (3.2.2.6) wurden Primärantikörper aus Kaninchen verwendet, die gegen diese Rezeptoren gerichtet sind. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μ M.

Zur Überprüfung der zellulären Lokalisation der MPRs wurden Wildtyp-MEFs und LAMP-defizienten MEFs auf Glasplättchen ausgesät, am nächsten Tag mit 4 % PFA fixiert und indirekte Immunfluoreszenz (3.2.2.7) mit gegen MPRs gerichteten Primärantikörpern durchgeführt. In den Wildtypzellen wurde der MPR46 sehr deutlich in der perinukleären Region detektiert und in einer feinen Verteilung in punktförmigen Strukturen über die gesamte Fläche der Zelle (Abb. 12 A). Die Verteilung in den LAMP-1/2-defizienten MEFs zeigte exakt das gleiche Muster (Abb. 12 C). Die Markierung der MPR300 war ebenfalls in beiden Zelllinien nicht zu unterscheiden: MPR300 wurde hauptsächlich in der Nähe des Zellkerns in vesikulären Strukturen detektiert (Abb. 12 B und D).

Es konnte keine Störung der subzellulären Lokalisation der MPRs in den LAMP-doppeldefizienten MEFs festgestellt werden. Sowohl in den untersuchten Wildtypzellen als auch den LAMP-defizienten MEFs waren die MPRs höchstwahrscheinlich in den Membranen des Trans-Golgi-Netzwerkes und Endosomen nachgewiesen worden. Aufgrund dieser Tatsache ist der korrekte Transport lysosomaler Komponenten, die MPR-abhängig innerhalb der Zelle transportiert werden, nicht gestört.

4.2. Die LAMP-Proteine und der intrazelluläre Cholesterolverkehr

In Immunfluoreszenzstudien wurde die intrazelluläre Lokalisation der Lysosomen in embryonalen Mausfibroblasten, denen LAMP-1, bzw. LAMP-2 oder beide LAMPs fehlten, mit Wildtypfibroblasten verglichen. In LAMP-2-einzeldefizienten und LAMP-1/2-doppeldefizienten Zellen zeigte sich eine mehr periphere Verteilung der späten Endosomen als in den Zellen der LAMP-1-defizienten und den Wildtypfibroblasten. Die Lysosomen zeigten ansonsten keine Auffälligkeiten bezüglich der Größe der Vesikel, der Ansäuerung und der Stärke der Färbungen ausgesuchter lysosomaler Proteine. Eskelinen und Kollegen untersuchten ergänzend die Dichte von gereinigten Lysosomen aus embryonalen Mausfibroblasten (Eskelinen et al., 2004). Hierbei wurde eine signifikant niedrigere Dichte der Lysosomen aus LAMP-doppeldefizienten Zellen gegenüber denen aus den einzeldefizienten Zellen und den Wildtypzellen festgestellt. Es wurde vermutet, dass eine Akkumulation von Lipiden die lysosomale Dichte verändert hatte. Färbung von freiem Cholesterol mittels Filipin konnte diesen Verdacht bestätigen.

4.2.1. Verteilung des freien Cholesterols innerhalb der Zelle

Das gleichzeitige Fehlen der lysosomalen Membranproteine LAMP-1 und LAMP-2 hat in embryonalen Mausfibroblasten aus bisher wenig verstandenen Gründen eine Akkumulation von freiem Cholesterol in späten Endosomen und Lysosomen zur Folge. Dabei scheinen viele der untersuchten, generellen Funktionen dieser Kompartimente nicht beeinträchtigt zu sein (Eskelinen et al., 2004). In LAMP-1 defizienten MEFs konnte diese Akkumulation des Cholesterols nicht beobachtet werden, wohingegen in LAMP-2 einzeldefizienten MEFs eine leichte Anreicherung freien Cholesterols zu erkennen ist (Eskelinen et al., 2004).

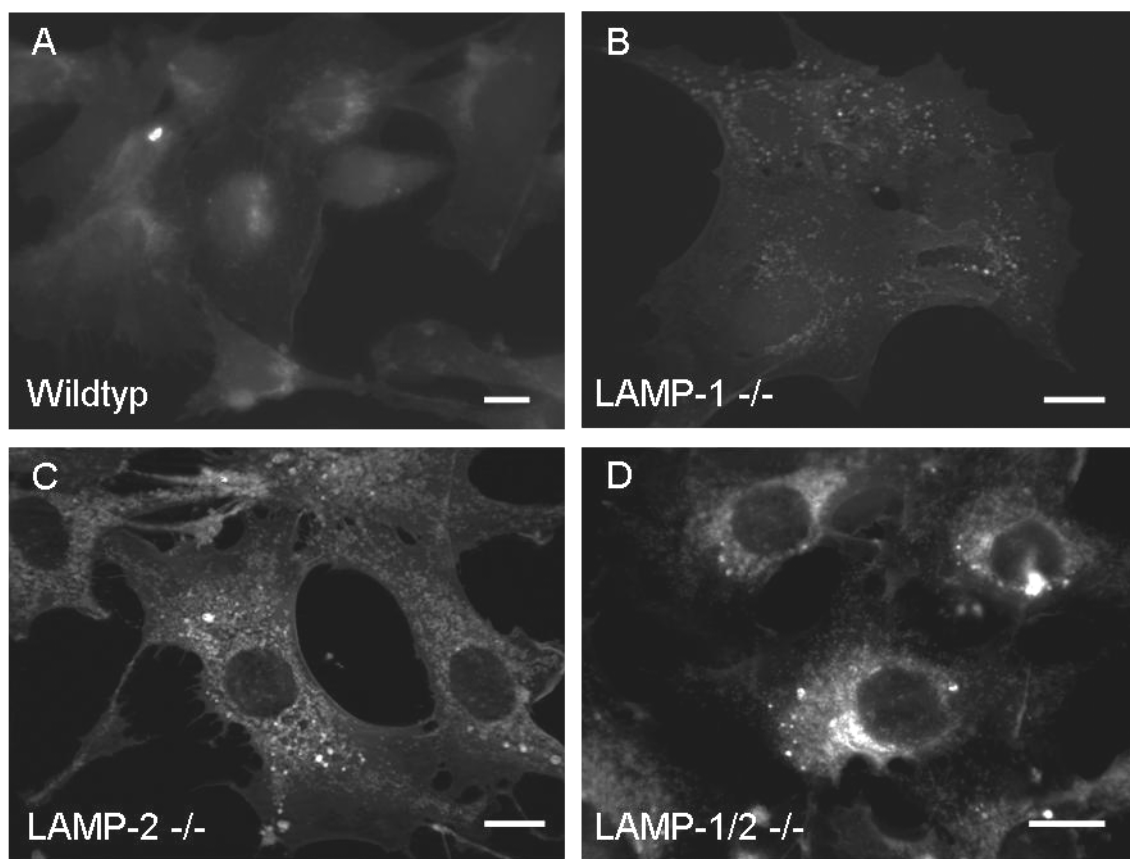


Abbildung 13: Cholesterolverteilung in Mausfibroblasten aus Embryonen, denen LAMP-1, LAMP-2 oder beide LAMPs fehlten, sowie aus Wildtypembryonen. Nach PFA-Fixierung der auf Glasplättchen kultivierten MEFs verschiedener Genotypen wurde das freie Cholesterol unter Verwendung von Filipin (3.2.2.8) angefärbt. **A** zeigt Wildtypzellen, **B** LAMP-1-defiziente, **C** LAMP-2-defiziente und **D** LAMP-1 und LAMP-2 doppeldefiziente Zellen. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 µM.

Dieser Phänotyp wurde in den verwendeten embryonalen Mausfibroblasten unterschiedlicher Genotypen zunächst überprüft, indem Zellen auf Glasplättchen kultiviert wurden, mit 4 %iger PFA-Lösung fixiert und das freie Cholesterol mit Hilfe der Filipinfärbung (3.2.2.8) für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen markiert wurde (Abb. 13).

In Kontrollfibroblasten zeigte sich eine schwache, perinukleär lokalisierte Färbung des freien Cholesterols, sowie eine leichte Färbung der Plasmamembran. Ein vergleichbares Färbungsmuster zeigt sich in den LAMP-1-defizienten MEFs. Hingegen ist bei gleicher Belichtungszeit in den LAMP-2-defizienten Zellen eine stärkere Filipinfärbung zu sehen, die auf eine Akkumulation freien Cholesterols hindeutet. Auch die Verteilung innerhalb der Zelle ist nicht streng auf den Bereich um den Zellkern und die Plasmamembran beschränkt, sondern zeigt sich zudem in vesikulären Strukturen auch in Richtung der Peripherie der Zelle hin. Ebenfalls bei gleicher Belichtungszeit aufgenommene Bilder der Zellen, denen beide LAMP-Proteine fehlen, zeigen eine sehr starke Cholesterolakkumulation in Vesikeln, die über die Zelle verstreut sind und stärker erschien als in den LAMP-2-einzeldefizienten Zellen.

4.2.2. Dünnschichtchromatografische Auftrennung gereinigter Lipide

Die Cholesterolakkumulation in LAMP-doppelfdefizienten MEFs und die Menge anderer Lipide wurde in weiteren Experimenten quantifiziert. Mittels dünnschichtchromatografischer Auftrennung wurden die Lipide, die aus Wildtyp-MEFs und aus LAMP-defizienten MEFs mit Chloroform:Methanol:Wasser (2:5:1, v/v/v) bei 37 °C für 24 h extrahiert worden waren, analysiert. Die gleichen Mengen Protein wurden in jede Spur der Dünnschichtplatte aufgetragen (Abb. 14 A). Die Lipide wurden in einem Gemisch aus Chloroform/Methanol/Eisessig (190:9:1) aufgetrennt. Die aufgetrennten Lipide durch Besprühen mit einer wässrigen Lösung mit 8 % H_3PO_4 und 10 % CuSO_4 und einer Inkubation für 10 Minuten bei 180 °C entwickelt. Die Banden wurden densitometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm quantifiziert (Shimadzu CS 9301 PC, Kyoto, Japan) (Abb. 14 B).

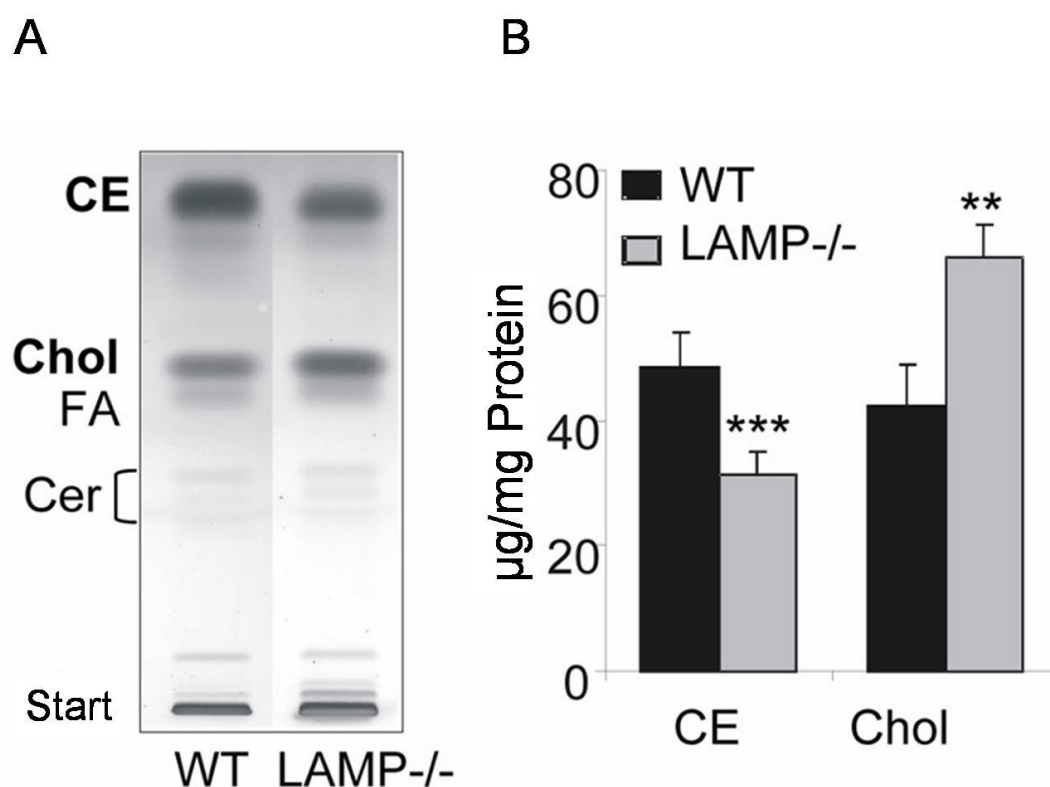


Abbildung 14: Dünnschichtchromatografische Auftrennung der Lipide, die aus Wildtyp-MEFs und LAMP-defizienten MEFs aufgereinigt worden waren. **A** Mittels dünnschichtchromatografischer Auftrennung wurden die Lipide, die aus Wildtyp-MEFs (WT) und aus LAMP-defizienten MEFs (LAMP^{-/-}) mit Chloroform:Methanol:Wasser (2:5:1, v/v/v) bei 37°C für 24 h extrahiert worden waren, analysiert. Die gleichen Mengen Protein wurden in jede Spur der Dünnschichtplatte aufgetragen. **B** Die Banden wurden densitometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm quantifiziert. Die Experimente wurden in Kollaboration mit Konrad Sandhoff, Universität Bonn, durchgeführt.

Die Quantifizierung der aufgereinigten und dünnschichtchromatografisch aufgetrennten Cholesterolester (Abb. 14 A und B, CE) aus Wildtyp-MEFs (Abb. 14 A und B, WT) und LAMP-defizienten MEFs (Abb. 14 A und B, LAMP^{-/-}) zeigte eine Reduktion in LAMP-defizienten MEFs gegenüber den Wildtypzellen. In den LAMP-defizienten MEFs waren lediglich 65 % der Menge an Cholesterolestern verglichen mit dem Wildtyp vorhanden. Die von freiem Cholesterol hingegen war in den LAMP-defizienten MEFs gegenüber dem Wildtyp um den Faktor 1,6 erhöht. Dieser Befund bestätigte die Ergebnisse der Filipinfärbungen von Wildtyp-MEFs und LAMP-defizienten MEFs, in denen eine stärkere Färbung freien Cholesterols in den LAMP-defizienten MEFs festgestellt worden war.

Zur metabolischen Markierung von neusynthetisierten Lipiden wurden Fibroblasten mit [1-¹⁴C]acetate (61 Ci/mol; 1 µCi/ml, Amersham Corp., Braunschweig, Germany) in

Kulturmedium (0.3 % FKS) für 48 h inkubiert. In jeder Spur der Dünnschichtchromatografieplatte wurden gleiche Mengen Radioaktivität aufgetragen (Abb. 15 A). Die radioaktiven Banden wurden mit einem Bio Imaging Analyser 1000 (Fuji, Japan) sichtbar gemacht und mittels der Tina software (Raytest, Staubenhardt, Germany) quantifiziert (Abb. 15 B).

In der Spur 1 der Abbildung 15 wurden die aus Wildtypzellen aufgereinigten Lipide aufgetrennt, in der Spur 2 die Lipide aus den LAMP-defizienten Zellen. Die als Cholesterolester (CE) identifizierte Bande war in der Spur 1 (WT) bedeutend stärker als bei den LAMP-doppeldefizienten Zellen (Spur 2). Die Quantifizierung der Bandenstärken ergab für die Cholesterolester aus Wildtypzellen eine ca. 10fach höhere Menge als in den LAMP-defizienten Zellen. Im Gegensatz dazu war die Bande des freien Cholesterols (Chol) in der Spur 2 der LAMP-defizienten stärker als in der Spur 1 der Wildtypzellen. Nach Quantifizierung dieser Banden konnte eine Verdoppelung der Menge an freiem, unverestertem Cholesterol in den LAMP-defizienten Zellen bestimmt werden. Bei den übrigen Banden, die als Di- und Triacylglyceride (DAG und TAG), sowie als freie Fettsäuren (FFA) identifiziert worden waren, konnte, insbesondere bei den Triacylglyceriden, eine leicht höhere Menge in den Wildtypzellen detektiert werden.

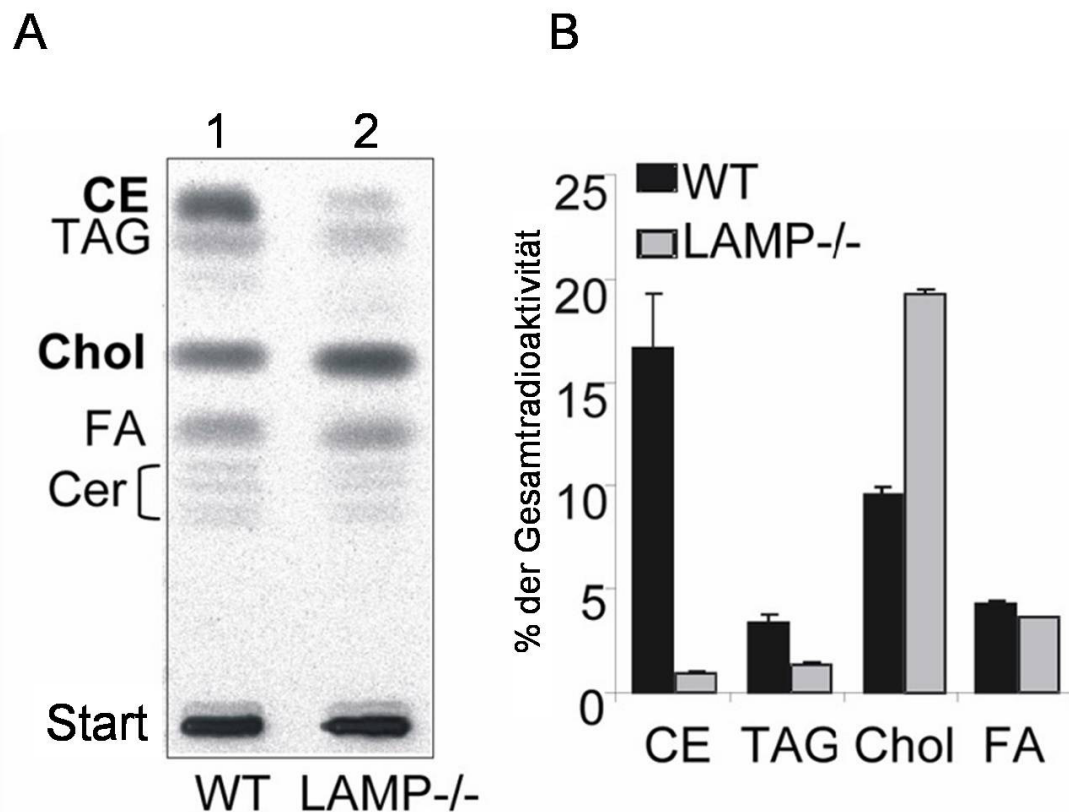


Abbildung 15: Quantifizierung der metabolisch C14-markierten Lipide. Kontrollzellen (WT, Spur 1) und LAMP-doppeldefiziente MEFs (LA1/LA2 $-/-$, Spur 2) wurden für 24 h mit ^{14}C -Acetat markiert. Die Lipide wurden extrahiert, dünnschichtchromatografisch (A) analysiert und die Stärke der sichtbaren Banden quantifiziert (B). CE Cholesterolester, TAG Triacylglyceride, DAG Diacylglyceride, Chol unverestertes Cholesterol, FFA freie Fettsäuren. Die Experimente wurden in Kollaboration mit Konrad Sandhoff, Universität Bonn, durchgeführt.

4.2.3. Lipidtröpfchen als Speicherort der veresterten Lipide in LAMP-doppeldefizienten embryonalen Mausfibroblasten

In LAMP-doppeldefizienten MEFs konnte mittels Filipinfärbung und nachfolgender Fluoreszenzmikroskopie die Akkumulation freien Cholesterols erkannt werden. In der dünnschichtchromatografischen Auftrennung aus embryonalen Mausfibroblasten extrahierter Lipide konnte diese Akkumulation bestätigt werden und zudem gezeigt werden, dass die Menge an Cholesterolestern im Vergleich zu Wildtypzellen stark reduziert war. Neutrale Lipide, wie Cholesterolester und die Di- und Triglyceride, werden nach ihrer Veresterung im endoplasmatischen Retikulum (ER) in sogenannten Lipidtröpfchen im Cytosol gespeichert (Ohsaki Y., 2008). Mit Hilfe der Nilrotfärbung lassen sich diese für die

Fluoreszenzmikroskopie anfärben (3.2.2.8). Hierzu wurden auf Glasplättchen kultivierte und PFA-fixierte MEFs für eine Stunde mit einer Nilrot-Lösung inkubiert und nach Einbettung in einem Mowiol/Dabco-Gemisch unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die neutralen Lipide werden in sogenannten Lipidtröpfchen in der Zelle gespeichert und erschienen in der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung als vesikuläre Strukturen (Abb. 16). In den Wildtypzellen (Abb. 16 A) waren diese in Übereinstimmung mit dem dünnschichtchromatografischen Befund in zahlreichen Zellen zu sehen.

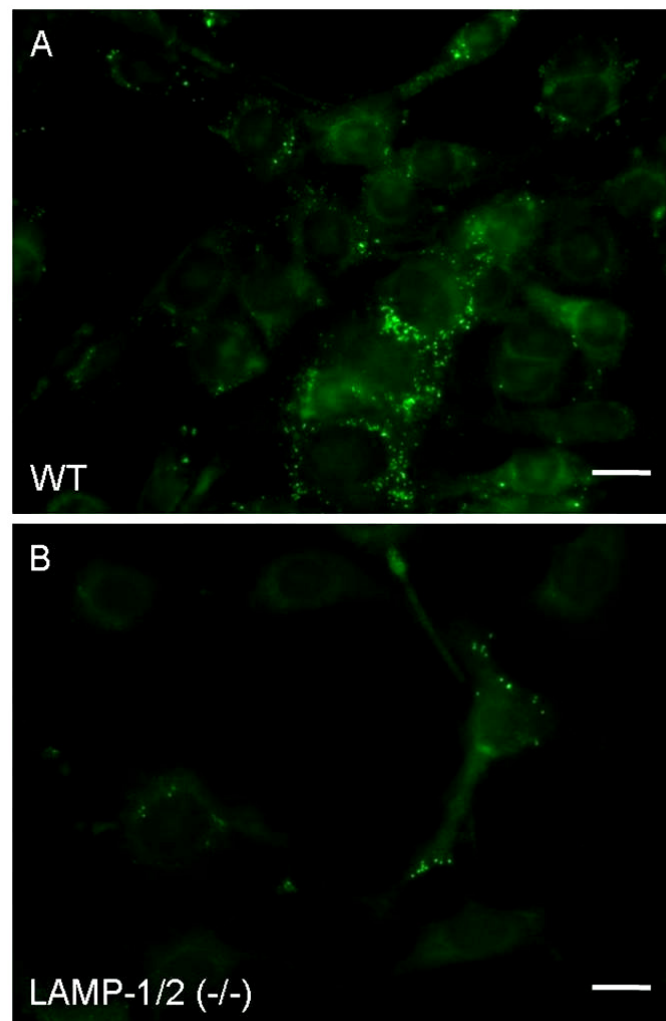


Abbildung 16: Verteilung der neutralen Lipide in Lipidtröpfchen. Murine Mausfibroblasten einer Wildtyplinie (A, Wildtyp) und einer LAMP-doppeldefizienten Linie (B, LAMP-1/2 (-/-)) wurden auf Glasplättchen ausgesät und die Neutrallipide am nächsten Tag mit Nilrot gefärbt (3.2.2.9).

Unter den LAMP-defizienten Zellen waren bedeutend weniger Zellen mit angefärbten Lipidtröpfchen. Zudem war auch die Anzahl der Lipidtröpfchen pro Zelle in den defizienten Zellen stark reduziert. Zur Quantifizierung dieses Befundes wurden Wildtyp- und LAMP-defiziente Zellen ausgezählt, die eine Färbung der Lipidtröpfchen zeigten und die Ergebnisse der Zählungen grafisch aufgetragen. Es zeigte sich, dass in ca. 70 % der Wildtypzellen Lipidtröpfchen zu sehen waren, in den LAMP-defizienten MEFs lediglich in ca. 20 % der Zellen (Abb. 17).

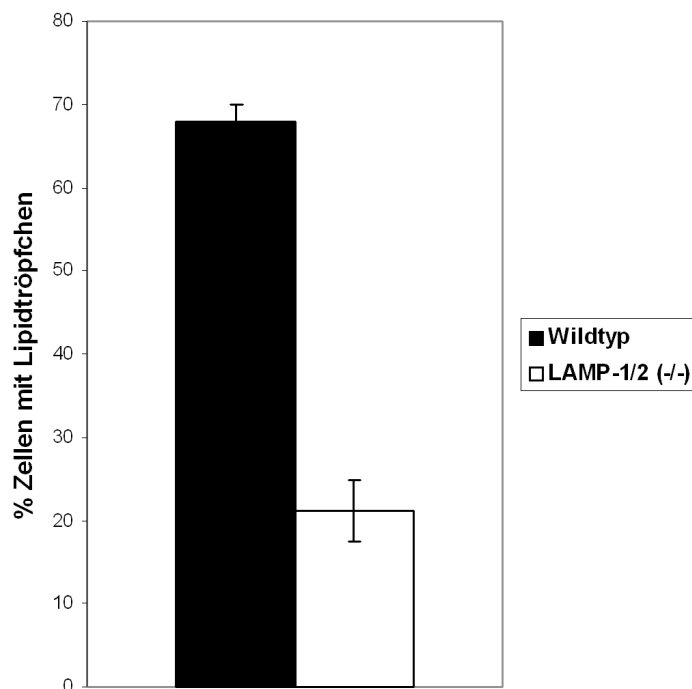


Abbildung 17: Quantifizierung der Zellen mit Lipidtröpfchen. Murine Mausfibroblasten einer Wildtypzelllinie (WT) und einer LAMP-doppeldefizienten Zelllinie (LAMP-1/2 (-/-)) wurden auf Glasplättchen ausgesät und die Neutrallipide am nächsten Tag mit Nilrot gefärbt (3.2.2.9). Es wurden dann aus drei unabhängigen Experimenten die Zellen mit Lipidtröpfchen ausgezählt und die Ergebnisse von Wildtypzellen (n=65, 139, 120) und LAMP-doppeldefizienten MEFs (jeweils n=200) verglichen. In Wildtypzellen zeigten ca. 68 % der Zellen (Standardabweichung ± 2) Lipidtröpfchen und in LAMP-defizienten ca. 21 % (Standardabweichung ± 4).

4.2.4. Unverestertes Cholesterol akkumuliert in der Leber LAMP-2-defizienter Mäuse

Die Leber steht im Mittelpunkt des Lipidstoffwechsels. Um zu testen, ob LAMP-2 in der Leber in ähnlicher Weise in den Cholesteroltransport involviert ist, wie es in Mousfibroblasten der Fall zu sein schien, wurde die Cholesterolakkumulation, sowie das Vorhandensein von verestertem Cholesterol in Lipidtröpfchen in Lebern von Wildtyp- und von LAMP-defizienten Mäusen untersucht. Hierzu wurden Mäuse mit PBS vorperfundiert und mit

4 % PFA in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4) fixiert. Die entnommenen Lebern wurden 2 h bei 4 °C nachfixiert. Es folgte eine Inkubation der Gewebe in 30 % Succrose/0.1 M PB über Nacht. Die Organe wurden auf dem zuvor mit Trockeneis vorgekühlten Schnitttisch des Microtoms auf einer Schicht fünfprozentiger Succrose festgefroren. Die erhaltenen Kryoschnitte (30 µm) wurden nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer zur Markierung von freiem Cholesterin in einer Filipinlösung (0,5 mg/ml in PBS), bzw. zur Markierung von Neutrallipiden in einer Nilrotlösung (5 µg/ml in PBS) eine Stunde unter sanftem Schütteln und Lichtausschluss inkubiert, bevor die Einbettung erfolgte.

Zum Einbetten wurden die Schnitte mit dem Pinsel auf Objektträger (Superfrost, Brand) aufgebracht, in Einbettmedium (Fluoromount) eingebettet und mit einem Glasplättchen abgedeckt.

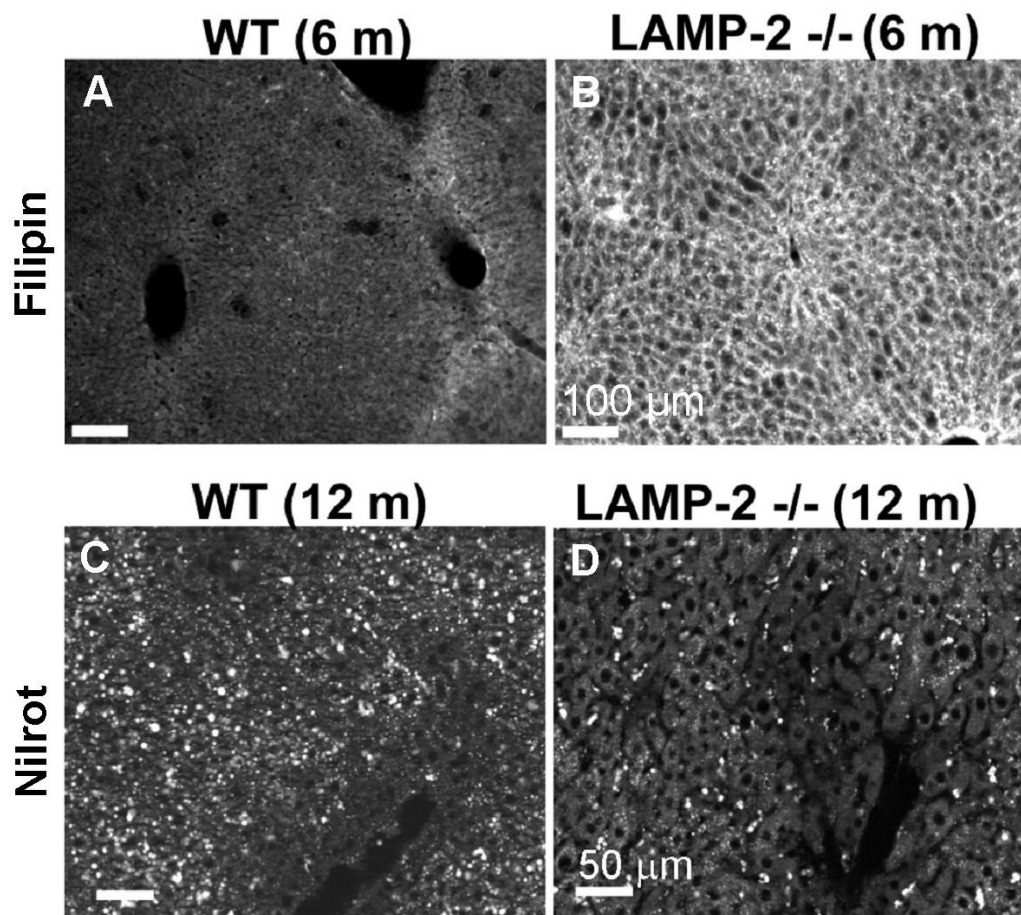


Abbildung 18: Unverestertes Cholesterin und Cholesterolester in der Leber. Wildtypmäuse und LAMP-2-defiziente Mäuse wurden mit PBS vorperfundiert und mit 4 % PFA fixiert. Die präparierten Lebern wurden bei 4 °C für 2 Stunden nachfixiert und über Nacht in 30 % Succrose/0.1 M PB bei 4 °C inkubiert. Die mit Hilfe des Mikrotoms hergestellten Kryoschnitte (30 µm) wurden nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer zur Markierung von freiem Cholesterin in einer Filipinlösung (A und B; 0,5 mg/ml in PBS), bzw. zur Markierung von Neutrallipiden in einer Nilrotlösung (C und D; 5 µg/ml in PBS) eine Stunde unter sanftem Schütteln und Lichtausschluss inkubiert, bevor die Einbettung erfolgte.

In den filipin-gefärbten Lebern von Wildtyp-Tieren zeigte sich eine schwache Anfärbung freien Cholesterols (Abb. 18 A). Im Gegensatz dazu war in den Lebern, wahrscheinlich besonders in den Hepatozyten der LAMP-defizienten Mäuse eine wesentlich stärkere Anfärbung zu sehen, die auf eine Cholesterolakкумуляtion in diesem Organ hinweisen (Abb. 18 B).

In den LAMP-defizienten Mausfibroblasten hatte sich neben der Akkumulation von freiem Cholesterol eine gleichzeitige drastische Abnahme der Cholesterolester in Lipidtröpfchen gezeigt. In den mit Nilrot gefärbten Lebern der Wildtyp-Tiere waren die Lipidtröpfchen als kräftige Anfärbung runder Strukturen zu erkennen (Abb. 18 C). In den Lebern LAMP-2-defizienter Mäuse waren hingegen deutlich weniger Lipidtröpfchen vorhanden (Abb. 18 D).

Die Ergebnisse der Cholesterol- und der Lipidtröpfchenanfärbung in Lebern der Wildtyp- und der LAMP-2-defizienten Mäuse, deuteten also ebenfalls auf eine Störung der Cholesterolhomöostase und damit auf eine Rolle von LAMP-2 im intrazellulären Cholesteroltransport hin, wie es in den Mausfibroblasten der Fall gewesen war.

4.2.5. Charakterisierung der Filipin-positiven Vesikel

Um die Vesikel, in denen das unveresterte Cholesterol in den LAMP-1/2-doppeldefizienten MEFs akkumulierte, näher zu charakterisieren, wurden Doppelfärbungen mit Filipin und lysosomalen Proteinen für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie (3.2.2.7) durchgeführt. Ein Charakteristikum von späten Endosomen und Lysosomen stellt der durch die v-H⁺-ATPase generierte saure pH-Wert da. Auch können die über den endozytotischen Weg aufgenommenen Cholesterolester nur unter sauren Bedingungen durch die saure Lipase in freies, unverestertes Cholesterol und freie Fettsäuren hydrolysiert werden. In der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie kann das Dinitrophenylderivat DAMP, eine schwache Base, zur Detektion saurer Kompartimente verwendet werden (Wang, R. et al., 2006). Während einer halbstündigen Inkubation von auf Glasplättchen kultivierten Zellen mit DAMP-haltigem Zellkulturmedium diffundiert das membrangängige DAMP in die Zellen und wird in sauren Kompartimenten zu dem nicht-membrangängigen Dinitrophenol (DNP) protoniert. DNP kann in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie mittels spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Es zeigte sich in der Untersuchung LAMP-doppeldefizienter MEFs, dass in einem Großteil der cholesterolakkumulierenden Vesikel ein saures Milieu herrscht (Abb. 19 A, B und C): Die Filipin-positiven Vesikel (Abb. 19 B) waren größtenteils DNP-positiv (Abb. 19 A), wie sich in der Überlagerung der beiden Färbungen (Abb. 19 C) zeigte.

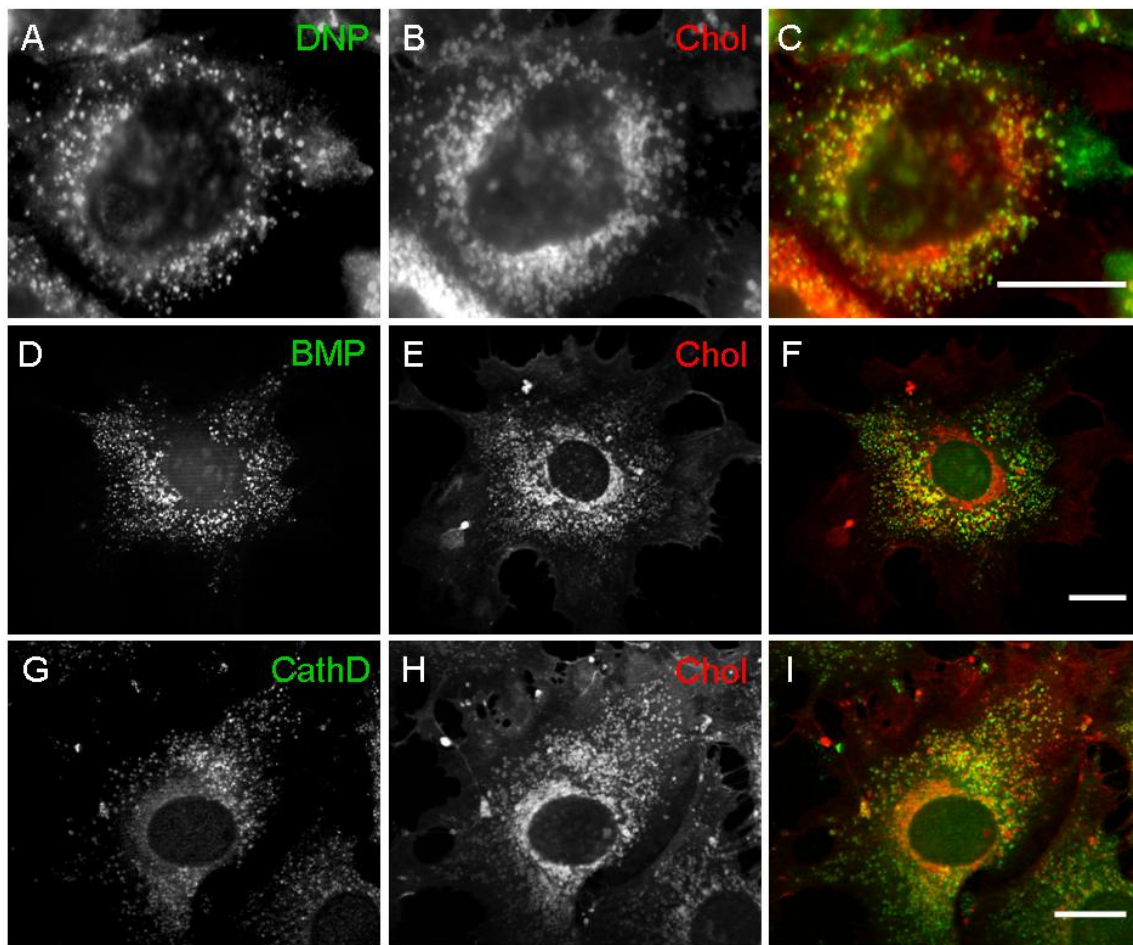


Abbildung 19: Charakterisierung der Filipin-positiven Vesikel. Zur Charakterisierung der cholesterolakkumulierenden Vesikel wurden Doppelfärbungen mit Filipin und lysosomalen Markern durchgeführt. Hierzu wurden LAMP-doppeldefiziente MEFs auf Glasplättchen kultiviert und das freie Cholesterol mittels Filipinfärbung (**B, C, E, F, H** und **I**, siehe auch 3.2.2.8), sowie die Ansäuerung (**A** und **C**) unter Verwendung der membrangängigen, schwachen Base DAMP, die unter sauren Bedingungen zu dem Dinitrophenol (DNP) protoniert wird (3.2.2.11). Des Weiteren wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz (3.2.2.7) das lysosomale Membranlipid BMP (**D** und **F**) und die lysosomale Protease Cathepsin D (**G** und **I**) detektiert. Die Maßstabsbalken in **G, F** und **I** entsprechen 10 μM .

Ein weiterer lysosomaler Marker ist das Membranlipid Bis(monoacylglycero)phosphat, kurz BMP. In der Überlagerung von Immunfluoreszenzaufnahmen, in denen BMP (Abb. 19 D), bzw. Cholesterol mittels Filipinfärbung (Abb. 19 E) dargestellt worden waren, zeigte sich auch hier eine Überlagerung (Abb. 19 F). Als dritte Färbung eines spätendosomal und lysosomal lokalisierten Markers wurde die Protease Cathepsin D detektiert. Es zeigte sich auch hier eine große Übereinstimmung in der Lokalisation von freiem Cholesterol und späten Endosomen/Lysosomen (Abb. 19 G-I).

Zusammengefasst zeigten die cholesterolakkumulierenden Vesikel der LAMP-doppeldefizienten MEFs also Charakteristika später Endosomen und Lysosomen (Abb. 19 C, F und I).

4.2.6. NPC2-Lokalisation in embryonalen Mausfibroblasten

Nachdem eine starke Kolo­kalisierung des akkumulierten, freien Cholesterols mit spätendosomal­en/lysosomal­en Markern festgestellt werden konnte, wurde in einem weiteren Experiment mittels indirekter Immunfluoreszenz das im Cholesterolstoffwechsel involvierte Protein NPC2 detektiert. NPC2 ist neben NPC1 eines der beiden Proteine, dessen Fehlen oder fehlerhafte Expression zur der Erkrankung Niemann Pick Typ C führt (Vanier, M. T. und Millat, G., 2003). Ähnlich wie in den LAMP-defizienten MEFs akkumuliert in Fibroblasten von Niemann-Pick-Patienten freies Cholesterol in späten Endosomen (Mukherjee, S. und Maxfield, F. R., 2004; Vance, J. E., 2006). Beide Proteine sind in späten Endosomen lokalisiert und für den Efflux freien Cholesterols aus diesen Kompartimenten unabdingbar (Storch und Cheruku, 2005). Während NPC1 ein membrandurchspannendes Protein ist, stellt NPC2 ein lösliches Protein dar. Beide können direkt freies Cholesterol binden (Infante et al., 2007). Der genaue Mechanismus, durch den die NPC-Proteine in den intrazellulären Cholesteroltransport eingreifen, ist bislang jedoch weitestgehend unbekannt.

Die Lokalisierung von NPC1 in LAMP-doppeldefizienten MEFs wurde bereits gezeigt (Eskelinen et al., 2004). Während in Wildtyp-MEFs NPC1-Färbungen ein feines, punktförmiges Muster hatte und nicht mit filipingefärbtem Cholesterol kolo­kalisierte, wurde NPC1 in vielen LAMP-defizienten MEFs in vergrößerten, ringförmigen cholesterolbeladenen Strukturen nachgewiesen.

Zur Überprüfung der subzellulären Lokalisation von NPC2 in LAMP-defizienten embryonalen Mausfibroblasten wurden Wildtyp-MEFs und LAMP-defiziente MEFs auf Glasplättchen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die LAMP-defizienten MEFs mit murinem LAMP-2A transfiziert. Das endogene NPC2 und das endogene LAMP-2 in den Wildtyp-MEFs, bzw. das transfizierte LAMP-2 in den LAMP-defizienten MEFs wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz (3.2.2.7) nachgewiesen. Hierzu wurden die Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Bouin's Fixierlösung (Pikrinsäure, Formalin, Eisessig, 15:5:1, 25 % in PBS) fixiert. Die Detektion des NPC2 erfolgte mit dem in Kaninchen hergestellten α -NPC2-Primärantikörper in einer Koinkubation mit gegen murines LAMP-2 gerichteten Primärantikörper aus Ratte. Als Sekundärantikörper wurde der α -Kaninchen

AlexaFluor594 für die NPC2-Färbungen und der α -Ratte AlexaFluor594 für die LAMP-2-Färbung verwendet.

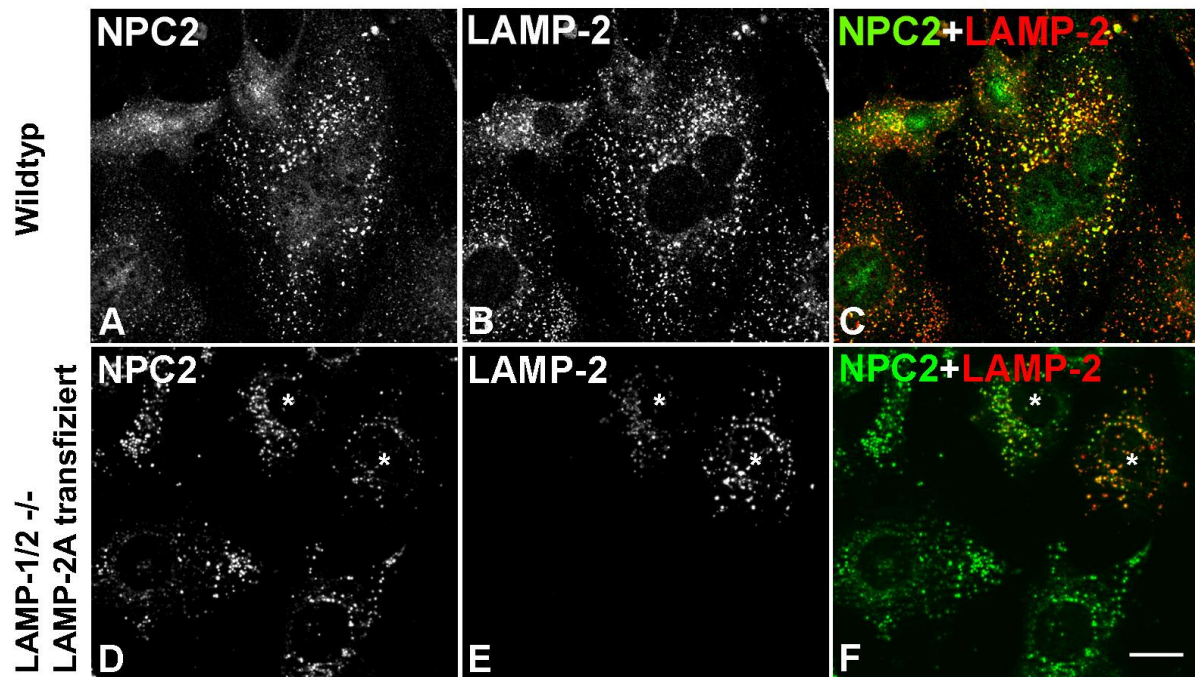


Abbildung 20: NPC2-Lokalisation in Wildtyp- und LAMP-doppeldefizienten MEFs. Wildtyp-MEFs und LAMP-doppeldefizienten MEFs wurden auf Glasplättchen kultiviert, transient mit dem LAMP-2A-Expressionsplasmid transduziert und mit *Bouin's* Fixierlösung (Pikrinsäure, Formalin, Eisessig, 15:5:1, 25 % in PBS) fixiert. Es wurde eine Doppelfärbung von NPC2 (grün) und LAMP-2 (rot) vorgenommen. Kolokalisation der beiden Proteine ist in gelb dargestellt. Asterixe markieren die transduzierten Zellen, der Maßstabsbalken in F entspricht 10 μ M und gilt für A bis F.

Sowohl in den Wildtyp-Zellen, als auch in den LAMP-defizienten Zellen lokalisierte NPC2 in vesikulären Strukturen (Abb. 20 B und C). Die Expression von LAMP-2A führte in den transduzierten LAMP-defizienten MEFs zu keiner Veränderung der subzellulären Lokalisation von NPC2. Sowohl in Wildtypzellen als auch in den transduzierten LAMP-defizienten Zellen kolokalisierte NPC2 mit LAMP-2.

4.2.7. Cholesterol-rescue nach Expression von LAMP-1 und LAMP-2

Die in LAMP-doppeldefizienten MEFs festgestellte Akkumulation unveresterten Cholesterols konnte in weniger starkem Ausmaß auch in LAMP-2-einzeldefizienten MEFs nachgewiesen werden, nicht jedoch in den LAMP-1-defizienten Zellen. Daraus ergab sich die Frage, ob

auch nur eine Überexpression des LAMP-2-Proteins in den doppeldefizienten MEFs die Akkumulation reduzieren kann, oder auch die des strukturverwandten LAMP-1-Proteins. Hierzu wurden LAMP-doppeldefiziente MEFs auf Glasplättchen kultiviert und entweder mit dem Expressionsplasmid für murines LAMP-1 oder für murines LAMP-2A transfiziert. Nach 48 Stunden Expression wurden die Zellen mit 4% PFA in PBS fixiert, das freie Cholesterol mittels Filipinfärbung (3.2.2.8) angefärbt (Abb. 21 A und D) und die Expression der LAMP-Proteine in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie (3.2.2.7) nachgewiesen (Abb. 21 B und E). Zur Überprüfung der korrekten lysosomalen Lokalisierung der überexprimierten Proteine wurden zusätzliche Doppelfärbungen der LAMPs mit dem lysosomalen Membranlipid Bis(Monoacylglycero)phosphat BMP durchgeführt (Abb. 21 C und F).

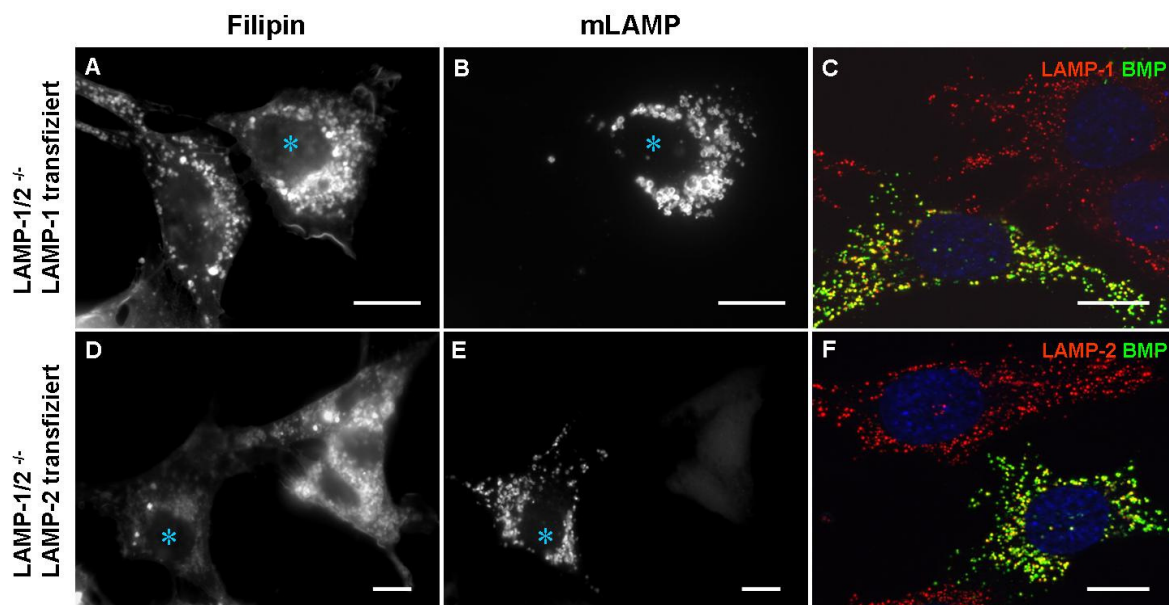


Abbildung 21: Effekt der Expression von LAMP-1 und LAMP-2 auf die Akkumulation freien Cholesterols in LAMP-doppeldefizienten MEFs. LAMP-1/2 doppeldefiziente MEFs wurden auf Glasplättchen ausgesät und am folgenden Tag mit LAMP-1- bzw. LAMP-2A-Expressionsplasmiden transfiziert. Nach 48 h Expression wurden die Zellen fixiert und gegen die LAMP-Proteine (A LAMP-1, D LAMP-2), sowie das freie Cholesterol mit Filipin (B und E) gefärbt. Zur Kontrolle der lysosomalen Lokalisation wurden Doppelfärbungen der überexprimierten LAMP-Proteine (rot) mit dem lysosomalen Membranlipid Bis(Monoacylglycero)phosphat (BMP, grün) durchgeführt (C und F). Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (C und F, blau). Die Maßstabsbalken entsprechen 10 µM.

In Abb. 21 A sind LAMP-defiziente MEFs gezeigt, von denen die mit * markierte Zelle mit LAMP-1 transfiziert worden war und keinen Rückgang der Cholesterollakkumulation zeigte. Zellen, die wie die in Abbildung 21 D mit * markierte Zelle, die mit LAMP-2A transfiziert worden waren, zeigten hingegen einen *rescue*-Effekt, d.h. eine deutliche Reduktion von freiem, filipinfärbbarem Cholesterol.

Es zeigte sich also, dass, wie aus dem jeweiligen Phänotyp der einzeldefizienten Zellen zu erwarten war, nur die Wiedereinführung von LAMP-2, nicht aber die von LAMP-1 in die doppeldefizienten MEFs zu einer Reduktion der Akkumulation freien Cholesterols führte.

4.2.8. Identifizierung der in den Cholesterolstoffwechsel involvierten Domäne von LAMP-2A

Die Tatsache, dass offensichtlich die LAMP-2-Defizienz eine spätendosomale/lysosomale Cholesterollakkumulation auslöst, aber nicht die LAMP-1-Defizienz, wurde sich in folgenden Experimenten zu Nutze gemacht. Durch die hohe strukturelle Ähnlichkeit der beiden LAMP-Proteine war es möglich, chimäre Konstrukte per Fusions-PCR (3.2.1.7) zu klonieren, in denen die einzelnen Domänen zwischen LAMP-1 und LAMP-2A ausgetauscht worden waren, um so die Domäne von LAMP-2A zu identifizieren, die womöglich ausreicht, um die Funktion des Proteins im Cholesterolstoffwechsel zu erfüllen. Die Domänenstruktur beider Proteine kann in eine große luminal Domäne, eine Transmembran- und eine cytoplasmatische Domäne eingeteilt werden. Abbildung 22 A zeigt die schematische Darstellung der verschiedenen, mittels Fusions-PCR (3.2.1.7) generierten Domänenchimären. Zur Herstellung der Chimären wurden in getrennten PCR-Ansätzen zunächst die jeweiligen Teilbereiche der LAMP-cDNA-Sequenzen amplifiziert und mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Amplifikate wurden aufgereinigt und in einer folgenden PCR fusioniert. Die Fusionsprodukte wurden ebenfalls in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend eluiert. Die so erhaltene, aus LAMP-1 und LAMP-2A zusammengesetzte DNA-Sequenz wurde an beiden Enden mit Restriktionsenzymen inkubiert und in den linearisierten Expressionsvektor pCIneo durch Ligation eingefügt. Die Grenzen der Domänen beider LAMP-Proteine wurden entsprechend den in der online-Datenbank *expasy* (www.expasy.org) hinterlegten, putativen Domänenstrukturen ausgewählt.

Das Konstrukt #1 bestand aus der luminalen und der transmembranen Domäne von LAMP-2a und der cytoplasmatischen Domäne aus LAMP-1, Konstrukt #2 aus der luminalen und der Transmembrandomäne von LAMP-1 und der cytoplasmatischen Domäne von LAMP-2A. Die

Chimäre #3 war aus der luminalen Domäne von LAMP-2A und der beiden weiteren Domänen aus LAMP-1, Chimäre #4 aus der luminalen Domäne von LAMP-1 und den beiden übrigen aus LAMP-2A zusammengesetzt.

Die hergestellten Chimäre wurden in LAMP-doppeldefizienten MEFs exprimiert und zunächst die lysosomale Lokalisation mittels Doppelfärbung mit dem lysosomalen Membranlipid BMP in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie (3.2.2.7) verifiziert. Wie in Abbildung 22 B gezeigt, waren alle vier Chimäre in der Tat lysosomal lokalisiert.

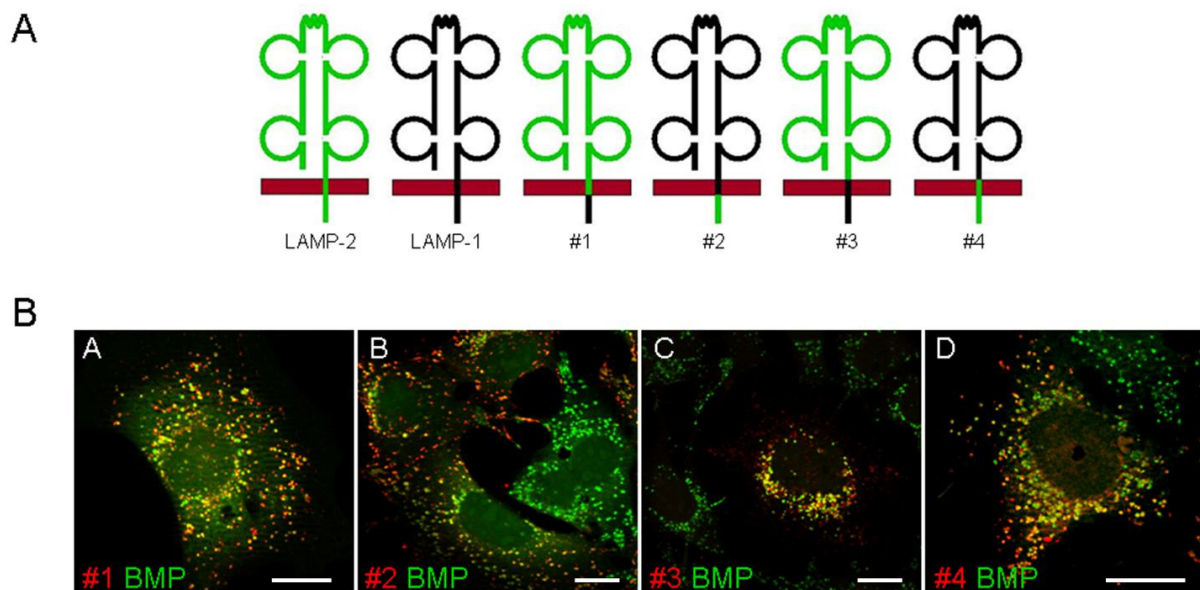


Abbildung 22: Lysosomale Lokalisation der transient exprimierten LAMP-Domänenchimäre. **A** Schematische Darstellung der Chimäre #1, #2, #3 und #4, die durch Austausch von Domänen zwischen LAMP-1 und LAMP-2A mittels Fusions-PCR (3.2.1.7) hergestellt wurden. Grün dargestellte Bereiche stellen LAMP-2-Sequenzen dar, schwarze LAMP-1-Sequenzen. **B** Die lysosomale Lokalisation der hergestellten Konstrukte (rot) wurde durch Doppelfärbungen mit dem lysosomalen Membranlipid BMP (grün) nach transienter Expression in LAMP-doppeldefizienten MEFs überprüft. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μ M.

Der nächste Schritt war nun der Test, welche der Konstrukte einen *rescue*-Effekt auf die Cholesterollakkumulation in LAMP-defizienten MEFs ausüben konnten. Dazu wurden die LAMP-Proteine in auf Glasplättchen kultivierten doppeldefizienten MEFs exprimiert und Filipinfärbungen durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie identifiziert. Zur Quantifizierung des *recue*-Effektes wurden dann transfizierte Zellen gezählt, in denen ein Rückgang der Cholesterollakkumulation zu erkennen war. Die statistische Auswertung dieser Zählung, dargestellt in Abb. 23, zeigte, dass diejenigen Konstrukte, die die luminal Domäne von LAMP-2A enthielten, d.h. die Chimären

#1 und #3, einen deutlichen *rescue*-Effekt ausübten. Die Chimären #2 und #4, die sich aus der cytoplasmatischen, bzw. der cytoplasmatischen und der transmembranen Domäne von LAMP-2A zusammensetzten und den jeweils übrigen Domänen von LAMP-1, jedoch nicht, so dass die luminal Domäne von LAMP-2A als die identifiziert werden konnte, die für den Rückgang der Cholesterollakkumulation in den LAMP-defizienten MEFs essentiell erscheint.

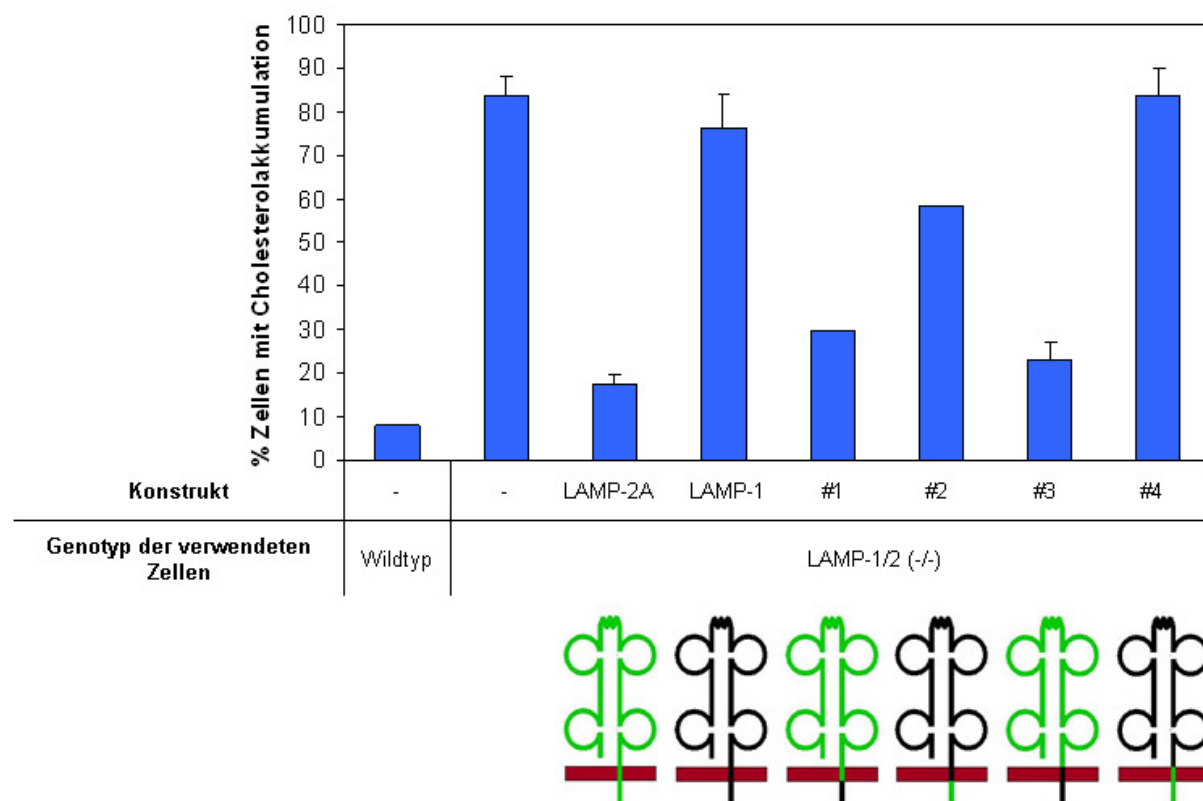


Abbildung 23: Effekt der transienten Expression der LAMP-Domänenchimäre auf die Cholesterollakkumulation. Die Konstrukte #1, #2, #3 und #4, die durch Austausch von Domänen zwischen LAMP-1 und LAMP-2A mittels Fusions-PCR (3.2.1.7) hergestellt worden waren, wurden in LAMP-doppeldefizienten MEFs transient exprimiert und nach 48 h Expression mittels Filipinfärbung (3.2.2.8) der Effekt auf die Cholesterollakkumulation beobachtet. Es wurden die Zellen gezählt, in denen ein *rescue*-Effekt zu beobachten war. Zum Vergleich wurde ebenfalls der Effekt der Wildtypproteine quantifiziert. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

4.2.9. Charakterisierung der Rolle der luminalen Domäne von LAMP-2A im Cholesterostoffwechsel

Es konnte gezeigt werden, dass die luminal Domäne von LAMP-2 für den *rescue*-Effekt auf die Cholesterollakkumulation in LAMP-defizienten, embryonalen Mausfibroblasten verantwortlich ist. Im nächsten Schritt sollte nun überprüft werden, ob es möglich sei, den

funktionellen Bereich der luminalen Domäne näher einzugrenzen. Auch hierfür wurde die Tatsache, dass LAMP-2 einen *rescue*-Effekt auf die in LAMP-doppeldefizienten MEFs auftretende Cholesterollakkumulation ausübte, LAMP-1 jedoch nicht, ausgenutzt. Es wurden chimäre Konstrukte, die Anteile der luminalen Domäne beider LAMP-Proteine enthielten, kloniert. Hierzu wurden per Fusions-PCR (3.2.1.7) die in Abb. 24 A schematisch dargestellten Konstrukte #5, #6, #7 und #8 hergestellt. Das Konstrukt #5 enthielt das erste Viertel der luminalen Domäne von LAMP-2, Konstrukt #6 die erste Hälfte ohne die *hinge*-Region, Konstrukt #7 das membranproximale Viertel der luminalen Domäne und Konstrukt #8 die membranproximale Hälfte, inklusive der *hinge*-Region von LAMP-2. Der jeweils übrige Anteil der Chimären bestand aus den LAMP-1-Sequenzen. Auch für diese chimären Konstrukte wurde zunächst die lysosomale Lokalisation durch Expression in LAMP-doppeldefizienten MEFs und Doppelfärbungen mit BMP bzw. dem lysosomalen Membranprotein LIMP-2 bestätigt (Abb. 24 B).

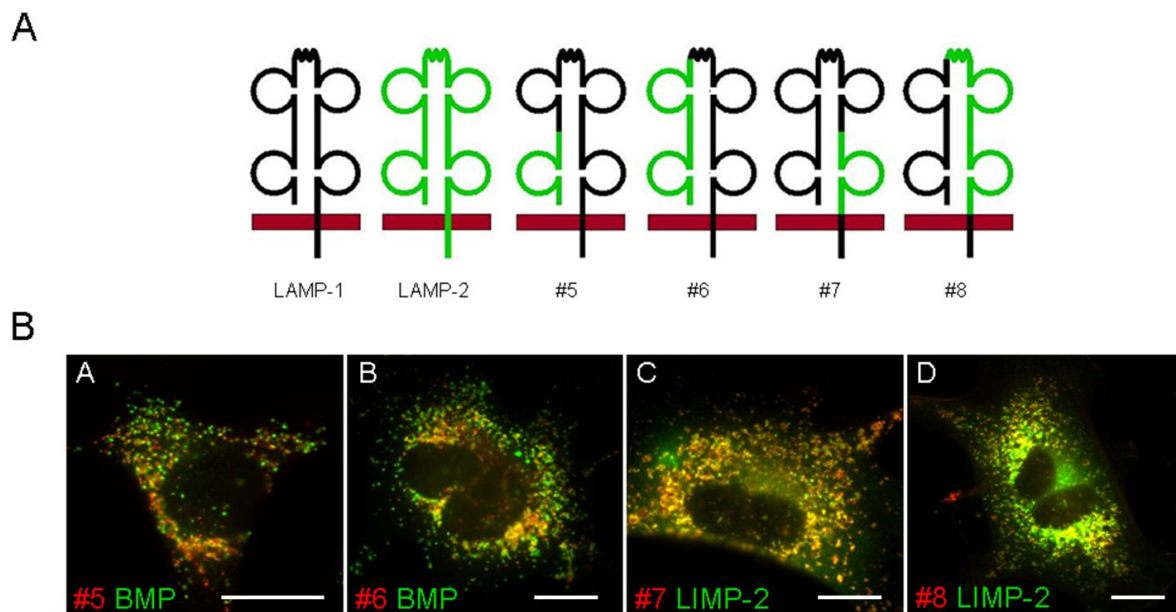


Abbildung 24: Lysosomale Lokalisation der transient exprimierten LAMP-Chimäre der luminalen Domäne A Schematische Darstellung der Chimäre #5, #6, #7 und #8, die durch Austausch von Teilbereichen der luminalen Domänen von LAMP-1 (schwarz) und LAMP-2 (grün) mittels Fusions-PCR (3.2.1.7) hergestellt wurden. B Die lysosomale Lokalisation der hergestellten Konstrukte (rot) wurde durch Doppelfärbungen mit dem lysosomalen Lipid BMP (grün) bzw. dem lysosomalen Membranprotein LIMP-2 (grün) nach transienter Expression in LAMP-doppeldefizienten MEFs überprüft. Die Kolokalisation ist in gelb dargestellt.

Um einen möglichen Cholesteroll-*rescue*-Effekt der Chimären zu untersuchen, wurden auf Glasplättchen kultivierte, LAMP-doppeldefiziente MEFs mit den verschiedenen

Expressionsplasmiden transfiziert und nach 48 Stunden Expressionszeit das freie Cholesterol mittels Filipinfärbung (3.2.2.8) an den PFA-fixierten Zellen detektiert. Zur Identifizierung der transfizierten Zellen wurden die exprimierten, chimären LAMP-Proteine mittels spezifischer Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Es wurden dann die Zellen gezählt und statisch ausgewertet, die eine Cholesterolakкумуляtion aufwiesen. Wie in der grafischen Darstellung der Zählungen zu sehen (Abb. 25), zeigte allein die Chimäre, die die membranproximale Hälfte der luminalen Domäne, inklusive der *hinge*-Region, enthielt, einen der LAMP-2 Wildtypsequenz vergleichbaren Reduktionseffekt auf die Cholesterolakкумуляtion. Hieraus erschließt sich die Annahme, dass in diesem Bereich der Luminalen Domäne die für die Funktion des LAMP-2 im intrazellulären Cholesterolstoffwechsel wichtige Struktur liegt.

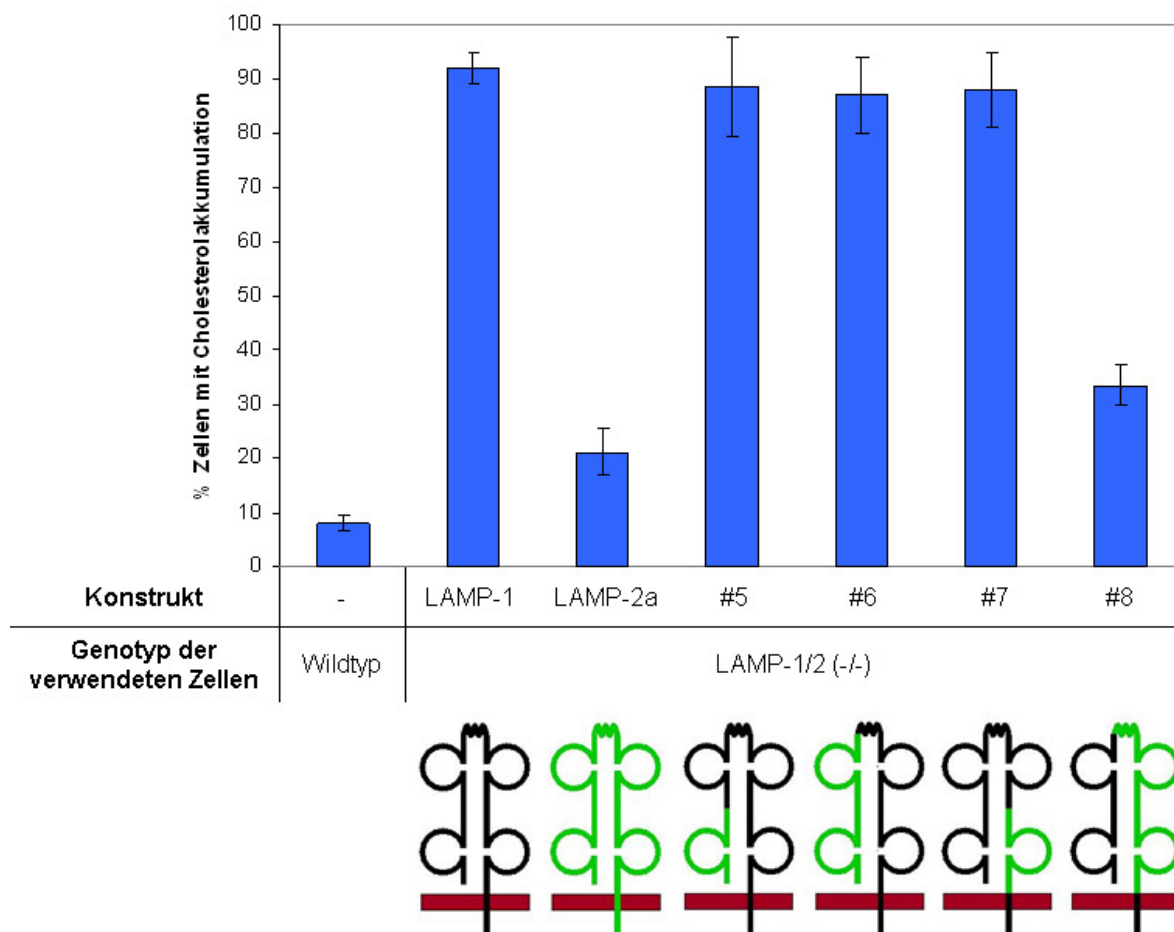


Abbildung 25: Effekt der luminalen Domäne von LAMP-2 auf die Cholesterolakкумуляtion. Die Konstrukte #5, #6, #7 und #8 wurden in LAMP-doppeldefizienten MEFs transient exprimiert und nach 48 h Expression mittels Filipinfärbung der Effekt auf die Cholesterolakкумуляtion beobachtet. Es wurden die Zellen gezählt, in denen ein *rescue*-Effekt zu beobachten war. Zum Vergleich wurde der Effekt der Wildtypproteine quantifiziert. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken eingezeichnet.

4.2.10. Herstellung von löslichem LAMP-2

Es hatte sich gezeigt, dass die luminaire Domäne von LAMP-2, die einen Effekt auf die Akkumulation von Cholesterin in späten Endosomen und Lysosomen in LAMP-defizienten MEFs ausübt. Mit Hilfe von chimären Proteinkonstrukten aus LAMP-1 und LAMP-2A konnte gezeigt werden, dass die luminaire Domäne von LAMP-2 die Akkumulation von freiem Cholesterin in LAMP-defizienten MEFs reduzieren kann. Es stellte sich nun die Frage, ob die luminaire Domäne von LAMP-2 zur Ausübung ihrer Funktion membrangebunden sein muss, oder ob auch eine lösliche Form die Cholesterinakkumulation in den LAMP-defizienten Zellen verändern kann. Zum anderen sollte eine rekombinante, überexprimierte lösliche Form zu Röntgenstrukturanalysen aufgereinigt und kristallisiert werden, um aus der aufgelösten Struktur Rückschlüsse auf die Funktionsweise von LAMP-2 zu ermöglichen. Hierzu wurden mittels PCR Expressionskonstrukte hergestellt.

Zunächst wurde ein Expressionssystem unter Verwendung des Plasmidvektors pCEP-Pu und der Expressionszelllinie HEK293T-EBNA-Zellen benutzt. Der Expressionsvektor pCEP-Pu enthält stromaufwärts der multiplen Klonierungsstelle die kodierende Sequenz des Signalpeptids des humanen Osteonectins, sowie darauf folgend die Sequenz eines His-tags, der für sechs aufeinander folgenden Histidine kodiert. Es dient also der Expression von Proteinen in Säugerzellen, die einen n-terminalen His-tag tragen und entweder ein Membranprotein sind oder ein lösliches Protein, das in den Zellkulturüberstand sezerniert werden soll. Zur stabilen Transfektion von Säugerzellen besitzt der Vektor eine Puromycinresistenz-Kassette.

Die Expressionszelllinie HEK293T-EBNA ist eine Zelllinie aus humanen, embryonalen Nierenzellen, die stabil mit dem EBNA-1-Gen transfiziert sind. Das EBNA-1-Protein bewirkt die episomale Replikation von Plasmiden, die ein ori-P (Sequenz, die als Replikationsstartpunkt dient) tragen, so dass Plasmide, mit denen diese Zellen transfiziert werden, zu hoher Kopienzahl repliziert werden. Zudem haben diese Zellen das Ad5 E1a/E1b Fragment stabil in ihrem Genom integriert, so dass Transgene, die unter der Kontrolle eines CMV-Promotors stehen, stark exprimiert werden.

Zur Insertion in den pCEP-Pu-Vektor wurde die luminaire Domäne von murinem LAMP-2A (Aminosäuren Asn24 bis Asn359) aus der vorhandenen cDNA per PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer waren so entworfen worden, dass der amplifizierte Sequenz am 5'-Ende eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym NheI angefügt wurde, sowie für NotI am 3'-Ende.

Zellen der Linie HEK293T-EBNA wurden mit 1 µg dieses so hergestellten Expressionsvektors psL2aI in antibiotikafreiem DMEM ohne FKS transfiziert. Nach 24 Stunden wurde das Medium gegen DMEM mit 10 % FKS (v/v) und 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v) ausgetauscht. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Kulturmedium durch DMEM mit 10 % FKS und 1 µg Puromycin/ml ersetzt, um transfizierte Zellen zu selektieren, die aufgrund der Aufnahme des Vektors puromycinresistent geworden waren. Nach 48 Stunden wurde der Zellkulturüberstand geerntet und ein Aliquot von 4 ml auf 60 µl aufkonzentriert, um die Expression und Sezernierung des löslichen LAMP-2 per Western Blot-Analyse zu testen.

In weiteren Klonierungen wurde die luminale Domäne von murinem LAMP-2 inklusive des Signalpeptids (Met1 – Asp376) in die Expressionsvektoren pcDNA3.1 und pCIneo eingefügt. Hierzu wurde die luminale Domäne per PCR amplifiziert und gleichzeitig Schnittstellen für die Restriktionsenzyme NheI (5') und XbaI (3'), sowie ein Carboxy-terminaler His-tag angefügt. Diese Konstrukte wurden in cos-7-Zellen transient exprimiert.

Die Expression der hergestellten Konstrukte wurde mittels Western Blot-Analyse überprüft. Hierzu wurden 4 ml Zellkulturüberstand auf 60 µl aufkonzentriert, mit reduzierendem Probenauftragspuffer versetzt und im 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurden die Proteine mit einem gegen LAMP-2 gerichteten Antikörper nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde Zellkulturüberstand aus nicht-transfizierten Zellen und von Zellen, die mit der Wildtyp-cDNA transfiziert worden waren, analysiert.

In den Spuren, in denen die Überstände der mit Wildtyp-LAMP-2A transfizierten Zellen und Überstände von untransfizierten Zellen aufgetragen worden waren, wurde kein lösliches LAMP-2 nachgewiesen (Abb. 26). In allen anderen Überständen wurde lösliches LAMP-2 nachgewiesen.

Zellkulturüberstand aus den stabil exprimierenden HEK-EBNA-Zellen sollte nun zur Aufreinigung des löslichen LAMP-2 verwendet werden. 10 ml serumfreier Zellkulturüberstand, der nach 48 Stunden Expressionszeit geerntet worden war, wurde mit 1,5 ml Nickel-NTA-Agarose für 3 Stunden rollend bei 4 °C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde dann in eine Kunststoffsäule überführt und der Durchlauf aufgefangen. Die Agarosekügelchen wurden viermal mit je 10 ml Waschpuffer gewaschen. Die an der Ni-NTA-Agarose gebundenen Proteine wurden in 11 Fraktionen mit jeweils 500 µl Imidazol-haltigem Elutionspuffer eluiert.

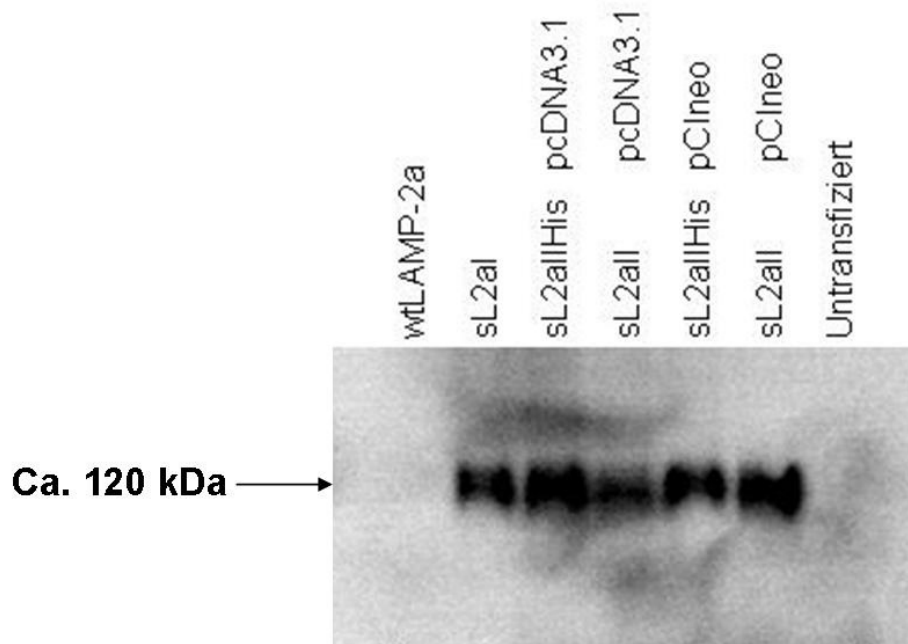


Abbildung 26: Western Blot Analyse der Expression verschiedenen Konstrukte löslichen LAMP-2A. *cos7*-Zellen bzw. HEK293-EBNA-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid für das Wildtypprotein LAMP-2A, bzw. den Expressionskonstrukten für lösliches LAMP-2A (sL2AI: luminale Domäne von LAMP-2A in pCEP-Pu (exprimiert in HEK293-EBNA), sL2AIIHis: luminale Domäne von LAMP-2A mit His-Tag in pcDNA3.1, sL2AII: luminale Domäne LAMP-2A in pcDNA3.1, sL2AIIHis in pCIneo, sL2AII: luminale Domäne von LAMP-2A in pCIneo) transfiziert (3.2.2.5). Nach 48 Stunden Expressionszeit wurden die Zellkulturüberstände geerntet. Die Überstände (4 ml) wurden auf ein Volumen von 60 μ l aufkonzentriert (3.2.3.4). Die gesamte Menge an aufkonzentriertem Zellkulturüberstand wurde in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (3.2.3.2) in einem 10 %igen Gel aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden mittels Immunoblot (3.2.3.3) mit einem gegen murines LAMP-2 gerichteten Antikörper detektiert.

Die aufgefangenen Proteinlösungen wurden aufkonzentriert und mittels Immunoblot (Abb. 27 A) und silbergefärbtem SDS-Polyacrylamidgel (Abb. 27 B) analysiert.

In der Spur, in der 750 μ l, aufkonzentriert auf 60 μ l, unaufgereinigter Überstand aufgetragen worden war (Abb. 27 A, SN), wurde lösliches LAMP-2 als eine starke Bande in der Höhe von ca. 120 kD detektiert. In der darauf folgenden Spur wurde 1 ml des Durchlaufs (aufkonzentriert auf 60 μ l) aufgetragen und es war eine schwache Bande des löslichen LAMP-2 zu sehen. In der ersten Waschfraktion (W1), von der von 10 ml 1 ml (aufkonzentriert auf 60 μ l) analysiert worden war, wurde ebenfalls eine schwache Bande in der Höhe von 120 kD nachgewiesen. Die Schwäche der Banden in den Fraktionen des Durchlaufs und der ersten Waschfraktionen deutet an, dass das lösliche LAMP-2 effektiv an die Ni.NTA-Agarose gebunden hatte. In den weiteren Waschfraktionen W2, W3 und W4 wurde kein Protein detektiert. In den Spuren E1 bis E5 wurden 50 μ l-Aliquote von jeweils insgesamt 500 μ l der ersten fünf Eluatfraktionen aufgetragen. In der ersten Fraktion E1 wurde

eine starke Bande des löslichen LAMP-2 detektiert, in der zweiten Fraktion E2 eine noch stärkere und in Fraktion E3 eine schwache Bande. In Fraktionen E4 und E5 war nur noch sehr wenig lösliches LAMP-2 enthalten. In den übrigen Eluatfraktionen E6 bis E11 war kein Protein mehr in nachweisbarer Menge vorhanden. Um zu überprüfen, ob nach Elution lösliches LAMP-2 an den Latexkügelchen gebunden war, wurden diese in reduzierendem Probenauftragspuffer für fünf Minuten bei 95 °C inkubiert, um alles an möglicherweise gebundenem Protein zu lösen. Der Überstand wurde in der letzten Spur (Beads) aufgetragen und es wurde kein LAMP-2 detektiert. Die Elution des löslichen LAMP-2 erfolgte also effektiv in den ersten vier Fraktionen.

Von denselben Fraktionen wurden Aliquots gleicher Menge auf ein weiteres SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, welches nach erfolgter Elektrophorese einer Silberfärbung (3.2.3.4) unterzogen wurde. Mittels dieser Methode werden Proteine nachgewiesen, indem die Aminosäuren Glutamat, Aspartat und Cystein Komplexe mit Silberionen eingehen. Die Silberionen werden durch Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert, welches dann als schwarze Färbung die Proteinbanden sichtbar macht. In dem nach dieser Methode gefärbten Gel war in den Eluatfraktionen 1 und 2 eine Färbung in der für lösliches LAMP-2 erwarteten Höhe von 120 kD zu sehen (Abb. 27 B). Aufgrund der starken Glykolisierung des LAMP-2-Proteins erstreckte sich dieses Signal auf einen relativ langgestreckten Bereich, statt eine klar definierte Bande darzustellen.

Insgesamt betrachtet konnte mit der Überexpression und Aufreinigung von löslichem LAMP-2 keine Ausbeute erreicht werden, die zu einer geplanten röntgenkristallografischen Strukturaufklärung benötigt werden würde, die mindestens 1 mg an aufgereinigtem Protein beträgt. Es wurde zudem ein präliminäres Experiment durchgeführt, in dem LAMP-defiziente MEFs für 24 Stunden mit dem Zellkulturüberstand aus den stabil überexprimierenden HEK-EBNA-Zellen inkubiert wurde. In den Zellen konnte mittels Immunfluoreszenz jedoch weder eine Wiederaufnahme des löslichen LAMP-2 nachgewiesen werden, noch wurde eine Reduktion des akkumulierten Cholesterols mittels Filipinfärbung beobachtet (Daten nicht gezeigt).

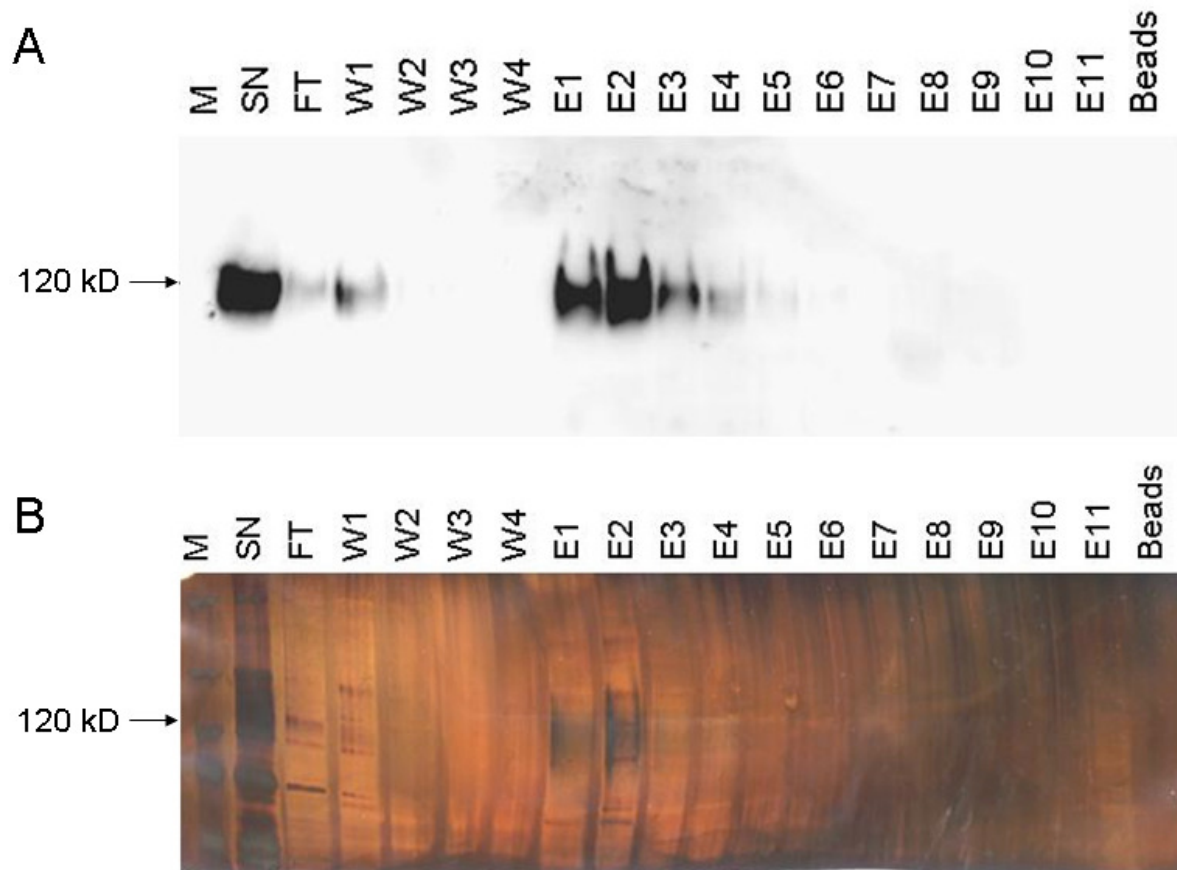


Abbildung 27: Aufreinigung von löslichem, murinem LAMP-2A. Zellkulturüberstand von stabil mit dem Expressionsplasmid psL2AI transfizierten EBNA-Zellen wurde mittels Nickel-NTA-Chromatografie aufgereinigt. Hierzu wurden 10 mL Zellkulturüberstand (SN) mit 1,5 ml Nickel-NTA-Agarose für 3 Stunden unter Rollen bei 4 °C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde dann in eine Kunststoffsäule überführt und der Durchlauf (FT) aufgefangen. Die Agarosekügelchen wurden viermal mit je 10 ml Waschpuffer gewaschen. Die an der Ni-NTA-Agarose gebundenen Proteine wurden in 11 Fraktionen mit jeweils 500 µl Elutionspuffer eluiert. Die aufgefangenen Proteinlösungen (SN 750 µl Überstand (aufkonzentriert), FT 1 ml Durchlauf (aufkonzentriert), W 1 ml Waschpuffer (aufkonzentriert), E 50 µl von 500 µl Eluat) wurden mittels Immunoblot mit gegen LAMP-2 gerichtetem Antikörper (A) und silbergefärbtem SDS-Polyacrylamidgel (B) analysiert. In der Spur M ist der Proteinmarker aufgetragen worden. Die Markierung 120 kD zeigt die Laufstrecke von Proteinen der Größe 120 kD an.

4.2.11. Die Überexpression von LAMP-2 in HeLa-Zellen verringert die U18666A-induzierte Cholesterollakkumulation

Die Behandlung mit der Substanz U18666A (3b-(2-diethylaminoethoxy)-androstenon, HCl) inhibiert den Cholesteroltransport sowohl von der Plasmamembran zum ER, als auch von Lysosomen zum ER, sowie von Lysosomen zur Plasmamembran. Der Mechanismus, der dieser Inhibition zugrunde liegt, ist bisher nur wenig verstanden (Hall, A.M., 2003). U18666A wird oft benutzt, um die Niemann-Pick Typ C-Erkrankung zu imitieren und eine Akkumulation von freiem Cholesterol in späten Endosomen, wie sie auch in den LAMP-defizienten MEFs beobachtet worden war, zu induzieren (Ganley et al., 2003; Walter et al.,

2008). In U18666A behandelten Zellen konnte diese Akkumulation durch Überexpression von NPC1 reduziert werden (Ko et al., 2001). Zur Überprüfung, ob die Überexpression des LAMP-2A-Protein ebenso zur Reduktion der Cholesterolakkumulation in U18666A behandelten Zellen führt und damit eine Bedeutung von LAMP-2 für den U18666A-Effekt herausgestellt würde, wurden HeLa-Zellen auf Glasplättchen kultiviert und mit dem murinen LAMP-2A-Expressionsplamid transfiziert. Nach 24 Stunden Expression wurden die Zellen für 24 Stunden mit U18666A-haltigem Kulturmedium (0,3 μM bzw. 3 μM in DMEM, 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin) inkubiert. Nach PFA-Fixierung wurde mittels Filipinfärbung (3.2.2.8) das freie Cholesterol für die Fluoreszenzmikroskopie detektiert. Die LAMP-2A überexprimierenden Zellen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie (3.2.2.7) mit dem gegen murines LAMP-2A gerichteten Primärantikörper identifiziert. In unbehandelten HeLa-Zellen zeigte sich eine schwache Filipinfärbung der Plasmamembran sowie eine ebenfalls schwache vesikuläre Lokalisation des freien Cholesterols, die durch die Überexpression murinen LAMP-2As nicht verändert worden war (Abb. 28 A und B). In Zellen, die mit 0,3 μM U18666A behandelt worden waren, zeigte sich eine vesikuläre Akkumulation freien Cholesterols (Abb. 28 D). Die LAMP-2A überexprimierenden Zellen hingegen, markiert in Abb. 28 D mit roten Sternchen, zeigten nur ein schwache vesikuläre Lokalisation von freiem Cholesterol. Die mit 3 μM U18666A behandelten Zellen, die nicht mLAMP-2A exprimierten, akkumulierten in noch stärkerem Maße vesikuläres Cholesterol. Die Überexpression von LAMP-2A konnte in nur wenigen Zellen die Wirkung von U18666A ausgleichen (Abb. 28 E und F). Zur statistischen Auswertung der U18666A-inhibierenden Wirkung der LAMP-2A-Überexpression wurden Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten gezählt, die keine oder nur eine sehr schwache Cholesterolakkumulation im Vergleich zu untransfizierten HeLa-Zellen aufwiesen (Abb. 29). Es zeigte sich, dass ca. 75 % der nicht transfizierten, mit 0,3 μM U18666A behandelten Zellen eine Cholesterolakkumulation auswiesen, in LAMP-2A-transfizierten Zellen hingegen nur etwa 29 %. In Zellen, die mit 3 μM U18666A behandelt worden waren, war dieser Unterschied zwischen transfizierten und nicht transfizierten Zellen nur sehr gering. Ungefähr 89 % der untransfizierten Zellen und ca. 83 % der mit LAMP-2A transfizierten Zellen zeigten eine starke Akkumulation freien Cholesterols.

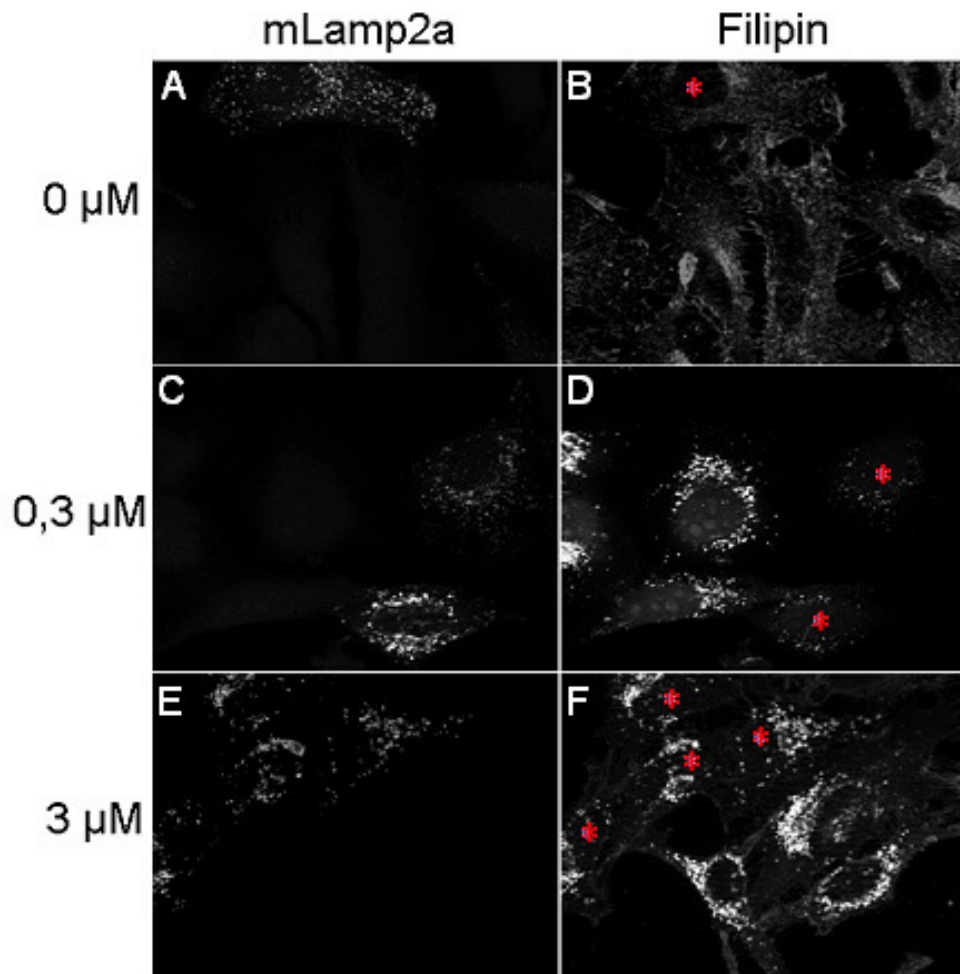


Abbildung 28: Wirkung der Substanz U18666A HeLa-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und am nächsten Tag mit der murinen LAMP-2A cDNA transfiziert. Nach einer Expressionszeit von 24 h wurden die Zellen über Nacht mit der cholesterintransportinhibierenden Substanz U18666A behandelt. Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Zellen (A und B unbehandelt, C und D 0,3 µM, E und F 3 µM). Anschließend wurden die Zellen fixiert und gegen mLAMP-2 (A, C und E) und mit Filipin (B, D und F) gefärbt. Transfizierte Zellen sind mit einem roten *Asterix markiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 µM.

Die Überexpression von murinem LAMP-2A konnte also in HeLa-Zellen eine cholesterolakkumulierende Wirkung der Substanz U18666A teilweise inhibieren, wie es auch für NPC1 gezeigt worden war.

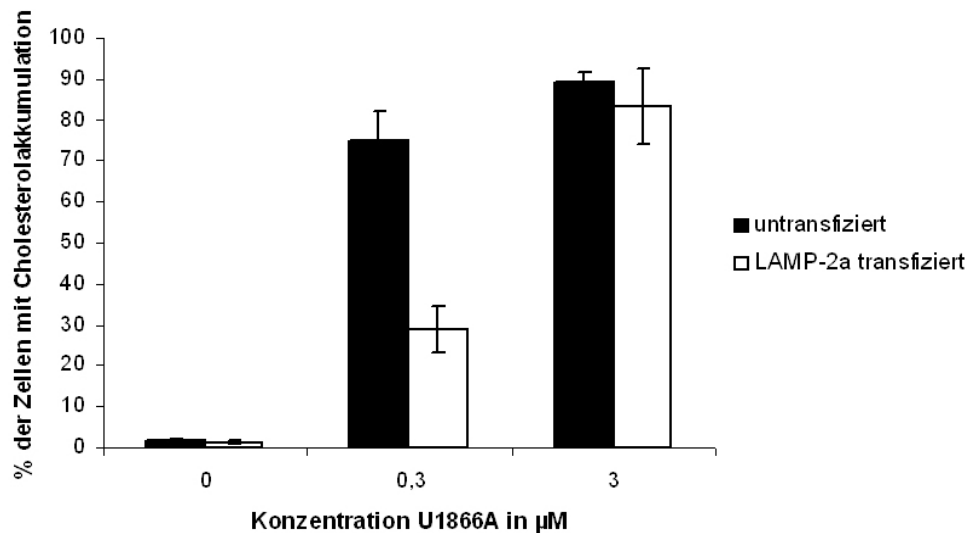


Abbildung 29: Quantifizierung des Effekts der Überexpression von LAMP-2 in U18666A-behandelten HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und am nächsten Tag mit der murinen LAMP-2A cDNA transfiziert. Nach einer Expressionszeit von 24 h wurden die Zellen über Nacht mit der cholesterintransportinhibierenden Substanz U18666A in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Von den transfizierten und untransfizierten Zellen wurden die Zellen, die Cholesterolakkumulation aufwiesen, ausgezählt und das Ergebnis der Zählung grafisch aufgetragen. Gezählt wurden Zellen auf drei verschiedenen Glasplättchen aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken entsprechen der statistischen Standardabweichung.

4.2.12. Die Behandlung von LAMP-defizienten MEFs mit 25-Hydroxycholesterol kann die Cholesterolhomöostase teilweise wiederherstellen

Oxysterole spielen in der Cholesterolhomöostase eine wichtige Rolle, indem sie sowohl die Cholesterolbiosynthese hemmen, als auch den Liver-X-Rezeptor (LXR) aktivieren und so die Veresterung von freiem Cholesterol im endoplasmatischen Retikulum (ER) stimulieren (Gill et al., 2008). Die LXR sind physiologische Sensoren für Cholesterolmetabolite. Die Bindung eines Liganden führt zur Aktivierung des Rezeptors und er bildet zusammen mit dem Retinoid-X-Rezeptor einen heterodimeren Komplex. Dieser bindet in der Promotorregion der Zielgene, sog. LXR-Response-Elemente, und regelt so auf transkriptioneller Ebene u.a. die Veresterung von freiem Cholesterol (Willy et al., 1995).

Für NPC-defiziente Zellen, die wie LAMP-defiziente MEFs eine starke endo/lysosomale Cholesterolakkumulation aufweisen, konnte zudem gezeigt werden, dass exogene Oxysterole,

wie z.B. 25-Hydroxycholesterol, die Cholesterolakkumulation verringert (Frolov et al., 2003; Lange et al., 2000).

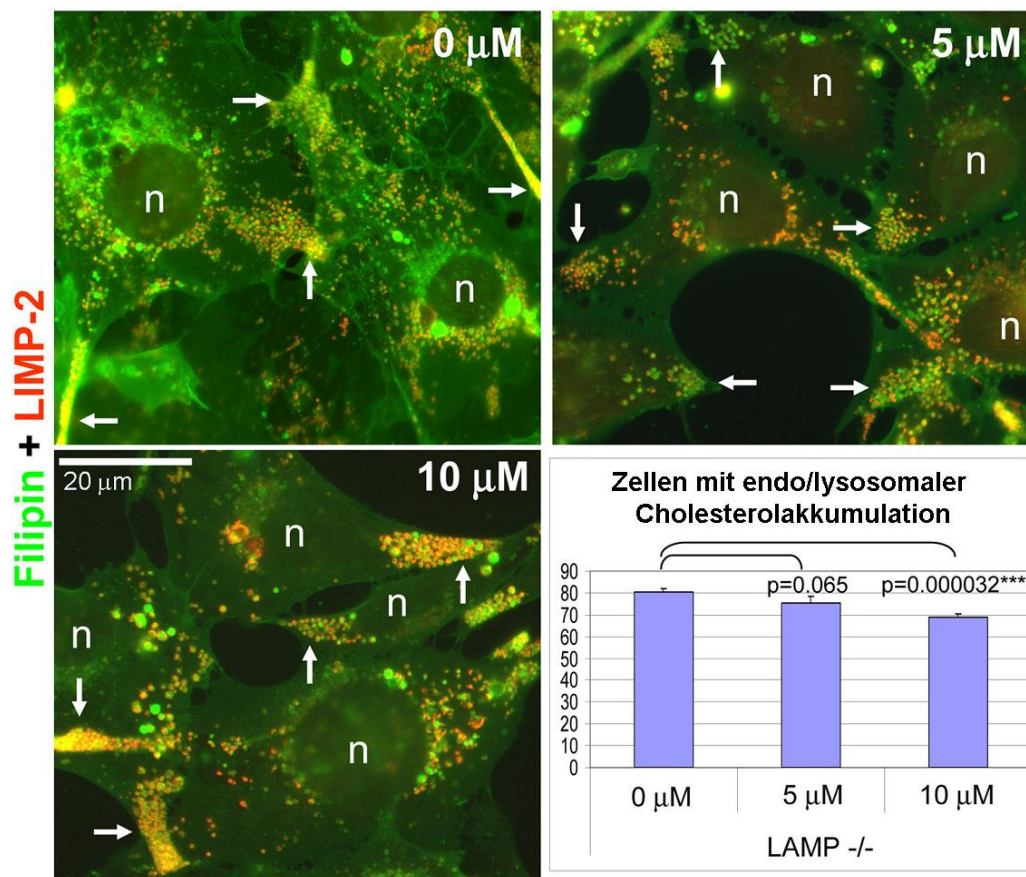


Abbildung 30: Auswirkung der 25-Hydroxycholesterolbehandlung der LAMP-defizienten MEFs auf die Cholesterolakkumulation. LAMP-defiziente MEFs wurden in Kulturmedium (DMEM, 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin), das 5 µM oder 10 µM 25-Hydroxycholesterol enthielt, für 48 Stunden auf Glasplättchen kultiviert. Nach Fixierung in 4 % PFA wurde freies Cholesterin mit Filipin (grün) für die Immunfluoreszenz gefärbt. Anschließend wurde zur Detektion später Endosomen und Lysosomen eine Antikörperfärbung mit LIMP-2-spezifischem Primärantikörper (rot) durchgeführt. Pfeile weisen auf periphere späte Endosomen und Lysosomen hin, in denen freies Cholesterin akkumuliert. Die Zellkerne sind mit „n“ markiert.

Es wurden Zellen gezählt, die unbehandelt, mit 5 µM oder mit 10 µM 25-Hydroxycholesterol behandelt worden waren und eine endo/lysosomale Cholesterolakkumulation aufwiesen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichung. Pro Probe wurden 6 Bilder in 20facher Vergrößerung ausgewertet. Das Experiment wurde in Kooperation mit E.-L. Eskelinen, Helsinki, durchgeführt.

Um den Effekt von 25-Hydroxycholesterol auf LAMP-defiziente MEFs zu studieren, wurden diese Zellen in Kulturmedium (DMEM, 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin), das 5 µM oder 10 µM 25-Hydroxycholesterol enthielt, für 48 Stunden auf Glasplättchen kultiviert. Nach Fixierung in 4 % PFA wurde freies Cholesterin mit Filipin (3.2.2.8), bzw. Neutrallipide mit Nilrot (3.2.2.9) für die Immunfluoreszenz gefärbt. Bei der Filipinfärbung wurde anschließend

zur Detektion später Endosomen und Lysosomen eine Antikörperfärbung mit LIMP-2-spezifischem Primärantikörper und kaninchenspezifischem, fluorophorgekoppeltem Sekundärantikörper (3.2.2.7) durchgeführt.

In unbehandelten Zellen wurde freies Cholesterol in der perinukleären Region nachgewiesen, sowie in der Zellperipherie, wo es in LIMP-2-positiven, spätendosomal/lysosomal Vesikeln akkumulierte (Abb. 30, 0 μM , s. Pfeile). In mit 25-Hydroxycholesterol behandelten Zellen (5 μM und 10 μM) war das perinukleäre Cholesterol gegenüber unbehandelten Zellen reduziert. Sowohl in Zellen, die mit 5 μM 25-Hydroxycholesterol behandelt worden waren, als auch in mit 10 μM behandelten Zellen, akkumulierte freies Cholesterol in LIMP-2-positiven Vesikeln in der Zellperipherie, wie es auch in den unbehandelten Zellen der Fall war. Interessanterweise schien die 25-Hydroxycholesterolbehandlung der Zellen die periphere Lokalisation der cholesterolakkumulierenden Vesikel noch zu verstärken. Insbesondere in den mit 10 μM behandelten Zellen war die Mehrheit der Cholesterol- und LIMP-2-positiven Vesikel in den Spitzen der Zellausläufer (s. Pfeile, Abb. 30)

Die Anzahl an Zellen, die eine Cholesterolakkumulation aufwiesen, war durch die Behandlung mit 25-Hydroxycholesterol nur schwach gegenüber den unbehandelten Zellen verringert: In unbehandelten akkumulierte in 80 % der ausgezählten Zellen Cholesterol, in mit 5 μM 25-Hydroxycholesterol behandelten Zellen ca. 75 % und in mit 10 μM 25-Hydroxycholesterol behandelten Zellen ca. 70 %.

Die mit 25-Hydroxycholesterol behandelten Zellen, in denen mit Nilrot die Neutrallipide angefärbt worden waren, wiesen eine stärkere Veränderung auf. Während in den unbehandelten Zellen und in mit 5 μM behandelten Zellen fast gar keine Lipidtröpfchen nachzuweisen waren (Abb. 31, 0 μM), konnte die Gegenwart von 10 μM 25-Hydroxycholesterol die Anzahl von Zellen mit Lipidtröpfchen auf ein mit Wildtypzellen vergleichbares Niveau steigern (Abb. 31, vergl. auch Abb. 16).

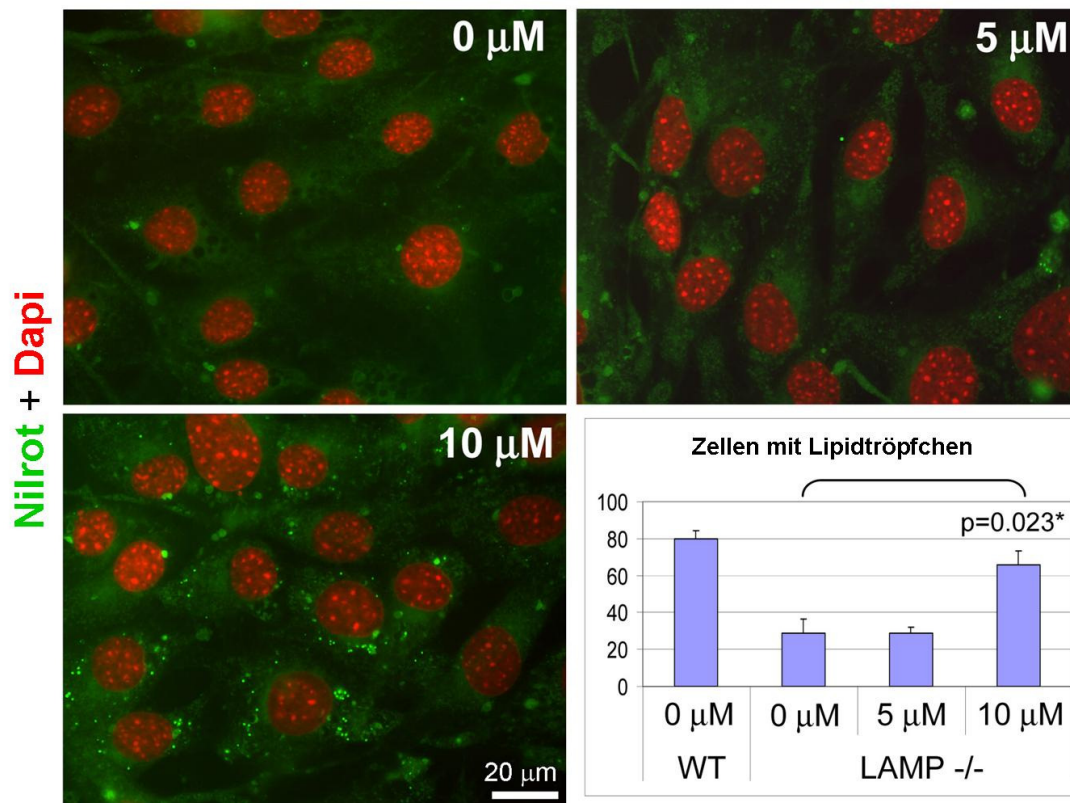


Abbildung 31: Auswirkung der 25-Hydroxycholesterolbehandlung der LAMP-defizienten MEFs auf die Lipidtröpfchen. LAMP-defiziente MEFs wurden in Kulturmedium, das 5 μM oder 10 μM 25-Hydroxycholesterol enthielt, für 48 Stunden auf Glasplättchen kultiviert. Nach Fixierung in 4 % PFA wurden Lipidtröpfchen mit Nilrot (grün) und Zellkerne mit DAPI (rot) für die Immunfluoreszenz gefärbt. Es wurden Wildtypzellen gezählt, sowie LAMP-defiziente Zellen, die unbehandelt, mit 5 μM oder mit 10 μM 25-Hydroxycholesterol behandelt worden waren und Lipidtröpfchen aufwiesen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichung. Pro Probe wurden 6 Bilder in 20facher Vergrößerung ausgewertet. Das Experiment wurde in Kooperation mit E.-L. Eskelinen, Helsinki, durchgeführt.

Zusammengefasst konnte die Behandlung der LAMP-defizienten Zellen mit 25-Hydroxycholesterol die endo/lysosomale Cholesterolakkumulation also nicht aufheben, verstärkte jedoch die periphere Lokalisation der cholesterolbeladenen späten Endosomen/Lysosomen und erhöhte die Menge an Lipidtröpfchen. Die Bildung der Lipidtröpfchen deutet darauf hin, dass die Veresterung von Lipiden nicht generell in den LAMP-defizienten Zellen gestört ist. Es scheint in diesen Zellen eher ein Transport der Lipide in das ER, den Ort der Veresterung, vermindert zu sein, so dass die Lipidveresterung im ER regulatorisch nicht ausgelöst wird.

4.3. Phagozytose ohne LAMPs

Nicht nur im intrazellulären Cholesterolfstoffwechsel spielen späte Endosomen und Lysosomen eine wichtige Rolle. Eine weitere herausragende Funktion besitzen diese Organellen während der Phagozytose. Die Phagozytose ist ein essentieller Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Die in phagozytierenden Makrophagen befindlichen Phagosomen erhalten ihre antimikrobiellen und degradierenden Eigenschaften während ihrer Reifung durch die Fusion mit späten Endosomen und Lysosomen. Unter anderem gelangen hierdurch lösliche saure Hydrolasen und die v-H⁺-ATPase, ein Membranprotein, das einen luminalen sauren pH-Wert generiert, zum Phagosom (Lukacs et al, 1990).

Nachdem das Fehlen des lysosomalen Membranproteins LAMP-2 in embryonalen Mausfibroblasten zu einer Störung des Cholesterolfstoffwechsels führte, wurde im folgend dargestellten Teil der Arbeit der Frage nachgegangen, ob die LAMP-Defizienz Auswirkungen auf die Eigenschaften von Phagosomen haben. Da das Fehlen beider LAMP-Proteine in Mäusen bereits zwischen den embryonalen Tag 14,5 und 16,5 letal ist, konnten keine Makrophagen für diese Studien verwendet werden (Eskelinen et al., 2004). Es standen lediglich embryonale Mausfibroblasten zur Verfügung, die natürlicherweise keine phagozytotische Eigenschaften besitzen. Durch die Transfektion mit dem humanen F_cγIIA-Rezeptor konnten MEFs jedoch in die Lage versetzt werden, mit humanem IgG opsonierte Latexkügelchen aufzunehmen und so Phagosomen zu formen (Huynh et al., 2007).

4.3.1. Etablierung des Phagozytoseexperimente für embryonale Mausfibroblasten

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Rekrutierung spätendosomaler/lysosomaler Proteine zu Phagosomen in LAMP-1- und LAMP-2-einzeldefizienten MEFs im Vergleich zu Wildtyp-MEFs unverändert ist. In MEFs, denen beide LAMP-Proteine fehlten, wurde jedoch eine signifikant reduzierte Rekrutierung z.B. der GTPase Rab7 und des spätendosomalen Membranproteins CD63 festgestellt (Huynh et al., 2007).

Um diesen Defekt näher zu untersuchen, wurde zunächst ein Phagozytose-Assay etabliert. Hierzu wurden Wildtyp-MEFs auf Glasplättchen ausgesät und am nächsten Tag mit dem Expressionskonstrukt für den humanen F_cγIIA-Rezeptor transfiziert. Nach 24 Stunden Expressionszeit wurde das Kulturmedium (DMEM mit 10 % FKS (v/v), 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v)) durch DMEM (ohne FCS und Antibiotika) ersetzt und die Latexkügelchen mit einer Größe von 3 μm, die mit humanem IgG opsoniert worden waren, zu

den Zellen gegeben. Die Kulturplatten wurden zur Synchronisation und Induktion der Phagozytose für fünf Minuten bei 1500 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, währenddessen die Latexkügelchen auf die Zellen absanken und mit dem humanen $Fc\gamma$ IIA-Rezeptor in Kontakt kommen konnten, um so die Phagozytose zu induzieren. Nach 15 Minuten, in denen die Latexkügelchen von den Zellen phagozytiert werden konnten, wurden durch dreimaliges Waschen der Zellen mit Kulturmedium die Latexkügelchen entfernt, die nicht aufgenommen worden waren. Während einer weiteren Inkubation der Zellen für 15 Minuten, 30 Minuten bzw. einer Stunde konnten die Phagosomen reifen. Nach Ablauf dieser Inkubationen wurden die Zellen mit 4 %-iger PFA-Lösung in PBS für die indirekte Immunfluoreszenz fixiert.

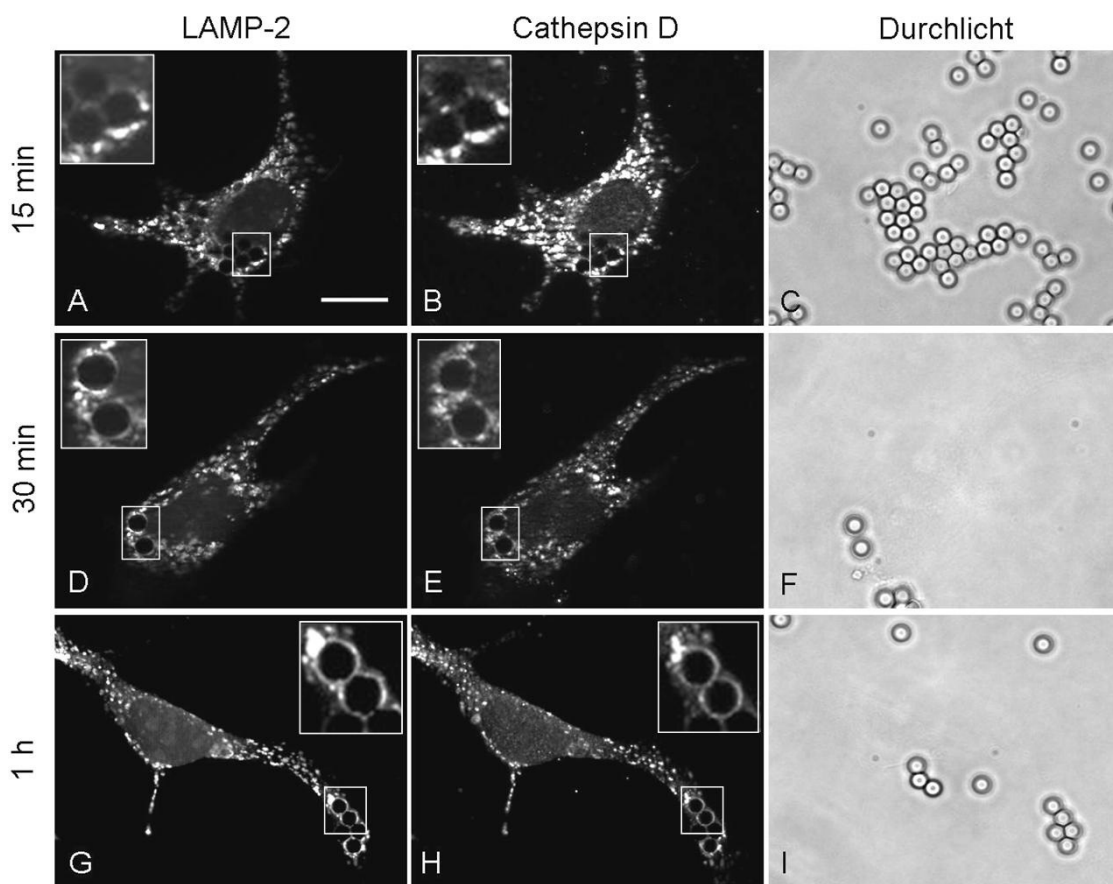


Abbildung 32: Phagosomenreifung in murinen embryonalen Wildtypmausfibroblasten. Embryonale Wildtypmausfibroblasten wurden auf Glasplättchen ausgesät und am nächsten Tag mit einem Expressionsplasmid transfiziert. Nach 24 Stunden Expressionszeit wurden opsonierte Latexkügelchen auf die Zellen gegeben und die Kulturplatten zur Synchronisation und Induktion der Phagozytose für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach einer 15 minütigen Inkubation im Zellinkubator bei 37 °C wurden die nicht aufgenommenen Latexkügelchen durch zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS entfernt. Zur Phagosomenreifung folgte eine weitere Inkubation bei 37 °C für 15 Minuten (A, B und C), 30 Minuten (D, E und F) oder eine Stunde (G, H und I). Die Zellen wurden dann für die Immunfluoreszenzfärbung (3.2.2.6) mit 4 % PFA in PBS fixiert und mit einem primären Antikörper aus Ratte gegen LAMP-2 (A, D und G) oder aus Kaninchen gegen Cathepsin D (B, E und H) inkubiert. Als Sekundärintikörper wurde der α -Ratte AlexaFluor594 (A, D und G), bzw. der α -Kaninchen AlexaFluor594 (B, E und H) verwendet. Der Maßstabsbalken in A entspricht 10 μ M und gilt für A-I.

Die fixierten Zellen wurden mit einem primären Antikörper aus Ratte gegen LAMP-2 (Abb. 32 A, D und G) oder aus Kaninchen gegen Cathepsin D (Abb. 32 B, E und H) inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde der α -Ratte AlexaFluor594 (Abb. 32 A, D und G), bzw. der α -Kaninchen AlexaFluor594 (Abb. 32 B, E und H) verwendet.

Nach 15 Minuten Maturierungszeit konnte noch keine Rekrutierung von LAMP-2 (Abb. 32 A) und Cathepsin D (Abb. 32 B) zu den aufgenommenen Latexkügelchen festgestellt werden (s. Ausschnittvergrößerungen). Es waren in beiden Färbungen vesikuläre Strukturen zu erkennen.

Nach 30 Minuten Maturierungszeit war an einigen Latexkügelchen beinhaltenden Phagosomen bereits die Rekrutierung sowohl von LAMP-2 (Abb. 32 D), als auch von Cathepsin D (Abb. 32 E) in Form einer schwachen, ringförmigen Anfärbung zu sehen (s. Ausschnittvergrößerungen). Nach einer Stunde Maturierungszeit waren sehr viele Phagosomen positiv für LAMP-2 (Abb. 32 G) und Cathepsin D (Abb. 32 H), wiederum zu erkennen an einer ringförmigen Anfärbung um die aufgenommenen Latexkügelchen (s. Ausschnittvergrößerungen).

Für die folgenden Phagozytose-Assays wurde eine Maturierungszeit von einer Stunde gewählt, da nach dieser Zeit der größte Teil der Phagosomen als Cathepsin D-positiv identifiziert werden konnte. Die Rekrutierung von Cathepsin D zu den Phagosomen sollte in folgenden Experimenten als Indikator für eine Maturierung der Phagosomen zu Phagolysosomen dienen, die durch die Fusion von Phagosomen mit Lysosomen entstehen (Mullock et al., 1998; Luzio et al., 2000). Lysosomale Enzyme, wie Cathepsin D, gelangen so ins Lumen der Phagosomen und vermitteln dadurch die degradierenden Eigenschaften an die Phagosomen.

4.3.2. Maturierungsdefekt in Phagosomen von LAMP-defizienten embryonalen Mausfibroblasten

Um die Maturierung der Phagosomen in LAMP-defizienten MEFs zu untersuchen, wurde die so etablierte Methode des Phagozytose-Assays angewendet. Hierzu wurden Wildtyp-MEFs und LAMP-defiziente MEFs auf Glasplättchen kultiviert, am folgenden Tag mit dem $Fc\gamma$ IIA-Rezeptor transfiziert. Nach 24 Stunden Expressionszeit wurden den Zellen für 15 Minuten opsonierte Latexkügelchen zur Phagozytose präsentiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit Kulturmedium wurden diejenigen Latexkügelchen entfernt, die nicht aufgenommen worden waren. Zur Maturierung der Phagosomen wurden die Zellen für eine

Stunde bei 37 °C im Zellinkubator inkubiert und dann für den Nachweis von LAMP-2 und der lysosomalen Hydrolase Cathepsin D in der indirekten Immunfluoreszenz (3.2.2.7) mit 4 % PFA in PBS fixiert. Zur Überprüfung der Ansäuerung der Phagosomen wurde vor der Fixierung eine Färbung mit *LysoTrackerRed* (3.2.2.10) durchgeführt.

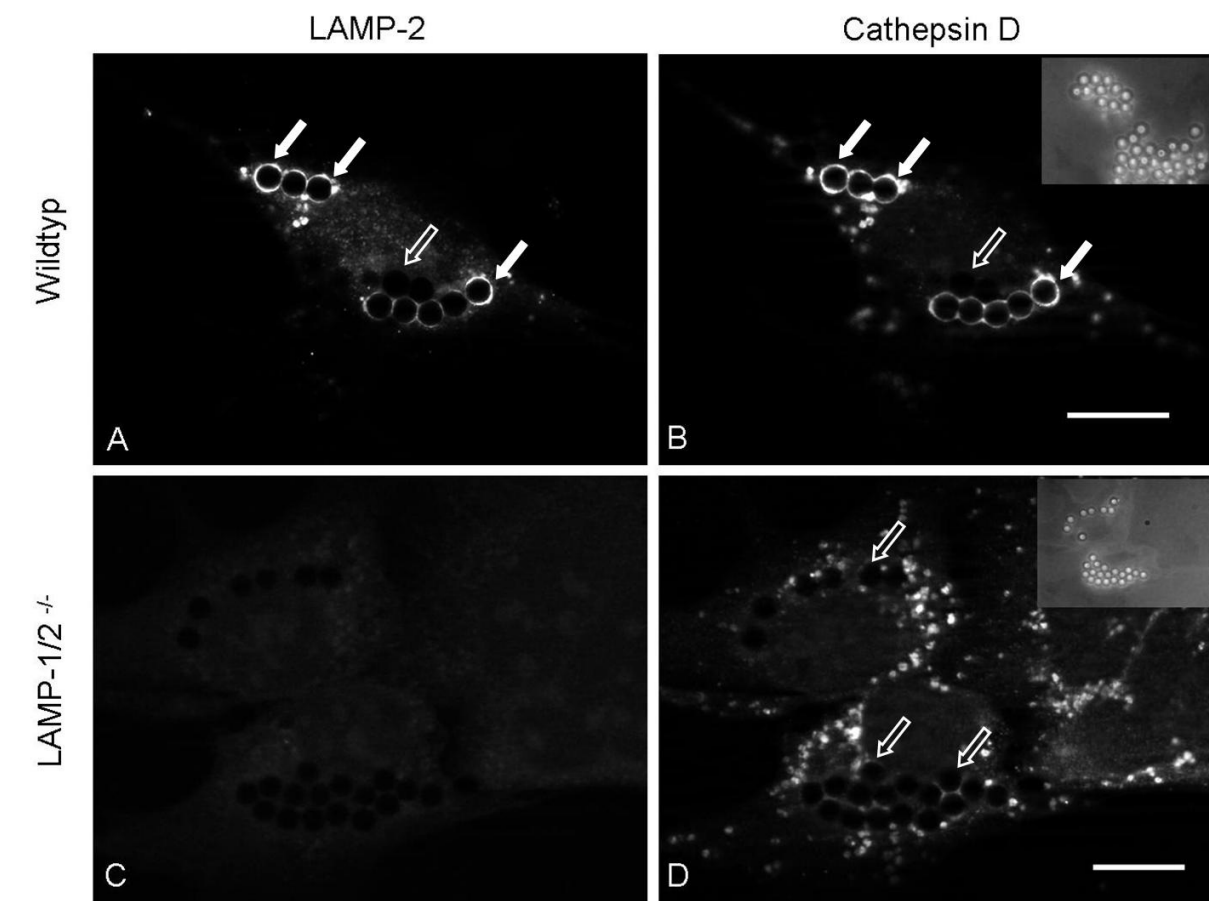


Abbildung 33: Rekrutierungsdefekt der lysosomalen Hydrolase Cathepsin D zu Phagosomen in LAMP-defizienten embryonalen Mausfibroblasten. Wildtyp- und LAMP-defiziente MEFs wurden auf Glasplättchen ausgesät, am nächsten Tag mit dem $Fc\gamma II A$ -Rezeptor transfiziert und nach 24 Stunden Expressionszeit der Phagozytose-Assay (3.2.2.12) an ihnen durchgeführt. Hierzu wurden opsonierte Latexkügelchen zu den Zellen gegeben und durch fünfminütiges Zentrifugieren der Zellkulturplatten bei 1500 rpm und Raumtemperatur auf die Zellen präzipitiert, um die Phagozytose zu induzieren und zu synchronisieren. Während der folgenden Inkubation im Zellinkubator für 15 Minuten, konnten die Zellen die Latexkügelchen phagozytieren. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit Kulturmedium wurden diejenigen Latexkügelchen entfernt, die nicht aufgenommen worden waren. Zur Maturierung der Phagosomen wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C im Zellinkubator inkubiert und dann für den Nachweis von LAMP-2 (A und C) und der lysosomalen Hydrolase Cathepsin D (B und D) in der indirekten Immunfluoreszenz (3.2.2.7) mit 4 % PFA in PBS fixiert. Geschlossene Pfeile weisen beispielhaft auf LAMP-2-positive (A), bzw. Cathepsin D-positive (B) Phagosomen, offenen Pfeile auf LAMP-2-negative (A) und Cathepsin D-negative (B und D) Phagosomen. Durchlichtaufnahmen, die die kugelförmigen Strukturen in A bis D als Latexkügelchen identifizieren, sind rechts oben in B und D. Der Maßstab in B entspricht 10 μM und gilt für A und B, der Maßstab in D entspricht 10 μM und gilt für C und D.

Der immunfluoreszenzmikroskopische Nachweis mit gegen LAMP-2 gerichtetem Primärantikörper und gegen Ratte gerichtetem, fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper zeigte in Wildtyp-MEFs (Abb. 33 A) eine Rekrutierung des LAMP-2-Proteins zu den meisten der Latexkügelchen-enthaltenden Phagosomen in Form einer ringförmigen Struktur um das jeweilige Latexkügelchen (s. geschlossene Pfeile in Abb. 33 A). Dieselben Phagosomen mit Latexkügelchen hatten ebenfalls Cathepsin D rekrutiert (s. geschlossene Pfeile in Abb. 33 B). Nicht an allen Latexkügelchen-enthaltenden Phagosomen ließ sich LAMP-2 detektieren (Abb. 33 A, offene Pfeile). Bemerkenswert war, dass an denselben Phagosomen, in denen LAMP-2 abwesend war, auch kein Cathepsin D nachgewiesen werden konnte. Dies lieferte einen Hinweis darauf, dass die Rekrutierung von LAMP-2 und Cathepsin D zu Phagosomen eng miteinander verbunden ist.

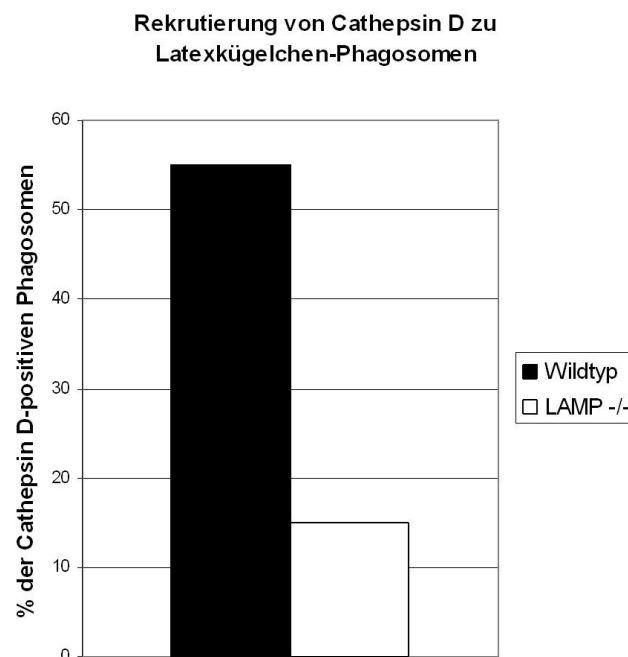


Abbildung 34: Rekrutierung von Cathepsin D zu Phagosomen in Wildtyp- und LAMP-defizienten embryonalen Mausfibroblasten. Wildtyp- und LAMP-defiziente MEFs wurden auf Glasplättchen ausgesät, am nächsten Tag mit dem $Fc\gamma II A$ -Rezeptor transfiziert und nach 24 Stunden Expressionszeit der Phagozytose-Assay (3.2.2.12) an ihnen durchgeführt. Es wurden in Wildtypzellen und in LAMP-defizienten Zellen die Latexkügelchen beinhaltende Phagosomen ausgezählt, die nach Detektion mittels indirekter Immunfluoreszenz Cathepsin D-positiv waren.

In den LAMP-defizienten MEFs konnte erwartungsgemäß kein LAMP-2 nachgewiesen werden (Abb. 33 C). Der Nachweis von Cathepsin D in diesen Zellen ergab, dass diese lysosomale Hydrolase in diesen Zellen in vesikulären Strukturen lokalisierte, aber bei fast allen Phagosomen abwesend war (Abb. 33 D, offene Pfeile). Auch dieser Befund deutete

darauf hin, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Rekrutierung von Cathepsin D und LAMP-2 zu den Phagosomen besteht.

Eine Auszählung der Cathepsin D-positiven, Latexkügelchen-enthaltenden Phagosomen in Wildtyp- und LAMP-defizienten MEFs ergab, dass nach einer Stunde Maturierungszeit ungefähr 55 % der Phagosomen in den Wildtyp-MEFs Cathepsin D rekrutiert hatten, während dies nur für ca. 15 % der Phagosomen in LAMP-defizienten MEFs der Fall war (Abb. 34).

Ein weiteres Merkmal der Reifung von Phagosomen ist die Generierung eines sauren pH-Wertes durch die lysosomale v-H⁺-ATPase. Saure Kompartimente einer Zelle lassen sich für die Fluoreszenzmikroskopie mittels *LysoTrackerRed* (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe) anfärben. Auf Glasplättchen kultivierte MEFs wurden, nachdem der Phagozytose-Assay (3.2.2.12) durchgeführt worden war, für fünf Minuten mit *LysoTrackerRed*-haltigem Kulturmedium (DMEM, 10 % FKS (v/v), 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v), 1:3000 verdünnte *LysoTrackerRed*-Originalstocklösung) inkubiert, mehrmals mit PBS gewaschen und für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit 4 %iger PFA-Lösung in PBS fixiert.

Die *LysoTrackerRed*-Markierung der Phagosomen zeigte sich als angefärbter Ring um die Latexkügelchen, der den sauren Bereich zwischen der phagosomalen Membran und dem Latexkügelchen darstellt. In den so markierten Wildtyp-MEFs konnten neben kleinen, vesikulären Strukturen die Azidifizierung der Latexkügelchen enthaltenden Phagosomen nachgewiesen werden (Abb. 35 A, geschlossene Pfeile). Dass es sich bei diesen Strukturen um höchstwahrscheinlich intrazelluläre Latexkügelchen handelte, wurde durch Durchlichtaufnahmen belegt (Abb. 35 B).

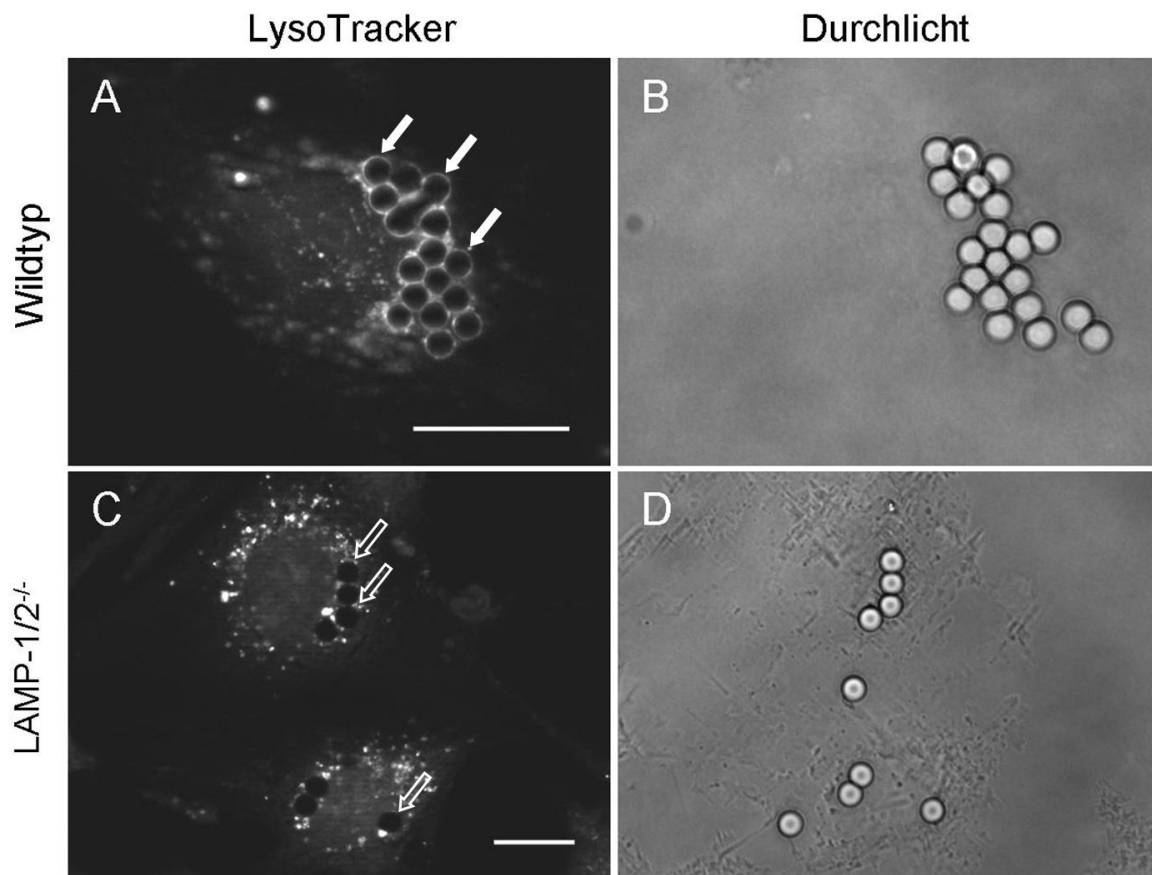


Abbildung 35: Azidifizierungsdefekt der Phagosomen in LAMP-defizienten embryonalen Mausfibroblasten. Auf Glasplättchen kultivierte Wildtyp- (A und B) und LAMP-defiziente (C und D) MEFs wurden, nachdem der Phagozytose-Assay mit Latexkugeln (3.2.2.12) durchgeführt worden war, für fünf Minuten mit *LysoTrackerRed*-haltigem Kulturmedium (DMEM, 10 % FKS (v/v), 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v), 1:3000 verdünnte *LysoTrackerRed*-Originalstocklösung) inkubiert, mehrmals mit PBS gewaschen und für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit 4 %iger PFA-Lösung in PBS fixiert. Auf diese Weise markierte saure Kompartimente ließen sich mit Hilfe des Filtersets Cy3,5 mit dem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Zeiss, Göttingen) nachweisen (A und C). Mit Hilfe von Durchlichtaufnahmen wurden die runden Strukturen in A und C sicher als Latexkugeln identifiziert (B und D). Geschlossenen Pfeile weisen auf *LysoTrackerRed*-positive Phagosomen, offene auf *LysoTrackerRed*-negative. Der Maßstabsbalken in A entspricht 10 μ M und gilt für A und B; der Maßstabsbalken in C entspricht 10 μ M und gilt für C und D.

In den LAMP-defizienten MEFs wurden ebenfalls kleine vesikuläre Strukturen mittels *LysoTrackerRed*-Markierung nachgewiesen. Bei diesen Zellen fehlte jedoch bei fast allen Latexkugeln-enthaltenden Phagosomen der Nachweis der Azidifizierung (Abb. 35 C, offene Pfeile).

Neben dem Cathepsin D-Rekrutierungsdefekt zeigte sich in den LAMP-defizienten MEFs also zudem eine mangelnde Ansäuerung der Phagosomen, so dass von einem schweren Maturierungsdefekt der Phagosomen in LAMP-defizienten MEFs ausgegangen werden konnte. Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Ansäuerung der Phagosomen wichtig für die Fusion mit 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).

4.3.3. Wiederherstellung der phagosomalen Cathepsin D-Rekrutierung in LAMP-defizienten MEFs durch Transfektion mit LAMP-1 und LAMP-2A

Da in den LAMP-defizienten embryonalen Mausfibroblasten ein Maturierungsdefekt der Phagosomen in Phagozytose-Assays in Form einer mangelhaften Rekrutierung der lysosomalen Hydrolase Cathepsin D beobachtet worden war, stellte sich die Frage, ob durch eine Wiedereinführung von LAMP-1 und/oder LAMP-2 eine Wiederherstellung der Fähigkeit zur Cathepsin D-Rekrutierung erreicht werden könnte. Hierzu wurden LAMP-defiziente MEFs auf Glasplättchen kultiviert, am nächsten Tag mit dem Fc γ IIA-Rezeptor und LAMP-1, bzw. LAMP-2A kotransfiziert und nach 48 Stunden Expressionszeit der Phagozytose-Assay (3.2.2.12) durchgeführt. Für den Nachweis von LAMP-1, LAMP-2 und der lysosomalen Hydrolase Cathepsin D in der indirekten Immunfluoreszenz (3.2.2.7) wurden die Zellen mit 4 % PFA in PBS fixiert.

Das in den LAMP-defizienten MEFs überexprimierte LAMP-1 kolokalisierte sowohl in vesikulären Strukturen mit dem endogenen Cathepsin D, als auch in den Latexkügelchen-beinhaltenen Phagosomen, wie in der farbig dargestellten Detailaufnahme in Abbildung 36 B zu erkennen ist (endogenes Cathepsin D in grün, transfiziertes LAMP-1 in rot). Während die phagozytierten Latexkügelchen in den untransfizierten LAMP-defizienten MEFs kaum Cathepsin D rekrutierten (Abb. 36 A und B, markiert durch offene Pfeile), war ein großer Anteil der Phagosomen in LAMP-1 transfizierten Zellen Cathepsin D-positiv (Abb. 36 A und B, markiert durch geschlossene Pfeile).

Auch das in den LAMP-defizienten MEFs überexprimierte LAMP-2A kolokalisierte sowohl in vesikulären Strukturen als auch in den Phagosomen mit endogenem Cathepsin D (Abb. 36 D, Detailaufnahme, grün: endogenes Cathepsin D, rot: exprimiertes LAMP-2A). Die Expression von LAMP-2A in den LAMP-defizienten MEFs konnte die Rekrutierung von Cathepsin D zu den Phagosomen wiederherstellen (Abb. 36 C und D, geschlossene Pfeile). Phagosomen in untransfizierten Zellen waren im Gegensatz dazu größtenteils nicht in der Lage, Cathepsin zu rekrutieren (Abb. 36 C und D, offene Pfeile).

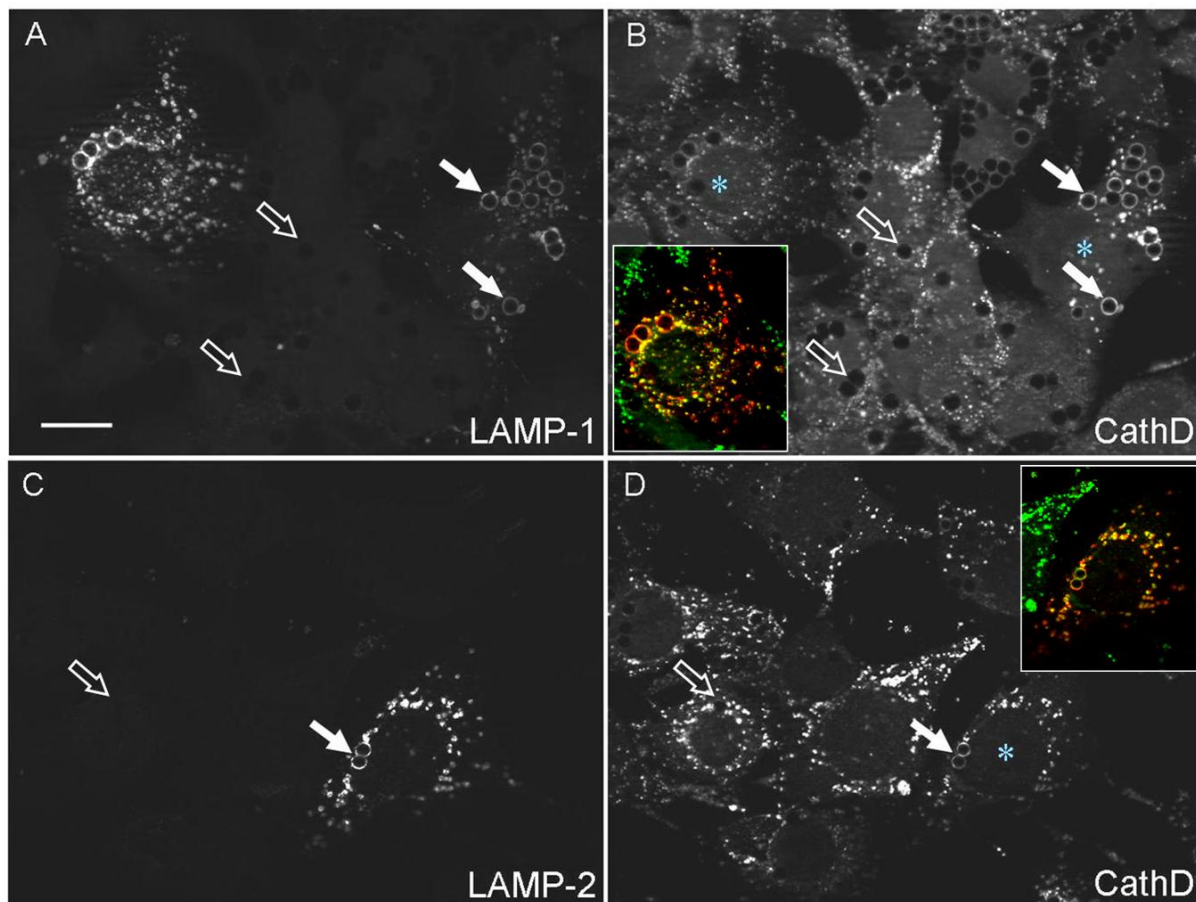


Abbildung 36: Wiederherstellung der Cathepsin D-Rekrutierung zu Latexkugelchen enthaltenden Phagosomen in LAMP-defizienten MEFs durch Transfektion mit LAMP-1 und LAMP-2 LAMP-defiziente MEFs wurden auf Glasplättchen ausgesät und am nächsten Tag mit dem $F_{\gamma}IIA$ -Rezeptor und LAMP-1 (A und B), bzw. LAMP-2A (C und D) kotransfiziert. Nach 48 Stunden Expressionszeit wurde der Phagozytose-Assay (3.2.2.12) durchgeführt. Für den Nachweis von LAMP-1 (A), LAMP-2 (C) und der lysosomalen Hydrolase Cathepsin D (B und D) in der indirekten Immunfluoreszenz (3.2.2.7) wurden die Zellen mit 4 % PFA in PBS fixiert. Geschlossene Pfeile weisen beispielhaft auf LAMP-1-positive (A), LAMP-2-positive (C) bzw. Cathepsin D-positive (B und D) Phagosomen, offenen Pfeile auf LAMP-negative (A und C) und Cathepsin D-negative (B und D) Phagosomen. Asterixe in B markieren mit LAMP-1 transfizierte Zellen, in D mit LAMP-2A transfizierte. Die farbig dargestellten Detailaufnahmen zeigen in grün die Färbung des endogenen Cathepsin D und in rot die Färbung des transfizierten LAMP-1 (B), bzw. LAMP-2A (D). Der Maßstabsbalken in A entspricht 10 μ m und gilt für A bis D.

In einer statistischen Auswertung der Wiederherstellung der Cathepsin D-Rekrutierungsfähigkeit in LAMP-transfizierten MEFs wurden Latexkugelchen-enthaltende Phagosomen in Wildtyp-MEFs, in LAMP-defizienten MEFs, sowie in mit LAMP-1, bzw. mit LAMP-2A transfizierten LAMP-defizienten MEFs gezählt, die positiv für Cathepsin D waren. Es stellte sich heraus, dass in Wildtyp-MEFs ca. 56 % der Phagosomen Cathepsin D-positiv waren, in LAMP-defizienten hingegen nur ungefähr 16 %. In LAMP-defizienten MEFs, die mit LAMP-1 transfiziert worden waren, hatten ca. 54 % Cathepsin D rekrutiert, in LAMP-2A transfizierten LAMP-defizienten MEFs ca. 48 % (Abb. 37).

Die Frage, ob die Expression von LAMP-1 und/oder LAMP-2 in LAMP-defizienten embryonalen Mausfibroblasten den Maturierungsdefekt der Phagosomen in Form mangelnder Cathepsin D-Rekrutierung reduzieren könnte, konnte dahingehend beantwortet werden, dass sowohl LAMP-1, als auch LAMP-2A in der Lage waren, Cathepsin D zu Phagosomen zu rekrutieren.

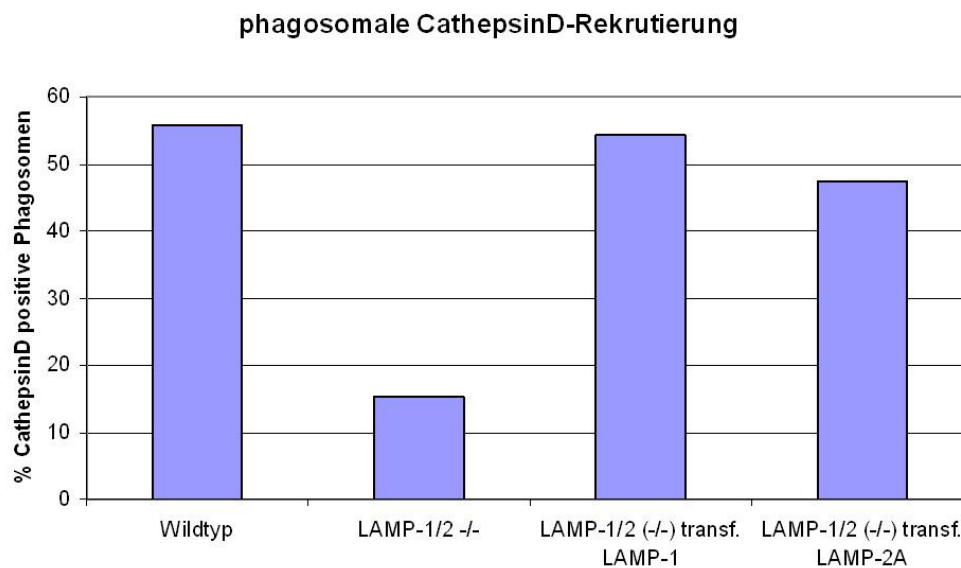


Abbildung 37: Statistische Auswertung der phagosomalen Cathepsin D-Rekrutierung in embryonalen Mausfibroblasten LAMP-defiziente MEFs wurden auf Glasplättchen ausgesät und am nächsten Tag mit dem $F_{\gamma}IIA$ -Rezeptor und LAMP-1, bzw. LAMP-2A kotransfiziert. Nach 48 Stunden Expressionszeit wurde der Phagozytose-Assay (3.2.2.12) durchgeführt. Exprimiertes LAMP-1, LAMP-2 und die endogene lysosomale Hydrolase Cathepsin D wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert. Es wurden dann in den Zellen die Latexkügelchen-enthaltenden Phagosomen gezählt, die positiv für Cathepsin D waren. Wildtyp n=682, LAMP-1/2 -/- n=441, LAMP-1/2 -/- transf. LAMP-1 n=250, LAMP-1/2 -/- transf. LAMP-2A n=266. Alle Zählungen wurden mit mehreren Glasplättchen aus einem Experiment durchgeführt.

5. Diskussion

Seit der Entdeckung im Jahre 1959 durch Christian deDuve (deDuve et al., 1959) wurden verschiedene Funktionen der Lysosomen und der limitierenden Membran dieses Kompartiments diskutiert. Die Trennung der lysosomalen degradierenden Hydrolasen von anderen zellulären Kompartimenten ist auch weiterhin als die herausragende Funktion der lysosomalen Membran anzusehen. Den lysosomalen Membranproteinen können für die Aufrechterhaltung der lysosomalen Funktion weitere wichtige Aufgaben zugeordnet werden, wie die Generierung des sauren pH-Wertes durch die v-H⁺-ATPase, sowie der Transport von Aminosäuren, Fettsäuren, Kohlenhydraten und anderer Nährstoffe, die aus der lysosomalen Degradierung von Makromolekülen entstehen (Eskelinen et al., 2004). Die Interaktion und Fusion von Lysosomen untereinander und mit anderen Zellkompartimenten, wie Endosomen, Phagosomen und der Plasmamembran ist ohne die Beteiligung der lysosomalen Membranproteine ebenfalls kaum denkbar (Fukuda et al., 1991).

Die Aufgaben der Lysosomal-Assoziierten-Membran-Proteine LAMP-1 und LAMP-2, die zusammen mit den Lysosomal-Integrierten-Membran-Proteinen über 50 % der Masse der lysosomalen Membranproteine ausmachen, sind bisher weitestgehend ungeklärt (Eskelinen et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden Auswirkungen des Fehlens der beiden abundanten lysosomalen Membranproteine LAMP-1 und LAMP-2 auf unterschiedliche Funktionen der Lysosomen untersucht. Zunächst wurden späte Endosomen und Lysosomen in LAMP-defizienten embryonalen Mausfibroblasten generell charakterisiert. Daraus folgende Studien befassen sich mit der Rolle, die die beiden Proteine in der Cholesterollhomöostase, speziell während des Cholesteroleffluxes aus endo/lysosomalen Vesikeln spielen. Weitere Versuche sollten der Funktion der LAMP-Proteine in der Phagozytose nachgehen.

5.1. Die generelle Charakterisierung LAMP-defizienter embryonaler Mausfibroblasten

Lysosomal-Assoziiertes-Membran-Protein-1 (LAMP-1) und LAMP-2 stellen den größten Proteinanteil der lysosomalen Membran dar. Bevor aktuelle Publikationen spezifische Funktionen der beiden Proteine zeigen konnten, wurde angenommen, dass die LAMPs

aufgrund ihrer hochglykosylierten luminalen Domäne die eher allgemeine Aufgabe besäßen, die lysosomale Membran vor der Degradierung durch lysosomale Hydrolasen zu schützen (Kornfeld and Mellman, 1989).

LAMP-1-defiziente Mäuse zeigen keinen auffälligen Phänotyp, bis auf die Entwicklung einer leichten Astroglie und geringe Unterschiede der Cathepsin D-Immunoreaktivität im Gehirn (Andrejewski et al., 1999). Die lysosomale Stabilität, der intralysosomalen pH-Werte und die Aktivität von Hydrolasen in LAMP-1-defizienten Fibroblasten war gegenüber Wildtyp-Zellen unverändert. In Niere, Leber und Herz LAMP-1-defizienter Mäuse wurde eine stärkere Expression von LAMP-2 bemerkt, was möglicherweise Folgen des Fehlens des LAMP-1-Proteins kompensieren könnte (Eskelinen, 2006).

Von LAMP-2-defizienten Mäuse sterben 50 % der Tiere zwischen Tag 20 und 40 nach der Geburt und sind insgesamt kleiner als Wildtyp-Tiere (Tanaka et al., 2000). Das auffälligste pathologische Charakteristikum ist eine Akkumulation von frühen und späten autophagozytotischen Vakuolen in zahlreichen Geweben wie z.B. in Leber, Pankreas, Milz, Herz und neutrophilen Granulozyten (Eskelinen, 2006).

Inzwischen wurden einige wichtige spezifische Funktionen von LAMP-2 entdeckt. So wurde die Isoform LAMP-2A als Rezeptor für den selektiven Import und Abbau von zytosolischen Proteinen in die Lysosomen bei der chaperonvermittelten Autophagozytose beschrieben (Cuervo und Dice, 1996; Bandyopadhyay et al., 2008). Chaperonvermittelte Autophagozytose stellt einen lysosomalen Abbauweg dar, mit dessen Hilfe zelluläre Proteine, die das Pentapeptidmotiv KFERQ besitzen, selektiv unter speziellen Bedingungen von Lysosomen aufgenommen und degradiert werden (Crotzer, V.L. and Blum, J. S., 2008). Die Bindung cytosolischer Proteine scheint auch der MHC-II-Präsentation von zytosolischen Antigenen zu dienen (Zhou et al, 2005).

Weitere interessante Befunde zeigten sich in der erhöhten Anfälligkeit LAMP-2-defizienter Mäuse für Parodontitis (Beertsen et al., 2008) und der fehlenden phagosomalen Abwehr von *Neisseria gonorrhoeae*, dem Auslöser der Gonorrhoe (syn. *Tripper*) und anderer Erkrankungen (Binker et al., 2007). In beiden Fällen wurde als Ursache für eine beeinträchtigte phagosomale Reifung die mangelhafte Rekrutierung von Rab7 festgestellt. Die LAMP-Proteine scheinen also auch eine wichtige Funktion während der phagosomalen Reifung zu spielen, dessen genaue molekuläre Mechanismen bislang nicht bekannt sind.

In dieser Arbeit wurden embryonale Mausfibroblasten, die defizient für LAMP-1, LAMP-2 oder beide Proteine sind, untersucht. Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden LAMP-1 und LAMP-2 in Wildtypzellen und den einzel- und doppeldefizienten Zellen nachgewiesen. In den Wildtypzellen wurden beide Proteine in vesikulären, perinukleär lokalisierten Strukturen detektiert. Diese intrazelluläre Verteilung der LAMP-Proteine ist die typische Lokalisation in späten Endosomen/Lysosomen (Lüllmann-Rauch, 2005). In den LAMP-1-defizienten MEFs wurde LAMP-2 in dem Wildtypprofil entsprechenden Strukturen nachgewiesen. In den LAMP-2-defizienten Zellen hingegen waren die LAMP-1-positiven Vesikel wesentlich zahlreicher als in den Wildtypzellen und schienen nicht hauptsächlich perinukleär lokalisiert, sondern eher über die gesamte Fläche der Zelle verteilt zu sein.

Die Markierung des endo/lysosomalen Membranlipids Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP), des endo/lysosomalen Membranproteins CD63 und der lysosomalen Hydrolase Cathepsin D mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie in Wildtyp-MEFs und in LAMP-1-, LAMP-2-einzeldefizienten, sowie LAMP-doppeldefizienten MEFs zeigte, dass späte Endosomen und Lysosomen eine leichte Dislokation in Richtung der Zellperipherie bei Fehlen des LAMP-2-Proteins und eine sehr deutliche periphere Dislokation bei Fehlen beider LAMP-Proteine aufwiesen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Transport der Lysosomen innerhalb der Zelle eine Störung aufweist. In eukaryotischen Zellen werden Lysosomen transportiert, indem sie an molekulare Motoren binden, die die Beförderung entlang von Mikrotubuli vermitteln (Cross et al., 2005). Kinesin-Motorproteine vermitteln hierbei anterograden Transport, Dyneinmotoren bewegen ihre Ladung in retrograder Richtung (Ross et al., 2008). Die Position eines Lysosoms ist also dadurch bestimmt, welcher der beiden Motorproteinkomplexe in dem Wettstreit zwischen Kinesin und Dynein die Oberhand gewinnt.

Die Identität der Lysosomen, wie auch anderer grösserer Organellen, ist unter anderem durch eine typische Zusammensetzung der Membranlipide und -proteine, sowie Rab-GTPasen bestimmt, die von den molekularen Motoren, vermittelt durch Adapterproteine, erkannt werden (Munro, 2004; Frederick et al., 2007). So scheint der GTPase Rab7 eine spezielle Rolle in der Rekrutierung von Dynein zuzukommen. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass LAMP-1 und LAMP-2 als typische Membranproteine später Endosomen und Lysosomen Teile des Erkennungsmotivs für den Dyneinmotorkomplex und seiner Adapterproteine z.B. in ihren cytosolischen c-Termini enthalten und so für den effektiven retrograden Transport dieser Organellen unerlässlich sind. So lassen z.B. Studien von Huyn und Kollegen vermuten, dass die Rab7-Rekrutierung zu Phagosomen von den LAMP-Proteinen abhängig ist (Huyn et

al., 2007). Dies würde die untypische Verteilung der LAMP-1-positiven späten Endosomen/Lysosomen in Richtung der Zellperipherie und damit ein Übergewicht der Kinesin-vermittelten Bewegung in den LAMP-2-einzeldefizienten MEFs erklären. Das gegenüber LAMP-2-einzeldefizienten MEFs noch verstärkte Auftreten der peripheren späten Endosomen / Lysosomen könnte darauf hinweisen, dass beide LAMP-Proteine Einfluss auf den intrazellulären Transport dieser Vesikel haben. Obwohl bisher viele der Proteine des Motorproteinkomplexes identifiziert werden konnten (Cross et al., 2005), ist es nicht auszuschließen, dass die LAMP-Proteine weitere Faktoren darstellen, die die feste Bindung des aktiven Komplexes an die spät-endosomale/lysosomale Membran stabilisieren oder die Spezifität dieser Bindung für den Dynein-vermittelten, retrograden Transport dieser Vesikel entlang der Mikrotubuli erhöhen.

Der bidirektionale mikrotubulinabhängige Transport von Organellen ist außer über die bereits diskutierten Faktoren von einer hierarchischen Kaskade von Signalwegen reguliert. Eine zentrale Rolle kommt hierbei cAMP zu (Kashina et al., 2004). Ob eine Störung cAMP-abhängiger Signalwege in den LAMP-2-einzeldefizienten und den LAMP-doppeldefizienten MEFs vorliegt und zu der tendentiellen Verlagerung der späten Endosomen in die Peripherie der Zellen führt, ist bislang noch nicht untersucht worden und sollte Gegenstand zukünftiger Experimente sein.

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass Cholesterol in späten Endosomen/Lysosomen in LAMP-2-defizienten und LAMP-1/2-doppeldefizienten Zellen akkumuliert. Diese auffällige Korrelation mit der untypischen Verteilung dieser Kompartimente in diesen Zellen lässt die Vermutung aufkommen, dass die Cholesterolakkumulation ursächlich für den fehlerhaften Transport der späten Endosomen und Lysosomen sein könnte. Die Hypothese wird unterstützt durch den Befund, dass die durch U18666A vermittelte Cholesterolbeladung die Lysosomenmotilität inhibiert (Lebrand et al., 2002). Dem widersprechend ist allerdings die Tatsache, dass in diesen Experimenten die Kinesin-vermittelte, anterograde Bewegung der Vesikel gestört war. Im Gegensatz dazu erschien in den LAMP-2-einzel- und den LAMP-1/2-doppeldefizienten MEFs der retrograde Transport gestört. Auch bewirkt die Cholesteroldepletion in LAMP-doppeldefizienten MEFs keine Wiederherstellung des retrograden Transports der spät-endosomalen/lysosomalen Vesikel (Huyn et al., 2007).

Stellvertretend für eine lysosomal aktive Protease wurde in Fluoreszenzfärbungen die lysosomale Hydrolase Cathepsin D und gleichzeitig saure Kompartimente mittels *LysoTracker*-Färbung markiert. Es zeigte sich sowohl in Wildtypzellen, als auch in LAMP-

einzel- und doppeldefizienten MEFs eine vesikuläre Kollokalisierung. Daraus kann geschlossen werden, dass zum einen die Azidifizierung der Lysosomen durch den korrekten Transport und die Funktion der v-H⁺-ATPase in den LAMP-defizienten MEFs nicht beeinträchtigt ist. Da die Proteaseaktivität von Cathepsin D von einem sauren Milieu abhängt (Turk et al., 2001), kann vermutet werden, dass aufgrund der Lokalisation von Cathepsin D in den markierten sauren Kompartimenten diese lysosomale Hydrolase aktiv ist. Dieser Befund stimmt mit vorangegangenen Untersuchungen überein, in denen keine Störungen verschiedener lysosomaler Abbauwege in LAMP-1/2-doppeldefizienten MEFs festgestellt werden konnte (Eskelinen et al., 2004).

5.2. Die Akkumulation von freiem Cholesterol in LAMP-defizienten Mausfibroblasten und die LAMP-Proteine

In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde mittels Filipinfärbung von freiem Cholesterol in Wildtyp-MEFs und LAMP-defizienten MEFs die Verteilung intrazellulären Cholesterols analysiert. In Wildtypzellen und in LAMP-1-defizienten Zellen wurde ein perinukleäres und vesikuläres Verteilungsmuster festgestellt. In den LAMP-2-einzeldefizienten und im besonderen Maße in den LAMP-1/2-doppeldefizienten MEFs konnte eine Akkumulation von freiem Cholesterol in späten Endosomen und Lysosomen beobachtet werden. Diese Cholesterolakkumulation ging einher mit der Abnahme der Menge von Cholesterolestern. Nicht nur in kultivierten Zellen, sondern auch in der Leber LAMP-2-defizienter Mäuse, konnte die Cholesterolakkumulation und die Abnahme von Lipidtröpfchen erstmalig festgestellt werden. Die Transfektion der doppeldefizienten MEFs mit LAMP-2A, jedoch nicht mit LAMP-1, reduzierte die Cholesterolakkumulation, was ebenfalls dafür spricht, dass das Fehlen von LAMP-2A eine stärkere Auswirkung auf die Cholesterolakkumulation hat. Das Fehlen von LAMP-2A scheint über direkte oder indirekte Mechanismen Auswirkungen auf den Export aus dem endo/lysosomalen Kompartiment zu besitzen. Bislang sind diese Mechanismen für den Cholesterolexport aus späten Endosomen und Lysosomen nur wenig verstanden. Bekannt ist, dass das exogene, in LDL-Partikeln über rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommene Cholesterol in das späte Endosom transportiert wird. Um zelluläre Antworten, wie die Regulierung der LDL-Rezeptorexpression, der *de novo*-Cholesterolsynthese und der Cholesterolveresterung im ER, auszulösen, muss Cholesterol späte Endosomen wieder verlassen (Goldstein JL, Brown MS,

1986; Ikonen, 2008). Aus diesem Zusammenhang erklärt sich, dass die Cholesterollakkumulation sowohl in den LAMP-doppeldefizienten MEFs, als auch in den LAMP-2-einzeldefizienten Lebern von der Abnahme der Lipidtröpfchen begleitet wird: Die Veresterung von Cholesterol im ER könnte durch einen Mangel an freiem, aus den späten/lysosomalen Kompartimenten stammenden Cholesterol reduziert sein.

Oxysterole spielen eine wichtige Rolle in der Cholesterolhomöostase, indem sie die Cholesterolsynthese hemmen und die Cholesterolveresterung stimulieren (Gill et al., 2008). Die Behandlung von LAMP-defizienten MEFs mit dem Oxysterol 25-Hydroxycholesterol stimulierte die Bildung von Lipidtröpfchen, ohne die Cholesterollakkumulation in den Lysosomen zu verringern. Durch Experimente, in denen radioaktiv markiertes LDL-Cholesterol verwendet wird, könnte dieser Befund eingehender untersucht werden. Messungen des veresterten, über LDL-Partikel aufgenommenen Cholesterols könnten so zusätzlich demonstrieren, ob der endo/lysosomale Export des Cholesterols in den LAMP-defizienten Fibroblasten gestört ist.

5.2.1. Die besondere Bedeutung der luminalen Domäne von LAMP-2

Die Transfektion von LAMP-defizienten MEFs mit LAMP-2A bewirkte einen signifikanten Rückgang der Cholesterollakkumulation, nicht jedoch die Transfektion mit dem strukturell sehr verwandten LAMP-1. Mit Hilfe von chimären Proteinen aus LAMP-1 und LAMP-2, in denen die Domänen der beiden Proteine gegeneinander ausgetauscht worden waren, konnte allein die luminal Domäne von LAMP-2, gebunden an die Transmembran- und cytoplasmatische Domäne von LAMP-1, die Cholesterollakkumulation in den LAMP-defizienten MEFs reduzieren. Diese Domäne scheint daher sehr entscheidend für die Funktion von LAMP-2 zu sein, die in den LAMP-defizienten Fibroblasten zu der Cholesterollakkumulation führt. Da die luminal Domäne in Datenbankrecherchen keine Homologien zu einem der bekannten cholesterolbindenden Proteine erkennen ließ, könnte der Wirkmechanismus auf die Cholesterolhomöostase eher indirekter Natur sein.

Es werden verschiedene Möglichkeiten des endo/lysosomalen Cholesteroltransports diskutiert (Hölttä-Vuori et al., 2006; Ikonen, 2008). Vesikelvermittelte Mechanismen scheinen dabei mit nicht-vesikulären „Hand-in-Hand“ zu gehen. Der vesikelvermittelte Weg beschreibt einen Mechanismus, in dem Rab-GTPasen eine wichtige Rolle spielen. Rab-GTPasen sind Regulatoren des vesikulären Transports (Seabra, M.C. und Evelyne Coudrier, E., 2004). Eine Inhibition dieser GTPasen mit dem GDP-Dissoziationsinhibitor GDI verhindert die

Entfernung von Cholesterol aus spätendosomalen Organellen (Hölttä-Vuori et al., 2000). Auch konnte die Überexpression von Rab7 und Rab9 die Cholesterolakkumulation in späten Endosomen in NPC1-Patientenfibroblasten reduzieren (Choudhury et al., 2002; Walter et al., 2008), so dass ein vesikelvermittelter intrazellulärer Cholesteroltransport zu bestehen scheint. Die in preliminären Experimenten dieser Arbeit gezeigte Veränderung des intrazellulären Transports der späten Endosomen/Lysosomen deutet die mögliche Störung eines vesikelvermittelten Cholesteroltransports an. Die Überexpression verschiedener Rab-GTPasen (Rab7, Rab8 und Rab9) in LAMP-doppeldefizienten MEFs, für die ein Einfluss auf die endo/lysosomale Cholesterolreduktion gezeigt werden konnte (Choudhury et al., 2002; Linder et al., 2007), hatte keine Reduktion der Cholesterolakkumulation zur Folge (Daten nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass das Fehlen von LAMP-2 die Funktion dieser Rab-Proteine verhindert und so den vesikulären Cholesteroltransport unterbricht.

Das Ergebnis, dass die luminaire Domäne von LAMP-2 der verantwortliche Bereich des LAMP-2-Proteins zu sein scheint, der die Cholesterolakkumulation in den LAMP-1/2-doppeldefizienten MEFs zu reduzieren vermag, lässt die Einflussnahme des Proteins in Vesikeltransportprozesse, die maßgeblich auf der cytosolischen Seite der Vesikelmembran oder innerhalb der Membran stattfinden, zunächst unwahrscheinlich erscheinen. In weiteren Experimenten konnte jedoch gerade die membranproximale Region der luminalen Domäne als diejenige identifiziert werden, die für die Reduktion des endo/lysosomalen Cholesterols in LAMP-defizienten MEFs entscheidend ist.

Ein weiterer Transportmechanismus von freiem Cholesterol postuliert einen Transport von endo/lysosomalem freiem Cholesterol, der ohne Vesikel stattfindet. In späten Endosomen unterscheiden sich die internen Membranen von der limitierenden Membran sowohl bezüglich der Lipid-, als auch der Proteinzusammensetzung. Nach derzeitigem Verständnis befindet sich der größte Teil des endo/lysosomalen freien Cholesterols in den internen Membranen (Kobayashi et al., 1999). Um innerhalb der Zelle weitertransportiert werden zu können, muss Cholesterol von diesen intra-endosomalen Membranen der limitierenden Membran zugeführt werden (Gruenberg et al., 2001). Endo/lysosomale Proteine, für die eine Funktion in diesem vesikelinternen Zusammenspiel vorgeschlagen wurden, sind das lösliche Protein NPC2 (Ko et al., 2003) und die in der limitierenden Membran inserierten MLN64 (Alpy et al., 2005) und ORP1 (Johansson et al., 2007). Auch das in den internen Membranen lokalisierte Lipid BMP scheint in diesen Prozess involviert zu sein (Kobayashi et al., 1999). In diesem Szenario könnte nun auch LAMP-2, speziell die luminaire Domäne, eine intralysosomale Funktion erfüllen, indem es zum Beispiel die Stabilität dieser Protein- und Lipidinteraktionen

beeinflusst und so eine Akkumulation des endo/lysosomalen Cholesterols verhindert. Zudem wurden sowohl für MLN64 (Holttä-Vuori et al., 2005), als auch für ORP1 (Johansson et al., 2007) Interaktionen mit Aktinfilamenten bzw. Mikrotubuli und eine damit verbundene Aufgabe im Vesikeltransport entlang dieser Filamente gezeigt. Beeinträchtigt das Fehlen von LAMP-2 die Funktion dieser Proteine, würde dies eine Störung eines vesikelabhängigen Cholesteroltransportes aus den späten Endosomen erklären.

5.2.2. Der entscheidende Teilbereich von LAMP-2 ist die membranproximale Hälfte der luminalen Domäne

Mit der selben Strategie, mit der die luminal Domäne als der wichtigste Bereich von LAMP-2 für dessen Funktion im lysosomalen Cholesterolexport identifiziert worden war, wurde versucht, den entscheidenden Teilbereich dieser Domäne näher einzugrenzen. Chimäre Proteine aus der Transmembran- und der cytosolischen Domäne von LAMP-1 wurden kombiniert mit einer luminalen Domäne, in der verschiedene Bereichen aus LAMP-1 und LAMP-2 gegeneinander ausgetauscht wurden. Expressionsstudien in LAMP-defizienten MEFs zeigten, dass die membranproximale Hälfte der luminalen Domäne entscheidend für den Cholesterolefflux war.

Dieser Bereich des LAMP-2-Proteins beinhaltet die *hinge*-Region, zwei der vier potentiellen Disulfidbrücken ($C^{237} - C^{270}$ und $C^{336} - C^{373}$) und neun potentielle N-Glykosylierungsstellen. In diesem Bereich konnte in Datenbankrecherchen keine Homologie zu einem der bekannten cholesterolbindenden Proteine gefunden werden.

In der für murines LAMP-2 in der Proteindatenbank *SwissProt* hinterlegten Proteinstruktur werden 16 potentielle N-Glykosylierungsstellen in der luminalen Domäne angegeben, von denen laut experimentellen Daten auch die meisten genutzt werden (Lewis et al., 1985). Durch die Entfernung der Kohlenhydratreste reduzierte sich das Molekulargewicht von LAMP-2 von 100 kD auf 50 kD. Diese Tatsache lässt vermuten, dass die luminal Domäne und auch die membranproximale Hälfte dieser Domäne von einer engen Schicht aus Kohlenhydraten bedeckt ist, was eine direkte Bindung von Cholesterol mehr als unwahrscheinlich macht.

Die luminal Domäne von LAMP-2 könnte eher Stabilität, Lokalisation oder Funktion anderer Faktoren beeinflussen, die am lysosomalen Cholesterolefflux über vesikuläre und nicht-vesikuläre Wege beteiligt sind. Wie bereits diskutiert, scheinen bei dem Export des Cholesterols aus dem spätendosomalen Kompartiment nicht-vesikuläre und vesikuläre

Transportprozesse eng zusammenzuhängen. Diese Tatsache bestärken die Vermutung, dass die membranproximale Hälfte der luminalen Domäne von LAMP-2 der entscheidende Bereich dieses Proteins sein könnte, um die Funktion des Protein in diesem Zusammenspiel zu gewährleisten.

Zusätzlich zu den bereits diskutierten Kandidatenproteinen könnten Untersuchungen von Proteinen, die in den intrazellulären Cholesteroltransport regulieren, wie z.B. ABCA1 (*ATP binding cassette transporter*; Maxfield et al., 2005) oder Scavenger-Rezeptor-BI (Ahres et al., 2008) möglicherweise weitere Einblicke in die Mechanismen der Cholesterolhomöostase gewähren, die in den LAMP-defizienten MEFs gestört zu sein scheinen.

5.2.3. LAMP-2 und die NPC-Proteine

Untersuchungen der Niemann Pick Typ C-Erkrankung, einer tödlichen, autosomal-rezessiv vererbten Krankheit, die durch eine lysosomale Cholesterolakkumulation charakterisiert ist, zeigten, dass die Proteine NPC1 und NPC2 am lysosomalen Export von Cholesterol beteiligt sind (Carstea et al., 1997; Naureckiene et al., 2000; Ikonen, 2008). Es wurde bereits gezeigt, dass die subzelluläre Lokalisation von NPC1 in den LAMP-defizienten MEFs gegenüber Wildtypzellen verändert zu sein scheint (Eskelinen et al., 2004). In den LAMP-defizienten MEFs wurde NPC1 zu den cholesterolbeladenen Vesikeln rekrutiert, während die NPC1-Lokalisierung in Wildtypzellen ein feines, punktförmiges Muster aufwies.

Es wird vermutet, dass NPC2 indem es Cholesterol im lysosomalen Lumen bindet und es weiteren Proteinen, die für den Transport durch die lysosomale Membran verantwortlich sind, wie z.B. NPC1 zuführt und so am Cholesterolefflux beteiligt sein könnte (Infante et al., 2008; Xu et al., 2008).

Die Lokalisation von NPC2 wurde in dieser Arbeit untersucht. Es zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Lokalisation in den LAMP-defizienten MEFs gegenüber Wildtypzellen. In beiden Zelltypen wurde NPC2 in vesikulären Strukturen nachgewiesen. Auch eine Überexpression von LAMP-2 in den defizienten Zellen bewirkte keine Veränderung der Lokalisation. Sowohl in den Wildtypzellen, als auch in den transfizierten LAMP-defizienten Zellen kolokalisierte NPC2 mit LAMP-2. Auch die subzelluläre Lokalisation dieser Vesikel schien in LAMP-defizienten MEFs gegenüber Wildtypzellen nicht verändert.

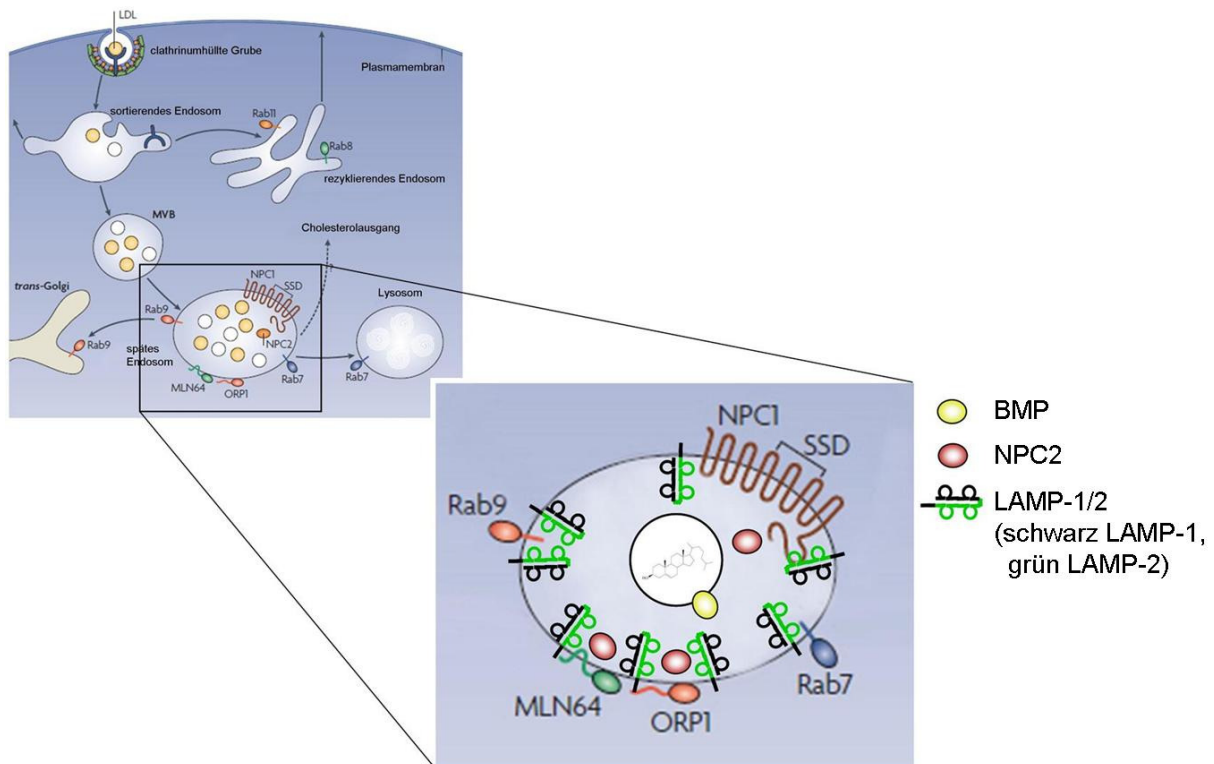


Abbildung 38: Modell der Funktion der luminalen Domäne von LAMP-2. Der größte Teil des endo/lysosomalen freien Cholesterols befindet sich in den internen, BMP-positiven Membranen. Um das späte Endosom/Lysosom verlassen zu können, muss das Cholesterol von den intra-endosomalen Membranen zu der limitierenden Membran der späten Endosomen/Lysosomen gebracht werden. Nach einem hier vorgestellten Modell vermittelt LAMP-2 die Interaktion des vesikelinternen löslichen Cholesteroltransportproteins NPC2 und Cholesterolakzeptoren der limitierenden Membran, wie NPC1, MLN64, oder ORP1. Aus diesem Grund scheint die membranproximale Hälfte der luminalen Domäne von LAMP-2 entscheidende Bereich des Proteins zu sein, der die Stabilität dieser Protein- und Lipidinteraktionen beeinflusst und so eine Akkumulation des endo/lysosomalen Cholesterols verhindert.

In Western Blot-Analysen wurde die Proteinmenge von NPC2 in Wildtyp-MEFs mit der in LAMP-einzel- und doppeldefizienten MEFs verglichen (Daten nicht gezeigt). Es zeigte sich eine nicht unerhebliche Varianz in der Menge von detektiertem NPC2 zwischen den getesteten Zelllinien, allerdings ohne einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und defizienten Zellen aufzuweisen.

Die Frage, ob LAMP-2 unterstützend an dem durch die beiden NPC-Proteine vermittelten Cholesterolexport aus späten Endosomen beteiligt ist, konnte durch die preliminären Experimente dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

In zukünftigen Versuchsansätzen sollte der Frage nachgegangen werden, ob Cholesterol das einzige Lipid ist, das im spätendosomalen Kompartiment akkumuliert. Für NPC1 konnte erst

kürzlich gezeigt werden, dass es sich bei diesem Protein wahrscheinlich um einen Sphingosintransportprotein handelt. Fehlt dieses Protein oder ist die Funktion durch Mutationen gestört, wie es in NPC-Patientenfibroblasten der Fall ist, kommt es zu einer dem Phänotyp der LAMP-2-defizienten und LAMP-doppeldefizienten vergleichbaren endosomalen Cholesterollakkumulation (Patterson et al., 1993, Butler et al., 1993). Neben freiem Cholesterol akkumulieren in NPC1-defizienten Zellen jedoch auch weitere Lipide, wie Sphingomyelin, Glykosphingolipide und Sphingosin in späten Endosomen (Liscum, 2000; Sun et al., 2001, te Vruchte et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass es sich primär in diesen Zellen um einen gestörten Efflux von Sphingosin handelt, in dessen Folge es zur Depletion von endosomalem Calcium kommt (Lloyd-Evans et al., 2008). Durch fehlendes luminales Calcium in den Endosomen ist vermutlich die Fusionsfähigkeit dieser Vesikel mit anderen membranumschlossenen Organellen und dadurch sekundär der Transport der anderen Lipide ebenfalls gestört.

Die Bestimmung der endosomalen Akkumulation anderer Lipide und auch der luminalen Calciumkonzentration der Endosomen in den LAMP-defizienten MEFs könnte wichtige Hinweise auf die Mechanismen liefern, die zu der endosomalen Cholesterollakkumulation in diesen Zellen führen.

5.3. Die Rolle der LAMP-Proteine in der Phagozytose

Die Phagozytose ist ein essentieller Teil der angeborenen Immunantwort und beschreibt einen Vorgang, in dem spezialisierte Zellen eindringende Pathogene, apoptotische Zellen und weitere fremde Partikel, die größer als 0,5 μM im Durchmesser sind, nach Rezeptor-Liganden-Interaktionen aufnehmen (Luzio et al., 2007). Die Phagozytose löst eine Reihe von Transmembransignalkaskaden aus, die zur Reorganisation des Zytoskeletts und zur Bildung eines intrazellulären, geschlossenen Organells führen, dem Phagosom. Phagozytotische Vakuolen erhalten ihre degradierenden und antimikrobiellen Eigenschaften über eine Serie von Interaktionen mit Endosomen (Desjardins et al., 1995; Stockinger et al., 2006). Dieser Prozess, zusammengefasst phagosomale Reifung genannt, mündet in der Fusion von Phagosomen mit Lysosomen. Es entsteht ein mit hydrolytischen Enzymen, reaktiven Sauerstoffspezies und antimikrobiellen Peptiden angereichertes Hybridorganell, das in der Lage ist, internalisierte Mikroorganismen abzutöten und zu degradieren. Dieses auch Phagolysosom genannte Organell enthält neben den aus der Fusion mit Lysosomen

stammenden, löslichen Komponenten auch Membranproteine wie die v-H⁺-ATPase, die die Ansäuerung des Lumens bewirkt (Lukacs et al., 1990; Luzio et al., 2007). Die Komplexität der phagosomalen Reifung macht es schwierig, diesen Prozess in die genauen molekularen Ereignisse zu gliedern, die zu der Phagolysosomenbiogenese führen, aber es ist bekannt, dass die Interaktion mit dem Zytoskelett und die Teilnahme der GTPase Rab7 und deren Effektor RILP im Laufe von Fusionsprozessen eine wichtige Rolle spielen (Harrison et al., 2003).

Obwohl die lysosomal assoziierten Membranproteine LAMP-1 und LAMP-2 wahrscheinlich die abundantesten integralen Membranproteine der Phagolysosomen sind, ist ihre Funktion in diesen Vesikeln bislang unklar. Da Mäuse mit einer Defizienz in LAMP-1 und LAMP-2 eine embryonale Letalität am Embryonaltag 15 zeigen, wurden in dieser Arbeit statt professionell phagozytotischen Zellen, wie Makrophagen oder Neutrophile Granulozyten, LAMP-1/2-doppeldefiziente Mausfibroblasten verwendet, um die Rolle dieser Proteine genauer zu untersuchen. Durch Transfektion mit humanen F_γIIA-Rezeptoren, konnte die Phagozytose in diesen Zellen rekonstituiert werden, eine Methode, wie sie von Downey und Kollegen schon für andere nicht-phagozytotische Zellen etabliert worden war (Downey et al., 1999). Als Substrat für die Phagozytose dienten hierbei IgG-opsonierte Latexkügelchen, die in der Lage sind, Rezeptor-Liganden-Interaktionen mit den F_γIIA-Rezeptoren einzugehen und so auch in MEFs Phagosomen entstehen zu lassen.

Als Indikator für die Fusion von Phagosomen mit Lysosomen zu Phagolysosomen dient die Rekrutierung von LAMP-2 und Cathepsin D (Mullock et al., 1998; Luzio et al., 2000). Während der Etablierung eines Phagozytose-Assays mit MEFs (3.2.2.12) zeigte sich, dass nach Ablauf einer einstündigen Maturierungszeit sowohl Cathepsin D, als auch LAMP-2 zu den Phagosomen in Wildtyp-MEFs rekrutiert wurden. In den LAMP-defizienten MEFs zeigte sich ein gravierender Maturierungsdefekt der Phagosomen bezüglich der Rekrutierung von Cathepsin D zu den Phagosomen.

Um ihre Aufgabe als Degradierungsorganell zu erfüllen, ist, wie erwähnt, auch die Rekrutierung der v-H⁺-ATPase von entscheidender Bedeutung. Die Azidifizierung des phagosomalen Lumens greift internalisierte Mikroorganismen nicht nur direkt an, sondern steigert auch die Effizienz antimikrobieller Peptide, lysosomaler Hydrolasen und die Umwandlung von Zwischenstufen zu reaktiven Sauerstoffspezies. Daher wurde die Ansäuerung der Phagosomen mittels *LysoTrackerRed*-Färbung überprüft. Auch hierbei zeigte sich, dass in einem Großteil der Phagosomen in den Wildtypzellen das Lumen nach einer Stunde Maturierungszeit angesäuert worden war, während dies in den LAMP-defizienten MEFs nur zu einem sehr geringen Teil der Fall war.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die LAMP-Proteine für eine erfolgreiche Fusion von Phagosomen mit Lysosomen nötig sind. Am Beispiel der Cathepsin D-Rekrutierung zu den Phagosomen konnte zudem gezeigt werden, dass die Transfektion der LAMP-doppeldefizienten MEFs sowohl mit LAMP-1, als auch mit LAMP-2, die Wiederherstellung der phagosomalen Reifung bewirkt, was diese These nachhaltig unterstützt. Zusammen mit der Beobachtung, dass die LAMP-Proteine in der Autophagozytose ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Reifung von Autolysosomen spielen (Eskelinen et al., 2004; Jager et al., 2004), zeigt dies, dass die LAMPs eine wichtige Funktion für die Dynamik des endosomalen Vesikelnetzwerks übernehmen.

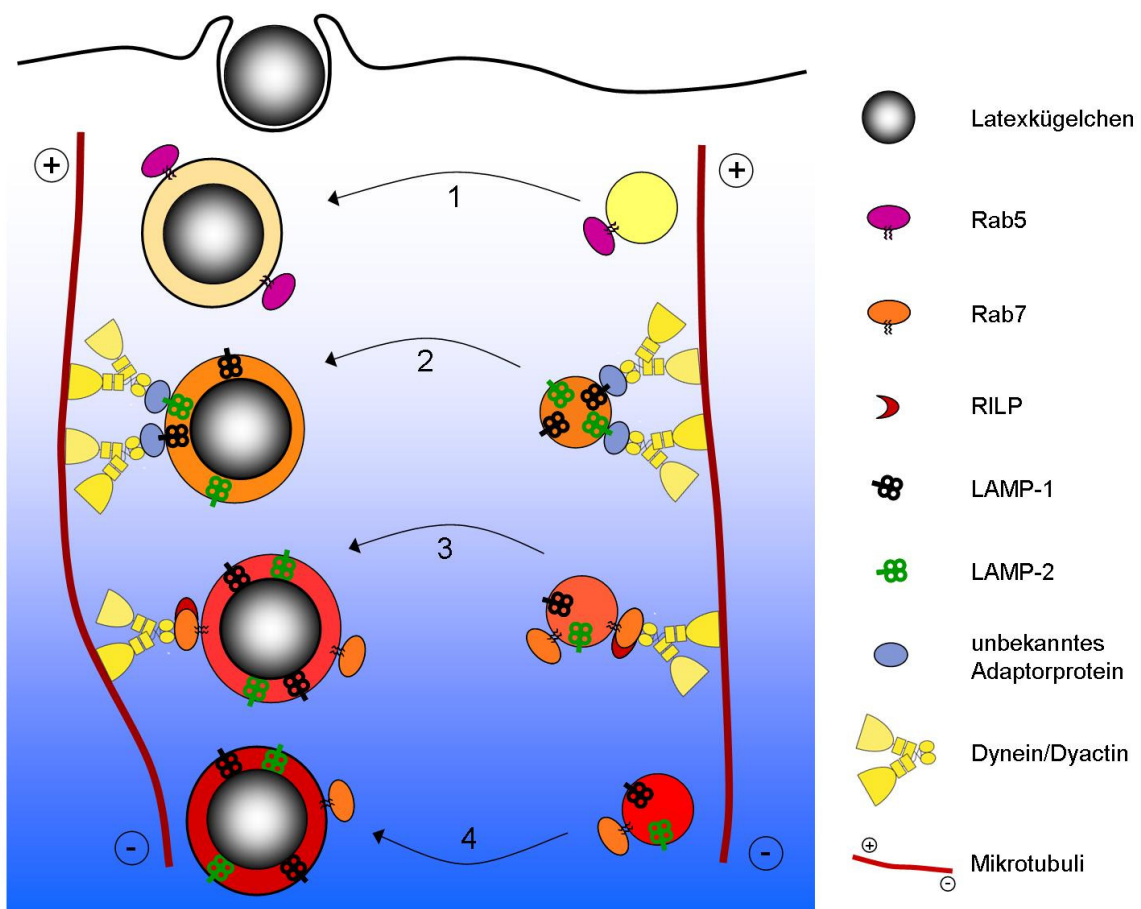


Abbildung 39: Schematische Darstellung der putativen Funktion der LAMP-Proteine während der phagosomalen Reifung. Nach dem Schließen der phagosomalen Membran unterliegt das Phagosom (linke Spalte) einer Reihe von sukzessiven Fusionsereignissen mit endozytotischen Vesikeln (rechte Spalte). Die Phagosomenreifung beginnt mit der Fusion mit frühen Endosomen (1), das mit der Akquirierung von PI(3)P und Rab5 einhergeht und für die weitere Interaktion mit späten Endosomen nötig ist. Vermutlich ist die Rekrutierung von Rab7 unabhängig von den LAMP-Proteinen (2). LAMP-1 und LAMP-2 vermitteln die Verknüpfung des Phagosoms mit den Mikrotubuli, entweder über die direkte Assoziation mit Dynein/Dynactin oder über einen unbekanntes Adapterprotein. Die LAMP-Proteine gewährleisten dann die Fusion mit späten Endosomen, die Rab7 beeinhalteten (3). Die Reifung endet mit der Fusion mit Lysosomen zu einem reifen Phagolysosom (4).

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in LAMP-doppeldefizienten MEFs späte Endosomen und Lysosomen eine sehr deutliche periphere Dislokation aufwiesen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Transport dieser Vesikel innerhalb der Zelle eine Störung aufweist. Eine Fehlfunktion von Dynein, einem Motorprotein, das für den retrograden Vesikeltransport verantwortlich ist, hat eine Störung der Fusion von homotypischen und heterotypischen endosomalen Vesikeln zur Folge (Burkhardt et al., 1997; Aniento et al., 1993). Moller und Kollegen nehmen ferner an, dass die Mobilität von Phagosomen während der phagosomalen Reifung ebenfalls von Bedeutung ist (Moller et al., 2000).

Kurz nach dem Verschließen der phagosomalen Membran assoziiert Rab5 an das Phagosom, was für die spätere Rekrutierung von Rab7 essentiell zu sein scheint (Vieira et al., 2003). Man nimmt an, dass die Fusion von Phagosomen mit späten Endosomen / Lysosomen die LAMP-Proteine zu den reifenden Phagosomen übertragen (Jahrhaus et al., 1998; Harrison et al., 2003).

Unerwarteterweise ist die Übertragung von Rab7 zu den Phagosomen in LAMP-defizienten MEFs gestört, was darauf schließen lässt, dass die Rekrutierung von Rab7 zu den Phagosomen selbst LAMP-abhängig ist (Hyunh et al., 2007). Die Überexpression einer dominant negativen Form von Rab7 inhibierte die phagosomale Rekrutierung der LAMP-Proteine nur teilweise, woraus die Schlussfolgerung gezogen worden war, dass nicht alle LAMP-Moleküle bezüglich ihres Transportes zu den Phagosomen von Rab7 abhängig sind und dass die LAMP-Rekrutierung oberhalb der Rab7-Rekrutierung innerhalb einer Folge von Maturierungsschritten (s. Abb. 39, Schritt 2) erfolgt. Diese Interpretation wird durch die Tatsache unterstützt, dass Phagosomen, die *Leishmania* enthalten, die LAMP-Proteine auch ohne Rab7 zu den Phagosomen rekrutiert worden waren (Scianimanico et al., 1999).

Der am besten charakterisierte Effektor von Rab7 ist RILP (Rab7 interagierendes lysosomales Protein). RILP spielt bei der phagosomalen Reifung eine entscheidende Rolle, da es den Dyneinmotorproteinkomplex zu den Phagosomen rekrutiert, wodurch ein retrograder Transport der Phagosomen entlang der Mikrotubuli in Richtung des Mikrotubuli-Organisationszentrums in der juxt nukleären Region gewährleistet ist (Harrison et al., 2003), in der die Fusion mit Lysosomen stattfindet. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass späte Endosomen/Lysosomen in LAMP-defizienten MEFs eine Dislokation in Richtung der Peripherie aufwiesen, die auf einen gestörten Dynein-vermittelten, retrograden Transport entlang der Mikrotubuli hindeutet. Da dies der Fall war, obwohl Rab7 und RILP zu den Lysosomen in LAMP-defizienten MEFs rekrutiert werden (Hyunh et al., 2007), kann vermutet werden, dass zusätzlich zum Rab7/RILP/Dynein-Komplex weitere Faktoren nötig

sind, um eine normale subzelluläre Verteilung und Beweglichkeit dieser Vesikel zu gewährleisten.

Es ist denkbar, dass ein dreiteiliger Komplex aus Rab7, RILP und LAMP für eine stabile Assoziation der Phagosomen und späten Endosomen mit Dynein nötig ist. Möglicherweise sind die LAMP-Proteine aber alternativ auch in einen Dynein-unabhängigen Mechanismus involviert, der zusätzlich zu dem bekannten Rab7/RILP-Mechanismus eine zusätzlich stabilisierende Verbindung der Vesikel über bislang unbekannte Adapteren mit den Mikrotubuli herstellt. Wie die LAMP-Proteine auf der cytosolischen Seite von Vesikeln ihre Wirkung entfalten könnten, ist unbekannt. Die LAMP-Proteine exponieren nur eine kurze, 11-aminosäurelange Sequenz in das Cytosol, für die jedoch in einem anderen Zusammenhang bereits eine Proteininteraktion postuliert worden ist. So wurde gezeigt, dass diese Proteindomäne von LAMP-2A, einer der drei bekannten Spleißvarianten von LAMP-2, den Rezeptor für die chaperonvermittelte Autophagozytose darstellt (Bandyopadhyay et al., 2008).

In zukünftigen Versuchen sollte untersucht werden, ob die cytoplasmatische Domäne von LAMP-2A mit weiteren Proteinen interagiert. Zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner würden sich beispielsweise Ko-Immunpräzipitationsexperimente oder ein *Yeast-II-Hybrid-screening* anbieten.

Wie eingangs erwähnt, stellt ein funktionierender Transport der Phagosomen entlang der Mikrotubuli eine wichtige Bedingung für die Fusion mit Lysosomen und damit für eine erfolgreiche phagosomale Reifung dar (Blocker et al., 1998; Harrison et al., 2003). Die Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten (Hyunh et al., 2007) sind am einfachsten dadurch erklärbar, dass LAMP-1 und LAMP-2 für die Beweglichkeit der Organellen benötigt wird, die für die Phagolysosomfusion unabdingbar ist.

Die Hypothese, dass die im zweiten Teil dieser Arbeit gezeigte Cholesterollakkumulation in späten Endosomen ursächlich für den gestörten Vesikeltransport sei (Lebrand et al., 2002), konnte bereits ausgeschlossen werden, da eine Cholesteroldepletion in den LAMP-defizienten MEFs nicht zur Wiederherstellung des retrograden Transports der spät-endosomalen/lysosomalen Vesikel führte (Hyunh et al., 2007).

In NPC1-Patientenfibroblasten wurde gezeigt, dass die primäre Akkumulation von Sphingosin in späten Endosomen zu einer sekundären Reduktion luminalen Calciums in diesen Kompartimenten führt (Lloyd-Evans et al., 2008). Die lysosomale Calciumdepletion wurde als Ursache für gestörte endocytotische Funktionen in diesen Zellen postuliert. Zukünftige Experimente mit LAMP-defizienten MEFs sollten der Frage nachgehen, ob auch

in diesen Zellen neben Cholesterol weitere Lipide, wie Sphingosin, akkumulieren und eine Reduktion lysosomalen Calciums vorliegt, die ein alternatives Erklärungsmodell für die gestörte Phagosomenreifung liefern könnten. Die Calciumabhängigkeit der phagosomalen Reifung wurde in anderen Publikationen bereits gezeigt (Czibener, C. et al., 2006; Stockinger, W. et al. (2006).

6. Zusammenfassung

Die beiden abundanten lysosomal assoziierte Membranproteine LAMP-1 und LAMP-2 stellen fast die Hälfte der Proteinmasse aller lysosomalen Membranproteine. Da die LAMPs eine Glykokalix bilden, indem sie aufgrund ihrer Glykosylierung eine kontinuierliche Kohlenhydratschicht auf der Innenseite der Membran von späten Endosomen und Lysosomen generieren, wurde ihre ursprüngliche Aufgabe in der Erhaltung der strukturellen Integrität dieser Membran durch den Schutz vor den lysosomalen Hydrolasen vermutet.

Um Funktionen der beiden lysosomalen Membranproteine LAMP-1 und LAMP-2 zu untersuchen, die über diese eher allgemeine Aufgabe hinausgehen, wurde an aktuelle Forschungsergebnisse angeknüpft. In LAMP-defizienten Mausfibroblasten wurde eine spätendosomale Cholesterolakkumulation festgestellt. Zudem wurde eine verminderte phagosomale Reifung in Makrophagen im Zusammenhang mit der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen beobachtet. In der vorliegenden Arbeit wurden Auswirkungen des Fehlens der beiden abundanten lysosomalen Membranproteine LAMP-1 und LAMP-2 auf unterschiedliche Funktionen der Lysosomen in LAMP-defizienten Mausfibroblasten näher untersucht.

Während der generellen Charakterisierung LAMP-defizienter Mausfibroblasten wurde eine Dislokation später Endosomen/Lysosomen in LAMP-2- und LAMP-1/2-doppeldefiziente Zellen festgestellt. In Kontrollzelllinien und den LAMP-1-defizienten Zellen schienen die späten Endosomen/Lysosomen eher perinukleär lokalisiert zu sein, in den LAMP-2- und den LAMP-doppeldefizienten Zellen hingegen in periphere Bereiche der Zelle verteilt. Die Rekrutierung der lysosomalen Hydrolase Cathepsin D zu sauren Kompartimenten war dabei nicht gestört.

In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde die Verteilung von intrazellulärem Cholesterol in Wildtyp-MEFs und LAMP-defizienten MEFs analysiert. In Wildtypzellen und in LAMP-1-defizienten Zellen wurde ein perinukleäres und vesikuläres Verteilungsmustervon freiem Cholesterol festgestellt. In den LAMP-2-einzeldefizienten und im besonderen Maße in den LAMP-1/2-doppeldefizienten MEFs konnte eine Akkumulation von freiem Cholesterol in späten Endosomen und Lysosomen beobachtet werden, die mit einer Reduktion von NilRot-färbaren Cholesterolestern einherging. In der Leber LAMP-2-defizienter Mäuse konnte die Cholesterolakkumulation und die Abnahme von Cholesterolestern in Lipidtröpfchen ebenfalls festgestellt werden.

Die heterologe Expression von LAMP-2A in den doppeldefizienten MEFs reduzierte die Cholesterolakkumulation, nicht jedoch die Transfektion mit LAMP-1.

Mit Hilfe von chimären Proteinen aus LAMP-1 und LAMP-2, konnte die membranproximale Hälfte der luminalen Domäne als der Bereich von LAMP-2 eingegrenzt werden, der die Cholesterolakkumulation in den LAMP-defizienten MEFs reduzieren vermag.

Um die Rolle der LAMP-Proteine während der phagosomalen Reifung zu untersuchen, wurde ein Latexkügelchen-Phagozytose-*Assay* mit murinen Fibroblasten etabliert. Es zeigte sich, dass sowohl die lysosomale Hydrolase Cathepsin D, als auch LAMP-2 zu einem Großteil der Phagosomen in Wildtyp-MEFs rekrutiert worden war, Indikatoren für die Fusion von Phagosomen mit Lysosomen zu Phagolysosomen. In den LAMP-1/2-doppeldefizienten MEFs zeigte sich ein gravierender Maturierungsdefekt der Phagosomen bezüglich der Rekrutierung von Cathepsin D zu den Phagosomen und der Generierung eines luminalen sauren Milieus. Es konnte gezeigt werden, dass die Transfektion der LAMP-defizienten MEFs sowohl mit LAMP-1, als auch mit LAMP-2, die Wiederherstellung der phagosomalen Reifung bewirkt.

7. Summary

The Lysosome Associated Membrane Proteins LAMP-1 and LAMP-2 represent nearly 50 % of the total membrane protein of late endosomes and lysosomes. LAMPs form a nearly continuous carbohydrate coat on the inner surface of the lysosomal membrane. The protective function against degradation by lysosomal hydrolases was assigned to the heavy glycosylation of both LAMP proteins possibly generating a continuous glycocalyx. Recent publications revealed further biological functions of LAMP-1 and LAMP-2. Murine fibroblasts deficient for both LAMPs were shown to accumulate free cholesterol in late endosomal compartments. Additionally, impairment of phagosomal maturation led to reduced clearance of pathogenic microbials in granulocytes deficient for LAMP-2 and in mouse embryonic fibroblasts (MEF) deficient for both LAMPs.

In this work the impact of the abundant lysosomal membrane proteins LAMP-1 and LAMP-2 on different lysosomal functions were studied. Therefore MEFs deficient in LAMP-1 and LAMP-2 expression were used. First studies revealed a dislocation of late endosomes/lysosomes in LAMP deficient MEFs. In control as well as in LAMP-1 deficient cells late endosomes were located near the nucleus. In contrast, in cells deficient for LAMP-2 or both LAMPs the late endosomal vesicles were peripherally located. Recruitment of the lysosomal hydrolase cathepsin D to acidic compartment was unaffected.

Filipin staining was used to analyse the localisation of free cholesterol in wildtype and LAMP deficient MEFs. While in wildtype and LAMP-1 deficient cells the localisation of free cholesterol was observed in perinuclear structures, in LAMP double deficient and to less extent in LAMP-2 deficient cells free cholesterol accumulated in late endosomal/lysosomal compartments. In addition to the prominent accumulation of cholesterol in late endosomes/lysosomes, the double deficient MEFs harbour considerably less Nile Red stainable lipid droplets than wild type MEFs. Furthermore, LAMP-2 deficiency led to intracellular cholesterol accumulation also in tissue, not only in cultured cells. Filipin staining of liver sections showed that LAMP-2 deficient liver accumulated free cholesterol, too. A reduction of lipid droplets was observed in LAMP-2 deficient livers.

Transient over-expression of LAMP-2A abolished the endo/lysosomal cholesterol accumulation in LAMP double deficient MEFs. In contrast, the over-expression of LAMP-1

could not restore normal cholesterol distribution. LAMP-2/LAMP-1 chimeric proteins were used to identify the region of the LAMP-2 protein which is critical for the rescue effect.

Over-expression of a chimeric protein containing the membrane-proximal half of the luminal domain of LAMP-2 led to the correcting of cholesterol accumulation in LAMP deficient fibroblasts. These data suggest that the membrane-proximal part of the luminal domain of LAMP-2 is sufficient to effect the cholesterol homeostasis.

To address functions for LAMP proteins on the phagosomal maturation, a phagocytosis assay using latex beads was established. The majority of phagosomes in wildtype MEFs recruited cathepsin D and LAMP-2 indicating a fusion of phagosomes with lysosomes. In LAMP-1/2 double deficient MEFs the phagosomal recruitment of cathepsin D and the acidification of the phagosomal lumen were dramatically reduced. Transient expression of LAMP-1 and LAMP-2, respectively could reconstitute phagosomal maturation.

8. Literatur

- Ahras, M., Naing, T., and McPherson, R. (2008) Scavenger receptor class B type I localizes to a late endosomal compartment, *Journal of lipid research* 49, 1569-1576.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., and Walter, P. (2004) *Molekularbiologie der Zelle*, Viley-VHC Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Alpy, F., and Tomasetto, C. (2005) Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals, *Journal of cell science* 118, 2791-2801.
- Anderson, R. G., and Orci, L. (1988) A view of acidic intracellular compartments, *The Journal of cell biology* 106, 539-543.
- Andersson, T. P., Svensson, S. P., and Karlsson, A. M. (2003) Regulation of melanosome movement by MAP kinase, *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 16, 215-221.
- 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, *The Journal of biological chemistry* 274, 12692-12701.
- Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G., and Gruenberg, J. (1993) Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes, *The Journal of cell biology* 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, *The American journal of pathology* 53, 687-733.
- Bandyopadhyay, U., and Cuervo, A. M. (2008) Entering the lysosome through a transient gate by chaperone-mediated autophagy, *Autophagy* 4, 1101-1103.
- Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L., and Cuervo, A. M. (2008) The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane, *Molecular and cellular biology* 28, 5747-5763.
- Beertsen, W., Willenborg, M., Everts, V., Zirotianni, A., Podschun, R., Schroder, B., Eskelinen, E. L., and Saftig, P. (2008) Impaired phagosomal maturation in neutrophils leads to periodontitis in lysosomal-associated membrane protein-2 knockout mice, *J Immunol* 180, 475-482.
- Binker, M. G., Cosen-Binker, L. I., Terebiznik, M. R., Mallo, G. V., McCaw, S. E., Eskelinen, E. L., Willenborg, M., Brumell, J. H., Saftig, P., Grinstein, S., and Gray-Owen, S. D. (2007) Arrested maturation of Neisseria-containing phagosomes in the absence of the lysosome-associated membrane proteins, LAMP-1 and LAMP-2, *Cellular microbiology* 9, 2153-2166.

- Blocker, A., Griffiths, G., Olivo, J. C., Hyman, A. A., and Severin, F. F. (1998) A role for microtubule dynamics in phagosome movement, *Journal of cell science* 111 (Pt 3), 303-312.
- Blum, H., Beier, H., und Gross, JH (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* 8, 93-99 (1987).
- Bright, N. A., Gratian, M. J., and Luzio, J. P. (2005) Endocytic delivery to lysosomes mediated by concurrent fusion and kissing events in living cells, *Curr Biol* 15, 360-365.
- Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis, *Science (New York, N.Y)* 232, 34-47.
- 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, *The Journal of cell biology* 139, 469-484.
- Burnside, J., and Schneider, D. L. (1982) Characterization of the membrane proteins of rat liver lysosomes. Composition, enzyme activities and turnover, *The Biochemical journal* 204, 525-534.
- Butler, J. D., Vanier, M. T., and Pentchev, P. G. (1993) Niemann-Pick C disease: cystine and lipids accumulate in the murine model of this lysosomal cholesterol lipidosis, *Biochemical and biophysical research communications* 196, 154-159.
- Carstea, E. D., Morris, J. A., Coleman, K. G., Loftus, S. K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., Rosenfeld, M. A., Pavan, W. J., Krizman, D. B., Nagle, J., Polymeropoulos, M. H., Sturley, S. L., Ioannou, Y. A., Higgins, M. E., Comly, M., Cooney, A., Brown, A., Kaneki, C. R., Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Neufeld, E. B., Chang, T. Y., Liscum, L., Strauss, J. F., 3rd, Ohno, K., Zeigler, M., Carmi, R., Sokol, J., Markie, D., O'Neill, R. R., van Diggelen, O. P., Elleder, M., Patterson, M. C., Brady, R. O., Vanier, M. T., Pentchev, P. G., and Tagle, D. A. (1997) Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis, *Science (New York, N.Y)* 277, 228-231.
- Chan, L. (1992) Apolipoprotein B, the major protein component of triglyceride-rich and low density lipoproteins, *The Journal of biological chemistry* 267, 25621-25624.
- Chang, T. Y., Chang, C. C., and Cheng, D. (1997) Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase, *Annual review of biochemistry* 66, 613-638.
- Chang, T. Y., Chang, C. C., Ohgami, N., and Yamauchi, Y. (2006) Cholesterol sensing, trafficking, and esterification, *Annual review of cell and developmental biology* 22, 129-157.

- Chang, T. Y., Reid, P. C., Sugii, S., Ohgami, N., Cruz, J. C., and Chang, C. C. (2005) Niemann-Pick type C disease and intracellular cholesterol trafficking, *The Journal of biological chemistry* 280, 20917-20920.
- Cheruku, S. R., Xu, Z., Dutia, R., Lobel, P., and Storch, J. (2006) Mechanism of cholesterol transfer from the Niemann-Pick type C2 protein to model membranes supports a role in lysosomal cholesterol transport, *The Journal of biological chemistry* 281, 31594-31604.
- 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 (New York, N.Y)* 246, 382-385.
- Choudhury, A., Dominguez, M., Puri, V., Sharma, D. K., Narita, K., Wheatley, C. L., Marks, D. L., and Pagano, R. E. (2002) Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells, *The Journal of clinical investigation* 109, 1541-1550.
- Cross, RA (March 2005). Intracellular Transport. ELS: Intracellular Transport/3953
- Crotzer, V. L., and Blum, J. S. (2008) Cytosol to lysosome transport of intracellular antigens during immune surveillance, *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 9, 10-16.
- Cuervo, A. M., and Dice, J. F. (1996) A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes, *Science (New York, N.Y)* 273, 501-503.
- Cuervo, A. M., and Dice, J. F. (1998) Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases, *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 76, 6-12.
- Cuervo, A. M., and Dice, J. F. (2000) Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms, *Journal of cell science* 113 Pt 24, 4441-4450.
- Czibener, C., Sherer, N. M., Becker, S. M., Pypaert, M., Hui, E., Chapman, E. R., Mothes, W., and Andrews, N. W. (2006) Ca²⁺ and synaptotagmin VII-dependent delivery of lysosomal membrane to nascent phagosomes, *The Journal of cell biology* 174, 997-1007.
- 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 (New York, N.Y)* 290, 2295-2298.
- de Duve, C. (1959) Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles. In *Subcellular Particles* (Hayashi, T., ed.), 128–159, Ronald Press
- de Duve, C. (1983) Lysosomes revisited, *European journal of biochemistry / FEBS* 137, 391-397.

- De Reuck, A. V. S. & Cameron, M. P. (eds., 1963). Ciba Foundation for the Promotion of International Cooperation in Medical and Chemical Research: Lysosomes, J. & A. Churchill, London
- Deacon, S. W., Serpinskaya, A. S., Vaughan, P. S., Lopez Fanarraga, M., Vernos, I., Vaughan, K. T., and Gelfand, V. I. (2003) Dynactin is required for bidirectional organelle transport, *The Journal of cell biology* 160, 297-301.
- Desjardins, M. (1995) Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis, *Trends in cell biology* 5, 183-186.
- Desjardins, M. (2003) ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions, *Nature reviews* 3, 280-291.
- Dice, J. F. (1990) Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis, *Trends in biochemical sciences* 15, 305-309.
- Downey, G. P., Botelho, R. J., Butler, J. R., Moltyaner, Y., Chien, P., Schreiber, A. D., and Grinstein, S. (1999) Phagosomal maturation, acidification, and inhibition of bacterial growth in nonphagocytic cells transfected with FcγRIIA receptors, *The Journal of biological chemistry* 274, 28436-28444.
- Driskell, O. J., Mironov, A., Allan, V. J., and Woodman, P. G. (2007) Dynein is required for receptor sorting and the morphogenesis of early endosomes, *Nature cell biology* 9, 113-120.
- Dunn, W. A., Jr. (1990) Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole, *The Journal of cell biology* 110, 1923-1933.
- Dunn, W. A., Jr. (1994) Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation, *Trends in cell biology* 4, 139-143.
- Eskelinen, E. L. (2005) Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells, *Autophagy* 1, 1-10.
- Eskelinen, E. L. (2006) Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy, *Molecular aspects of medicine* 27, 495-502.
- 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, *Molecular biology of the 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, *Molecular biology of the cell* 15, 3132-3145.
- Eskelinen, E. L., Tanaka, Y., and Saftig, P. (2003) At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins, *Trends in cell biology* 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, *The Journal of biological chemistry* 281, 36303-36316.
- Frederick, R. L., and Shaw, J. M. (2007) Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle, *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8, 1668-1675.
- Frolov, A., Zielinski, S. E., Crowley, J. R., Dudley-Rucker, N., Schaffer, J. E., and Ory, D. S. (2003) NPC1 and NPC2 regulate cellular cholesterol homeostasis through generation of low density lipoprotein cholesterol-derived oxysterols, *The Journal of biological chemistry* 278, 25517-25525.
- Fukuda, M. (1991) Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking, *The Journal of biological chemistry* 266, 21327-21330.
- Fukuda, M., Viitala, J., Matteson, J., and Carlsson, S. R. (1988) Cloning of cDNAs encoding human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Comparison of their deduced amino acid sequences, *The Journal of biological chemistry* 263, 18920-18928.
- Funato, K., Beron, W., Yang, C. Z., Mukhopadhyay, A., and Stahl, P. D. (1997) Reconstitution of phagosome-lysosome fusion in streptolysin O-permeabilized cells, *The Journal of biological chemistry* 272, 16147-16151.
- Galluzzi, L., Morselli, E., Vicencio, J. M., Kepp, O., Joza, N., Tajeddine, N., and Kroemer, G. (2008) Life, death and burial: multifaceted impact of autophagy, *Biochemical Society transactions* 36, 786-790.
- Ganley, I. G., and Pfeffer, S. R. (2006) Cholesterol accumulation sequesters Rab9 and disrupts late endosome function in NPC1-deficient cells, *The Journal of biological chemistry* 281, 17890-17899.
- 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.
- Gill, S., Chow, R., and Brown, A. J. (2008) Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised, *Progress in lipid research* 47, 391-404.
- Goldstein, J. L., DeBose-Boyd, R. A., and Brown, M. S. (2006) Protein sensors for membrane sterols, *Cell* 124, 35-46.
- 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, *The Journal of cell biology* 137, 1161-1169.
- Gruenberg, J. (2001) The endocytic pathway: a mosaic of domains, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 721-730.

- Gruenberg, J., and Howell, K. E. (1989) Membrane traffic in endocytosis: insights from cell-free assays, *Annual review of cell biology* 5, 453-481.
- Hall, A. M., Krishnamoorthy, L., and Orlow, S. J. (2003) Accumulation of tyrosinase in the endolysosomal compartment is induced by U18666A, *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 16, 149-158.
- Hamasaki, T., Barkalow, K., Richmond, J., and Satir, P. (1991) cAMP-stimulated phosphorylation of an axonemal polypeptide that copurifies with the 22S dynein arm regulates microtubule translocation velocity and swimming speed in Paramecium, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 7918-7922.
- Hamilton, J. A. (2003) Fast flip-flop of cholesterol and fatty acids in membranes: implications for membrane transport proteins, *Current opinion in lipidology* 14, 263-271.
- Hao, M., Lin, S. X., Karylowski, O. J., Wustner, D., McGraw, T. E., and Maxfield, F. R. (2002) Vesicular and non-vesicular sterol transport in living cells. The endocytic recycling compartment is a major sterol storage organelle, *The Journal of biological chemistry* 277, 609-617.
- Harrison, R. E., Bucci, C., Vieira, O. V., Schroer, T. A., and Grinstein, S. (2003) Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP, *Molecular and cellular biology* 23, 6494-6506.
- Hille-Rehfeld, A. (1995) Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes, *Biochimica et biophysica acta* 1241, 177-194.
- Holtta-Vuori, M., Alpy, F., Tanhuanpaa, K., Jokitalo, E., Mutka, A. L., and Ikonen, E. (2005) MLN64 is involved in actin-mediated dynamics of late endocytic organelles, *Molecular biology of the cell* 16, 3873-3886.
- Holtta-Vuori, M., and Ikonen, E. (2006) Endosomal cholesterol traffic: vesicular and non-vesicular mechanisms meet, *Biochemical Society transactions* 34, 392-394.
- Holtta-Vuori, M., Maatta, J., Ullrich, O., Kuismanen, E., and Ikonen, E. (2000) Mobilization of late-endosomal cholesterol is inhibited by Rab guanine nucleotide dissociation inhibitor, *Curr Biol* 10, 95-98.
- Huang, F., Kirkpatrick, D., Jiang, X., Gygi, S., and Sorkin, A. (2006) Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain, *Molecular cell* 21, 737-748.
- 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, *The EMBO journal* 26, 313-324.
- Ikonen, E. (2008) Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization, *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 125-138.

- Infante, R. E., Abi-Mosleh, L., Radhakrishnan, A., Dale, J. D., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (2008) Purified NPC1 protein. I. Binding of cholesterol and oxysterols to a 1278-amino acid membrane protein, *The Journal of biological chemistry* 283, 1052-1063.
- Infante, R. E., Radhakrishnan, A., Abi-Mosleh, L., Kinch, L. N., Wang, M. L., Grishin, N. V., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2008) Purified NPC1 protein: II. Localization of sterol binding to a 240-amino acid soluble luminal loop, *The Journal of biological chemistry* 283, 1064-1075.
- Infante, R. E., Wang, M. L., Radhakrishnan, A., Kwon, H. J., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (2008) NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 15287-15292.
- 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, *The Journal of cell biology* 110, 1555-1564.
- Jager, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., and Eskelinen, E. L. (2004) Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles, *Journal of cell science* 117, 4837-4848.
- Jahraus, A., Tjelle, T. E., Berg, T., Habermann, A., Storrie, B., Ullrich, O., and Griffiths, G. (1998) In vitro fusion of phagosomes with different endocytic organelles from J774 macrophages, *The Journal of biological chemistry* 273, 30379-30390.
- Johansson, M., Bocher, V., Lehto, M., Chinetti, G., Kuismanen, E., Ehnholm, C., Staels, B., and Olkkonen, V. M. (2003) The two variants of oxysterol binding protein-related protein-1 display different tissue expression patterns, have different intracellular localization, and are functionally distinct, *Molecular biology of the cell* 14, 903-915.
- Johansson, M., Lehto, M., Tanhuanpaa, K., Cover, T. L., and Olkkonen, V. M. (2005) The oxysterol-binding protein homologue ORP1L interacts with Rab7 and alters functional properties of late endocytic compartments, *Molecular biology of the cell* 16, 5480-5492.
- Johansson, M., Rocha, N., Zwart, W., Jordens, I., Janssen, L., Kuijl, C., Olkkonen, V. M., and Neefjes, J. (2007) Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betaIII spectrin, *The Journal of cell biology* 176, 459-471.
- Kamal, A., and Goldstein, L. S. (2002) Principles of cargo attachment to cytoplasmic motor proteins, *Current opinion in cell biology* 14, 63-68.
- Kashina, A., and Rodionov, V. (2005) Intracellular organelle transport: few motors, many signals, *Trends in cell biology* 15, 396-398.

- Kashina, A. S., Semenova, I. V., Ivanov, P. A., Potekhina, E. S., Zaliapin, I., and Rodionov, V. I. (2004) Protein kinase A, which regulates intracellular transport, forms complexes with molecular motors on organelles, *Curr Biol* 14, 1877-1881.
- Klionsky, D. J., and Emr, S. D. (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation, *Science (New York, N.Y)* 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, *The Journal of cell biology* 121, 997-1010.
- Ko, D. C., Gordon, M. D., Jin, J. Y., and Scott, M. P. (2001) Dynamic movements of organelles containing Niemann-Pick C1 protein: NPC1 involvement in late endocytic events, *Molecular biology of the cell* 12, 601-614.
- 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, *Nature cell biology* 1, 113-118.
- Kornfeld, S., and Mellman, I. (1989) The biogenesis of lysosomes, *Annual review of cell biology* 5, 483-525.
- Kundra, R., and Kornfeld, S. (1999) Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis, *The Journal of biological chemistry* 274, 31039-31046.
- Lange, Y., Ye, J., Rigney, M., and Steck, T. (2000) Cholesterol movement in Niemann-Pick type C cells and in cells treated with amphiphiles, *The Journal of biological chemistry* 275, 17468-17475.
- Lange, Y., Ye, J., and Steck, T. L. (1998) Circulation of cholesterol between lysosomes and the plasma membrane, *The Journal of biological chemistry* 273, 18915-18922.
- Lawrence, B. P., and Brown, W. J. (1992) Autophagic vacuoles rapidly fuse with pre-existing lysosomes in cultured hepatocytes, *Journal of cell science* 102 (Pt 3), 515-526.
- Le Blanc, I., Luyet, P. P., Pons, V., Ferguson, C., Emans, N., Petiot, A., Mayran, N., Demaurex, N., Faure, J., Sadoul, R., Parton, R. G., and Gruenberg, J. (2005) Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids, *Nature cell biology* 7, 653-664.
- Lebrand, C., Corti, M., Goodson, H., Cosson, P., Cavalli, V., Mayran, N., Faure, J., and Gruenberg, J. (2002) Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7, *The EMBO journal* 21, 1289-1300.
- Lewis, V., Green, S. A., Marsh, M., Vihko, P., Helenius, A., and Mellman, I. (1985) Glycoproteins of the lysosomal membrane, *The Journal of cell biology* 100, 1839-1847.

- Linder, M. D., Uronen, R. L., Holtta-Vuori, M., van der Sluijs, P., Peranen, J., and Ikonen, E. (2007) Rab8-dependent recycling promotes endosomal cholesterol removal in normal and sphingolipidosis cells, *Molecular biology of the cell* 18, 47-56.
- Liscum, L. (2000) Niemann-Pick type C mutations cause lipid traffic jam, *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 1, 218-225.
- Liscum, L., and Faust, J. R. (1987) Low density lipoprotein (LDL)-mediated suppression of cholesterol synthesis and LDL uptake is defective in Niemann-Pick type C fibroblasts, *The Journal of biological chemistry* 262, 17002-17008.
- Lloyd-Evans, E., Morgan, A. J., He, X., Smith, D. A., Elliot-Smith, E., Sillence, D. J., Churchill, G. C., Schuchman, E. H., Galione, A., and Platt, F. M. (2008) Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium, *Nature medicine* 14, 1247-1255.
- Lüllmann-Rauch, R., (2005). History and Morphology of the Lysosome. In *Lysosomes.*, (ed. P. Saftig), pp. 1-12. Georgetown: Landes Bioscience/Eurekah.com.
- Lock, R., and Debnath, J. (2008) Extracellular matrix regulation of autophagy, *Current opinion in cell biology* 20, 583-588.
- Lukacs, G. L., Rotstein, O. D., and Grinstein, S. (1990) Phagosomal acidification is mediated by a vacuolar-type H(+)-ATPase in murine macrophages, *The Journal of biological chemistry* 265, 21099-21107.
- 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., Pryor, P. R., and Bright, N. A. (2007) Lysosomes: fusion and function, *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 622-632.
- Luzio, J. P., Rous, B. A., Bright, N. A., Pryor, P. R., Mullock, B. M., and Piper, R. C. (2000) Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis, *Journal of cell science* 113 (Pt 9), 1515-1524.
- Malicdan, M. C., Noguchi, S., Nonaka, I., Saftig, P., and Nishino, I. (2008) Lysosomal myopathies: an excessive build-up in autophagosomes is too much to handle, *Neuromuscul Disord* 18, 521-529.
- Mallik, R., and Gross, S. P. (2004) Molecular motors: strategies to get along, *Curr Biol* 14, R971-982.
- Matteoni, R., and Kreis, T. E. (1987) Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules, *The Journal of cell biology* 105, 1253-1265.
- Matthies, H. J., Miller, R. J., and Palfrey, H. C. (1993) Calmodulin binding to and cAMP-dependent phosphorylation of kinesin light chains modulate kinesin ATPase activity, *The Journal of biological chemistry* 268, 11176-11187.

- Matveev, S., Li, X., Everson, W., and Smart, E. J. (2001) The role of caveolae and caveolin in vesicle-dependent and vesicle-independent trafficking, *Advanced drug delivery reviews* 49, 237-250.
- Maxfield, F. R., and Tabas, I. (2005) Role of cholesterol and lipid organization in disease, *Nature* 438, 612-621.
- Mellman, I. (1996) Endocytosis and molecular sorting, *Annual review of cell and developmental biology* 12, 575-625.
- Mellman, I., Fuchs, R., and Helenius, A. (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways, *Annual review of biochemistry* 55, 663-700.
- Mellman, I., and Warren, G. (2000) The road taken: past and future foundations of membrane traffic, *Cell* 100, 99-112.
- Mills, I. G., Urbe, S., and Clague, M. J. (2001) Relationships between EEA1 binding partners and their role in endosome fusion, *Journal of cell science* 114, 1959-1965.
- Mizushima, N., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2002) Autophagosome formation in mammalian cells, *Cell structure and function* 27, 421-429.
- Mobius, W., van Donselaar, E., Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Heijnen, H. F., Slot, J. W., and Geuze, H. J. (2003) Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway, *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 4, 222-231.
- Moller, W., Nemoto, I., Matsuzaki, T., Hofer, T., and Heyder, J. (2000) Magnetic phagosome motion in J774A.1 macrophages: influence of cytoskeletal drugs, *Biophysical journal* 79, 720-730.
- Mukherjee, S., and Maxfield, F. R. (2004) Lipid and cholesterol trafficking in NPC, *Biochimica et biophysica acta* 1685, 28-37.
- Mullins, C., and Bonifacino, J. S. (2001) The molecular machinery for lysosome biogenesis, *Bioessays* 23, 333-343.
- 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, *The Journal of cell biology* 140, 591-601.
- Munro, S. (2004) Organelle identity and the organization of membrane traffic, *Nature cell biology* 6, 469-472.
- Nascimento, A. A., Roland, J. T., and Gelfand, V. I. (2003) Pigment cells: a model for the study of organelle transport, *Annual review of cell and developmental biology* 19, 469-491.

- 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 (New York, N.Y)* 290, 2298-2301.
- 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.
- 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, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 12473-12478.
- Reilein, A. R., Tint, I. S., Peunova, N. I., Enikolopov, G. N., and Gelfand, V. I. (1998) Regulation of organelle movement in melanophores by protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC), and protein phosphatase 2A (PP2A), *The Journal of cell biology* 142, 803-813.
- Repa, J. J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J. M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Mangelsdorf, D. J. (2000) Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta, *Genes & development* 14, 2819-2830.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., and Zerial, M. (2005) Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes, *Cell* 122, 735-749.
- Ross, J. L., Ali, M. Y., and Warshaw, D. M. (2008) Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton, *Current opinion in cell biology* 20, 41-47.
- Saftig, P., and Eskelinen, E. L. (2008) Live longer with LAMP-2, *Nature medicine* 14, 909-910.
- Saftig, P., Tanaka, Y., Lullmann-Rauch, R., and von Figura, K. (2001) Disease model: LAMP-2 enlightens Danon disease, *Trends in molecular medicine* 7, 37-39.
- Saftig, P., (2005). Lysosomal Membrane Proteins. In *Lysosomes*, P. Saftig (ed), Landes Bioscience/Eurekah.com, Springer Science + Business Media, New York, USA.
- Scianimanico, S., Desrosiers, M., Dermine, J. F., Meresse, S., Descoteaux, A., and Desjardins, M. (1999) Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes, *Cellular microbiology* 1, 19-32.
- Seabra, M. C., and Coudrier, E. (2004) Rab GTPases and myosin motors in organelle motility, *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 5, 393-399.
- Storch, J. and Cheruku, S. R. (2005). Cholesterol transport in lysosomes. In *Lysosomes.*, (ed. P. Saftig), pp. 18-26. Georgetown: Landes Bioscience/Eurekah.com.

- Sugii, S., Reid, P. C., Ohgami, N., Du, H., and Chang, T. Y. (2003) Distinct endosomal compartments in early trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol, *The Journal of biological chemistry* 278, 27180-27189.
- Sun, X., Marks, D. L., Park, W. D., Wheatley, C. L., Puri, V., O'Brien, J. F., Kraft, D. L., Lundquist, P. A., Patterson, M. C., Pagano, R. E., and Snow, K. (2001) Niemann-Pick C variant detection by altered sphingolipid trafficking and correlation with mutations within a specific domain of NPC1, *American journal of human genetics* 68, 1361-1372.
- 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.
- te Vruchte, D., Lloyd-Evans, E., Veldman, R. J., Neville, D. C., Dwek, R. A., Platt, F. M., van Blitterswijk, W. J., and Sillence, D. J. (2004) Accumulation of glycosphingolipids in Niemann-Pick C disease disrupts endosomal transport, *The Journal of biological chemistry* 279, 26167-26175.
- Tjelle, T. E., Lovdal, T., and Berg, T. (2000) Phagosome dynamics and function, *Bioessays* 22, 255-263.
- Turk, V., Turk, B., and Turk, D. (2001) Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities, *The EMBO journal* 20, 4629-4633.
- Vale, R. D. (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport, *Cell* 112, 467-480.
- Vance, J. E. (2006) Lipid imbalance in the neurological disorder, Niemann-Pick C disease, *FEBS letters* 580, 5518-5524.
- Vanier, M. T., and Millat, G. (2003) Niemann-Pick disease type C, *Clinical genetics* 64, 269-281.
- Vanier, M. T., and Millat, G. (2004) Structure and function of the NPC2 protein, *Biochimica et biophysica acta* 1685, 14-21.
- Vieira, O. V., Botelho, R. J., and Grinstein, S. (2002) Phagosome maturation: aging gracefully, *The Biochemical journal* 366, 689-704.
- Walter, M., Chen, F. W., Tamari, F., Wang, R., and Ioannou, Y. A. (2008) Endosomal lipid accumulation in NPC1 leads to inhibition of PKC, hypophosphorylation of vimentin and Rab9 entrapment, *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*.
- Wang, R., Hosaka, M., Han, L., Yokota-Hashimoto, H., Suda, M., Mitsushima, D., Torii, S., and Takeuchi, T. (2006) Molecular probes for sensing the cholesterol composition of subcellular organelle membranes, *Biochimica et biophysica acta* 1761, 1169-1181.

- Watari, H., Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Watari, M., Neufeld, E. B., Patel, S., Pentchev, P. G., and Strauss, J. F., 3rd. (1999) Mutations in the leucine zipper motif and sterol-sensing domain inactivate the Niemann-Pick C1 glycoprotein, *The Journal of biological chemistry* 274, 21861-21866.
- Webb, J. L., Ravikumar, B., and Rubinsztein, D. C. (2004) Microtubule disruption inhibits autophagosome-lysosome fusion: implications for studying the roles of aggresomes in polyglutamine diseases, *The international journal of biochemistry & cell biology* 36, 2541-2550.
- Welte, M. A. (2004) Bidirectional transport along microtubules, *Curr Biol* 14, R525-537.
- Wickner, W. T., and Lodish, H. F. (1985) Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes, *Science (New York, N.Y.)* 230, 400-407.
- Willy, P. J., Umesono, K., Ong, E. S., Evans, R. M., Heyman, R. A., and Mangelsdorf, D. J. (1995) LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway, *Genes & development* 9, 1033-1045.
- Woodman, P. G., and Futter, C. E. (2008) Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity, *Current opinion in cell biology* 20, 408-414.
- Wustner, D., Mondal, M., Tabas, I., and Maxfield, F. R. (2005) Direct observation of rapid internalization and intracellular transport of sterol by macrophage foam cells, *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 6, 396-412.
- Xu, Z., Farver, W., Kodukula, S., and Storch, J. (2008) Regulation of sterol transport between membranes and NPC2, *Biochemistry* 47, 11134-11143.
- Yogalingam, G., Bonten, E. J., van de Vlekkert, D., Hu, H., Moshiah, S., Connell, S. A., and d'Azzo, A. (2008) Neuraminidase 1 is a negative regulator of lysosomal exocytosis, *Developmental cell* 15, 74-86.
- Zhang, C., and Cuervo, A. M. (2008) Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function, *Nature medicine* 14, 959-965.
- Zhang, M., Dwyer, N. K., Neufeld, E. B., Love, D. C., Cooney, A., Comly, M., Patel, S., Watari, H., Strauss, J. F., 3rd, Pentchev, P. G., Hanover, J. A., and Blanchette-Mackie, E. J. (2001) Sterol-modulated glycolipid sorting occurs in niemann-pick C1 late endosomes, *The Journal of biological chemistry* 276, 3417-3425.
- Zhou, D., Li, P., Lin, Y., Lott, J. M., Hislop, A. D., Canaday, D. H., Brutkiewicz, R. R., and Blum, J. S. (2005) Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens, *Immunity* 22, 571-581.

Anhang

Lebenslauf

Name	Schneede
Vorname	Alexander
Anschrift	Metzstr. 21 24116 Kiel
Geburtsdatum	27. März 1974
Geburtsort	Hamburg
Vater	Wolfgang Dieter Fritz Schneede
Mutter	Annelies Schneede, geb. Clausen
Schulabschluss	1993 Allgemeine Hochschulreife Gymnasium Billstedt, Hamburg
Zivildienst	1993 - 1994
Berufsabschluss Chemielaborant	1997 DEA, Hamburg
Hochschulstudium	1998 - 2004
Studienabschluss	2004 Diplom Biochemiker

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 17.12.2008

Alexander Schneede