Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Funktionelle Charakterisierung des Two-Pore-Loop-Kanals 2 (TPC2)

im endolysosomalen System

Sami Hassan

aus

München

2014

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Christian Wahl-Schott betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 11. November 2014

Sami Hassan

Dissertation eingereicht am	23. Oktober, 2014
1. Gutachter	Prof. Dr. C. Wahl-Schott
2. Gutachter	Prof. Dr. M. Biel
Mündliche Prüfung am	07. November, 2014

für meine familie & violi

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT 9

3 MATERIAL UND METHODEN 10

3.1 CHEMIKALIEN, LÖSUNGEN UND PUFFER 10

3.2 VERWENDETE MAUSLINIE 10

3.3 ARBEITEN MIT RNA UND DNA 11

3.3.1 Arbeiten mit RNA 11

3.3.2 Arbeiten mit DNA 11

3.4 ZELLKULTUR 12

3.4.1 Generierung der Mouse Embryonic Fibroblast (MEF)-Zelllinien 12

3.4.1.1 Präparation der Primärzellen 12

3.4.1.2 Retrovirale Infektion und Immortalisierung 12

3.4.2 Hippocampale Neuronenkultur 13

3.4.2.1 Vorbereiten und Beschichten der Glasplättchen 13

3.4.2.2 Neuronenpräparation 13

3.4.2.3 Transfektion 14

3.5 ZYTOLOGIE & HISTOLOGIE 14

3.5.1 Immunzytologie 14

3.5.2 Nissl-Färbungen von Hirnschnitten 15

3.6 TRANSPORTEXPERIMENT 15

3.6.1 Transport in MEF-Zellen 15

3.6.2 Live-Cell-Imaging in Neuronen 16

3.7 ARBEITEN MIT PROTEINEN 17

3.7.1 Massenspektrometrischer Screen nach potentiellen TPC2 Interaktionspartnern 17

3.7.2 TPC2-Antikörper 18

3.7.3 Westernblot 19

3.8 ELEKTROPHYSIOLOGIE 20

3.8.1 Lysosomales Patch-Clamp 20

3.8.2 Messung der exzitatorischen spontanen Neurotransmission an hippocampalen Primärneuronen 20

3.9 ANALYSE DER LEBERPHYSIOLOGIE 20
3.10 VERHALTEN 21
3.11 STATISTIK 22

4 ERGEBNISSE 23

4.1 POTENTIELLER INTERAKTIONSPARTNER VON TPC2 23
4.1.1 TPC2 immunopräzipitiert mit Markern des spätendosomalen-lysosomalen Systems 23
4.2 TPC2 ALS REGULATOR DES ENDOLYSOSOMALEN *TRAFFICKINGS* 25
4.2.1 Der Verlust von TPC2 führt zu einer Beeinträchtigung der Degradation von EGF im endolysosomalen System 25
4.2.2 Calcium und TPC2 Kanäle sind essentiell für den endolysosomalen Transport 31
4.2.3 Der Transportdefekt im endolysosomalen System TPC2-defizienter Zellen kann in vitro generalisiert werden 33
4.2.4 TPC2$^{-/-}$-Mäuse zeigen ein stark erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Fettleberhepatitis 35
4.2.5 TPC2 im Zentralen Nervensystem 38
4.2.6 Der Verlust von TPC2 führt zu einer erhöhten Frequenz spontaner exzitatorischer Neurotransmission im Hippocampus 40
4.2.7 Der Knockout von TPC2 resultiert in einer Akkumulation und Beeinträchtigung des axonalen Transports später Endosomen 42
4.2.8 Makroautophagie in TPC2$^{-/-}$-Mäusen 50
4.2.9 Hippocampus-abhängiges Lernen in TPC2$^{-/-}$-Mäusen 52

5 DISKUSSION 54

5.1.1 Die Rolle von TPC2 im endolysosomalen System 54
5.1.2 TPC2 in der Leber 58
5.1.3 TPC2 im ZNS 59

6 ZUSAMMENFASSUNG 63

7 LITERATURVERZEICHNIS 65

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 70

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 72

10 ANHANG **74**

10.1 TABELLEN 74

10.2 PRIMER 76

10.3 LÖSUNGEN 76

10.3.1 Proteine & Westernblot *76*

10.3.2 Zellkultur *78*

10.3.3 Elektrophysiologie *79*

10.3.4 Histologie *79*

10.3.5 Antikörperaufreinigung *80*

10.4 LEBENSLAUF 81

10.5 PUBLIKATIONEN 82

10.6 DANKSAGUNG 83

1 Einleitung

„Survival of the fittest“ – dieser 1864 von Herbert Spencer geprägte Satz, der später von Charles Darwin übernommen wurde, drückt die Notwendigkeit eines Organismus aus, sich zu jedem Zeitpunkt seines Daseins an die ihn umgebenden Bedingungen anzupassen, um zu überleben. Er muss Umweltreize sensorisch erfassen, verarbeiten und seine homöostatischen Prozesse den jeweiligen Anforderungen entsprechend angleichen. Um diesen Aufgaben gerecht zu werden, haben sich im Laufe der Evolution auf molekularer Ebene eine Vielzahl von Strukturen mit einzigartigen Sensor- und Effektoreigenschaften entwickelt. Ein Teil dieser Strukturen bildet die Genfamilie der Transient-Receptor-Potential-Kanäle (TRP-Kanäle). Die 29 Vertreter dieser Genfamilie können allgemein als nichtselektive Kationenkanäle bezeichnet werden, da sie sowohl für Na^+, Ca^{2+} als auch z. T. für Mg^{2+} permeabel sind. TRP-Kanäle werden durch unterschiedlichste Reize aktiviert, dazu zählen u. a. die Bindung von spezifischen Liganden, Änderung der Membranspannung, Phosphorylierung, physikalische Reize wie Druck- oder Temperaturänderungen und chemische Reize wie eine Änderung des *Redox*-Potentials der Umgebung [1]. Da die meisten TRPs auf mehrere der genannten Reize ansprechen, verfügen sie über die Eigenschaften eines Signalintegrators und diese polymodale Aktivierung stattet die Zelle mit einer wertvollen Sensorfunktion für den Status Quo des inneren Milieus eines Organismus aus. Die durch die Aktivierung bedingten Kationenströme, die eine Depolarisation der Zellmembran oder den Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellularraum bzw. aus intrazellulären Speichern ins Zytoplasma zur Folge haben, ermöglichen nachgeschaltet die Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden innerhalb der Zelle. Aufgrund dieser Eigenschaften sind TRP-Kanäle in eine Vielzahl physiologischer Prozesse involviert, beispielsweise Schmerz-, Temperatur- und Mechanosensitivität, Ca^{2+}- und Mg^{2+}-Homöostase, lysosomale Funktion, kardiovaskuläre Funktion und die Kontrolle von Zellwachstum bzw. –proliferation [2, 3].

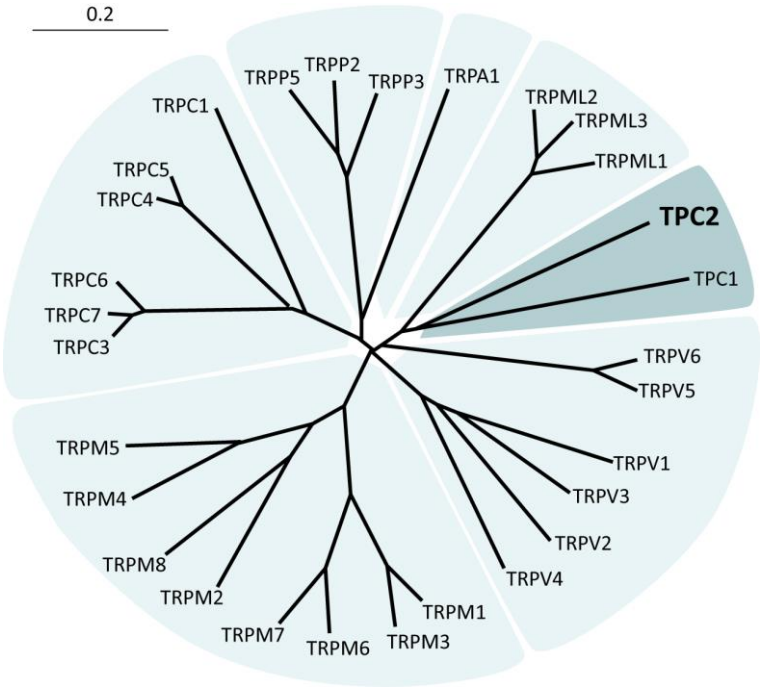

Abb. 1 TPC2 als Teil der TRP-Kanal-Superfamilie

Der phylogenetische Stammbaum der humanen TRP-Kanalfamilie, basierend auf der Homologie ihrer Aminosäuresequenzen im Transmembransegment (TMS) 5, der Porendomäne und TMS 6. Die Unterfamilie der Two-Pore-Kanäle (TPCs) ist dunkel hervorgehoben. Für TPCs wurde TMS 5, Pore und TMS 6 der zweiten Domäne herangezogen. Die Skalierung gibt den Grad der genetischen Divergenz in willkürlicher Einheit (a. u.) an. Adaptiert nach Vorlage von Dr. Christian Grimm.

Auf Basis ihrer Homologie der Primärsequenz wird die TRP-Familie in 7 Unterfamilien eingeteilt: TRPC (Klassisch), TRPV (Vanilloid-Rezeptor), TRPM (Melastatin), TRPA (Ankyrin), TRPML (Mucolipin), TRPP (Polycystin) und TPC (Two-Pore-loop) (Abb. 1). Ihre prinzipielle molekulare Architektur entspricht der von spannungsabhängigen Ionenkanälen, die allesamt eine tetramere Symmetrie aufweisen. Diese wird bei fast jeder Subfamilien der TRP-Familie von 4 Untereinheiten gebildet, die jeweils aus 6 TMS (in Form von α-Helices) bestehen (Abb. 2a, oben). Zwischen dem TMS 5 und 6 befindet sich die sogenannte Porenschleife, die für die Ionenleitfähigkeit und Selektivität des Kanals verantwortlich ist. TMS 4 enthält mehrere basische Aminosäuren, die unter physiologischen Bedingung positiv geladen sind. Dies führt bei Änderungen des Membranpotentials zu einer Lageverschiebung der Helix, die sich auf die Konformation des ganzen Kanals überträgt und den Übergang zwischen offener und geschlossener Kanalkonformation ermöglicht [4]. Den experimentellen Beleg für die Topologie, die bisher auf Daten aus Modeling-Experimenten basiert, lieferte kürzlich die erste Strukturaufklärung eines TRP-Kanals, dem an der neuronalen Schmerzwahrnehmung beteiligten TRPV1, mit einer Auflösung von 3.4 Å (Abb. 2b) [5].

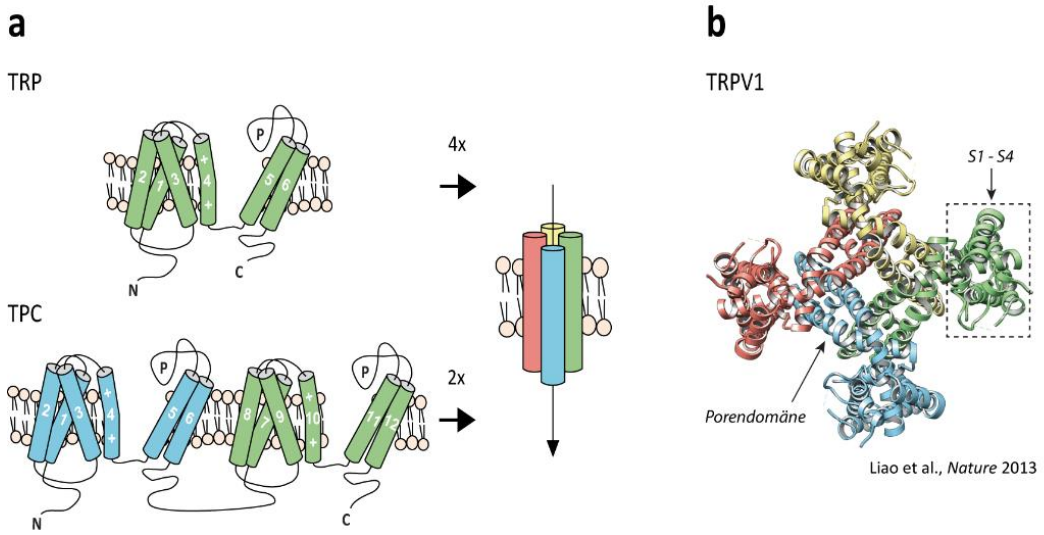

Abb. 2 Topologie von TRP- und TPC-Kanälen

(a) Die Grundstruktur eines tetrameren TRP-Kanals besteht aus 6 TMS mit der porenbildenden Schleife zwischen TMS 5 und 6. TMS 4 ist aufgrund mehrerer basischer Aminosäuren positiv geladen und bildet den Spannungssensor des Kanals. In Two-Pore-Kanälen sind zwei der beschriebenen Untereinheiten bereits genetisch fusioniert. Für einen funktionellen Kanal mit pseudo-tetramerer Struktur müssen zwei TPC-Untereinheiten dimerisieren. (b) Modell der kryoelektronenmikroskopisch bestimmten Struktur von TRPV1.

Eine Sonderstellung innerhalb der TRP-Kanäle nimmt die Unterfamilie der Two-Pore-Kanäle ein. Basierend auf Daten der Sequenzhomologie und aufgrund von Hydrophobizitätsanalysen der Primärstruktur stellt diese Unterfamilie eine strukturelle Weiterentwicklung dar, da eine Untereinheit der Two-Pore-Kanäle, im Gegensatz zu den anderen Vertretern der TRP-Familie, nicht über 6, sondern über 12 TMS verfügt und offensichtlich das Resultat einer Genduplikation ist.

Nach der Klonierung des ersten Mitglieds der TPC-Familie (TPC1) aus Nierengewebe der Ratte herrschte lange Zeit Unklarheit über die Eigenschaften und die Funktion dieser neuen Genfamilie. Die Primärstruktur legt aufgrund der Sequenzhomologie zwar eine Verwandtschaft zu spannungsabhängigen Kationenkanälen nahe, die heterologe Expression in Xenopus-Eiern zeigte in elektrophysiologischen Messungen an der Plasmamembran jedoch keine funktionelle Stromantwort [6]. Erst 2009 gelang in zwei unabhängigen Studien die funktionelle Beschreibung von Two-Pore-Kanälen [7, 8]. Diese Arbeiten zeigten, dass in Maus und Mensch, neben TPC1, auch eine zweite Isoform, TPC2, exprimiert wird. Coimmunopräzipitationsexperimente belegten die postulierte Dimerisierung zweier Untereinheiten zu einem Kanal, wobei ausschließlich Homodimere nachgewiesen werden

konnten. Dieser Befund wurde auch durch die unterschiedliche Lokalisation der TPC-Isoformen unterstützt. In den durchgeführten Colokalisationsstudien mit Markern verschiedener Zellorganellen konnte TPC1 in Endosomen lokalisiert werden, wohingegen TPC2 eine starke Colokalisation mit Lysosomen aufwies. In Ca^{2+}-Imaging-Experimenten konnte in beiden zuvor genannten Arbeiten TPC2 durch intrazelluläre Applikation des *Second-messengers* Nicotinsäureadenindinukleotidphosphat (NAADP) im Überexpressionsystem aktiviert werden. Die Aktivierung durch NAADP führte zu einer TPC2-abhängigen Ca^{2+}-Freisetzung aus lysosomalen Speichern, die, charakteristisch für NAADP, einer glockenförmigen Dosis-Wirkungs-Beziehung folgte. Mit einem Aktivierungsmaximum im nanomolaren Konzentrationsbereich ist NAADP der bis heute potenteste bekannte Ca^{2+}-freisetzende *Second-messenger*. Calcraft *et al.* konnten außerdem den Verlust der NAADP-Antwort in Azinus-Zellen des Pankreas aus TPC2-Knockout ($TPC2^{-/-}$)-Mäusen zeigen [8]. Ein resultierender Phänotyp der Knockout (KO)-Maus wurde jedoch nicht beschrieben.

Die Ca^{2+}-Imaging-Experimente waren ein erster Hinweis auf die Kanaleigenschaften von TPC2, der direkte Beleg dafür konnte kurze Zeit später durch elektrophysiologische Messungen an Lysosomen erbracht werden [9]. Isolierte Lysosomen aus HEK293-Zellen, die TPC2 stabil überexprimieren, zeigten in planaren Patch-Clamp-Experimenten eine Aktivierung durch NAADP. Analog zu den Ca^{2+}-Imaging-Experimenten folgte die Dosis-Wirkungs-Beziehung von NAADP einer glockenförmigen Kurve und die Messungen zeigten eine Abhängigkeit vom luminalen pH-Wert. Ein Anstieg des luminalen pHs auf zytosolische Werte führte zu einer Inaktivierung des Kanals. Außerdem konnte unter Verwendung biionischer Bedingungen ein Permeabilitätsverhältnis Ca^{2+} : K^+ von > 1000 gemessen werden, was die Funktion von TPC2 als lysosomalem Ca^{2+}-Kanal nahe legt.

In der Folge konnte in weiteren unabhängigen Studien die Leitfähigkeit von TPC2 für Ca^{2+} mit unterschiedlichen Methoden bestimmt werden. Brailoiu *et al.* [10] reinigten humanes TPC2-Protein auf und analysierten die Funktion in einem Lipid-Bilayer-System. Pitt *et al.* [11] hingegen verwendeten eine TPC2-Mutante, in der das lysosomale *Targeting*signal entfernt wurde. Diese Mutante wird statt zum Lysosom zur Plasmamembran transportiert und konnte somit über konventionelle Patch-Clamp-Messungen analysiert werden.

Trotz der Identifizierung von NAADP als Aktivator von TPC2 blieb der genaue Aktivierungsmechanismus unklar. Die glockenförmige Dosis-Wirkungs-Beziehung von NAADP,

d. h. eine Aktivierung mit niedrigen nanomolaren Konzentrationen und eine Inhibition bei Verwendung mikromolarer Konzentrationen, führte zu der Annahme zweier Bindungsstellen für NAADP: eine hoch affine, die die Öffnung des Kanals bewirkt, sowie eine niedrig affine, deren Bindung den Kanal schließt [12]. Subzelluläre Fraktionierung von HEK293 Zellen, die TPC2-cDNA aus dem Seeigel überexprimieren, zeigte eine Korrelation zwischen TPC2-Anreicherung und spezifischer Bindung von [^{32}P]NAADP [13]. Eine Bindungsstelle am Kanal wurde jedoch nicht identifiziert. 2012 konnten zwei Arbeitsgruppen, unabhängig voneinander, die direkte Bindung von NAADP an TPC2 ausschließen [14, 15]. Durch die Verwendung des photoaktivierbaren, radioaktiv markierten 5-Azido-NAADP (siehe Abb. 3) waren sie in der Lage eine spezifische Bindung von NAADP an ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 23 kDa zu zeigen. Die Identität des Proteins konnte bis heute jedoch noch nicht geklärt werden. Diese Ergebnisse legen die Einbindung von TPC2 in einen größeren Proteinkomplex nahe, mit der Bindung von NAADP durch eine unabhängige akzessorische Komponente.

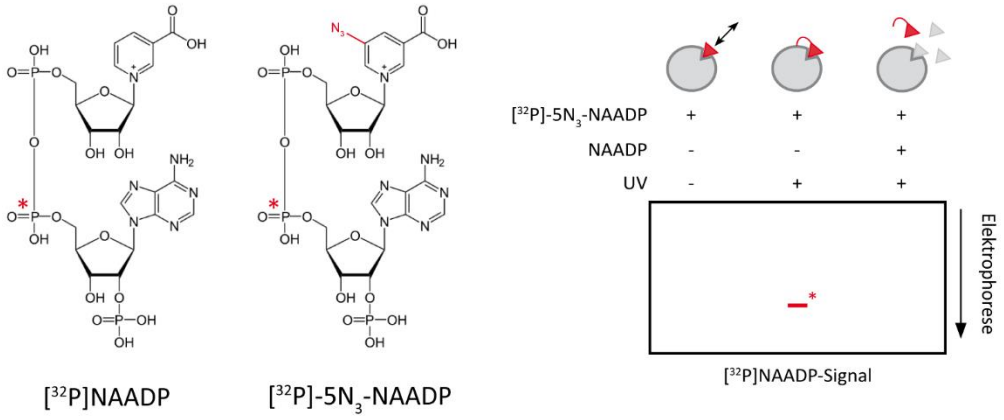

Abb. 3 Photo-Affinitätsmarkierung des NAADP-bindenden Proteins

Für die Photo-Affinitätsmarkierung des NAADP-bindenden Proteins wurde ein photoaktivierbares Derivat von radioaktiv markiertem NAADP verwendet, [^{32}P]-5-Azido-NAADP. Zelllysate wurden mit dem Liganden inkubiert. Belichtung mit UV führt zu einer Aktivierung der Azidgruppe zu einem Nitren, das unmittelbar mit Bionukleophilen in seiner näheren Umgebung abreagiert, was in einer kovalenten Bindung des Liganden mit dem bindenden Protein resultiert. Die nachfolgende Auftrennung des Lysats mittels Elektrophorese und Detektion des radioaktiven Signals ermöglichte die Größenbestimmung des markierten Proteins. Experimente ohne UV-Aktivierung dienten als Negativkontrolle. Die Spezifität des Azido-Derivats wurde in Verdrängungsexperimenten mit NAADP bestätigt. Adaptiert nach Lin-Moshier *et al.*, 2010.

Für einiges Aufsehen im Forschungsgebiet der Two-Pore-Kanäle sorgte, ebenfalls 2012, die Publikation von Wang *et al.* [16]. Die Autoren der Arbeit stellten neben der Aktivierung durch NAADP auch die Ca^{2+}-Selektivität von TPC2 in Frage. Im Wiederspruch zu Calcraft *et al.* [8]

konnten sie auch keine Beeinträchtigung der NAADP-Antwort in Azinus-Zellen des Pankreas von TPC1- / TPC2-Doppel-KO-Mäusen nachweisen. TPC2 schrieben sie auf Basis ihrer Daten primär die Eigenschaften eines Na^+-Kanals zu. Außerdem zeigten sie die Aktivierung von TPC2 durch ein spätendosomal-lysosomales Phospholipidderivat, Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat ($PI(3,5)P_2$). Die Aktivierung von TPC2 durch $PI(3,5)P_2$ wurde nachfolgend auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt [17, 18] und der Vergleich von TPC2 mit N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren, bei denen beide, die primäre Na^+-Leitfähigkeit, aber auch die geringere Leitfähigkeit für Ca^{2+}, eine physiologische Relevanz besitzen, war eine konzilianter Ansatz bezüglich der Frage nach der Ionenselektivität von TPC2 [17, 19]. Morgan & Galione [19] führten jedoch erhebliche Zweifel an der fehlenden Aktivierung von TPC2 durch NAADP an. In ihrem Review geben sie methodische Mängel, sowohl bei der Wahl der Fusionsvarianten von TPC2 für die Messungen, als auch bei der *Targeting*strategie der KO-Maus zu bedenken.

Die aktuellen Forschungsergebnisse zusammenfassend, handelt es sich bei TPC2 um einen lysosomalen Ionenkanal, der sowohl durch den *Second-messenger* NAADP, als auch durch ein spezifisches Phospholipidderivat, $PI(3,5)P_2$, aktivierbar ist. Eine Aktivierung führt zu einem transienten Ausstrom von Na^+ und Ca^{2+} aus dem lysosomalen Lumen entlang ihres Konzentrationsgradienten ins Zytosol (Abb. 4).

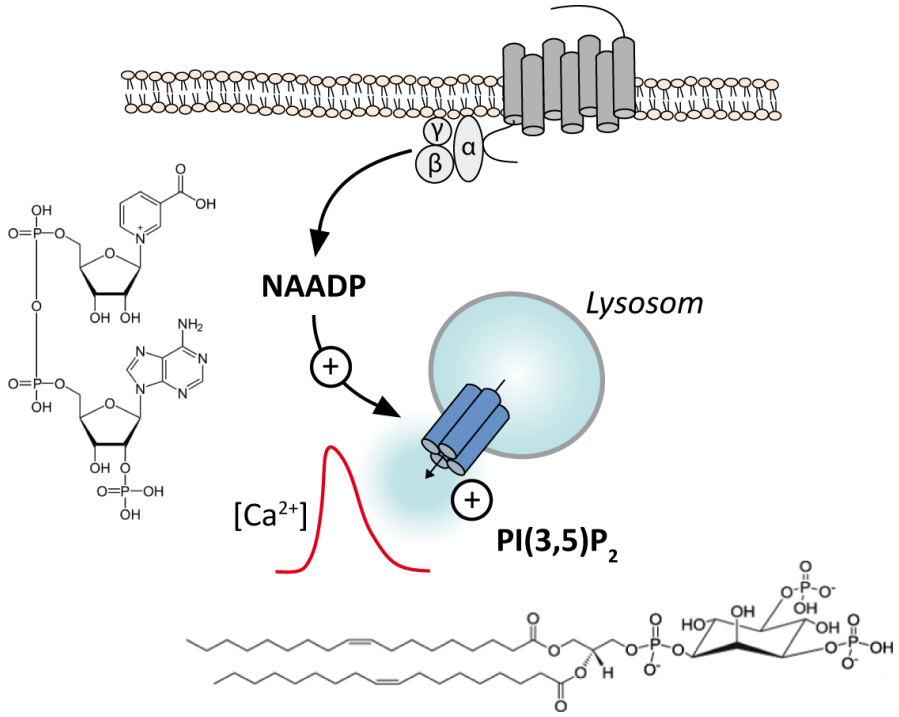

Abb. 4 TPC2 ist ein ligandengesteuerter lysosomaler Ionenkanal

Zwei Aktivatoren sind bisher für TPC2 beschrieben: der *Second-messenger* NAADP und das spätendosomal-lysosomale Phospholipid PI(3,5)P_2. Aktivierung von TPC2 führt, neben Na^+, zu einer Ca^{2+}-Freisetzung aus dem Lysosom ins Zytoplasma.

Was aber ist die physiologische Aufgabe und Relevanz von TPC2? Eine Reihe potentieller Funktionen hinsichtlich der Rolle von TPC2 im endolysosomalen System wurde diskutiert [20], ein direkter Nachweis *in vivo*, unter Verwendung von KO-Mausmodellen, fehlt jedoch bislang in den meisten Fällen. Interessant ist der Bericht über die Assoziation von 2 Polymorphismen im humanen TPC2-Gen mit heller Haut, rötlichem Haar und Sommersprossen bei Europäern [21]. Interessant aus dem Grund, weil Melanosomen für die Pigmentierung im Menschen verantwortlich sind und diese zum Formenkreis der Lysosome-related organelles gezählt werden. Als lysosomaler Ca^{2+}-Kanal ist eine Funktion von TPC2 in Melanosomen also durchaus vorstellbar. Eine Arbeit zu der Funktion von Two-Pore-Kanälen *in vivo* stammt von Cang *et al.* [18]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine signifikante Beeinträchtigung der physischen Ausdauer von TPC1- / TPC2-Doppel-KO-Mäusen nach einer Fastenperiode im Vergleich zu WT-Mäusen. Mechanistisch zeigten die Experimente eine Inhibition von TPC2 unter Ruhebedingungen durch mTOR. Fastenbedingungen bewirkten einen Abfall der zellulären ATP-Konzentration, die wiederum zu einer Disinhibition von TPC2 führte. Wie genau dies in einer effektiveren Energiebereitstellung unter Fastenbedingungen resultiert, blieb offen. Die Autoren postulierten aber eine wichtige Rolle von Two-Pore-Kanälen in der Kopplung der

endolysosomalen Funktion an den metabolischen Status einer Zelle und sehen in TPC2 einen Anpassungsmechanismus des Organismus in Zeiten mangelnder Energieversorgung über externe Quellen.

2 Zielsetzung der Arbeit

In den letzten Jahren wurden die grundlegenden molekularen und biophysikalischen Eigenschaften von TPC2 charakterisiert. Über die physiologische Bedeutung wurde bisher jedoch überwiegend spekuliert. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, neue Methoden zu entwickeln, um die offene Frage der physiologischen Funktion von TPC2 zu adressieren. Im ersten Teil der Arbeit sollten mit einem massenspektrometrischen *Screening* potentielle Interaktionspartner von TPC2 identifiziert werden, um einen tieferen Einblick in das molekulare Umfeld des Proteins zu bekommen. Im zweiten Teil sollten aus WT- und TPC2$^{-/-}$-Mäusen native Zellmodelle generiert werden, anhand derer neue Erkenntnisse über die zelluläre Funktion von TPC2 erarbeitet werden sollten. Diese *in vitro* Ergebnisse sollten in vergleichenden *in vivo* Studien an WT- und KO-Tieren auf ihre physiologische Relevanz getestet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck und Sigma-Aldrich in den Qualitäten *pro analysi* oder für molekularbiologische Zwecke bezogen. Zur Herstellung sämtlicher Lösungen wurde hochreines entionisiertes Wasser (ddH_2O) (Reinstwassersystem Easypure UV/UF, Werner GmbH) verwendet. Lösungen für sehr sensitive Anwendungen (z. B. PCR, Zellkultur, RNA-Methoden) oder Lösungen, die über längere Zeit gelagert werden sollten, wurden autoklaviert bzw. steril filtriert.

3.2 Verwendete Mauslinie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben Wildtyp-Mäusen eine von der Arbeitsgruppe generierte $TPC2^{-/-}$-Mauslinie verwendet. Bei dieser Mauslinie wurde Exon 7 des TPC2 Gens, das für TMS 5 und einen Teil der ersten Pore kodiert, global deletiert (Abb. 5). Für die Versuche wurden Tiere aus hetero- und homozygoten Zuchten verwendet. Gezüchtet wurden diese auf einem gemischten genetischen Hintergrund (129SvJ / C57BL6/N). Die Tiere erhielten Futter und Wasser *ad libidum* und wurden in einem 12 Stunden Tag- / Nacht-Rhythmus gehalten. Die Maushaltung und Tierversuche erfolgten gemäß den gesetzlichen Bestimmungen.

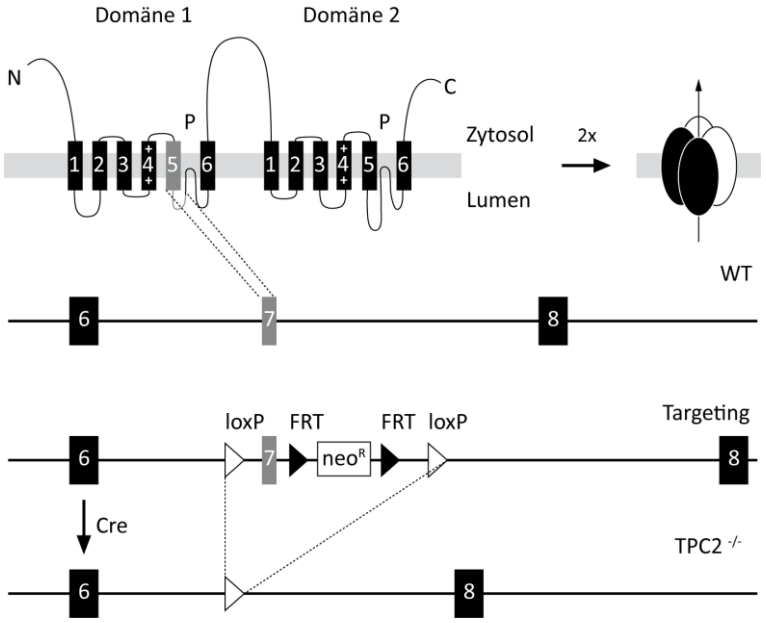

Abb. 5 Targetingstrategie der TPC2$^{-/-}$-Maus

Exon 7 des TPC2-Gens, das für TMS 5 und einen Teil der Pore der Domäne I codiert, wurde durch die Deletionskassette des *Targeting*vektors über homologe Rekombination ersetzt. Die Kassette enthält zwei loxP-Erkennungssequenzen des Cre-Enzyms. Diese flankieren Exon 7. Außerdem befinden sich zwischen den loxP-Seiten zwei FRT-Erkennungssequenzen des Flippase-Enzyms, die ein Resistenzgen für Neomycin (neo^R) flankieren. neo^R ermöglicht die positive Selektion der Stammzellen, die den *Targeting*vektor integriert haben. Die FRT-Seiten bieten die Möglichkeit der Generierung einer konditionellen KO-Linie. Verpaarung mit einer Cre-Mauslinie resultiert in der Deletion von Exon 7 gleichbedeutend mit dem KO von TPC2. *Targeting*strategie und Generierung der Mauslinie, Dr. H. Cuny.

3.3 Arbeiten mit RNA und DNA

3.3.1 Arbeiten mit RNA

RNA aus Zellen und Geweben wurde unter Verwendung von peqGOLD TriFast (PEQLAB Biotechnologie GmbH) nach Anweisung des Herstellers isoliert. 5 µg RNA wurden mit dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (THERMO Scientific), ebenfalls nach Anweisung des Herstellers, in Einzelstrang-cDNA umgeschrieben.

3.3.2 Arbeiten mit DNA

hRab7-EGFP wurde freundlicherweise von Prof. Dr. D. Edbauer zur Verfügung gestellt. cDNA wurde aus vorhandenen Plasmidkonstrukten amplifiziert, cDNA für Rab5, Lamp1, TPC2 wurde aus muriner mRNA des Hippocampus amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in die entsprechenden kommerziellen Vektoren subcloniert: pmKate2 (Evrogen), pcDNA™3.1(+)

(Life Technologies). pmKate2-mito wurde kommerziell bezogen. Primer und Schnittstellen s. Anhang.

3.4 Zellkultur

3.4.1 Generierung der *Mouse Embryonic Fibroblast* (MEF)-Zelllinien

3.4.1.1 Präparation der Primärzellen

MEFs aus WT- und KO-Mäusen wurden mit leichten Abänderungen nach dem Protokoll von Xu [22] präpariert. Die Präparation erfolgte unter aseptischen Bedingungen. Embryonen wurden am Tag 13.5 aus dem Uterus der Mutter isoliert und jeweils in 2 ml PBS in 2 cm Petrischalen gegeben. Der Dottersack des Embryos wurde entfernt. Kopf, Leber und Herz des Embryos wurden ebenfalls entfernt. 1 Embryo wurde in je ein 15 ml Falconrohr gegeben, das 3 ml eiskaltes 0.25% Trypsin-EDTA enthielt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Trypsinlösung unter der Lamina-Flow-Werkbank bis auf ca. 2 Volumenäquivalente des Gewebes abgesaugt. Das verschlossene Falcon wurde für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden 8 ml DMEM (low glucose, GlutaMAX™, pyruvate; Gibco®), supplementiert mit 10% FBS (Biochrom) sowie 100 Units/ml Penicillin G (Biochrom) und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom), ins Falcon gegeben und mit einer Pipette ca. 10 mal homogenisiert. Dabei wurde die Bildung von Luftblasen vermieden. Die Suspension wurde für 1 min stehen gelassen, um größere Zelltrümmer sedimentieren zu lassen. Der Überstand wurde in ein frisches 50 ml Falcon überführt. Auf das Sediment wurden 8 ml frisches DMEM gegeben und erneut homogenisiert und sedimentiert. Die Überstände wurden vereint und *ad* 50 ml mit DMEM aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde durch vorsichtiges Schwenken homogenisiert und in 5 Petrischalen (10 cm) ausgesät.

3.4.1.2 Retrovirale Infektion und Immortalisierung

Die psi2-865 Zelllinie, die den ecotrophischen Helfer-freien Retrovirus produziert, wurde freundlicherweise von Prof. Dr. R. Fässler, Max-Planck-Institut, Martinsried, zur Verfügung gestellt. Dieser replikationsinkompetente Retrovirus kodiert für das SV40 largeT Antigen, dessen Expression für die Immortalisierung der MEF-Zellen verantwortlich ist, sowie für neo^R zur späteren Selektion der Zellen. Die Viruszelllinie wurde im gleichen Kulturmedium wie die MEF-Primärzellen kultiviert. Sobald die Zelldichte ca. 90% Konfluenz erreicht hatte, wurde 24

h später der Überstand abgenommen und steril filtriert (0.2 µm). 10 ml filtrierter Überstand wurde in Anwesenheit von 8 µg/ml Polybrene für 2 h auf die MEF-Primärzellkultur gegeben. Nach der Infektion wurde das Medium der MEF-Zellen gewechselt und 48 h nach der Infektion mit 1 mg/ml G418 für 2 Wochen selektioniert. Die Zellen wurden ca. alle 3 Tage passagiert. Nach 2 Wochen wurden Gefrierstocks der Zellen angefertigt und in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung gelagert (Einfriermedium: suppl. DMEM, 20% FBS, 10% DMSO). Die Zellen wurden bei 37°C / 5% CO_2 kultiviert.

3.4.2 Hippocampale Neuronenkultur

Die Präparation hippocampaler Neurone wurde nach dem Protokoll von Fath *et al.* [23] durchgeführt.

3.4.2.1 Vorbereiten und Beschichten der Glasplättchen

18 mm Glas*coverslips* wurden über Nacht in 65% HNO_3 geätzt und entfettet. Am nächsten Tag wurden die Plättchen über 2 h 4mal mit ddH_2O gewaschen und danach für mind. 6 h bei 220°C im Trockenschrank sterilisiert. Im Anschluss wurden die Plättchen unter der Flow in 12-*well*-Platten verteilt. Für die Beschichtung wurden die Plättchen für 1 h mit 37.5 µg/ml Poly-D-Lysin in Boratpuffer bei 37°C beschichtet. Danach 2mal mit ddH_2O gewaschen. Dann wurde für mind. 0.5 h mit Laminin (5 µg/ml) in Neurobasal®-A (suppl. Pen / Strep) bei 37% / 5% CO_2 beschichtet, gefolgt von einem weiteren Waschschritt mit Neurobasal®-A (suppl. Pen /Strep). Zum Schluss wurde je 1 ml voll supplementiertes Neurobasalmedium in die *wells* gegeben und die Plättchen bis zur Verwendung am selben Tag bei 37°C / 5% CO_2 inkubiert.

3.4.2.2 Neuronenpräparation

Hippocampi neugeborener (p0) Mäuse wurden isoliert und in je 1.8 ml eiskaltem HBSS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}; Gibco®) suppl. mit 1fach Pyruvat (Invitrogen), 0.1% Glukose und 10 mM HEPES in 15 ml Falcons gegeben. Nach der Isolation wurden jeweils 200 µl 10fach Trypsin (Sigma) hinzugegeben und die Falcons für 20 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden jeweils 50 µl DNAseI Stammlösung (Sigma) unter der Flow zugegeben und 30 s gewartet. Anschließend wurde 3mal mit jeweils 3 ml HBSS (Raumtemperatur) gewaschen und der Hippocampus in 1 ml Neurobasal®-A Medium (suppl. B-27®, GlutaMAX™; Gibco®; Pen / Strep; s. o.) aufgenommen. Das Gewebe wurde mit einer Feuer-polierten Pasteurpipette ca. 10mal homogenisiert bis keine sichtbaren Zellklumpen mehr zu erkennen waren. Die resultierende

Zellsuspension sedimentierte für 2 min. Im Anschluss wurde 1 ml Überstand in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt, sanft homogenisiert und auf 12 vorbereitete Glasplättchen in einer 12-*well*-Platte mit jeweils 1 ml Medium (s.o.) verteilt. Die Zellen wurden bei 37°C / 5% CO_2 kultiviert.

3.4.2.3 Transfektion

Neurone wurden mit $Ca_3(PO_4)_2$ nach dem Protokoll von Jiang & Chen [24] transfiziert. Hierfür wurden die Plättchen in eine neue 12-*well*-Platte mit jeweils 1 ml Neurobasal®-A Medium (suppl. GlutaMAX™, Pen / Strep) gegeben. Pro Glasplättchen wurden 2 ml Medium separat bei 10% CO_2 inkubiert, um es anzusäuern. Für ein Plättchen wurden 0.8 – 1.5 µg Plasmid-DNA ad 22.5 µl mit ddH_2O aufgefüllt, mit 2.5 µl 2.5 M $CaCl_2$ versetzt und unter tropfenweiser Zugabe von 25 µl 2fach BBS bei 2000 rpm *gevortext*. Die Lösung wurde 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit sich Präzipitate bilden konnten. Anschließend wurde die Lösung auf die Zellen gegeben und die Zellen bei 5% CO_2 für 0.5 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Bildung von Präzipitaten im Mikroskop überprüft und bei positivem Befund wurde das Medium abgesaugt und mit 2 ml des angesäuerten Mediums ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 10 min bei 5% CO_2 inkubiert. Nach dieser Zeit wurde überprüft ob sich die Präzipitate aufgelöst hatten. Anschließend wurden die Glasplättchen wieder in ihre ursprüngliche 12-*well*-Platte mit B27-haltigem Medium zurücküberführt.

3.5 Zytologie & Histologie

3.5.1 Immunzytologie

Folgende Antikörper wurden benutzt: αEEA1 (C45B10, Cell Signaling), αRab5 (2143S, Cell Signaling bzw. ab18211, abcam), αRab7 (NBP1-87174, Novus Biologicals), αLamp1 (1D4B, Developmental Studies Hybridoma Bank).

MEF Zellen wuchsen auf unbeschichteten Glas*coverslips*. Die Fixierung erfolgte mit 4% Paraformaldehyd in PBS (w/v), danach wurde mit 0.2% Saponin permeabilisiert. Alternativ wurden die Zellen für 5 min in eiskaltem Methanol bei -20°C ohne weitere Permeabilisierung fixiert. Blockiert wurde mit 10% Normal Goat Serum (Sigma) in PBS (± Saponin), die Antikörperverdünnungen enthielten 1% Serum. Alexa488 (MoBiTec) oder Cy5 (Jackson

ImmunoResearch) wurden als Sekundärantikörper verwendet. Zellen wurden mit Hoechst 33342 gefärbt. Anschließend wurden die Zellen in Mowiol-Medium eingedeckelt. Bilder wurden mit einem Zeiss LSM 510 META Konfokalmikroskop aufgenommen.

3.5.2 Nissl-Färbungen von Hirnschnitten

Gehirne von WT- und TPC2$^{-/-}$-Mäusen wurden gemäß den gesetzlichen Richtlinien isoliert. Anschließend wurden die Gehirne in -30°C kaltem 2-Methylbutanol eingefroren und entwässert. Sie wurden auf Trockeneis für ca. 30 min gelagert und bis zur Anfertigung der Schnitte bei -20°C gelagert. 40 µm dicke Kryoschnitte (Leica CM3050S) der Gehirne wurden angefertigt und anschließend nach Nissl gefärbt. Hierfür wurden die Schnitte für etwa 20-30 min bei Raumtemperatur aufgetaut. Für die Färbung wurden die Objektträger zunächst 2mal für 5 min in 100%igen (v/v) Ethanol, für 5 min in 95%igen Ethanol und für 5 min in 70%igen Ethanol gestellt. Dann wurden sie für etwa 5 s in ddH_2O getaucht und anschließend für 5 min in der Kresylviolett-Lösung gefärbt. Danach wurde sie für 5 min in ddH_2O gewaschen und langsam entwässert, indem sie für 5 min in 70%igen Ethanol und für jeweils 4 min in 95%igen Ethanol, 2mal in 100%igen Ethanol und zur vollständigen Dehydratation 2mal in 100%iges Toluol gestellt wurden. Nach kurzem Trocknen der Schnitte wurden diese mit Entellan® (Roth) eingebettet. Aufnahmen wurden unter dem Stereomikroskop mit einer AxioCam MRm (Zeiss) gemacht.

3.6 Transportexperiment

3.6.1 Transport in MEF-Zellen

Für die Transportexperimente wurde AlexaFluor488-EGF, AlexaFluor555-EGF oder LDL-BodipyFL (Life Technologies) verwendet. WT- und TPC2$^{-/-}$-MEFs wurden auf Glasplättchen in 24-*well*-Platten ausgesät und 48 h in DMEM (suppl. 10% FBS, Pen / Strep) bei 37°C / 5% CO_2 inkubiert. Danach wurden die Zellen mit variierenden Konzentrationen an markiertem LDL oder EGF und für unterschiedlich lange Zeiträume bei 37°C / 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in DMEM ohne FBS gewaschen und entweder für einen weiteren Zeitraum mit nicht markiertem EGF / LDL bei 37°C / 5% CO_2 inkubiert, oder direkt mit eiskaltem Methanol für 5 min bei -20°C fixiert. Die Hoechst-Färbung (Hoechst 33342) wurde in PBS (5

µg/ml) durchgeführt. Die Zellen wurden 3mal in PBS gewaschen und anschließend in Fluoromount-G Einbettmedium (Beckman Coulter) eingebettet.

Konfokalbilder wurden mit dem LSM 510 META unter Verwendung der entsprechenden Filter aufgenommen. Die Quantifizierung wurde mit Hilfe von ImageJ (W. Rasband, NIH) durchgeführt. Hierbei wurde die Anzahl der Vesikel in einem Bildausschnitt durch die Anzahl der Zellkerne geteilt.

3.6.2 *Live-Cell-Imaging* in Neuronen

Neurone wurden mit Rab7-EGFP, mKate2-mito und den komplementären löslichen Fluoreszenzproteinen (diente der Identifizierung des Axons anhand morphologischer Kriterien) im Verhältnis 2:1 cotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die *coverslips* in die Messkammer (Warner Instruments) überführt und mit HEPES-gepufferter Tyrode bei 37°C / 5% CO2 in der Inkubationskammer (Okolab) eines Leica TCS SP8 Konfokalmikroskops für 10 min akklimatisiert. Danach wurden 300 Aufnahmen (1 Hz) eines Axonabschnitts in ca. 100 µm Abstand vom Zellsoma aufgenommen. Für die Aufnahmen wurde ein 63x Objektiv verwendet bei 1x optischem Zoom und einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixeln. Das Pinhole wurde auf 3 Units eingestellt, um Höhenunterschiede im Axonverlauf durch größere optische Schnittdicke auszugleichen. Die resultierenden Einzelbilder wurden mit ImageJ in einem *Stack* vereint und dieser mit dem MultipleKymograph Plugin (J. Rietdorf & A. Seitz) als Kymogramm *geplottet* und ausgewertet. Ein Minimum von 5 µm Wegstrecke in 300 s wurde als Bewegungskriterium gewählt.

Für die Colokalisationsstudien in Neuronen wurde TPC2-EGFP jeweils zusammen mit Rab5-mKate2 und Lamp1-mKate2 in einem Verhältnis von 1:1 cotransfiziert und 2 Tage nach der Transfektion in Tyrode bei 37°C mit einem Leica TCS SP8 Konfokalmikroskop untersucht. Es wurden z-*Stacks* aufgenommen und davon *maximum intensity projections* (LAS AF, Leica) angefertigt.

3.7 Arbeiten mit Proteinen

3.7.1 Massenspektrometrischer *Screen* nach potentiellen TPC2 Interaktionspartnern

Um die Genauigkeit der massenspektrometrischen Analyse zu erhöhen, wurde die SILAC Methode verwendet (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture) [25]. Dafür wurden TPC2-EGFP exprimierende HEK293-Zellen sowie HEK293 Kontrollzellen, die entweder nur EGFP oder kein heterologes Protein exprimierten, jeweils mit unterschiedlichen isotopenmarkierten Aminosäuren inkubiert. TPC2_EGFP exprimierende Zellen wurden mit Medium kultiviert, das schweres Arginin (R*: $^{13}C_6$, $^{15}N_4$) und Lysin (K*: $^{13}C_6$) enthielt, wohingegen Kontrollzellen mit Medium inkubiert wurden, das unmarkierten Aminosäurevarianten enthielt (R, K). Nach ca. 5 Zellteilungszyklen war davon auszugehen, dass ca. 97% der Proteine die jeweiligen Aminosäuren, *gelabelt* und *ungelabelt*, integriert hatten [26]. Danach wurden die Zellen lysiert und die Immunopräzipitation unter Verwendung von GFP-Trap®_A (Chromotek) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die jeweiligen Pellets wurden daraufhin vereint, da Proben- und Kontrollproteine aufgrund ihres Isotopenlabels später im Massenspektrometer eindeutig identifiziert werden konnten (Abb. 6). Das Vereinen der Pellets hatte den Vorteil, dass nachfolgende Aufbereitungsschritte für die Massenspektrometrie für beide, Kontrolle wie auch Probe, identisch waren. Dies ermöglichte eine genauere Quantifizierung der relativen Mengenverhältnisse von Probe zu Kontrolle und verbesserte dadurch die Identifikation. Die Pellets wurden in 30 µl 1fach Lämmli bei 95°C für 5 min aufgekocht und bei –80°C bis zur Messung weggefroren. Elektrophorese und die Messungen am Massenspektrometer wurden von der Arbeitsgruppe Fässler und der Arbeitsgruppe Mann am Max-Planck-Institut, Martinsried, durchgeführt.

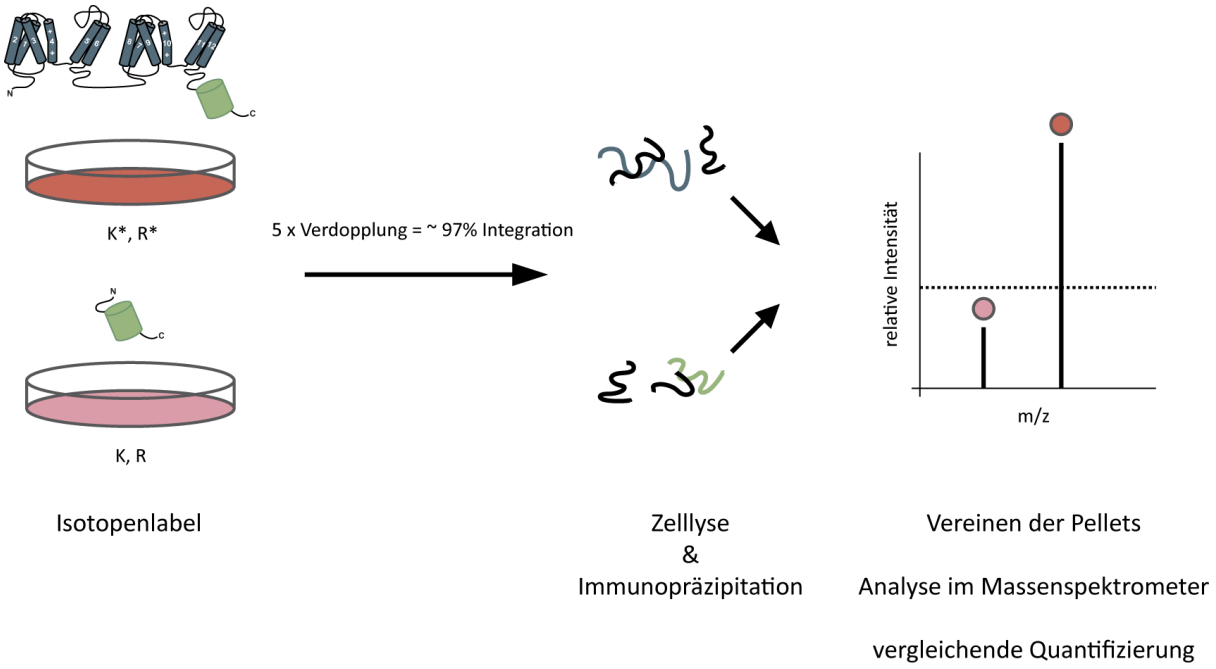

Abb. 6 SILAC Workflow

Zellen, die das Protein von Interesse (TPC2-EGFP) exprimieren und Kontrollzellen (EGFP exprimierende Zellen) werden in unterschiedlich isotopenmarkierten Medien kultiviert. Nach 5 Verdopplungszyklen haben ca. 97% des Proteoms der Zellen die jeweilig markierten bzw. nichtmarkierten Aminosäuren integriert. Nach Zelllyse und Immunopräzipitation können die Lysate vereinigt werden und im Massenspektrometer quantifiziert werden. Dies erhöht die Genauigkeit der relativen Quantifizierung, da beide Proben die identischen Schritte durchlaufen. Im Massenspektrometer zeigen gleiche Proteine der unterschiedlichen Proben aufgrund der Isotopenmarkierung einen *Shift* im Masse/Ladungs-Verhältnis und können deshalb voneinander abgegrenzt werden.

3.7.2 TPC2-Antikörper

Um einen TPC2-spezifischen Antikörper zu generieren, wurden Kaninchen mit einem C-terminalen Peptid von TPC2 immunisiert (N-Cys_Phe[705]-His[726]-C). Die Immunisierung wurde extern von der Firma Gramsch durchgeführt. Nach der Immunisierung wurde das resultierende Serum über Affinitätschromatographie mittels SulfoLink® Immobilization Kit for Peptides (Thermo Scientific; Verwendung gemäß Herstellerangaben) und einem ÄKTAprime plus (GE Healthcare) Flüssigchromatographiesystem aufgereinigt. Gebundener Antikörper wurde durch einen linearen Säuregradienten beginnend bei pH 8 bis pH 2 eluiert (Abb. 7).

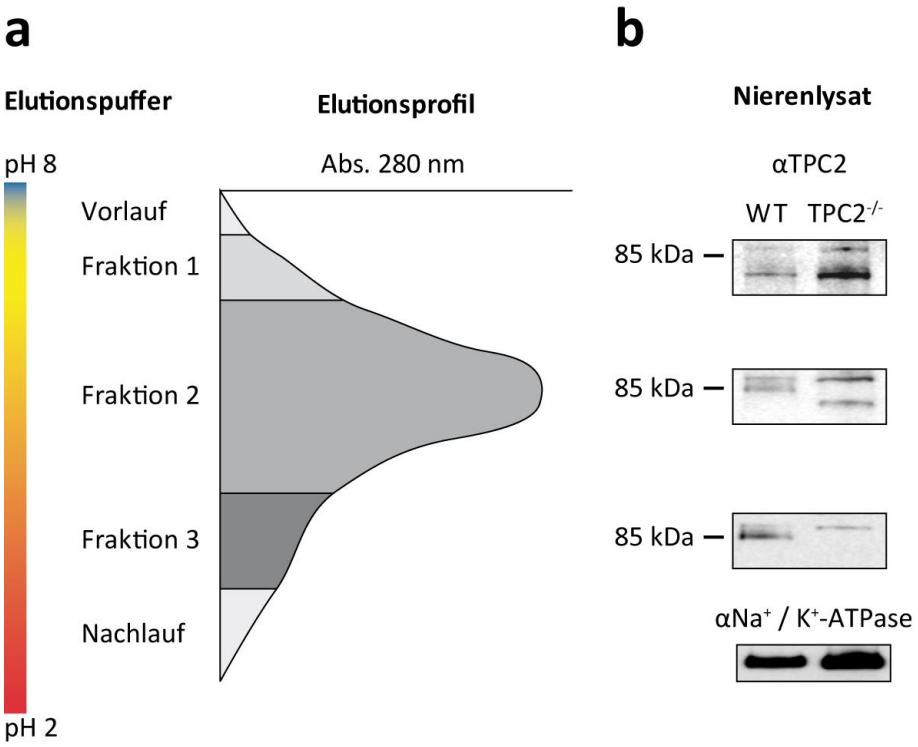

Abb. 7 Affinitätsreinigung und Fraktionierung des TPC2-Antikörpers

(a) Serum von immunisierten Kaninchen wurde über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Gebundener Antikörper wurde über einen linearen Säuregradienten von der Säule eluiert. Eluierter Antikörper wurde durch die Absorption bei 280 detektiert und in 1 ml Fraktionen gesammelt. Entsprechend dem Elutionsprofil wurden die 1 ml Fraktionen zu 3 Hauptfraktionen vereint. Vorlauf und Nachlauf wurden verworfen. (b) Die Qualität der Antikörperfraktionen 1 – 3 wurde mittels Westernblot von WT- und KO-Nierenlysaten überprüft. Die Zunahme der Spezifität des Antikörpers ist gut an der ab Fraktion 2 detektierbaren TPC2 Bande bei ca. 85 kDa, sowie an dem Verlust der unspezifischen Nebenbanden in Fraktion 3, zu erkennen. Als Ladekontrolle diente die Na^+ / K^+-ATPase.

3.7.3 Westernblot

Folgende kommerzielle Antikörper wurden verwendet: αTubulin(α) (DM1A, dianova), αGAPDH (D16H11, Cell Signaling), αLC3 (APG8, abgent), αLamp1 (L1418, sigma).

Gelelektrophorese und Blot wurden nach Standardprotokollen durchgeführt. Zur Proteinauftrennung wurden als Sammelgel 5–20%ige Gradientengele verwendet. Für den Blot wurden PVDF-Membranen benutzt. Arbeiten mit Proteinlysaten wurden stets auf Eis durchgeführt. Zur Detektion zytosolischer Proteine wurden x mg Gewebe mit x*10 µl 1fach Lämmli in einem Glas / Teflonhomogenisierer (Potter S, B. Braun Biotech International) durch 20 Hübe bei 900 rpm homogenisiert. Die Suspension wurde 20 min bei 70° / 1000 rpm in einem Laborthermomixer (eppendorf) homogenisiert und die resultierende klare Lösung auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Für Membranpräparationen wurden x mg Gewebe mit x*10 µl

Homogenisierungspuffer (s. Anhang) in einem Glas / Teflonhomogenisierer durch 20 Hübe bei 1400 rpm homogenisiert. Die Suspension wurde für 20 min bei 800 g / 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches Falcon gegeben. Das Pellet wurde mit x*5 µl Homogenisierungspuffer gewaschen und die Überstände vereint. Die Suspension wurde 3mal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C aufgetaut. Danach wurde für 1 h bei 4 ° eine Carbonatextraktion (final 100 mM) durchgeführt. Die Suspension wurde anschließend für 1 h bei 100 000 g / 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in x*3 µl 1fach Lämmli resuspendiert und 20 min bei 70° / 1000 rpm in einem Laborthermomixer gelöst. Die klare Lösung wurde auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen.

3.8 Elektrophysiologie

3.8.1 Lysosomales Patch-Clamp

Die Messungen wurden von Cheng-Chang Chen durchgeführt und ausgewertet.

3.8.2 Messung der exzitatorischen spontanen Neurotransmission an hippocampalen Primärneuronen

Synaptische Ströme wurden mit einem Axopatch 200B Verstärker aufgenommen und mit Clampex visualisiert (Molecular Devices). Die Messungen wurden in der *whole-cell*-Konfiguration durchgeführt und das Membranpotential auf -60 mV geklemmt. Zusammensetzung der Extra- und Intrazellulärlösung, s. Anhang. Der Pipettenwiderstand in der Extrazellulärlösung betrug zwischen 3-5 MOhm. Für die Aufnahme spontaner Ströme wurden Aktionspotentiale mit Tetrodotoxin blockiert. Die exzitatorische Komponente wurde pharmakologisch durch die Zugabe des GABA-Rezeptor-Blockers Bicubullin isoliert. Einzelne Ströme wurden mit Clampfit 10 (Molecular Devices) unter Zuhilfenahme der *threshold*-Suche ausgezählt. Ströme > 5 pA wurden als Event gezählt.

3.9 Analyse der Leberphysiologie

Daten und Auswertung wurden von Dr. C. Grimm durchgeführt.

3.10 Verhalten

Die Versuche wurden auf Basis der Publikation von Kleinknecht *et al.* durchgeführt [27] (Abb. 35). Es wurden je 8 TPC2$^{-/-}$- und WT-Geschwisterpaare für das Experiment verwendet. Die Tiere waren 6-7 Wochen alt. 2 Wochen vor Beginn des Experiments, wurden die Tiere an einen inversen 12 h Tag- / Nacht-Rhythmus gewöhnt (Beginn der Tag-Phase um 19 h). Dadurch befand sich der Biorhythmus der Tiere während der Durchführung der Experimente in der aktiven Phase.

Das Wasserbecken, das im Versuch verwendet wurde, ist aus 4 kreuzförmig angeordneten Armen aufgebaut. Es besteht aus Plexiglas, um die visuelle Orientierung der Tiere durch externe Fixpunkte zu gewährleisten. Die jeweiligen Arme werden mit Nord-, Ost-, Süd- und West-Arm im Uhrzeigersinn bezeichnet. Eine herausnehmbare, durchsichtige Abtrennung ermöglicht den gegenüberliegenden Arm in Abhängigkeit des Startpunktes (Nord oder Süd) zu blockieren, sodass der, der Maus zugängliche Bereich, die Form eines „T“s bildet. Eine Plattform (8 x 8 cm) aus Plexiglas wird am Ende des Ost- oder West-Arms ca. 1 cm unter der Wasseroberfläche, daher unsichtbar für die Maus, positioniert. Das Wasser wurde regelmäßig während des Experiments gewechselt. Ein Stab ermöglicht die Bergung des Tieres nach Beendigung eines Durchlaufs.

Die Tiere wurden täglich, unmittelbar vor dem Experiment vom Haltungsraum in den Testraum gebracht. Für einen Durchlauf in der Lernphase wurden die Mäuse vorsichtig mit dem Kopf zur Wand des Startpunktes ins Wasser gelassen. Der Experimentator verblieb während der Schwimmzeit am selben Ort. Nachdem das Tier die Plattform erreicht hatte, wurde es geborgen und zurück in den Käfig gebracht, der mit Infrarotlicht gewärmt wurde, damit die Tiere trocknen konnten. Wenn das Tier innerhalb von 30 s die Plattform nicht fand, wurde es vorsichtig mit Hilfe des Stabes dorthin geleitet und nach 5 s Ruhe auf der Plattform geborgen. Um olfaktorische Orientierung zu verhindern, wurde das Wasser nach jedem Durchlauf gründlich durchmischt. Die Tiere wurden in zwei Gruppen zu je 8 Mäusen (4 WT, 4 KO) getestet.

Jedes Tier durchlief über 2 Wochen an je 5 Tagen 6 Durchläufe pro Tag. Diese Durchläufe dienten dem Erlernen des Plattformstandortes. In der ersten Woche stand die Plattform immer im West-Arm. Der Startpunkt wechselte in zufälliger Reihenfolge zwischen den 6

Durchläufen zwischen Nord- und Süd-Arm (N S N N S S). Der alternierende Startpunkt zwingt die Maus, sich an der Umgebung zu orientieren um die Plattform zu finden. Dieser experimentelle Aufbau erlaubt es, das hippocampusabhängige allozentrische Lernen (Orientierung an der Umgebung) zu testen. In der zweiten Woche wurde die Startsequenz beibehalten, aber die Plattform stand nun immer im Ost-Arm. Dadurch konnte getestet werden, ob die Maus in der Lage ist, den veränderten Standpunkt umzulernen. Auch hierbei wurde allozentrisches Lernen getestet. Am Ende der zwei Lernphasen wurde jeweils ein Testlauf ohne Plattform durchgeführt, in dem überprüft wurde ob die Mäuse den Ort der Plattform richtig gelernt hatten.

Die Lernleistung wurde anhand von drei Parametern evaluiert: *Akkuratesse*, *Latenz* und *Falsche Plattform*. Jeder Armeintritt durch die Maus wurde vom Experimentator gezählt. Ein Eintritt wurde nur dann als Eintritt gewertet, wenn der ganze Körper der Maus, Schwanz ausgeschlossen, innerhalb eines Armes war. Ein zweiter Eintritt in den gleichen Arm wurde nur dann gezählt, wenn das Tier vorher den Arm komplett verlassen hatte. Ein Durchlauf wurde als akkurat gewertet, wenn das Tier sofort in den Arm, in dem die Plattform positioniert war, schwamm und auf die Plattform kletterte. Jegliches anderes Verhalten wurde als nicht-akkurat gewertet. Die *Akkuratesse* gibt den Anteil in % an akkuraten Durchläufen an einem Tag und pro Tier wieder. Die *Latenz* ist definiert als die Zeit, die das Tier braucht, um die Plattform zu finden. Sie wird als Durchschnittswert aus allen 6 Durchläufen pro Tag angegeben. Wenn das Tier die Plattform innerhalb von 30 s nicht auffindet, wurden 31 s für die Berechnung verwendet. *Falsche Plattform* gibt die Anzahl der falschen Plattform-Besuche an. Falsche Plattform Besuche wurden dann gezählt, wenn das Tier das äußere Drittel des Arms, der sich gegenüber dem Arm befand, in dem die Plattform positioniert war, erreicht hatte. Ein zweiter falscher Plattform-Besuch wurde nur dann gezählt, wenn das Tier den Bereich zuvor komplett verlassen hatte. Die Anzahl der falschen Plattform-Besuche wurde aufsummiert.

3.11 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde Origin® 6.1 (Originlab Corp.) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Potentieller Interaktionspartner von TPC2

4.1.1 TPC2 immunopräzipitiert mit Markern des spätendosomalen-lysosomalen Systems

Zu Beginn der Arbeit gab es nur wenige Ansätze für eine physiologische Funktion von TPC2. Zudem war nichts über dessen Interaktom bekannt. Deshalb wurde zunächst ein SILAC-basierter Proteomansatz durchgeführt, um potentielle Interaktionspartner zu identifizieren. Das funktionelle und zellbiologische Profil der identifizierten Proteine sollte dabei erste Rückschlüsse auf mögliche physiologische Funktionen von TPC2 geben. Aufgrund der hohen Sensitivität der Methode können in relativ kurzer Zeit eine Vielzahl an potentiellen Kandidaten identifiziert werden. Die Lysebedingungen für die anfängliche Proteinisolation und Immunopräzipitation sind von entscheidender Bedeutung für den Erhalt spezifischer Protein-Protein-Wechselwirkung bzw. um die Bildung unspezifischer Wechselwirkungen im Verlauf der Aufreinigung zu vermeiden. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Ansätze mit variierender Stringenz der Lysebedingungen durchgeführt. Für milde Bedingungen wurde ohne Detergenz gearbeitet, für stringenter Lysebedingungen wurde 0.1% Triton X-100 im Lysepuffer verwendet. Da es sich bei TPC2 um ein Membranprotein handelt, wurde unter Verwendung der milden Bedingung auch die Präparationsmethode variiert. Einmal wurde die Präzipitation aus Komplettlysat, das andere Mal aus einer Membranfragmentpräparation durchgeführt. Die Anreicherung der Membranfraktion vor der Präzipitation sollte die Zahl unspezifischer Bindungen von zytosolischen Proteinen reduzieren.

Die Analyse der Proteinpräzipitate in der Massenspektrometrie lieferte in allen drei Ansätzen eine Vielzahl an Datenbanktreffern. Aus diesen wurden zunächst jene ausgewählt, die im Vergleich zur Kontrollbedingung - Zellen ohne heterologe Expression bzw. Zellen mit heterologer EGFP Expression - eine Anreicherung von mindestens 30% aufwiesen (Anhang, Tabelle 1 und 2). Von diesen potentiellen Interaktionspartnern wurden dann diejenigen, die in allen drei Bedingungen angereichert werden konnten, einer genaueren Betrachtung unterzogen (13; Abb. 8a; Abb. 8b). Hierbei ist zunächst interessant, dass sich unter ihnen klassische lysosomale Marker (LAMP1, RAB7A [28]) bzw. Marker der lysosomalen Biogenese (M6PR, RAB9A [29]) befinden. Dies bestätigt die für TPC2 beschriebene lysosomale

Lokalisation [7] und kann als Indiz für die Validität des *Screens* gewertet werden. Funktionell interessant ist die Identifizierung von ADP-ribosylation factor-like protein 8B (Arl8b). Arl8b wurde mehrfach im Zusammenhang mit lysosomalem *Trafficking* beschrieben [30, 31]. Neben Arl8b ist die Copräzipitation von Secretory carrier-associated membrane protein 3 (SCAMP3) auffällig. Dieses spielt eine Rolle in der Biogenese von Multivesicular Bodies (MVB), einer Vorstufe von Lysosomen, und nimmt eine Schlüsselstellung im Transport von Endosomen zu Lysosomen ein. So beeinflusst es z. B. den Transport von Epidermal Growth Factor (EGF) und dessen Rezeptor (EGFR) ins Lysosom [32]. Außerdem finden sich in der Liste der 13 Proteine in Abb. 8b, wie auch in den angereicherten Proteinen der einzelnen Ansätze, mit NSF, diversen Vamp-Proteinen und Syntaxinen, eine Reihe von Proteinen der vesikulären Fusionsmaschinerie (sog. SNARE-Proteine).

Zusammenfassend bestätigt der *Screen* die lysosomale Lokalisation von TPC2 und liefert mit der Copräzipitation von Arl8b und SCAMP3 erste Evidenz, dass TPC2 möglicherweise eine Rolle im vesikulären spätendosomalen-lysosomalen Transport spielt. Die Identifizierung verschiedener SNARE-Proteine stellt zudem eine mögliche Beteiligung an vesikulären Fusionsereignissen in Aussicht.

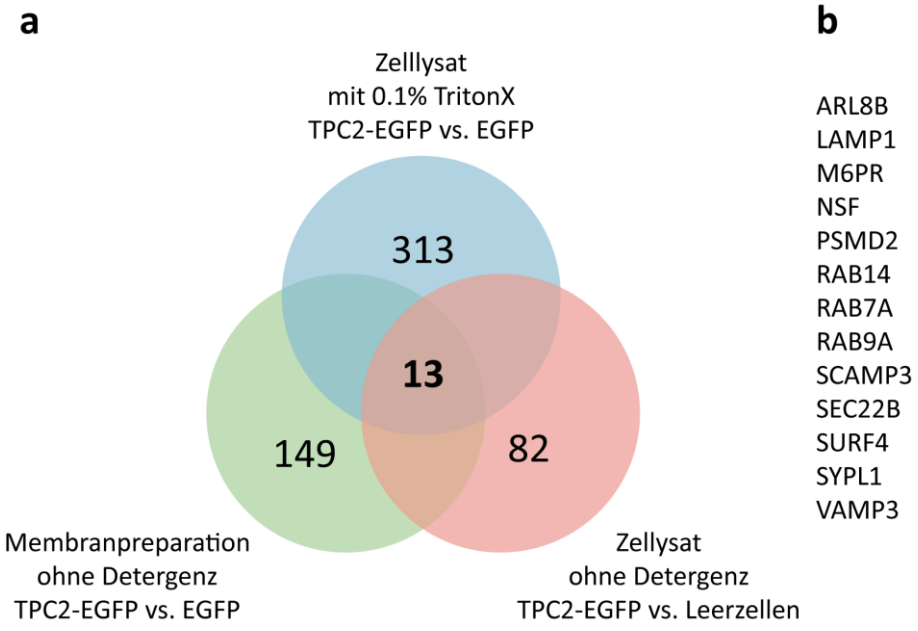

Abb. 8 Potentielle Interaktionspartner von TPC2

(a) Venn-Diagramm der angereicherten potentiellen Interaktionspartner. (b) Gennamen der 13 Proteine, die unter allen drei Bedingungen angereichert wurden. SILAC-Experimente wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Fässler und der Arbeitsgruppe Mann am MPI, Martinsried, durchgeführt.

4.2 TPC2 als Regulator des endolysosomalen *Traffickings*

4.2.1 Der Verlust von TPC2 führt zu einer Beeinträchtigung der Degradation von EGF im endolysosomalen System

Um die Hinweise einer möglichen Beteiligung von TPC2 am endolysosomalen *Trafficking* aus dem massenspektrometrischen *Screen* im Zellmodell zu validieren, wurde in einem nächsten Schritt der lysosomale Degradationsweg der Zelle (vom frühen Endosom bis ins Lysosom) funktionell untersucht. Hierfür wurden zunächst Mouse Embryonic Fibroblast (MEF)-Zelllinien aus WT- und TPC2$^{-/-}$-Mäusen generiert und charakterisiert (Abb. 9).

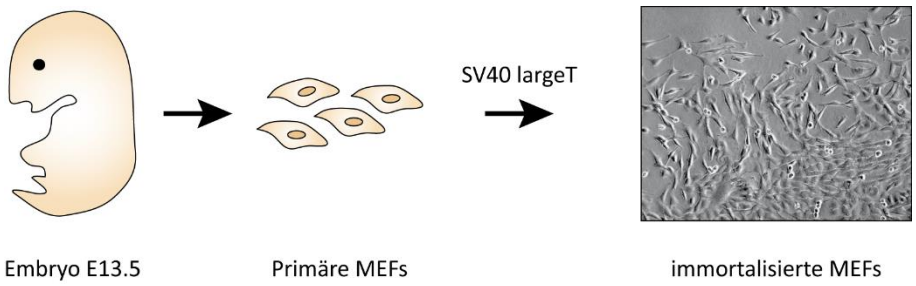

Abb. 9 Arbeitsschema der MEF-Zell-Generierung

Die Haut von 13.5 Tage alten Mäuseembryonen wurde enzymatisch verdaut. Die resultierende Zellsuspension (Primäre MEFs) wurde in Kultur genommen und durch Infektion mit einem für das SV40 Protein „largeT" kodierenden Virus immortalisiert. (rechts) Exemplarische Aufnahme von immortalisierten WT-MEF-Zellen.

Morphologisch unterscheiden sich TPC2$^{-/-}$-MEFs nicht von WT-Zellen, weder in der Durchlichtmikroskopie (Daten nicht gezeigt), noch in der Verteilung endolysosomaler Marker nach Antikörperfärbung (Abb. 10). Einzig die Teilungsrate scheint bei immortalisierten TPC2-defizienten MEFs verlangsamt zu sein (eigene Beobachtung).

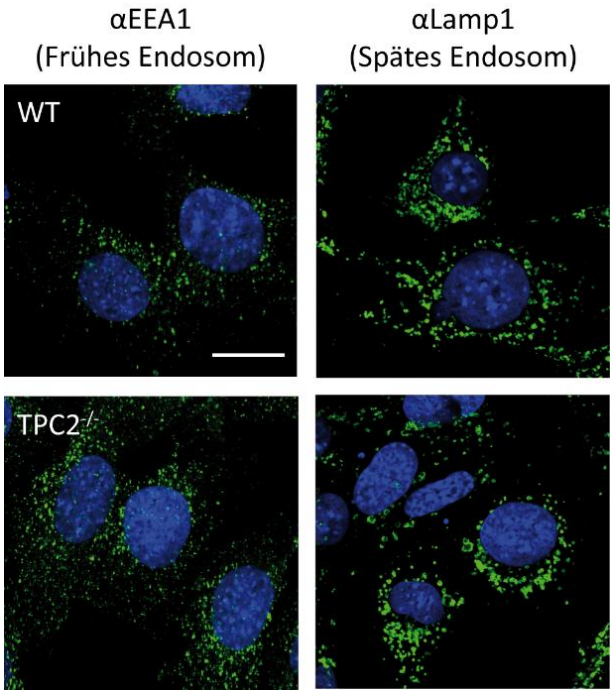

Abb. 10 Marker des endolysosomalen Systems in WT- und TPC2$^{-/-}$-MEF Zellen

WT- und KO-MEFs wurden mit Antikörpern gegen Marker für frühe Endosomen (EEA1) und Lysosomen (Lamp1) gefärbt (grünes Signal). Kerne wurden mit Hoechst gegengefärbt (blau). Skalierung 20 µm. In Kooperation mit dem Arbeitskreis Saftig, Kiel.

Der erfolgreiche Knockout des TPC2-Gens in TPC2$^{-/-}$-MEFs konnte sowohl auf mRNA-Ebene als auch immunzytologisch mit einem gegen TPC2 generierten Antikörper bestätigt werden (Abb. 11).

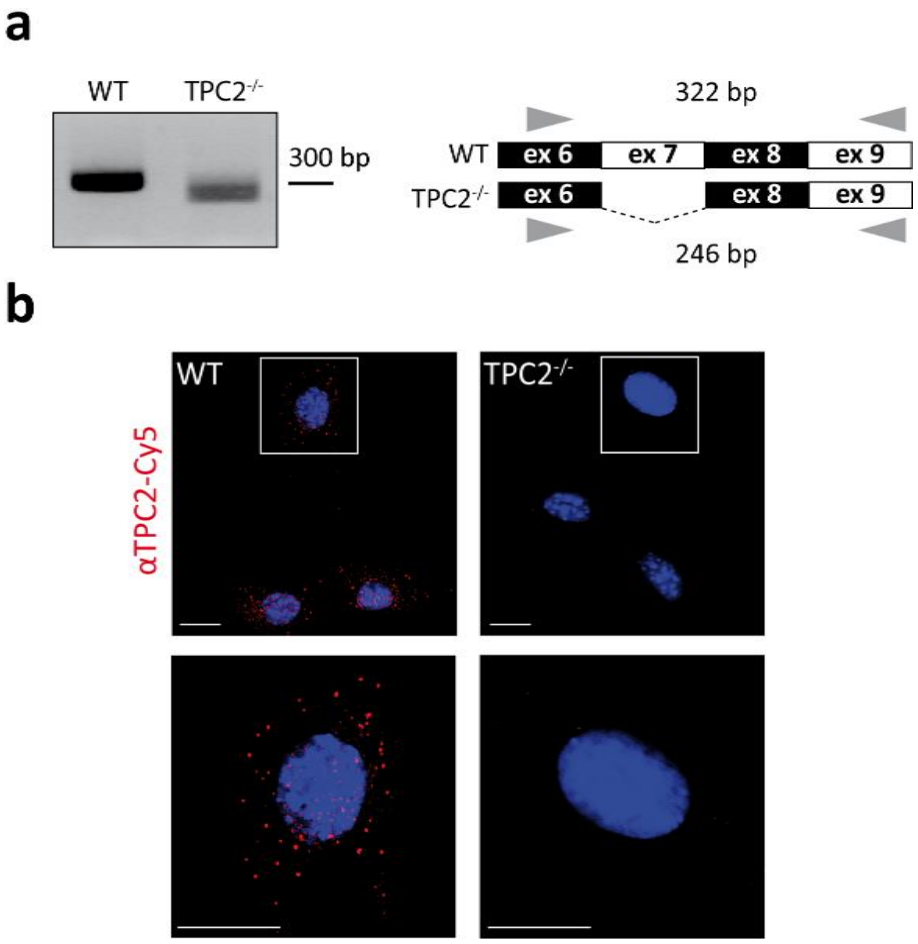

Abb. 11 KO von TPC2 in MEF-Zellen

(a) MEF-Zell-cDNA des TPC2-Transkripts. Der KO ist an der Verschiebung der cDNA Bande zur kleineren Basenpaarzahl in TPC2$^{-/-}$-Zellen zu erkennen. (b) Immunzytologischer Nachweis von TPC2. Das punktierte Signal für TPC2 (rot) ist in WT-MEF-Zellen, nicht mehr jedoch in TPC2$^{-/-}$-Zellen zu detektieren. Zellkerne sind mit Hoechst (blau) gefärbt. Die untere Reihe ist die jeweilige Vergrößerung des Inserts der oberen Reihe. ex Exon, Skalierung 20 µm.

Aus TPC2$^{-/-}$-MEF-Zellen isolierte Lysosomen zeigen elektrophysiologisch im Vergleich zum WT eine starke Reduktion der Stromantwort nach Applikation postulierter Aktivatoren von TPC2 (Abb. 12). Die NAADP-Antwort folgt in WT-Lysosomen der bereits im Überexpressionssystem beschriebenen glockenförmigen Dosis-Wirkungs-Beziehung [7].

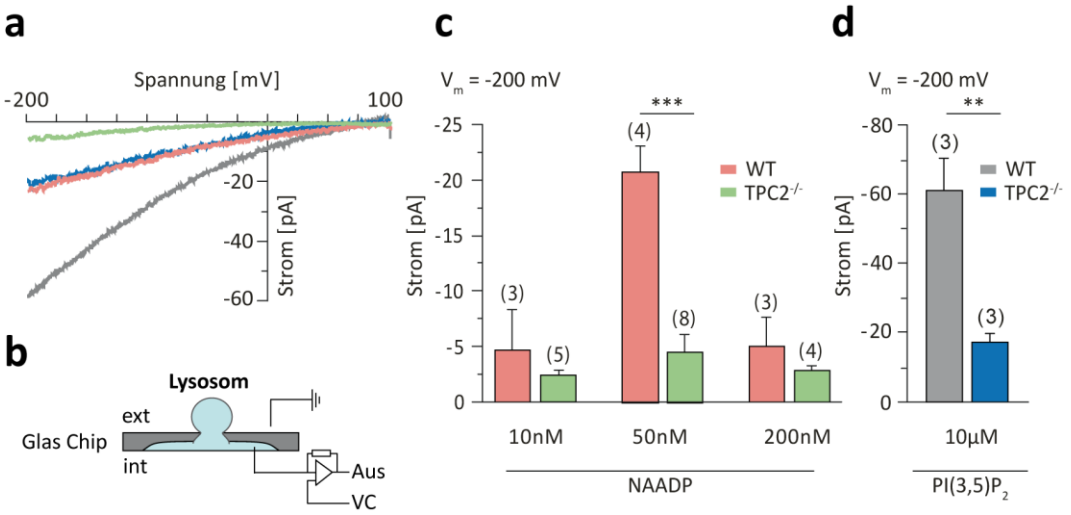

Abb. 12 Elektrophysiologische Chrakterisierung von MEF-Zell-Lysosomen

(a) Strom-Spannungs-Beziehung lysosomaler Ionenströme nach Aktivierung mit 50 nM NAADP oder 10 mM PI(3,5)P_2. WT- und KO-Lysosomen wurden vor den Messungen aus Vacuolin-1-behandelten MEF-Zellen isoliert. (b) Prinzipieller Aufbau des planaren lysosomalen Patch-Clamps. Die lysosomale Membran geht eine feste Verbindung (*Gigaseal*) mit der Oberfläche des Glas-Chips ein. Leichter Unterdruck von der Unterseite führt zu einer Ruptur der lysosomalen Membran an der Mikrobohrung des Chips und ermöglicht die Messung von Strömen über die lysosomale Membran. (c und d) Populationsdaten der Stromamplituden bei 200 mV aus den in (a) durchgeführten Messungen; **p < 0.01, ***p < <0.001, Zweifache Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von Bonferroni's Post-hoc-Test (c) oder ungepaartem Student's t-test (d). Alle Messungen wurden von Cheng-Chang Chen durchgeführt.

Um den Einfluss des TPC2-Knockouts auf den endolysosomalen Degradationsweg funktionell zu testen wurde ein Transport-/ Degradations*assay* unter Verwendung der generierten MEF-Zelllinien etabliert. Hierbei wurde ein fluoreszenzmarkierter Ligand mit den Zellen für einen definierten Zeitraum inkubiert (sog. *pulse-time*). Anschließend wurde für einen weiteren Zeitraum mit *ungelabeltem* Ligand inkubiert (sog. *chase time*). Während dieser *chase time* konnten die Zellen den aufgenommenen Ligand entlang der endolysosomalen Route transportieren. Danach wurden die Zellen fixiert und anhand der residualen Fluoreszenz in der Zelle die Transport- und Degradationskompetenz der Zellen beurteilt. Schwache Fluoreszenz zeigt ein intaktes System an, da der Marker zum Lysosom transportiert und dort degradiert wurde. Starke Restfluoreszenz hingegen indiziert einen Transport- und / oder Degradationsdefekt, da der Marker aufgrund einer Störung entlang des Transportweges zum Lysosom akkumuliert. Als Marker wurde fluoreszenzmarkiertes EGF (AlexaFluor488-EGF) verwendet, da zum einen der endolysosomale Transportweg von EGF - Bindung und Aktivierung seines Rezeptors (EGFR) an der Zelloberfläche, Internalisierung als Ligand-Rezeptorkomplex, Transport entlang des endolysosomalen Weges und Degradation im Lysosom (Abb. 13) - in der Literatur hinreichend belegt ist [33]. Zum anderen konnte mit

SCAMP3 als *Hit* in der Massenspektrometrie bereits eine Verbindung zwischen TPC2 und dem EGF-Transport hergestellt werden [32].

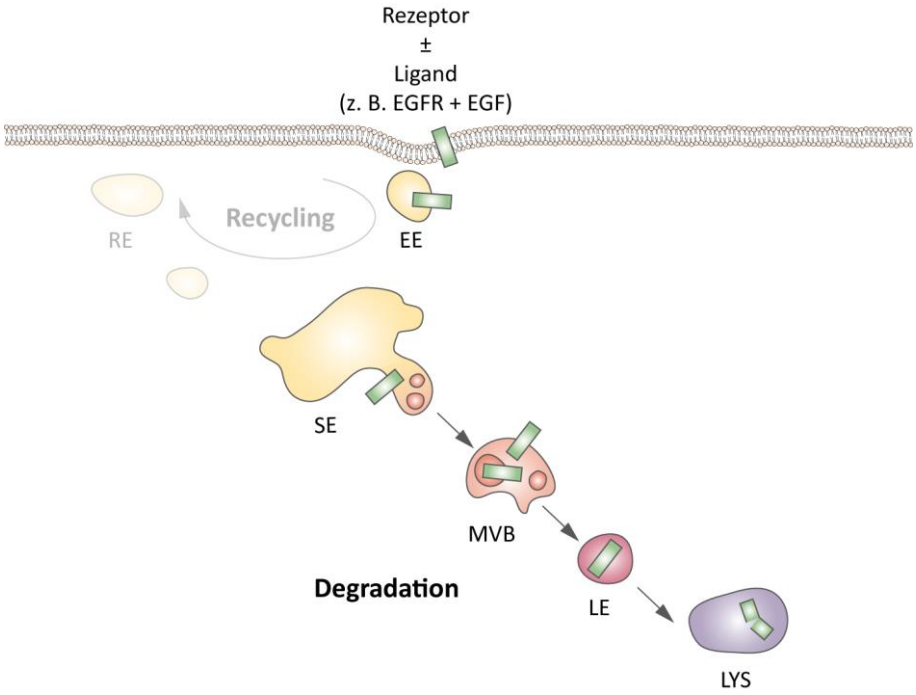

Abb. 13 Schematische Darstellung des lysosomalen Degradationsweges anhand des EFG/EGFR-Ligand-Rezeptorkomplexes

EGF wird nach Bindung und Aktivierung seines Rezeptors (EGFR) als Ligand-Rezeptorkomplex über Endozytose internalisiert. Das resultierende frühe Endosom (EE) fusioniert mit Sorting Endosomen (SE). Dort wird die Fracht, die für den Degradationsweg zum Lysosom bestimmt ist, in bestimmte Mikrodomänen separiert. Diese Domänen spalten sich als sog. Multivesicular Bodies (MVB) ab, fusionieren mit späten Endosmen (LE), welche final mit Lysosomen (LYS) fusionieren. Im Lysosom wird die Fracht enzymatisch degradiert. Der *Recycling Pathway* vom SE zurück zur Plasmamembran ist hier nur der Vollständigkeit halber dargestellt, spielt für den EGF Transport jedoch nur eine untergeordnete Rolle. RE Recycling Endosom

Die Inkubation von MEF Zellen mit markiertem EGF führt über einen weiten Konzentrationsbereich (0.1 – 1 µg/ml) zu einer signifikanten Akkumulation von EGF in TPC2-defizienten Zellen. Sub- bzw. saturierende Konzentrationen (0.03 und 3 µg/ml) zeigen einen entsprechenden Trend, dieser ist jedoch in beiden Fällen statistisch nicht signifikant (Abb. 14).

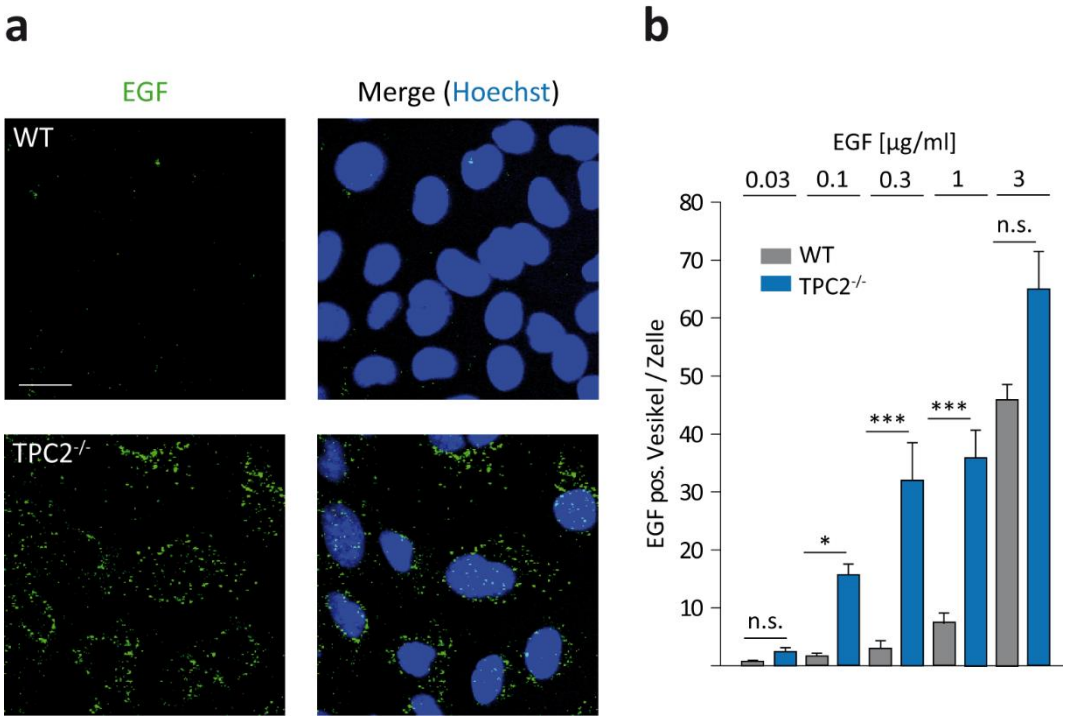

Abb. 14 Der Verlust von TPC2 führt zu einer Akkumulation von EGF in MEF-Zellen

(a) Repräsentative Konfokalbilder von WT- und TPC2$^{-/-}$-MEFs, inkubiert mit 0.3 µg/ml AlexaFluor488-EGF. Zellkerne sind mit Hoechst (blau) gefärbt. (b) Durchschnittliche Anzahl mit Standardfehler an EGF-positiven Vesikeln nach einer halben Stunde Inkubation für unterschiedliche Konzentrationen an EGF. *p < 0.05, ***p < 0.001, n. s. nicht signifikant, Zweifache Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von Bonferroni's Post-hoc-Test. Dieser und folgende *Trafficking-Assays* an MEF-Zellen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Christian Grimm durchgeführt.

Um die Identität der endolysosomalen Vesikel, in denen EGF akkumuliert, festzustellen wurde der *Assay* wiederholt und anschließend wurden die Zellen auf unterschiedliche Markerproteine des endolysosomalen Transportweges angefärbt: frühe Endosomen (Rab5), späte Endosomen (Rab7) und spätendosomal-lysosomale Vesikel (LAMP1). Hierbei zeigt sich, dass 57% der EGF positiven Vesikel ebenfalls positiv für Rab7 und 41% positiv für LAMP1 sind, wohingegen nur ca. 5% neben EGF ein Signal für Rab5 aufweisen. Dies impliziert, dass die Akkumulation im späten Abschnitt des endolysosomalen Transportes stattfindet und nicht im frühendosomalen.

Diese Ergebnisse zeigen klar, dass der endolysosomale Transport und die Degradation von EGF/EGFR in TPC2-defizienten Zellen gestört und deutlich schneller überlastet ist als in WT-Zellen.

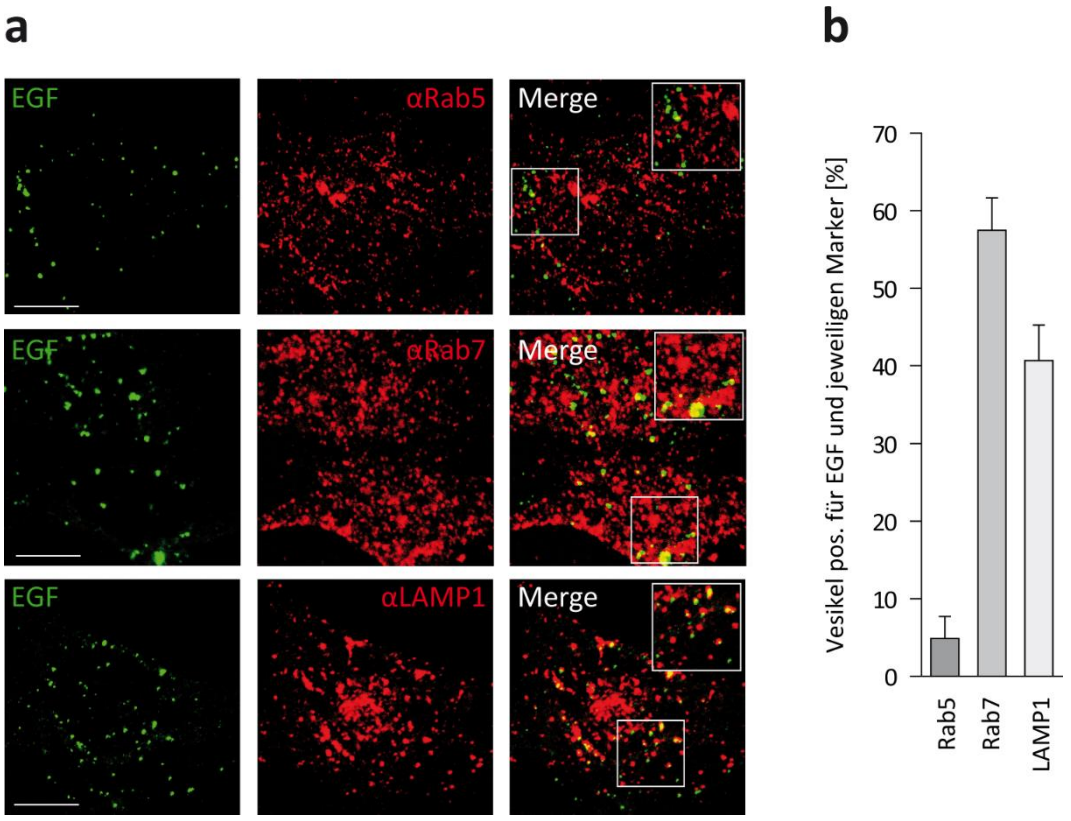

Abb. 15 EGF akkumuliert in späten Endosomen in TPC2$^{-/-}$-MEFS

(a) Repräsentative Konfokalbilder von WT- und TPC2$^{-/-}$-MEFs, inkubiert mit 1 µg/ml AlexaFluor488-EGF für 30 min, fixiert und jeweils gefärbt mit αLAMP1, αRab5 und αRab7, Skalierung 20 µm. (b) Quantitative Auswertung der Experimente in (a), gegeben als Mittelwert ± Standardfehler.

4.2.2 Calcium und TPC2 Kanäle sind essentiell für den endolysosomalen Transport

Störungen im endolysosomalen System können unterschiedlichste Ursachen haben. So kann z. B. ein Enzymdefekt den Abbau und Transport von Makromolekülen stören, was eine der häufigsten Ursachen Lysosomaler Speicherkrankheiten (LSD) ist [34, 35]. Diese Gruppe genetischer Stoffwechselerkrankungen führt durch Defekte im endolysosomalen System zu einer Akkumulation hochmolekularer Substanzen, die zunächst Funktionsstörungen und schließlich den Untergang der Zelle zur Folge hat. Eine Störung des Transports kann aber auch durch Veränderungen der Ionenhomöostase einzelner Vesikel, Defekte in deren Azidifizierung während der Reifung zum Lysosom oder Defekte der Fusions- und Knospungsprozesse während ihres Transports verursacht werden. Da in Vorarbeiten gezeigt werden konnte, dass der lysosomale pH sowie die Prozessierung saurer Hydrolasen wie Cathepsin D in TPC2 defizienten MEF-Zell-Lysosomen ggü. WT-Lysosomen nicht verändert ist (Daten nicht gezeigt), war eine andere Hypothese, dass gestörte Fusions- bzw. Knospungsprozesse dem

beobachteten Akkumulationsphänotyp in TPC2$^{-/-}$-Zellen zugrunde liegen könnten. Bereits früher wurde postuliert, dass Ca^{2+} für vesikuläre Fusionsprozesse benötigt wird und dadurch den vesikulären Transport reguliert [36, 37]. Damit übereinstimmend führt eine Komplexierung von zellulärem freien Ca^{2+} mit dem membrangängigen Ca^{2+}-Chelator 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N‘,N‘-tetraessigsäure tetrakis(acetoxymethylesther) (BAPTA-AM) in WT-MEF-Zellen konzentrationsabhängig zu einem ähnlichen Akkumulationsphänotyp, wie er beim Verlust von TPC2 zu beobachten war. In TPC2$^{-/-}$-Zellen hingegen führt die zusätzliche Komplexierung von Ca^{2+} durch BAPTA nicht zu einem weiteren Anstieg der Akkumulation (Abb. 16).

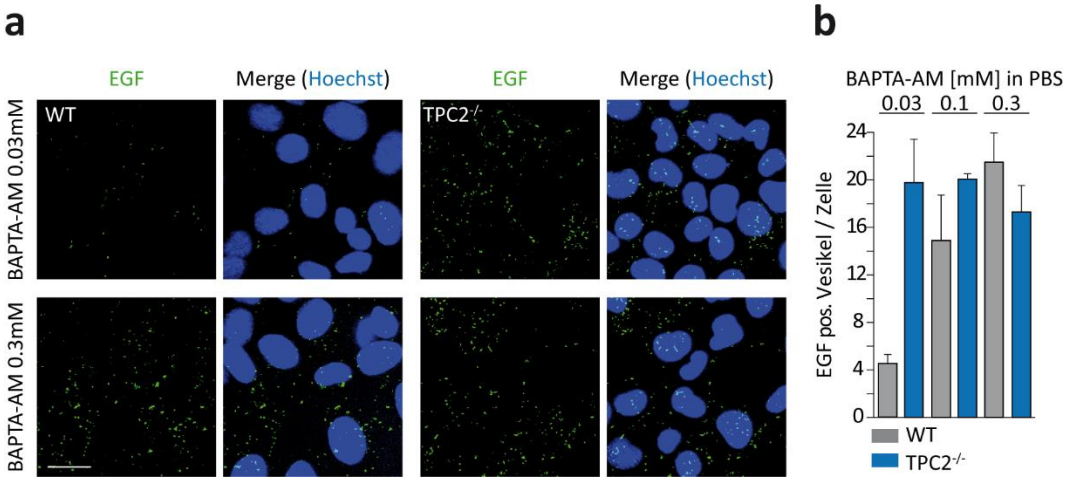

Abb. 16 Effekt der Calcium-Komplexierung mittels BAPTA auf den endolysosomalen Transport

(a) Repräsentative Bilder von WT- und TPC2$^{-/-}$-MEFs inkubiert mit 0.1 µg/ml EGF (5 min), gefolgt von einer Inkubation von 0.1 µg/ml EGF + 0.03 mM, 0.1 mM bzw. 0.3 mM BAPTA-AM Zellkerne sind mit Hoechst (blau) gefärbt. Skalierung 20 µm. (b) Durchschnittliche Nummer von EGF-positiven Vesikeln / Zelle bei unterschiedlichen Konzentrationen von BAPTA-AM wie unter (a) beschrieben. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardfehler.

Wenn TPC2 für die Bereitstellung des Calciums für den endolysosomalen Transport benötigt wird, müsste der Transportdefekt in TPC2$^{-/-}$-Zellen durch heterologe Expression von funktionellem TPC2 zu beheben sein. In der Tat zeigen TPC2$^{-/-}$-Zellen, die funktionellen EGFP-markierten TPC2-Kanal heterolog exprimieren (Abb. 17a, grünes Signal), keinen Akkumulationsphänotyp mehr. Exprimiert man jedoch eine nicht-funktionelle Porenmutante des Kanals (TPC2 N257A [9]) kommt es nach wie vor zur Akkumulation (Abb. 17b).

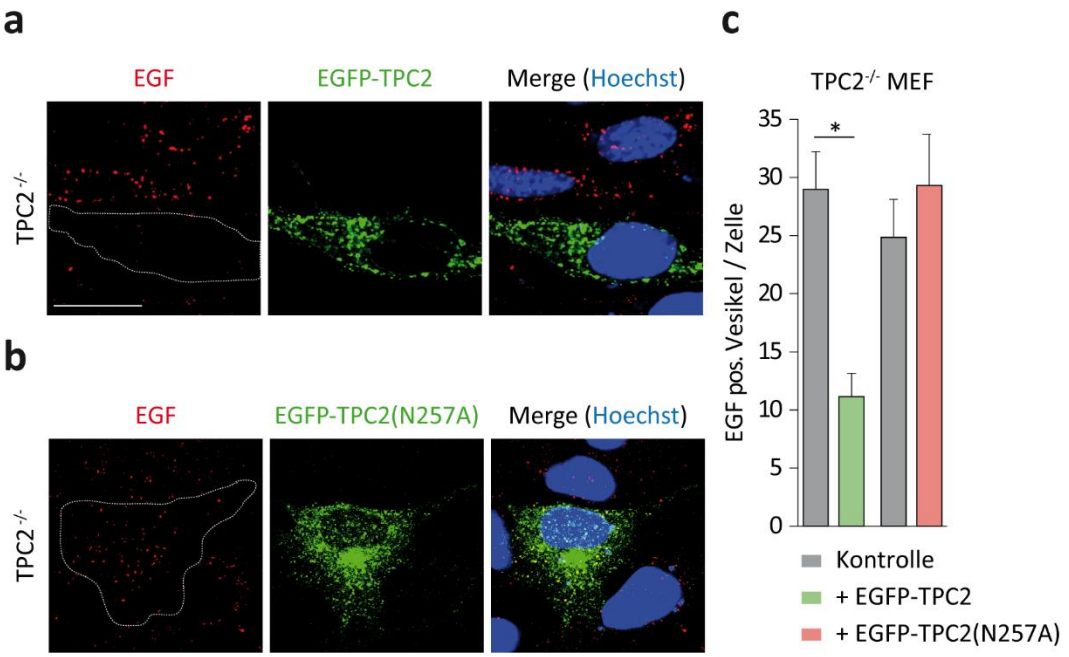

Abb. 17 Heterologe Expression von funktionellem TPC2 rescued den Transport in KO-MEFs

WT-TPC2 (a) und die inaktive Porenmutante N257A von TPC2 (b) wurden an EGFP fusioniert und in KO-MEFs überexprimiert. Die Zellen wurden mit 1 µg/ml AlexaFluor555-EGF (rot) inkubiert und die Akkumulation analysiert. Gezeigt sind repräsentative Bilder der entsprechenden Zellen nach der Fixierung. Zellkerne sind mit Hoechst (blau) gefärbt. Skalierung 20 µm. (c) Durchschnittliche Zahl EGF positive Vesikel / Zelle der Experimente in (a und b). Untransfizierte Zellen, die sich in räumlicher Nähe zu transfizierten Zellen befanden, wurden als Kontrolle herangezogen. Mittelwert ± Standardfehler, *p < 0.05, ungepaarter Student's t-test.

Diese Ergebnisse zeigen die Calciumabhängigkeit des endolysosomalen Transports und sind ein starkes Indiz dafür, dass die Kanalaktivität von TPC2 tatsächlich die Calciumquelle für die Fusionsprozesse im spätendosomalen-lysosomalen Abschnitt des Transports ist.

4.2.3 Der Transportdefekt im endolysosomalen System TPC2-defizienter Zellen kann *in vitro* generalisiert werden

Um zu testen, ob neben EGF auch andere Signalwege betroffen sind, wurde der *Assay* mit einem anderen Liganden (markiertes Low Density Lipoprotein (LDL-BodipyFL)) wiederholt. Im Gegensatz zu EGF werden beim LDL-Transport Ligand und Rezeptor nicht als Komplex zum Lysosom transportiert und dort degradiert. LDL wird im Sorting Endosom von seinem Rezeptor getrennt. Der Rezeptor wird zurück zur Plasmamembran transportiert und recycelt, wohingegen der Ligand, das LDL, ins Lysosom transportiert wird um dort abgebaut zu werden.

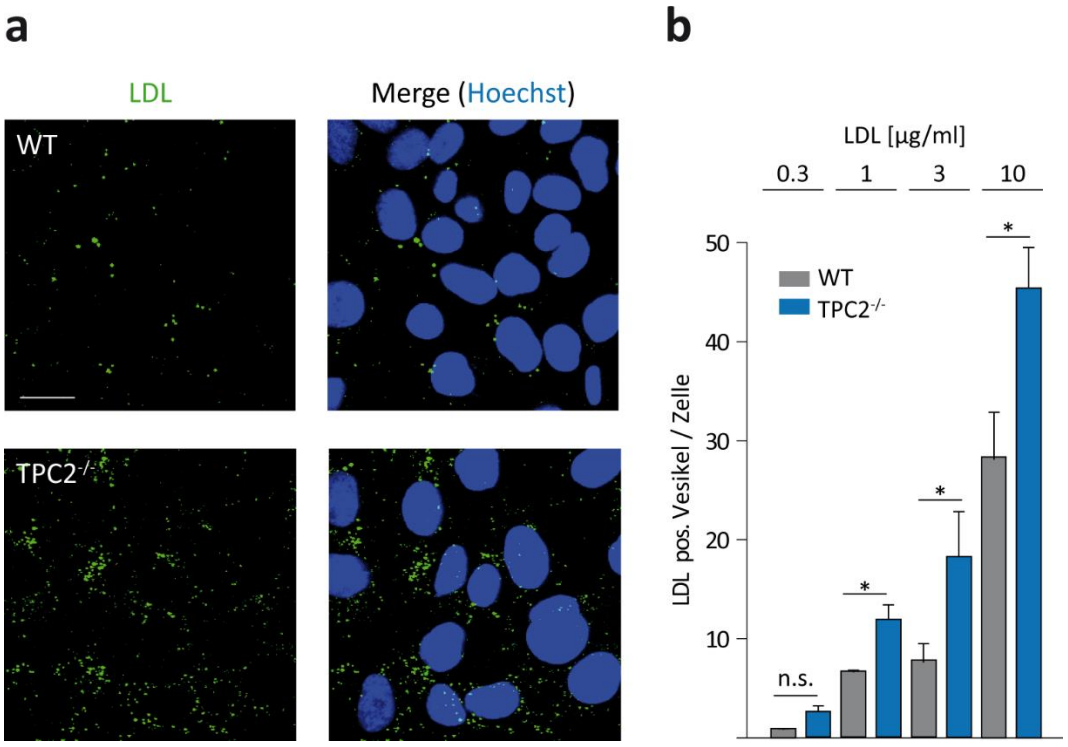

Abb.18 LDL akkumuliert in TPC2 defizienten MEF-Zellen

(a) Repräsentative Konfokalbilder von WT- und TPC2$^{-/-}$-MEFs, inkubiert mit 3 µg/ml LDL-BodipyFL. Zellkerne sind mit Hoechst (blau) gefärbt. (b) Durchschnittliche Anzahl LDL-positiver Vesikel nach einer halben Stunde Inkubation für unterschiedliche Konzentrationen an LDL. Mittelwert ± Standardfehler, *p < 0.05, n.s. nicht signifikant, Zweifache Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von Bonferroni's Post-hoc-Test.

Die Inkubation von MEF-Zellen mit LDL führt, ähnlich wie bei den EGF-Experimenten gezeigt, zu einer konzentrationsabhängigen Akkumulation des Liganden in TPC2$^{-/-}$-Zellen (Abb. 18). Dieser Befund ist aus zweierlei Hinsicht interessant. Zum einen erlaubt er den Transportdefekt durch den Verlust der TPC2-Kanalaktivität im endolysosomalen System zu generalisieren - dieser ist also unabhängig von der zu transportierenden Fracht. Zum anderen stellt die Akkumulation von LDL eine Verbindung zu weit verbreiteten Volkskrankheiten her. Die subintimale Akkumulation von LDL in Gefäßwänden gilt als Schüsselereignis in der Pathogenese der Atherosklerose und erhöhtes Serum-LDL ist einer der Hauptrisikofaktoren der Atherosklerose [38]. Neben dem kardiovaskulären Risiko korrelieren erhöhte Serum-LDL-Werte auch mit dem Risiko einer Nichtalkoholischen Fettlebererkrankung. Da Mäuse i. d. R. relativ resistent ggü. atherosklerotischen Veränderungen der Gefäßwand sind [39], wurden die *in vitro* gewonnen Erkenntnisse *in vivo* in der Leber auf ihre physiologische Relevanz getestet.

4.2.4 TPC2$^{-/-}$-Mäuse zeigen ein stark erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Fettleberhepatitis

Die physiologische Funktion von LDL ist der Transport von Cholesterol bzw. dessen Ester im Blut. Um die Bedeutung von TPC2 im LDL-Stoffwechsel *in vivo* zu untersuchen wurden deshalb WT- und TPC2$^{-/-}$-Mäuse 6 Wochen lang mit einer cholesterolreichen Diät (1.25%, w/w) gefüttert. Die Cholesterolaufnahme liegt bei dieser Diät ca. 20-30fach über dem durchschnittlichen Tagesbedarf [40] und aufgrund der *in vitro* beobachteten verringerten Transportreserve in TPC2$^{-/-}$-Zellen ist bei dieser Form der Belastung ein deutlicher Effekt zwischen WT- und KO-Mäusen zu erwarten.

Da ein Großteil des LDL-Stoffwechsels in der Leber stattfindet, hier also die größten Effekte zu erwarten sind, wurde zunächst die Expression von TPC2 in der Leber mittels Westernblot bestätigt (Abb. 19).

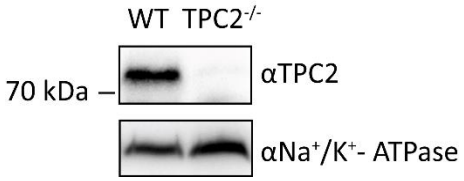

Abb. 19 Westernblot von TPC2 in murinem Lebergewebe

TPC2 wird in der murinen Leber exprimiert. Die erwartete Bande von ca. 84 kDa ist im WT, nicht aber in der TPC2$^{-/-}$-Leber detektierbar. Als Ladekontrolle diente die Na^+/ K^+-ATPase.

Die cholesterolreiche Diät führt in TPC2$^{-/-}$-Mäusen zu einem signifikanten Anstieg des Lebergewicht/Körpergewicht-Verhältnisses (Abb. 20a). Das Körpergewicht selbst hingegen zeigt zwischen WT- und KO-Mäusen keinen Unterschied, was für einen spezifischen Effekt im LDL-Stoffwechsel spricht. Makroskopisch zeigen 95% (n = 21) der TPC2$^{-/-}$-Lebern eine Farbveränderung von leicht bis stark gelblich. Nur ca. 5% der KO-Lebern sind unauffällig. Bei den WT-Mäusen hingegen sehen 76% der Lebern normal aus, 24% zeigen eine leichte Gelbfärbung (Abb. 20b).

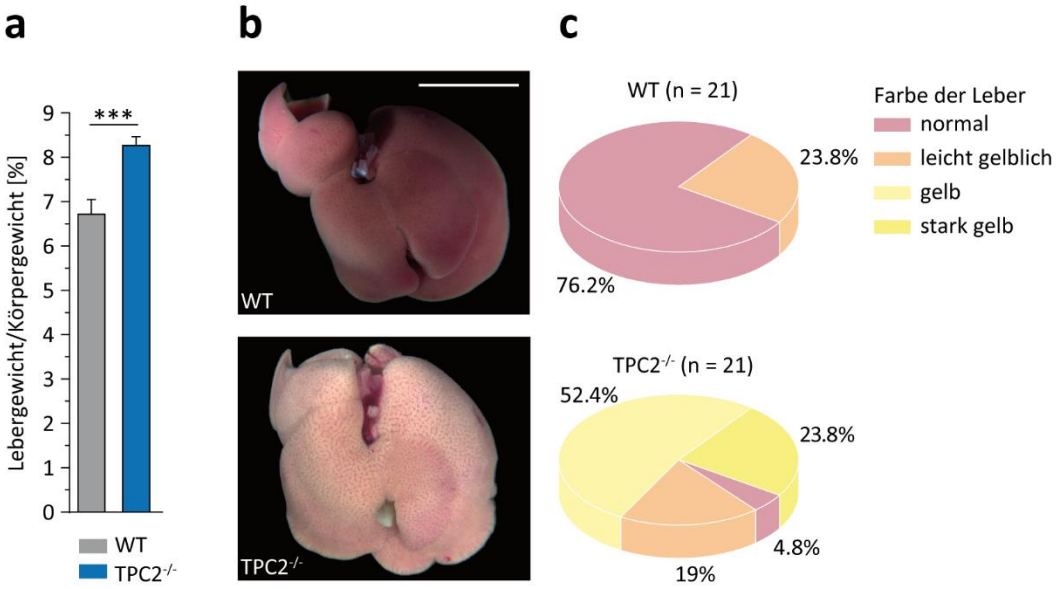

Abb. 20 Analyse von WT- und TPC2$^{-/-}$-Lebern

(a) Das Balkendiagramm zeigt das Lebergewicht/Körpergewicht-Verhältnis (in %) von WT- und KO-Mäusen, die über 6 Wochen mit einer cholesterolreichen Diät gefüttert wurden. ***p < 0.001, Zweifache Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von Bonferroni's Post-hoc-Test. (b) Exemplarische Lebern von 10-12 Wochen alten WT- und TPC2$^{-/-}$-Männchen nach 6 wöchiger Cholesteroldiät. Skalierung 10 mm. (c) Kuchendiagramme zeigen die Verteilung der farblichen Veränderung von WT- und TPC2$^{-/-}$-Mäusen nach der Cholesteroldiät. Daten von Dr. Christian Grimm.

Die starke Verfärbung der KO-Lebern deutet auf eine Fettinfiltration im Lebergewebe hin (Hepatosteatose). Tatsächlich offenbart die histologische Färbung von TPC2$^{-/-}$-Leberschnitten eine dramatische Akkumulation von Fettvakuolen, vornehmlich in periportalen Hepatozyten (Abb. 21a), was dem klinischen Bild einer Nichtalkoholischen Fettleberhepatitis gleicht. Diese ist histologisch ebenfalls durch eine mikrovesikuläre periportale Hepatosteatose gekennzeichnet. Die spezifische Färbung mit Filipin verdeutlicht die Ablagerung von freiem Cholesterol innerhalb der Fettvakuolen in TPC2$^{-/-}$-Lebern (Abb. 21b). Eine unabhängige gaschromatographische Bestimmung (in Kooperation mit Prof. Bracher, LMU) bestätigt den Anstieg von freiem Cholesterol in der Leber von KO-Tieren und zeigt zudem einen noch drastischeren Anstieg der Cholesterol-Ester (Daten nicht gezeigt).

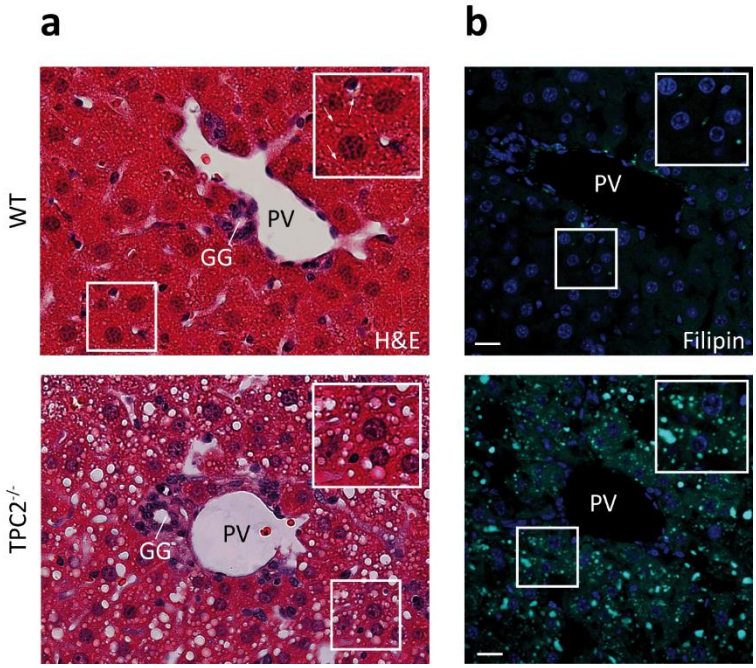

Abb. 21 Cholesterolakkumulation in WT- und TPC2$^{-/-}$-Lebern

(a) Repräsentative Bilder von Paraffinschnitten der Lebern aus WT- und TPC2$^{-/-}$-Mäusen nach der Cholesteroldiät, gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin (H&E), GG Gallengang, PV Portalvene, CV Zentralvene. (b) Filipinfärbung auf freies Cholesterol an Kryoschnitten von WT- und KO-Lebern. Skalierung 20 µm. Bilder von Dr. Christian Grimm.

Um die funktionellen Konsequenzen der Cholesterolakkumulation in der Leber zu untersuchen, wurde auf leberspezifische Enzyme im Blut getestet. Eine Erhöhung der Werte im Serum zeigt eine Zerstörung von Leberfunktionsgewebe an. In TPC2$^{-/-}$-Mäusen sind sowohl die Werte für GLDH (Glutamat Dehydrogenase) (49.4 ± 5.0 U/l; WT: 32.3 ± 4.8 U/l; $p < 0.05$), als auch für ALAT (Alanin Transaminase) (60.8 ± 7.7 U/l; WT: 34.9 ± 8.4 U/l; $p < 0.05$) im Vergleich zum WT signifikant erhöht, was den Verdacht einer durch die Fetteinlagerung bedingten nekrotischen Leberfunktionsstörung erhärtet.

Abschließend zeigen die Daten deutlich, dass TPC2$^{-/-}$-Mäuse im Vergleich zum WT eine signifikant verringerte LDL-Transportkapazität besitzen. Histologisch resultiert dies in einer erhöhten Akkumulation von Cholesterol in der Leber, was wiederum zu einer Leberfunktionsstörung führt, die sich in den erhöhten Serumwerten für GLDH und ALAT widerspiegelt. Zusammenfassend entsprechen die *in vivo* Befunde dem klinischen Bild einer Nichtalkoholischen Fettleberhepatitis.

4.2.5 TPC2 im Zentralen Nervensystem

Die Daten aus den Transport*assays* an MEF-Zellen und den *in vivo* Fütterungsversuchen demonstrieren eindrucksvoll die elementare Rolle der TPC2-Kanalaktivität im endolysosomalen Transport. Diese ist nicht beschränkt auf den Transport spezifischer Moleküle. Vielmehr zeigen die Versuche, dass TPC2 generell für den Degradationsweg vom frühen Endosom zum Lysosom notwendig ist. Das ubiquitäre Expressionsmuster von TPC2 [7] legt außerdem eine physiologische Funktion in weiteren Organsystemen nahe. Um dieser Frage nachzugehen, sollte die Rolle von TPC2 in einem weiteren Modellsystem untersucht werden. Idealerweise sollte sich dieses durch ausgeprägte endolysosomale Transportvorgänge auszeichnen, die gleichzeitig die Möglichkeit einer strukturierten Analyse bieten. Beide Anforderungen werden in nahezu einzigartiger Weise von Neuronen erfüllt. Im Bereich hoher Aktivität an der Synapse und entlang ihrer Zellfortsätze, den Axonen und Dendriten, finden kontinuierlich Transportvorgänge unter Einbeziehung des endolysosomalen Systems statt. Zudem lässt sich deren Dynamik aufgrund der „Zweidimensionalität“ der dünnen Zellfortsätze besonders gut analysieren lässt. In einem nächsten Schritt wurden deshalb die Konsequenzen des TPC2-KO in Neuronen und dem Zentralen Nervensystem (ZNS) untersucht.

Um die Rolle von TPC2 im ZNS zu analysieren wurde zunächst dessen Expression in verschiedenen Hirnregionen überprüft.

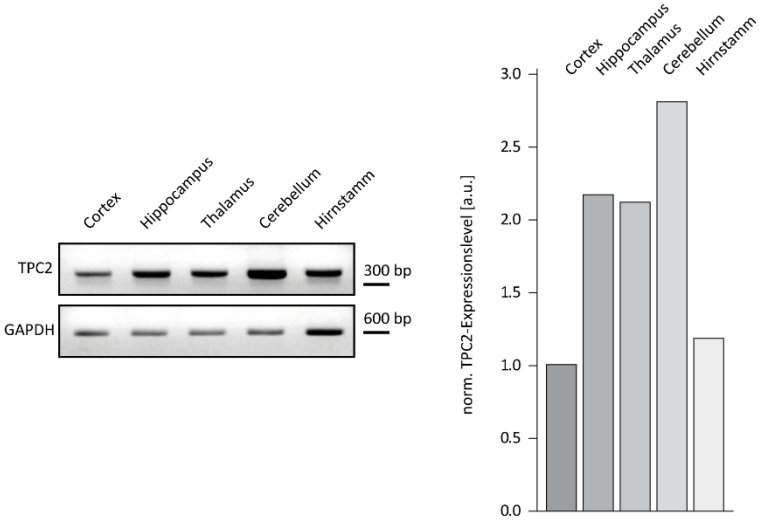

Abb. 22 Expression von TPC2 im ZNS

(links) cDNA des TPC2 Transkripts in verschiedenen Hirnregionen. Als Ladekontrolle wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. (rechts) Halbquantitative densitometrische Auswertung des Gels (ImageJ, Gel Analyzer Plugin). TPC2-cDNA-Level wurden auf GAPDH normalisiert. Nach dem Cerebellum ist die höchste Expression im Hippocampus zu finden. a. u. arbitrary unit

Das Transkriptsignal für TPC2 ist nach dem Kleinhirn am stärksten im Hippocampus (Abb. 22). Aufgrund dessen und der Tatsache, dass der Hippocampus ein gut etabliertes Modellsystem ist, wurde sich im weiteren Verlauf der Experimente auf diese Hirnregion konzentriert. Morphologisch zeigen Nisslfärbungen koronarer Kryoschnitte des Gehirns im Bereich des Hippocampus, aber auch in den übrigen Regionen, keine Auffälligkeiten oder Veränderungen zwischen WT- und TPC2$^{-/-}$-Mäusen (Abb. 23).

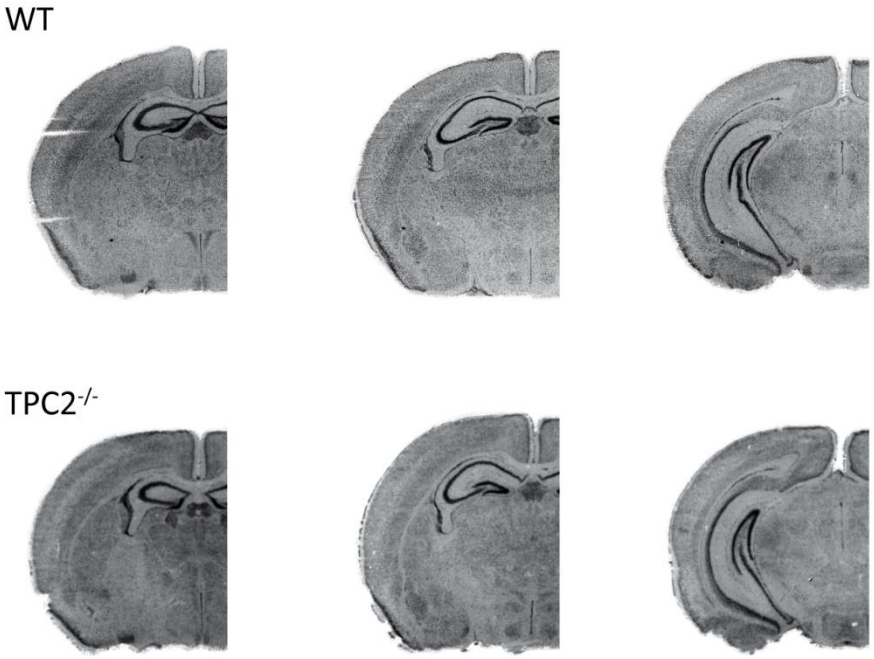

Abb. 23 Nisslfärbung von Hirnschnitten 7 Tage alter WT- und TPC2$^{-/-}$-Mäuse

40 µm dicke Gehirn-Kryoschnitte (rostral → caudal) wurden nach Nissl gefärbt. Sowohl im Hippocampus als auch in den übrigen Regionen sind keine offensichtlichen Anomalien zwischen WT- und TPC2$^{-/-}$-Mäusen zu erkennen.

4.2.6 Der Verlust von TPC2 führt zu einer erhöhten Frequenz spontaner exzitatorischer Neurotransmission im Hippocampus

Um zu testen, ob der Verlust von TPC2 funktionelle Auswirkungen im Hippocampus hat, wurden in Kooperation mit Oliver Griesbeck am Max-Planck-Institut, Martinsried, elektrophysiologische Messungen in hippocampalen Schnittpräparaten von WT- und TPC2$^{-/-}$-Mäusen durchgeführt. Die Ableitung in der CA1-Region (Abb. 24) zeigt dabei eine erhöhte Frequenz spontaner exzitatorischer Neurotransmitterfreisetzung (sog. miniature currents, mEPSC) in TPC2$^{-/-}$-Mäusen. Die Amplitude der postsynaptische Stromantwort der quantalen Neurotransmitterfreisetzung hingegen ist unverändert. Ebenso unverändert ist die Frequenz und Amplitude der inhibitorischen spontanen Neurotransmission (Daten nicht gezeigt).

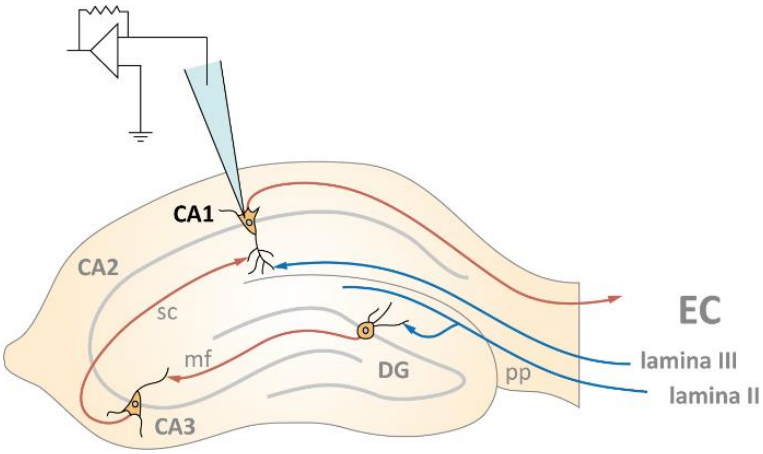

Abb. 24 Schematische Darstellung des Hippocampus und der elektrophysiologischen Ableitung in CA1

Die synaptische Verschaltung innerhalb des Hippocampus folgt einer trisynaptischen Schleife (rot), die drei Hauptzellgruppen unterschiedlicher Regionen umfasst: Granulazellen des Gyrus dentatus (DG), Pyramidalzellen der CA3-Region und Pyramidalzellen der CA1-Region. Input erhält der Hippocampus u. a. aus Schichten (II, III) des Entorhinalen Cortex (EC), dem sog. Tractus perforans (pp) (blau). Nach monosynaptischer (III → CA1) oder trisynaptischer Verschaltung (II → DG → CA3 → CA1) verlässt das Signal den Hippocampus über Axone von CA1-Pyramidalzellen. Die Messung der mEPSCs erfolgte an Zellsomata von Pyramidalzellen der CA1 Region. CA Corpus ammonis, DG Gyrus dentatus, mf Moosfasern, sc Schaffer Kollateralen.

Die beobachtete erhöhte Frequenz der spontanen exzitatorischen Neurotransmission in der CA1-Region des Hippocampus von TPC2$^{-/-}$-Mäusen bestätigt die Vermutung einer physiologischen Funktion von TPC2 im ZNS. Die unveränderte Amplitude spricht dabei für Veränderungen auf der präsynaptischen Seite in der KO-Maus [41].

Um die Ursache der veränderten Neurotransmission auf molekularer Ebene zu verstehen wurde die Primärkultur hippocampaler Neurone als Modellsystem etabliert (Abb. 25).

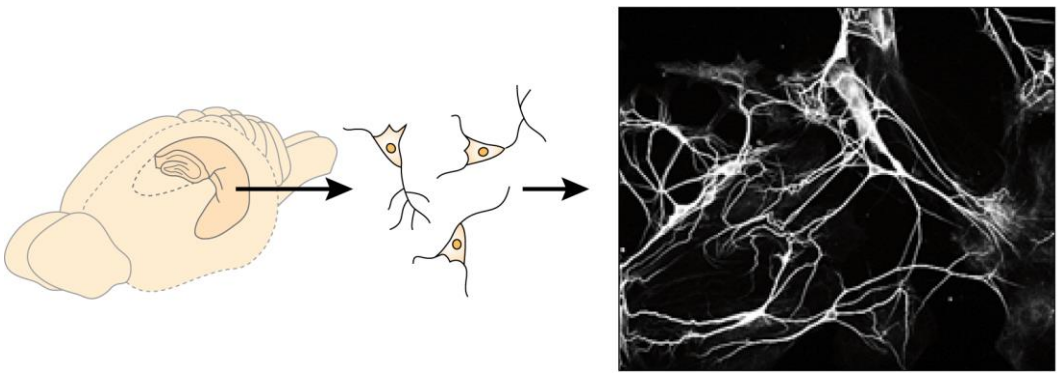

Abb. 25 Arbeitsschema zur Präparation dissoziierter primärer hippocampaler Neurone

Der Hippocampus neugeborener Mäuse (p0) wird isoliert, enzymatisch verdaut und dann mechanisch dissoziiert. Die Zellsuspension wird verdünnt und ausplattiert. (rechts) Exemplarisches Bild von WT-Neuronen an Tag 10 (div10). Die Zellen wurden immunzytologisch mit αMAP2 gefärbt um Dendriten zu visualisieren.

In der neuronalen Primärkultur werden Zellverbände dissoziiert und damit ursprüngliche neuronale Netzwerke zerstört. Der beobachtete Phänotyp im Schnittpräparat könnte jedoch die Folge solcher Netzwerkeffekte sein. Deshalb wurde zunächst überprüft, ob in der Primärkultur die erhöhte Neurotransmission erhalten bleibt. Tatsächlich zeigt die Messung der mEPSCs auch hier einen signifikanten Anstieg der Frequenz in TPC2$^{-/-}$-Neuronen (WT: 3.44 ± 0.5 Hz, TPC2$^{-/-}$: 8.05 ± 1.11 Hz, Abb. 26). Der Verlust von TPC2 führt im Neuron also zu Veränderungen bereits auf Einzelzellebene und kommt nicht erst auf Netzwerkebene zum Tragen.

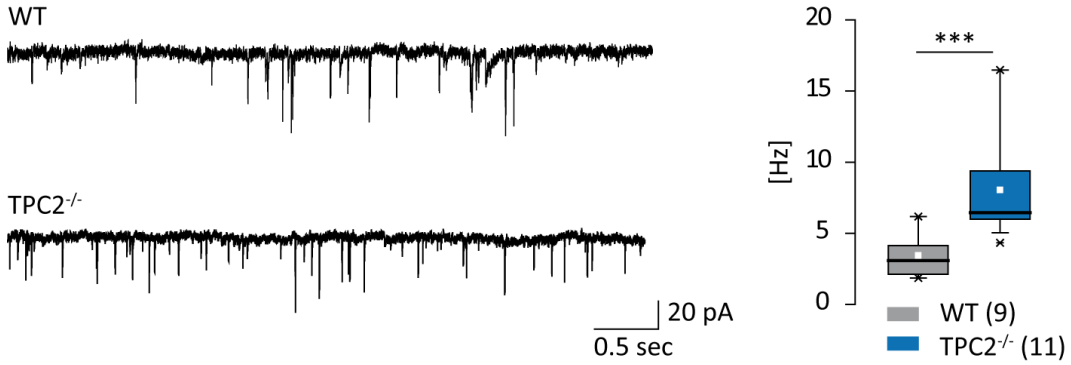

Abb. 26 Der Verlust von TPC2 führt zu einer erhöhten mEPSC-Frequenz in hippocampalen Neuronen

(links) Repräsentative Stromspuren der mEPSC-Messung in primären Neuronen. (rechts) Boxplot der mEPSC-Frequenz. Box: $Q_{0.75\text{-}0.25}$, Strich Median, weißes Quadrat Mittelwert, Whiskers: $Q_{0.95\text{-}0.05}$, Kreuz $Q_{0.99\text{-}0.01}$, Querstrich Minimum / Maximum, p*** < 0.001, zweiseitiger Student's t-Test. In Zusammenarbeit mit Xiangang Zong.

4.2.7 Der Knockout von TPC2 resultiert in einer Akkumulation und Beeinträchtigung des axonalen Transports später Endosomen

Aus den Experimenten an MEF-Zellen wissen wir bereits, dass der Knockout von TPC2 auf zellulärer Ebene zu einem gestörten Transport und einer Akkumulation im spätendosomal-lysosomalen System führt. Dem liegt höchstwahrscheinlich ein Defekt der calciumabhängigen vesikulären Fusion zugrunde, da durch den Verlust von TPC2-Kanalaktivität die Calciumfreisetzung aus dem Lysosom beeinträchtigt ist.

Zudem wissen wir aus den elektrophysiologischen Untersuchungen an hippocampalen Schnittpräparaten und Primärzellkulturen, dass glutamaterge TPC2$^{-/-}$-Neurone präsynaptisch eine erhöhte spontane Neurotransmitterfreisetzung zeigen.

Ein Grund für die erhöhte Frequenz der Neurotransmission kann eine erhöhte Anzahl synaptischer Vesikel sein [41]. Die Menge an verfügbaren synaptischen Vesikeln wird durch ein Gleichgewicht aus Neogenese von Vorläufervesikeln bzw. Recycling bereits synthetisierter Komponenten und Degradation bestimmt [42]. Die Degradation synaptischer Vesikel bzw. deren Proteine erfolgt entweder lokal an der Synapse über das Ubiquitin- / Proteasom-System, oder nach retrogradem Transport zum Zellsoma in Lysosomen [43]. Die detaillierten Abläufe sind bis heute jedoch nur unzureichend verstanden.

Führt man die obigen Überlegungen zusammen, ist eine mögliche Erklärung für den beobachteten Phänotyp, dass der Verlust von TPC2 auch im Neuron zu einem Transportdefekt zwischen spätem Endosom und Lysosom führt. Dies wiederum resultiert in einer verminderten Degradationsrate und verschiebt damit das Gleichgewicht an der Synapse zu einer vermehrten Zahl synaptischer Vesikel. Der vergrößerte *Pool* synaptischer Vesikel korreliert mit der Freisetzungswahrscheinlichkeit [44] und bedingt dadurch eine gesteigerte Frequenz der Neurotransmission (Abb. 27).

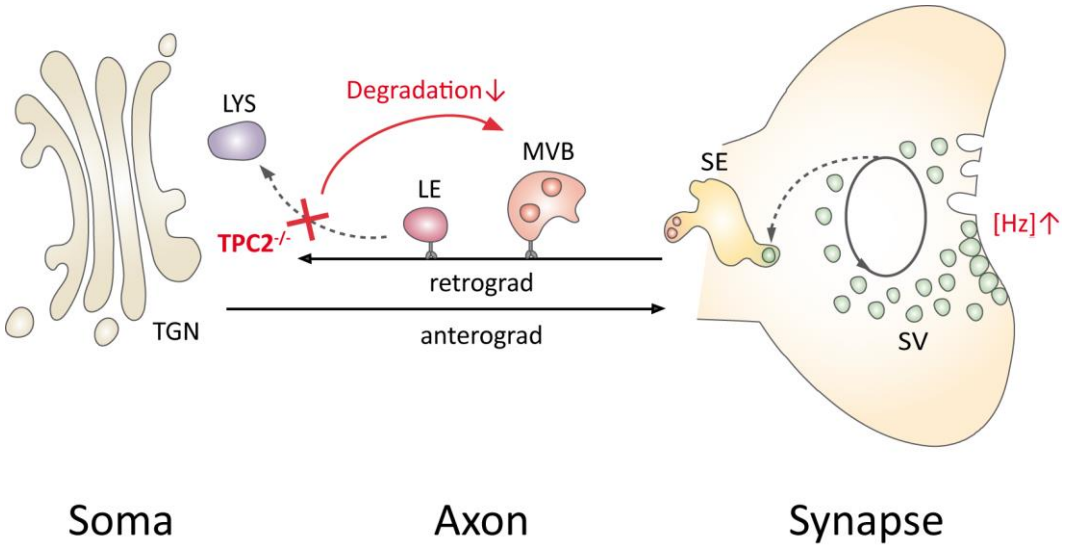

Abb. 27 Hypothetisches Modell zur TPC2-Funktion im Neuron

TPC2 stellt Calcium für die Fusion von späten Endosomen (LE) und Lysosomen (LYS) aus dem lysosomalen Lumen bereit. Ein Verlust von TPC2 führt zu einem Fusionsdefekt verbunden mit einem gestörten retrograden Transport und einer Akkumulation später Endosomen (LE) / Multivesicular Bodies (MVB) im Axon. Die verminderte Degradationsrate bewirkt an der Synapse eine Akkumulation synaptischer Vesikel (SV) mit einer erhöhten Freisetzungswahrscheinlichkeit und einem Anstieg der mEPSC-Frequenz.

Um diese Hypothese zu testen wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation von TPC2 in hippocampalen Neuronen untersucht. Coexpression von TPC2-EGFP mit Rab5-mKate2, einem Marker früher Endosomen, zeigt nur schwache Colokalisation (Abb. 28a). Im Gegensatz dazu zeigt sich eine starke Colokalisation mit dem lysosomalen Marker Lamp1-mKate2 (Abb. 28b).

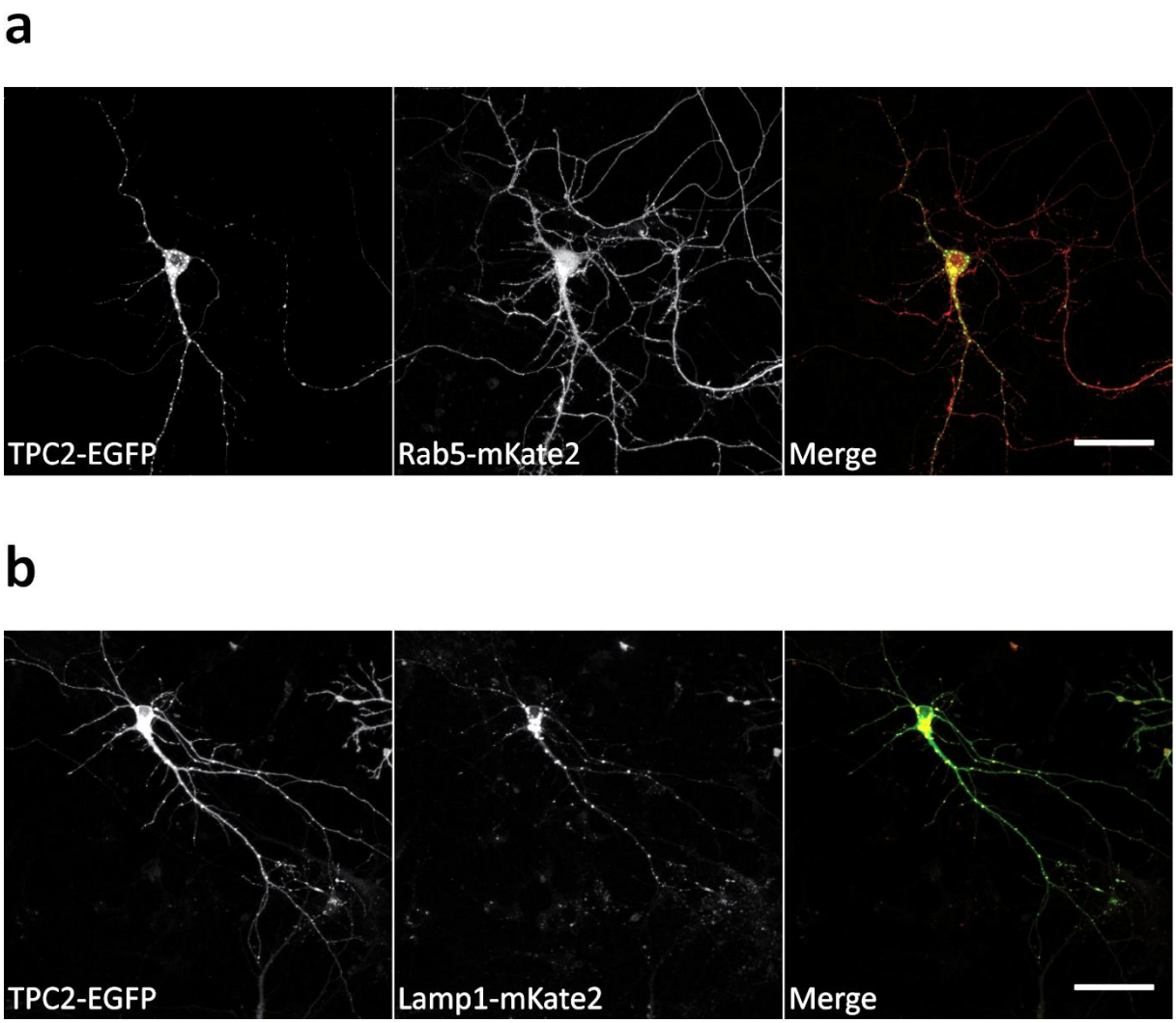

Abb. 28 Colokalisation von TPC2 mit Markern des endolysosomalen Systems in hippocampalen Primärneuronen

Coexpression von TPC2-EGFP (grünes Signal) mit Markern früher Endosomen (Rab5 mit mKate2-Tag, rot) (a) und Lysosomen (Lamp1 mit mKate2-Tag, rot) (b). Überlappung der Signale wird durch gelbe Farbe angezeigt (Merge). Skalierung 50 µm.

Die Coexpression von TPC2-EGFP mit löslichem mCherry als morphologischem Marker ermöglicht die Analyse der TPC2-Verteilung zwischen Soma, Dendrit und Axon. TPC2 lokalisiert hier hauptsächlich im Soma (Abb. 29, Insert). In deutlich geringerem Ausmaß findet man TPC2-positive Vesikel im Axon (Abb. 29, Pfeile) und in Dendriten. Die überwiegende Lokalisation von Lysosomen im Zellsoma von Neuronen wurde bereits früher beschrieben [45] und bestätigt die für TPC2 gefundenen Ergebnisse.

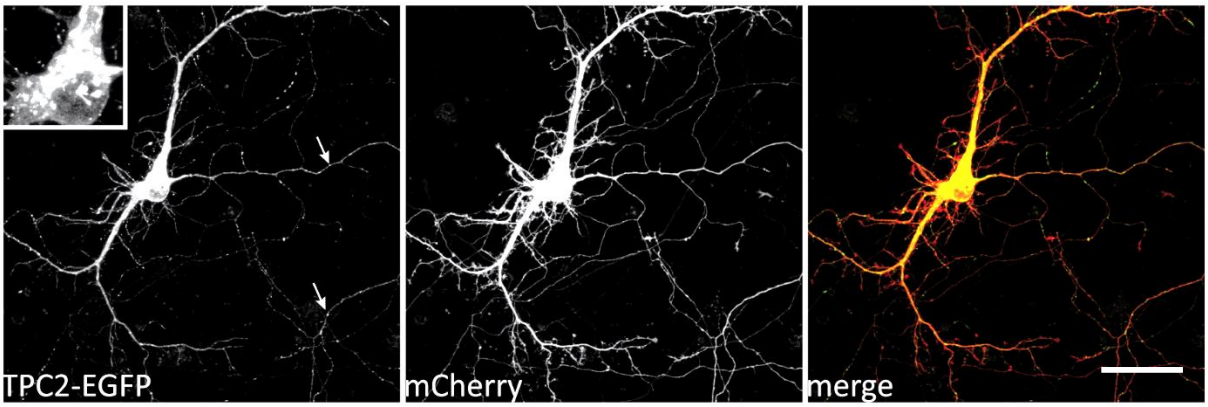

Abb. 29 TPC2 lokalisiert überwiegend im Zellsoma

TPC2-EGFP wurde mit mCherry in hippocampalen Neuronen coexprimiert. Das Insert im ersten Bild wurde bei geringerer Laserintensität und zeigt klar die perinucleäre vesikuläre Verteilung von TPC2. Die Expression von mCherry erlaubt die Unterscheidung zwischen Dendriten und Axonen anhand der Morphologie. TPC2 positive Vesikel finden sich sowohl in Axonen (Pfeile) als auch Dendriten, aber in deutlich geringerer Zahl im Vergleich zum Soma. Skalierung 50 µm.

Damit synaptische Proteine und Organellen im Lysosom degradiert werden können, müssen sie von der Synapse retrograd entlang des Axons zum Soma transportiert werden. Dem Transport vorgeschaltet ist eine in der Peripherie stattfindende Sortierung in späte Endosomen. Diese verfügen über das GTP-bindende-Protein Rab7, welches wichtig für den Dynein-abhängigen retrograden Transport dieser Organellen ist [43, 45, 46]. Um zu prüfen, ob der Knockout von TPC2 Auswirkungen auf diese Prozesse hat, wurden konfokale Zeitrafferaufnahmen der Transportdynamik entlang des Axons von WT- und KO-Neuronen angefertigt. Der dünne, tubusförmige Aufbau des Axons ermöglicht auf einzigartige Weise eine strukturierte Analyse der einzelnen Vesikelbewegungen in Echtzeit. Durch den *Plot* der resultierenden, mittels Software linearisierten, Axonaufnahmen direkt untereinander, erhält man Kymogramme, die die gesamte Transportdynamik in einem Bild vereinen und die Analyse verschiedenster Parameter wie Transportrichtung, Geschwindigkeit, Größe oder Zahl einzelner Vesikel erlaubt (Abb. 30). Für die Analyse der Transportdynamik später Endosomen im Axon wurde fluoreszenzmarkiertes Rab7 in KO- und WT-Neuronen überexprimiert und konfokale Zeitrafferaufnahmen in Kymogrammen dargestellt und ausgewertet.

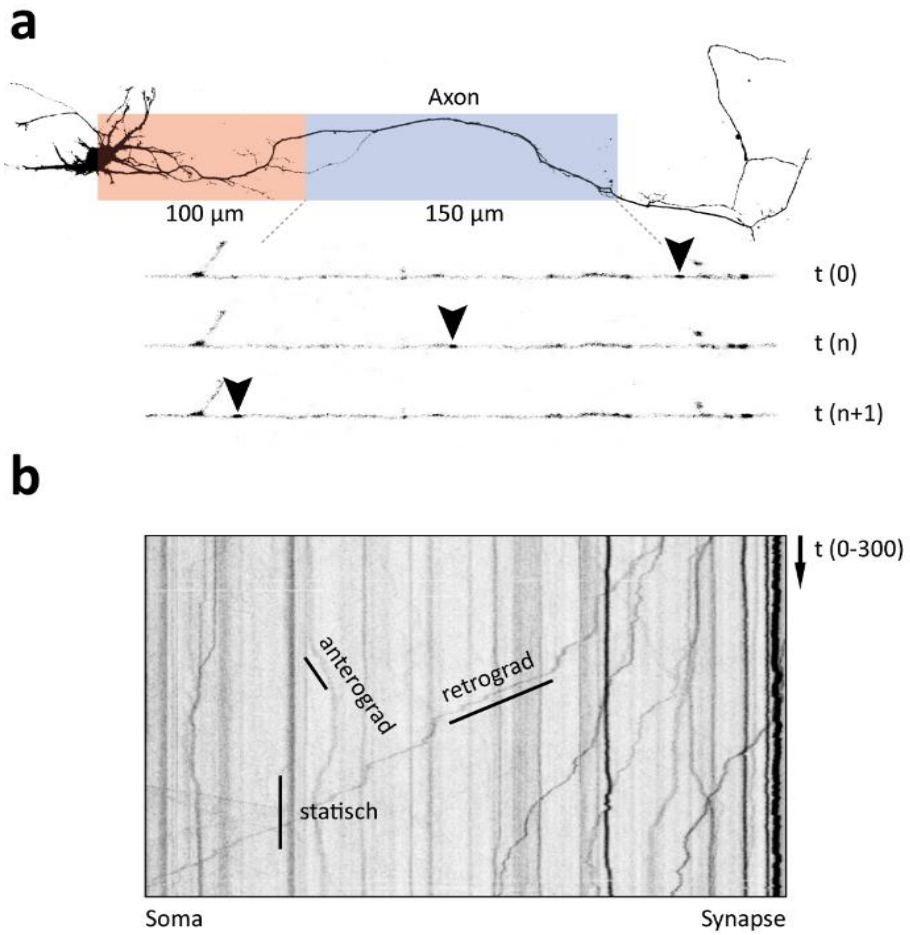

Abb. 30 Arbeitsschema zur Erstellung eines Kymogramms

(a) Rab7-EGFP wurde in hippocampalen Neuronen exprimiert. Konfokale Zeitrafferaufnahmen eines 150 µm langen Axonabschnitts, ca. 100 µm vom Zellsoma entfernt, wurden über 5 min mit 1 Hz aufgenommen. Die Position eines Rab7-positiven Vesikels im Axon zu drei verschiedenen Zeitpunkten ist abgebildet (Pfeilköpfe) und lässt die retrograde Bewegung erkennen. (b) Exemplarisches Kymogramm. 300 linearisierte Axonaufnahmen aufeinanderfolgender Zeitpunkte wurden direkt untereinander *geplottet*. Retrograde Bewegung (Synapse → Soma) ist durch Linien von rechts oben nach links unten angezeigt, anterograde (Soma → Synapse) durch Linien von links oben nach rechts unten und statische Vesikel durch vertikale Linien.

Die Kymogramme bestätigen im WT die für späte Endosomen charakteristische Dominanz des retrograden Transportweges über den anterograden [45]. In TPC2$^{-/-}$-Neuronen zeigen sie jedoch eine deutliche Reduktion der Transportdynamik (Abb. 31a). Die statistische Auswertung belegt dies mit einem prozentualen Anstieg statischer Vesikel zu Lasten der retrograden Fraktion im KO (Abb. 31b). Da aber auch die absolute Gesamtzahl Rab7-positiver Vesikel im KO signifikant erhöht ist (Abb. 31c, links), stellt sich die Frage ob die prozentuale Verringerung des retrograden Transports einen Transportdefekt anzeigt - in diesem Falle müsste auch die absolute Anzahl retrograd transportierter Vesikel erniedrigt sein –, oder ob sie aus der gestiegenen Zahl statischer Vesikel resultiert, also für einen

Akkumulationsphänotyp spricht. Die Auswertung der absoluten Vesikelzahlen in den drei Fraktionen (anterograd, retrograd und statisch) zeigt, dass sowohl eine signifikante Reduktion retrograder Vesikel, als auch ein signifikanter Anstieg der statischen Vesikel vorliegen (Abb. 31c, rechts). Demnach bedingt der TPC2-KO neben der Akkumulation später Endosomen auch eine Beeinträchtigung der Transportkapazität.

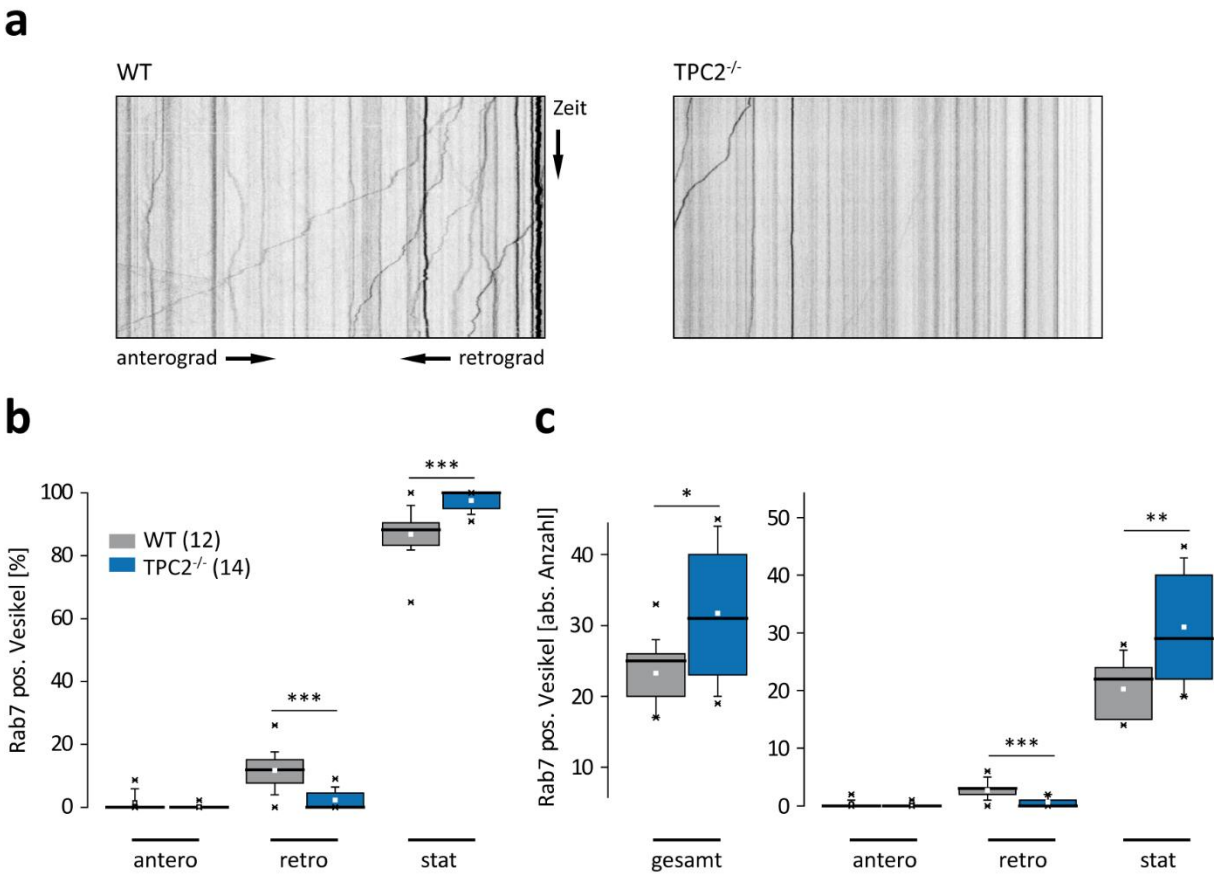

Abb. 31 TPC2$^{-/-}$-Neurone zeigen einen retrograden Transportdefekt und eine Akkumulation später Endosomen im Axon

(a) Repräsentative Kymogramme des axonalen Transports von Rab7-EGFP in hippocampalen Neuronen von WT- und KO-Mäusen, Wegstrecke 150 µm, Zeit 300 s. (b) Boxplot der relativen Verteilung der Bewegungsrichtung (anterograd, retrograd, statisch) Rab7 positiver Vesikel aus den Experimenten in (a). (c) Gesamtzahl Rab7 positiver Vesikel über den Zeitraum einer Messung in (a) und fraktionelle Anteile der Bewegungsrichtung in absoluter Vesikelzahl. ***p < 0.001, **p < <0.01, *p < 0.05, zweiseitiger Student's t-Test, Box: $Q_{0.75\text{-}0.25}$, Strich Median, weißes Quadrat Mittelwert, Whiskers: $Q_{0.95\text{-}0.05}$, Kreuz $Q_{0.99\text{-}0.01}$, Querstrich Minimum / Maximum.

Um auszuschließen, dass dem beobachteten Phänotyp ein genereller Transportdefekt im Axon zugrunde liegt, wurde als Kontrolle der Transport von Mitochondrien untersucht. Mitochondrien werden im Axon sowohl retrograd als auch anterograd transportiert [47], die

statistische Auswertung der Kymogramme zeigt dabei aber keine Unterschiede zwischen WT- und TPC2$^{-/-}$-Neuronen (Abb. 32).

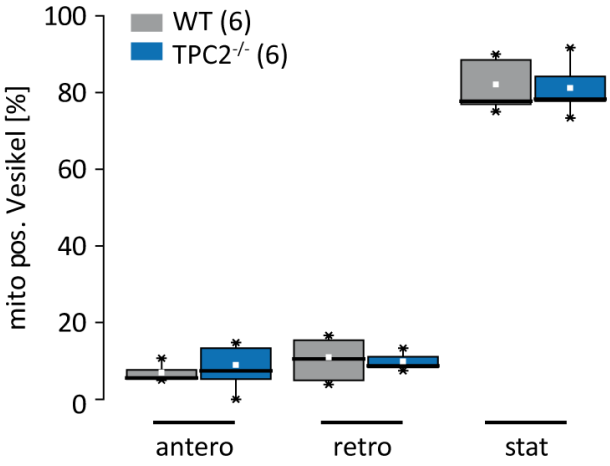

Abb. 32 Der axonale Transport von Mitochondrien ist intakt in TPC2$^{-/-}$-Zellen

Boxplot der relativen Verteilung der Bewegungsrichtung (anterograd, retrograd, statisch) mKate2-mito positiver Vesikel. Messbedingungen wie in Abb. 31a. Box: $Q_{0.75\text{-}0.25}$, Strich Median, weißes Quadrat Mittelwert, Whiskers: $Q_{0.95\text{-}0.05}$, Kreuz $Q_{0.99\text{-}0.01}$, Querstrich Minimum / Maximum.

Die Beeinträchtigung des axonalen Transports ist also spezifisch für das endolysosomalen System. Die Akkumulation später Endosomen kann dabei die Folge gestörter Fusionsprozesse mit Lysosomen sein, oder aus einer beeinträchtigten Degradationskompetenz des Lysosoms resultieren. Um letzteren Punkt zu adressieren wurde die Prozessierung der lysosomalen Endoprotease Cathepsin D (CatD) im Hippocampus untersucht. CatD wird normalerweise vom TGN als unprozessiertes Vorläuferprotein ins Lysosomen transportiert und erst im lysosomalen Lumen durch saure Hydrolasen in seine aktive Form überführt. Jede Änderung des Prozessierungsmusters kann als Indiz für eine gestörte lysosomale Reifung und Funktion gewertet werden [45]. Die quantitative Bestimmung der unterschiedlichen Reifeformen von CatD mittels Westernblot zeigt jedoch keine Unterschiede zwischen WT- und KO-Mäusen (Abb. 33). Das Lysosom ist demnach generell in der Lage Makromoleküle zu verarbeiten weshalb die Akkumulation der späten Endosomen im Axon wahrscheinlich auf einen Fusionsdefekt zwischen den Organellen zurückzuführen ist.

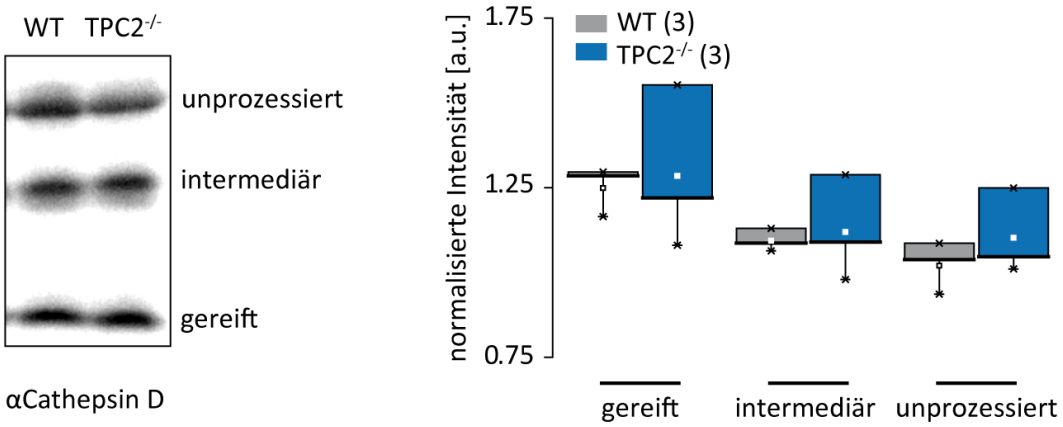

Abb. 33 Cathepsin D-Prozessierung in Hippocampi von WT- und TPC2$^{-/-}$-Mäusen

(links) Exemplarischer Westernblot von Cathepsin D, isoliert aus Hippocampi von WT- und KO-Mäusen. Sichtbar sind die verschiedenen Prozessierungsstufen, die Cathepsin während seiner Reifung durchläuft. (rechts) Statistische Auswertung der rel. Bandenintensitäten zwischen WT und KO. Die einzelnen Banden wurden auf die Intensität von GAPDH (nicht abgebildet) des gleichen Blots normalisiert. Zweiseitiger Student's t-Test, Box: $Q_{0.75\text{-}0.25}$, Strich Median, weißes Quadrat Mittelwert, Whiskers: $Q_{0.95\text{-}0.05}$, Kreuz $Q_{0.99\text{-}0.01}$, Querstrich Minimum / Maximum.

4.2.8 Makroautophagie in TPC2$^{-/-}$-Mäusen

TPC2 wurde kürzlich aufgrund seiner Aktivierung durch NAADP im Zusammenhang mit der Regulation von Makroautophagie im ZNS diskutiert [48, 49]. Makroautophagie beinhaltet, ähnlich wie der endolysosomale Transport, einen finalen Fusionsschritt von Autophagosomen ins Lysosom [50]. Tatsächlich konnten im massenspektrometrischen *Screen* mit Arl8b und Vamp3 Proteine identifiziert werden, die im Rahmen von lysosomalem *Trafficking* und Autophagie bereits beschrieben wurden [31, 51]. Aus diesem Grund sollte die autophagosomale Reifung im Hippocampus anhand der Prozessierung von LC3 überprüft werden. LC3 gilt als etablierter Marker um Autophagie zu detektieren [52]. Nach der Translation wird das LC3-Vorläuferprotein (proLC3) zunächst proteolytisch zum zytosolischen LC3I gespalten. Sobald die Zelle Autophagie induziert, wird LC3I durch Hinzufügung eines lipophilen Phosphatidylethanolamin-Ankers zu LC3II prozessiert. Dieses integriert spezifisch in die Membran von neu geformten Autophagosomen. Bestimmt man das Verhältnis von LC3II/LC3I zeigt ein Anstieg des Quotienten die Induktion von Autophagie an. Da Autophagosomen nach ihrer Formation mit Lysosomen fusionieren, um dort abgebaut zu werden, übersteigt das Verhältnis unter physiologischen Bedingungen einen gewissen Wert nicht. Ein extremer Anstieg ist aber zu erwarten, wenn die lysosomale Funktion bzw. die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen gestört ist. Aus diesem Grund wurde der

Quotient im Hippocampus von p7 WT- und KO-Mäusen untersucht. Um Autophagie zu induzieren, wurden die Tiere für 24 h vor der Proteinisolation ausschließlich mit Wasser versorgt. Die Analyse des Quotienten mittels Westernblot zeigt einen Anstieg der LC3-II Menge im Vergleich zu Kontrolltieren, die nicht gefastet hatten, was die Induktion der Autophagie in der Fastengruppe bestätigt (Daten nicht gezeigt). Innerhalb der Gruppe ergab sich ein Trend zu höheren LC3II/LC3I-Werten im KO, dieser erreichte jedoch kein Signifikanzniveau (Abb. 34). Eine Beeinträchtigung der autophagosomalen Clearance ist damit nicht vollkommen auszuschließen. Eine dominierende Rolle in der Genese des neuronalen Phänotyps der KO-Maus lassen die LC3-Ergebnisse aber nicht zu. Dennoch sollten Experimente mit weiteren Markern die Funktion der Autophagie in Neuronen TPC2-defizienter Mäuse genauer evaluieren.

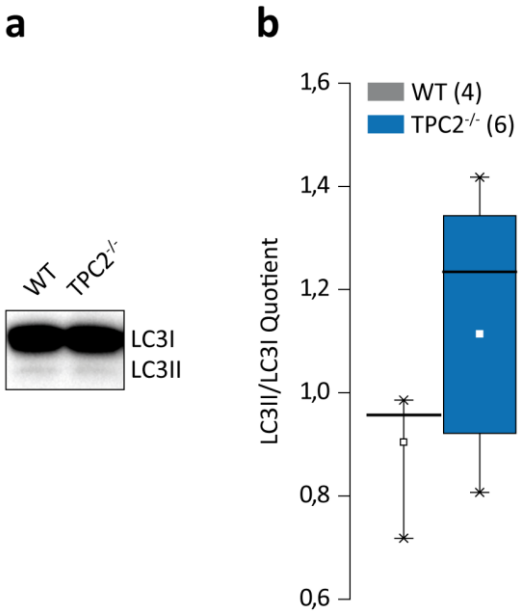

Abb. 34 LC3-Prozessierung in TPC2$^{-/-}$-Hippocampi

(a) Exemplarischer Westernblot von LC3 aus WT- und KO-Hippocampi. p7 alte Mäuse wurden 24 h lang gefastet um Autophagie zu induzieren. LC3 zeigt im Blot zwei Signale: die elektrophoretisch langsamere, höhere LC3I-Bande und das mit einem Phosphatidylethanolamin-Anker versehene schnellere LC3II als untere Bande. Der Quotient aus LC3II/LC3I gibt Aufschluss über den Autophagosomalen Flux. (b) Statistische Auswertung der LC3II/LC3I Quotienten in WT- und KO-Mäusen. KO-Mäuse zeigen einen Anstieg des Quotienten, der aber kein Signifikanzniveau erreicht. Zweiseitiger Student's t-Test, Box: $Q_{0.75\text{-}0.25}$, Strich Median, weißes Quadrat Mittelwert, Whiskers: $Q_{0.95\text{-}0.05}$, Kreuz $Q_{0.99\text{-}0.01}$, Querstrich Minimum / Maximum.

Zusammenfassend sprechen der Transportdefekt und die Akkumulation später Endosomen in Axonen hippocampaler Neurone für die Hypothese, dass ein Fusionsdefekt zwischen späten

Endosomen und Lysosomen am Zellsoma zu einem retrograden Stau des Degradationsweges führen. Dieser Stau wiederum verschiebt das Gleichgewicht an der Synapse hin zu einer Vergrößerung des synaptischen Pools, der die erhöhte Neurotransmission erklären könnte. Aufbauend auf den bisherigen Ergebnissen müssen jedoch weitere funktionelle und morphologische Experimente die Gültigkeit dieser Hypothese zeigen.

4.2.9 Hippocampus-abhängiges Lernen in TPC2$^{-/-}$-Mäusen

Um zu klären, ob die veränderte Neurotransmission in TPC2$^{-/-}$-Mäusen Auswirkungen auf das Hippocampus-abhängige räumliche Lernen hat, wurden Verhaltensversuche in einer modifizierten Form des Tolman-Labyrinths [27] mit WT- und KO-Mäusen durchgeführt (Abb. 35). Dabei konnte keine Veränderung des räumlichen Lernens zwischen WT- und KO-Mäusen festgestellt werden. Beide Gruppen zeigen in den jeweiligen Testläufen am Ende der Lernphase in Woche 1 und der reversen Lernphase in Woche 2 nahezu die gleiche Präzision bei der Suche nach der Plattform (Abb. 35b, Balkendiagramme). Beide Gruppen sind also in der Lage, den Ort einer versteckten Plattform neu zu erlernen, umzulernen und in gleichem Maße auch wieder abzurufen. Betrachtet man jedoch die Latenz, also die Zeit, die die Mäuse brauchen um vom Startpunkt zu der Plattform zu schwimmen, zeichnet sich beim KO in der Trainingsphase ein Trend zu schnelleren Zeiten hin ab, der teilweise Signifikanzniveau erreicht (Abb. 35b). Dies kann mit dem Hippocampus-abhängigen Lernen korrelieren, kann jedoch auch eine Vielzahl von anderen Gründen haben, z. B. psychomotorisch bedingt sein. Bedenkt man die ubiquitäre Expression von TPC2 ist eine veränderte Neurotransmission auch in anderen Bereichen nicht unwahrscheinlich, weshalb eine breitere funktionelle Analyse in anderen Hirnregionen, sowie weitere Verhaltensversuche notwendig sind, um hier eine eindeutige Aussage treffen zu können.

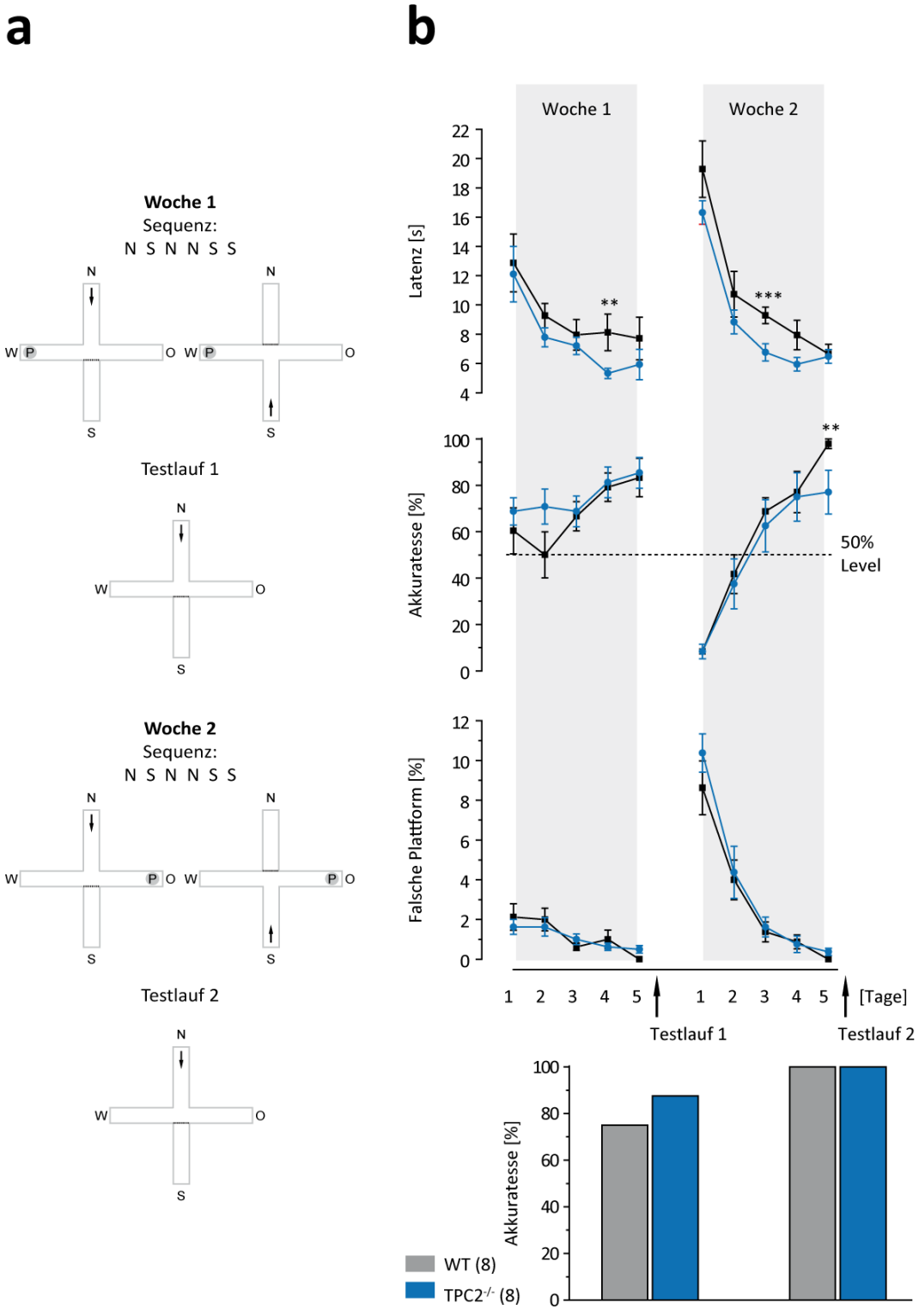

Abb. 35 Räumliches Lernen von TPC2$^{-/-}$- und WT-Mäusen

(a) Versuchsaufbau zur Untersuchung des räumlichen Lernens. Verwendet wurde ein kreuzförmiges Wasserbecken. Der nördliche (N) bzw. südliche (S) Arm kann durch eine Plexiglasbarriere versperrt werden. Zwei Wochen lang wurden die Mäuse jeweils fünf Tage trainiert, wobei pro Tag 6 Durchläufe mit zufällig alternierendem Startpunkt (s. Sequenz) durchgeführt wurden. Die versteckte Plattform befand sich in der ersten Woche immer im Westen (W), während der zweiten Woche im Osten (O). Während der Trainingsphase wurden Latenzzeit, Akkuratesse und die Wahl des falschen Arms (falsche Plattform) aufgezeichnet (b). Am Ende jeder Woche wurde ein Testlauf ohne Plattform durchgeführt und geprüft, ob sich die Maus für den jeweils richtigen Arm entscheidet (b, Balkendiagramm). Punktdiagramm: Mittelwert ± Standardfehler, ***p < 0.001, **p < <0.01, zweiseitiger Student's t-Test.

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass TPC2 eine wichtige Rolle in der Regulierung des endolysosomalen Transports spielt. Der Verlust von TPC2 führt im Zellmodell, nach Belastung des Degradationsweges vom Endosom zum Lysosom, zu einer Akkumulation von Makromolekülen innerhalb der Zelle und lässt auf eine verminderte Transporttoleranz schließen. In $TPC2^{-/-}$-Mäusen resultiert dies zum einen in einer Akkumulation von freiem Cholesterol und dessen Ester in Hepatozyten und manifestiert sich im klinischen Bild einer Nichtalkoholischen Fettleberhepatitis. Zum anderen liefert diese Arbeit erste Evidenz, dass der Verlust von TPC2 im ZNS zu funktionellen Veränderungen im axonalen Transport führt, was u. a. eine erhöhte spontane Neurotransmission glutamaterger Neurone im Hippocampus bewirkt.

5.1.1 Die Rolle von TPC2 im endolysosomalen System

Wie ist TPC2 als Ionenkanal funktionell in den endolysosomalen Transport involviert? Die elektrophysiologischen Messungen an Lysosomen, isoliert aus WT- und $TPC2^{-/-}$-MEF-Zellen, belegen die Aktivierung des Kanals durch NAADP und $PI(3,5)P_2$. $PI(3,5)P_2$ zeigt entlang des endolysosomalen Degradationsweges einen Konzentrationsgradienten, der sein Maximum in späten Endosomen / Lysosomen erreicht [53, 54]. Im Bereich geringer $PI(3,5)P_2$-Konzentrationen ist TPC2 demnach geschlossen und würde erst mit der sukzessiven Reifung zu späten Endosomen hin öffnen. Für dieses Modell spricht neben der Aktivierung durch $PI(3,5)P_2$ auch die Tatsache, dass TPC2 bei höheren luminalen pH-Werten inaktiviert [9]. Die Öffnung von TPC2 könnte dann die finale Fusion zwischen späten Endosomen und Lysosomen vermitteln. Die Experimente an MEF-Zellen zeigen, dass der vesikuläre Transport im endolysosomalen Degradationsweg sowohl freies Ca^{2+} als auch TPC2-vermittelte Ionenströme benötigt. Die naheliegendste Interpretation dieser Ergebnisse ist, dass Ca^{2+} direkt durch TPC2-Kanäle bereitgestellt wird. In früheren Arbeiten konnte die Ca^{2+}-Leitfähigkeit für TPC2 bereits gezeigt werden [7-9] und Messungen an WT-Lysosomen aus MEF-Zellen zeigen unter biionischen Bedingungen für I_{NAADP} ein Permeabilitätsverhältnis $Na^+ : Ca^{2+} : K^+$ von 2 : 1 : 0.003 (interne Kommunikation mit Cheng-Chang Chen). Eine Aktivierung von TPC2 könnte daher

durch einen Efflux von Ca^{2+} aus dem lysosomalen Lumen in Bereichen zytosolischer Mikrodomänen zu Stande kommen. Dieser Vorgang würde um das Lysosom ausreichend hohe Ca^{2+}-Konzentrationen erzeugen, sodass Ca^{2+}-abhängige Fusionsproteine, die sich in unmittelbarer Nähe zum Kanal befinden, aktiviert würden (Abb. 36, Abb. 37a). Die Idee, dass TPC2 mit Proteinen des Fusionsapparates in Mikrodomänen innerhalb der lysosomalen Membran arrangiert ist, wird durch die Ergebnisse aus dem massenspektrometrischen Interaktions*screen* für TPC2 gestützt. Hier wurde mit dem zytosolischen Faktor NSF und den SNARE-Proteinen Stx7, Vti1b , Vamp7 fast der komplette Fusionsapparat für die Fusion zwischen späten Endosomen und Lysosomen identifiziert (Tab. 1) [55]. Der genaue Aktivierungsmechanismus von TPC2 im Rahmen konstitutiver Transport- und Fusionsprozesse im endolysosomalen System wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Wichtig wäre zu klären, welche Rolle $PI(3,5)P_2$ und NAADP jeweils dabei spielen. Die Stromantwort nach Aktivierung durch $PI(3,5)P_2$ zeigt in $TPC2^{-/-}$-Lysosomen deutlich größere Residuenströme im Vergleich zur NAADP-Antwort (Abb. 12). Dies ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf die gleichzeitige Aktivierung von TRPML1, einen weiteren lysosomalen Ionenkanal, durch $PI(3,5)P_2$ zurückzuführen [56]. NAADP zeigt bzgl. der Aktivierung von TPC2 gegenüber $PI(3,5)P_2$ also eine deutlich höhere Selektivität. Wie NAADP synthetisiert und metabolisiert wird ist im Detail noch nicht geklärt. Eine Reihe von NAADP-abhängigen intrazellulären Ca^{2+}-Signalen in unterschiedlichen Zellen wurden beschrieben, darunter auch in Neuronen und Hepatozyten (siehe Review von Galione, 2014 [57]). Wie diese in endolysosomale Transportvorgänge eingebunden sind, müssen zukünftige Experimente zeigen.

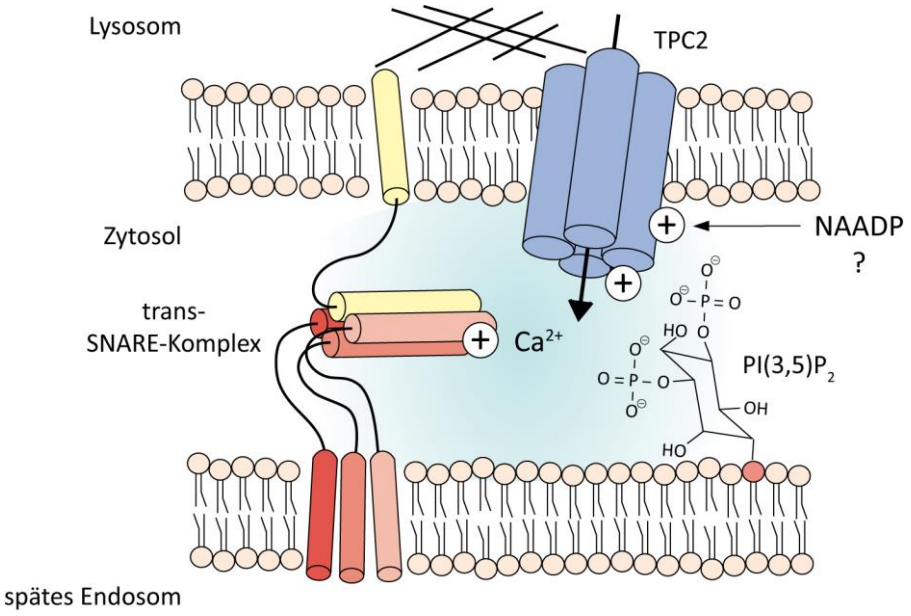

Abb. 36 Modell der Organisation von TPC2-Kanälen und SNARE-Proteinen der Fusionsmaschinerie in Mikrodomänen mit enger räumlicher Vernetzung

TPC2-Kanäle werden bei ausreichender räumlicher Nähe von späten Endosomen und Lysosomen durch $PI(3,5)P_2$ in der Membran von späten Endosomen aktiviert. Die Aktivierung führt zu einem TPC2-vermittelten Ca^{2+}-Ausstrom aus Lysosomen. Bereits formierte trans-SNARE Komplexe, die mit TPC2 in Mikrodomänen dicht beieinander arrangiert sind, werden durch die gestiegene Ca^{2+}-Konzentration aktiviert, und vermitteln daraufhin die Membranfusion von späten Endosomen und Lysosomen. Welche Rolle die Aktivierung durch NAADP bei diesen Prozessen spielt müssen zukünftige Experimente zeigen.

Ein anderes Szenario für die TPC2-vermittelte Membranfusion wurde kürzlich von Wang *et al.* postuliert [16]. Aufgrund der Leitfähigkeit von TPC2 für Na^+, könnte die Depolarisation durch den Na^+-Efflux nach TPC2-Aktivierung die Membranfusion aufgrund elektrostatischer Anziehung der gegenseitig geladenen Membranen vermitteln (Abb. 37b). Auf Basis einer biochemischen Gradientenaufreinigung von Lysosomen und anschließender Quantifizierung der relativen Verhältnisse der lysosomalen Ionenpopulationen mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma, kommen die Autoren zu dem Schluss, dass Na^+ das dominierende Ion im lysosomalen Lumen ist. Außerdem zeigen ihre Messungen unter biionischen Bedingung eine Permeabilitätsverhältnis $Na^+ : Ca^{2+}$ von 100. Aufgrund des hohen Konzentrationsgradienten von Na^+ über die lysosomale Membran und der höheren Selektivität für Na^+, sehen die Autoren einen physiologischen Beitrag von TPC2 zur lysosomalen Ca^{2+}-Freisetzung als unwahrscheinlich an. Legt man jedoch deren Kalkulationen zu Grunde, besteht für Ca^{2+} ein Konzentrationsgradient zwischen Lysosom und Zytosol von ca. 15 000. Selbst bei der höheren Selektivität für Na^+ bedeutet dies eine enorme Triebkraft für Ca^{2+}. In Analogie zu NMDA-Rezeptoren des Neurons kommt dies funktionell einer

depolarisierenden Hauptstrom-Komponente durch Na^+ und einer kleineren Stromkomponente gleich, die durch Ca^{2+} getragen wird und deshalb durchaus wichtige nachgeschaltete Signalprozesse (z. B. SNARE-Aktivierung) induzieren kann [58].

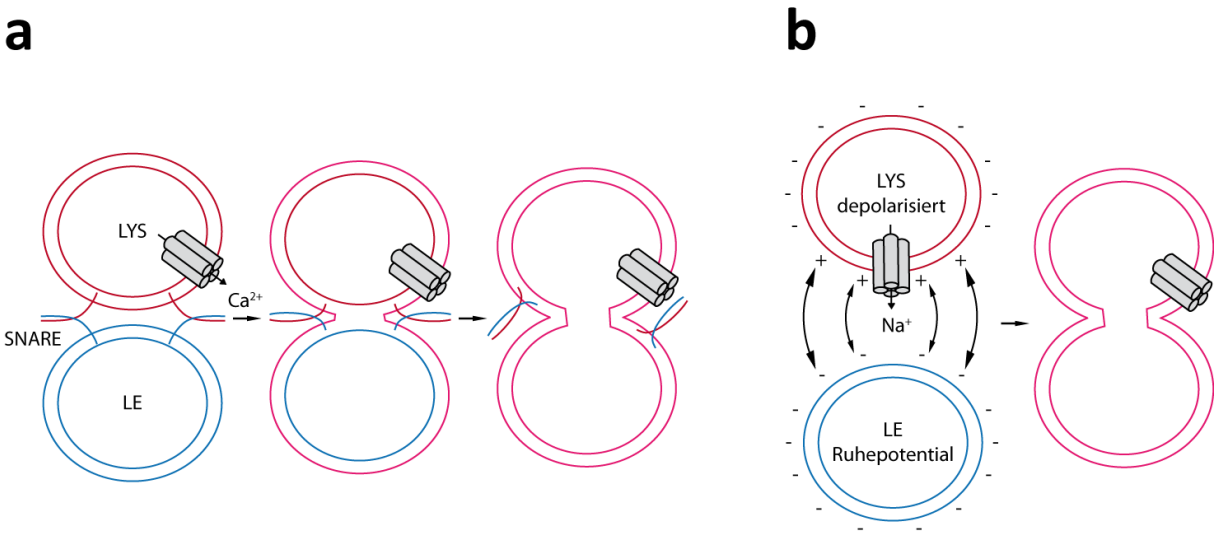

Abb. 37 Möglicher Mechanismus der TPC2 vermittelten Membranfusion zwischen späten Endosomen und Lysosomen

(a) Aktivierung von TPC2 führt zu einem Ca^{2+}-Ausstrom aus dem Lysosom. Dieser aktiviert benachbarte SNARE-Komplexe, welche die finale Fusion von späten Endosomen und Lysosomen bewirkt. (b) Die Na^+-Komponente von I_{TPC2} führt zu einer Depolarisation der lysosomalen Membran. Die elektrostatische Anziehung der nun gegenseitigen geladenen Membranen von späten Endosomen und Lysosomen führt zur Annäherung der Organellen und letztlich zur Fusion.

Mit der Annahme, dass TPC2 nach Aktivierung die Membranfusion zwischen späten Endosomen und Lysosomen *triggert*, lassen sich ein Großteil der Befunde im Zellmodell, wie auch der $TPC2^{-/-}$-Maus, erklären. Ohne TPC2-Aktivität akkumulieren Liganden wie LDL bzw. Ligand-Rezeptor-Komplexe wie EGF-EGFR, die nach Endozytose entlang des Degradationsweges zum Lysosom transportiert werden, in intrazellulären Vesikeln von MEF-Zellen. Die Akkumulation konzentriert sich auf den Bereich später Endosomen, was den Funktionsdefekt distal, d. h. zwischen spätem Endosom und Lysosom, nahelegt. Zusammen mit der lysosomalen Lokalisation von TPC2 ist dies ein weiteres Indiz für die Regulation der finalen Fusion durch TPC2.

5.1.2 TPC2 in der Leber

In vivo äußert sich der Funktionsdefekt nach Belastung des endolysosomalen Systems mit einer erhöhten Cholesterolzufuhr in einer drastischen Fettinfiltration des Lebergewebes verbunden mit der Ausbildung charakteristischer Fettvakuolen. Klinisch entspricht dies einer Nichtalkoholischen Fettleberhepatitis.

Cholesterol, das im Körper, größtenteils in Form seiner Ester, verpackt in LDL-Partikeln transportiert wird, muss in späten Endosomen und Lysosomen erst durch saure Lipasen in freies Cholesterol überführt werden, um verwertet werden zu können. Freies Cholesterol wird daraufhin aus dem endolysosomalen System über Transportproteine ins Zytosol exportiert und steht damit der Zelle zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung [59]. In $TPC2^{-/-}$-Mäusen hingegen erfolgt der Efflux aufgrund des Transportdefekts zwischen spätem Endosom und Lysosom wahrscheinlich überwiegend aus dem späten Endosom. Dies wiederum könnte, im Vergleich zum endolysosomalen Transport in WT-Zellen, eine Fehlleitung der nachgeschalteten Cholesterolverwertung durch Hochregulierung alternativer Transportwege in $TPC2^{-/-}$-Zellen bewirken. Z. B. häufen sich die Hinweise auf spezifische Kontaktstellen zwischen spätem Endosom und Endoplasmatischem Reticulum (ER) [60-62], sowie den direkten vesikulären und nicht-vesikulären Transport zwischen diesen beiden Organellen [63, 64]. Eine Erhöhung der freien Cholesterolkonzentration am ER wiederum induziert die vermehrte Synthese von Cholesterol-Estern und deren Speicherung in Fettvakuolen und führt in gleicher Weise zur Drosselung der endogenen Cholesterolbiosynthese [59, 65]. Damit übereinstimmend, zeigen $TPC2^{-/-}$-Mäuse eine prägnante Akkumulation von Fettvakuolen in der Histologie von Leberschnitten ebenso wie einen starken Anstieg hepatischer Cholesterol-Ester in der Gaschromatographie.

Die Identifizierung von TPC2 als Risikofaktor der Nichtalkoholischen Fettlebererkrankung zeigt zum ersten Mal die Beteiligung des Gens an der Pathogenese einer Volkskrankheit von hoher klinischer Relevanz: 30% der Weltbevölkerung sind schätzungsweise betroffen [66, 67]. Zusätzlich steht die Krankheit im Verdacht das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen zu erhöhen. Zukünftige Experimente werden zeigen, welche Relevanz TPC2 im Rahmen dieser Krankheiten hat.

5.1.3 TPC2 im ZNS

Neuronales Gewebe scheint besonders auf die funktionelle Integrität des endolysosomalen Systems angewiesen zu sein. Dies zeigt sich u. a. in der häufigen Beeinträchtigung neuronaler Funktionen im Rahmen lysosomaler Speicherkrankheiten [34, 35, 68, 69]. Der in dieser Arbeit gezeigte Anstieg der spontane Neurotransmission glutamaterger Neurone des Hippocampus in TPC2$^{-/-}$-Mäusen kann als ein weiterer Beleg für Notwendigkeit eines funktionieren endolysosomalen Systems im ZNS gewertet werden. Wie aber lässt sich eine Verstärkung der spontanen Neurotransmitter-Freisetzung an der Präsynapse mit einem Defekt der spätendosomalen-lysosomalen Fusion erklären? Lysosomen sind für die Degradation präsynaptischer Proteine und Organellen verantwortlich und damit eine wichtige Regelgröße im dynamischen Gleichgewicht aus Neogenese und Degradation, das die Verfügbarkeit an der Präsynapse reguliert [43]. Aufgrund der räumlichen Trennung zwischen Lysosomen, die überwiegend am Zellsoma lokalisieren [45], und der Präsynapse werden präsynaptische Proteine an der Synapse zunächst in Rab7-positive späte Endosomen sortiert und retrograd entlang des Axons transportiert. Nach Fusion mit Lysosomen erfolgt die Degradation. In Übereinstimmung mit dem postulierten Modell der Regulierung spätendosomaler-lysosomaler Fusion durch TPC2, zeigen TPC2-defiziente Neurone eine Akkumulation später Endosomen (Rab7-positive Vesikel) entlang des Axons. Für einen Fusionsdefekt spricht die intakte Prozessierung der lysosomalen Endoprotease CatD in TPC2$^{-/-}$-Neuronen, die eine Beeinträchtigung der lysosomalen Degradationskompetenz als Ursache der Akkumulation ausschließt. Neben der Akkumulation im Axon offenbaren Zeitrafferaufnahmen der Transportdynamik Rab7-positiver Vesikel jedoch auch einen Defekt des retrograden Transports bei gleichzeitiger Zunahme der statischen Vesikelfraktion. Dieser Transportdefekt ist spezifisch für Rab7, da der retrograde mitochondriale Transport zwischen WT und KO unverändert ist. Der verminderte retrograde Transport könnte als Folge der Akkumulation und des verminderten Vesikel*turnovers* auftreten, d. h. als sekundärer Nebeneffekt des primären Fusionsdefizits. So könnte die verminderte Degradationsrate später Endosomen zunehmend den Abbau fehlerhafter Vesikel, oder den Einbau missgefalteter Proteine in sich neu formierende Rab7-positive Vesikel begünstigen. Beträfen die Defekte zunehmend Adapterproteine, die für die Bindung an Motorproteine des Zytoskeletts verantwortlich sind, könnte dies eine Beeinträchtigung des dyneinabhängigen retrograden Transports bewirken. Eine verminderte Bindung LC3-positiver Vesikel an das Motorprotein des retrograden

Transports Dynein und eine damit verbundene Reduktion des retrograden axonalen Transports konnte als Folge der Inhibition von Lysosomen bereits gezeigt werden [70]. Ebenso denkbar wäre eine durch die Akkumulation bedingte „dauerhafte“ Bindung von limitierenden Transportproteinen / -adaptern. Diese würden dem verfügbaren *Pool* entzogen und der relative Mangel könnte in der Peripherie in einem Transportblock resultieren. Snapin ist ein solches Adapterprotein des retrograden Transports und dessen Knockout bedingt, ähnlich wie der Verlust von TPC2, eine spezifische Reduktion des retrograden Transports Rab7-positiver Vesikel [45]. Geht man davon aus, dass TPC2 auch in späten Endosomen aktiv ist, so sind auch Szenarien denkbar, in denen der Transportdefekt nicht sekundäre Folge der Akkumulation, sondern direkt durch den Verlust der TPC2-Aktiviät bedingt ist. Beispielsweise besteht die Möglichkeit einer Ca^{2+}-Abhängigkeit des retrograden Transports. Vergleichbar mit der postulierten lokalen Aktivierung von SNARE-Proteinen durch TPC2, ist es vorstellbar, dass der Verlust der TPC2-Aktivität eine niedrigere lokale $[Ca^{2+}]$ in der direkten Umgebung des Transportvesikels zur Folge hat, was wiederum einen Block des retrograden Transports bewirken könnte. Ryanodin, das die Ca^{2+}-Freisetzung aus einem intrazellulären Speicher, dem Endplasmatischen Retikulum, blockt, führt z. B. zu einer Verminderung des schnellen axonalen Transports [71]. Ebenso möglich wäre eine durch den KO bedingte Veränderung des vesikulären Membranpotentials. Für Mitochondrien wurde ein Zusammenhang zwischen Membranpotential und axonalem Transport bereits gezeigt [72]. Unabhängig jedoch vom Mechanismus, sind Transportdefekt und Akkumulation später Endosomen im Axon Ausdruck einer Verminderung der Degradationsrate im Neuron. Gemäß der Idee eines Gleichgewichtes, könnte der verminderte Abbau präsynaptisch in einem Anstieg synaptische Vesikel resultieren (vgl. Abb. 27). Eine Vergrößerung des *Pools* an synaptischen Vesikeln erhöht die Freisetzungswahrscheinlichkeit [44] und könnte den Frequenzanstieg erklären.

Pathophysiologisch interessant ist die Frage nach den Langzeitkonsequenzen des TPC2-Verlustes im ZNS. Die bisherigen Versuche wurden an Zellen (div7-10) und Mäusen (p7, ausgenommen die Tiere im Verhaltensexperiment) in verhältnismäßig jungem Entwicklungsstadium durchgeführt. Analog den Überlegungen zum Mechanismus des Transportdefekts, würde man mit zunehmendem Alter bei einer erniedrigten Degradationsrate und der damit verbundenen verringerten Clearance eine Anhäufung defekter Proteine und auch Organellen erwarten. Insbesondere an Orten erhöhter Aktivität wie den Synapsen sollte sich dies im Laufe der Zeit durch Funktionseinbußen bemerkbar

machen. Es wäre demnach interessant, die synaptische Funktion in älteren Tieren zu messen. Ließe sich hier ein gradueller Verlust der neuronalen Funktion in Verbindung mit der Akkumulation missgefalteter Proteine nachweisen, wäre das ein *Link* zu wichtigen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson [73]. Gomez-Suaga *et al.* [48] haben hier bereits eine Verbindung zwischen TPC2 und LRRK2 (Leucine Rich Repeat Kinase 2) diskutiert. Bei monogenetischen Defekten, die zu familiärem Parkinsonoismus führen, finden sich die meisten Mutationen im LRRK2-Gen. Interessanterweise bewirken Mutanten von LRRK2, ebenso wie der Verlust von TPC2, eine Beeinträchtigung des EGF-Transports zwischen spätem Endosom und Lysosom im Zellmodell [74]. Für M. Alzheimer wird immer häufiger eine Beeinträchtigung der lysosomalen Clearance als Ursache der Erkrankung diskutiert [70, 75, 76], nicht selten auch mit Blick auf die Autophagie [50, 77, 78]. Der postulierte Fusionsdefekt zwischen späten Endosomen und Lysosomen gilt offensichtlich nicht in gleicher Weise für die Fusion zwischen Autophagosomen und Lysosomen, da die Bestimmung des LC3II/LC3I-Quotienten keinen signifikanten Unterschied zwischen WT- und $TPC2^{-/-}$-Mäusen im Hippocampus zeigt, was indirekt für eine intakte Fusion zwischen Autophagosomen und Lysosomen spricht. Die Tatsache, dass Endosomen und Autophagosomen auf unterschiedliche SNARE-Proteine zurückgreifen um mit Lysosomen zu fusionieren, kann ein Grund für den selektiven Fusionsdefekt sein [55, 79, 80]. Eine interessante Schlussfolgerung in diesem Zusammenhang ist eine mögliche Kompensation der Defekte im Degradationsweg (EE > LE > LYS) durch die autophagosomale Clearance. Anstatt direkt mit Lysosomen zu fusionieren, würden späte Endosomen zunächst mit Autophagosomen zu sogenannten Amphisomen fusionieren um dann über TPC2-unabhängige Mechanismen mit Lysosomen zu fusionieren, beispielsweise unter Beteiligung eines anderen lysosomalen Ionenkanals, TRPML1 [81]. Jüngere Literaturdaten belegen die enge Vernetzung von Endosomen und Autophagosomen [82-85]. Eine Kompensation könnte auch die milde Ausprägung des Phänotyps der $TPC2^{-/-}$-Maus unter Basalbedingungen erklären, der häufig erst zu Tage tritt, sobald das endolysosomale System belastet wird, z. B. durch EGF- / Cholesterol-Stress in MEF Zellen und Hepatozyten oder Rab7-Überexpression im Neuron. Die marginalen Unterschiede im Lernverhalten der KO-Tiere im Vergleich zum WT könnten ebenfalls Folge kompensatorischer Gegenregulation sein. Allerdings bedarf die Interpretation komplexer Verhaltensmuster einer umfassenden und genauen Charakterisierung der beteiligten Strukturen, besonders im Falle von subtilen

Veränderungen. Deshalb sind weitere elektrophysiologische Untersuchungen sowie zusätzliche Verhaltensexperimente nötig, um eine endgültige Aussage über die Beteiligung von TPC2 an kognitiven Prozessen machen zu können.

6 Zusammenfassung

Ein intaktes endolysosomales System ist elementar für die physiologische Funktion eukaryotischer Zellen. Es ist sowohl verantwortlich für die Aufnahme, den Transport und die Metabolisierung von Nährstoffen und Makromolekülen aus dem extrazellulären Raum, als auch für das Recycling und die Degradation intrazellulärer Strukturen, wie beispielsweise beschädigte Zellorganellen aber auch Signalmoleküle. Eine Schlüsselrolle in diesen Prozessen nimmt das Lysosom ein, da es das letzte Glied der endolysosomalen Transportkette ist und für die finale Degradation der Makromoleküle verantwortlich ist. Defekte und Mutationen lysosomaler Proteine können zur Akkumulation hochmolekularer Strukturen innerhalb der Zelle führen, deren prominenteste Ausprägung die Lysosomalen Speicherkrankheiten sind. Über 40 verschiedene Subtypen dieser Gruppe genetischer Stoffwechselerkrankungen sind bis heute beschrieben worden. Nicht zuletzt aufgrund der universellen Bedeutung des endolysosomalen Systems in eukaryotischen Zellen, zeichnen sich diese symptomatisch durch eine hohe Variabilität der klinischen Manifestation aus. Als Ursache wurden bisher überwiegend lysosomale Enzymdefekte beschrieben. Aufgrund der Fortschritte der letzten Jahre im Bereich der funktionellen Analysemethoden auf subzellulärer Ebene, wie dem vesikulären Patch-Clamp oder hochauflösenden mikroskopischen Bildgebungsverfahren, mehren sich jedoch die Hinweise, dass auch Ionenkanäle eine fundamentale Rolle in der Regulation der lysosomalen Funktion spielen [86].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die funktionelle Rolle eines dieser lysosomalen Ionenkanäle, des Two-Pore-Loop-Kanals 2 (TPC2), genauer untersucht werden. TPC2 ist Teil der Transient-Receptor-Potential (TRP)-Kanalfamilie. Sein Aktivierungsmechanismus ist noch nicht im Detail geklärt, gesichert ist jedoch die Aktivierung durch zwei Liganden, den *Second-messenger* Nicotinsäureadenindinukleotidphosphat (NAADP) sowie das endolysosomale Membranlipid Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat ($PI(3,5)P_2$) [8, 9, 16-19]. Unabhängig vom endogenen Liganden konnte in früheren Studien mit unterschiedlichen Methoden gezeigt werden, dass TPC2 nach Aktivierung Ca^{2+} leitet [7-9, 11, 17]. TPC2 ist daher möglicherweise direkt an der physiologischen Ca^{2+}-Freisetzung aus Endosomen / Lysosomen beteiligt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass TPC2-defiziente Zellen einen Defekt im Ca^{2+}-abhängigen Transport des endolysosomalen Degradationsweg aufweisen, der sich in

einer prominenten Akkumulation von Makromolekülen im Bereich später Endosomen äußert. Ein massenspektrometrischer *Screen* nach Interaktionspartnern legt eine enge räumliche Beziehung zwischen TPC2 und SNARE-Proteinen der lysosomalen Fusionsmaschinerie nahe. Zusammen implizieren diese Ergebnisse, dass TPC2 direkt in die Ca^{2+}-abhängige Regulation endolysosomaler Fusionsprozesse involviert ist. Als Folge der beobachteten Transportdefekte im Zellmodell zeigen $TPC2^{-/-}$-Mäuse *in vivo* eine verringerte metabolische Cholesterol-Toleranz. Diese führt zu Cholesterol-Infiltraten der Leber und manifestiert sich im klinischen Bild einer Nichtalkoholischen Fettleberhepatitis. Neuronal führt der Verlust von TPC2 zu einem Transportdefekt und zu einer Akkumulation später Endosomen in Axonen glutamaterger Neurone des Hippocampus. Diese sind möglicherweise die Ursache für die ebenfalls beobachtete erhöhte spontane Neurotransmission in diesen Zellen. Zukünftige Experimente müssen den genauen Zusammenhang und die funktionellen Konsequenzen im ZNS genauer klären.

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren den elementaren Beitrag von TPC2 zur Regulation des endolysosomalen Transports im Degradationsweg eukaryotischer Zellen. Die funktionellen Veränderungen in zwei unabhängigen Organsystemen als Konsequenz auf den Verlust der TPC2-Funktion in der KO-Maus, deuten für TPC2 die Regulation der Homöostase einer Vielzahl unterschiedlicher Makromoleküle und Zellmetaboliten an.

7 Literaturverzeichnis

1. Nilius, B. and G. Owsianik, *The transient receptor potential family of ion channels.* Genome Biol, 2011. **12**(3): p. 218.
2. Benarroch, E.E., *TRP channels: functions and involvement in neurologic disease.* Neurology, 2008. **70**(8): p. 648-52.
3. Ramsey, I.S., M. Delling, and D.E. Clapham, *An introduction to TRP channels.* Annu Rev Physiol, 2006. **68**: p. 619-47.
4. Yu, F.H. and W.A. Catterall, *The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis.* Sci STKE, 2004. **2004**(253): p. re15.
5. Liao, M., et al., *Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy.* Nature, 2013. **504**(7478): p. 107-12.
6. Ishibashi, K., M. Suzuki, and M. Imai, *Molecular cloning of a novel form (two-repeat) protein related to voltage-gated sodium and calcium channels.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **270**(2): p. 370-6.
7. Zong, X., et al., *The two-pore channel TPCN2 mediates NAADP-dependent Ca(2+)-release from lysosomal stores.* Pflugers Arch, 2009. **458**(5): p. 891-9.
8. Calcraft, P.J., et al., *NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels.* Nature, 2009. **459**(7246): p. 596-600.
9. Schieder, M., et al., *Characterization of two-pore channel 2 (TPCN2)-mediated Ca2+ currents in isolated lysosomes.* J Biol Chem, 2010. **285**(28): p. 21219-22.
10. Brailoiu, E., et al., *An NAADP-gated two-pore channel targeted to the plasma membrane uncouples triggering from amplifying Ca2+ signals.* J Biol Chem, 2010. **285**(49): p. 38511-6.
11. Pitt, S.J., et al., *TPC2 is a novel NAADP-sensitive Ca2+ release channel, operating as a dual sensor of luminal pH and Ca2+.* J Biol Chem, 2010. **285**(45): p. 35039-46.
12. Rosen, D., et al., *Analogues of the nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) antagonist Ned-19 indicate two binding sites on the NAADP receptor.* J Biol Chem, 2009. **284**(50): p. 34930-4.
13. Ruas, M., et al., *Purified TPC isoforms form NAADP receptors with distinct roles for Ca(2+) signaling and endolysosomal trafficking.* Curr Biol, 2010. **20**(8): p. 703-9.
14. Walseth, T.F., et al., *Photoaffinity labeling of high affinity nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)-binding proteins in sea urchin egg.* J Biol Chem, 2012. **287**(4): p. 2308-15.
15. Lin-Moshier, Y., et al., *Photoaffinity labeling of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) targets in mammalian cells.* J Biol Chem, 2012. **287**(4): p. 2296-307.
16. Wang, X., et al., *TPC Proteins Are Phosphoinositide- Activated Sodium-Selective Ion Channels in Endosomes and Lysosomes.* Cell, 2012. **151**(2): p. 372-83.
17. Jha, A., et al., *Convergent regulation of the lysosomal two-pore channel-2 by Mg(2)(+), NAADP, PI(3,5)P(2) and multiple protein kinases.* EMBO J, 2014. **33**(5): p. 501-11.
18. Cang, C., et al., *mTOR regulates lysosomal ATP-sensitive two-pore Na(+) channels to adapt to metabolic state.* Cell, 2013. **152**(4): p. 778-90.
19. Morgan, A.J. and A. Galione, *Two-pore channels (TPCs): current controversies.* Bioessays, 2014. **36**(2): p. 173-83.

20. Zhu, M.X., et al., *Calcium signaling via two-pore channels: local or global, that is the question.* Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **298**(3): p. C430-41.
21. Sulem, P., et al., *Two newly identified genetic determinants of pigmentation in Europeans.* Nat Genet, 2008. **40**(7): p. 835-7.
22. Xu, J., *Preparation, culture, and immortalization of mouse embryonic fibroblasts.* Curr Protoc Mol Biol, 2005. **Chapter 28**: p. Unit 28 1.
23. Fath, T., et al., *Primary support cultures of hippocampal and substantia nigra neurons.* Nat Protoc, 2009. **4**(1): p. 78-85.
24. Jiang, M. and G. Chen, *High Ca2+-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures.* Nat Protoc, 2006. **1**(2): p. 695-700.
25. Ong, S.E., et al., *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics.* Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(5): p. 376-86.
26. Ong, S.E. and M. Mann, *A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC).* Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2650-60.
27. Kleinknecht, K.R., et al., *Hippocampus-dependent place learning enables spatial flexibility in C57BL6/N mice.* Front Behav Neurosci, 2012. **6**: p. 87.
28. Chapel, A., et al., *An extended proteome map of the lysosomal membrane reveals novel potential transporters.* Mol Cell Proteomics, 2013. **12**(6): p. 1572-88.
29. Riederer, M.A., et al., *Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network.* J Cell Biol, 1994. **125**(3): p. 573-82.
30. Bagshaw, R.D., J.W. Callahan, and D.J. Mahuran, *The Arf-family protein, Arl8b, is involved in the spatial distribution of lysosomes.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **344**(4): p. 1186-91.
31. Korolchuk, V.I., et al., *Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses.* Nat Cell Biol, 2011. **13**(4): p. 453-60.
32. Falguieres, T., D. Castle, and J. Gruenberg, *Regulation of the MVB pathway by SCAMP3.* Traffic, 2012. **13**(1): p. 131-42.
33. Madshus, I.H. and E. Stang, *Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking.* J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 19): p. 3433-9.
34. Platt, F.M., B. Boland, and A.C. van der Spoel, *The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction.* J Cell Biol, 2012. **199**(5): p. 723-34.
35. Jeyakumar, M., et al., *Storage solutions: treating lysosomal disorders of the brain.* Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(9): p. 713-25.
36. Martina, J.A., B. Lelouvier, and R. Puertollano, *The calcium channel mucolipin-3 is a novel regulator of trafficking along the endosomal pathway.* Traffic, 2009. **10**(8): p. 1143-56.
37. Morgan, A.J., et al., *Molecular mechanisms of endolysosomal Ca2+ signalling in health and disease.* Biochem J, 2011. **439**(3): p. 349-74.
38. Weber, C. and H. Noels, *Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options.* Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1410-22.
39. Jawien, J., P. Nastalek, and R. Korbut, *Mouse models of experimental atherosclerosis.* J Physiol Pharmacol, 2004. **55**(3): p. 503-17.

40. Osono, Y., et al., *Role of the low density lipoprotein receptor in the flux of cholesterol through the plasma and across the tissues of the mouse.* J Clin Invest, 1995. **95**(3): p. 1124-32.
41. Han, E.B. and C.F. Stevens, *Development regulates a switch between post- and presynaptic strengthening in response to activity deprivation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(26): p. 10817-22.
42. Willeumier, K., S.M. Pulst, and F.E. Schweizer, *Proteasome inhibition triggers activity-dependent increase in the size of the recycling vesicle pool in cultured hippocampal neurons.* J Neurosci, 2006. **26**(44): p. 11333-41.
43. Rizzoli, S.O., *Synaptic vesicle recycling: steps and principles.* EMBO J, 2014. **33**(8): p. 788-822.
44. Murthy, V.N., et al., *Inactivity produces increases in neurotransmitter release and synapse size.* Neuron, 2001. **32**(4): p. 673-82.
45. Cai, Q., et al., *Snapin-regulated late endosomal transport is critical for efficient autophagy-lysosomal function in neurons.* Neuron, 2010. **68**(1): p. 73-86.
46. Hirokawa, N., S. Niwa, and Y. Tanaka, *Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease.* Neuron, 2010. **68**(4): p. 610-38.
47. Hollenbeck, P.J. and W.M. Saxton, *The axonal transport of mitochondria.* J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 23): p. 5411-9.
48. Gomez-Suaga, P., et al., *A link between LRRK2, autophagy and NAADP-mediated endolysosomal calcium signalling.* Biochem Soc Trans, 2012. **40**(5): p. 1140-6.
49. Pereira, G.J., et al., *Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) regulates autophagy in cultured astrocytes.* J Biol Chem, 2011. **286**(32): p. 27875-81.
50. Harris, H. and D.C. Rubinsztein, *Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease.* Nat Rev Neurol, 2012. **8**(2): p. 108-17.
51. Fader, C.M., et al., *TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(12): p. 1901-16.
52. Klionsky, D.J., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy.* Autophagy, 2012. **8**(4): p. 445-544.
53. Di Paolo, G. and P. De Camilli, *Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics.* Nature, 2006. **443**(7112): p. 651-7.
54. Michell, R.H., et al., *Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: metabolism and cellular functions.* Trends Biochem Sci, 2006. **31**(1): p. 52-63.
55. Luzio, J.P., S.R. Gray, and N.A. Bright, *Endosome-lysosome fusion.* Biochem Soc Trans, 2010. **38**(6): p. 1413-6.
56. Dong, X.P., et al., *PI(3,5)P(2) controls membrane trafficking by direct activation of mucolipin Ca(2+) release channels in the endolysosome.* Nat Commun, 2010. **1**: p. 38.
57. Galione, A., *A primer of NAADP-mediated Ca(2)(+) signaling: from sea urchin eggs to mammalian cells.* Cell Calcium, 2014.
58. Mayer, M.L. and G.L. Westbrook, *Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones.* J Physiol, 1987. **394**: p. 501-27.
59. Ikonen, E., *Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 125-38.
60. Eden, E.R., et al., *The relationship between ER-multivesicular body membrane contacts and the ESCRT machinery.* Biochem Soc Trans, 2012. **40**(2): p. 464-8.

61. Friedman, J.R., et al., *Endoplasmic reticulum-endosome contact increases as endosomes traffic and mature.* Mol Biol Cell, 2013. **24**(7): p. 1030-40.
62. van der Kant, R., et al., *Cholesterol-binding molecules MLN64 and ORP1L mark distinct late endosomes with transporters ABCA3 and NPC1.* J Lipid Res, 2013. **54**(8): p. 2153-65.
63. Holtta-Vuori, M. and E. Ikonen, *Endosomal cholesterol traffic: vesicular and non-vesicular mechanisms meet.* Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 3): p. 392-4.
64. Du, X. and H. Yang, *Endosomal cholesterol trafficking: protein factors at a glance.* Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2013. **45**(1): p. 11-7.
65. Robenek, H., et al., *Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis.* J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 20): p. 4215-24.
66. Bhatia, L.S., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease: a new and important cardiovascular risk factor?* Eur Heart J, 2012. **33**(10): p. 1190-200.
67. Tiniakos, D.G., M.B. Vos, and E.M. Brunt, *Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis.* Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 145-71.
68. Schultz, M.L., et al., *Clarifying lysosomal storage diseases.* Trends Neurosci, 2011. **34**(8): p. 401-10.
69. Wang, D., et al., *Membrane trafficking in neuronal maintenance and degeneration.* Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(16): p. 2919-34.
70. Lee, S., Y. Sato, and R.A. Nixon, *Lysosomal proteolysis inhibition selectively disrupts axonal transport of degradative organelles and causes an Alzheimer's-like axonal dystrophy.* J Neurosci, 2011. **31**(21): p. 7817-30.
71. Breuer, A.C., M. Bond, and M.B. Atkinson, *Fast axonal transport is modulated by altering trans-axolemmal calcium flux.* Cell Calcium, 1992. **13**(4): p. 249-62.
72. Miller, K.E. and M.P. Sheetz, *Axonal mitochondrial transport and potential are correlated.* J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 13): p. 2791-804.
73. Skovronsky, D.M., V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski, *Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications.* Annu Rev Pathol, 2006. **1**: p. 151-70.
74. Gomez-Suaga, P., et al., *LRRK2 delays degradative receptor trafficking by impeding late endosomal budding through decreasing Rab7 activity.* Hum Mol Genet, 2014.
75. Appelqvist, H., et al., *The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target.* J Mol Cell Biol, 2013. **5**(4): p. 214-26.
76. Funk, K.E. and J. Kuret, *Lysosomal fusion dysfunction as a unifying hypothesis for Alzheimer's disease pathology.* Int J Alzheimers Dis, 2012. **2012**: p. 752894.
77. Barnett, A. and G.J. Brewer, *Autophagy in aging and Alzheimer's disease: pathologic or protective?* J Alzheimers Dis, 2011. **25**(3): p. 385-94.
78. Wolfe, D.M., et al., *Autophagy failure in Alzheimer's disease and the role of defective lysosomal acidification.* Eur J Neurosci, 2013. **37**(12): p. 1949-61.
79. Furuta, N., et al., *Combinational soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins VAMP8 and Vti1b mediate fusion of antimicrobial and canonical autophagosomes with lysosomes.* Mol Biol Cell, 2010. **21**(6): p. 1001-10.
80. Itakura, E., C. Kishi-Itakura, and N. Mizushima, *The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes.* Cell, 2012. **151**(6): p. 1256-69.
81. Wong, C.O., et al., *Drosophila TRPML is required for TORC1 activation.* Curr Biol, 2012. **22**(17): p. 1616-21.

82. Fader, C.M. and M.I. Colombo, *Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners.* Cell Death Differ, 2009. **16**(1): p. 70-8.
83. Hyttinen, J.M., et al., *Maturation of autophagosomes and endosomes: a key role for Rab7.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(3): p. 503-10.
84. Szatmari, Z., et al., *Rab11 facilitates cross-talk between autophagy and endosomal pathway through regulation of Hook localization.* Mol Biol Cell, 2014. **25**(4): p. 522-31.
85. Tooze, S.A., A. Abada, and Z. Elazar, *Endocytosis and autophagy: exploitation or cooperation?* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(5): p. a018358.
86. Scott, C.C. and J. Gruenberg, *Ion flux and the function of endosomes and lysosomes: pH is just the start: the flux of ions across endosomal membranes influences endosome function not only through regulation of the luminal pH.* Bioessays, 2011. **33**(2): p. 103-10.

8 Abbildungsverzeichnis

ABB. 1 TPC2 ALS TEIL DER TRP-KANAL-SUPERFAMILIE 2

ABB. 2 TOPOLOGIE VON TRP- UND TPC-KANÄLEN 3

ABB. 3 PHOTO-AFFINITÄTSMARKIERUNG DES NAADP-BINDENDEN PROTEINS 5

ABB. 4 TPC2 IST EIN LIGANDENGESTEUERTER LYSOSOMALER IONENKANAL 7

ABB. 5 TARGETINGSTRATEGIE DER TPC2$^{-/-}$-MAUS 11

ABB. 6 SILAC WORKFLOW 18

ABB. 7 AFFINITÄTSREINIGUNG UND FRAKTIONIERUNG DES TPC2-ANTIKÖRPERS 19

ABB. 8 POTENTIELLE INTERAKTIONSPARTNER VON TPC2 24

ABB. 9 ARBEITSSCHEMA DER MEF-ZELL-GENERIERUNG 25

ABB. 10 MARKER DES ENDOLYSOSOMALEN SYSTEMS IN WT- UND TPC2$^{-/-}$-MEF ZELLEN 26

ABB. 11 KO VON TPC2 IN MEF-ZELLEN 27

ABB. 12 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE CHRAKTERISIERUNG VON MEF-ZELL-LYSOSOMEN 28

ABB. 13 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES LYSOSOMALEN DEGRADATIONSWEGES ANHAND DES EFG/EGFR-LIGAND-REZEPTORKOMPLEXES 29

ABB. 14 DER VERLUST VON TPC2 FÜHRT ZU EINER AKKUMULATION VON EGF IN MEF-ZELLEN 30

ABB. 15 EGF AKKUMULIERT IN SPÄTEN ENDOSOMEN IN TPC2$^{-/-}$-MEFS 31

ABB. 16 EFFEKT DER CALCIUM-KOMPLEXIERUNG MITTELS BAPTA AUF DEN ENDOLYSOSOMALEN TRANSPORT 32

ABB. 17 HETEROLOGE EXPRESSION VON FUNKTIONELLEM TPC2 RESCUED DEN TRANSPORT IN KO-MEFS 33

ABB.18 LDL AKKUMULIERT IN TPC2 DEFIZIENTEN MEF-ZELLEN 34

ABB. 19 WESTERNBLOT VON TPC2 IN MURINEM LEBERGEWEBE 35

ABB. 20 ANALYSE VON WT- UND TPC2$^{-/-}$-LEBERN 36

ABB. 21 CHOLESTEROLAKKUMULATION IN WT- UND TPC2$^{-/-}$-LEBERN 37

ABB. 22 EXPRESSION VON TPC2 IM ZNS 39

ABB. 23 NISSLFÄRBUNG VON HIRNSCHNITTEN 7 TAGE ALTER WT- UND TPC2$^{-/-}$-MÄUSE 40

ABB. 24 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES HIPPOCAMPUS UND DER ELEKTROPHYSIOLOGISCHEN ABLEITUNG IN CA1 41

ABB. 25 ARBEITSSCHEMA ZUR PRÄPARATION DISSOZIIERTER PRIMÄRER HIPPOCAMPALER NEURONE 41

ABB. 26 DER VERLUST VON TPC2 FÜHRT ZU EINER ERHÖHTEN MEPSC-FREQUENZ IN HIPPOCAMPALEN NEURONEN 42

ABB. 27 HYPOTHETISCHES MODELL ZUR TPC2-FUNKTION IM NEURON 44

ABB. 28 COLOKALISATION VON TPC2 MIT MARKERN DES ENDOLYSOSOMALEN SYSTEMS IN HIPPOCAMPALEN PRIMÄRNEURONEN 45

ABB. 29 TPC2 LOKALISIERT ÜBERWIEGEND IM ZELLSOMA 46

ABB. 30 ARBEITSSCHEMA ZUR ERSTELLUNG EINES KYMOGRAMMS 47

ABB. 31 TPC2$^{-/-}$-NEURONE ZEIGEN EINEN RETROGRADEN TRANSPORTDEFEKT UND EINE AKKUMULATION SPÄTER ENDOSOMEN IM AXON 48
ABB. 32 DER AXONALE TRANSPORT VON MITOCHONDRIEN IST INTAKT IN TPC2$^{-/-}$-ZELLEN 49
ABB. 33 CATHEPSIN D-PROZESSIERUNG IN HIPPOCAMPI VON WT- UND TPC2$^{-/-}$-MÄUSEN 50
ABB. 34 LC3-PROZESSIERUNG IN TPC2$^{-/-}$-HIPPOCAMPI 51
ABB. 35 RÄUMLICHES LERNEN VON TPC2$^{-/-}$- UND WT-MÄUSEN 53
ABB. 36 MODELL DER ORGANISATION VON TPC2-KANÄLEN UND SNARE-PROTEINEN DER FUSIONSMASCHINERIE IN MIKRODOMÄNEN MIT ENGER RÄUMLICHER VERNETZUNG 56
ABB. 37 MÖGLICHER MECHANISMUS DER TPC2 VERMITTELTEN MEMBRANFUSION ZWISCHEN SPÄTEN ENDOSOMEN UND LYSOSOMEN 57

9 Abkürzungsverzeichnis

$[Ca^{2+}]$	Calcium-Konzentration
a.u.	arbitrary unit
ALAT	Alanin Transaminase
ANOVA	Varianzanalyse
Arl8b	ADP-ribosylation factor-like protein
CA	Corpus ammonis
Ca^{2+}	Calcium
CatD	Cathepsin D
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DG	Gyrus dentatis
div	Days in vitro
EC	Entorhinaler Cortex
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Rezeptor
ER	Endoplasmatischem Reticulum
FBS	Fötales Bovines Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLDH	Glutamat Dehdrogenase
H&E	Hämatoxylin-Eosin
K	Lysin
K*	schweres Lysin
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein 1
LC3	Microtubule-associated protein 1 light chain 3
LDL	Low Density Lipoprotein
LRRK2	Leucine Rich Repeat Kinase 2
M6PR	Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
mEPSC	spontane exzitatorische postsynaptische Ströme
mf	Moosfasern
n.s.	nicht signifikant
NAADP	Nicotinsäureadenindinukleotidphosphat
neo^R	Neomycin / Geneticin Resistenz
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat, Siehe
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor
p7	postnataler Tag 7
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
$PI(3,5)P_2$	Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat

pp	Tractus perforans
R	Arginin
R*	schweres Arginin
RAB7A	Ras-related protein Rab-7a
RAB9A	Ras-related protein Rab-9A
RNA	Ribonukleinsäure
sc	Schaffer Kollateralen
SCAMP3	Secretory carrier-associated membrane protein 3
SILAC	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
Stx7	Syntaxin 7
TMS	Transmembransegment
TPC2	Two-pore-loop Kanal 2
$TPC2^{-/-}$	TPC2 Knockout
TRP	Transient Receptor Potential
Vamp3	Vesicle associated membrane protein 3
Vamp7	Vesicle-associated membrane protein 7
Vti1b	Vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1B
w/w	Massenprozent
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

10 Anhang

10.1 Tabellen

Tabelle 1

Zellysat ohne Detergenz		Membranpreparation ohne Detergenz		
TPC2-EGFP, ctrl.: Leerzellen		TPC2-EGFP, ctrl.: EGFP		
TFRC	BAT3	CAND1	EXOSC2	DCTN1
STX12	AP1G1	UTRN	MYO1D	EPB41L3
VPS45	TPD52L2	TEX10	LNPEP	GNAI1
VTI1A	CPD	MCM5	NDUFV1	GNAI3
VTI1B	PDIA3	SEC11A/L1	HK1	EPPK1
STX6	NAPG	DHX57	PCID2	EXOSC7
BCAP31	RAB5C	SEC23A	RPL12	TUBA1A/1C/3C/3E
CD63	PSMD12	ATP5C1	COPS3	CSE1L
ATP6V0D1	PSMD11	GTPBP4	CPOX	LIMA1
SCAMP3	RAP1B;RAP1A	HLA-B/C/E/H	CHCHD3	KRT18
SORT1	PSMD4	PIGS	ITGB1	FMR1
CANX	SCAMP1	YIF1B	CSNK1A1/L	XPO1
SYNGR1	PSMD2	ACTR2	DAD1	ILKAP
LNPEP	TRAPPC3	STX12	CTSC	HSD17B4
M6PR	HSP90B1	RPS15A	LMAN2L	GOLGB1
TMX1	SNX4	LAS1L	PLD3	ATP6V1A
STX7	PSMB6	PRPSAP2	CUL4A/B	VAMP2
ATP6V0A1	PSMC2	PDIA6	HSD17B12	RTN3
SRPRB	AP1B1	MGST1	UGGT1	PHGDH
SV2A	PSMA3	FARSB	RAB7A	SYPL1
HMGB2	PSMA4	PTPLAD1	HLA-A	TUBGCP3
TMED10	PSMB2	KHSRP	RPL18	RPL28
LMAN1	RAB8	CAPN3	ABCD3	PIGK
SYNGR2	SNAPIN	SEC22B	STX8	MCM3
RPN1	PSMA6	GLG1	RAB14	RALA/B
VAMP7	RAB18	RPL27	CYB5A	NCKAP1
NSF	PSMC4	ACTL6A	SLC12A2	RPL7
SEC22B	RHO	CCDC47	GNAS	GNAQ/11
ARL8B	PSMD6	RPL10/L	MRTO4	LAMP1
SYPL1	RAC	RIF1	PLOD1	GNB2
VAMP2	PSMB5	NPTN	CORO1C	CKAP4
VAMP3	PSMA7	SSR1	CYB5R3	SURF4
TMED9		SEL1L	NSF	RPL36
RAB9A		DDRGK1	DOCK7	RPL15
RAB1A		RANGAP1	RPS2	POR
RAB7A		DDOST	NT5DC2	PELO
SURF4		PSMD2	RPL5	ARL8B
NAPA		PDIA3	ZW10	RPS28
RAB1B		CAPZB	LGALS3BP	KRT8
ATP6V0A2		RAB13	DPM1	MOV10
RAB4A		RPP30	GNL2	RPL8
RAB11		GEMIN5	MYO1B	LMAN2
SLC3A2		FARSA	GEMIN4	SCAMP3
LAMP1		PSMD7	GOLGA2	PKP2
RAB6A		TMEM33	NUDT16L1	RTTN
RAB14		RPL6	CUL1	RCC2
RAB2A		RPL13A	GOLIM4	PSMD1
RTN4		STX18	TMX3	MAN2B1
PSMB1		NRAS/HRAS	PFKP	SCAMP2
BAG6		FXR2	FAM3C	

Tabelle 2

Zelllysat
mit 0.1% TritonX

TPC2-EGFP, ctrl.: EGFP

TUBB4B	NSF	TM9SF2	CCT4	CKAP4	TCP1	PARK7
RPS4X	PSMC1	SLC3A2	RPL7	RANGAP1	XRCC5	LRRC59
ARL8B	APMAP	DHX9	SRP68	GNAI2	TUBA1B/C	TPCN2
GAPDH	GIGYF2	SCCPDH	CCT8	PARP1	HIST1H4A	HNRNPM
SYPL1	ANXA5	PIGK	POR	RPS5	MTHFD1	RPS3
TBC1D4	OCIAD1	RPN2	CUL2	CCT6A	HLA-B/C	HIST2H2BX
LSS	VPS45	PDIA6	PKM2	EIF3L/EIP	MIF	HDAC6
HNRNPH1	OSBPL9	EMD	LPCAT1	ESYT1	EPRS	DAD1
NTPCR	NUP93	NUP155	FAR1	PGRMC2	PITPNB	CANX
FKBP8	DFFA	RPL4	RAB9A	G3BP1	EIF3D	BOLA2/B
GANAB	PTPLAD1	TNPO3	HSPA5	TRIM28	DDX5	PHB2
NOMO1/2/3	YIF1B	FAF2	IGF2BP1	FANCI	RAP1A/B	HSPD1
SHMT2	M6PR	PFKM	EIF4G1	TTC19	HNRNPA1/L2	HSPA1A/B
AP1B1/AP2B1	ARPC4/TTLL3	NUP210	PSME3	DDX39A/B/BAT1	RAB5A/B/C	
RAB4A/B	TCEB2	UBQLN2	LCLAT1	PHGDH	ATP5B	
SF3B3	PTK7	EIF3A	LANCL1	HADHA	ENO1	
HSPH1	AIFM1/PDCD8	MARS	RAB8A	RUVBL2	GNB2L1	
MATR3	FARSA	TUBA1B	XPOT	CYB5R3	ATP2A1/2	
NDUFAF3	DDX20	AIFM2	SCAMP3	EEF2	SDHA	
SMC1A	HSPA4	HNRNPA3	SH3GLB2	PLS3	DDOST	
MYH9	LAMP1	CCT2	MCM3	RUVBL1	CYB5A	
MYH10	LARS	ATP1A1/3	RAB5C	IPO5	TIMM50	
PPP1CA/C	TAMM41	DDX19A;DDX19B	PTPN1	LBR	SLC25A11	
DDX6	ACADVL	GMPS	PFN2	FUBP1/3	UMPS	
KLC1	OPA1	EIF4A1/2	AFG3L2	ACTR2	TMEM33	
STAT3	PAICS	SNRPA1	DARS	KRT8/P11	PTCD1/ATP5J2	
QARS	KIAA0090	PSMC5	ECM29	CCT7	COPA	
NCAPG	IPO9	PSMC6	GFPT1	XPO1	CRKL	
MDN1	EDC4	CLTC	ACAD9	KHSRP	SLC1A5	
EFTUD2	MCM5	IPO7	HMOX2	MAT2A	HNRNPU	
TUBB6	ASNA1	PEF1	UBQLN1	VAMP3	HIST1H2X	
PSMD7	AP3B1	ISOC2	IRS4	PABPC1/3	XRCC6	
VARS	TUFM	RPL10/L	FASN	YWHAE	NSF	
CNTN5	MTOR	RAVER1	CAD	TRAP1	HNRNPA2B1	
GART	PELO	PSMB1	TOMM70A	TMPO	RAB14	
DUT	PSMC3	ACTN1/4	SEC23A/B	PFKP	HSPA9	
PRDX1	PRKAR2A	ARL6IP5	PSMD3	PSMD6	LMAN2	
CAND1	FAM3C	SNRNP200	PSMD11	DDX3X/Y	LRPPRC	
LTN1	PPP2CA/B	PRPS1/2	AGPS	HSP90B1	RAB7A	
UFL1	TUBB/2A/2B	DYNC1H1	CTPS	RPSA/58	SEC22B	
H2AFY	PREB	RBM14/4	SURF4	PPP2R1A/B	PCBP1	
COMT	NT5DC2	MOGS	SERPINH1	SRPRB	TFRC	
IDH3A	RPS27A/UBA52/B/B	TNPO1	GNAI3	RPS15A	ATP1B3	
PSMC2	RCC2	PSMD12	CKB	KPNB1	ATP5A1	
SLC12A2	XPO5	KPNA2	CAPZA1	SCAMP2	PHB	
SPTAN1	FECH	PFKL	SEC11A/L1	DDX1	ATP5O	
PSMB5	HAX1	PRKDC	GCN1L1	RPL12	HSP90AB1	
PSMD2	NSDHL	TPM1/2/3/4	EEF1A1/P5	RDH11	CSE1L	
FDFT1	TAGLN2	SLC25A3	LMNB1	FBXO22	VDAC1	
IARS	SSR4	BAG6;BAT3	GPD2	PDCD6	RPN1	

10.2 Primer

RT-PCR TPC2

for_AACCTGTGGCTGCTGGCCTACTT

rev_GGTAGCCACGGAACTGATTATAG

Rab5a

for_TGTgagctcaagctt*GCCACC*ATGGCTAATCGAGGAGCAACAA

rev_ACggtaccGTGTTACTACAACACTGGCTTCTG

Lamp1

for_TGTgagctcaagctt*GCCACC*ATGGCGGCCCCCGGCGCC

rev_ACggtaccGATGGTCTGATAGCCGGCGTG

TPC2

for_Tggtacc*GCCACC*ATGGCGGCAGAAGAGCAGCC

rev_AGATctcgagAGTAccgcggGCCggatccCCTGCACAGATGCAAGTGTGG

10.3 Lösungen

10.3.1 Proteine & Westernblot

Trenngel

20%			*5%*		
0.82	ml	ddH_2O	5.79	ml	ddH_2O
2.5	ml	4fach Tris pH 8.8	2.5	ml	4fach Tris pH 8.8
6.63	ml	Rotiphorese 30 (Roth)	1.66	ml	Rotiphorese 30 (Roth)
25	µl	20% APS	25	µl	20% APS
5	µl	TEMED	5	µl	TEMED

Sammelgel

4%

3.05	ml	ddH_2O
1.25	ml	4fach Tris pH 6.8
0.67	ml	Rotiphorese 30 (Roth)
12.5	µl	20% APS
5	µl	TEMED

Tris, 4fach

pH 8.8

18.17	g	Tris
4	ml	10% SDS

ad 100 ml ddH_2O, pH 8.8 mit HCl konz.

pH 6.8

6.06	g	Tris
4	ml	10% SDS

ad 100 ml ddH_2O, pH 6.8 mit HCl konz.

Laufpuffer, 10fach

30.2	g	Tris
144	g	Glycin
10	g	SDS

ad 1000 ml ddH_2O

Blotpuffer, 10fach

30.2	g	Tris
144	g	Glycin

ad 1000 ml ddH_2O

6fach Lämmli

12	%	SDS
0.06	% mg	Bromphenolblau
60	%	Glycerol
375	mM	Tris pH 6.8
0.6	mM	DTT

Coomassie Färbe- / Entfärbelösung

400	ml	MeOH
100	ml	Eisessig
500	ml	ddH_2O
1	g	Coomassie blue R-250 (für Entfärbelösung weglassen)

Homogenisierungspuffer, Membranpräparation

250	mM	Saccharose
10	mM	Tris
5	mM	EDTA

pH 7.6

+ Proteaseinhibitor (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail; Roche)

PBST

1000	ml	PBS
1	ml	Triton X-100

10.3.2 Zellkultur

10fach PBS (1M)

100	mM	Na_2HPO_4
1.37	M	NaCl
27	mM	KCl
18	mM	KH_2PO_4

Boratpuffer

1.24	g	H_3BO_3
1.9	g	$Na_2B_4O_7$
400	ml	ddH_2O

2fach BBS

50	mM	BES (N,N-Bis[2-hydroxyethyl]-2-Aminoethansulfosäure)
1.5	mM	Na_2HPO_4
280	mM	NaCl

pH 6.95

Sterilfiltrieren, aliquotieren und bei 4°C lagern.

Tyrode

124	mM	NaCl
3	mM	KCl
1	mM	$MgCl_2$
2	mM	$CaCl_2$
5	mM	Glukose
10	mM	HEPES
pH	7.4	

Mowiol, wässriges Eindeckmedium

2.4	g	Mowiol 4-88
6	g	Glycerol
6	ml	ddH_2O (mehrere h vorsichtig bei Raumtemperatur rühren)
12	ml	Tris-Cl (0.2 M, pH 8.5) zugeben und für 10 min bei 50°C weiter rühren wenn sich alles gelöst hat 15 min / 5000 g abzentrifugieren und Überstand verwenden
2.5	%	DABCO (1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octane) zugeben, aliquotieren und bei -20°C lagern

10.3.3 Elektrophysiologie

Miniature, extrazellulär

140	mM	NaCl
5	mM	KCl
2	mM	$MgCl_2$
2	mM	$CaCl_2$
10	mM	Glukose
10	mM	HEPES
pH	7.4 mit NaOH	

Blocker: 1 µM Tetrodotoxin
10 µM Bicucullin

Miniature, intrazellulär

5	mM	NaCl
120	mM	CsCl
1	mM	$MgCl_2$
2	mM	$CaCl_2$
10	mM	EGTA
10	mM	HEPES
0.3	mM	Na-GTP
3	mM	Mg-ATP
pH	7.2 mit CsOH	

Blocker: 5mM QX-314

10.3.4 Histologie

Acetatpuffer

6	ml	NaOAc, 1M
34	ml	HOAc, 1M

0.5% Kresylviolettlösung, pH 3.9

0.5	g	Kresylviolett
40	ml	Acetatpuffer
60	ml	ddH_2O

7 Tage bei Raumtemperatur rühren, danach filtrieren

10.3.5 Antikörperaufreinigung

Lagerungspuffer

50	mM	Na_3Citrat
50	mM	NaH2PO4
150	mM	NaCl

pH 7

Gradient, niedriger pH

50	mM	Na_3Citrat
50	mM	NaH_2PO_4

pH 2

Gradient, hoher pH

50	mM	Na_3Citrat
50	mM	NaH_2PO_4
150	mM	NaCl

pH 7

Neutralisierungspuffer

400	mM	Na_2HPO_4

pH 9

10.4 Lebenslauf

Sami Hassan

Department Pharmazie – Pharmakologie für Naturwissenschaften

Ludwig-Maximilians-Universität

Butenandtstr. 7, 81377 München

sami.hassan@zoho.com

Ausbildung und Berufserfahrung

Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München

seit 05/10 Wiss. Mitarbeiter und Doktorand am Lehrstuhl für Pharmakologie

Department Pharmazie

betreut von Prof. M. Biel/ Prof. C. Wahl-Schott

- Graduiertenstipendium nach dem Bayerischen Eliteförderungsgesetz (BayEFG)
- Student der "Graduate School Life Science Munich", LMU

Regierung von Oberbayern

12/10 3. Staatsexamen, Approbation als Apotheker

Iris Apotheke, München

11/09 – 04/10 Praktisches Jahr im Rahmen der Approbation als Apotheker

Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München

04/05 – 07/09 Pharmaziestudium, 1. & 2. Staatsexamen (Lesmüller Preis)

10/04 – 01/05 Chemiestudium

Arbeiter-Samariter-Bund, München

10/03 – 06/04 Zivildienst

Thomas-Mann Gymnasium, München

06/03 Abitur

10.5 Publikationen

Peer reviewed Artikel

- *High Susceptibility to Fatty Liver Disease in Two-pore Channel 2 Deficient Mice;* Grimm C, Holdt LM*, Chen CC*, **Hassan SI***, Müller C, Jörs S, Cuny H*, Kissing S, Schröder B, Butz E, Northoff B, Castonguay J, Luber CA, Moser M, Spahn S, Lüllmann-Rauch R, Fendel C, Klugbauer N, Griesbeck O, Haas A, Mann M, Bracher F, Teupser D, Saftig P, Biel M, Wahl-Schott CA; Nat Commun, 2014
- *NAADP and the two-pore channel protein 1 participate in the acrosome reaction in mammalian spermatozoa;* Arndt L, Castonguay J, Arlt E, Meyer D, **Hassan S**, Borth H, Zierler S, Wennemuth G, Breit A, Biel M, Wahl-Schott C, Gudermann T, Klugbauer N, Boekhoff I; Mol Biol Cell, 2014
- *Sick Sinus Syndrome in HCN1-Deficient Mice;* Fenske S, Krause SC, **Hassan SI**, Becirovic E, Auer F,Bernard R, Kupatt C, Lange P, Ziegler T, Wotjak CT, Zhang H, Hammelmann V, Paparizos C, Biel M, Wahl-Schott CA; Circulation, 2013
- *Biocompatibility of a genetically encoded calcium indicator in a transgenic mouse model;* Direnberger S, Mues M, Micale V, Wotjak CT, Dietzel S, Schubert M, Scharr A, **Hassan S**, Wahl-Schott C, Biel M, Krishnamoorthy G, Griesbeck O; Nat Commun, 2012
- *Complex regulation of voltage-dependent activation and inactivation properties of retinal voltage-gated Cav1.4 L-type Ca2+ channels by Ca2+-binding protein 4 (CaBP4);* Shaltiel L, Paparizos C, Fenske S, **Hassan S**, Gruner C, Rötzer K, Biel M, Wahl-Schott CA; J Biol Chem, 2012

Review

- *Role of TRPML and two-pore channels in endolysosomal cation homeostasis;* Grimm C, **Hassan S**, Wahl-Schott C, Biel M; J Pharmacol Exp Ther, 2012

10.6 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Martin Biel zum einen für die Aufnahme in den Arbeitskreis und die Möglichkeit an diesem Projekt mitwirken zu können. Zum anderen möchte ich mich herzlich für die stete Förderung und die immer offene Tür bei Fragen und Problemen bedanken.

Dankbar für die finanzielle Förderung bin ich dem Elitenetzwerk Bayern und Cornelia Kellermann für ihren Einsatz und die Betreuung im Rahmen der Graduate School of Life Science.

Besonderer Dank gilt Prof. Christian Wahl, wissenschaftlich wie auch privat. Der dauerhafte und lebhafte Diskurs mit Dir war stets Ansporn und Inspiration zugleich und Quelle für meine Begeisterung an der Wissenschaft. Unsere gemeinsamen Exkurse, kulinarische wie auch geographische, machen die 4 Jahre am Lehrstuhl zu einer Zeit, reich an amüsanten Anekdoten und schönen Erinnerungen.

Ebenso herzlich möchte ich Fensko danken, Du hast mir das ganze schließlich „eingebrockt". Danke für eine großartige Freundin während dieser Zeit und wundervolle Abende mit Turbo und Popkorn.

Herr Beschirowisch, Dir danke ich zunächst für's kritische Gegenlesen. Außerdem danke ich für Deine wertvolle Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen und besondere Abende mit den besten Weinen dieser Welt, oder zumindest den teuersten.

Porsche-Michi, Dir danke ich für die Betreuung während meines ersten Jahres. Meine Hochachtung gilt besonders Deiner schier unerschöpflichen Geduld und Unterstützung. Privat nicht zu vergessen ist unsere kleine Abenteuerreise, auch dafür dank ich Dir, das sind die Momente, die bleiben.

Ein besonderer Mensch außerhalb des Labors, dem ich danke möchte, ist Dr. Felix Denk. Vielen Dank für tolle Jahre in der Iris und fortwährende Unterstützung.

Prakti und Christos, danke Euch für Freude im Laboralltag und noch freudigere Abende. An dieser Stelle möchte ich auch Henne und Mirja danken, unsere gemeinsamen Abende sind ebenfalls unvergesslich, nicht zuletzt aufgrund des ein oder anderen Video-Beweises.

Stelio, auch Dir möchte ich für wissenschaftlichen Rat und unterhaltsame Momente außerhalb des Laboralltags danken.

Russki, Dir danke ich für einmalige 6 Monate Masterarbeit.

Jan vielen Dank für einen 1A Antikörper und die wunderbaren Abende in Freiburg.

Frau Butz, Dir vielen Dank für Deine tatkäftige Unterstützung.

Xiangang und Maxo, auch Euch möchte ich herzlich für Eure tolle Unterstützung danken.

Benni, Dir danke ich als Kommilitone, Mitbewohner, Mitstreiter und natürlich als guter Freund.

Dr. Christian Grimm, auch Dir möchte ich meinen Dank aussprechen. Vielen Dank für Deine Unterstützung und Deinen kameradschaftlichen Beistand unterm Tarnnetz.

Besonderer Dank gilt natürlich auch allen weiteren Kollegen im Arbeitskreis und nicht zu vergessen den Kooperationspartnern, ohne die diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Das Beste hebt man sich bekanntlich für den Schluss auf. Und hier gebührt zwei ganz besonderen Personen mein Dank.

Spähnchen, die weltbeste Assistentin. Dir danke ich zum einen für die unzähligen Male, die Du mir mit Deiner Hilfe den Rücken frei gehalten hast und zum anderen für die Nachsicht, die Du ggü. meiner Sturheit bisweilen aufbringen musstest. Viel dankbarer bin ich jedoch für die vielen fröhlichen Abende und dein offenes Ohr zu jeder Zeit. Schön dich als Freundin zu wissen.

Kräuschen, ohne Dich wäre die Promotion mit Sicherheit einsamer und nicht halb so schön verlaufen. Es gibt 1000 Dinge, die ich jetzt hier aufzählen könnte warum, aber ich fasse mich kurz: es ist eine wunderbare Bereicherung Dich kennengelernt zu haben, mit Dir Höhen wie Tiefen in den 4 Jahren durchgestanden zu haben und am Ende eine wichtige Freundin gewonnen zu haben und ich freue mich auf die Zeit, die noch kommt.

Letztlich gilt der Dank natürlich auch den vielen wunderbaren Menschen außerhalb des Labors, die jeden Tag aufs Neue so lebenswert machen: Rakete, Pille, Bertl, Maxi, Diffi, Giove, Romansky, Vrono, Cajus, Tanjo, Corni, Joscherl, Sepp, Frizzo & Caro, Christoph, Teufel & Ratti…