

**Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. Thomas Gudermann

**Studien zur funktionellen Bedeutung
der Kationenkanalfamilie der *two-pore channels*
für exozytotische Prozesse in Mastzellen und Spermien**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Elisabeth Arlt

aus Fürstenfeldbruck

2018

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Betreuer(in):	Prof. Dr. Ingrid Boekhoff
Zweitgutachter(in):	Prof. Dr. Alexander Faussner
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL
Tag der mündlichen Prüfung:	30.10.2018

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

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. (2014). *NAADP and the Two Pore Channel Protein 1 participate in the Acrosome Reaction in Mammalian Spermatozoa*. *Molecular Biology of the Cell*.

Publikation in Vorbereitung:

Arlt, E., Fraticelli, M., O'Neill, T.J., Wennemuth, G., Breit, A., Ehrenberg, S., Stiller, S., Wahl-Schott, C., Steinritz, D., Grimm, C., Biel, M., Gudermann, T., Klugbauer, N., Zierler, S. and Boekhoff, I.

Arbeitstitel: *Augmented mast cell activity and contact hypersensitivity in mice lacking the two-pore channel TPC1*

Kooperationen:

Prof. Dr. Norbert Klugbauer, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg:
TPC1-defiziente Maus und TPC1-spezifischer Antikörper

PD Dr. Dr. Christian Grimm, Prof. Dr. Christian Wahl-Schott, Fakultät für Chemie und Pharmazie, LMU München:
TPC2-defiziente Maus und TPC2-spezifischer Antikörper

Prof. Dr. Gunther Wennemuth, Institut für Anatomie, Universität Duisburg-Essen:
Immunogold-Färbungen und transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen

Dr. Dipl.-Ing. Claudia Fecher-Trost, Allgemeine und Klinische Pharmakologie, Universität des Saarlandes:
Massenspektrometrische Analysen

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	4
3	Einleitung	6
3.1	Exozytose	6
3.1.1	Allgemein	6
3.1.2	Spezielle Formen der regulierten Exozytose	9
3.2	Mastzellen	12
3.2.1	Morphologie, Differenzierung und Lokalisation	12
3.2.2	Granulatypen, -bildung und -reifung	14
3.2.3	Immunmediatoren	15
3.2.4	Aktivierung von Mastzellen, Signaltransduktion und Ablauf der Degranulationsreaktion	16
3.2.5	Physiologische und pathophysiologische Rolle von Mastzellen	20
3.3	Intrazelluläre Ca ²⁺ -Speicher	22
3.4	<i>Two-pore channels</i>	26
3.5	Zielsetzung	32
4	Material	35
4.1	Chemikalien	35
4.2	Puffer und Stocklösungen	37
4.3	Verbrauchsmaterialien	41
4.4	Geräte	42
4.5	Antikörper	44
4.5.1	Primärantikörper	44
4.5.2	Sekundärantikörper	45
4.6	Kits, Enzyme und Größenstandards	45
4.7	Primer zur Genotypisierung	46

4.8	Versuchstiere und Zelllinien	47
5	Methoden	48
5.1	Arbeit mit Mäusen	48
5.1.1	Verwendete Mauslinien	48
5.1.2	Tierhaltung und Zucht	49
5.1.3	Genotypisierung	50
5.1.4	Erhebung von Daten zur Untersuchung des Reproduktionsphänotyps von Mäusen	52
5.2	Methoden der Zellkultur	53
5.2.1	Verwendete Zellenlinien	53
5.2.2	Kultivierung von RBL-1 Zellen	53
5.2.3	Kryokonservierung von RBL-1 Zellen	54
5.3	Isolation peritonealer Mastzellen	54
5.4	Isolation von Vorläufer-Mastzellen aus dem Knochenmark	55
5.5	Proteinbiochemische Methoden	55
5.5.1	Herstellung von totalen Zelllysaten	55
5.5.2	Isolierung von endo-lysosomalen Organellen	56
5.5.3	Gewinnung von <i>lipid rafts</i>	56
5.5.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	57
5.5.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	58
5.5.6	Western Blot Technik	58
5.5.7	Immunodetektion	59
5.5.8	Immunpräzipitation	60
5.5.9	Färbung von Oberflächenantigenen und Durchflusszytometrie	63
5.5.10	Magnetische Zellsortierung	64
5.5.11	Immuncytochemie	65
5.5.12	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	66
5.6	Funktionelle Untersuchungen an Spermien	68
5.6.1	NAADP-AM Stimulierung	68

5.6.2	<i>Zona pellucida</i> und <i>trans</i> -Ned 19 Stimulierung	69
5.7	Funktionelle Analysen an Mastzellen	71
5.7.1	Ca ²⁺ Imaging	71
5.7.2	Histamin Assay	73
5.7.3	β-Hexosaminidase Assay	74
5.7.4	Lebendzellfärbung.....	75
5.7.5	Bestimmung der Membrankapazität mittels Elektrophysiologie	77
5.8	Statistische Methoden.....	77
5.9	Erstellung von Grafiken.....	78
6	Ergebnisse	79
6.1	Die Bedeutung der TPCs für die Reproduktion	79
6.1.1	Effekte eines membranpermeablen NAADP-Analogs auf die Akrosomreaktion	79
6.1.2	Funktionelle Rolle von TPC1 für die <i>Zona pellucida</i> -induzierte Akrosomreaktion	83
6.1.3	Zuchterfolg einer TPC1 ^{-/-} Mauslinie	84
6.1.4	Reproduktionserfolg einer TPC2-defizienten Mauslinie	90
6.1.5	Zuchterfolg einer TPC1/2 Doppel-knockout Mauslinie	95
6.2	Expression von TPC1 und TPC2 in peritonealen Zellen	100
6.3	Auswirkungen der genetischen Deletion des TPC1 auf den immunologischen Phänotyp von Mäusen	105
6.4	Morphologie von Wildtyp und TPC1 KO Mastzellen.....	108
6.4.1	Elektronenmikroskopische Aufnahmen	108
6.4.2	Einfluss von TPC1 auf den pH-Wert in sauren Organellen	110
6.5	Kapazitätsmessungen.....	111
6.5.1	Maximale Stimulierung der Exozytose in Mastzellen mittels GTPγS.....	112
6.5.2	Effekte des two-pore channel Blockers Tetrandrine auf die Degranulation von Mastzellen	118
6.5.3	Einfluss von NAADP auf die Degranulation von Mastzellen	120
6.6	Ca ²⁺ -Signale in Wildtyp und TPC1-defizienten Mastzellen	126

Inhaltsverzeichnis

6.6.1	Untersuchung zytosolischer Ca ²⁺ -Signale mittels Fura-2-AM	126
6.6.2	Rolle des Ca ²⁺ aus intrazellulären Speichern bei der Degranulation	134
6.7	Intrazelluläre Lokalisation von TPC1 in Mastzellen	140
6.7.1	Nachweis von TPC1 in LAMP-1 positiven Zellfraktionen	140
6.7.2	Immunogold-Färbungen	144
6.8	Mediatorfreisetzung aus Wildtyp und TPC1 KO Mastzellen	146
6.8.1	Histamin	146
6.8.2	β-Hexosaminidase	149
6.9	Endozytose in TPC1-defizienten Mastzellen	152
6.10	Identifizierung möglicher Interaktionspartner von TPC1	156
6.10.1	Co-Immunopräzipitations-Studien	156
6.10.2	Massenspektrometrische Analyse	163
7	Diskussion	167
7.1	Funktionelle Kompensation von <i>two pore channel</i> -Subtypen in TPC-defizienten Mäusen	168
7.2	Bedeutung der two-pore channels für die NAADP-induzierte Akrosomreaktion	170
7.3	Einfluss des genetischen Stammhintergrund auf den Phänotyp des TPC1-defizienten Mausmodells	173
7.4	Rolle von TPC1 bei der Differenzierung und Migration von Mastzellen 176	
7.5	Modell zur Rolle von TPC1 bei der Ca ²⁺ -Homöostase in Mastzellen	179
7.6	Besondere Bedeutung von TPC1 für die Mastzell-Degranulation	189
7.7	TPC1 in Mastzellen und Spermien	191
8	Literaturverzeichnis	193
9	Anhang	212
9.1	Abbildungsverzeichnis	212
9.2	Tabellenverzeichnis	215
9.3	Abkürzungsverzeichnis	216

Inhaltsverzeichnis

9.4	Publikationsverzeichnis.....	220
9.4.1	Originalarbeiten.....	220
9.4.2	Tagungsbeiträge.....	220
9.5	Eidesstattliche Versicherung.....	222
9.6	Danksagung.....	223

1 Zusammenfassung

Mastzellen kommen vorwiegend an Kontaktstellen des Organismus mit der Umwelt vor und übernehmen eine zentrale Rolle im Rahmen der angeborenen und der erworbenen Immunabwehr insbesondere bei der IgE-induzierten Soforttyp-Allergie. Als Reaktion auf eine Aktivierung geben Mastzellen eine Reihe von Immunmediatoren frei, die im Ruhezustand der Zelle in den zahlreichen, für Mastzellen charakteristischen, großen Granula gespeichert sind. Die Freisetzung der Immunmediatoren aus den sekretorischen Granula erfolgt dabei durch Ca^{2+} -abhängige Exozytose (Degranulation), wobei das dafür benötigte Ca^{2+} zu einem großen Teil aus intrazellulären Speichern stammt. Neben dem Endoplasmatischen Retikulum kommt auch den sauren Organellen, wie dem für die intrazelluläre Verdauung zuständigen endo-lysosomalen System, eine wichtige Ca^{2+} -Speicherfunktion zu. Die Freisetzung von Ca^{2+} aus Endo- und Lysosomen erfolgt durch den *second messenger* NAADP. Der Ligand NAADP aktiviert dann die kürzlich entdeckten sogenannten *two-pore channels* (TPCs) in endo-lysosomalen Organellen, die dann die Freisetzung von Ca^{2+} ermöglichen.

Um die funktionelle Relevanz der TPCs für die Degranulation zu erfassen, wurden peritoneale Mastzellen aus Wildtyp und TPC-defizienten Mäusen isoliert und die Exozytose der Granula mit Hilfe elektrophysiologischer Kapazitätsmessungen und *live cell* Ca^{2+} -Imaging Methoden untersucht. Obwohl beide TPC-Subtypen, TPC1 und TPC2, in peritonealen Zellen von Wildtyp-Mäusen nachgewiesen werden konnten, zeigten die elektrophysiologischen Kapazitätsmessungen, dass speziell TPC1-defiziente Mastzellen eine signifikant erhöhte Amplitude der Degranulationsreaktion aufweisen. Diese Zunahme der Kapazität konnte an Wildtyp-Mastzellen durch den TPC-Blocker Tetrandrine bestätigt werden. Die Applikation von NAADP führte hingegen zu einer Reduktion der Degranulationsamplitude. Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnte eine erhöhte Zahl bzw. Vergrößerung der Granula in den TPC1-defizienten Mastzellen als Ursache für diesen auffälligen Phänotyp ausgeschlossen werden. Allerdings zeigten die durchgeführten Ca^{2+} -Imaging Versuche mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM, dass TPC1-defiziente Mastzellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen, sowohl nach Blockierung der Ca^{2+} -ATPase des Sarko-/Endoplasmatischen Retikulums durch Thapsigargin als auch nach Aktivierung der Mastzellen durch IgE, erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Signale aufwiesen. Diese Unterschiede blieben auch in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} bestehen, was darauf hindeutet, dass die genetische Deletion von TPC1 zu einer Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration in den intrazellulären Speichern führt. Tatsächlich wurden nach Stimulation der Mastzellen mit der Lysosomen-destabilisierenden Substanz GPN

kleinere Ca^{2+} -Signale im Zytosol von TPC1-defizienten Mastzellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen registriert. Mit Hilfe des niedrig-affinen Ca^{2+} -bindenden Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2FF konnte zusätzlich beobachtet werden, dass eine TPC1 Deletion zu einer erhöhten Ca^{2+} -Konzentration im ER führt. Die verstärkte Degranulation der TPC1-defizienten Mastzellen spiegelte sich auch in einer erhöhten Ausschüttung des Immunmediators Histamin im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen wieder. Jüngste Studien ergaben, dass NAADP und TPCs an der Entstehung von Membrankontaktstellen zwischen dem ER und dem endo-lysosomalen System, sogenannten *nanojunctions*, beteiligt sind. Meine Ergebnisse lassen vermuten, dass die Aktivierung der Mastzellen zu einer NAADP/TPC-abhängigen Erhöhung der Anzahl dieser *nanojunctions* führt. Dies würde in einer verstärkten Pufferkapazität des endo-lysosomalen Systems und einer reduzierten Degranulation der Mastzellen resultieren. Diese Arbeitshypothese konnte durch Co-Immunopräzipitationsstudien und anschließende massenspektrometrische Analysen zur Identifizierung potenzieller TPC1-Interaktionspartner, die als „ER-Lysosomen-Bindeglieder“ fungieren könnten, unterstützt werden. In den TPC1-Immunopräzipitaten konnten unter anderem das in der ER-Membran lokalisierte *vesicle-associated membrane protein-associated protein A* (VAP A) bzw. das Chaperon *glucose-related protein 75* (GRP75), das bereits als Bindeglied zwischen dem ER und Mitochondrien beschrieben wurde, nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu Mastzellen enthalten Spermien nur ein einzelnes riesiges Lysosomverwandtes Vesikel, das Akrosom, das als Speicher für Ca^{2+} dient. Die Fusion des Akrosoms mit der Plasmamembran ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Verschmelzung mit der Eizelle. Nachdem der TPC1 von uns bereits in der akrosomalen Membran von Mauspermien nachgewiesen wurde, konnte ich im Rahmen dieser Arbeit eine funktionelle Relevanz des TPC1 für die akrosomale Exozytose zeigen. Die durch isolierte *Zona pellucida* ausgelöste Akrosomreaktion war durch die Zugabe des NAADP-Antagonisten *trans-Ned 19* teilweise blockierbar. Obwohl dieser Befund darauf hindeutet, dass diese Akrosomreaktion durch NAADP/TPC-abhängige Prozesse vermittelt wird, zeigten unsere Zuchtansätze mit TPC-defizienten Elterntieren überraschenderweise, dass eine genetische Deletion eines TPC-Subtyps nur geringe Auswirkungen auf den Fortpflanzungserfolg der Mäuse hat. Die sich dadurch andeutende funktionelle Kompensation der beiden TPCs konnte durch Verpaarungsansätze mit TPC1/2-doppelt-defizienten Zuchtpaaren unterstützt werden, deren Fortpflanzungseffizienz drastisch reduziert war.

Mit Hilfe der beiden unterschiedlichen Exozytose Modellsysteme, der Mastzelle und des Spermiums, konnte insgesamt gezeigt werden, dass TPCs an exozytotischen Prozessen in beiden Zellsystemen beteiligt sind. Dabei ergaben die durchgeführten Experimente

auch, dass je nach physiologischer Aufgabe des Zelltyps, die NAADP/TPC-vermittelten Ca^{2+} -Signale eine andere Funktion übernehmen könnten: Während sie in den männlichen Keimzellen dafür sorgen, dass es zur vollständigen Fusion des Akrosoms kommt, erhöhen die TPCs in Mastzellen die Ca^{2+} -Pufferkapazität des endo-lysosomalen Systems, so dass die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration und damit die Degranulationsreaktion je nach Stimulus gezielt reguliert werden kann. Inwieweit eine Fehlfunktion der TPCs zu pathophysiologischen Veränderungen führen kann, muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

2 Summary

Mast cells mainly reside in tissues with close contact to the environment and are involved in innate and adaptive immunity, especially in IgE-induced immediate hypersensitivity. Upon activation, mast cells can release a plethora of immune mediators, which are stored in a large number of secretory granules under resting conditions. Granule release or degranulation is a Ca^{2+} -dependent exocytotic process. The necessary Ca^{2+} is largely provided by intracellular stores like the endoplasmic reticulum (ER) or acidic organelles. Release of Ca^{2+} from acidic stores, e.g. the endo-lysosomal system, is mediated through the second messenger NAADP by activation of its recently identified targets the two-pore channels (TPCs), which are localized in the endo-lysosomal membranes. To understand the functional role of TPCs in mast cell degranulation, secretory granule exocytosis was analysed in isolated peritoneal mast cells by means of electrophysiological capacitance recordings and live cell Ca^{2+} -imaging. Though expression of both TPC subtypes TPC1 and TPC2 was verified in wildtype mast cells, capacity recordings showed an elevated degranulation amplitude, especially in TPC1-deficient mast cells. This phenotype was also observed in wildtype mast cells after treatment with the TPC inhibitor tetrandrine, whereas application of NAADP resulted in a reduced degranulation efficiency. Electron microscopy images proved that neither an elevated number of secretory granules nor an increase in granule size was responsible for the elevated degranulation amplitude in TPC1-deficient mast cells. However, imaging studies using the fluorescent Ca^{2+} -indicator Fura-2-AM provided evidence that cytosolic Ca^{2+} -levels were increased in TPC1-deficient mast cells compared to wildtype cells after inhibition of the Ca^{2+} -ATPase responsible for Ca^{2+} -reuptake in to the ER by thapsigargin, as well as after activation of mast cells by IgE. Elevated Ca^{2+} -levels were still detected in absence of extracellular Ca^{2+} , indicating that genetic deletion of TPC1 results in altered Ca^{2+} concentrations of intracellular stores in mast cells. Indeed, by applying the low-affinity fluorescent Ca^{2+} dye Fura-2FF it was possible to determine that the ER Ca^{2+} concentration was higher in TPC1-deficient mast cells. In addition, application of the lysosome-disrupting agent GPN led to reduced cytosolic Ca^{2+} -signals in TPC1-deficient mast cells compared to wildtype control cells. Likely as a result of increased degranulation, secretion of histamine was elevated in TPC1 knockout mast cells.

Recent studies established that NAADP and TPCs are involved in the formation of ER-Endosome/Lysosome membrane contact sites, or nanojunctions. One could speculate that mast cell activation leads to an increase in the number of nanojunctions in an NAADP/TPC-dependent manner, enhancing the Ca^{2+} -buffer capacity of the endo-lysosomal system and thereby modulating mast cell degranulation. In agreement with

this hypothesis, co-immunoprecipitation studies combined with mass spectrometry analysis identified several proteins that are already associated with intracellular Ca^{2+} -store interplay, e.g. *vesicle-associated membrane protein-associated protein A* (VAP A) and *glucose-related protein 75* (GRP75), as potential TPC1 interaction partners.

In contrast to mast cells, sperm contain a single huge lysosome-related organelle, the acrosome, that serves as a Ca^{2+} -store. Fusion of the acrosome with the sperm plasma membrane is an essential prerequisite for fertilisation. Since our group previously demonstrated that TPC1 is localized in the acrosomal membrane of mouse sperm, my studies concerning the functional relevance of TPC1 in acrosomal exocytosis showed that the *zona pellucida*-induced acrosome reaction could be partially blocked by addition of the NAADP antagonist *trans*-Ned 19. Though these results indicate that NAADP and TPC1 mediate the physiological acrosome reaction, hardly any limitations regarding the reproductive success of mice lacking only one TPC subtype were observed. That this could be due to a functional compensation of the two TPC subtypes is further stressed by the drastically reduced reproduction efficiency of TPC1/2 double knockout breeding pairs.

Using mast cells and sperm as model systems for exocytosis, it could be demonstrated that the TPC subtypes are involved in exocytotic processes of both cell types. However, the conducted experiments showed that the functional role of NAADP/TPC1 Ca^{2+} signals is dependent on the physiological context. In sperm, TPC function is probably required to ensure complete fusion of the acrosomal vesicle, leading to the overall exposure of the inner acrosomal membrane. In mast cells, however, TPCs presumably mediate endo-lysosomal Ca^{2+} -buffering capacity and thereby specifically control cytosolic Ca^{2+} concentration and degranulation according to different stimuli. Further studies will be needed to assess whether TPC dysfunctions could lead to pathophysiological alterations like mast cell activation syndrome.

3 Einleitung

Als intrazellulärer Botenstoff hat Calcium (Ca^{2+}) eine universelle Bedeutung für diverse zelluläre Prozesse, zu denen unter anderem die Proliferation, Differenzierung und Fertilisation zählen (M. J. Berridge et al., 2000). Eine zelluläre Ca^{2+} -abhängige Funktion, die von großer Bedeutung für die Regulation einer Reihe physiologischer Abläufe ist, sind intrazelluläre Membranfusion-Prozesse, zu denen auch die Exozytose zählt. In den nachfolgenden Abschnitten werden die Prinzipien der Exozytose detaillierter vorgestellt. Da das für die Verschmelzung der Membranen benötigte Ca^{2+} sowohl aus dem extrazellulären Raum als auch aus intrazellulären Speichern stammt (Barclay et al., 2005), werden die Mechanismen zur Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ebenfalls kurz zusammengefasst und zusätzlich die bisher bekannte Rolle der Ca^{2+} -leitenden *two-pore channels* in diesem Zusammenhang erläutert.

3.1 Exozytose

3.1.1 Allgemein

Bezüglich der verschiedenen Formen der Exozytose ist bekannt, dass in nahezu allen Zellen die sogenannte konstitutive Form der Exozytose auftritt, die unter anderem dazu dient, die Plasmamembran durch den Einbau von Membranen zu erneuern, wobei gleichzeitig bestimmte Proteine in den Extrazellularraum abgegeben werden (Burgess und Kelly, 1987). Dem gegenüber steht die regulierte oder auch stimulierte Form der Exozytose, die in eher spezialisierten Zelltypen, wie z. B. Neuronen oder neurosekretorischen Zellen abläuft. Durch einen Reiz oder Stimulus kommt es zur Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration; Ca^{2+} bewirkt dann, dass vorgeformte Vesikel mit der Plasmamembran verschmelzen und dabei den gespeicherten Inhalt (z. B. Neurotransmitter oder Hormone) in den extrazellulären Raum freisetzen (Burgoyne und Morgan, 2003; L. G. Wu et al., 2014).

Hinsichtlich des Mechanismus, der zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt, sind für verschiedene physiologische Prozesse unterschiedliche Regulationsprozesse realisiert:

(i) Bei der regulierten Exozytose an der neuronalen Synapse resultiert ein ankommendes elektrisches Signal in Form eines Aktionspotenzials in der Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran. Durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verschmelzen anschließend synaptische Vesikel mit der präsynaptischen Membran, wodurch gespeicherte Neurotransmitter freigesetzt werden (Sudhof, 2004).

(ii) Bezüglich der Sekretion von Hormonen, wie z. B. Insulin aus pankreatischen β -Zellen, wird zur Zeit angenommen, dass die Erhöhung des Glukose-Spiegels im Blut dazu führt, dass es in den Zellen über die Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) zur Schließung von Kalium-Kanälen und somit zur Membrandepolarisation kommt. Dadurch werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle aktiviert und so die Fusion der Insulin-haltigen sekretorischen Vesikel mit der Membran ausgelöst (MacDonald et al., 2005). Exozytotische Prozesse spielen aber auch in vielen Zelltypen des Immunsystems eine wichtige Rolle: So eliminieren beispielsweise zytotoxische T-Zellen infizierte Zellen durch die exozytotische Freisetzung von zytolytischen Proteinen, wie Granzym B und Perforin, aus sekretorischen Granula an der immunologischen Synapse zwischen beiden Zellen (Davis et al., 2012). Die für die Fusion der Granula mit der Plasmamembran notwendige Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wird dabei durch die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern sowie durch den Speicher-abhängigen Einstrom von Ca^{2+} (*store-operated Ca^{2+} entry*, SOCE) gewährleistet (Davis et al., 2012).

Der eigentliche Vorgang der Exozytose ist relativ komplex und lässt sich in mehrere funktionelle Teilreaktionen untergliedern, wobei die einzelnen Phasen ineinander übergehen und so nicht exakt voneinander abgegrenzt werden können (Verhage und Sorensen, 2008). Während des *tetherings* findet eine initiale Anlagerung der Vesikel an die Plasmamembran statt, die im weiteren Verlauf des *dockings* stabilisiert wird. Anschließend kommt es zu umfangreichen ATP-abhängigen Reifungsprozessen, die insgesamt als *priming* Reaktionen zusammengefasst werden; die Vesikel erlangen dabei ihre volle „Sekretions-Kompetenz“ und können dann im finalen Prozess der *fusion* mit der Zielmembran verschmelzen (Burgoyne und Morgan, 2003; Verhage und Sorensen, 2008).

Für die Initiierung und den Ablauf der einzelnen Teilschritte der Exozytose sind sowohl die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration (Burgoyne, 1995), als auch die Beteiligung einer Reihe konservierter Regulatorproteine von Bedeutung (Sudhof und Rothman, 2009). Diese Proteine umfassen vor allem die Mitglieder der *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor* (SNARE)-Familie, die SNARE-bindenden Sec1/Munc18 (SM) Proteine, *N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor* (NSF) Proteine sowie Rab-GTPasen und Proteine der Adapterfamilie der *cytomatrix of the active zone* (CAZ) (Sudhof, 2012; Kittel und Heckmann, 2016). Bezüglich des funktionellen Zusammenspiels dieser konservierten Proteine während der Fusionsporenbildung ist bekannt, dass auf gegenüberliegenden Membranen lokalisierte SNARE Proteine (v-SNAREs auf vesikulären, t-SNAREs auf Ziel (*target*)-Membranen) einen *trans*-Komplex bilden. Durch die Verflechtung von vier Helices, die jeweils das typische 60-70

Aminosäuren umfassende, konservierte SNARE-Motiv enthalten, rücken die Membranen näher zusammen, bis es schließlich zur Bildung der Fusionspore kommt (Sutton et al., 1998) (s. Abb. 1).

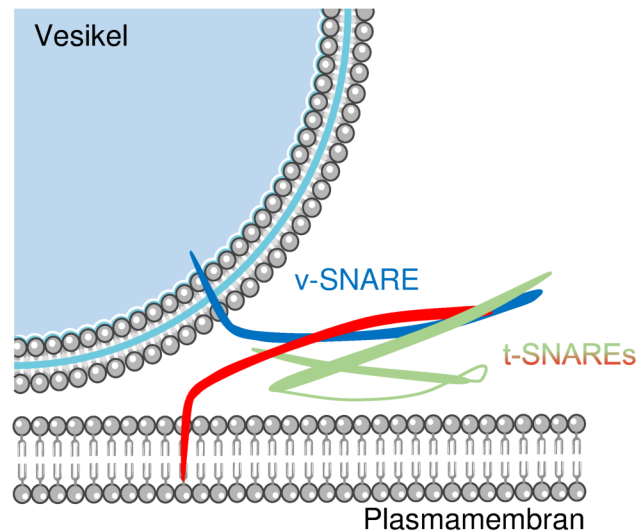


Abb. 1 Aufbau des *trans*-SNARE-Komplexes.

Sowohl in der vesikulären Membran als auch in der Plasmamembran sind SNARE-Proteine verankert, die über ein konserviertes 60-70 Aminosäuren umfassendes SNARE-Motiv miteinander interagieren. Dabei kommt es durch die Verflechtung der Helices der vesikulären (v)-SNAREs und der auf der Seite der Plasmamembran lokalisierten *target* (t)-SNAREs zu einer räumlichen Annäherung der Membranen und letztendlich zur Bildung der Fusionspore.

SM-Proteine können an das t-SNARE-Protein Syntaxin binden und unterstützen so den Fusionsprozess (Sudhof und Rothman, 2009). Auch Rab-GTPasen spielen im aktivierten GTP-gebundenen Zustand eine Rolle beim *docking* der Vesikel sowie dem eigentlichen Fusionsprozess (Jahn et al., 2003). Die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an Ca^{2+} -Sensorproteine, wie das Synaptotagmin, und deren Interaktion mit SNARE-Proteinen und Phospholipiden in der Membran ist schließlich der finale Auslöser für die Fusion der Membranen (Burgoyne und Morgan, 2003; Jahn et al., 2003; Barclay et al., 2005). Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration kann dabei durch verschiedene Mechanismen, wie z. B. die Ca^{2+} -Pufferkapazität von Mitochondrien, reguliert werden, wodurch die Amplitude sowie der zeitliche Ablauf der Exozytose gesteuert werden kann (Burgoyne und Morgan, 2003; Dolensek et al., 2011). Ca^{2+} spielt aber auch bereits vor der exozytotischen Fusion eine wichtige Rolle für den Reifungsprozess der Vesikel (Voets, 2000). Für die räumliche und zeitliche Organisation der exozytotischen Prozesse sind die CAZ-Proteine verantwortlich. Diese Gruppe von Proteinen, zu der beispielsweise das *Rab3-interacting molecule* (RIM) wie auch die durch ihre enorme Größe ausgezeichneten Adapterproteine Bassoon und Piccolo zählen, bilden eine Art Proteingerüst an der aktiven Zone und koordinieren durch die zeitlich und räumlich kontrollierte Interaktion mit

SNAREs sowie weiteren Regulatorproteinen der Exozytose den Fusionsprozess (Sudhof, 2012; Kittel und Heckmann, 2016).

Nach Bildung der Fusionspore kann diese wieder geschlossen und erneut geöffnet werden (*kiss-and-run*) oder sich vergrößern, sodass es zu einer vollständigen Verschmelzung (*full fusion*) des Vesikels mit der Plasmamembran kommt (Burgoyne und Morgan, 2003; Vardjan et al., 2013). Durch die Fusion befinden sich alle Komponenten des SNARE-Komplexes in derselben Membran. Dadurch wird aus dem *trans*- ein *cis*-SNARE-Komplex, der wiederum durch NSF-Proteine ATP-abhängig disassembliert wird, was dazu führt, dass die einzelnen Komponenten für einen erneuten Einsatz zur Verfügung stehen (Baker und Hughson, 2016). Die integrierte Vesikelmembran wird anschließend durch Endozytose wieder gewonnen (Li und Chin, 2003; Ceridono et al., 2011).

Die beschriebene Fusionsmaschinerie ist nicht nur für die Exozytose von Vesikeln an der Plasmamembran essentiell, sondern auch an der Fusion von Vesikeln miteinander (z. B. bei der Reifung von Vesikeln oder während des endo-lysosomalen Transports) beteiligt (Chen und Scheller, 2001; Ungermann und Langosch, 2005). Der Ablauf des Fusionsprozesses folgt dabei dem oben beschriebenen Schema; die beteiligten Subtypen der SNARE-, SM- und Rab-Proteinfamilien variieren allerdings je nach Fusionstyp (z. B. *kiss-and-run* oder *full fusion*) und Zelltyp (Jahn et al., 2003).

3.1.2 Spezielle Formen der regulierten Exozytose

Eine spezialisierte Form der Exozytose ist die Akrosomreaktion in Spermien, die Voraussetzung für eine erfolgreiche Fertilisation ist. Das Akrosom ist ein einzelnes, Lysosom-verwandtes, saures Vesikel, das gleichzeitig als intrazelluläres Speicherorganell für Ca^{2+} und hydrolytische Enzyme dient und im Spermienkopf lokalisiert ist (Herrick et al., 2005; Berruti et al., 2010; Borg et al., 2010). Durch den Kontakt mit der Eizelle kommt es zu einer Ca^{2+} -abhängigen Verschmelzung der äußeren akrosomalen Membran mit der Plasmamembran und somit zur Freisetzung der gespeicherten hydrolytischen Enzyme (Barros et al., 1967; Darszon et al., 2006). Diese verdauen die *Zona pellucida*, eine die Eizelle umgebende Hülle, um so eine Fusion mit dem Spermium zu ermöglichen. Im Unterschied zu exozytotischen Prozessen in anderen sekretorischen Zellen findet die Akrosomreaktion einmalig nach dem alles-oder-nichts Prinzip statt und damit ohne die Notwendigkeit einer anschließenden Membran-Wiedergewinnung (Arnoult et al., 1996; Mayorga et al., 2007).

Im Vorfeld der Akrosomreaktion wandern die Spermien auf dem Weg zur Oozyte durch den Eileiter und durchlaufen am Isthmus, dem proximalen Abschnitt des Eileiters, einen durch das Bicarbonat-haltige Milieu ausgelösten Prozess, der als Kapazitierung bezeichnet wird (Boatman und Robbins, 1991; Salicioni et al., 2007). Dabei kommt es

zu Veränderungen der Membranfluidität (Harrison und Gadella, 2005) und zur Steigerung der Motilität der Spermien (Hyperaktivierung) (Marquez und Suarez, 2004) sowie zum *docking* des akrosomalen Vesikels an die Plasmamembran (Tsai et al., 2012). Der Kontakt des Spermiums mit der *Zona pellucida*, bzw. die Bindung von Glykoproteinen (beispielsweise ZP3 in der Maus) an einen oder mehrere noch nicht identifizierte/n Rezeptor/en auf der Spermienoberfläche, resultiert in einem initialen Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran des Spermiums. Des Weiteren führt die Glykoprotein-Bindung zur Aktivierung der Spermien-spezifischen Phospholipase C (PLC) ζ (Nomikos et al., 2017), die die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ($\text{PI}(4,5)\text{P}_2$) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) katalysiert. IP_3 bindet an den IP_3 -Rezeptor (IP_3R) in der äußeren akrosomalen Membran (Walensky und Snyder, 1995) und sorgt so für einen lang anhaltenden Ca^{2+} -Ausstrom aus dem Akrosom (s. Abb. 2).

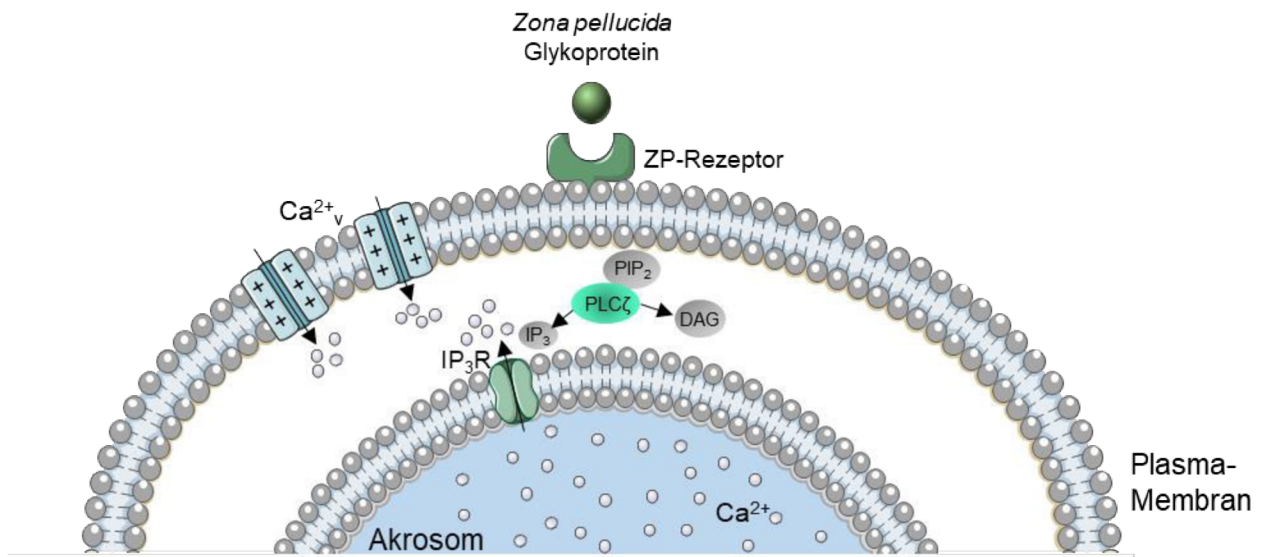


Abb. 2 Schematische Darstellung der molekularen Vorgänge während der Akrosomreaktion.

Durch die Bindung von in der *Zona pellucida* enthaltenen Glykoproteinen an einen noch nicht identifizierten Rezeptor in der Plasmamembran von kapazitierten Spermien kommt es zunächst zur Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (Ca^{2+v}) in der Plasmamembran und somit zu einem initialen Einstrom von Ca^{2+} in das Spermien Zytosol. Des Weiteren führt der Kontakt mit der *Zona pellucida* zur Aktivierung der Spermien-spezifischen PLC ζ , die $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ in DAG und IP_3 spaltet. IP_3 bindet wiederum an den IP_3 -Rezeptor ($\text{IP}_3\text{-R}$) in der akrosomalen Membran, wodurch Ca^{2+} aus dem Akrosom freigesetzt wird. Die Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration führt schließlich zur Verschmelzung der akrosomalen Membran mit der Plasmamembran und zur Freisetzung von hydrolytischen Enzymen.

Das akrosomale Ca^{2+} ist essentiell für die finale Fusion der Membranen und alleine bereits ausreichend für den Ablauf der Akrosomreaktion (Herrick et al., 2005; Publicover et al., 2007; Maximov et al., 2009; Tsai et al., 2012). Die im Cytoplasma akkumulierenden

Ca^{2+} -Ionen können von Ca^{2+} -Sensorproteinen gebunden werden. Dadurch wird dann die unter anderem durch SNARE-Proteine und Rab-GTPasen (im Besonderen Rab3a (Yunes et al., 2000)) vermittelte Bildung von hunderten von Fusionsporen ermöglicht (De Blas et al., 2005). Dabei finden die Fusionsereignisse keineswegs zufällig über die Membran verteilt statt, sondern beginnen im posterioren Bereich des Akrosoms und setzen sich räumlich gerichtet bis zur Spitze des Akrosoms fort (Buffone et al., 2009). In Spermien konnte speziell die Beteiligung der t-SNAREs Syntaxin 3 und SNAP 23 und des v-SNAREs VAMP 2 bei der Bildung eines SNARE-Komplexes sowie des SNARE-Komplex Interaktionsproteins Complexin 2 gezeigt werden (Tsai et al., 2012).

Die Akrosomreaktion hat allerdings nicht nur die Freisetzung hydrolytischer Enzyme zur Folge, sondern ist vor allem auch Voraussetzung für die Freilegung der inneren akrosomalen Membran, die nach Ablauf der Reaktion als neue Plasmamembran fungiert (Primakoff und Myles, 2007). In der inneren akrosomalen Membran konnte das Protein Izumo (japanisch für „Hochzeitsschrein“) identifiziert werden (Inoue et al., 2005), das zusammen mit seinem auf der Eizellmembran lokalisierten Rezeptor Juno (römische Göttin der Fruchtbarkeit) essentiell für die Fusion von Spermium und Eizelle und somit für die Bildung der Zygote ist (Bianchi et al., 2014). Die geringe Affinität zwischen Juno und Izumo war dafür verantwortlich, dass die Interaktion der beiden Proteine trotz intensiver Bemühungen erst einige Zeit nach der Entdeckung von Izumo beschrieben werden konnte. Um diese schwache Affinität auszugleichen, bedarf es möglicherweise einer Vielzahl von Juno-Izumo-Interaktionen (Bianchi et al., 2014). Deshalb ist anzunehmen, dass die Freilegung eines möglichst großen Teils der inneren akrosomalen Membran und damit vieler Izumo Moleküle durch eine vollständig ablaufende Akrosomreaktion besonders wichtig ist (Nele Weber, 2014).

Eine weitere spezielle Form der Exozytose ist die Degranulation von Mastzellen. Mastzellen spielen sowohl im angeborenen als auch im erworbenen Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Generierung von Immunantworten sowie bei der Entstehung von Allergien (Shelburne und Abraham, 2011). Im Gegensatz zu Spermien, die nur ein großes sekretorisches Vesikel enthalten, besitzen Mastzellen eine Vielzahl von Vesikeln (sekretorische Granula), die ebenfalls Ca^{2+} -abhängig mit der Plasmamembran aber auch miteinander verschmelzen können (Azouz et al., 2014). Im Unterschied zur akrosomalen Exozytose in Spermien können die sekretorischen Granula nach ihrer Fusion mit der Plasmamembran durch Endozytose wiedergewonnen werden, und die Degranulationsreaktion kann erneut ablaufen (Balseiro-Gomez et al., 2016). Zusätzlich können in Mastzellen während der Degranulation verschiedene Formen der Exozytose,

wie z. B. die Verbund- oder *compound* Exozytose, auftreten (Pickett und Edwardson, 2006).

Seit der Entdeckung der Mastzellen im Jahr 1876 durch Paul Ehrlich konnten viele Erkenntnisse über die Funktionen und physiologischen Rollen dieser Immunzellen gewonnen werden (Ghably et al., 2015). Dennoch sind weder die molekularen Abläufe noch die verschiedenen Regulationsmechanismen während der Degranulation vollständig aufgeklärt (Theoharides et al., 2012; Azouz et al., 2014). Mastzellen stellen hinsichtlich der Exozytose, vor allem wegen der Vielzahl der Granula und der verschiedenen Formen der Exozytose, im Vergleich zu Spermien, ein sehr konträres, besonders spezialisiertes Zellsystem dar. Um die Besonderheiten der Mastzellen bezüglich der Exozytose und damit ihrer physiologischen Funktion einordnen zu können, soll im Folgenden ausführlicher auf deren Morphologie, Entstehung, Aktivierung und Funktionen eingegangen werden.

3.2 Mastzellen

3.2.1 Morphologie, Differenzierung und Lokalisation

Im Rahmen seiner Doktorarbeit beschrieb Paul Ehrlich 1878 Mastzellen als besonders auffällig, da sie ungewöhnlich große Granula in ihrem Zytoplasma aufweisen. Er ging fälschlicherweise davon aus, dass diese Granula phagozytierte Nährstoffe enthalten und die Zellen deshalb für die Versorgung des umliegenden Gewebes zuständig wären. Auf Grund dieser Annahme bezeichnete er diesen Zelltyp als „Mastzellen“ (Ehrlich, 1878; Crivellato et al., 2003a).

Tatsächlich besitzt eine Mastzelle zwischen 50 und 200 sekretorische Granula, die Immunmediatoren, wie z. B. Histamin, Serotonin, lysosomale Enzyme, Proteasen, Cytokine oder Wachstumsfaktoren, enthalten (da Silva et al., 2014). Murine Mastzellen haben einen Durchmesser von ca. 5-10 µm (Voehringer, 2013) und weisen eine runde bis elliptische Form auf (Stone et al., 2010). Die Zellen enthalten neben einem ebenfalls runden bis ovalen Nukleus einige Mitochondrien und sehr viele freie Ribosomen, dafür aber nur wenige Bereiche mit rauem Endoplasmatischem Retikulum (ER) (G. Molderings, 2010).

Im Knochenmark entwickeln sich hämatopoetische Stammzellen zu Mastzell-Vorläuferzellen (*mast cell progenitors*; MCP); die letztendliche Differenzierung zu reifen Mastzellen findet allerdings nicht im Knochenmark statt, sondern nach Einwanderung der MCPs in das periphere Gewebe (s. Abb. 3). Charakteristisch für reife Mastzellen ist die Expression des *stem cell factor* (SCF)-Rezeptors c-Kit (CD117) und des Fcε-Rezeptors (FcεR) I auf der Oberfläche (Dahlin et al., 2015). Damit sind Mastzellen die

einzigsten Zellen hämatopoetischen Ursprungs, die nach der Differenzierung weiterhin c-Kit exprimieren.

Für eine Migration der im Blut zirkulierenden Vorläuferzellen zu einem Zielort ist eine bestimmte Zusammensetzung aus Integrinen, Adhäsionsmolekülen, Chemokinen, Cytokinen und Wachstumsfaktoren nötig. So führt z. B. eine Expression von CXCR2 zu einer Einwanderung in den Dünndarm, wo es durch die Interaktion von $\alpha 4\beta 7$ Integrinen auf MCPs mit VCAM-1 Integrinen auf dem Dünndarm-Epithel zu einer Bindung der MCPs (Collington et al., 2011) und schließlich unter dem Einfluss von Cytokinen und SCF zur Differenzierung zu reifen Mastzellen kommt (Okayama und Kawakami, 2006). Die Freisetzung von Immunmediatoren und Wachstumsfaktoren aus Mastzellen im Zuge eines Entzündungsprozesses kann ebenfalls zu einer Rekrutierung von MCPs in die betreffende Region führen (Gruber et al., 1994; Balzar et al., 2005).

Mastzellen sind in allen vaskularisierten Geweben, wie z. B. in Schleimhäuten und Epithelien, zu finden. In Nagern kommen sie zudem auch im thorakalen und peritonealen Raum vor (da Silva et al., 2014). Für die Rekrutierung der Mastzellen in das Peritoneum sind wiederum Integrine wie Mac-1 und Interleukin (IL)-3 verantwortlich (de Cassia Campos et al., 2014). Typischerweise sind Mastzellen in Bereichen lokalisiert, an denen der Organismus in Kontakt mit der Umwelt tritt, z. B. dem gastrointestinalen und respiratorischen Trakt sowie der Haut (Galli und Tsai, 2010). Sie befinden sich dabei in den Bereichen unterhalb des Epithels, in der Umgebung von Blutgefäßen, Nerven, glatten Muskelzellen, Schleimdrüsen und Haarfollikeln (Galli et al., 2005).

Es existieren zwei verschiedene Typen von Mastzellen: Zum einen die in den Schleimhäuten vorkommenden Mastzellen (Mukosa-Mastzellen), die nur Tryptasen produzieren; zum anderen die Bindegewebs-Mastzellen, die zusätzlich auch noch Chymasen und Carboxypeptidasen produzieren, und zu denen auch die peritonealen Mastzellen zählen (Irani et al., 1986; Metcalfe et al., 1997; Miller und Pemberton, 2002; Schwartz, 2006; Pejler et al., 2010) (s. Abb. 3). Des Weiteren unterscheiden sich Bindegewebs-Mastzellen durch die größere Menge an freigesetztem Histamin und Prostaglandin D₂ von Schleimhaut-Mastzellen (Heavey et al., 1988).

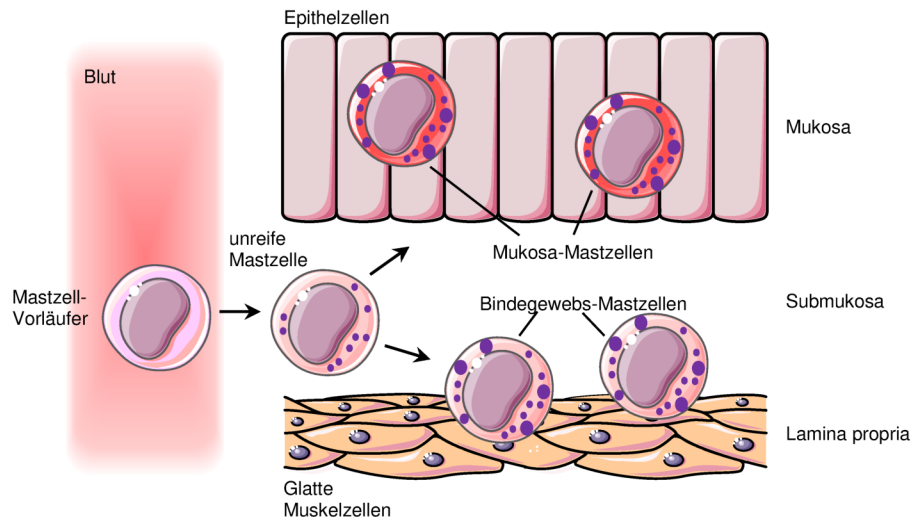


Abb. 3 Entwicklung und Lokalisation verschiedener Mastzell-Subtypen.

Im Blut zirkulierende Mastzell-Vorläuferzellen wandern in verschiedene Gewebe ein und differenzieren dort zu reifen Mastzellen. Die Zusammensetzung von verschiedenen Cytokinen und Wachstumsfaktoren in den Geweben hat einen Einfluss auf den Phänotyp der Mastzellen. Es wird grundsätzlich zwischen Mukosa-Mastzellen, die in den Schleimhäuten zu finden sind, und Bindegewebs-Mastzellen, in den tieferen Schichten, unterschieden. Verändert nach (Galli et al., 2008)

3.2.2 Granulatypen, -bildung und –reifung

Die sekretorischen Granula (auch sekretorische Lysosomen) in Mastzellen lassen sich nach einem Model von Raposo und Kollegen (Raposo et al., 1997) auf der Basis ihres Inhalts in drei Untergruppen einteilen. Die zugrundeliegenden Befunde stammen aus Versuchen mit Mastzellen, die aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark generiert wurden (*bone marrow-derived mast cells*, BMMC). Typ I Granula enthalten Cathepsin D und weisen den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) II, den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR) und die lysosomalen Markerproteine LAMP1 und 2 auf. Möglicherweise handelt es sich dabei um ein klassisches Lysosom. Granula vom Typ II entsprechen eventuell späten sekretorischen Lysosomen und enthalten zusätzlich zu MHCII, M6PR, LAMP1 und 2 auch VAMP-8, Serotonin und Histamin. In Typ III Granula sind weder MHCII noch die beiden LAMP Subtypen zu finden. Sie beinhalten neben M6PR und VAMP-8 auch Serotonin und *tumor necrosis factor* (TNF). In allen Granulatypen ist zudem das Enzym β -Hexosaminidase vorhanden.

Diese Einteilung konnte *in vivo* allerdings noch nicht bestätigt werden, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass noch weitere Granulatypen existieren (Moon et al., 2014).

Die Entstehung der sekretorischen Granula beginnt am *trans*-Golgi-Netzwerk. Dort werden sogenannte *small fusogenic granules* abgeschnürt, die miteinander fusionieren und unreife pro-Granula bilden. Für die Entstehung von reifen sekretorischen Granula sind mehrere Fusionsereignisse mit anderen unreifen oder reifen Granula nötig (Hammel

et al., 2010). Obwohl die genauen molekularen Vorgänge, die im Zuge der Granula-Biogenese ablaufen, noch nicht aufgeklärt wurden, konnten verschiedene Proteine identifiziert werden, die offenbar zur Entstehung der Granula beitragen. Dazu zählen unter anderem Mitglieder der Rab-GTPase-Familie, der *lysosomal trafficking regulator* LYST, Synaptotagmin III und Secretogranin III (Moon et al., 2014).

Während des sogenannten Kondensations-Prozesses wird schließlich das Volumen der Granula reduziert und der Inhalt reorganisiert. Dafür ist unter anderem der pH-Wert in den Granula entscheidend: Zu Beginn der Entstehung am trans-Golgi-Netzwerk liegt dieser bei ca. 6. Während des Reifungsprozesses findet eine Azidifizierung mit Hilfe der V-Typ-ATPase, einer Protonen-Pumpe, bis zum einem pH-Wert von ca. 5,5 statt (Wernersson und Pejler, 2014).

3.2.3 Immunmediatoren

Auf welchem Wege die Mediatoren zur Speicherung in die Granula kommen, ist zum größten Teil noch ungeklärt. Es wird davon ausgegangen, dass der vesikuläre Monoamin Transporter (VMAT) 2 für die Befüllung der Granula mit Histamin verantwortlich ist (Merickel und Edwards, 1995), und dass lysosomale Enzyme durch Fusionen mit sekretorischen Lysosomen in die Granula gelangen (Schwartz und Austen, 1981). Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass bestimmte Moleküle (z. B. Histamin und TNF) aus dem extrazellulären Raum durch Endozytose aufgenommen werden und so ihren Weg in die Granula finden (Ohtsu et al., 2002; Olszewski et al., 2007; Wernersson und Pejler, 2014).

Zu den vorgeformten Mediatoren, die bis zur Sekretion in Granula gespeichert werden, zählen neben den biogenen Aminen Histamin und Serotonin z. B. auch Proteasen, wie Chymase oder Trypsin, lysosomale Enzyme, wie die β -Hexosaminidase, Cytokine, wie TNF- α , und Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise *transforming growth factor* (TGF)- β . Im zeitlichen Verlauf einer Immunantwort werden diese Effektoren bereits Sekunden nach Aktivierung der Mastzellen durch Degranulation freigesetzt (s. Abb. 4). Histamin ist dabei der wohl bekannteste Immunmediator und wurde bereits Mitte des 20. Jahrhunderts als solcher beschrieben (Rocha e Silva et al., 1947; Riley und West, 1952). Es entsteht durch die Decarboxylierung von Histidin durch das Enzym Histidin-Decarboxylase (Rothschild und Schayer, 1959) und führt zu einer Reihe von Effekten, wie z. B. Vasodilatation, Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Aktivierung von Nervenzellen und Bronchokonstriktion (Maintz und Novak, 2007; Lundequist und Pejler, 2011).

Neben den vorgeformten Mediatoren können Mastzellen nach Aktivierung zeitversetzt noch weitere Mediatoren generieren (z. B. Eicosanoide) oder *de novo* synthetisieren (z.

B. Cytokine). Welche Mediatoren produziert werden, hängt dabei von der Art des Stimulus und dem aktivierten Rezeptor ab (da Silva et al., 2014) (s. Abb. 4).

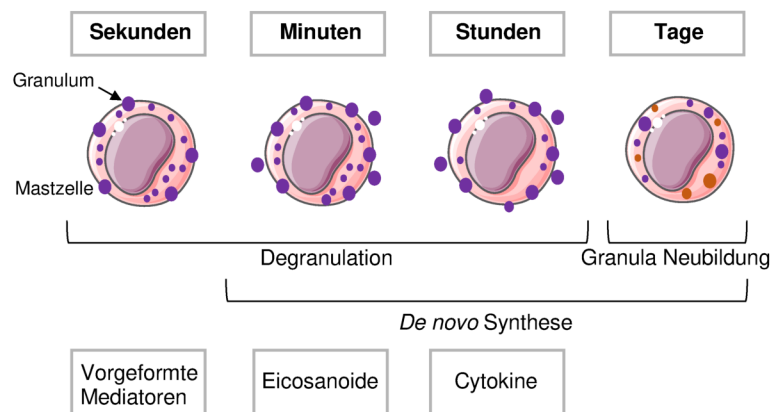


Abb. 4 Zeitlicher Ablauf der Freisetzung von Immunmediatoren aus Mastzellen im Zuge einer Immunantwort.

Unmittelbar nach der Aktivierung können vorgeformte, in sekretorischen Granula gespeicherte Immunmediatoren durch Exocytose (Degranulation) freigesetzt werden. Gleichzeitig wird Arachidonsäure durch katalytische Prozesse in Eicosanoide umgewandelt, die ebenfalls, etwas zeitverzögert, ausgeschüttet werden. Durch die Stimulation kommt es abhängig vom Stimulus auch zur transkriptionellen Aktivierung der *de novo* Synthese von Cytokinen. Dieser Effekt kann mehrere Stunden bis Tage anhalten.

3.2.4 Aktivierung von Mastzellen, Signaltransduktion und Ablauf der Degranulationsreaktion

Die Aktivierung von Mastzellen kann durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden. Der bekannteste Mechanismus ist die Bindung von Immunglobulin (Ig) E/Antigen-Komplexen an den hoch-affinen FcεRI. Der Kontakt mit den Cytokinen IL-4 bzw. IL-13, die von T-Helferzellen 2 ausgeschüttet werden, führt in reifen B-Zellen zu einem Immunglobulin-Klassenwechsel. Daraufhin produzieren die betreffenden B-Zellen nach Aktivierung durch ein Antigen Immunglobuline der Klasse E (Poulsen und Hummelshoj, 2007). Diese Antikörper zirkulieren nicht, sondern binden mit ihrem F_c-Teil an die α-Kette des hoch affinen FcεRI auf der Oberfläche von Mastzellen. Bei einem weiteren Kontakt der Mastzellen mit dem entsprechenden Antigen wird dieses gebunden, sodass es zur Quervernetzung der gebundenen IgEs und zur Homodimerisierung der FcεRI kommt (Collington et al., 2011). Der Rezeptor besteht neben der IgE-bindenden α-Kette noch aus einer die Membran durchspannenden β-Untereinheit und zwei γ-Ketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind (Kalesnikoff und Galli, 2008). An die γ-Untereinheit sind Enzyme wie die Tyrosin-Kinase Lyn assoziiert, die im Falle einer Aktivierung die ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*)-Tyrosin-Reste in der β- und γ-Kette phosphorylieren (Benhamou et al., 1990). Das führt wiederum zu einer Interaktion mit der Tyrosin-Kinase Syk, die Proteine wie LAT (*linker for activation of t-cells*) und PLCγ

durch Phosphorylierung aktiviert (Iwaki et al., 2005). Die PLC γ katalysiert daraufhin die Spaltung von PI(4,5)P $_2$ zu IP $_3$ und DAG. IP $_3$ bindet an den IP $_3$ R in der Membran des ER und sorgt so für die Freisetzung von Ca $^{2+}$ in das Zytosol (Hitomi et al., 2004). Das Sinken der Ca $^{2+}$ -Konzentration im ER aktiviert den Speicher-abhängigen Ca $^{2+}$ -Einstrom (*store-operated Ca $^{2+}$ -entry*: SOCE) durch die Interaktion des Ca $^{2+}$ -Sensors *stromal interacting molecule-1* (STIM-1) mit dem Ca $^{2+}$ Kanal Orai1 in der Plasmamembran und führt auf diesem Weg zu einer Wiederbefüllung des ER (Hoth und Penner, 1992, 1993; Hong-Tao M, 2010) (s. Abb. 5).

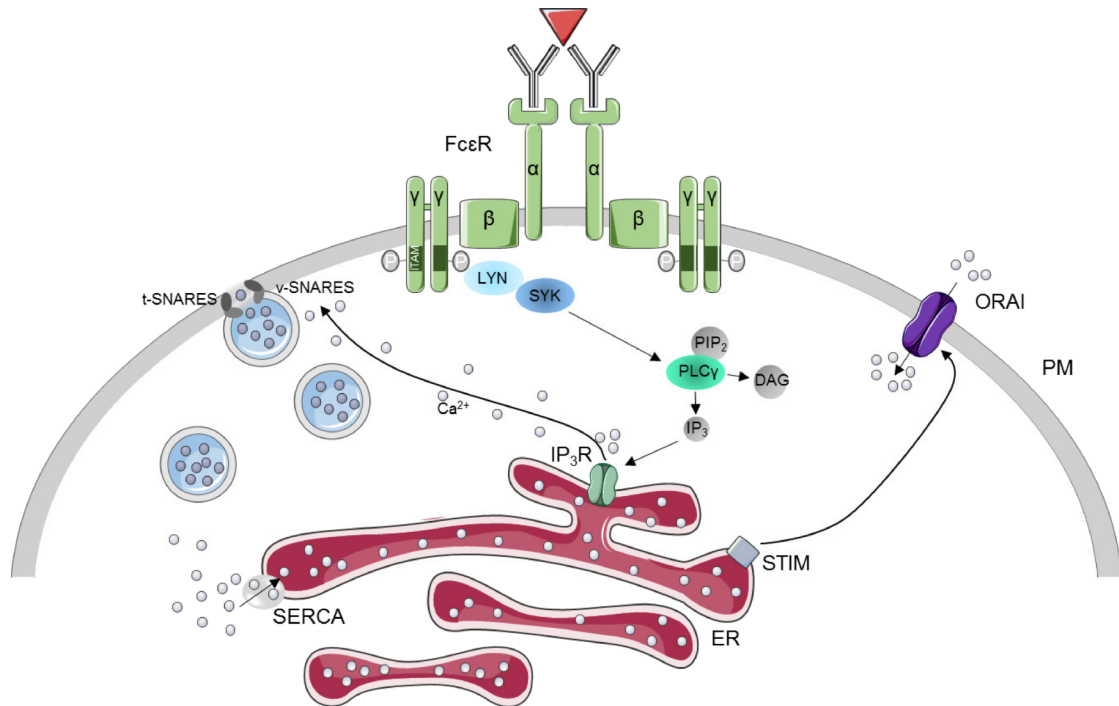


Abb. 5 IgE-vermittelte Aktivierung von Mastzellen.

Antikörper des Subtyps IgE, die von aktivierten B-Zellen gegen ein spezifisches Antigen produziert wurden, binden an die α -Kette von hochaffinen Fc ϵ -Rezeptoren auf der Oberfläche von Mastzellen. Nach Bindung eines Antigens kommt es zur Quervernetzung der Antikörper und zur Rezeptor-Dimerisierung. Daraufhin phosphoryliert die Tyrosin-Kinase Lyn die ITAM-Motive in der β - und γ -Untereinheit des Fc ϵ R, wodurch es zu einer Interaktion mit der Tyrosin-Kinase Syk kommt. Syk aktiviert wiederum die PLC γ , die die Spaltung von PI(4,5)P $_2$ zu IP $_3$ und DAG katalysiert. Die Bindung von IP $_3$ an den IP $_3$ -Rezeptor in der Membran des ER resultiert in einem Ausstrom von Ca $^{2+}$ -Ionen in das Zytosol. Durch die Entleerung des ER wird der Ca $^{2+}$ -Sensor *stromal interacting molecule* (STIM) aktiviert, der mit dem Ca $^{2+}$ -Kanal Orai1 in der Plasmamembran interagiert. Dadurch kommt es zu einem zusätzlichen Einstrom von Ca $^{2+}$ -Ionen. Die Erhöhung der zytosolischen Ca $^{2+}$ -Konzentration führt schließlich zur SNARE-vermittelten Fusion von mit Immunmediatoren gefüllten sekretorischen Granula mit der Plasmamembran. Über die Sarko-/Endoplasmatisches Retikulum Ca $^{2+}$ -ATPase (SERCA) kann Ca $^{2+}$ unter Energieverbrauch wieder in das ER zurück transportiert werden.

Durch den Anstieg der Ca $^{2+}$ -Konzentration im Zytoplasma kommt es zur Fusion der Mediator-gefüllten Granula mit der Plasmamembran und somit zur Freisetzung der gespeicherten Botenstoffe. Dabei kann bereits auf einen einzigen Stimulus hin nahezu der gesamte in Granula gespeicherte Inhalt in kurzer Zeit frei gesetzt werden, um einen maximalen Effekt zu generieren (Marchand et al., 2003). Für den

Verschmelzungsprozess sind, wie bereits erwähnt (s. 3.1.1), verschiedene Proteinfamilien von essentieller Bedeutung, deren Vertreter auf den beteiligten Membranen zu finden sind und (Ca^{2+} -abhängig) einen stabilen Komplex bilden (Sutton et al., 1998; Sudhof und Rothman, 2009; Sudhof und Rizo, 2011). Die an der Fusion beteiligten Subtypen dieser Proteinfamilien variieren, wie unter 3.1.1 beschrieben, je nach Zelltyp und Fusionsart. Für die Mastzell-Degranulation konnte vor allem die Beteiligung von SNAP 23 und Syntaxin 4 auf der Seite der Plasmamembran sowie von VAMP-8 und/oder VAMP-7 auf der Seite der vesikulären Membran bei der Bildung des SNARE-Komplexes gezeigt werden (Woska und Gillespie, 2012); zusätzlich konnten Funktionen für weitere SNARE-Proteine wie Syntaxin 3 (Hibi et al., 2000; Martin-Verdeaux et al., 2003) und die regulatorischen Proteine Munc18-2 und Munc18-3 (Martin-Verdeaux et al., 2003) sowie Munc13-4 (Elstak et al., 2011), Rab3D (Tuvim et al., 1999; Pombo et al., 2001) und Rab27 (Mizuno et al., 2007) aufgezeigt werden.

Bezüglich der Fusion von Granula miteinander, z. B. im Rahmen der Granula-Biogenese oder der Verbund-Exozytose (s. unten), wird angenommen, dass diese möglicherweise durch andere SNARE-Komplexe vermittelt wird, als die Verschmelzung von Granula mit der Plasmamembran (Lorentz et al., 2012). Während beispielsweise Munc18-3, das mit Syntaxin 4 interagiert, an der Plasmamembran zu finden ist, konnte eine Lokalisation von Munc18-2 und dessen Interaktionspartner Syntaxin 3 in den sekretorischen Granula nachgewiesen werden (Martin-Verdeaux et al., 2003; Lorentz et al., 2012). Auch bei der Degranulation von Mastzellen ist eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration für die finale Membranfusion notwendig (Pearce, 1985). Ca^{2+} -Sensorproteine, wie Synaptotagmin II, konnten in Mastzellen als essentielle Faktoren für die regulierte Exozytose identifiziert werden (Melicoff et al., 2009).

Neben der „klassischen“ Exozytose einzelner Granula tritt während der Degranulation in Mastzellen auch die sogenannte Verbund- oder *compound* Exozytose auf. Dabei verschmelzen einzelne sekretorische Granula entweder vor der Fusion mit der Plasmamembran miteinander (multivesikuläre Verbundexozytose) oder es kommt in einem sekundären Fusionsschritt zur Verschmelzung von weiteren Vesikeln mit einem bereits mit der Plasmamembran fusionierten Vesikel (sequentielle Verbundexozytose). So bewirkt dieser Prozess die rapide, hocheffiziente Freisetzung des Granula-Inhalts (Alvarez de Toledo und Fernandez, 1990; Pickett und Edwardson, 2006). Die regulatorischen Mechanismen, die die Verbund-Exozytose initiieren und vermitteln sind jedoch, bis auf die vermutete Beteiligung des SNARE-Proteins VAMP-8, nahezu unbekannt (Thorn und Gaisano, 2012).

Dem gegenüber steht die ebenfalls in Mastzellen ablaufende als *piecemeal degranulation* (PMD) bezeichnete graduelle Ausschüttung des Inhalts der

sekretorischen Granula. Dabei wird der gespeicherte Inhalt allmählich freigesetzt, obwohl die Granula nicht mit der Plasmamembran verschmelzen (H. F. Dvorak et al., 1973; H. F. Dvorak et al., 1974; A. M. Dvorak et al., 1976; Crivellato et al., 2003b). Nach der „*shuttling vesicle*“ Hypothese wird davon ausgegangen, dass während der PMD kleinere Vesikel mit distinktem Inhalt von den sekretorischen Granula abgeschnürt und zur Plasmamembran transportiert werden (H. F. Dvorak und Dvorak, 1975; Crivellato et al., 2010). Es konnte beobachtet werden, dass auf Grund der schrittweisen Entleerung der Granula deren Elektronendichte abnimmt, und letztlich vergrößerte, nicht fusionierte aber leere Vesikel im Zytoplasma der Mastzellen verbleiben (Crivellato et al., 2003b).

Um zu verhindern, dass die Plasmamembranoberfläche durch exozytische Prozesse in den Zellen stetig zunimmt, findet über Endozytose eine Rückgewinnung der Vesikelmembranen statt (L. G. Wu et al., 2014). Da beispielsweise in Neuronen die Geschwindigkeit der Endozytose und Regeneration von synaptischen Vesikeln ein möglicher limitierender Faktor für die Exozytose ist, müssen die fusionierten Vesikel sehr schnell, innerhalb von Minuten, wiedergewonnen werden. Dagegen kann die Regeneration der sekretorischen Granula in Mastzellen wesentlich länger dauern und sogar bis zu 72 Stunden in Anspruch nehmen (Blank und Rivera, 2004). Dabei wird jede Form der Exozytose durch einen bestimmten Endozytose-Modus komplettiert: Bei der „*kiss and run*“-Fusion wird das an der Exozytose beteiligte Vesikel direkt wiedergewonnen; die Membran-Rückgewinnung nach „*full fusion*“ Exozytose wird durch die klassische Clathrin-abhängige Endozytose vermittelt; auf die Verbund-Exozytose von sekretorischen Granula folgt die sogenannte „*bulk*“ Endozytose (L. G. Wu et al., 2014).

Neben IgE führen noch einige weitere Substanzen zur Aktivierung von Mastzellen. Dazu gehören IgG, Faktoren des Komplementsystems, Liganden des *Toll-like receptors* (TLR), Neuropeptide, Cytokine (z. B. SCF), Chemokine und exogene Moleküle (Y. Yu et al., 2016). Auch Histamin kann die Degranulation von Mastzellen durch Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche auslösen (Jemima et al., 2014).

Noch ist jedoch ungeklärt, wie genau die Aktivierung von Mastzellen durch verschiedene Stimuli zur selektiven Freisetzung bestimmter Immunmediatoren führt (Moon et al., 2014). Die Beteiligung unterschiedlicher SNARE-Proteine bei der Exozytose verschiedener Granula-Subpopulationen könnte eine der möglichen Erklärungen für die Stimulus-abhängige differentielle Sekretion sein (Puri und Roche, 2008).

Es ist dennoch unbestritten, dass die Fähigkeit von Mastzellen, auf unterschiedliche Situationen mit einer individuell angepassten Mediator-Freisetzung zu reagieren und so

bestimmte Immunantworten auszulösen, diesen Zellen eine Schlüsselrolle im Immunsystem verleiht (Marshall, 2004).

3.2.5 Physiologische und pathophysiologische Rolle von Mastzellen

Wie bereits angedeutet, haben Mastzellen diverse Funktionen bei einer Reihe von physiologischen und immunologischen Prozessen. So führt z. B. die Sekretion von bestimmten Cytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, wie TNF- α , IL-8, (TGF)- β , *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) zu einer verstärkten Angiogenese. Auch freigesetztes Histamin hat durch die Erhöhung der Gefäßpermeabilität einen indirekten Effekt auf die Gefäßneubildung (Norrby, 2002) und reguliert zusätzlich die Vasodilatation (Krystel-Whittemore et al., 2015). Durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, wie *neuron growth factor* (NGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), VEGF oder bFGF, wird die Proliferation von Epithelzellen und Fibroblasten induziert. Somit sind Mastzellen ein wichtiger Faktor für die Homöostase von Geweben (Abe et al., 2000; Maurer et al., 2003). Auch zwischen Mastzellen und Neuronen bestehen wechselseitige Beziehungen: Serotonin aus Mastzellen trägt zur Neurogenese bei (Nautiyal et al., 2012), während die Neuropeptide *substance P* und Endothelin-1 wiederum Mastzellen aktivieren können (Suzuki et al., 1999).

Nach Kontakt mit Pathogenen können Mastzellen als Bestandteil des angeborenen Immunsystems Immunmediatoren freisetzen, und somit schnelle, aber eher unspezifische Immunantworten auslösen. Zudem spielen Mastzellen auch im adaptiven Immunsystem eine Rolle: Sie sind, wie auch dendritische Zellen, in der Lage, Antigene durch die Bindung an MHC I und MHC II zu präsentieren (Stelekati et al., 2009). Des Weiteren führt die Sekretion von IL-1 und TNF- α zur direkten Aktivierung von dendritischen Zellen, die deren Migration in die Lymphknoten und die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen zur Folge hat (Nakae et al., 2006; Reuter et al., 2010). Auch auf Dauer und Stärke der Immunantwort können Mastzellen durch die Freisetzung von anti-inflammatorischen Cytokinen, wie IL-10 und TGF- β , Einfluss nehmen (Rao und Brown, 2008).

Welche körperlichen Reaktionen die Immunantwort auslöst, hängt vor allem vom Ort der Antigenexposition ab. Im Gastrointestinal-Trakt resultiert eine Antigen-vermittelte Mastzell-Aktivierung in erhöhter Gefäßpermeabilität, Flüssigkeitsabsonderung und Peristaltik und somit in Erbrechen und Durchfall (Strauss-Albee et al., 2014). Gelangen Antigene durch Inhalation in die Lunge, führt das ebenfalls zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität; zudem bilden sich Ödeme und es kommt zur Verengung der Atemwege (Bradding, 1999; Krystel-Whittemore et al., 2015). Antigen-stimulierte

Histamin-Freisetzung in den Bindegewebsschichten der Haut bewirkt dagegen die Entstehung von Nesselsucht (Strauss-Albee et al., 2014).

Mastzellen beeinflussen also viele physiologische Reaktionen im Organismus. Dabei ist die Regulation der Abläufe während der Immunantworten von großer Bedeutung. Störungen dieser Abläufe können verschiedenste pathologische Veränderungen zur Konsequenz haben (Rao und Brown, 2008).

So wird beispielsweise angenommen, dass Mastzellen den Verlauf von kardiovaskulären Erkrankungen wie Atherosklerose negativ beeinflussen können: In atherosklerotischen Läsionen konnte eine erhöhte Zahl von Mastzellen beobachtet werden (Jeziorska et al., 1997). Die von aktivierten Mastzellen ausgeschütteten Immunmediatoren verstärken den inflammatorischen Prozess in den betroffenen Gefäßen und tragen zur Destabilisierung der atherosklerotischen Ablagerungen bei (Conti und Shaik-Dasthagirisab, 2015; Wezel et al., 2015). Auch bei der gastrointestinalen Erkrankung Morbus Crohn, bei der eine chronische Entzündung des Darms vorliegt (Rubin et al., 2012), konnte eine erhöhte Mastzellzahl im Darmgewebe festgestellt werden. Zudem kann eine zusätzliche „Über-Aktivierung“ der Mastzellen zu einer weiteren Verschlimmerung der Entzündung führen (Hamilton et al., 2014).

Auch bei Autoimmunerkrankungen können Mastzellen eine Rolle spielen. Im Falle einer Autoimmunität kann das Immunsystem nicht mehr zwischen körpereigenen und körperfremden Molekülen unterscheiden und richtet Immunantworten gegen eigene Gewebe und Organe. Im Falle von multipler Sklerose wird das zentrale Nervensystem durch überreaktive B- und T-Zellen geschädigt. In den betroffenen Bereichen konnte außerdem eine erhöhte Aktivierung und Degranulation von Mastzellen beobachtet werden, was zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion führt. Des Weiteren aktivieren Mastzellen T-Zellen durch die Präsentation von Myelin Antigenen (z. B. *myelin basic protein*) und begünstigen somit das Fortschreiten der charakteristischen Demyelinisierung (Conti und Kempuraj, 2016).

Wie sich erst im Laufe der letzten Jahre herausgestellt hat, existieren darüber hinaus bestimmte Erkrankungen, die unmittelbar auf eine Dysregulation von Mastzellen zurückzuführen sind. Diese Krankheitsbilder werden unter dem Begriff „Mastzell-Aktivierungssyndrom“ (MCAS) zusammengefasst, wobei zwischen dem primären, sekundären und dem idiopathischen MCAS unterschieden wird (Akin, 2017). Das primäre MCAS ist auf einen Defekt in den Mastzellvorläuferzellen zurückzuführen, der in einer Überaktivierung und/oder Überproduktion von Mastzellen resultiert. Ein Beispiel für eine derartige Erkrankung ist die Mastozytose. Dabei sorgt eine aktivierende Mutation (*gain-of-function mutation*) im c-Kit-Rezeptor dafür, dass es zu einer vermehrten Akkumulation von Mastzellen in unterschiedlichen Geweben kommt. Dadurch bedingt

häufen sich von Mastzellen ausgeschüttete Mediatoren in den verschiedenen Geweben an, was zu einer Vielzahl von Symptomen, wie Hautausschlägen, Magen-Darm-Beschwerden und/oder Herz-Kreislauf Problemen, führt (Horny et al., 2007).

Im Gegensatz zum primären MCAS ist im Falle des sekundären MCAS die Anzahl der Mastzellen normal (Akin, 2017). Jedoch kommt es, z. B. im Rahmen einer Allergie, als Reaktion auf einen bestimmten Stimulus zu einer verstärkten Aktivierung der Mastzellen. Bei einer allergischen Reaktion wird ein Antigen (in diesem Fall das Allergen) während der Sensibilisierung von Antigen-präsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen und Mastzellen, auf ihrer Zelloberfläche präsentiert, von T-Zellen erkannt und daraufhin als potenziell gefährdend eingestuft. Die nachfolgenden Reaktionen bis hin zur IgE-vermittelten Aktivierung der Mastzellen nach einem zweiten Kontakt mit dem Allergen und der sich anschließenden Ausschüttung von Immunmediatoren wurden bereits beschrieben (s. 3.2.4).

Können die charakteristischen MCAS Symptome jedoch weder auf die primäre noch die sekundäre MCAS Form zurückgeführt werden, spricht man von einem idiopathischen MCAS (Akin et al., 2010).

Zum jetzigen Zeitpunkt bleiben jedoch viele Fragen bezüglich der mechanistischen Vorgänge im Zusammenhang mit MCAS offen und es ist unklar, welche weiteren genetische Ursachen zur Überaktivierung von Mastzellen führen können (G. J. Molderings et al., 2016).

3.3 Intrazelluläre Ca²⁺-Speicher

Die intrazelluläre Ca²⁺-Homöostase ist Voraussetzung für eine Vielzahl von allgemeinen und spezifischen Zellfunktionen (Clapham, 2007). Damit zeitlich und räumlich koordinierte Ca²⁺-Signale biologische Prozesse wie Fertilisation oder Sekretion induzieren können, muss zum einen die Ca²⁺-Konzentration im Zytoplasma auf einem sehr niedrigen Niveau gehalten werden (ca. 100 nM); zum anderen muss die Ca²⁺-Beladung der internen Speicher sowie die regulierte Freisetzung von Ca²⁺-Ionen gewährleistet sein (Bagur und Hajnoczky, 2017). So kann auf einen Stimulus folgend Ca²⁺ entweder über Ca²⁺-Kanäle in der Plasmamembran oder aus intrazellulären Ca²⁺-Speichern in das Zytosol einströmen, wodurch weitere Reaktionen in der Zelle aktiviert werden. Zur Beendigung eines Ca²⁺-Signals und um ein nachfolgendes Signal zu ermöglichen, müssen Ca²⁺-Ionen wieder aus dem Zytosol entfernt werden (Bootman, 2012). Dafür stehen der Zelle verschiedene Mechanismen zur Verfügung: Über die Plasmamembran-ständige Ca²⁺-ATPase PMCA (*plasmamembrane Ca²⁺ ATPase*) und den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher NCX (*Na⁺/Ca²⁺ exchanger*) kann ein Teil des Ca²⁺ aus der Zelle in den extrazellulären Raum befördert werden (Brini und Carafoli, 2011). Der andere Teil des Ca²⁺ wird wieder in intrazelluläre Speicher aufgenommen. Der größte

dieser Speicher ist das ER, in dem im Ruhezustand eine Ca^{2+} -Konzentration von ca. 0,5 – 1 mM und ein neutraler pH-Wert von ca. 7,2 herrscht (M. M. Wu et al., 2000; Phillips und Voeltz, 2016) (s. Abb. 6). Die Freisetzung des ER- Ca^{2+} erfolgt über den IP_3 - und den Ryanodin-Rezeptor in der ER-Membran; für den Rücktransport von Ca^{2+} in das ER-Lumen ist die Sarko-/Endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) zuständig, die unter Energieverbrauch Ca^{2+} -Ionen gegen Protonen tauscht (Strehler und Treiman, 2004).

Ein weiterer Ca^{2+} -Speicher der Zellen sind Mitochondrien (Deluca und Engstrom, 1961; Vasington und Murphy, 1962), die bei einem pH-Wert von ca. 7,8 in der Matrix und 6,9 im Intermembranraum bis zu 100 μM Ca^{2+} enthalten können (Porcelli et al., 2005; Phillips und Voeltz, 2016) (s. Abb. 6). Um in das Lumen der Mitochondrien zu gelangen, müssen Ca^{2+} -Ionen die äußere (*outer mitochondrial membran*: OMM) und die innere (*inner mitochondrial membrane*: IMM) mitochondriale Membran passieren (Rizzuto et al., 2012). In der OMM sind Vertreter der *voltage-dependent anion channel* (VDAC) - Familie lokalisiert, die den Transport von Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytosol in den Bereich zwischen den Membranen sicherstellen (Gincel et al., 2001). Von dort gelangt das Ca^{2+} durch den *mitochondrial Ca^{2+} -Uniporter* (MCU) in die mitochondriale Matrix (Kirichok et al., 2004). Zur Erhaltung der Ca^{2+} -Homöostase in den Mitochondrien können Ca^{2+} -Ionen über einen Na^+ - Ca^{2+} - Li^+ -Austauscher (*$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$ -exchanger*: NCLX) freigesetzt werden (Palty et al., 2010). Erhöht sich die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Folge eines Stimulus, so können Mitochondrien als eine Art Ca^{2+} -Puffersystem funktionieren, in dem sie einen Teil des Ca^{2+} aus dem Zytosol aufnehmen und somit das Ca^{2+} -Signal modulieren (Drago et al., 2012; Rizzuto et al., 2012; Shoshan-Barmatz et al., 2017).

Zwischen dem ER und den Mitochondrien können Kontaktstellen, sogenannte Mikrodomänen (Rizzuto et al., 1993), entstehen, die nach einer Aktivierung des IP_3 -Rezeptors eine besonders schnelle Aufnahme von Ca^{2+} -Ionen in die mitochondriale Matrix ermöglichen (Rizzuto et al., 1998). Zur Ausbildung dieser Mikrodomänen kommt es unter anderem durch die Interaktion des VDAC1 Ionenkanals in der OMM mit dem IP_3 -Rezeptor in der Membran des ER über das Chaperon *75 kDa glucose-regulated protein* (GRP75) (Szabadkai et al., 2006).

Auch die Elemente des endo-lysosomalen Systems, Lysosom-verwandte Organellen und sekretorische Vesikel, die allgemein unter dem Begriff saure Vesikel zusammengefasst werden (Patel und Cai, 2015), dienen der Zelle als intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher (Pozzan et al., 1994). Die Freisetzung des Ca^{2+} aus diesen Speichern erfolgt über den *second messenger* Nikotinsäureadeninindinukleotidphosphat (NAADP). Hinsichtlich der luminalen basalen Ca^{2+} -Konzentration und des pH-Werts gibt es Unterschiede zwischen den verschiedenen endolysosomalen Komponenten: Im Lumen

von endozytierten Vesikeln entspricht die Ca^{2+} -Konzentration in etwa der des extrazellulären Raums (ca. 1 mM); im Verlauf der Azidifizierung bis zu einem pH-Wert von ca. 6,0 nimmt die Ca^{2+} -Konzentration in frühen Endosomen zunächst ab (Gerasimenko et al., 1998; Sorkin und Von Zastrow, 2002; Phillips und Voeltz, 2016). In späten Endosomen und Lysosomen liegt der pH-Wert bei ca. 4,5 bis 5,5 und es herrscht im Ruhezustand, ähnlich wie im ER, eine Ca^{2+} -Konzentration von ca. 0,5 mM vor (Christensen et al., 2002; Sorkin und Von Zastrow, 2002; Albrecht et al., 2015). In sekretorischen Vesikeln (z. B. Mastzell-Granula) konnten Ca^{2+} -Konzentrationen im mikromolaren Bereich bis ca. 100 μM gemessen und ein pH-Wert von ca. 5,5 ermittelt werden (De Young et al., 1987; Mitchell et al., 2001; Quesada et al., 2001; Santodomingo et al., 2008) (s.Abb. 6).

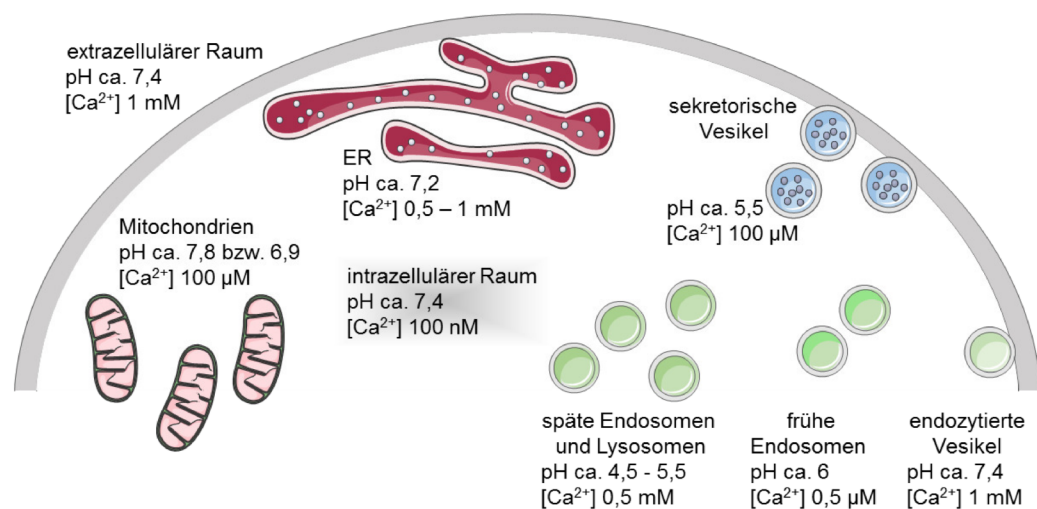


Abb. 6 Luminalen Ca^{2+} -Konzentrationen und pH-Werte in intrazellulären Ca^{2+} -Speichern.

Ca^{2+} -Ionen können aus verschiedenen intrazellulären Speichern freigesetzt werden. Diese Speicher unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Ca^{2+} -Aufnahmekapazität sondern auch bezüglich ihres pH-Werts. Das ER ist der größte Ca^{2+} -Speicher der Zelle: Die luminalen Ca^{2+} -Konzentration kann darin bis zu 0,5 – 1 mM betragen und es herrscht ein neutraler pH-Wert von ca. 7,2. Im Intermembranraum von Mitochondrien wurde ein pH-Wert von ca. 7,8 gemessen, in der mitochondrialen Matrix ein pH-Wert von ca. 6,9. Die Ca^{2+} -Konzentration in den Mitochondrien kann bis zu 100 μM betragen. Die Ca^{2+} -Konzentration und der pH-Wert in endozytierten Vesikeln entsprechen den Bedingungen im extrazellulären Raum (pH 7,4; $[\text{Ca}^{2+}] = 1 \text{ mM}$). Bei der Reifung der Vesikel zu frühen Endosomen kommt es dann zu einer Azidifizierung bis zu pH 6. Die Ca^{2+} -Konzentration in den frühen Endosomen nimmt dabei ab; in späten Endosomen und Lysosomen herrschen saure pH Bedingungen (pH ca. 4,5-5,5) und die luminalen Ca^{2+} -Konzentration liegt bei etwa 0,5 mM. Auch sekretorische Vesikel werden mit einem pH-Wert von ca. 5,5 den sauren Ca^{2+} -Speichern zugeordnet und können bis zu 100 μM Ca^{2+} enthalten.

Ungeklärt ist bisher, wie Ca^{2+} in die sauren Speicher aufgenommen werden kann (Morgan, 2016). In Pflanzen und Hefe konnte gezeigt werden, dass $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Austauscher und Ca^{2+} -ATPasen für den Transport von Ca^{2+} in das Lumen von sauren Vakuolen verantwortlich sind (Morgan et al., 2011). Daher wurde spekuliert, dass die Ca^{2+} -

Aufnahme auch in Lysosomen vom pH-Gradienten abhängig ist und über noch nicht identifizierte Ca^{2+} -Transporter und -Pumpen erfolgt (Morgan, 2016). Diese These wurde durch Veröffentlichungen untermauert, die zeigen konnten, dass nach Aufhebung des Protonen-Gradienten die luminalen Ca^{2+} -Konzentration in Lysosomen deutlich abnahm (Lloyd-Evans et al., 2008; Calcraft et al., 2009; Shen et al., 2012). Mit Hilfe eines Lysosomen-spezifischen genetisch codierten Ca^{2+} -Indikators zur Messung der luminalen Ca^{2+} -Konzentration in Lysosomen konnte jedoch beobachtet werden, dass die Störung des pH-Gradienten durch Inhibition der vakuolären H^+ -ATPase (V-ATPase) keinen Einfluss auf die Ca^{2+} -Wiederbefüllung der Lysosomen hatte. Stattdessen wurde festgestellt, dass das ER in Kombination mit dem IP_3R eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme von Ca^{2+} in die Lysosomen spielt (Garrity et al., 2016).

Ähnlich wie für Mitochondrien beschrieben, existieren auch Kontaktstellen zwischen dem ER und dem endo-lysosomalen System (Rocha et al., 2009; Eden et al., 2010), die durch verankernde Komplexe stabilisiert werden (Eden, 2016). Zelluläre Prozesse, bei denen die Formation dieser Kontaktstellen von Bedeutung ist, reichen vom Lipid-Transport über Rezeptor-Tyrosin-Kinase Signalwege bis hin zur Motilität von Endosomen (Eden, 2016). An den Membrankontaktstellen sind die beteiligten Organellen nur ca. 15 nm voneinander entfernt (Phillips und Voeltz, 2016). Diese räumliche Nähe ist vor allem auch ein wichtiger Faktor bei der Ca^{2+} Signalweiterleitung. Aus den intrazellulären Speichern wird Ca^{2+} in einer hohen Konzentration freigesetzt; jedoch reduziert sich die Ca^{2+} -Konzentration bereits in einem Radius von 100 nm um den geöffneten Kanal deutlich (Shuai und Parker, 2005). Durch die geringe Entfernung der Organellen an deren Kontaktstellen wird eine Verdünnung des Ca^{2+} -Signals verhindert und somit gewährleistet, dass eine vollständige Detektion der Ca^{2+} -Signale erfolgt (Lopez-Sanjurjo et al., 2013). Zunächst wurde davon ausgegangen, dass es nur eine Ca^{2+} -Signalrichtung gibt: von den sauren Vesikeln hin zum ER (Morgan et al., 2013). Diese Kopplung der intrazellulären Speicher wird unter dem Begriff „*trigger*“-Hypothese zusammengefasst (Morgan et al., 2011): Dabei führt der initiale Ca^{2+} -Ausstrom aus einem sauren Ca^{2+} -Speicher über den Mechanismus der Ca^{2+} -vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung (CICR (Patel et al., 2001)) zu einer Aktivierung von IP_3 - und Ryanodin-Rezeptoren in der ER-Membran und dient so als „*trigger*“ zur Amplifizierung des lokalen Ca^{2+} -Signals (Morgan et al., 2011) (s. Abb. 7). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass Ca^{2+} -Signale auch in entgegengesetzter Richtung weitergeleitet werden können; dabei aktiviert aus dem ER freigesetztes Ca^{2+} den NAADP-Signalweg, sodass es ebenfalls zu einer Signalverstärkung kommt (Morgan et al., 2013).

Die Interaktion der Ca^{2+} -Speicher kann aber nicht nur zu einer Signalamplifikation führen. Endosomen und Lysosomen sind nämlich vermutlich auch in der Lage, über einen noch

nicht identifizierten Mechanismus Ca^{2+} , das aus dem ER freigesetzt wurde, aufzunehmen (Lopez-Sanjurjo et al., 2013; Phillips und Voeltz, 2016). Dieses Ca^{2+} -„buffering“ durch saure Vesikel könnte eine zusätzliche Möglichkeit zur Modulation von Ca^{2+} -Signalen in der Zelle bieten (Morgan, 2016) (s. Abb. 7). Konzentrationsschwankungen der luminalen Ca^{2+} -Konzentration, die in späten Endosomen beobachtet wurden, könnten eine Folge dieses Ca^{2+} -Austauschs zwischen dem ER und den späten Endosomen sein (Phillips und Voeltz, 2016).

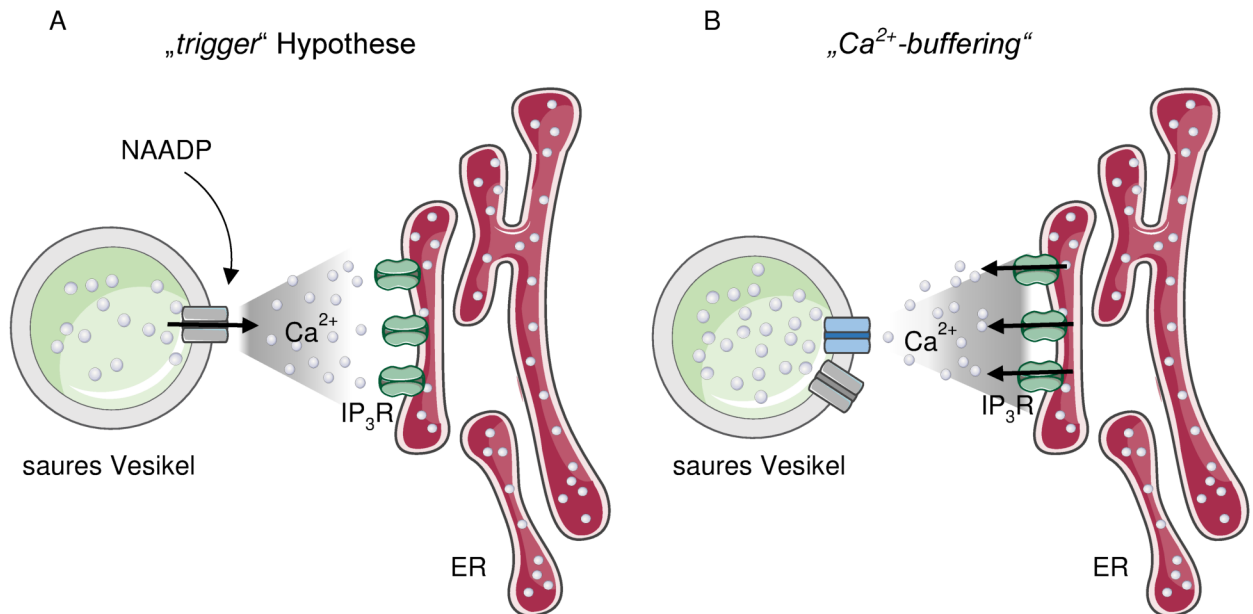


Abb. 7 Interaktion von intrazellulären Ca^{2+} -Speichern (ER und saure Vesikel).

A „trigger“-Hypothese: Der NAADP-vermittelte Ca^{2+} -Ausstrom aus sauren Speichern aktiviert über den Mechanismus der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung (CICR) Ca^{2+} -Kanäle wie den IP₃R in der ER-Membran. Die initiale Ca^{2+} -Freisetzung dient so als *trigger* für eine Amplifikation des Ca^{2+} -Signals.

B „ Ca^{2+} -buffering“: Aus dem ER ausströmendes Ca^{2+} wird über einen bisher noch nicht bekannten molekularen Mechanismus zum Teil in saure Ca^{2+} -Speicher aufgenommen. Durch diesen Prozess können Ca^{2+} -Signale in der Zelle moduliert werden.

3.4 Two-pore channels

Die Freisetzung von Ca^{2+} aus sauren Organellen erfolgt durch NAADP, das neben IP₃ und der zyklischen ADP-Ribose (cADPR) ein potenter *second messenger* ist (Churchill et al., 2002; Yamasaki et al., 2004). *In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass die Synthese von NAADP aus Nikotinsäureamidadenindinukleotidphosphat (NADP) und Nikotinsäure (NA) auf einen externen Stimulus hin von der ADP-Ribosyl Zyklase CD38 bei sauren pH Bedingungen katalysiert wird (H. C. Lee, 2006). Ein definitiver Beweis für die funktionelle Rolle von CD38 bei der *in vivo* Generierung von NAADP steht allerdings noch aus (Lin et al., 2017); in Untersuchungen an Herzen von CD38^{-/-} Mäusen konnte

jedoch ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Enzym-Defizienz und reduzierten Ca^{2+} -Signalen aus sauren Speichern in Kardiomyozyten hergestellt werden (Lin et al., 2017).

Obwohl die Funktion von NAADP bei der intrazellulären Mobilisierung von Ca^{2+} bekannt war, blieb die Identität der Zielstruktur lange Zeit unbekannt (Galione und Ruas, 2005). Im Jahr 2009 wurden schließlich die *two-pore channels* (TPCs) von drei unabhängigen Forschungsgruppen als potenzielle Zielstrukturen von NAADP auf sauren Ca^{2+} -Speichern wie dem endo-lysosomalen System identifiziert (Brailoiu et al., 2009; Calcraft et al., 2009; Zong et al., 2009). Schon einige Jahre zuvor wurde die Sequenz des Ca^{2+} -Ionenkanals TPC, der seinen Namen auf Grund der ungewöhnlichen Topographie erhielt (s. Abb. 8), in Säugetier-Geweben beschrieben (Ishibashi et al., 2000). Die TPC Untereinheiten bestehen aus zwei homologen Domänen, die jeweils sechs Transmembran (TM)-Segmente (S1-S6) und eine porenbildende Region zwischen S5 und S6 umfassen (Ishibashi et al., 2000; Galione et al., 2009; Hooper et al., 2011) (s. Abb. 8). Die strukturelle Analogie zu *transient receptor potential* (TRP)-Kanälen mit einer sechs-TM-Domäne einerseits und zu spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen mit vier sechs-TM-Domänen andererseits, legt nahe, dass es sich bei den TPCs um eine evolutionäre Zwischenstufe der beiden Ionenkanal-Familien handeln könnte (Morgan und Galione, 2014). Um einen funktionellen Kanal auszubilden, lagern sich zwei der TPC Untereinheiten zu einem Dimer zusammen (Zong et al., 2009).

Sowohl der N-, als auch der C-Terminus des Ionenkanals befinden sich auf der

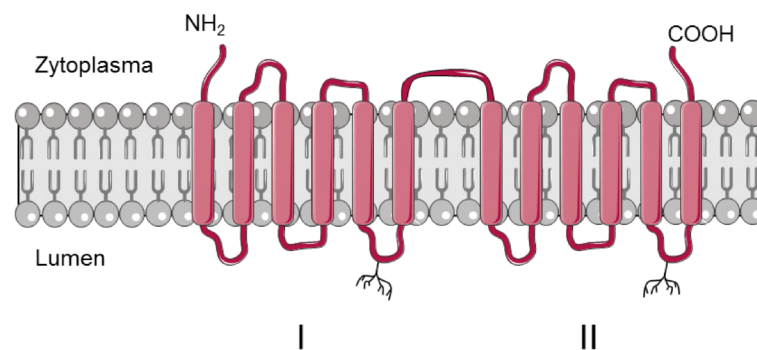


Abb. 8 Schematische Darstellung der Topographie der *two-pore-channels*.

TPCs sind aus zwei homologen Domänen aufgebaut, die jeweils sechs Transmembransegmente mit einer porenbildenden Region zwischen dem fünften und sechsten Segment umfassen. Der N- und C-Terminus befinden sich auf der zytoplasmatischen Seite der Vesikelmembran. Auf der luminalen Seite der Ionenkanäle konnten Glykosylierungsstellen nachgewiesen werden.

zytosolischen Seite der Membran (Hooper et al., 2011); auf der dem sauren Lumen zugewandten Seite konnten zusätzlich Glykosylierungsstellen identifiziert werden (Hooper et al., 2011) (s. Abb. 8).

Die TPC-Familie besteht aus den drei Subtypen TPC1, TPC2 und TPC3, wobei im humanen und im Nagetier-System nur TPC1 und TPC2 exprimiert werden (Calcraft et

al., 2009). Diesen beiden Isoformen werden innerhalb des endo-lysosomalen Systems unterschiedliche Lokalisationen zugeordnet: Während TPC1 vor allem in Membranen von frühen und späten Endosomen zu finden ist, beschränkt sich die TPC2 Expression auf lysosomale Membranen (Zhu et al., 2010a; Morgan et al., 2011). Zwar wurde beschrieben, dass TPC1 und TPC2 neben Homodimeren auch Heterodimere bilden können (Rietdorf et al., 2011); neuere Studien konnten eine Interaktion der beiden Subtypen jedoch nicht bestätigen (J. Castonguay et al., 2017).

Wie bereits beschrieben, besagt die sogenannte „trigger“-Hypothese, dass durch einen initialen Ca^{2+} -Ausstrom aus einem sauren Vesikel durch den Mechanismus der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung (CICR) ein lokales zu einem globalen Ca^{2+} -Signal amplifiziert werden kann. Nachdem die TPCs als Effektoren für die NAADP-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus sauren Organellen identifiziert wurden, wird angenommen, dass das initiale Ca^{2+} -Signal des CICR Verstärkungsmechanismus durch eine Aktivierung der TPCs entsteht (Patel et al., 2010; Morgan et al., 2011).

Auf der Suche nach NAADP-Bindestellen wurde überraschenderweise festgestellt, dass NAADP vermutlich nicht direkt an TPCs bindet, sondern an bisher nicht identifizierte akzessorische Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 22-23 kDa, die möglicherweise als Interaktionspartner des Ionenkanals in einen größeren TPC-Komplex eingebunden sind (Lin-Moshier et al., 2012; Walseth et al., 2012). In weiteren Studien wurde beobachtet, dass TPCs zusätzlich zu NAADP auch durch Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphat ($\text{PI}(3,5)\text{P}_2$) aktiviert werden können (Wang et al., 2012; Grimm et al., 2014). Kontroverse Diskussionen wurden auch durch die Veröffentlichung von Befunden ausgelöst, die die TPCs als Na^+ -leitende Kanäle beschrieben (Wang et al., 2012; Cang et al., 2013). Diese Hypothese stand im Widerspruch zu allen bis *dato* veröffentlichten Modellen zur Funktion der TPCs und konnte bisher auch nicht durch weiterführende Untersuchungsansätze bestätigt werden. Viele Erkenntnisse zur physiologischen Rolle der TPCs wurden in den letzten Jahren durch die Verwendung von TPC-defizienten Mausmodellen gewonnen. Bei einem Vergleich der deletierten codierenden Sequenzen musste jedoch festgestellt werden, dass eine alternative Form des Subtyps TPC1 (TPC1B) existiert, die über einen zusätzlichen Promotor im Exon 3 der TPC1-Gensequenz exprimiert wird (Ruas et al., 2014). Obwohl TPC1B eine N-terminal verkürzte Form des TPC1 darstellt, muss davon ausgegangen werden, dass sie nach Dimerisierung durchaus einen funktionellen Kanal bilden kann. Somit ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die Validität einiger bis *dato* beschriebener TPC1-defizienter Mausmodelle in Frage gestellt werden muss (Ruas et al., 2014). Dazu zählt unter anderem auch ein TPC1/2-defizientes Mausmodell, das für Untersuchungen der sensorischen Rolle des endolysosomalen Systems bei der

Energieversorgung der Zelle verwendet wurde. Dabei wurden die bereits erwähnten, durch ATP-Applikation induzierten Na^+ -Ströme in aus peritonealen Makrophagen von Wildtyp-Mäusen isolierten Endolysosomen gemessen, die in TPC1/2-defizienten Endolysosomen nicht zu detektieren waren (Cang et al., 2013). Zusätzlich wurde eine Interaktion zwischen TPCs und der Kinase *mechanistic target of rapamycin* (mTOR), die neben dem Energiehaushalt der Zelle noch eine Vielzahl von anderen Signalwegen reguliert (Hu et al., 2016), beschrieben (Cang et al., 2013). Erst durch einen Nachweis für die vollständige Defizienz des Mausmodells für beide TPC1 Isoformen können diese Befunde als verlässlich eingestuft werden (Ruas et al., 2014).

Es konnte bereits für viele verschiedene Zelltypen gezeigt werden, dass die NAADP/TPC-vermittelte Freisetzung von Ca^{2+} eine entscheidende Bedeutung für den Ablauf bestimmter zellulärer Prozesse hat: Beispielsweise konnte in β -Zellen aus dem Pankreas von Wildtyp-Mäusen beobachtet werden, dass die Applikation von NAADP Ca^{2+} -Signale und Kationenströme auslöste, die Voraussetzung für die Depolarisation der β -Zellen waren, und die in TPC1- und TPC2-defizienten Zellen ausblieben (Arredouani et al., 2015). Des Weiteren konnte in murinen Hepatozyten gezeigt werden, dass TPC2 eine entscheidende Rolle beim intrazellulären *trafficking* von Vesikeln während endolysosomaler Abbauprozesse spielt. In TPC2^{-/-} Mäusen kam es auf Grund der Defizienz zu einer Akkumulation von Cholesterin in Hepatozyten und das Risiko in Folge einer cholesterinreichen Ernährung eine Fettleber auszubilden stieg (Grimm et al., 2014). Die Bedeutung der TPCs für Fusionsprozesse im endo-lysosomalen System konnte auch in Zusammenhang mit der Infektion von humanen Makrophagen und Mäusen durch das Ebola-Virus gezeigt werden: Bevor die Viren Replikationswerkzeuge ihrer Wirtszellen für ihre Vermehrung nutzen können, müssen sie über Endozytose in die Zelle gelangen. Dort werden sie entlang des endo-lysosomalen Abbaupfades transportiert, sodass es schließlich zur Freisetzung der Viruspartikel in den intrazellulären Raum und dort zur Replikation kommt (Moller-Tank und Maury, 2015). Sowohl durch genetische Deletion der TPCs als auch durch den Einsatz von siRNA und des pflanzlichen Alkaloids Tetrandrine, das bei niedriger Dosierung die TPCs spezifisch inhibiert, konnte die Infektionsrate des Ebola-Virus *in vitro* und *in vivo* drastisch gesenkt werden (Sakurai et al., 2015).

Weiterhin konnte die Bedeutung von TPCs für intrazelluläre Fusionsprozesse bei der für die Metastasenbildung nötigen Migration von Tumorzellen beobachtet werden: Die für den Kontakt der Tumorzellen mit der extrazellulären Matrix, und damit für die Migration notwendigen Integrine werden über das endo-lysosomale System recycelt (Hood und Cheresch, 2002; Maritzen et al., 2015). In Folge einer Inhibition der TPCs kam es zu einer

Akkumulation von Integrinen in frühen Endosomen und daraufhin zu einer reduzierten Metastasen-Bildung in einem Tumor-Mausmodell (Nguyen et al., 2017).

In der jüngsten Vergangenheit ergaben sich außerdem zunehmend Hinweise, dass zwischen einer fehlerhaften Funktion von TPC2 und der Entstehung bestimmter Formen der Parkinson'schen Krankheit ein Zusammenhang besteht (Rivero-Rios et al., 2016). Dabei scheint vor allem die Interaktion von TPC2 mit der Kinase LRRK2 von Bedeutung zu sein, da viele Parkinson-Erkrankte eine Mutation im LRRK2 Gen tragen (Gomez-Suaga und Hilfiker, 2012). Wie genau allerdings die Dysregulation von TPC2 zum Absterben von dopaminergen Neuronen führt, muss noch geklärt werden (Rivero-Rios et al., 2016).

Zu den sauren Ca^{2+} -Speichern zählen neben den Komponenten des endo-lysosomalen Systems auch sekretorische Vesikel (Patel und Muallem, 2011). In zytotoxischen T-Lymphozyten wurde eine Expression beider TPC-Subtypen auf zytolytischen Granula, einer speziellen Form sekretorischer Vesikel, nachgewiesen (Peters et al., 1991; Davis et al., 2012). Eine NAADP/TPC-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus den Granula war ausreichend, um deren Fusion mit der Plasmamembran an der immunologischen Synapse zu induzieren (Davis et al., 2012).

Das akrosomale Vesikel in Spermien ist, wie oben beschrieben (3.1), ein Lysosomenverwandtes Organell und damit ebenfalls ein saurer Ca^{2+} -Speicher (Berruti et al., 2010). Welche funktionelle Rolle TPC1 und NAADP im Kontext der Akrosomreaktion einnehmen, wurde bereits 2014 eingehend untersucht (Arndt et al., 2014). Zunächst konnte mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen und unter Anwendung der Immunogold-Färbetechnik eine Lokalisation von TPC1 in der akrosomalen Membran gezeigt werden. Die Stimulation von Wildtyp Spermien mit einem breiten Konzentrations-Spektrum von NAADP zur Auslösung der Akrosomreaktion resultierte in zwei typischen glockenförmigen Dosis-Wirkungs-Kurven, die bereits in mehreren Arbeiten zu den TPCs dokumentiert wurden (Galione et al., 2009; Galione, 2011; Davis et al., 2012; Ruas et al., 2015; C. S. Lee et al., 2016) (Abb. 9 A und B). Im niedrigen nanomolaren (50 nM) (Abb. 9 A) sowie auch im mikromolaren (1 μM) (Abb. 9 B) Konzentrationsbereich waren Maxima der Kurve zu erkennen; eine jeweilige Erhöhung der NAADP-Konzentration führte zu einer Inaktivierung des Systems. Die inaktive Vorstufe NADP konnte nur in sehr hohen Konzentrationen (100 μM) die Akrosomreaktion auslösen, wodurch die Spezifität der NAADP-vermittelten Reaktion bestätigt werden konnte (Abb. 9 A und B).

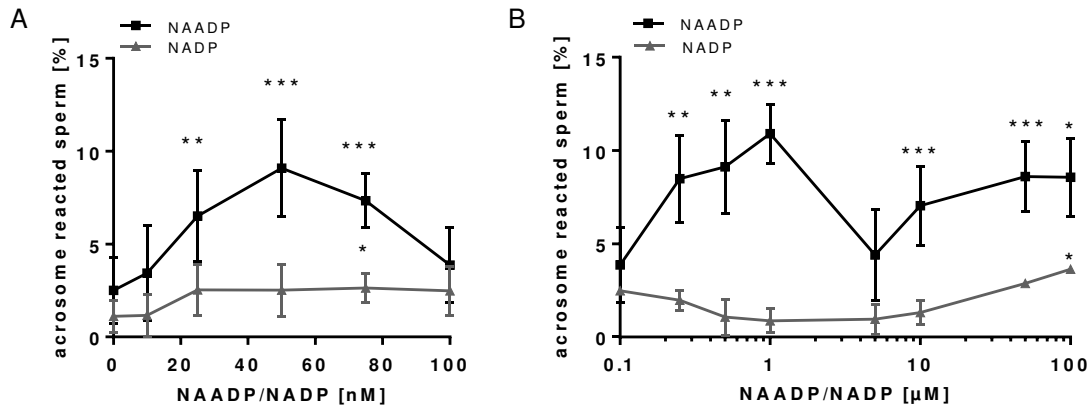


Abb. 9 Konzentrationsabhängige Effekte von NAADP und NADP auf die Akrosomreaktion. Kapazitierte Spermien von Wildtyp Mäusen wurden mit einem breiten Konzentrationsspektrum von NAADP und der inaktiven Vorstufe NADP inkubiert. **A** Die Analyse des akrosomalen Status ergab, dass im niedrigen nanomolaren Bereich das Maximum der glockenförmigen Kurve nach Stimulierung mit 50 nM NAADP erreicht wurde. **B** Im mikromolaren Konzentrationsspektrum war der Anteil der Spermien ohne Akrosom nach Stimulation der Spermien mit 1 μM NAADP am höchsten. Die Erhöhung der NAADP Konzentration in den unphysiologischen Bereich über 10 μM resultierte auch in der Erhöhung der Akrosomreaktionsrate. Die Zugabe von NADP konnte erst ab sehr hohen Konzentrationen (100 μM) die Akrosomreaktion auslösen (Arndt et al., 2014).

In Spermien von $TPC1^{-/-}$ Mäusen wurde die Akrosomreaktion unverändert durch eine Konzentration von 50 nM NAADP ausgelöst; auch die Applikation der vermutlich unphysiologischen Konzentration von 50 μM führte zur akrosomalen Exozytose. Es war allerdings nicht mehr möglich, durch die Zugabe von 1 μM NAADP die Akrosomreaktion in $TPC1^{-/-}$ Spermien zu induzieren (s. Abb. 10). Diese Daten deuten darauf hin, dass TPC1 in Spermien, wie auch in anderen Zellsystemen, als niedrig-affine NAADP-Zielstruktur dient. Das erste Maximum der Dosis-Wirkungs-Kurve im nanomolaren Bereich ist vermutlich das Resultat der Aktivierung des TPC2, der bereits als hochaffine NAADP-Zielstruktur beschrieben wurde (Grimm et al., 2014; Ruas et al., 2015).

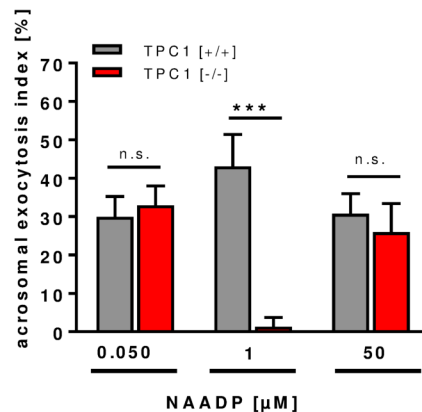


Abb. 10 Effekte der Defizienz für TPC1 auf die Akrosomreaktionsrate.

In kapazitierten Spermien von TPC1^{-/-} Mäusen konnte die Akrosomreaktion durch die Zugabe von 50 nM und 50 μM NAADP weiterhin ausgelöst werden. Die in Wildtyp Spermien dokumentierte maximale Stimulation der Akrosomreaktion nach Zugabe von 1 μM NAADP konnte in TPC1^{-/-} allerdings nicht mehr registriert werden (Arndt et al., 2014).

3.5 Zielsetzung

Die Degranulation von Mastzellen zeichnet sich dadurch aus, dass, je nach Immunantwort, entweder einzelne oder auch eine Kombination von Immunmediatoren aus den sekretorischen Granula freigesetzt werden. Zudem kann die ausgeschüttete Mediatormenge durch verschiedene Formen der Exozytose (z. B. *compound exocytosis*, *piece-meal degranulation*) gezielt gesteuert werden. Die regulatorischen Mechanismen, die dieser selektiven Freisetzung von Immunmediatoren zu Grunde liegen, sind zum größten Teil noch unverstanden. Diese könnten aber gerade im Hinblick auf neue Therapieansätze bei einer Überaktivierung von Mastzellen und einer damit verbundenen vermehrten Ausschüttung von Mediatoren, z. B. im Rahmen einer allergischen Reaktion, von besonderem Interesse sein.

Die durch Allergene induzierte Quervernetzung von Fcε-Rezeptoren löst die Degranulation von Mastzellen aus. Diese Degranulation wird unter anderem durch eine IP₃-abhängige Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER getriggert. Zusätzlich zum ER, als größtes intrazelluläres Ca²⁺-Speicherorganell, enthalten Mastzellen aber auch endo-lysosomale Ca²⁺-Speicherorganellen sowie eine Vielzahl von ebenfalls mit Ca²⁺ beladenen sekretorischen Granula. Daher ist es vorstellbar, dass das in diesen sauren Ca²⁺-Speichern enthaltene Ca²⁺ eine regulatorische Funktion bezüglich der kontrollierten Mastzell-Degranulation übernimmt. Hinsichtlich der Freisetzung von Ca²⁺ aus sauren Speicherorganellen haben jüngste Studien gezeigt, dass der *second messenger* NAADP und dessen molekulare Zielstrukturen, die *two-pore channels*, die Ca²⁺-Freisetzung aus sauren Vesikeln vermitteln. Daher soll im Rahmen meiner Arbeit die Bedeutung von

NAADP und der TPCs für die Degranulation von Mastzellen exemplarisch an isolierten peritonealen Mastzellen untersucht werden. Zunächst möchte ich dazu die Expression des TPC1- und TPC2-Proteins in den peritonealen Zellen mit Hilfe von Western Blot bzw. immunocytochemischen Techniken überprüfen. Mittels TPC1 und TPC2-defizienter Mauslinien soll dann in den weiteren Analysen geklärt werden, ob beide TPC-Subtypen vergleichbare Funktionen hinsichtlich der Mastzell-Degranulation übernehmen. Zur Quantifizierung der Stärke der Degranulationsreaktion sollen elektrophysiologische Kapazitätsmessungen an GTP γ S-stimulierten Wildtyp und TPC-defizienten Mastzellen im *whole cell* Modus durchgeführt werden, wobei auch Messungen mit NAADP und dem TPC Blocker Tetrandrine folgen werden. Zudem sind vergleichende *live cell* Ca²⁺-Imaging Versuche an Wildtyp und TPC-defizienten Mastzellen geplant. Dabei werden unterschiedlich affine Ca²⁺-Fluoreszenzindikatoren zur gezielten Erfassung von Veränderungen der Ca²⁺-Konzentration sowohl im Zytosol als auch in den intrazellulären Speichern eingesetzt. Eine selektive Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER bzw. dem lysosomalen System wird durch den Einsatz spezifischer pharmakologischer Wirkstoffe (Thapsigargin, GPN) erfolgen. Diese beiden experimentellen Ansätze sollen durch Studien ergänzt werden, in denen die freigesetzte Menge des Immunmediators Histamin mit Hilfe eines kompetitiven Immunoassays quantitativ erfasst wird. Da neueste Untersuchungen zudem erste Hinweise auf die Existenz von TPC-enthaltenden Proteinkomplexen geben, die den Kontakt zwischen dem ER und dem endo-lysosomalen System vermitteln, sollen mit Hilfe von Immunopräzipitationsstudien in Kombination mit massenspektrometrischen Analysen neue TPC-Interaktionspartner identifiziert werden. Außerdem soll in elektronenmikroskopischen Analysen an Wildtyp und TPC defizienten Mastzellen geprüft werden, ob die Menge der Kontaktstellen zwischen den Ca²⁺-Speichern von der Expression der TPCs abhängig ist. Dieser Ansatz erlaubt es außerdem, die Morphologie der TPC1-defizienten Mastzellen zu analysieren. Im Gegensatz zu Mastzellen enthalten Spermien nur ein einziges, dafür aber riesiges Lysosom-verwandtes Vesikel, das Akrosom, dessen Fusion mit der Plasmamembran eine essentielle Voraussetzung für die erfolgreiche Befruchtung einer Eizelle darstellt. Bezüglich der akrosomalen Exozytose konnten wir in unserem Labor bereits zeigen, dass die Applikation von NAADP zur Auslösung der Akrosomreaktion führt, und dass TPC1 (und vermutlich auch TPC2) an diesem Prozess beteiligt sind. Da die Akrosomreaktion *in vivo* aber durch den direkten Kontakt des Spermiums mit der Glykoproteinmatrix der Eizelle, der *Zona pellucida*, ausgelöst wird, soll im Rahmen meiner Arbeit untersucht werden, ob NAADP auch eine Bedeutung für die durch den physiologischen Stimulus ausgelöste akrosomale Exozytose hat. Dazu sollen Spermien zunächst mit solubilisierter *Zona pellucida* alleine bzw. in Kombination mit dem NAADP-

Antagonisten *trans*-Ned 19 stimuliert werden. Anschließend erfolgt eine mikroskopische quantitative Erfassung des akrosomalen Status der unterschiedlich behandelten Spermienproben. Der tatsächliche Effekt der TPC-Defizienz auf die Reproduktionsfähigkeit von Mäusen soll in monogamen Zuchtansätzen TPC1- und TPC2-defizienter Elterntiere bestimmt werden, wobei Reproduktionsparameter wie z. B. die Wurfgröße und die Wurfintervalle registriert werden sollen. Um Hinweise auf eine mögliche funktionelle Redundanz beider TPC-Subtypen zu sammeln, sollen entsprechende Zuchtansätze auch für TPC1/2-doppelt-defiziente Mäuse durchgeführt werden.

4 Material

4.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
A23187 Calcium-Ionophor	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Rotiphorese 30)	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
6-Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bovines Serumalbumin	Carl Roth, Karlsruhe
Compound 48/80	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blau G250	Serva, Heidelberg
Desoxy-Nukleotid-5'-Triphosphat (dNTPs)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
4',6-Diamidin-2-phenylindol dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dithiotreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt
Dinitrophenol (DNP)-BSA	Thermo-Fisher Scientific, Waltham (USA)
DNAse	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth, Karlsruhe
FcR Blocking reagent mouse	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Fluoreszenz-Eindeckmedium (Fluorescent Mounting Medium)	Dako Cytomation, Hamburg
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching (Österreich)
Formaldehydlösung, 37 %	Carl Roth, Karlsruhe
FM™ 1-43 Dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Fura-2-AM	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fura-2-FF-AM	Biomol, Hamburg
Glutaraldehyd, 25 %	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Guanosin 5'-[γ-thio]triphosphat Tetralithiumsalz (GTPγS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycylphenylalanin 2-naphthylamid (GPN)	Santa Cruz, Heidelberg
Igepal (Nonidet P-40 alternative)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Material

Substanz	Hersteller
Immersionsöl	Zeiss, Jena
Immunglobulin E (IgE) Anti-Dinitrophenyl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Immunglobulin G (IgG) aus Kaninchenserum	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Lactat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Luminol (3-Aminophthalhydrazid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
LysoTracker™ Red DND-99	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Microbeads CD117, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Natriumdesoxycholat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumlactat-Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>trans</i> -Ned 19	Tocris, Bristol (UK)
N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Nikotinsäureadenindinukleotidphosphat (NAADP)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Nikotinsäureadenindinukleotidphosphat-Acetoxymethylester (NAADP-AM)	AG Grimm, LMU München
4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide (pNAG)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Normales Ziegenserum (NGS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Paraformaldehyd, 16 %	Science Services, München
Penicilin/ Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Percoll	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pluronic F-127	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Protease-Inhibitor Cocktail Set III	Merck, Darmstadt
Protease-Inhibitor cOmplete Cocktail Tabletten	Roche, Mannheim
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pyruvat	
Roti® Gel-stain	Carl Roth, Karlsruhe
Sigmacote	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Substanz	Hersteller
Tetrandrine	Santa Cruz, Heidelberg
Thapsigargin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triethanolamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe

Soweit nicht anders angegeben, wurden Standardchemikalien von Carl Roth, Karlsruhe oder Sigma-Aldrich, Deisenhofen bezogen.

4.2 Puffer und Stocklösungen

<i>Zellkultur</i>	
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) steril (Gibco)	<i>Phosphate buffered salt solution (PBS) steril (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)</i>
<i>Hank's balanced salt solution (HBSS) steril (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)</i>	
<i>Puffer für die Molekularbiologie</i>	
Probenpuffer für die Agarosegelelektrophorese (6x) 40 % Glycerin (v/v) 0,25 % Bromphenolblau (w/v) in TAE-Puffer TAE-Puffer 40 mM Tris 20 mM Essigsäure 2 mM EDTA pH 8,3	Puffer B 25 mM EDTA 75 mM NaCl pH 8,0

Puffer für die Proteinbiochemie

Blotpuffer

12 mM Tris
 96 mM Glycin
 0,5 % SDS
 10 % Methanol

Bradford-Reagenz

5 % Bradford Stammlösung (v/v)
 8,5 % Phosphorsäure (v/v)

ECL-Lösung S1

100 mM Tris/HCl
 2,5 mM Luminol
 0,4 mM Para-Coumarinsäure
 pH 8,5

HEPES-Resuspensionspuffer

50 mM HEPES
 250 mM NaCl
 1 mM CaCl₂
 0,5 % Igepal (v/v)
 pH 7,6

Lysispuffer Mastzellen

10 mM Tris-HCl (pH 8)
 5 % Glycerol
 1 mM EDTA
 68,5 mM NaCl
 0,5 % Triton X-100
 cOmplete Proteaseinhibitor (Roche)
 10 µg/ml DNase

MACS-Puffer

0,5 % BSA
 2 mM EDTA
 in PBS

Ponceau S Lösung

0,1 % Ponceau S (v/v)
 5 % Essigsäure (v/v)

Bradford-Stammlösung

0,1 % Coomassie Brilliant Blau G250
 (w/v)
 in Ethanol

ECL-Lösung S2

100 mM Tris/HCl
 18 µM H₂O₂
 pH 8,5

HEPES-Waschpuffer

0,01 % Natriumdesoxycholat
 cOmplete Proteaseinhibitor (Roche)
 in HEPES-Resuspensionspuffer

Lysispuffer Lysosomen-Isolation

250 mM Sucrose
 50 mM Tris
 25 mM EDTA
 pH 7,6

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)

150 mM NaCl
 1,4 mM K₂HPO₄
 8 mM Na₂HPO₄
 pH 7,4

<p>Elutionspuffer (2x) 120 mM Tris/HCl 20 % Glycerin (v/v) 10 % β-Mercaptoethanol (v/v) 8 % SDS (w/v) 0,01 % Bromphenolblau (w/v) pH 6,8</p> <p>Sammelgelpuffer (4x) 500 mM Tris/HCl 0,4 % SDS (w/v) pH 6,8</p> <p>Sucrosepuffer <i>lipid rafts</i> Isolation 100 mM Tris 300 mM Sucrose cOmplete Proteaseinhibitor (Roche)</p> <p>Tris gepufferte Salzlösung (TBS) 0,1 M Tris/HCl pH 7,3</p> <p>Trenngelpuffer (4x) 1,5 M Tris/HCl 0,4 % SDS (w/v) pH 8,8</p>	<p>Probenpuffer für die SDS-PAGE (Laemmli) (4x) 62,5 mM Tris/HCl 20 % Glycerin (v/v) 5 % β-Mercaptoethanol (v/v) 4 % SDS (w/v) 0,1 % Bromphenolblau (w/v) pH 6,8</p> <p>SDS-Laufpuffer 25 mM Tris 0,1 % SDS (w/v) 190 mM Glycin</p> <p>Sucrosepuffer Lysosomen-Isolation 28,8 bzw. 46 % Sucrose 10 mM Tris 5 mM EDTA pH 7,6</p> <p>Tris gepufferte Salzlösung mit Tween (TBST) 10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20 (v/v) pH 7,4</p> <p>Überschichtungspuffer 25 % Sammelgelpuffer (4x) (v/v) 50 % Isopropanol (v/v) 25 % H₂O (v/v)</p>
<p><i>Puffer für elektronenmikroskopische Untersuchungen</i></p>	
<p>Blockierungs/Permeabilisierungs-Lösung 0.5 % BSA 0.1 % Saponin 50 mM NH₄Cl in PBS</p>	<p>Glutaraldehydlösungen 1 % bzw. 2 % Glutaraldehyd in 200 mM HEPES-Lösung</p>

<p>PB-Puffer 200 mM Na₂HPO₄•2H₂O davon 24,5 % 200 mM NaH₂PO₄•2H₂O davon 25,5 % in ddH₂O</p>	<p>PFA-Fixierungslösung 4 % Paraformaldehyd in 200 mM HEPES-Lösung</p>
<p><i>Puffer für funktionelle Analysen (Mastzellen)</i></p>	
<p>Citratpuffer 49,5 % 500 mM Zitronensäure 50,5 % 500 mM Tri-Natriumcitrat pH 4,5</p> <p>Externe Na⁺-Ringer Lösung 140 mM NaCl 1 mM CaCl₂ 2,8 mM KCl 2 mM MgCl₂ 10 mM Hepes NaOH 11 mM glucose pH 7,2 300 mosmol l-1</p> <p>Interne Kalium-Glutamat Lösung 120 mM Kalium-Glutamat 8 mM NaCl 1 mM MgCl₂ 10 mM Hepes pH 7,2 280 mosmol l-1</p> <p>Natrium-Carbonat-Puffer 60 % 500 mM Na₂CO₃ 40 % 500 mM NaHCO₃ pH 10</p>	<p>Externe Na⁺-Ringer Lösung (ohne Ca²⁺) 140 mM NaCl 0,5 mM EGTA 2,8 mM KCl 2 mM MgCl₂ 10 mM Hepes NaOH 11 mM glucose pH 7,2 300 mosmol l-1</p> <p>HEPES-Puffer 10 mM HEPES 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 0,4 mM Na₂HPO₄•7H₂O 5,6 mM Glucose 1,8 mM CaCl₂•2H₂O 1,3 mM MgSO₄•7H₂O 0,04 % Bovine serum albumin (BSA) pH 7,4</p>
<p><i>Puffer für funktionelle Analysen (Spermien)</i></p>	
<p>Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung 0,04 % Coomassie Brilliant Blue G250 10 % Essigsäure 50 % Methanol</p>	

<p>HB-Puffer 150 mM NaCl 25 mM Triethanolamin 1 mM MgCl₂ 1 mM CaCl₂ 1 mM PMSF cOmplete Proteaseinhibitor (Roche) pH 8,5</p> <p>HS-Puffer 30 mM HEPES 135 mM NaCl 5 mM KCl 2 mM CaCl₂ 1 mM MgCl₂ 10 mM Glucose 10 mM Lactat 1 mM Pyruvat</p> <p>Post-Fixierungs-Waschpuffer 100 mM Ammoniumacetat in ddH₂O pH 9</p>	<p>HB+++Puffer HB-Puffer 0,2 % Aprotinin 0,2 % DNase</p> <p>HS++-Puffer 15 mM NaHCO₃ 0,5 % BSA in HS-Puffer</p> <p>Spermien-Fixierungs-Puffer 20 mM Na₂HPO₄ 150 mM NaCl 7,5 % Formaldehyd</p>
--	--

4.3 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
Allgemeine Glaswaren	Carl Roth, Karlsruhe
Deckgläschen (24 x 60 mm)	VWR, Darmstadt
Deckgläschen (Ø12 mm)	Menzel, Braunschweig
Dounce-Homogenisator	Kontes, Vineland (USA)
Dynabeads® M270 Epoxy	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Einmalspritzen Injekt 10 ml	Braun, Melsungen
Elektrodenpapier NovaBlot	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Färbekasten und –gestell aus Glas	Carl Roth, Karlsruhe
Fettstift (Pap Pen)	Dako Cytomation, Hamburg
Filterpapier, extra dick	Bio-Rad, München
Inkjet-F Einmalspritzen (1 mL)	Braun, Melsungen

Material

Artikel	Hersteller
Mikroliterspritzen Gastight (1705, 1710)	Hamilton, Bonaduz (Schweiz)
Mikrotiterplatte 96-well, half-well, weiß	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
Mörser mit Pistill	Carl Roth, Karlsruhe
MS Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Neubauer-Improved Zählkammer	Brand, Wertheim
Nitrozellulose-Membran Protran 0,45 µm	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago (USA)
PE-Schlauchfolie (0,2 mm)	Rische und Herfurth, Hamburg
Petrischalen (Ø 35 mm, 60 mm, 100 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischale mit Glasboden (Ø 35 mm)	MatTek, Ashland (USA)
pH-Indikatorpapier	Macherey-Nagel, Düren
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen für Multipette Combitip (0,2 – 10 ml)	Eppendorf, Hamburg
Potter Elvehjem (3 ml, 30 ml)	VWR, Darmstadt
Potter Elvehjem (17 ml)	Omnilab, Bremen
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterican Einmal-Injektionskanüle Gr. 23	Braun, Melsungen

4.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegelelektrophorese-System	Peqlab, Erlangen
Biophotometer Plus	Eppendorf, Hamburg
CCD-Kamera (Ixon+)	Andor, Belfast (Nordirland)
Chemilumineszenz-Detektionssystem (Chemismart 5100)	Peqlab, Erlangen
Elektrophorese System Mini PROTEAN® Tetra	Bio-Rad, München
Fluoreszenzmikroskop IX71 mit Lichtquelle X-Cite 120PC und Kamera XM10	Olympus, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop IX70	Olympus, Hamburg
Guava® easyCyte Durchflusszytometer 5	Merck Millipore, Billerica (USA)

Material

Gerät	Hersteller
Inkubator HeraCell 240	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Konfokales Laser Scanning Mikroskop (LSM 880)	Zeiss, Jena
Kühlzentrifuge mit Ausschwingrotor A-4-44	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifugen (Biofuge Stratos, Biofuge Fresco 21)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Lichtmikroskop Axio Vert A1	Zeiss, Jena
Lichtmikroskop CKX41 mit Kamera SC20	Olympus, Hamburg
Magnet Dynal	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Magnet QuadroMacs Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührer (Barnstead Thermolyne)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Mikromanipulator	Scientifica, Uckfield (UK)
Mikrowelle	Severin, Sundern
Monochromator Polychrom V	Till Photonics, München
Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop 2000c Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Osmometer Vapro® 5600	Wescor, Puteaux (Frankreich)
Patch Clamp Verstärker EPC 10	HEKA, Lambrecht
PCR-Maschine	Bio-Rad, München
PCR-Maschine Primus 25	Peqlab, Erlangen
pH-Meter FiveEasy plus	Mettler-Toledo, Gießen
PicoTipEmitter, 30µm	New Objective, Woburn (USA)
Pipetten (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Peqlab, Erlangen
Pipetten-Puller DMZ Universal	Zeitz, München
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Herrenberg
Schüttelheizblock TS-100	Peqlab, Erlangen
SDS-PAGE-System Mini Protean Tetra Cell	Bio-Rad, München
Semi-Dry Blotter Novex®	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Spannungsquelle EV 231	Peqlab, Erlangen
Sterilbank HERAsafe	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Taumler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Tiefkühlschrank -80°C	New Brunswick Scientific (Eppendorf), Hamburg

Material

Gerät	Hersteller
Tischzentrifuge (Biofuge Pico 17)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Ultraschallstab MSE 100W	Measuring + Scientific Equipment, London (UK)
Ultrazentrifuge (UZ) Beckmann XL-90	Beckmann-Coulter, Krefeld
Ultrazentrifugenrotoren SW40 Ti und 50.2 Ti	Beckmann-Coulter, Krefeld
UV-Geldokumentationssystem Infinity 3026	Peqlab, Erlangen
Vortexer MS3 Basic	Ika, Staufen
Waage EG 620-3NM	Kern, Balingen
Wärmeschrank UFE 600	Memmert, Schwabach
Wasserbad WNE 14	Memmert, Schwabach
Wipp-Mischer SLG	Süd-Laborbedarf, Gauting
Überkopffrotor	Feinmechanikwerkstatt des Walther-Straub-Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München

4.5 Antikörper

4.5.1 Primärantikörper

Name	Donor-spezies	Verdünnung			Herkunft	Katalog-nummer
		ICC/EM	WB	FACS		
Actin	Kaninchen		1:1000		Sigma-Aldrich	A2066
B 220 FITC	Ratte			1:100	Biologend	103205
Caveolin-1	Kaninchen	-	1:2.000		Santa Cruz, Heidelberg	SC894
CD 3 FITC	Ratte			1:100	Biologend	100203
CD 11b FITC	Ratte			1:100	Biologend	101205
CD 11c APC				1:100		
CD 19 APC	Ratte			1:100	Biologend	152409
CD 117 FITC	Ratte			1:100		105805
Histamin	Ratte	1:100			Abnova	PAB14706
IP ₃ -Rezeptor	Kaninchen		1:1000		Synaptic Systems	117002
Irbt	Kaninchen		1:500		Sigma-Aldrich	SAB2100076
Isotypkontrolle IgG2bk FITC	Ratte			1:100	Biologend	400605

Material

Name	Donor- spezies	Verdünnung			Herkunft	Katalog- nummer
		ICC/EM	WB	FACS		
Isotypkontrolle IgG2ak APC	Ratte			1:100	Biologend	400511
Lamp-1	Kaninchen		1:500		Abcam	ab24170
Ly6-G APC	Ratte			1:100	Biologend	127613
Rab 3a			1:1000		Santa Cruz	
Rab 5			1:1000		Synaptic Systems	
Rab 7			1:1000			
TPC1	Kaninchen	1:500	1:1000		AG Klugbauer, Freiburg	
TPC2	Kaninchen	1:100	1:1000		AG Wahl-Schott, München	

4.5.2 Sekundärantikörper

Name	Donorspezies	Verdünnung		Hersteller
		ICC/EM	WB	
anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-gekoppelt	Ziege	-	1:7.500	Bio-Rad, München
anti-Maus IgG, Peroxidase-gekoppelt	Ziege	-	1:10.000	Bio-Rad, München
Anti-rabbit-nanogold 1,4 nm	Ziege	1:100		Nanoprobes
Anti-rat-nanogold 1.4 nm	Ziege	1:100		Nanoprobes
Anti-rabbit FITC		1:1200		Invitrogen
Anti-rabbit A546		1:1200		Invitrogen
Anti-rat FITC		1:1200		Invitrogen

4.6 Kits, Enzyme und Größenstandards

Artikel	Hersteller
DNase I	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Artikel	Hersteller
DNA-Größenstandard (100 BP, 1 kBP)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Dynabeads® Antibody Coupling Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Gold-Enhance™ EM Kit	Nanoprobes, Yaphank (USA)
Histamin-Kit	Cisbio, Codolet (Frankreich)
Protein-Größenstandard BluePlus	Biomol, Hamburg
Protein-Größenstandard BluePlus WIDE	Biomol, Hamburg
Protein-Größenstandard PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Protein-Größenstandard PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Protein-Größenstandard Spectra Multicolor High Range	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
RNase A	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Taq-Polymerase und –Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

4.7 Primer zur Genotypisierung

TPCN1 wild-type	390 bp	5'TCA GCT GCC TGT GAG CCA GAG 3' 5'GGA GCT CAC CTG GTT GTG CCA TA 3'
TPCN1 knockout	290 bp	5'TCA GCT GCC TGT GAG CCA GAG 3' 5'CCA TGC CTT TGA TCC CAA CAA 3'
TPCN2 wild-type	290 bp	5'ATG CCT AAT CCA GAT GGC TC 3' 5'TGG ACA TGC AAC AGG CTC TC 3'
TPCN2 knockout	379 bp	5'CCT CAG CCT CAA GAT GAG TG 3' 5'TGG ACA TGC AAC AGG CTC TC 3'

4.8 Versuchstiere und Zelllinien

<i>Rat basophilic leukemia</i> (RBL) -1 Zellen	AG Dr. Wladimir Chubanov, Walther-Straub Institut, LMU München
Maus, Balb/C	Charles River Wiga Deutschland, Sulzfeld Tierstall Walther-Straub-Institut, LMU München
Maus, C57BL/6N	Elevage Janvier, St. Berthevin, Frankreich Tierstall Walther-Straub-Institut, LMU München
Maus, gendefiziente TPCN1 Maus	AG Prof. N. Klugbauer, Universität Freiburg, Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie
Maus, gendefiziente TPCN2 Maus	AG Prof. Dr. Christian Wahl-Schott Ludwig-Maximilians-Universität München Department Pharmazie Zentrum für Pharmaforschung
Maus, gendefiziente TPCN1, TPCN2 (DKO) Maus	Kreuzung aus gendefizienten TPCN1/TPCN2 Mauslinien Tierstall Walther-Straub-Institut, LMU München

5 Methoden

5.1 Arbeit mit Mäusen

5.1.1 Verwendete Mauslinien

Um die funktionelle Rolle der TPCs bei der Exozytose zu untersuchen, wurden TPC1-, TPC2- und TPC1/2-defiziente Mauslinien verwendet. Die TPC1^{-/-} Mauslinie wurde freundlicherweise von Prof. Norbert Klugbauer (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt (Jan Castonguay, 2014). Die Maus wurde generiert, indem das Exon 3 der TPCN1 Gensequenz mittels des Cre-loxP Rekombinationssystems (Orban et al., 1992) eliminiert wurde; dabei entstand eine Mauslinie mit gemischtem SV129/C57Bl/6 Stammhintergrund, die kein funktionelles TPC1 Protein exprimiert (s. Abb. 11) (Arndt et al., 2014; Jan Castonguay, 2014; Ruas et al., 2014). Die TPC1^{-/-} Mäuse wurden in der Mausezuchtanlage des Walther-Straub Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der LMU München in 12. Generation auf einen C57Bl/6N-Hintergrund zurückgekreuzt. Die TPC2^{-/-} Mauslinie wurde von Prof. Christian Wahl-Schott und Prof. Martin Biel (Department Pharmazie, LMU München) generiert. Dazu wurde das Exon 7 der TPCN2 Gensequenz ebenfalls durch das Cre-loxP Rekombinationssystem eliminiert (Hassan, 2014) (s. Abb. 11). Durch strategische Verpaarungen der Einzel-TPC-knockout Mauslinien wurde im Tierstall des Walther-Straub Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der LMU München zusätzlich eine TPC1/TPC2 Doppel-knockout (TPC DKO) Linie generiert (s. Abb. 12). Die verwendeten Mäuse der TPC2^{-/-} - und TPC1/2^{-/-} -Linien waren mindestens in der siebten Generation auf einen C57Bl/6 Hintergrund zurückgekreuzt

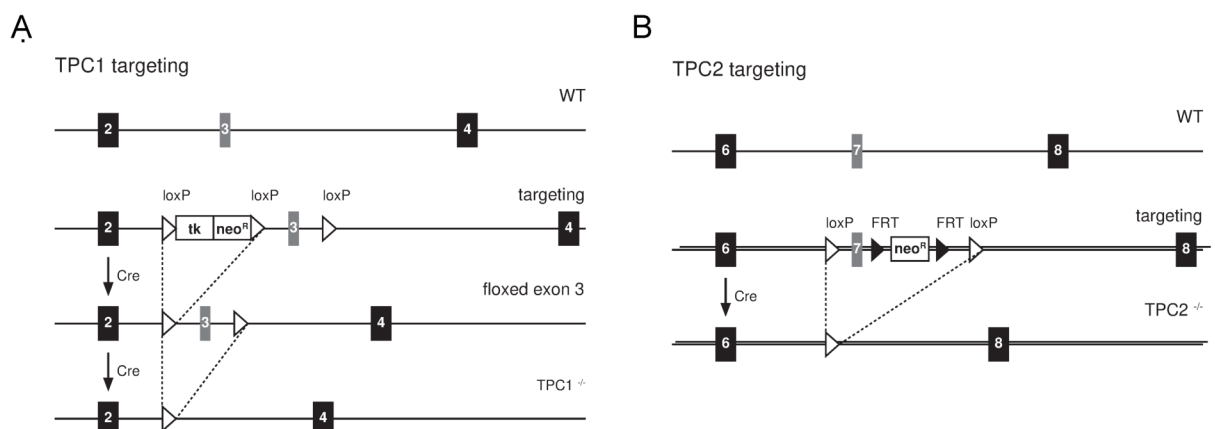


Abb. 11 Strategien zur Generierung von TPC Knockout-Mausmodellen.

Zur Erzeugung einer TPC1 [A] und TPC2 [B] Knockout-Mauslinie wurde jeweils das Cre-loxP Rekombinationssystem verwendet. Durch Exzision des Exons 3 der TPCN1- bzw. Exon 7 der TPCN2-Gensequenz können keine funktionellen TPC Proteine mehr synthetisiert werden. Modifiziert nach (Jan Castonguay, 2014; Hassan, 2014)

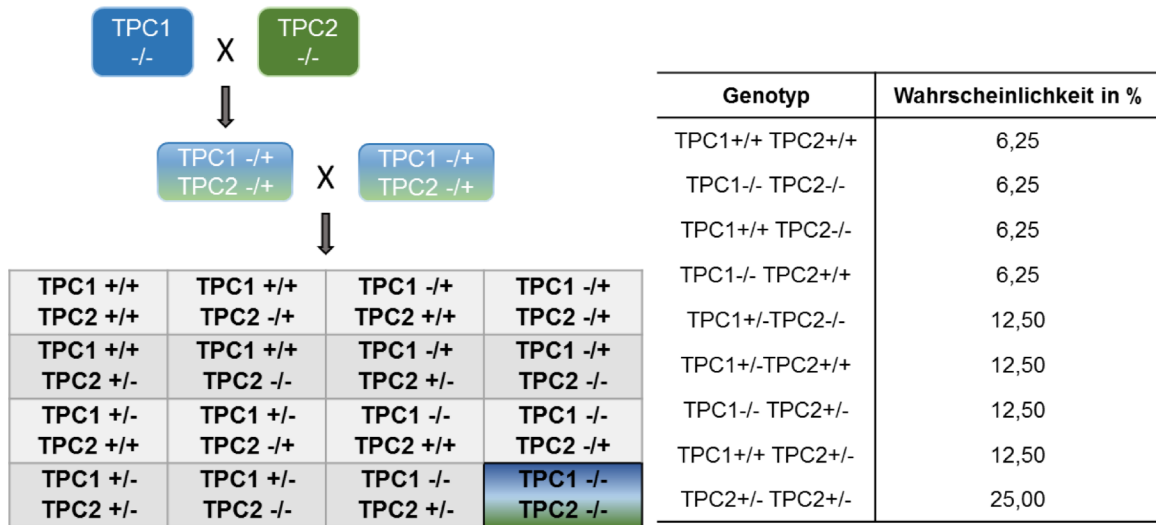


Abb. 12 Kreuzungsstrategie zur Generierung einer TPC1/2 Doppel-Knockout Mauslinie. Durch die Verpaarung von Tieren, die homozygot defizient für TPC1 bzw. TPC2 sind (obere Zeile), erhält man Nachkommen, die heterozygot für beide Merkmale sind (mittlere Zeile). Kreuzt man wiederum zwei dieser Nachkommen, können sich 9 verschiedene Genotypen mit unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten (s. Tabelle) ergeben.

5.1.2 Tierhaltung und Zucht

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Mäuse, wurden in der vom Veterinäramt München genehmigten Tierversuchsanlage des Walther-Straub Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der LMU München gezüchtet und bis zur weiteren Verwendung in isoliert belüfteten Käfigen (IVC, Techniplast Hohenpeißenberg) bei einem je zwölf Stunden andauernden Hell/Dunkel-Rhythmus gehalten (pro Käfig maximal sechs Weibchen bzw. fünf Männchen). Luftfeuchtigkeit und Temperatur betragen konstant 50 % bzw. 22 °C; Futter (Nagerfutter SNIFF Spezialdiät, Soest) und Wasser waren ohne Einschränkungen verfügbar. Das Einstreumaterial (Lignocoel Select, Rettermaier und Söhne, Rosenberg) wurde ein- bis zweimal in der Woche gewechselt und durch Holzwolle ergänzt.

Die Zucht der Tiere erfolgte in monogamen Verpaarungen, wobei das Mindestalter der Zuchtpaare acht Wochen betrug. Geborene Jungtiere wurden nach einer dreiwöchigen Aufzuchtzeit durch die Eltern nach Geschlecht getrennt und in separate Käfige abgesetzt. Im gleichen Arbeitsschritt wurde zur späteren Bestimmung der Genotypen der Nachkommen eine Gewebeprobe von der Schwanzspitze der Jungtiere genommen und die Tiere durch das Einstanzen von Ohrlochmustern individualisiert (Dahlborn et al., 2013). Parallel wurden für jede Mauslinie (TPC1, TPC2, TPC DKO) Wildtypiere mit dem

gleichen genetischen Stammhintergrund gezüchtet. Um Wurfgeschwister mit unterschiedlichen Genotypen (Wildtyp und knockout) zu erhalten, wurden zusätzlich heterozygote Verpaarungen angesetzt.

5.1.3 Genotypisierung

5.1.3.1 *Verdau und DNA-Extraktion*

Die ca. 5 mm langen Schwanzspitzen der abgesetzten Jungtiere wurden zunächst bei 4°C gelagert; Zur Isolierung des genetischen Materials wurde das Gewebe in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen mit 330 µl Puffer B (s. 4.2) supplementiert mit 1 mg/ml Proteinase K und 10 % SDS über Nacht bei 55°C im Wasserbad unter Schütteln verdaut. Am nächsten Tage wurden die Proben zunächst mit 1,5 µl RNase A (10 mg/ml in ddH₂O) versetzt und weiter bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Anschließend wurden die verdauten Gewebelysate mit 100 µl gesättigter NaCl-Lösung (35 % w/v in ddH₂O) versetzt und nach 15 min weiteren Schüttelns bei RT bei 17000 rcf für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße umgefüllt und mit 860 µl 100 % Ethanol gemischt, um so die enthaltene DNA zu präzipitieren. Nach erneuter Zentrifugation bei 17000 rcf für 15 min wurde der Überstand verworfen und das verbliebene Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 17000 rcf für 5 min verworfen und die DNA nach Lufttrocknen über Nacht in 100 µl ddH₂O gelöst und bei 4°C gelagert.

5.1.3.2 *Polymerase-Kettenreaktion*

Zur Genotypisierung der verwendeten Mäuse wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit spezifischen Primern (s. 4.7) für die entsprechenden Wildtyp- und TPC1- bzw. TPC2-knockoutsequenzen durchgeführt. Je 1 µl der isolierten Schwanzspitzen-DNA wurde auf Eis mit 24 µl eines Mastermix bestehend aus 18,875 µl H₂O, 2,5 µl *PCR reaction buffer* (DreamTaq, Thermo Fisher Scientific), 0,5 µl dNTPs (0,8 mM), 0,125 µl Taq Polymerase (DreamTaq, Thermo Fisher Scientific) und je 1 µl der entsprechenden Primer versetzt. Die für die Durchführung der PCR gewählten Protokolle sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 1: PCR-Protokoll zur Genotypisierung der TPC1-defizienten Mauslinie.

Zyklusschritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94	5	1
Amplifikation	Denaturierung	94	1
	Primer Bindung	65	1
	Elongation	72	1
Amplifikation	Denaturierung	94	1
	Primer Bindung	61	1
	Elongation	72	1
Finale Elongation	72	10	1

Tabelle 2: Programm zur Durchführung der Genotypisierungs-PCR der TPC2-defizienten Mauslinie.

Zyklusschritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94	5	1
Amplifikation	Denaturierung	95	1
	Primer Bindung	65	1
	Elongation	72	3
Amplifikation	Denaturierung	95	1
	Primer Bindung	63	1
	Elongation	72	3
Finale Elongation	72	10	1

5.1.3.3 Agarose Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der durch die PCR gewonnenen Amplifikationsprodukte wurden diese auf ein 1,5 %-iges Agarose-Gel aufgetragen. Die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren der DNA wandern in einem elektrischen Feld zur Anode. (Sharp et al., 1973) Die PCR-Amplifikate werden ihrer Größe nach aufgetrennt, da sie unterschiedlich schnell durch die Agarosegelmatrix wandern (Aaij und Borst, 1972). Die DNA kann dann mit Hilfe von Fluoreszenz-Farbstoffen detektiert werden.

Zur Herstellung des Gels wurden 1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (s. 4.2) durch mehrmaliges Aufkochen in einer Mikrowelle aufgelöst. Nach einer kurzen Abkühlphase wurden ca. 5 µl des nicht-toxischen und nicht mutagenen Fluoreszenzfarbstoffs *Roti@-*

GelStain zugegeben. Das Gel wurde in einen Plexiglas-Gelschlitten gegossen und sofort Kämme eingesetzt, so dass beim Aushärten des Gels Taschen zum Auftragen der Proben erzeugt wurden. Das fest gewordene Gel konnte dann in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer eingesetzt werden, und die mit 5 µl sechsfach Probenpuffer (s. 4.2) versetzten PCR-Amplifikate in die Taschen hinein pipettiert werden. Um nach Beendigung des Gellaufs die Größen der erhaltenen Banden bestimmen zu können, wurde ein DNA-Größenstandard (s. 4.6) mit auf das Gel aufgetragen. Nach ca. 45 min Laufzeit bei 120 mV wurde das Gel der Kammer entnommen und die DNA Banden unter UV-Licht (UV-Geldokumentationssystem, Peqlab, Erlangen) sichtbar gemacht. Je nach Größe und Zusammensetzung der Banden (s. 4.7) war es möglich, die Genotypen der analysierten Mäuse zu bestimmen.

5.1.4 Erhebung von Daten zur Untersuchung des Reproduktionsphänotyps von Mäusen

Um den Zuchterfolg TPC-defizienter Mäuse zu erfassen, wurden verschiedene Reproduktionsparameter bestimmt. Zum einen wurden die Intervalle bis zum ersten Wurf sowie die Zeitspannen zwischen den Würfen von Wildtyp sowie heterozygoten und homozygot defizienten Zuchtpaaren dokumentiert. Des Weiteren wurde die Wurfgröße ermittelt sowie die Anzahl der Würfe in einem festgelegten Zeitraum von 120 Tagen berechnet.

Für alle Nachkommen aus den analysierten Verpaarungen wurde das Geschlecht, sowie der Genotyp ermittelt und die erhobenen Daten durch Anwendung des Chi-Quadrat-Tests auf Abweichungen von den statistisch erwarteten Werten überprüft. Außerdem wurde die Anzahl der toten Nachkommen in den ersten drei Lebenswochen notiert und mit den erhaltenen Daten die Mortalitätsrate in Abhängigkeit des Genotyps der Zuchtpaare berechnet. Dabei wurde nicht zwischen totgeborenen und im Laufe der drei Wochen verstorbenen Jungtieren unterschieden.

Für TPC1^{-/-} Männchen wurde der morphologische Reproduktionsphänotyp bereits erfasst (Arndt et al., 2014). Im Rahmen dieser Arbeit wurden entsprechende Daten zum Körpergewicht, Hodengewicht und Spermienzahl für TPC2^{-/-}, TPC2 heterozygote und TPC1/2 heterozygote Männchen, sowie für parallel mitgezüchtete Wildtyp-Tiere erhoben. Das Körpergewicht wurde unmittelbar nach Tötung der Männchen durch zervikale Dislokation bestimmt. Nach Öffnung des Bauchraums der Tiere, wurden die Hoden entnommen, und nach Entfernung von Gewebe- und Fettresten gewogen; das angegebene Hodengewicht bezieht sich immer auf beide Hoden der untersuchten Männchen.

Zur Erhebung der Spermienzahl wurde der kaudale Teil beider Nebenhoden eines Männchens isoliert, in eine 35 mm Petrischale mit 2 ml HS+-Puffer (s. 4.2) überführt und eingeschnitten. Während einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C konnten die Spermien aus dem Gewebe ausschwimmen. Anschließend wurde ein Aliquot mit einem Volumen von 20 µl aus der Schale entnommen und mit 780 µl ddH₂O (1:40) verdünnt und dann mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Anzahl der Spermien bestimmt; unter Berücksichtigung der Verdünnung konnte dann die Gesamtzahl der Spermien des jeweiligen Männchens berechnet werden.

5.2 Methoden der Zellkultur

5.2.1 Verwendete Zellenlinien

Da die Gewinnung primärer Zellen teilweise mit erheblichem Aufwand verbunden ist, und die Verfügbarkeit Genotyp-spezifischer Spendertiere durch die erhöhte Mortalitätsrate der knockout Mäuse (s. 6.1.3.3) gelegentlich limitiert war, wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich zu *ex vivo* Studien auch Untersuchungen an einer Mastzell-ähnlichen Zelllinie durchgeführt.

Rat basophilic leukemia (RBL-1) Zellen wurden ursprünglich aus Chlorethylamin-induzierten Tumoren aus Wistar-Ratten isoliert und kultiviert (Eccleston et al., 1973). Die Expression des Fcε-Rezeptors in diesen Zellen konnte durch Bindungsstudien mit dem Liganden IgE nachgewiesen werden (Kulczycki et al., 1974). Dieses Merkmal in Verbindung mit der Fähigkeit, den Immunmediator Histamin zu sekretieren (Williams et al., 1991), macht die RBL-1 Zellen zu einem hilfreichen Zellmodell zur Komplettierung von Studien an Mastzellen.

5.2.2 Kultivierung von RBL-1 Zellen

Die teilweise adhärent, teilweise in Suspension wachsenden RBL-1 Zellen wurden in DMEM Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin unter Standardbedingungen (37°C, 5 % CO₂) kultiviert. Nach etwa 48 bis 72 Stunden wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde das Medium abgenommen und die Zellen vorsichtig mit sterilem PBS gewaschen. Durch die Zugabe von 0,05 % Trypsin-EDTA und anschließende Inkubation bei 37°C für ca. zwei bis fünf Minuten, wurden die Zellen von der Kulturflasche abgelöst. Um die verdauende Wirkung des Trypsins zu inhibieren, wurde erneut Medium hinzugefügt und die Zellen darin durch vorsichtiges Resuspendieren vereinzelt. Je nach Zelldichte wurden 10 bis 20 % der ursprünglichen Zellsuspension in eine neue Kulturflasche überführt und mit dem, je nach Größe der Flasche benötigten Volumen Kulturmedium aufgefüllt.

5.2.3 Kryokonservierung von RBL-1 Zellen

Für schonendes Einfrieren der RBL-1 Zellen wurden diese, wie unter 5.2.2 beschrieben, vom Boden der T175 Kulturflaschen abgelöst und in je 10 ml Medium pro Flasche aufgenommen und resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt und das entsprechende berechnete Volumen mit der gewünschten Zellzahl in ein 15 ml Falcon überführt. Zur Kryokonservierung der RBL-1 Zellen wurde eine Zellkonzentration von 5×10^6 Zellen pro 1 ml gewählt. Die Zellsuspension wurde mit kaltem PBS auf 15 ml aufgefüllt und bei 800 rcf 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet zügig (auf Eis) in 1 ml kaltem Einfriermedium (Kulturmedium mit 10 % DMSO) pro 5×10^6 Zellen resuspendiert, und je 1 ml der Suspension in ein Kryokonservierungsröhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden zunächst für zwei bis vier Tage bei -80 °C in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter aufbewahrt, um so ein gleichmäßiges, schonendes Einfrieren der Zellen zu gewährleisten. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in einem Stickstofftank aufbewahrt.

5.3 Isolation peritonealer Mastzellen

Peritoneale Mastzellen sind auf den Epithelien von Geweben und Organen lokalisiert und lassen sich durch eine Spülung und vorsichtige Massage des Bauchraumes relativ leicht isolieren (Malbec et al., 2007). Nach Tötung der Mäuse durch zervikale Dislokation, wurde die äußere Haut über dem Peritoneum geöffnet und mit Hilfe einer spitzen Kanüle mittig eine kleine Öffnung in der inneren Haut, die den peritonealen Raum umspannt, erzeugt. Zur Spülung des Bauchraums wurde *Hank's balanced salt solution* (HBSS) verwendet. Etwa 5 ml des gekühlten Puffers wurden über eine 10 ml Spritze mit aufgesetzter stumpfer Kanüle (blau 23G) vorsichtig in das Peritoneum gespritzt. Dabei wurde darauf geachtet, eine Verletzung von Blutgefäßen zu vermeiden, um so die Zellsuspension nicht mit Erythrozyten zu verunreinigen. Daraufhin wurde die kleine Öffnung mit Hilfe einer Pinzette verschlossen und der Bauchraum ca. 1 min massiert, um möglichst viele Zellen von Organen und Geweben zu lösen. Die Zellsuspension wurde anschließend mittels Spritze und Kanüle wieder aus dem Peritoneum entnommen und nach Entfernung der Spritzenkanüle in ein auf Eis vorgekühltes Gefäß (15 ml Falcon) überführt. Diese *Lavage* wurde je nach Bedarf und Zell-Ausbeute zwei- bis dreimal wiederholt. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm und 4 °C für 10 min konnte der Puffer abgenommen und die isolierten peritonealen Zellen in Medium (DMEM, 10 % FBS, 1 % P/S) resuspendiert werden. Je nach vorgesehenem experimentellem Einsatz wurden die Zellen anschließend sofort weiter verwendet oder in unterschiedlicher Dichte ausgesät und über Nacht im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO_2 gelagert, um eine

Regeneration der Zellen nach der mechanischen Belastung während der Isolation zu ermöglichen. Die so gewonnenen Mastzellen konnten in dieser Mischkultur bis zu drei Tage gehalten werden.

5.4 Isolation von Vorläufer-Mastzellen aus dem Knochenmark

Reife Mastzellen entstehen aus Vorläuferzellen, die sich im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen entwickeln. Die noch unreifen Vorläuferzellen wandern anschließend zu den verschiedenen Geweben, wo dann die eigentliche Differenzierung zu funktionellen Mastzellen beginnt (Collington et al., 2011). Um solche Vorläuferzellen zu erhalten, muss daher zunächst das Knochenmark isoliert werden. Dafür wurde nach Tötung der Maus der Oberschenkelknochen freigelegt und ein Teil des Knochens durch Schnitte oberhalb des Knies und unterhalb des Oberschenkelkopfes herausgetrennt. Das so erhaltene Stück des Röhrenknochens konnte mit Hilfe einer Spritze mit aufgesetzter 23 G Kanüle durchgespült und das gewonnene Knochenmark in einem 2 ml Reaktionsgefäß aufgefangen werden. Nach der Isolierung wurde die Knochenmarkssuspension durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Spritze mit aufgesteckter Kanüle homogenisiert und so enthaltene Zellen vereinzelt. Um die isolierten Vorläuferzellen zu lysieren und deren Proteine mittels Western Blot Technik nachweisen zu können, wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und in kaltem Lysispuffer (s. 4.2) resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Lysat bei 12000 rcf 5 min zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit Laemmli-Puffer versetzt.

5.5 Proteinbiochemische Methoden

5.5.1 Herstellung von totalen Zelllysaten

5.5.1.1 RBL-1 Zellen

Auf einer 6-well-Mikrotiterplatte wurden 50000 RBL-1 Zellen pro well ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann je 200 µl Laemmli-Puffer pro Vertiefung zugegeben; mit Hilfe einer Pipettenspitze wurde die Lösung anschließend gleichmäßig verteilt. Sobald die Lösung durch die Freisetzung der DNA aus dem Kern eine schleimige, zähflüssige Konsistenz aufwies, wurde das Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 s mit Ultraschall behandelt.

5.5.1.2 Primäre peritoneale Mastzellen

Die primären Mastzellen wurden nach der Isolation pelletiert (170 rcf, 10 min), in 100 µl Mastzell-Lysepuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach jeweils 10 min Inkubation erfolgte zur Sicherstellung der vollständigen Lyse der Zellen ein erneutes Auf-

und Abpipettieren. Anschließend wurden die Lysate zentrifugiert (12000 rcf, 10 min), und die Überstände in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Dann wurden 100 µl zweifach konzentrierter Laemmli Puffer hinzugefügt, und die Proben wiederum mit Ultraschall behandelt. Für Mastzellvorläuferzellen aus dem Knochenmark wurde nach dem gleichen Protokoll verfahren. Bis zur weiteren Verwendung der Proben wurden diese bei -20 °C gelagert.

5.5.2 Isolierung von endo-lysosomalen Organellen

Mittels eines diskontinuierlichen, zweischichtigen Sucrosegradienten ist es möglich, intakte Organellen des endo-lysosomalen Systems aus Zellkulturen oder primären Zellen zu isolieren. (Repnik et al., 2013; L. R. Walker et al., 2016) Zur Isolation endo-lysosomaler Organellen aus RBL-1 Zellen, wurden die Zellen zunächst in zwei T175 Zellkulturflaschen ausgesät und für etwa 48 Stunden im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) gelagert, bis die Konfluenz der Zellen bei ca. 90 % lag. Das Kulturmedium wurde abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und durch den Einsatz von Trypsin vom Flaschenboden abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und bei 800 rcf 5 min pelletiert; der Überstand wurde verworfen, und das Zellpellet in 3 ml Sucrose/Lysispuffer (s. 4.2) resuspendiert. Primäre Zellen wurden, wie in 5.3 beschrieben, isoliert, jedoch direkt nach Abnahme des HBSS-Puffers in 3 ml Sucrose/Lysispuffer aufgenommen und resuspendiert. In einem Potter wurden die lysierten Zellen weiter homogenisiert (15 Hübe) und anschließend zweimal für 10 s mit Ultraschall behandelt. Mittels eines Zentrifugationsschritts (500 rcf, 5 min, 4 °C) wurden die Zellkerne pelletiert, und der Überstand im Anschluss auf den zuvor hergestellten Sucrosegradienten geladen, für den 4 ml 28,8 % Sucrosepuffer vorsichtig auf 4 ml 46 % Sucrosepuffer (s. 4.2) geschichtet worden waren. Der Gradient wurde dann in einem *Swing-out* Rotor (SW 40 Ti, Beckmann Coulter) bei 230000 rcf für 90 min bei 4 °C ultrazentrifugiert und im Anschluss von oben nach unten in 1 ml Fraktionen abgenommen. Je 150 µl der Fraktionen wurden mit 50 µl vierfach SDS-Probenpuffer versetzt, um diese dann elektrophoretisch aufzutrennen (s. 5.5.5) und mittels Western Blot Technik (s. 5.5.6) zu untersuchen. Bei erfolgreicher Isolierung kommt es zu einer Anreicherung von Lysosomen und späten Endosomen an der Interphase zwischen den beiden Sucrosekonzentrationen (Fraktionen 7 und 8). Diese kann durch den Einsatz eines spezifischen Antikörpers gegen das Markerprotein für späte Endosomen und Lysosomen LAMP-1 überprüft werden (Cook et al., 2004).

5.5.3 Gewinnung von *lipid rafts*

Als Lipidflöße oder *lipid rafts* werden Regionen der Plasmamembran bezeichnet, die sich durch einen hohen Gehalt an Cholesterin und Glycosphingolipiden auszeichnen. *lipid*

rafts enthalten eine Vielzahl von Proteinen, die eine Funktion bei der Signalweiterleitung innerhalb der Zelle haben, wobei mittlerweile geklärt werden konnte, dass die Lokalisation in *rafts* eine regulierende Wirkung auf Prozesse der Signaltransduktion haben kann (Simons und Toomre, 2000). Die dichte Packung der *lipid rafts* ist verantwortlich dafür, dass sie sich nicht in kalten, nicht-ionischen Detergenzien wie Triton X-100 lösen und somit gut isolierbar sind (Brown und London, 1998; Pike, 2003). Um zunächst die intakten Zellen aufzuschließen wurde ein Sucrosepuffer (s. 4.2) verwendet, in dem die Zellen zuerst resuspendiert und dann mit Hilfe eines Potters mechanisch aufgeschlossen wurden (15 Hübe). Anschließend erfolgten drei Ultraschallbehandlungen für jeweils 30 s und eine erste Zentrifugation (10000 rcf, 10 min, 4°C) zur Sedimentierung der Zellkerne. Um die im Überstand enthaltenen cytosolischen Zellbestandteile und Membranen voneinander zu trennen, wurde eine Ultrazentrifugation (Rotor 50.2 Ti, Beckman Coulter, 230000 rcf, 1 h, 4°C) durchgeführt. Das erhaltene Pellet wurde in kaltem PBS mit 1 % Triton X-100 und 1 % Proteinaseinhibitorcocktail (Merck) resuspendiert und für 1,5 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Zur Trennung der Triton X-100-löslichen und -unlöslichen Bestandteile wurde eine abschließende Zentrifugation bei 50000 rcf, 4°C für 2 h durchgeführt. Das Detergenz-resistente Pellet (PTX), in dem sich die Lipid rafts befanden, wurde mit 100 µl der PBS/Triton X-100 Lösung resuspendiert und dann im Weiteren für eine Immuno- bzw. Co-Immunopräzipitation von TPC1 verwendet.

5.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Bestimmung des Proteingehaltes von Gewebe- oder Zellaufarbeitungen wurde die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) verwendet. Dabei macht man sich die unterschiedlichen Absorptionsspektren von Coomassie blue G250 je nach Bindungsstatus an kationische und unpolare, hydrophobe Seitenketten von Aminosäuren zu Nutze (Bradford, 1976).

Zu 2 µl der (falls notwendig verdünnten) Proteinprobe wurden 98 µl ddH₂O und 1,5 ml Bradford Reagenz (5 % Bradford-Stammlösung (s. 4.2), 8.5 % Phosphorsäure in ddH₂O) gegeben, gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Mit Hilfe eines Photometers wurde dann die Absorption bei 595 nm gemessen. Um vor Beginn der Messung den Blindwert zu ermitteln, wurden 2 µl des Puffers, der zur Aufarbeitung der Proben verwendet wurde, mit Bradford-Reagenz gemischt. Zur späteren Kalkulation des Proteingehaltes wurde eine Referenzprobe mit bekannter BSA Konzentration von 2 mg/ml hergestellt und ebenfalls bei 595 nm gemessen. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der Mittelwert der drei Messungen in Relation zur Referenzprobe gesetzt. Durch die Zugabe von Homogenisationspuffer sowie 4-fach Laemmli-puffer (s. 4.2) konnte dann eine definierte Proteinkonzentration eingestellt werden.

5.5.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts lassen sich Proteine in einem elektrischen Feld mittels Gelelektrophorese nach ihrer Größe auftrennen. Durch Zugabe einer überschüssigen Menge des anionischen Detergenz SDS werden die individuellen Ladungen jedes Proteins maskiert, so dass eine Auftrennung der Proteine nur entsprechend ihres Molekulargewichts stattfindet. Das ebenfalls im SDS-Probenpuffer enthaltene β -Mercaptoethanol zerstört durch Spaltung der Disulfidbindungen die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine und erlaubt so die Detektion von Protein-Monomeren. Um zu Beginn des Gel-Laufs die in den Proben enthaltenen Proteine alle an einem „Startpunkt“ der Lauffront zu konzentrieren, wurde das großporigere Sammelgel hergestellt. Dazu wurde ein Puffer (Sammelgelpuffer siehe 4.2) mit niedrigerem pH-Wert (6,8) und geringerer Ionenkonzentration (Tris/HCl 0.5 M) verwendet. Der Puffer (Trenngelpuffer siehe 4.2) für das Trenngel hat einen höheren pH-Wert (8.8) und eine höhere Ionenkonzentration (Tris/HCl 1.5 M). Die Porengröße im Gel wird wesentlich durch die Konzentration von Polyacrylamid bestimmt. Zur Auftrennung größerer Proteine werden Gele mit einem geringeren Acrylamid-Anteil und damit größeren Poren verwendet; je kleiner die zu untersuchenden Proteine sind, desto höher sollte der Anteil an Acrylamid gewählt werden. Für die Sammelgele wurde davon unabhängig ein Acrylamid-Anteil von 5 % eingesetzt. Die Polymerisierung des Acrylamids wurde durch Zugabe von APS (30 μ g/ml) und TEMED (0.06 %) initiiert.

Für die Herstellung der Gele wurde zunächst das Trenngel zwischen zwei Glasplatten mit integrierten Abstandshaltern gegossen und nach erfolgter Polymerisierung das Sammelgel darauf gegeben. Vor Beginn der Vernetzungsreaktion im Sammelgel wurden Taschen durch Einsetzen eines Kamms erzeugt, in die später die Proben geladen werden konnten. Die verwendeten Proben wurden zuvor auf 65 °C erhitzt und dann bei 13000 rcf für 1 min zentrifugiert. Die hergestellten Gele wurden in eine mit Laufpuffer (s. 4.2) gefüllte Kammer transferiert und mit den Proben und einem Größenstandard beladen. Zum Start der Gelelektrophorese wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Nach erfolgreicher Akkumulation der Proteine im Sammelgel und bei beginnender Auftrennung des Größenstandards wurde die Spannung auf 120 V erhöht.

5.5.6 Western Blot Technik

Die nach Molekulargewicht im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine können mit Hilfe der Western Blot Technik auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen werden, auf welcher, durch Bindung von Antikörpern, die Anwesenheit bestimmter Proteine spezifisch nachgewiesen werden kann (Towbin et al., 1979; Burnette, 1981). Beim Semi-Dry Blotverfahren werden die Nitrocellulose-Membran und zwei Filterpapiere (Bio-Rad)

zunächst in einem Blotpuffer (s. 4.2) äquilibriert, bevor die verschiedenen Bestandteile in der Blotapparatur systematisch aufeinander geschichtet werden (s. Abb. 13). Auf der Kathoden-Graphitplatte der Apparatur wird das Gel auf einem Filterpapier platziert und die Membran vorsichtig aufgelegt. Anode und Membran werden durch ein weiteres Filterpapier getrennt. Die durch das anwesende Detergenz möglicherweise entstandenen Lufteinschlüsse werden durch Druckeinwirkung entfernt. Für den Elektro-Transfer wurde eine Stromstärke von 0.8 mA/cm^2 für 2 h angelegt. Die negativ geladenen Proteine wandern in dieser Zeit in Richtung der Anode und wurden so vom Gel auf die Membran übertragen. Die Geschwindigkeit der Übertragung ist dabei abhängig vom Molekulargewicht des jeweiligen Proteins. Um eine erfolgreiche Übertragung auf die Nitrozellulosemembran zu überprüfen, wurde diese nach dem Transfer mit dem wasserlöslichen Farbstoff Ponceau S (s. 4.2) gefärbt. Bei diesem unspezifischen Protein-Nachweis erscheinen die übertragenen Banden nach einem Waschschrift mit ddH₂O blass-rosa.

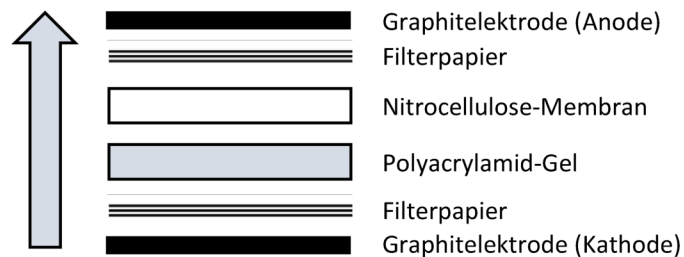


Abb. 13 Schematische Darstellung des Aufbaus der Komponenten beim Semi-Dry Western Blot Verfahren.

Das Polyacrylamid-Gel wird auf einem mit Blotpuffer äquilibrierten Filterpapier auf der Kathode positioniert. Darauf werden die Nitrocellulose-Membran und ein weiteres Filterpapier positioniert. Die im Gel befindlichen, negativ geladenen Proteine wandern zur Anode und werden somit auf die Membran übertragen.

5.5.7 Immunodetektion

Zur Visualisierung auf der Nitrozellulosemembran gebundener Antikörper wurde das *Enhanced Chemoluminescence* (ECL)-System verwendet. Dabei setzt die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase das im ECL-Substrat enthaltene Luminol um, wodurch es zur Emission von Licht kommt (Whitehead et al., 1979). Zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurde die Membran zuerst mit 5 % Milchpulver in TBST (s. 4.2) für ca. 30 min blockiert. Die verwendeten Primärantikörper (s. 4.5.1) wurden in 3 % Milchpulver in TBST entsprechend verdünnt und die Nitrozellulosemembran darin auf einer Wippe über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen, wurde die Membran am nächsten Tag

drei Mal für 10 min mit TBST gewaschen. Danach wurde der für die Spezies des Primärantikörpers geeignete Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper (s. 4.5.2) ebenfalls in 3 % Milchpulver in TBST angesetzt und die Membran darin für 1 h bei RT unter leichter Bewegung inkubiert. Überschüssiger Zweitantikörper wurde durch drei Waschschriffe mit TBST für je 10 min entfernt. Anschließend wurde die Membran mit gleichen Volumina der ECL-Lösungen S1 und S2 (s. 4.2) für einige Minuten inkubiert, und die Chemolumineszenz dann mit Hilfe eines automatisierten Detektionssystems (Chemismart, Peqlab) erfasst.

5.5.8 Immunpräzipitation

Während des Ablaufs verschiedenster Prozesse innerhalb einer Zelle interagieren Proteine miteinander und bilden funktionelle Signaltransduktionskomplexe (Bray, 1998). Um festzustellen, ob funktionell beteiligte Proteinkomponenten Bestandteil solcher Transducisomen (Harris und Lim, 2001) sind und zudem mögliche weitere Funktionselemente eines Signaltransduktionsprozesses zu identifizieren, können Immunpräzipitationsstudien durchgeführt werden. Dabei werden Antikörper gegen ein bestimmtes Protein z. B. an magnetische Kügelchen gekoppelt, um anschließend dieses Protein mit etwaigen Interaktionspartnern aus einem Solubilisat, durch Verwendung eines Magneten zu isolieren.

5.5.8.1 *Kopplung von Antikörpern an magnetische Kügelchen*

Für die Immunpräzipitation (IP) wurden superparamagnetische Polymerkügelchen (Dynabeads Epoxy M-270, Thermo Fisher Scientific) mit einem Durchmesser von 2,8 μm verwendet, auf deren Oberfläche sich Epoxy-Gruppen befanden, die kovalente Bindungen mit Antikörpern bilden können. Zur Kopplung wurden 5 mg der Kügelchen nach Anweisungen des Herstellers äquilibriert (Dynabeads Antibody Coupling Kit, Thermo Fisher Scientific) und anschließend mit der erforderlichen Menge des Antikörpers über Nacht bei 37 °C rotierend inkubiert. Für die Kopplung des aufgereinigten TPC1 Antikörpers wurden 8 μg pro mg Festphase eingesetzt (Jan Castonguay, 2014); als Kontrollantikörper wurden Kaninchen Immunglobuline des Subtyps G verwendet. Die nachfolgenden Waschschriffe zur Entfernung ungebundener Antikörper erfolgten wiederum in strenger Anleitung an das Kopplungsprotokolls des Herstellers. Bis zur weiteren Verwendung wurden die gekoppelten Dynabeads mit 0,02 % Natriumazid bei 4 °C gelagert. Vor jedem Einsatz wurde ein Waschschriff mit 0,1 % BSA in PBS für 5 min und eine Äquilibrierung in HEPES-Waschpuffer (s. 4.2) durchgeführt.

5.5.8.2 Solubilisierung von TPC1 aus totalen Zelllysaten und lipid rafts

Für die Immunpräzipitation wurden sowohl isolierte, primäre Zellen aus einer peritonealen Lavage, RBL-1 Zellen und Hodengewebe, als auch *lipid rafts* enthaltende PTX-Fractionen der verschiedenen Proben eingesetzt. Die Zellen wurden nach der Isolation bei 800 rcf für 5 min pelletiert und, analog zum Gewebe, in je 10 ml HEPES-Resuspensionspuffer (s. 4.2) mit complete Proteaseinhibitor (Roche) pro Gramm Material resuspendiert bzw. homogenisiert. Für die PTX-Fractionen wurden ca. 150 µl Puffer pro ursprünglich 5×10^6 eingesetzter Zellen für die Resuspension verwendet. Die weitere Homogenisierung fand in einem Gewebehomogenisator vom Typ Potter Elvehjem statt (15 Hübe). Nach Zugabe von 30 µg/ml RNase A, 0,1 % Natriumdesoxycholat und 1 mM EDTA erfolgte eine 45 bis 60 minütige Inkubation unter Rühren auf Eis. Vom entstandenen Lysat wurde ein Aliquot (Bezeichnung: *Lysat*) genommen, um nachfolgend die einzelnen Schritte der Versuchsdurchführung zu kontrollieren. Nach einer Ultrazentrifugation bei 100000 rcf (45 min, 4 °C) in einem Festwinkel-Rotor (Beckman Coulter Ti 50.2) wurde vom Überstand erneut ein Aliquot (Bezeichnung: *Input*) entnommen und das Pellet (Bezeichnung: *Pellet*) in 200 µl 1 x Laemmlipuffer resuspendiert.

5.5.8.3 Affinitätsreinigung von TPC1

Das vorbereitete Solubilisat wurde zur Affinitätsreinigung von TPC1 geteilt und mit jeweils 5 µl TPC1- bzw. IgG-gekoppelten Dynabeads versetzt. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Das durch die Ultrazentrifugation entstandene Pellet wurde in 100 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und ebenfalls zur späteren Kontrolle im Immunoblot aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Dynabeads und daran gebundenes Material mit Hilfe eines Magneten separiert und die überschüssige Lösung abgenommen und ebenfalls zur Kontrolle aufbewahrt (Bezeichnung: *Durchfluss*). Mit HEPES-Waschpuffer (s. 4.2) wurden fünf Waschschriffe durchgeführt, wobei die gesammelten Überstände (Bezeichnung: *wash*) auch als Kontrollen genutzt wurde. Danach erfolgte die Elution der gebundenen Proteine durch Zugabe von 35 µl Elutionspuffer (s. 4.2) und Erhitzen der Proben auf 61°C für 20 min. Die Dynabeads wurden wiederum im Magneten von der Lösung separiert und das Eluat abgenommen. Dieser Elutionsvorgang wurde mit 15 µl Puffer bei RT wiederholt und beide Eluate (Bezeichnung: *Eluat*) anschließend vereinigt. Die Dynabeads wurden ebenfalls im Western Blot untersucht, und dazu in 100 µl HEPES-Waschpuffer aufgenommen (Bezeichnung: *beads*). Zu jeweils 100 µl Lysat, Einsatz, Durchfluss, Wasch-Überstand und Dynabeads wurden abschließend 100 µl 2 x Laemmlipuffer gegeben. Im Immunoblot wurde die Anwesenheit verschiedener Proteine in den TPC1-Antikörper-Präzipitaten untersucht.

5.5.8.4 *Massenspektrometrische Analyse*

Des Weiteren wurden an den Eluaten der TPC1- und Kontroll-IgG-Antikörpergekoppelten Beads massenspektrometrische Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Claudia Fecher-Trost am Institut für experimentelle Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes durchgeführt. Bei der Massenspektrometrie werden die Peptide, die nach einer enzymatischen Spaltung der zu analysierenden Proteine entstanden sind, mit Hilfe eines Lasers ionisiert, in einem elektrischen Feld beschleunigt, und durch einen Ionendetektor detektiert (Calvano et al., 2014). Die Analyse erfolgte der Vorgehensweise folgend, die bereits in N. Weber et al. (2014) und Nele Weber (2014) beschrieben wurde: Dazu wurden die eluierten Proteine zunächst auf einem 4 % - 12 % Gradienten-Gel (NuPAGE®) separiert und mit einer Lösung aus 40 % Ethanol und 10 % Essigsäure im Gel fixiert. Zur Detektion der aufgetrennten Proteine im Gel wurde eine Coomassie-Färbung durchgeführt und anschließend die gefärbten Bereiche des Gels in drei Teile geschnitten. Die Gelstücke wurden daraufhin zweimal abwechselnd mit Lösung A (50mM NH_4HCO_3) und B (50mM NH_4HCO_3 und 50% Acetonitril) gewaschen. Um eine Reduktion der Disulfidbrücken zu erreichen, wurden die Gelstücke 30 min bei 56 °C in Lösung A mit 10 mM DTT inkubiert. Durch eine anschließende Inkubation mit Lösung A versetzt mit 5 mM Iodacetamid für 30 min bei 21 °C im Dunkeln wurden die Thiolgruppen methyliert. Danach wurden die Gelstücke erneut zweimal abwechselnd mit Lösung A und B gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und für die enzymatische Spaltung der Proteine im Gel über Nacht bei 37 °C mit 5 – 15 μl Trypsin-Lösung (10 ng/ μl) inkubiert. Zur Extraktion der resultierenden Peptide wurden die Gelstücke zweimal in Extraktions-Puffer (2,5 % Ameisensäure und 50 % Acetonitril) geschüttelt. Die so extrahierten Peptide wurden in einer Vakuumzentrifuge konzentriert und anschließend in einer 0,1 % Ameisensäurelösung resuspendiert.

Mit Hilfe der *online nanoflow liquid chromatography-high resolution MS/MS* (LC-HR-MS/MS) wurde je ein Aliquot der Trypsin-verdauten Peptidextrakte analysiert. Dazu wurden die Peptide auf einer C18 *trap* Säule immobilisiert und in einer Umkehrphasen-Chromatographie mit den Puffern A (0,1 % Ameisensäure) und B (90 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure) mit einer Flussrate von 300 nl/min separiert. Dabei wurden zwei verschiedene Gradienten verwendet: Gradient 1: 4 bis 55 % Puffer B in 60 min, 55 bis 90 % in 7 min; Gradient 2: 4 bis 55 % Puffer B in 120 min, 55 bis 90 % in 7 min. Unter Anwendung des Electrospray-Verfahrens wurde der Durchfluss der Chromatographie direkt in das Massenspektrometer eingeleitet und bei 2,2 kV ionisiert. Die MS-Spektren wurden in einem Daten-abhängigen Modus aufgenommen, wobei ein automatischer Wechsel zwischen *full scan* MS und MS/MS stattfand. Die *full scan* MS-Spektren wurden

mit einem Zielwert von 10^6 in einem Orbitrap-Analyser aufgenommen. In der *high-pressure linear ion trap* wurden die 10 intensivsten Peptid-Ionen mit einem Ladungszustand $> +2$ durch *low-energy collision induced dissociation* mit einer normierten Kollisionsenergie von 35 % fragmentiert. Mittels des MASCOT Algorithmus und der TF Proteome Discoverer 1.4 Software wurden die fragmentierten Peptide identifiziert, sodass schließlich mit Hilfe der Mascot Software Version 2.0 (Matrix Science London, UK) und der SwissProt Datenbank (Version 2015) eine Zuordnung der Peptide erfolgen konnte. Die Carbamidomethylierung von Cysteinen wurde dabei als feststehende Modifikation gewählt und folgende weitere Modifikationen als optional: Die Desaminierung von Asparagin und Glutamin, die Acetylierung von Lysin und die Oxidation von Methionin. Die mit der MASCOT Software erhaltenen Daten wurden zum Abgleich in die Scaffold Software 4.0 (Proteome Software, Proteome Software Inc., Portland, USA) geladen: Der Proteinwahrscheinlichkeitsfilter wurde auf einen Wert von 95 % gesetzt, der Peptidwahrscheinlichkeitsfilter auf 90%. Somit sollte eine signifikante Proteinidentifikation sichergestellt werden. Die Identifikation von mindestens zwei Peptiden eines Proteins in den Immunopräzipitaten des TPC1-Antikörpers und gleichzeitige Abwesenheit dieser Peptide in den Kontrollansätzen wurde als Voraussetzung angenommen, um die enthaltenen Proteine als mögliche Bindungspartner von TPC1 einzustufen. Des Weiteren wurden auch Proteine als Interaktionspartner in Betracht gezogen, deren identifizierte Peptide gegenüber der IgG-Kontrolle in einem fünffachen Überschuss in den TPC1-Immunopräzipitaten vorhanden waren.

5.5.9 Färbung von Oberflächenantigenen und Durchflusszytometrie

Durch die Spülung des murinen Peritoneums erhält man verschiedene Typen von Immunzellen. In der Lavage einer gesunden, adulten Maus finden sich neben Mastzellen (ca. 2-5 %) vor allem B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen und Granulozyten, wie zum Beispiel Neutrophile. (Malbec et al., 2007; Ray und Dittel, 2010; Swamydas et al., 2015) Die Anzahl der Zellen kann jedoch, je nach Gesundheitszustand der Tiere, variieren. Die unterschiedlichen Zelltypen lassen sich mit Hilfe von Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen spezifische Antigene eines Zelltyps auf dessen Zelloberfläche unterscheiden. Mittels Durchflusszytometrie (oder auch FACS (*fluorescence activated cell sorting*) Analyse) kann dann die Anzahl der markierten Zellen in einer Probe bestimmt und anschließend deren prozentualer Anteil ermittelt werden. Für die Färbung der Oberflächenantigene wurden die isolierten peritonealen Zellen zunächst in MACS-Puffer (s. 4.2) resuspendiert und mit FcR Blockierungsreagenz (Milteny Biotech) (1:10

für bis zu 10^7 Zellen) versetzt. Nach etwa 10 min wurden die blockierten Zellen pelletiert (400 rcf, 5 min, 4°C) und in 100 µl MACS-Puffer pro Färbungsansatz resuspendiert. Zu jedem Ansatz wurde 1 µl des jeweiligen Antikörpers (s. Tabelle 3 und 4.5.1) gegeben und nach einer 20 minütigen Inkubationszeit drei Waschschriffe mit 200 µl MACS-Puffer und Zentrifugationsschritten bei 400 rcf und 4 °C für 5 min angeschlossen. Zur finalen Resuspension wurden die Zellen in 350 µl MACS-Puffer aufgenommen. Im Falle einer Doppelfärbung mit zwei Antikörpern wurden zusätzlich die jeweiligen Einzelfärbungen analysiert. Als Kontrollen wurden sowohl ungefärbte Zellen als auch mit IgG-Isotyp Kontrollantikörpern (mit entsprechenden Fluorochromen) (s. Tabelle 3) behandelte Zellen eingesetzt. Für die Durchflusszytometrie wurde ein Guava® easyCyte Zytometer (Merck Millipore) verwendet. Zur Bestimmung des jeweiligen prozentualen Anteils eines bestimmten Zelltypen wurde zunächst die Gesamtzahl der lebenden Zellen bestimmt und anschließend die Zellzahl der gefärbten Zellen in der der Zellgröße entsprechenden Population.

Tabelle 3 Zelltypen in einer murinen peritonealen Lavage sowie spezifische Oberflächenantigene und die zur Quantifizierung in der Durchflusszytometrie genutzten Fluorochrome.

Zelltyp	Oberflächenantigen(e) / Fluorochrom
T-Zellen	CD3 / FITC
B-Zellen	CD19 / APC; B220 / FITC
Makrophagen	CD11b / FITC; CD11c / APC
Mastzellen	CD117 / FITC
Neutrophile	Ly6-G / APC

5.5.10 Magnetische Zellsortierung

Über die Identifizierung hinaus können die charakteristischen Oberflächenantigene jedes Zelltyps in einer Mischkultur auch zur Separierung verschiedener Zelltypen genutzt werden. Durch die Verwendung von magnetischen Kügelchen, an die spezifische Antikörper gegen die jeweiligen Oberflächenantigene gebunden sind, ist es möglich, eine positive Selektion von Zellen über eine ebenfalls magnetische Säule durchzuführen. CD-117 positive Mastzellen (Miettinen und Lasota, 2005) wurden nach dem entsprechenden *Microbeads (mouse)* Protokoll (Miltenyi Biotec), wie im Folgenden beschrieben, vorbereitet, markiert und isoliert. Dafür wurde zunächst die Gesamtzellzahl der mittels peritonealer Lavage isolierten Zellen bestimmt. Anschließend wurden diese bei 300 rcf für 10 min abzentrifugiert, der HBSS Puffer abgenommen und die Zellen der Lavage in je 80 µl MACS Puffer (s. 4.2) pro 10^7 Zellen resuspendiert. Zur Markierung der Mastzellen wurden 20 µl CD117 *Microbeads* (pro 10^7 Zellen) zu der Suspension

gegeben, vorsichtig gemischt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Um nicht gebundene magnetische Kügelchen zu entfernen, wurden die Zellen mit 1 ml MACS Puffer gewaschen, bei 300 rcf für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 500 µl MACS Puffer resuspendiert. Für die magnetische Separation wurde eine MS-Säule, entsprechend der zu erwartenden geringen Zahl an markierten Mastzellen in der Lavage, verwendet. Die Säule wurde in einem Magneten (Miltenyi Biotec) platziert und zunächst mit 500 µl MACS Puffer gespült, bevor die Zellsuspension darauf gegeben wurde. Die mit magnetischen Kügelchen markierten Mastzellen bleiben so an der magnetischen Matrix der Säule haften, die ungebundenen Zellen sind im Durchfluss enthalten. Durch eine weitere Zugabe von 500 µl MACS Puffer wurden eventuell verbliebene CD117 negative Zellen gewaschen. Um die nun aufgereinigten Mastzellen zu eluieren, wurde die Säule aus dem Magneten entfernt, auf ein Auffanggefäß gesetzt und die Zellen mit 1 ml MACS Puffer herausgespült. Zur Verbesserung der Aufreinigung wurde das Eluat nochmals auf eine neue Säule gegeben und die Separation wiederholt. Um den Reinheitsgrad der isolierten Mastzellen zu überprüfen, wurde eine Immunfärbung (s. 5.5.9) mit einem fluoreszenzmarkiertem CD117 spezifischen Antikörper (s. 4.5.1) mit anschließender FACS-Analyse durchgeführt.

5.5.11 Immuncytochemie

Durch den Einsatz Fluorochrom-gekoppelter Antikörper kann nicht nur die Expression bestimmter Proteine nachgewiesen werden sondern auch deren Lokalisation innerhalb der Zelle untersucht werden (Burry, 2011). Peritoneale Mastzellen wurden im Vorfeld der Fluoreszenzfärbung auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesät und über Nacht ca. 12-16 h im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) zur Anheftung inkubiert. Zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden diese nach einem Waschschrift mit PBS sehr vorsichtig mit eiskaltem Methanol überschichtet und für 20 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde das Methanol wieder abgenommen, und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Um vor der Antikörper-Behandlung alle unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen abzusättigen, wurden zwei Blockierungsschritte durchgeführt: Zunächst wurden die Zellen bei 37 °C für 1 h in einer feuchten Kammer mit einem FcR-Blockierungsreagenz (2,4 % in einer 1 % BSA-Lösung) inkubiert und im Anschluss einmal mit PBS gewaschen. Der zweite Schritt war eine 30-minütige Blockierung (feuchte Kammer) mit normalem Ziegen Serum (*normal goat serum*, NGS), das 1:1000 in einer 1 %-igen BSA-Lösung (in PBS) verdünnt wurde. Auch die jeweiligen Primärantikörper (s. 4.5.1) wurden in 1 %-iger BSA-Lösung (in PBS) verdünnt und schließlich auf die Zellen pipettiert. Um während der 1,5-stündigen Antikörper-Inkubation bei 37 °C ein Austrocknen zu verhindern, wurde erneut eine feuchte Kammer verwendet,

und die Deckgläschen zusätzlich mit Parafilm abgedeckt. Zur Entfernung nicht gebundener Primärantikörper wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit den entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Spezies-spezifischen Sekundärantikörpern (s. 4.5.2) erfolgte für 40 min bei 37 °C und im Dunkeln. Auch dieser Schritt wurde in einer feuchten Kammer nach Abdeckung der Zellen mit Parafilm durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde noch eine Färbung mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI angeschlossen, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Dazu wurden die Zellen für 30 min bei RT mit einer DAPI-Lösung (0,1 µg/ml in PBS) überschichtet und anschließend zweimal für 5 min mit PBS und einmal für 5 min mit ddH₂O gewaschen. Zum Konservieren der Präparate wurde ein Tropfen Dako Fluoreszenz Eindeckmedium auf die Deckgläschen gegeben, bevor diese auf einem Objektträger positioniert wurden. Nach einer ca. einstündigen Trocknungszeit im Dunkeln bei RT wurden die Präparate abschließend mit Nagellack versiegelt.

5.5.12 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie ist es möglich, die Zellmorphologie bis hin zu subzellulären Strukturen sichtbar zu machen und so auch pathologische Veränderungen darzustellen. Darüber hinaus können durch den Einsatz von Goldpartikel-gekoppelten Sekundärantikörpern auch Proteine im Gewebe-Semidünnschnitt spezifisch markiert und so visualisiert werden (Immunogoldfärbung).

5.5.12.1 *Vorbereitungen für Routine Transelektronenmikroskopie (TEM)*

Um die Morphologie von Wildtyp und TPC-defizienten Mastzellen vergleichend darzustellen, wurden Zellen einer peritonealen Lavage zur Erhöhung des Kontrasts mit Methyleneblau gefärbt. Diese Färbung wurde an Zellen durchgeführt, die an das Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Essen (Prof. Dr. G. Wennemuth) versandt wurden. Vor dem Versand wurden die peritonealen Zellen zunächst für 4 h mit 2,5 % Glutaraldehyd in PB-Puffer (s. 4.2) fixiert. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 200 rcf wurde der Überstand verworfen und das Pellet in PB Puffer resuspendiert. Für drei weitere Waschschrte mit je 1 ml PB-Puffer wurden die Zellen zwischen dem Pufferwechsel jeweils bei 1000 rcf für 10 min pelletiert. Die Zellen wurden wiederum in PB-Puffer resuspendiert und auf Eis verschickt. Am Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Essen folgte die Kontrastfärbung der Zellen mit Methyleneblau sowie das Einbetten der Zellen und das Anfertigen der Ultradünnschnitte.

5.5.12.2 *Vorbereitungen von Zellen für Immunogold Färbung nach Standardverfahren*

Im Gegensatz zur Fixierung der Zellen für eine Kontrastfärbung mit Methylenblau, wurde im Vorfeld der Immunogoldfärbung eine mildere Fixierungsart gewählt, die ebenfalls vor dem Versand der Zellen durchgeführt wurde. Dazu wurden die primären isolierten Mastzellen in 2 % PFA mit 0,05 % Glutaraldehyd in PB-Puffer (s. 4.2) für 2 h bei RT fixiert. Die anschließenden Waschschrte wurden entsprechend dem in 5.5.12.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Am Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Essen wurden die fixierten Mastzellen in Ethanol und Propylen-Oxid dehydriert (Neesen et al., 2002) und in LR Gold Resin eingebettet. Mit Hilfe eines Reichert Ultramikrotoms mit Diamant-Messer wurden Ultradünnschnitte der Präparate angefertigt, die auf spezielle Objektträger mit einem Gold-Trägernetz (100 *mesh*) aufgebracht wurden. Die Präparate wurden mit anti-TPC1 Primär-Antikörper (6.6 µg/ml, verdünnt in Tris-gepufferter Saline (TBS: 10 mM Tris/HCl, pH 8; 150 mM NaCl)) für 12 h bei 4 °C inkubiert und daraufhin dreimal mit TBS für 15 min gewaschen. Als Sekundär-Antikörper wurde eine 1:100 Verdünnung eines anti-rabbit IgG eingesetzt, an den Goldpartikel mit einem Durchmesser von 10 nm (BBInternational, Cardiff, UK) gekoppelt waren. Abschließend wurden die Ultradünnschnitte erneut mit TBS gewaschen und kurzzeitig mit alkalischem Bleicitrat und Uranylacetat zur Kontrastierung behandelt. Die Dokumentation der Mastzellen erfolgte mittels eines Elektronenmikroskops (Tecna12BT, FEI, Hillsboro, USA).

5.5.12.3 *Pre-Embedding Immunogold Färbung*

Beim herkömmlichen Verfahren der Immunogoldfärbung wird die Antikörperfärbung nach dem Einbetten und Schneiden der Präparate durchgeführt; deshalb werden die Zellen zunächst nur mit einem milden Fixans behandelt. Diese Vorgehensweise kann aber zur Konsequenz haben, dass die Ultrastruktur der Zellen nicht oder nur schlecht erhalten bleibt. Um dieses Problem zu umgehen, kann die Antikörperfärbung auch nach einer milden Vorfixierung und anschließender Glutaraldehyd-Fixierung vor dem Einbetten der Zellen durchgeführt werden (Schulz, 1990). Für eine solche Vorfixierung wurden zu 1 ml Zellsuspension (1×10^6 Zellen/ml in PB-Puffer) 9 ml 4 % PFA Fixierungslösung (s. 4.2) gegeben und vorsichtig resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei leichter Bewegung bei RT wurde die Suspension bei 1000 rcf für 10 min zentrifugiert und die Fixierungslösung abgenommen. Um eventuelle Rückstände der Fixierlösung zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml PBS und einmal mit 2 ml Blockierungs/Permeabilisierungslösung (s. 4.2) gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in 2 ml Blockierungs/Permeabilisierungslösung resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 1000 rcf für 10 min wurde der Überstand verworfen, und das Zellpellet in 500 µl Blockierungs/Permeabilisierungslösung mit

Primärantikörper (s. 4.5.1) resuspendiert. Dieser Ansatz wurde für 1 h bei RT und dann über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten sechs Waschschriffe mit je 2 ml Blockierungs/Permeabilisierungslösung für 5 min, bevor die Zellen mit dem entsprechenden Goldpartikel-gekoppelten Sekundärantikörper (s. 4.5.2) (Verdünnung in 500 µl Blockierungs/Permeabilisierungslösung) für 2 h bei RT inkubiert wurden. Überschüssige Antikörper wurden durch drei Waschschriffe für je 2 min mit 2 ml Blockierungs/Permeabilisierungslösung entfernt. Um Goldpartikel zu vergrößern, wurde optional ein Gold Enhancement Kit (Nanoprobes) angewandt. Nach Protokoll des Herstellers wurden die 4 Komponenten (A, B, C und D) gemischt, zu den Ansätzen gegeben und für ca. 1 bis 5 min inkubiert, bis die gewünschte Größe der Goldpartikel erreicht war. Nach Zentrifugation wurde der Überstand unverzüglich entfernt, und die Zellen dreimal mit je 2 ml PBS gewaschen. Für die Post-Fixierung wurde das Zellpellet nach dem letzten Waschschriff in 2 ml 2 % Glutaraldehyd (s. 4.2) resuspendiert und für 10 min unter leichter Bewegung bei RT inkubiert. Um das Fixans zu entfernen, erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 1000 rcf für 10 min. Der Überstand wurde abgenommen, und die Zellen dreimal mit je 2 ml PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 1 % Glutaraldehyd (s. 4.2) aufgenommen und anschließend auf Eis an das Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Essen versendet. (Polishchuk und Polishchuk, 2013; Melo et al., 2014) In der Arbeitsgruppe von Professor G. Wennemuth wurden dann die weiteren Schritte der Einbettung und des Schneidens der Präparate durchgeführt.

5.6 Funktionelle Untersuchungen an Spermien

5.6.1 NAADP-AM Stimulierung

Zur Isolation kaudaler Spermien wurden Männchen durch zervikale Dislokation getötet, die Nebenhoden präpariert und in HS⁺⁺-Puffer (s. 4.2) überführt und eingeschnitten. Von den ausschwimmenden Spermien wurde eine Probe (Bezeichnung: $t=0$) genommen und durch Zugabe von Spermienfixierungslösung (s. 4.2) fixiert. Während einer anschließenden Inkubation für 90 min bei 37 °C und 5 % CO₂ durchliefen die übrigen Spermien einen funktionellen Reifungsprozess, der als Kapazitation bezeichnet wird, und eine Voraussetzung für die Befruchtungskompetenz der Spermien ist (Navarrete et al., 2015). Nach Ablauf der Kapazitationszeit wurde erneut eine Probe (Bezeichnung: $t=90$) genommen und fixiert. Durch eine Zentrifugation bei 400 rcf für 5 min wurden die Spermien pelletiert und der überständige Puffer verworfen. Nach Resuspendierung mit HS⁺⁺-Puffer, wurden je 180 µl Spermien suspension vorsichtig auf 20 µl Stimulationsansatz gegeben. Zur Stimulierung wurde entweder das Ca²⁺-Ionophor A23187 (Babcock et al., 1976) (10 µM) oder verschiedene Konzentrationen von NAADP-AM (10 nM, 25 nM, 50 nM, 75 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM,

100 μM) eingesetzt. Die entsprechenden Verdünnungen wurden mit HS⁺⁺-Puffer angesetzt, der, als Negativkontrolle, ebenfalls zu einer Spermienprobe gegeben wurde. Die Stimulation fand für 30 min bei 37 °C im Wasserbad statt. Anschließend wurden die Spermien durch Zugabe etwa des 10-fachen Volumen an Spermien-Fixierungs-Puffer (s. 4.2) für 30 min bei RT fixiert. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt bei 16200 rcf für 1 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 μl Postfixierungswaschpuffer (s. 4.2) resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 16200 rcf für 1 min wurde der Überstand bis auf ca. 20 μl abgenommen, das Pellet in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und auf Objektträgern ausgestrichen und bei RT getrocknet. Um das proteinreiche Akrosom anzufärben, wurde eine Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung (s. 4.2) verwendet (Larson und Miller, 1999). Diese wurde für 5 min auf die Objektträger gegeben und anschließend mit ddH₂O gewaschen. Zur Konservierung der Präparate wurde Kaiser's Glycerin-Gelatine auf ca. 65 °C erwärmt, auf die Proben gegeben und diese mit einem Deckglas eingedeckt. Zur Versiegelung wurde an den Rändern des Deckglases zusätzlich Nagellack aufgetragen.

Um den akrosomalen Status der verschiedenen behandelten Spermienproben zu bestimmen, wurden unter einem Lichtmikroskop insgesamt 200 Spermien pro Objektträger ausgezählt. Die Identität der Proben wurde durch das Abkleben der Beschriftung unkenntlich gemacht, wodurch eine unvoreingenommene Auszählung der Spermien sichergestellt wurde. Abschließend wurde der prozentuale Anteil der Spermien ohne Akrosom berechnet.

5.6.2 *Zona pellucida* und *trans*-Ned 19 Stimulierung

5.6.2.1 *Präparation von Zona pellucida*

Die die Eizelle-umhüllende *Zona pellucida* enthält Glykoproteine, die der physiologische Auslöser für die Akrosomreaktion in Spermien sind (Gupta und Bhandari, 2011). Um diese zu isolieren, wurden jeweils ca. 15 bis 20 mind. 5 Wochen alte Balb/C Weibchen durch zervikale Dislokation getötet und die Ovarien präpariert. Das Gefäß zur Aufnahme der Ovarien und alle anderen Verbrauchsmaterialien, die während der weiteren Präparation der *Zona pellucida* zum Einsatz kamen, wurden im Vorfeld mit Sigmacote beschichtet. Die präparierten Ovarien wurden in 2 ml kalten HB⁺⁺⁺-Puffer (s. 4.2) gegeben und auf Eis gelagert. Mit Hilfe eines Potters (Kontes) wurden die Ovarien homogenisiert und mit 1 % NP-40 und 1 % Natrium-Desoxycholat versetzt. Um die *Zonae pellucidae* von überschüssigem Gewebe zu trennen wurde das Homogenisat anschließend auf einen Percoll-Gradienten geladen. Für den Gradienten wurden 3 ml 22 % Percoll, 2 ml 10 % Percoll und 2 ml 2 % Percoll (Verdünnung mit HB⁺⁺⁺ Puffer) übereinander geschichtet und kühl gelagert. Durch Zentrifugation für 2 h bei 200 rcf und

4 °C wurde das Homogenisat im Gradienten aufgetrennt und anschließend in separate Gefäße überführt. In der 10 % Percoll-Schicht sollten sich nach diesem Schritt die *Zonae* befinden. Zum Waschen wurde die 10 % Fraktion mit HB+++ Puffer auf 35 ml Gesamtvolumen aufgefüllt, auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und bei 16000 rcf und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden bis auf 500 µl aufgenommen, die Pellets vereinigt und die leeren Gefäße nochmals mit 500 µl nachgespült, um möglichst wenige *Zonae* zu verlieren. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt bis nur noch ein Reaktionsgefäß mit allen vereinigten *Zonae* übrig war. Nach einer finalen Zentrifugation bei 16000 rcf und 4 °C für 10 min wurde der Überstand bis auf 100 µl abgenommen und der verbleibende Rest in 1,5 ml HS-Puffer (s. 4.2) mit Proteaseinhibitor (cOmplete, Roche) und 100 µl PMSF (HS+PI) resuspendiert. Ab diesem Punkt wurde eine gleich behandelte Puffer-Kontrolle mitgeführt. Nach erneuter Zentrifugation bei 16000 rcf, 4°C für 10 min wurde der Überstand komplett abgenommen und das Pellet in 150 µl HS+PI resuspendiert. Um die Zahl der isolierten *Zonae* zu bestimmen, wurden drei 1 µl Tropfen auf einem Objektträger verteilt und die durchschnittliche Anzahl unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Zur Solubilisierung der Glykoproteine wurde der pH-Wert durch Zugabe von konzentrierte HCl und Inkubation für 15 min bei 37 °C auf ca. 2,5 reduziert. Nach Zentrifugation bei 16000 rcf für 2 min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der pH-Wert mittels 5 M NaOH auf 7,4 neutralisiert. Zur Stimulation sollten 10 *Zonae* pro µl Spermisuspension eingesetzt werden. Bei 30 µl verwendeter Spermisuspension waren also 300 *Zonae* nötig. Deshalb wurde das Solubilisat in entsprechenden Volumina aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5.6.2.2 *Stimulation von Spermien und Beurteilung des akrosomalen Status*

Spermien wurden aus dem kaudalen Teil des Nebenhodens eines adulten, ca. 12 Wochen alten Männchens isoliert. Dazu wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet, beide Nebenhoden präpariert, in HS++ Puffer (s. 4.2) überführt und das Gewebe eingeschnitten. Während der anschließenden Inkubationszeit von 1,5 h bei 37 °C und 5 % CO₂ konnten die Spermien dann aus dem Nebenhodengewebe ausschwimmen und kapazitieren. Die Spermisuspension wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die Anzahl der Spermien mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Durch Zentrifugation bei 400 rcf für 5 min wurden die Zellen pelletiert und die Zellzahl mit HS+-Puffer auf 3×10^6 Spermien/ml eingestellt. Für die Stimulation wurden jeweils 30 µl Spermisuspension mit dem entsprechenden Volumen der verwendeten Zona-Präparation (300 *Zonae*) bzw. der Zona-Puffer-Kontrolle versetzt. Alle verwendeten Verbrauchswaren, wie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße, die mit Zona pellucida in Kontakt kamen, wurden im Vorfeld, wie bereits beschrieben, mit Sigmacote beschichtet.

Um den Effekt von *trans*-Ned 19 zu untersuchen, wurde eine Spermienprobe (45 μ l) mit 100 nM *trans*-Ned 19 alleine und eine Probe (ca. 30 μ l) mit 100 nM *trans*-Ned 19 in Kombination mit Zona pellucida versetzt. Als Kontrolle wurde zu einer weiteren Probe (45 μ l) nur 5 μ l HS+++-Puffer gegeben. Die 30-minütige Inkubation fand bei 37 °C im Wasserbad statt. Die anschließende Fixierung der Proben, Herstellung der Präparate und Auswertung wurde wie in 5.6.1 beschrieben durchgeführt.

5.7 Funktionelle Analysen an Mastzellen

5.7.1 Ca²⁺ Imaging

Die Konzentration von Ca²⁺-Ionen im Cytosol oder in Speicherorganellen der Zelle kann mit Hilfe von Ca²⁺-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen bestimmt werden und Änderungen über die Zeit nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen können nachverfolgt werden. Die nicht-membranpermeablen Ca²⁺-Indikatoren können durch die Bindung an einen lipophilen Acetoxymethyl-Ester (AM) die Zellmembran passieren. Innerhalb der Zellen wird der Ester dann durch endogene Esterasen abgespalten und der hydrophile Fluoreszenzfarbstoff kann nicht mehr aus der Zelle diffundieren. (Takahashi et al., 1999) Bei den weitverbreiteten ratiometrischen Farbstoffen wie z.B. Fura-2-AM hängt die Anregungswellenlänge vom Ca²⁺-Bindungsstatus ab: In der Ca²⁺-gebundenen Form wird eine Wellenlänge von 340 nm (F₃₄₀) zur Anregung benötigt, im Ca²⁺-freien Zustand von 380 nm (F₃₈₀). Die Emissionswellenlänge beträgt in beiden Fällen 510 nm. Die Bestimmung der Ratio (F₃₄₀/F₃₈₀) der Fluoreszenzintensitäten nach Anregung mit beiden Wellenlängen gibt dann Auskunft über die Ca²⁺-Konzentration in der Zelle oder deren Kompartimenten und deren Änderung über die Zeit (Grynkiewicz et al., 1985).

5.7.1.1 Vorbereitung der Zellen und Beladung mit Ca²⁺-Indikatoren

Nach der Isolation der peritonealen Zellen wurden diese auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen ausgesät (ca. 80.000 Zellen/ml) und über Nacht im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) gelagert.

Für Versuche, bei denen Ca²⁺-Antworten nach IgE/Antigen Stimulation untersucht wurden, erfolgte eine Inkubation mit 100 ng/ml IgE über Nacht und erneut 2 h vor Start der Messungen (s. Abb. 14). Die ratiometrischen, Ca²⁺-bindenden Fluoreszenzfarbstoffe Fura-2-AM und dessen Derivat Fura-2FF-AM, das sich durch eine niedrige Affinität für Ca²⁺ auszeichnet (K_d \approx 35 μ M) (Ursu et al., 2005; Paredes et al., 2008), wurden zur Beladung der Zellen in einer Na⁺-Ringer-Lösung (s. 4.2 externe Lösung) mit 1 mM Ca²⁺ auf eine Konzentration von 5 μ M verdünnt. Zusätzlich wurden 1 % BSA und 0,02 % Pluronic F-127 zur Lösung hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde auf die Zellen gegeben und diese darin für 30 min (bzw. 40 min bei Beladung mit Fura-2FF) inkubiert. Nach

Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Ca^{2+} -haltiger externer Na^+ -Ringer-Lösung zweimal gewaschen um nicht aufgenommenen Farbstoff zu entfernen. Die Deckgläschen wurden für die Messungen in eine Kammer eingesetzt und mit 400 μl externer Na^+ -Ringer-Lösung vorsichtig überschichtet. Die externe Lösung wurde je nach externem Ca^{2+} -Status der Versuchsreihe mit 1 mM Ca^{2+} oder 0,5 mM EGTA versetzt.

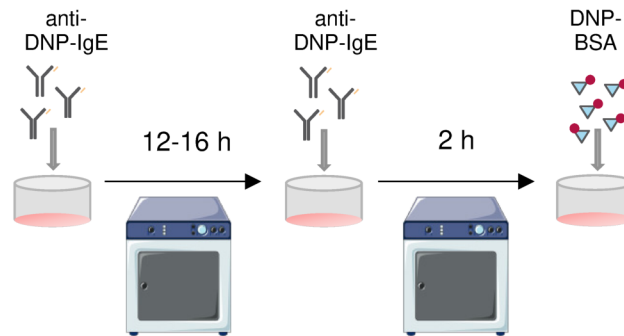


Abb. 14 Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der anti-DNP-IgE/DNP-BSA Stimulation.

Die ausgesäten Zellen wurden mit Antikörpern des Subtyps E (IgE) (100 ng/ml), die gegen BSA-gekoppeltes Dinitrophenol (DNP-BSA) generiert wurden, über Nacht im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Zwei Stunden vor Stimulierung der Zellen wurde erneut 100 ng/ml anti-DNP-IgE auf die Zellen gegeben und diese erneut im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Durch die Zugabe des Antigens DNP-BSA (100 ng/ml) und dessen Bindung an die anti-DNP-IgEs, die wiederum an $\text{Fc}\epsilon$ -Rezeptoren auf der Zelloberfläche gebundenen sind, wird eine Signalkaskade in den Zellen ausgelöst, die letztlich zu deren Degranulation führt.

5.7.1.2 Ca^{2+} Messungen auf Einzelzell Ebene

Die Mastzellen in der Mischkultur wurden unter dem Mikroskop (Olympus IX70) mit einem 40x Öl-Objektiv visuell identifiziert und mit Hilfe der Imaging-Software TillVision (Till Photonics) bei einer Anregungswelle von 360 nm mit ROIs (*regions of interest*) markiert. In diesen ausgewählten Bereichen wurden dann die Fluoreszenzintensitäten bei 510 nm aufgezeichnet. Eine zusätzliche Markierung wurde auf eine zellfreie Fläche gesetzt, um das Hintergrundsignal zu detektieren, das anschließend von den Messwerten subtrahiert wurde. Ein Monochromator (Polychrom V, Till Photonics) diente als Lichtquelle und die Fluoreszenzsignale wurden mit einer CCD-Kamera (Andor) aufgenommen. Zur Verstärkung der Signale wurde ein vierfach *binning* angewendet. Die Belichtungsdauer betrug 10 ms. Die Stimulation der Zellen erfolgte manuell durch Zugabe der betreffenden Substanz, verdünnt in externer Na^+ -Ringer-Lösung (mit 1 mM Ca^{2+} oder 0.5 mM EGTA). Um auch die basalen Fluoreszenzintensitäten im unstimulierten Zustand zu bestimmen, wurde der Zugabezeitpunkt auf 50 s (oder länger) nach Start der Messung festgesetzt. Bei der späteren Auswertung wurde dann der Mittelwert aus zehn Messwerten vor dem Zugabezeitpunkt bestimmt und als basaler Ca^{2+} -Gehalt festgesetzt. Um die Ca^{2+} -Antworten verschiedener Zellen miteinander zu

vergleichen, wurden alle nachfolgenden Messwerte auf den basalen Ca^{2+} -Gehalt normiert.

5.7.2 Histamin Assay

Werden Mastzellen im Zuge einer allergischen Reaktion aktiviert, setzen sie den Immunmediator Histamin, der in vorgefertigten Vesikeln in der Zelle gespeichert ist, über exozytotische Prozesse frei (Borish und Joseph, 1992). Über die Menge des sekretierten Botenstoffes lassen sich dann wiederum Rückschlüsse auf die Exozytose-Aktivität der untersuchten Mastzellen ziehen. Für die vorliegende Arbeit wurde ein zeitlich aufgelöster, immunokompetitiver Assay (HTRF® Histamin-Assay Kit, Cisbio) zur quantitativen Bestimmung der Histaminkonzentration im Kulturüberstand von primären peritonealen Mastzellen verwendet. Die isolierten primären Zellen wurden über Nacht in 48-well Mikrotiterplatten in Medium bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert und am nächsten Tag das Medium unmittelbar vor der Stimulation durch externe Na^+ -Ringerlösung (s. 4.2) ersetzt. Um die Zellen zu stimulieren, wurden der SERCA-Inhibitor Thapsigargin (2 μM) (Lytton et al., 1991), der Mastzellen-Aktivator Compound 48/80 (Paton, 1951) (C48/80) (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 30 min bei RT eingesetzt. Bei IgE/DNP-BSA Stimulation wurden die Zellen über Nacht und zwei Stunden vor der eigentlichen Stimulation mit 100 ng/ml IgE vorinkubiert. Als Referenzwert wurde auch die basale Histaminfreisetzung nach 30 min ermittelt. Zur Feststellung des totalen Histamingehalts wurden die Zellen mit 0,5 % Triton X-100 in externer Lösung für 10 min bei 37 °C lysiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Überstände in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Der Verdrängungsassay wurde in einer weißen 96-well Mikrotiterplatte mit halber Well-Tiefe (Greiner Bio-One), wie vom Hersteller empfohlen, durchgeführt. Die nach Rekonstitution bei -80 °C gelagerten Komponenten des Assays wurden ca. 30 min vor Verwendung an die RT adaptiert. Zunächst wurden jeweils 45 μl der Überstände bzw. des Lysats (in Triplikaten) in die Platte pipettiert. Anschließend wurden 2,5 μl des Acetylierungsreagenz und -puffers zugegeben, gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Im nächsten Schritt folgte die Zugabe von 25 μl XL665-markiertem Histamin (Histamine XL 665) und 25 μl eines monoklonalen, Kryptat-gekoppelten Antikörpers gegen Histamin. Nach einer dreistündigen Inkubationszeit wurden die Fluoreszenzsignale nach Angaben von *Cisbio* in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (FluoStar, Omega) gemessen. Nach Acetylierung des endogenen, von den Zellen freigesetzten, Histamins, kann dieses mit gleicher Affinität durch den Antikörper gebunden werden wie das XL665-markierte Histamin. Nach einer Anregung mit 337 nm emittiert Kryptat ein langanhaltendes Fluoreszenzsignal bei 620 nm, XL665 ein transitorisches Signal bei 665 nm. Bindet der Antikörper das XL665-markierte Histamin, findet ein Energietransfer vom Donor (Kryptat) auf den Akzeptor (XL665) statt, woraus dann ebenfalls ein langlebiges Signal

bei 665 nm resultiert (s. Abb. 15). Aus dem Verhältnis der entstandenen Signale (665 nm/620 nm), lässt sich mit Hilfe einer Standardkurve die Konzentration von endogenem Histamin im eingesetzten Kulturüberstand bestimmen. (Degorce et al., 2009)

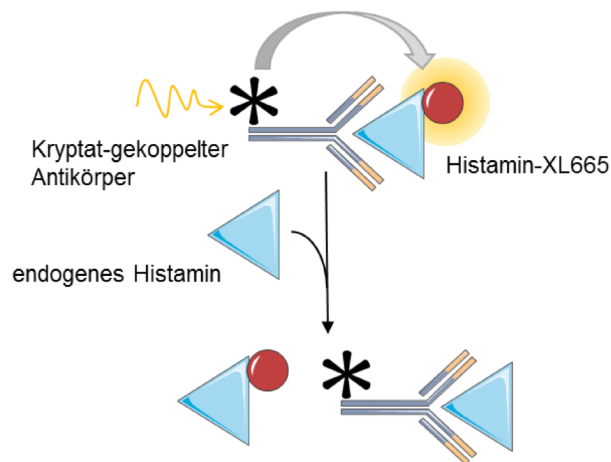


Abb. 15 Prinzip des zeitlich aufgelösten Wettbewerbsassays zur Bestimmung der Histaminkonzentration in Kulturüberständen.

Endogenes Histamin aus der eingesetzten Probe und XL665-markiertes Histamin konkurrieren um die Bindung an den Kryptat-gekoppelten Antikörper. Bindet der Antikörper das XL665-gekoppelte Histamin, findet ein Energietransfer vom Donor (Kryptat) auf den Akzeptor (XL665) statt und es entsteht ein langlebiges Fluoreszenzsignal mit einer Wellenlänge von 665 nm.

5.7.3 β -Hexosaminidase Assay

Neben Histamin werden auch andere, in Vesikeln gespeicherte Substanzen mittels Exozytose von Zellen des Immunsystems freigesetzt. Dazu zählt auch das Enzym β -Hexosaminidase, das eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr von Bakterien spielt. β -Hexosaminidase ist in der Zelle wichtig für die Metabolisierung von Glycoproteinen und es konnte gezeigt werden, dass es nach Freisetzung Peptidoglycan, einen Bestandteil der bakteriellen Zellwand, abbaut und so das Bakterienwachstum hemmt. Im Gegensatz zu den meisten anderen Zelltypen wird es in Mastzellen in Granula und nicht in Lysosomen gelagert. Deshalb kann die Ausschüttung von β -Hexosaminidase als Marker für die Degranulation von Mastzellen analysiert werden. (Fukuishi et al., 2014)

Die Freisetzung des Enzyms aus peritonealen und RBL-1 Zellen wurde nach Behandlung der Zellen mit Thapsigargin (2 μ M), C48/80 (30 ng/ μ l), IgE/DNP-BSA (jeweils 100 ng/ml) sowie dem TPC-Blocker Tetrandrine (Sakurai et al., 2015) (500 nM) und dem NAADP-Antagonisten *trans*-Ned 19 (1 μ M) untersucht. 80.000 RBL-1 bzw. 200.000 peritoneale Zellen pro *well* wurden in einer 48-well Mikrotiterplatte ausgesät und über Nacht in Medium bei 37 °C, 5 % CO₂ kultiviert. Bei Stimulation mit IgE/DNP-BSA wurden die Zellen über Nacht und nochmals 2 h vor der Stimulation mit IgE vorinkubiert (s. Abb. 14). Für die Stimulation wurde das Medium abgenommen und durch HEPES-

Puffer (s. 4.1) ersetzt. Die entsprechenden Substanzen wurden zugegeben und die Zellen für 30 min bei RT inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und die pelletierten Zellen durch die Zugabe von HEPES-Puffer mit 0,5 % Triton X-100 für 10 min bei 37 °C lysiert. Jeweils 15 µl der Überstände und entsprechenden Lysate wurden (in Triplikaten) in eine 96-well Mikrotiterplatte überführt und mit 60 µl 4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminid (pNAG; 1mM in Citratpuffer (s. 4.2)), einem Substrat der β-Hexosaminidase, versetzt. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 1 h, wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl Natrium-Carbonatpuffer (s. 4.2) gestoppt und die Absorption des in den Proben enthaltenen Spaltprodukts 4-Nitrophenol bei 405 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (FluoStar, Omega) bestimmt (s. Abb. 16). Die Freisetzung der β-Hexosaminidase aus den jeweiligen Zellen wurde dann als Prozentsatz des gesamten Enzymgehalts der Zellen ausgedrückt. (Kuehn et al., 2010; Sohn et al., 2011)

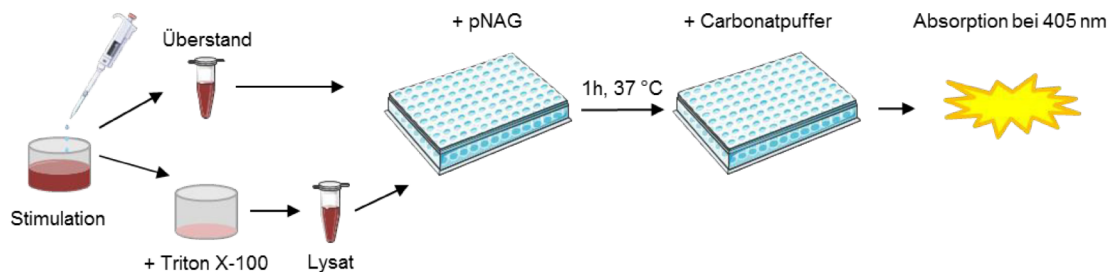


Abb. 16 Schema zum Versuchsaufbau des β-Hexosaminidase Assays.

Nach der Stimulation der Zellen wurden die Überstände abgenommen und die Zellen durch Zugabe von 0,5 % Triton X-100 lysiert. Anschließend wurden Überstände und Lysate mit pNAG, einem Substrat der β-Hexosaminidase, versetzt und nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von Carbonatpuffer, die Absorption des Spaltprodukts 4-Nitrophenol bei 405 nm gemessen.

5.7.4 Lebendzellfärbung

5.7.4.1 Färbung von sauren Organellen

Zur Visualisierung von sauren Bestandteilen einer Zelle, wie späte Endosomen und Lysosomen, kann der fluoreszierende Lebendzellfarbstoff LysoTracker red DND99 (Thermo Fisher Scientific) verwendet werden, der im deprotonierten Zustand in der Lage ist, die Plasmamembran zu passieren und nach Protonierung in sauren Vesikeln verbleibt (Lemieux et al., 2004). Isolierte primäre Mastzellen und RBL-1 Zellen wurden in 35 mm Petrischalen mit Glasboden ausgesät und über Nacht in Medium kultiviert. Am nächsten Tag wurde LysoTracker® Red DND99 (Endkonzentration 50 nM) auf die Zellen gegeben und für 2 h bei 37 °C weiter im Inkubator gelagert. Zur Detektion der Färbung wurden ein Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX71) und ein Konfokalmikroskop (Zeiss 880 Airy Scan) verwendet; Die Anregung der LysoTracker Sonden erfolgte mit einer Wellenlänge von 577 nm und die Emission wurde bei 590 nm detektiert. Die Aufnahmen

der Zellen wurden mit ImageJ verarbeitet und die Gesamtfluoreszenz CTCF (*corrected total cell fluorescence*) der Zellen analysiert (McCloy et al., 2014).

5.7.4.2 Visualisierung von NAADP-Bindestellen

Um die Rolle von NAADP bei der Freisetzung von Ca^{2+} in der Zelle weiter zu untersuchen, wurde ein Screening für strukturell ähnliche Substanzen durchgeführt. Die Substanz *trans*-Ned 19 wirkt bei nanomolaren und niedrigen mikromolaren Konzentrationen antagonistisch und kann zur Fluoreszenzmarkierung von NAADP-Bindestellen eingesetzt werden (Naylor et al., 2009). Die Färbung von primären peritonealen Mastzellen (und deren Analyse) wurde, analog zur LysoTracker-Färbung, durchgeführt (Endkonzentration von *trans*-Ned 19 100 μM).

5.7.4.3 Detektion von vesikulären Transportprozessen

Die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs FM1-43 nimmt stark zu, sobald er an Membranen bindet und durch Endozytose in die Zelle aufgenommen wird. Auf Grund dieser Eigenschaft eignet er sich zur Untersuchung jeglicher Art von vesikulären Transportprozessen, wie Endo- und Exozytose. (Cochilla et al., 1999) Peritoneale Mastzellen wurden nach ihrer Isolation auf 35 mm Petrischalen mit Glasboden (mit Poly-L-Lysin Beschichtung) ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO_2 in Medium kultiviert. Der Farbstoff wurde nach Protokoll des Herstellers in eiskaltem HBSS verdünnt (Endkonzentration 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und nach Abnahme des Mediums auf die Zellen gegeben. Während der Inkubationszeit von 1 min wurden die Zellen auf Eis gelagert und anschließend die Färbelösung abgenommen und durch HBSS ersetzt. Nach Platzierung der Petrischale in der beheizten Kammer (37 °C) des Konfokalmikroskops (Zeiss 880, Airy Scan) wurden mehrere Zeitserien mit Stapelaufnahmen in der Z-Ebene (*Z-stack*) vor (basal) und nach der Stimulation der Zellen mit 2 μM Thapsigargin (0, 5, 15, 25 35 min) durchgeführt (Versuchsablauf siehe Abb. 17).

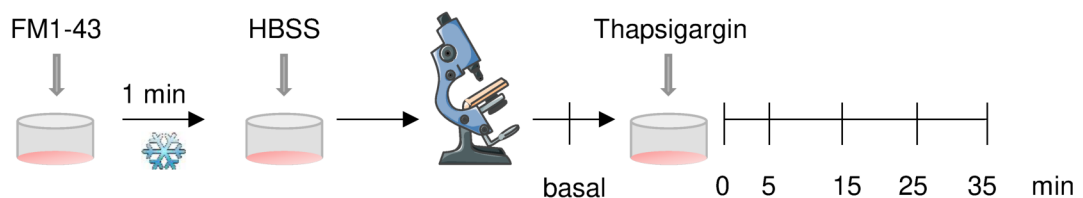


Abb. 17 Schematischer Ablauf zur Untersuchung von vesikulären Transportprozessen in Mastzellen.

Nach Zugabe des Farbstoffs FM1-43 wurden die peritonealen Zellen für 1 min auf Eis inkubiert und anschließend mit HBSS gewaschen. Mit Hilfe eines Konfokalmikroskops (Zeiss 880, Airy Scan) wurden vor (basal) und nach der Stimulation der Zellen mit Thapsigargin zu den dargestellten Zeitpunkten Zeitserien mit Z-Stapeln einer Mastzelle aufgenommen.

5.7.5 Bestimmung der Membrankapazität mittels Elektrophysiologie

Während der Degranulation von Mastzellen fusionieren Granula mit der Plasmamembran, wodurch es zur Integration der Granulamembran kommt. Die daraus resultierende Vergrößerung der Membranfläche einer Zelle kann mit Hilfe der Elektrophysiologie durch Bestimmung der Membrankapazität indirekt gemessen werden (Einheit: Farad [F]). Die Membran einer Zelle trennt Ladungen und funktioniert somit wie ein Kondensator. Die Kapazität des Kondensators gibt an, welche Ladungsmenge er bei einer bestimmten Spannung speichern kann. Mit der Größe der Zellmembran steigt auch deren Kapazität. (Neher und Marty, 1982)

Isolierte peritoneale Mastzellen wurden auf 12 mm Deckgläschen ausgesät und für 16 bis 40 h im Inkubator kultiviert. Für die Messungen wurden die Deckgläschen in 35 mm Petrischalen überführt, dort fixiert und die Zellen mit extrazellulärer Lösung (s. 4.2) überschichtet. Glaspipetten aus Borsilikat (mit Filament) wurden mit Hilfe eines Pipetten-Pullers (Zeitz) zu einem Widerstand von ca. 2 bis 4 MΩ ausgezogen und mit interner Lösung (s. 4.2) und der jeweiligen Stimulationssubstanz (z.B. GTPγS; NAADP) gefüllt. Nach Identifizierung einer geeigneten Mastzelle wurde deren Kapazität im „whole-cell“-Modus mittels eines Verstärkers (EPC10, HEKA) über die Zeit bestimmt. Die initiale Membrankapazität wurde als Referenzwert verwendet und alle weiteren Messwerte darauf normiert. Für Versuche mit dem TPC-Inhibitor Tetrandrine wurde dieser direkt in die extrazelluläre Lösung gegeben und nicht über die Pipette appliziert. Die elektrophysiologischen Daten wurden mit Hilfe des Programms Igor (Wavemetrics) analysiert. Neben der basalen Zellgröße wurde die Degranulationsamplitude nach 300 s bestimmt. Des Weiteren wurde für jede Einzelmessung eine Kurvenanpassung (*Capfit*) mit Hilfe der folgenden Funktion durchgeführt:

$$f(x) = C_{\text{initial}} + (C_{\text{initial}} \times (C_{\text{max}} - 1) \times (1 - \exp(-(t_{\text{delay}})/\tau))^n)$$

Dabei steht C_{initial} für die initiale Kapazität, C_{max} für die Degranulations-Amplitude und t für die Zeit in Sekunden (Zierler et al., 2016). Aus dieser Funktion wurden die Parameter „delay“ (Zeitraum bis zum Start der Reaktion) und „tau“ (Zeitraum bis 2/3 der maximalen Amplitude erreicht sind) ermittelt.

5.8 Statistische Methoden

Die statistische Analyse der Daten wurde mit Hilfe der Programme Graphpad Prism 7, Microsoft Excel 2013 und Igor (Wavemetrics) durchgeführt. Es wurden der ungepaarte, zweiseitige T-test und der Chi-Quadrat Test zu einem Signifikanzniveau von 5% angewendet. Um signifikante Ausreißer innerhalb einer Datengruppe zu identifizieren, wurde der Grubbs Test zu einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % durchgeführt. Soweit

nicht anders vermerkt, wurden in den Abbildungen Mittelwerte \pm SEM dargestellt und zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde der ungepaarte zweiseitige T-test verwendet. Die aus den statistischen Signifikanztests resultierenden p-Werte wurden in den Abbildungen vereinfacht durch Sternchen (*) dargestellt. Dabei entspricht ein p-Wert $p < 0,05$ einem Stern *, ein p-Wert von $p < 0,01$ zwei Sternen ** und ein p-Wert $p < 0,001$ drei Sternen ***.

5.9 Erstellung von Grafiken

Für diese Arbeit verwendete Grafiken wurden mit Hilfe des *Medical Art Service* von *Les Laboratoires Servier* erstellt. <http://smart.servier.com/> (Servier, 2017)

6 Ergebnisse

6.1 Die Bedeutung der TPCs für die Reproduktion

6.1.1 Effekte eines membranpermeablen NAADP-Analogs auf die Akrosomreaktion

Unsere initialen Versuche an *in vitro* kapazitierten Mausspermien haben gezeigt, dass der *second messenger* NAADP eine Akrosomreaktion auslösen kann, wobei das dafür notwendige Ca^{2+} offenbar zum Teil durch eine NAADP-vermittelte Aktivierung von TPCs aus dem sauren akrosomalen Vesikel zur Verfügung gestellt wird.

Dosis-Wirkungskurven haben dazu insgesamt gezeigt, dass die Stimulierung mit einem breiten Konzentrationsspektrum an NAADP für Wildtyp-Spermien zwei glockenförmige Dosis-Wirkungs-Bereiche ergab, deren Maxima im nanomolaren bzw. im mikromolaren Konzentrationsbereich lagen. In TPC1-defizienten Spermien konnte der niedrig-affine NAADP-abhängige Signalweg dagegen nicht mehr aktiviert werden, sodass daraus abgeleitet werden konnte, dass TPC1 die niedrig-affine Zielstruktur für NAADP darstellt. (Arndt et al., 2014)

Da uns zum Zeitpunkt dieser Studien jedoch nur nicht-membran-permeables NAADP zur Verfügung stand, wurden die Spermien zur Beladung der Keimzellen mit NAADP mit dem porenbildenden bakteriellen Toxin Streptolysin O (SLO) behandelt (Diaz et al., 1996; Arndt et al., 2014). Um nun weiter zu überprüfen, ob die Permeabilisierung der Plasmamembran der Spermien sowie die Chelatierung des Ca^{2+} während der SLO-Behandlung (Arndt et al., 2014) einen Einfluss auf die durch NAADP auslösbare Akrosomreaktion haben, wurden im Rahmen dieser Arbeit weiterführende Studien mit einem NAADP-Derivat durchgeführt, das durch Kopplung an einen Acetoxymethylester (AM) membrangängig gemacht wurde (Parkesh et al., 2008).

Dazu wurden Spermien von adulten TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Männchen nach einer 90-minütigen *in vitro* Kapazitierung (Visconti et al., 1995) mit den gleichen Konzentrationen an NAADP-AM behandelt, wie in unseren initialen Versuchen mit nicht-membrangängigem NAADP (Arndt et al., 2014); anschließend wurde der akrosomale Status der Spermien mit Hilfe einer Coomassie Brilliant blue Färbung (s. 5.6.1) bestimmt (s. Abb. 18 B). Da die Kapazitierung zu einem Liganden-unabhängigen akrosomalen Verlust führen kann (Perry et al., 1995), wurde für Spermien beider Genotypen zusätzlich der prozentuale Anteil der spontan ihr Akrosom verlierenden Spermien einmal direkt vor der *in vitro* Kapazitierung (t=0) sowie nach einer 90 und 120 minütigen Kapazitierungsphase quantitativ erfasst (s. Abb. 18 A). Dabei entspricht die t=120 min Probe der unstimulierten Negativkontrolle, da diese nur mit Pufferlösung und nicht mit

NAADP-AM behandelt wurde. Um gleichzeitig den Erfolg der Kapazitierung jeder einzelnen Spermienpräparation zu überprüfen, wurde zudem je eine Probe der TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Spermien mit dem Ca²⁺-Ionophor A23187 (A23) behandelt (Tanphaichitr und Hansen, 1994), um so eine direkte durch Ca²⁺ getriggerte Akrosomreaktion auszulösen. Abb. 18 A zeigt zunächst, dass der Anteil der spontanen Akrosomreaktion für Spermien beider TPC1-Genotypen, wie erwartet, mit fortschreitender Kapazitierung zunimmt (Perry et al., 1995). Vergleicht man allerdings die absolute Exozytoserate für Spermien beider Genotypen, wird ein deutlicher Unterschied für Keimzellen der beiden Mauslinien erkennbar: Während die basale prozentuale Exozytoserate für Wildtyp-Spermien zu den Zeitpunkten t=0 und t=90 bei ca. 10 % bzw. 17,5 % lag, sind die Akrosomreaktionsraten für TPC1^{-/-} Spermien für beide Kapazitierungszustände signifikant verringert: Direkt nach der Isolation (t=0) lag die basale Akrosomreaktionsrate bei TPC1^{-/-} Spermien bei nur ca. 2 % (p=0,016); nach einer 90 minütigen Kapazitierung hatte die spontane Exozytoserate lediglich einen Wert von ca. 7 % erreicht (p=0,016). Ein ähnlich auffälliger Unterschied in der Akrosomreaktionsrate für Spermien beider TPC-Genotypen wurde auch nach einer Stimulierung mit dem Ca²⁺-Ionophor A23187 (A23) festgestellt: Die Zugabe von A23 löste in etwa 43 % der Wildtyp-Spermien eine Akrosomreaktion aus. In TPC1^{-/-} Spermien lag der Anteil mit ca. 35 % dagegen deutlich, wenn auch nicht signifikant unterschiedlich darunter (s. Abb. 18 A).

In unseren vorangegangenen Studien an permeabilisierten Spermien konnte bisher kein Unterschied in der Akrosomreaktionsrate nach Stimulierung mit A23 zwischen TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Spermien festgestellt werden (Arndt et al., 2014). Allerdings lag bei diesen experimentellen Versuchsreihen der prozentuale Anteil der Spermien ohne Akrosom nach A23 Stimulation bei ca. 60 % (Arndt et al., 2014) und damit deutlich höher als in den hier vorgestellten Experimenten an unpermeabilisierten Spermienproben. Daher ist durchaus vorstellbar, dass durch die mit Hilfe von SLO in der Plasmamembran gebildeten Poren eine größere Menge A23 in das Zytosol der permeabilisierten Spermien gelangt als bei den nicht-permeabilisierten Keimzellen, so dass dadurch die Rate Akrosom-reagierter Spermien insgesamt wesentlich größer ausfällt und ein Unterschied zwischen TPC1^{-/-} Spermien gegenüber Wildtyp-Spermien möglicherweise nicht mehr feststellbar ist.

Um nun weiter zu prüfen, ob in unpermeabilisierten Spermien ebenfalls zwei durch unterschiedliche Affinitäten ausgezeichnete NAADP-aktivierbare Zielstrukturen zur Auslösung der Akrosomreaktion nachzuweisen sind (Arndt et al., 2014), wurden kapazitierte, nicht permeabilisierte TPC1^{+/+} Spermien mit verschiedenen Konzentrationen an NAADP bzw. NAADP-AM inkubiert. Um zu erfassen, welcher Anteil dabei durch den TPC1 getragen wird, wurde die gleiche NAADP Dosis-Wirkungskurve

auch für TPC1^{-/-} Spermien erstellt. In Abb. 18 B ist in schwarz die Dosis-Wirkungskurve nach NAADP-AM Stimulationen für Wildtyp-Spermien dargestellt; für die Illustration der verwendeten NAADP-AM Konzentrationen wurde eine logarithmische Skalierung der x-Achse gewählt. Betrachtet man die durch NAADP-AM induzierte Akrosomreaktion über das gesamte Konzentrationsspektrum (10 nM bis 100 µM) sind zwei Maxima erkennbar, deren induzierte maximale Akrosomreaktionsrate bei ca. 30 % für niedrige (75 nM) und auch für hohe (5 µM) NAADP-AM Dosen lag. Der Kurvenverlauf und die durch NAADP induzierbare maximale Exozytose-Antwort stimmt damit weitgehend mit dem für permeabilisierte Spermien überein (Arndt et al., 2014). Allerdings ist eine leichte Verschiebung der Dosis-Wirkungskurven nach rechts für die beiden NAADP-Dosen zu registrieren, die jeweils eine maximale Antwort hinsichtlich der Exozytoserate auslösen: Für permeabilisierte Spermien konnte eine maximale Antwort bereits bei 50 nM bzw. 1 µM NAADP ausgelöst werden, während die Maximalantworten in der hier vorgestellten Versuchsreihe bei 75 nM bzw. 5 µM lagen. Ob dies auf eine durch die Porenbildung bewirkte höhere zytosolische NAADP Konzentration zurückzuführen ist, kann gegenwärtig aber nur vermutet werden.

Vergleicht man als nächstes das NAADP-AM abhängige Antwortverhalten von Wildtyp- und TPC1^{-/-} Spermien, zeigte sich, dass eine Applikation von 75 nM NAADP-AM für Spermienpräparationen beider Genotypen eine vergleichbar starke Exozytoserate auslöste, die für Keimzellen beider Genotypen ca. 30 % über der spontanen Akrosomreaktionsrate lag (Abb. 18 B). Die auf das Maximum folgende Abnahme der Akrosomreaktionsrate in Wildtyp-Spermien, die auf eine Desensibilisierung der TPCs durch höhere NAADP Dosen zurückzuführen ist (Aarhus et al., 1996), ist in den TPC1^{-/-} Spermien allerdings wesentlich weniger stark ausgeprägt; zudem ist für TPC1^{-/-} Spermien, anders als für Wildtyp-Spermien, kein weiteres durch höhere NAADP-AM Dosen (5 µM) induziertes Maximum in der Exozytoserate erkennbar (s. Abb. 18 B, rote Kurve). Diese Daten bestätigen zum einen die Befunde einer durch NAADP induzierbaren Akrosomreaktion, die bereits für SLO-permeabilisierte Spermien erhoben wurden (Arndt et al., 2014); zudem lässt sich bei dem Vergleich des Antwortverhaltens beider Spermienpopulationen ableiten, dass der niedrig affine NAADP-Signalweg zur Auslösung der Akrosomreaktion offenbar durch TPC1 vermittelt wird, während TPC2 möglicherweise für die durch sehr geringe NAADP-Dosen induzierte Akrosomreaktion verantwortlich ist (Arndt et al., 2014). Ob die ausbleibende Desensibilisierung nach Applikation von 75 nM NAADP-AM in TPC1^{-/-} Spermien aber tatsächlich auf eine fehlende Inaktivierung des TPC2 in TPC1 defizienten Spermien zurückzuführen ist, muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

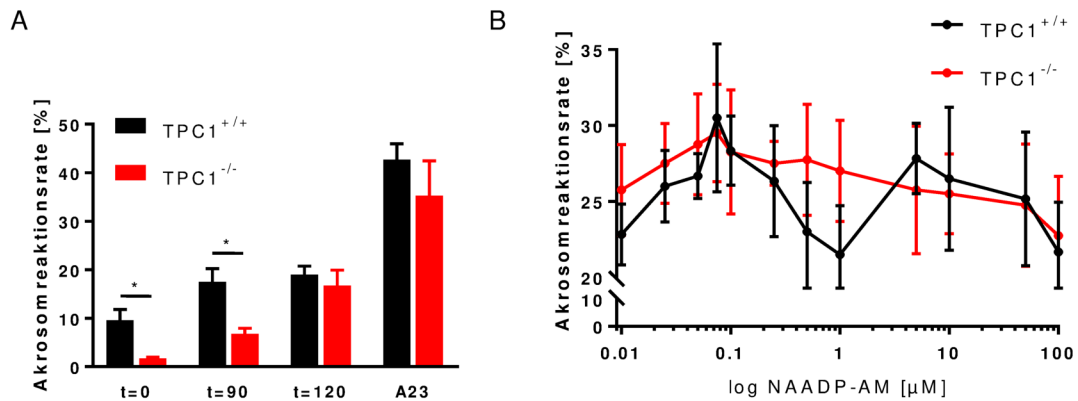


Abb. 18 Akrosomreaktionsraten unpermeabilisierter Wildtyp- und TPC1-defizienter Spermien .

A Spontane und durch das Calciumionophor A23187 induzierbare Akrosomreaktion in Spermien von Wildtyp- und TPC1-defizienten Männchen.

Spermien beider Genotypen wurden für jeweils 120 min *in vitro* kapazitiert, wobei zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 min, 90 min, 120 min) jeweils Proben entnommen und dafür der akrosomale Status für jeweils 200 Spermien bestimmt wurde. Parallel dazu wurden Proben beider Genotypen nach 90 min für je eine halbe Stunde mit 10 μM des Calciumionophors A23187 (A23) inkubiert. Die prozentuale Umrechnung der Exozytoserate ergab für Wildtyp-Spermien, dass diese im unkapazitierten Zustand eine spontane Akrosomreaktionsrate von $9,6 \pm 2,2$ % aufwiesen (t=0 min). Bei unkapazitierten TPC1^{-/-} Spermien war der Anteil mit $1,8 \pm 0,3$ % dagegen signifikant (p=0,016) geringer. Auch nach 90 min der *in vitro* Kapazitierung war die Akrosomreaktionsrate in TPC1^{-/-} Spermien ($6,8 \pm 1,2$ %) signifikant reduziert (p=0,016) gegenüber der von Wildtyp Spermien ($17,5 \pm 2,7$ %). Diese reduzierten Akrosomreaktionsraten der TPC1^{-/-} Spermien waren auch nach einer 120-minütigen Kapazitierungsphase und nach Gabe des Ca²⁺-Ionophors A23 registrierbar, wobei die Datensätze für die experimentellen Ansätze für beide Genotypen keine signifikant unterschiedlichen Raten aufwiesen. (TPC1^{+/+} n=6, TPC1^{-/-} n=4)

B Akrosomreaktionsraten nicht-permeabilisierter TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Spermien nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an NAADP-AM.

In vitro kapazitierte TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Spermien wurden für 30 min mit unterschiedlichen Konzentrationen (10 nM bis 100 μM) des membranpermeablen NAADP-AM inkubiert und danach der Anteil der Spermien ohne Akrosom quantitativ erfasst (200 Spermien/Probe). Die Dosis-Wirkungskurve für TPC1^{+/+} Spermien ist in schwarz dargestellt und zeigt sowohl im nanomolaren als auch im mikromolaren Bereich einen glockenförmigen transienten Verlauf mit maximalen Exozytoseraten bei 75 nM und 5 μM NAADP-AM. Beim Vergleich der Dosis-Wirkungskurve für die TPC1^{-/-} Spermien fällt auf, dass der für Wildtyp-Spermien typische Abfall in der Akrosomreaktionsrate nach Gabe von 75 nM NAADP-AM für die TPC1-defizienten Spermien nicht auszumachen ist. Zudem ist die zweite maximale Exozytoserate bei einer Konzentration von 5 μM NAADP-AM nicht mehr für TPC1^{-/-} Spermien zu erkennen.

Die abgebildeten Daten stellen jeweils den induzierten Anteil Akrosom-reagierter Spermien abzüglich der spontan auftretenden Akrosomenreaktion für beide Genotypen (s. **A** t=120 min) dar. (TPC1^{+/+} n=6, TPC1^{-/-} n=4)

6.1.2 Funktionelle Rolle von TPC1 für die *Zona pellucida*-induzierte Akrosomreaktion

Der physiologische Stimulus, der die Akrosomreaktion in Spermien während des Befruchtungsprozesses auslöst, ist die *Zona pellucida* der Eizelle (Wassarman und Litscher, 2008). Der Kontakt mit dieser die Eizelle umgebenden Glykoproteinhülle führt dabei über verschiedene Signalwege zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, welches dann über die Aktivierung der SNARE-Fusionsmaschinerie die Verschmelzung der akrosomalen Membran mit der Plasmamembran triggert (Gupta und Bhandari, 2011).

Unsere Versuche zur Rolle von TPC1 bei der Akrosomreaktion haben bisher gezeigt, dass eine direkte Aktivierung von TPC1 durch NAADP für die Initiierung der akrosomalen Exozytose von Bedeutung ist. Ob TPC1 damit aber auch eine funktionelle Rolle bei der durch *Zona pellucida*-Kontakt ausgelösten Akrosomreaktion übernimmt, kann so nicht abgeleitet werden. Um diese physiologisch relevante Frage zu beantworten, wurden kaudale, kapazitierte Spermien von Wildtyp-Mäusen mit solubilisierter *Zona pellucida* (Abb. 19; [*Zona*]) inkubiert und nach einer 30-minütigen Inkubation wurde der Anteil der Spermien ohne Akrosom bestimmt. Um die funktionelle Bedeutung der TPCs erfassen zu können, wurden parallel Proben angesetzt, in denen Spermien mit solubilisierter *Zona pellucida* zusammen mit dem NAADP-Antagonisten *trans*-Ned 19 (100 nM) inkubiert wurden (Abb. 19; [*Zona + Ned19*]). Als Negativkontrollen für die Erfassung der spontanen Akrosomreaktion wurden Proben zum einen mit dem Kapazitierungsbuffer allein (Abb. 19; [*control*]) bzw. der entsprechenden Verdünnung des zur Solubilisierung der *Zona pellucida* eingesetzten Puffers (Abb. 19; [*buffer*]) inkubiert. Um zudem den alleinigen Effekt von *trans* Ned-19 zu bestimmen, wurde eine Spermienprobe mit 100 nM *trans*-Ned 19 behandelt (Abb. 19; [*Ned19*]).

Die in Abb. 19 dargestellten Befunde dieser Versuchsreihe zeigen, dass weder Solubilisierungspuffer (*buffer*: $6,31 \pm 1,43$ %) noch *trans*-Ned 19 (*Ned19*: $3,74 \pm 1,00$ %) alleine im Vergleich zu nur mit Kapazitierungsbuffer behandelten Spermien (*control*: $2,68 \pm 0,61$ %) zu einer signifikanten Erhöhung der akrosomalen Exozytoserate in Spermien führten. Die Zugabe von solubilisierter *Zona pellucida* führte dagegen in $23,35 \pm 5,04$ % der Spermien zu einer akrosomalen Exozytosereaktion. Dieser Effekt wurde durch die gleichzeitige Behandlung der Spermien mit *trans*-Ned 19 signifikant ($p=0,013$) auf $12,33 \pm 3,06$ % reduziert (s. Abb. 19). Da sich die durch *Zona pellucida* induzierte Akrosomreaktion durch den TPC Antagonist *trans*-Ned 19 teilweise blockieren lässt, ist anzunehmen, dass TPC/NAADP-abhängige Prozesse an der durch *Zona pellucida* ausgelösten Akrosomreaktion tatsächlich beteiligt sind (Arndt et al., 2014).

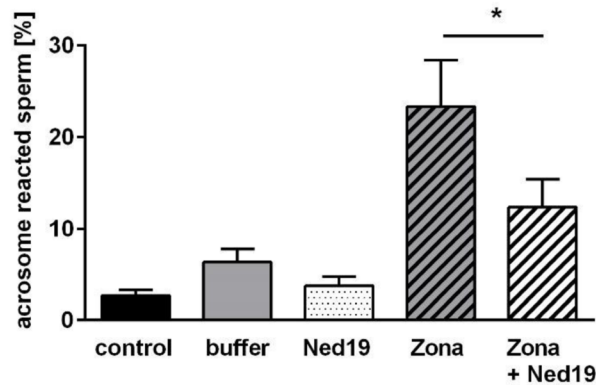


Abb. 19 *Zona pellucida* induzierte Akrosomreaktion und inhibitorische Effekte des NAADP-Antagonisten *trans*-Ned19.

Kapazitierte Spermien von Wildtyp-Männchen wurden für je 30 min mit solubilisierter *Zona pellucida* [*Zona*] (10 *Zonae*/μl Zellsuspension), dem NAADP Antagonisten *trans*-Ned 19 (100 nM; [*Ned19*]) bzw. mit beiden Substanzen zusammen ([*Zona+Ned19*]) inkubiert. Um den Effekt des Solubilisierungspuffers auf die Akrosomreaktion zu erfassen, wurden zusätzlich Kontrollansätze mit Solubilisierungspuffer [*buffer*] im Vergleich zu Ansätzen mit Kapazisierungspuffer [*control*] mitgeführt. Nach Fixierung der Spermien auf Objektträgern wurden die Proben anschließend anonymisiert und der akrosomale Status von mindestens 200 Spermien pro Ansatz bestimmt. Die Auswertung der Daten macht deutlich, dass die durch *Zona pellucida* induzierte Akrosomreaktion durch den NAADP-Antagonisten *trans*-Ned19 signifikant ($p = 0,013$) inhibiert wird. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Spermien ohne Akrosom als Mittelwert von je 5 unabhängigen Spermienpräparationen. Die englische Beschriftung entspricht der Original-Beschriftung in Arndt et al. (2014).

6.1.3 Zuchterfolg einer $TPC1^{-/-}$ Mauslinie

Der Reproduktionsphänotyp der für diese Arbeit verwendeten $TPC1^{-/-}$ Mauslinie wurde bereits 2014 beschrieben (Arndt et al., 2014). Dabei wurden verschiedene Fertilitätsparameter, anatomische Merkmale der Reproduktionsorgane der Männchen sowie die Genotyp- und Geschlechterverteilung der Nachkommen erfasst. Die veröffentlichten Ergebnisse (s. Tabelle 4 und Arndt et al., 2014) wurden von Wildtyp- und $TPC1^{-/-}$ -Zuchtpaaren generiert, die über drei Generationen mit Mäusen des Inzuchtstamms C57Bl/6 zurückgekreuzt waren (N3), so dass das Genom der verwendeten Tiere noch zu 6 % aus dem Genom des zur Gewinnung der embryonalen Stammzelle genutzten Inzuchtstamms 129/Sv stammt (Bouabe und Okkenhaug, 2013). Da der 129/Sv und der C57Bl/6 Inzuchtstamm allerdings hinsichtlich ihrer Reproduktionseigenschaften Unterschiede aufweisen (MGI, 2017b, a) wurden im Rahmen dieser Arbeit die Mäuse der $TPC1^{-/-}$ -Linie in 12. Generation auf den Stammhintergrund des C57Bl/6-Inzuchtstamms zurückgekreuzt (100 % C57Bl/6); anschließend wurde der Reproduktionserfolg nochmals dokumentiert und im Vergleich zu den Befunden der Zuchtpaare aus der N3 Rückkreuzungsgeneration analysiert.

6.1.3.1 Fertilität

Um die funktionelle Rolle des TPC1 für die Reproduktion zu erfassen, wurden monogame homozygote knockout (TPC1^{-/-}) Verpaarungen sowie heterozygote (TPC1^{+/-}) und Wildtyp-Zuchtpaare (TPC1^{+/+}) mit einem 87,5 %igen (N3) bzw. 99,98 %igen (N12) C57Bl/6-Stammhintergrund angesetzt. In Tabelle 4 (N3) und Tabelle 5 (N12) sind die erfassten Fertilitätsparameter für diese verschiedenen TPC1-Zuchtpaare vergleichend gegenübergestellt.

Betrachtet man zuerst die Verpaarungen mit einem reinen C57Bl/6 Stammhintergrund (Tabelle 5), so fällt auf, dass die Größe der Würfe für die unterschiedlichen TPC Zuchtpaare, verglichen mit Elterntieren mit einem 94 %igen C57Bl/6 Hintergrund (Tabelle 4, N3) teilweise deutlich reduziert war: Während sich die durchschnittliche Wurfgröße von Wildtyp-Elterntieren mit gemischtem (6,4 Jungtiere pro Wurf) und reinem (5,2 Jungtiere pro Wurf) C57Bl/6 Hintergrund nur leicht unterschied, konnte bei heterozygoten Zuchtpaaren eine deutliche Reduktion der Wurfgröße in Abhängigkeit von der Rückkreuzungsgeneration auf den C57Bl/6 Hintergrund festgestellt werden: Würfe von TPC1 heterozygoten Zuchtpaaren mit gemischtem genetischen C57Bl/6 Stammhintergrund umfassten im Mittel 6,5 Nachkommen pro Wurf. Nach vollständiger Rückkreuzung der Elterntiere auf den C57Bl/6 Hintergrund wurden durchschnittlich nur noch 4,8 Jungtiere pro Wurf registriert. Bei homozygot defizienten TPC1 Zuchtpaaren war dieser Effekt noch deutlicher zu erkennen: Würfe der TPC1^{-/-} Zuchtpaare mit einem gemischten C57Bl/6 Stammhintergrund hatten im Mittel eine Größe von 6,2 Jungtieren und waren somit nicht unterschiedlich zur Wurfgröße von Wildtyp-Zuchtpaaren. Für TPC1^{-/-} Elterntiere mit kongenem C57Bl/6 Stammhintergrund (N12) wurde hingegen eine durchschnittliche Wurfgröße von nur 4,1 Jungtieren bestimmt, was zusammen mit den Daten der heterozygoten TPC1 Zuchtpaare auf eine Beeinträchtigung der Reproduktion durch eine TPC1 Deletion hinweist. Diese Daten bestätigen also insgesamt, dass TPC1 für den Reproduktionserfolg von Mäusen funktionell relevant ist. Außerdem zeigen die Befunde, dass der Effekt auf den Reproduktionsphänotyps vom Stammhintergrund der Zuchtpaare abhängig ist, und bei kongenen TPC1^{-/-} Zuchtpaaren mit reinem C57Bl/6 Stammhintergrund wesentlich deutlicher zur Ausprägung kommt.

Im Gegensatz zur Wurfgröße scheint aber weder die genetische Deletion des TPC1 noch der genetische Inzucht-Stammhintergrund der TPC1-defizienten Zuchtpaare einen Einfluss auf die Geschlechterverteilung der Jungtiere zu haben: Zwar lag der Anteil der männlichen Nachkommen der Wildtyp-Zuchtpaare sowohl in der N3- als auch in der N12-Rückkreuzungsgeneration bei ca. 57 %, jedoch konnte weder für heterozygote noch für homozygote TPC1 Zuchtpaare ein signifikanter Unterschied zur Geschlechterverteilung von Jungtieren der Wildtyp-Zuchtpaare festgestellt werden.

Sowohl in der N3 (Tabelle 4) als auch in der N12 Rückkreuzungsgeneration (Tabelle 5) lag der Anteil männlicher Nachkommen von heterozygoten und TPC1^{-/-}-Zuchtpaaren im Mittel bei ca. 50 %.

Bei der Bestimmung der Verpaarungsintervalle wurde im Rahmen dieser Arbeit zwischen der Zeit bis zum ersten Wurf und der mittleren Zeit zwischen zwei Würfen während einer kontinuierlichen Verpaarung unterschieden. Betrachtet man zuerst das zeitliche Intervall zwischen zwei Würfen für Zuchtpaare der N3 Rückkreuzungsgeneration, so zeigte sich, dass der zeitliche Abstand bei Wildtyp-Zuchtpaaren im Mittel 33,6 Tage betrug (Tabelle 4); bei heterozygoten und homozygoten Elterntieren der N3 Rückkreuzungsgeneration war das Zeitintervall zwischen zwei Würfen etwas verlängert (Tabelle 4: 34,5 Tage für TPC1^{+/-}, 37,1 Tage für TPC1^{-/-}). Diese Tendenz wurde auch für N12 Zuchtpaare registriert (Tabelle 5: 37,2 Tage für TPC1^{+/-}, 38,0 Tage für TPC1^{-/-}).

Betrachtet man dagegen die Zeitspanne bis zum ersten Wurf kann ein deutlicher Unterschied zwischen Wildtyp und TPC1 defizienten Elterntieren der N3 und N12 Rückkreuzungsgeneration festgestellt werden: Während es für Zuchtpaare mit 87,5 %igem C57Bl/6 Stammhintergrund keinen signifikanten Unterschied zwischen TPC1^{+/+} (28,3 Tage) und TPC1^{-/-} (31,8 Tage) Elterntieren gab (Tabelle 4), konnte für TPC1^{-/-} Zuchtpaare nach vollständiger Rückkreuzung auf den C57Bl/6 Stammhintergrund eine statistisch signifikante Verlängerung der Intervalle bis zum nächsten Wurf im Vergleich zu Wildtyp Elterntieren festgestellt werden (Tabelle 5): Schon bei heterozygoten Zuchtpaaren war die durchschnittliche Zeit bis zum ersten Wurf mit 31,8 Tagen im Vergleich zu 21,5 Tagen bei TPC1^{+/+} Verpaarungen signifikant verlängert ($p=0,007$); bei homozygoten TPC1^{-/-} Zuchtpaaren lag die Zeitspanne bis zum ersten Wurf sogar bei 36 Tagen ($p=0,05$).

Insgesamt kann also festgestellt werden, dass der Reproduktionsphänotyp TPC1 defizienter Mäuse, der sich in einer reduzierten Wurfgröße und einer Verlängerung des Zeitintervalls zwischen zwei Würfen widerspiegelt, bei kongenen Zuchtpaaren mit reinem C57Bl/6 Stammhintergrund sehr viel ausgeprägter ist als bei Elterntieren mit gemischtem 129/Sv/C57Bl/6 Stammhintergrund.

Tabelle 4 Fertilitätsparameter für TPC1 Verpaarungen der N3-Rückkreuzungsgeneration (87,5 % C57Bl/6) (Arndt et al., 2014).

Fertilitätsparameter	TPC1 Genotyp		
	[+/+] x [+/+]	[+/-] x [+/-]	[-/-] x [-/-]
Wurfgröße (Zuchtpaare/Würfe)	6,4 ± 0,2 (8/30)	6,5 ± 0,10 (26/105)	6,2. ± 0,2 (8/31)
Geschlechterverteilung (% Männchen)	57,1	52,8	48,5
Zeit zwischen den Würfen (d) (Zuchtpaare)	33,6 ± 2,3 (9)	34,5 ± 1,3 (26)	37,1 ± 2,5 (9)
Zeit bis zum ersten Wurf (d) (Zuchtpaare)	28,3 ± 3,6 (9)	26,8 ± 1,7 (26)	31,8 ± 6,1 (9)

Tabelle 5 Fertilitätsparameter für TPC1 Zuchtpaare mit kongenem C57Bl/6 Hintergrund (N12-Rückkreuzungsgeneration, 99,8 % C57Bl/6 Stammhintergrund).

Fertilitätsparameter	TPC1 Genotyp		
	[+/+] x [+/+]	[+/-] x [+/-]	[-/-] x [-/-]
Wurfgröße (Zuchtpaare/Würfe)	5,2 ± 0,6 (6/19)	4,8 ± 0,3 (11/37)	4,1 ± 0,5 (7/18)
Geschlechterverteilung (% Männchen)	57,0	50,9	50,00
Zeit zwischen den Würfen (d) (Zuchtpaare)	35,0 ± 3,5 (6)	37,2 ± 2,0 (16)	38,0 ± 4,1 (10)
Zeit bis zum ersten Wurf (d) (Zuchtpaare)	21,5 ± 1,0 (6)	31,6 ± 3,2 * (16)	36,0 ± 5,4 * (10)

Ein weiteres Kriterium zur Beurteilung der Fruchtbarkeit von Mäusen ist die Anzahl von Würfen, die aus einer Verpaarung in einem bestimmten Zeitraum (hier 120 Tage) hervorgehen (Moreira et al., 2015). Bei TPC1^{+/+} Verpaarungen wurden durchschnittlich 3,0 Würfe im entsprechenden Zeitintervall registriert; aus heterozygoten Verpaarungen gingen im Mittel 2,6 Würfe in diesem Zeitintervall hervor; und für TPC1^{-/-} Zuchtpaare wurden durchschnittlich 2,2 Würfe in 120 Tagen dokumentiert (Abb. 20). Der Unterschied in der Anzahl der Würfe von TPC1^{-/-} Zuchtpaaren zu TPC1^{+/+} Verpaarungen ist nicht signifikant ($p=0,3$), spiegelt aber trotzdem bereits die leicht verlängerte Zeitspanne zwischen zwei Würfen wieder (s. Tabelle 5).

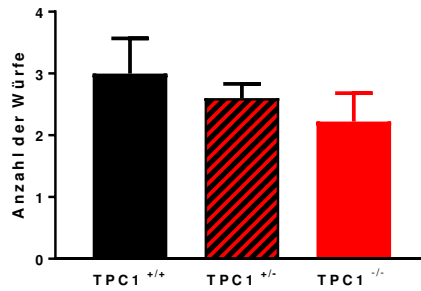


Abb. 20 Anzahl der Würfe von TPC1^{+/+}, TPC1^{+/-} und TPC1^{-/-} Zuchtpaaren über ein Zeitintervall von 120 Tagen.

Nach Ansetzen von 7 TPC1^{+/+}, 17 TPC1^{+/-} und 11 TPC1^{-/-} Zuchtpaaren mit reinem C57Bl/6 Stammhintergrund wurden alle Würfe eines Zuchtpaares über einen Zeitraum von 120 Tagen registriert und anschließend jeweils die durchschnittliche Anzahl der Würfe in diesem Zeitintervall für Zuchtpaare der unterschiedlichen Genotypen ermittelt.

6.1.3.2 Genotypverteilung

Nach den Mendelschen Gesetzen haben 50 % der Nachkommen aus einer heterozygoten Verpaarung ebenfalls einen heterozygoten Genotyp; 25 % der Jungtiere sind dagegen entweder homozygot defizient für das entsprechende Allel oder tragen zwei Wildtyp-Allele (Griffiths AJF, 2000). Ist das betroffene Gen allerdings wichtig für das prä- und postnatale Überleben der Nachkommen, verschiebt sich diese Verteilung zu Gunsten des Wildtyp-Allels (Huang et al., 2013).

Bei der Analyse der Genotypverteilung von Nachkommen aus heterozygoten TPC1-Zuchtpaaren mit gemischtem genetischen Stammhintergrund (N3 Rückkreuzungsgeneration) fiel auf, dass diese hochsignifikant von der erwarteten Mendelschen Verteilung abweicht (Arndt et al., 2014). Im Detail wurde dazu festgestellt, dass der Anteil der heterozygoten Jungtiere mit 50,1 % der Erwartung entspricht. Bemerkenswert war jedoch, dass der Anteil der homozygot TPC1-defizienten Nachkommen mit nur 19,6 % deutlich unter dem erwarteten Anteil von 25 % lag, wohingegen 29,8 % der Nachkommen als Wildtyp-Tiere identifiziert wurden. Somit lag eine eindeutige Genotypverschiebung zu Gunsten des Wildtyps vor (Arndt et al., 2014). Aufbauend auf der Beobachtung, dass der Stammhintergrund der verwendeten TPC1-Mauslinie einen Effekt auf den Reproduktionserfolg der Zuchtpaare hat (s. 6.1.3.1), war es wichtig zu prüfen, ob die Deletion des TPC1 auch einen Einfluss auf die prä- oder postnatale Entwicklung der TPC1-defizienten Jungtiere hat. Entsprechend der beschriebenen Vorgehensweise (s. 5.1.4) wurden daher nach Rückkreuzung der Mäuse auf einen reinen C57Bl/6 Stammhintergrund zusätzlich Daten zur Genotypverteilung der Nachkommen von heterozygoten Elterntieren gesammelt. Dabei stellte sich heraus, dass die in der Rückkreuzungsgeneration N3 registrierte Genotypverschiebung nicht mehr zu beobachten war, sondern die tatsächliche Verteilung in etwa der Erwartung nach Mendel entsprach (s. Abb. 21). Von insgesamt 177 geborenen Jungtieren aus

heterozygoten N12 Zuchtpaaren wurden 43 Tiere als TPC1^{+/+}, 86 Tiere als TPC1^{+/-} und 48 Tiere als TPC1^{-/-} genotypisiert. Nach einer entsprechenden prozentualen Umrechnung zeigte sich, dass diese Genotypverteilung in etwa der erwarteten 25:50:25 %-Verteilung entspricht.

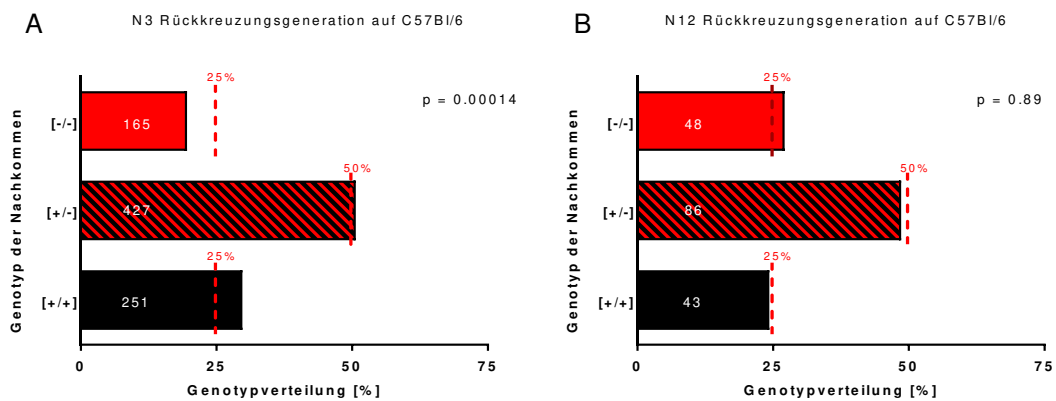


Abb. 21 Genotypverteilung der Nachkommen heterozygoter TPC1-Zuchtpaare unterschiedlicher C57Bl/6 Rückkreuzungsgenerationen.

Die Genotypen der Nachkommen von 29 heterozygoten Zuchtpaaren der Rückkreuzungsgeneration N3 (A) bzw. 11 heterozygoten Zuchtpaaren der Rückkreuzungsgeneration N12 (B) wurden bestimmt und der Prozentsatz des jeweiligen Genotyps berechnet (Balken). Die rot gestrichelten Linien stellen die erwartete Verteilung nach Mendel dar (homozygot TPC1^{+/+}: 25 %; homozygot TPC1^{-/-}: 25 %; heterozygot: 50 %). In den Balken ist die für den entsprechenden Genotyp absolute Anzahl von Nachkommen notiert. Die in der N3-Rückkreuzungsgeneration registrierte Genotypverschiebung zu Ungunsten des TPC1^{-/-} Genotyps ist nach vollständiger Rückkreuzung auf den C57Bl/6 Stammhintergrund (N12) nicht mehr zu beobachten. Zur statistischen Auswertung der Genotypverteilung wurde der Chi²-Test angewendet; dabei wurde die tatsächliche Genotypverteilung mit dem zu erwartenden prozentualen Anteil nach Mendel verglichen. Insgesamt wurden 681 Nachkommen von 26 Zuchtpaaren ([A], N3) bzw. 177 Nachkommen von 11 heterozygoten Zuchtpaaren ([B], N12) in die Berechnung einbezogen.

6.1.3.3 Mortalität

Zur Bestimmung der Mortalitätsrate von Nachkommen der TPC1^{+/+}, heterozygoten und TPC1^{-/-} Zuchtpaare wurde die Gesamtzahl der Nachkommen sowie die Anzahl der in den ersten drei Wochen nach der Geburt verstorbenen Jungtiere in einem Wurf dokumentiert. Aus diesen Daten wurde die durchschnittliche Sterberate der Nachkommen für den jeweiligen Genotyp der Elterntiere berechnet.

Bei Verpaarungen von TPC1^{+/+} Mäusen lag die Mortalitätsrate bei 12,1 %. Der Anteil der toten Jungtiere für heterozygote Zuchtpaare war mit 12,5 % in etwa gleich hoch. Bei TPC1^{-/-} Zuchtpaaren hingegen starben in den ersten drei Wochen durchschnittlich 27,3 % der Nachkommen in einem Wurf. Damit ist die Mortalitätsrate von Nachkommen TPC1-defizienter Elterntiere im Vergleich zu TPC1^{+/+} Verpaarungen signifikant (p=0,022) erhöht.

Ergebnisse

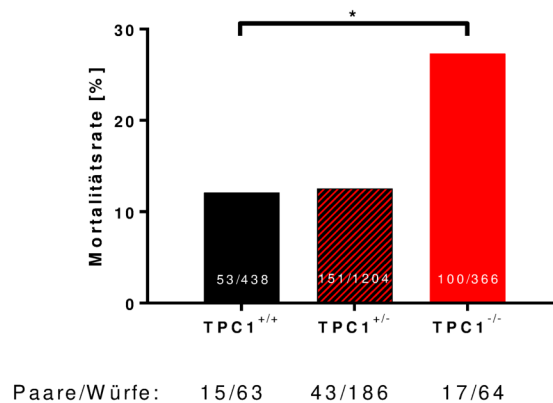


Abb. 22 Mortalitätsrate der Nachkommen aus Wildtyp-Verpaarungen und heterozygot sowie homozygot TPC1-defizienten Zuchtpaaren.

Für Zuchtpaare mit TPC1^{+/+}, TPC1^{+/-} oder TPC1^{-/-} Genotyp wurde der Prozentsatz der in den ersten drei Lebenswochen verstorbenen Nachkommen für jeden Wurf ermittelt. Dargestellt ist die durchschnittliche Mortalitätsrate aller Nachkommen der Verpaarungen der drei untersuchten Genotypen. In den Säulen sind die jeweilige Anzahl der toten und die Gesamtzahl aller Nachkommen angegeben. Die Mortalitätsrate bei TPC1^{-/-} Zuchtpaaren (27,3 %) ist im Vergleich zu Wildtyp Elterntieren (12,1 %) signifikant erhöht ($p=0,02$).

6.1.4 Reproduktionserfolg einer TPC2-defizienten Mauslinie

Die bisherigen Daten zur Expression von TPC1 und TPC2 und deren Bedeutung für die Akrosomreaktion deuten insgesamt daraufhin, dass beiden TPC Subtypen eine funktionelle Rolle für die Reproduktion zukommt (Arndt et al., 2014). Daher war es notwendig, analog zur Analyse des Reproduktionsphänotyps der TPC1-defizienten Mäuse (s. 6.1.1 und (Arndt et al., 2014)) auch die vorhandenen TPC2^{-/-} Mäuse im Hinblick auf deren Fertilität, also die Fähigkeit Nachkommen zu produzieren, und den Einfluss der TPC2-Defizienz auf diese Nachkommen zu analysieren. Des Weiteren wurden speziell für die Männchen dieser Mauslinie Daten zur Spermienzahl sowie dem Hoden- und Körpergewicht erhoben, da pathophysiologische Veränderungen dieser Parameter den Fortpflanzungserfolg beeinflussen können. Da zum Zeitpunkt der Studien die verfügbaren TPC2^{-/-} Mäuse zum Teil erst in der 7. Generation auf den C57Bl/6 Stammhintergrund zurückgekreuzt waren (99,2 % C57Bl/6), wurden für diese experimentellen Ansätze durchweg Wildtyp-Kontrolltiere mit dem gleichen genetischen C57Bl/6 Hintergrund verwendet.

6.1.4.1 Fertilität von TPC2 defizienten Mäusen

Die Zuchtansätze haben insgesamt gezeigt, dass TPC2^{-/-} Mäuse prinzipiell in der Lage sind, sich fortzupflanzen und überlebensfähige Nachkommen zu produzieren. Bei der detaillierten Analyse verschiedener Fertilitätsparameter konnten allerdings Hinweise auf eine Subfertilität des TPC2 knockouts festgestellt werden, die im Folgenden skizziert werden.

So liegt z.B. die durchschnittliche Größe eines Wurfes eines TPC2^{-/-} Zuchtpaares mit 4,3 Jungtieren pro Wurf unter dem Referenzwert von 5,7 Jungtieren für TPC2^{+/+} Verpaarungen. Würfe von heterozygoten TPC2 Zuchtpaaren hatten im Mittel eine Größe von 5,5 Tieren (s. Tabelle 6) und entsprachen somit in etwa der Wurfgröße, die für Wildtyp-Elterntiere bestimmt wurde. Die Anzahl der hier in die Auswertung eingegangenen Zuchtpaare ist mit 4 TPC2^{-/-} Elterntier-Paaren jedoch noch relativ gering. Ob der bereits zu diesem Zeitpunkt festgestellte Unterschied in der Wurfgröße sich bei der Analyse weiterer Zuchtpaare bestätigt und dann auch statistisch signifikante Unterschiede zu entsprechenden Kontrolltieren aufzeigt, muss daher in weiterführenden Zuchtansätzen geklärt werden.

Betrachtet man darüberhinaus die Geschlechterverteilung der Jungtiere, so war im Mittel bei keinem der verschiedenen TPC1 Zuchtpaare eine Abweichung von der erwarteten 50:50 Geschlechterverteilung zu beobachten: Zwar betrug der durchschnittliche Anteil der Männchen unter den Nachkommen bei den TPC2^{+/+} Verpaarungen 56 % und war damit höher als bei heterozygoten und TPC2^{-/-} Zuchtpaaren (45 % bzw. 49 %), jedoch konnte für diese Datensätze im Vergleich zu den Nachkommen der Wildtyp-Zuchtpaare kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (s. Tabelle 6).

Als wichtige weitere Reproduktionsparameter wurden die Zeitintervalle zwischen den Würfen in der durchgeführten kontinuierlichen Wurfserie bzw. der Zeitraum bis zum ersten Wurf erfasst (Tabelle 6). Die durchschnittliche Zeitspanne zwischen zwei Würfen war bei TPC2^{-/-} Zuchtpaaren mit 40,5 Tagen gegenüber TPC2^{+/+} und heterozygoten Paaren mit 37,3 und 38,7 Tagen zwar nur leicht erhöht. Das Zeitintervall vom Zeitpunkt der Anpaarung eines TPC2^{-/-} Zuchtpaares bis zur Geburt der ersten Nachkommen war dagegen signifikant ($p=0,017$) verlängert: Bei einem TPC2^{+/+} Zuchtpaar verstrichen im Mittel nur 21,6 Tage bis zum ersten Wurf; bei heterozygoten Paaren waren es 29,8 und bei TPC2^{-/-} Paaren sogar 43,4 Tage (s. Tabelle 6).

Tabelle 6 Fertilitätsparameter für Zuchtpaare mit unterschiedlichem TPC2 Genotyp.

Fertilitätsparameter	TPC2 Genotyp		
	[+/+] x [+/+]	[+/-] x [+/-]	[-/-] x [-/-]
Wurfgröße (Zuchtpaare/Würfe)	5,7 ± 0,2 (7/29)	5,5 ± 0,2 (8/29)	4,3 ± 0,4 (4/12)
Geschlechterverteilung (% Männchen)	56,0	45,0	49,0
Zeit zwischen den Würfen (d) (Zuchtpaare)	37,3 ± 2,9 (8)	38,7 ± 3,6 (9)	40,5 ± 4,9 (5)
Zeit bis zum ersten Wurf (d) (Zuchtpaare)	21,6 ± 1,1 (8)	29,8 ± 3,8 (9)	43,4 ± 9,9 * (5)

Die unterschiedlichen Zeitintervalle bis zum ersten Wurf eines Zuchtpaares wirkten sich auch auf die durchschnittliche Zahl der Würfe im Zeitraum von 120 Tagen aus: Aus TPC2^{+/+} Verpaarungen gingen in diesem Zeitintervall 3,4 Würfe hervor, während es bei heterozygoten 2,9 und bei TPC2^{-/-} Zuchtpaaren nur 2,7 Würfe waren (s. Abb. 23).

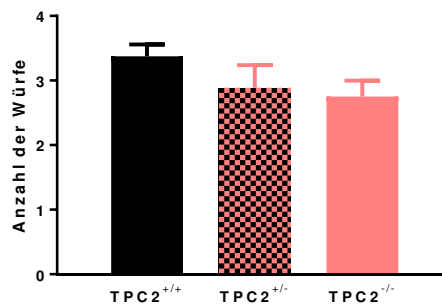


Abb. 23 Durchschnittliche Anzahl der Würfe von Wildtyp und heterozygot sowie homozygot TPC2-defizienten Zuchtpaaren in einem Verpaarungszeitraum von 120 Tagen.

Die Anzahl der Würfe in einem Zeitraum von 120 Tagen ist im Vergleich zu Wildtyp-Elterntieren bei heterozygoten und TPC2^{-/-} Zuchtpaaren leicht reduziert. Die statistische Auswertung ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen.

Abschließend kann festgestellt werden, dass sich die genetische Deletion von TPC2, ähnlich wie die Defizienz für TPC1, vor allem auf die Anzahl der Nachkommen pro Wurf und das Zeitintervall bis zum ersten Wurf nach Verpaarung eines Zuchtpaares auswirkt.

6.1.4.2 Reproduktionsphänotyp TPC2-defizienter Männchen

Um weiter zu überprüfen, ob die verlängerte Dauer bis zum ersten Wurf eines TPC2^{-/-} Zuchtpaares auf die Reproduktionsfähigkeit der Männchen zurückzuführen ist, wurden adulte männliche TPC2^{-/-} Tiere hinsichtlich ihres Hodengewichts und ihrer Spermienzahl untersucht; parallel dazu wurde das Gesamtkörpergewicht der Männchen bestimmt. Zur

Bewertung möglicher Abweichungen wurden Daten von TPC2^{+/+} und heterozygoten Männchen im gleichen Alter (ca. 10 bis 14 Wochen) und mit dem gleichen genetischen C57Bl/6 Stammhintergrund erhoben. Insgesamt wurden für diese Versuchsreihe 14 TPC2^{+/+}, 10 TPC2^{+/-} und 9 TPC2^{-/-} Männchen untersucht. Die in Tabelle 7 zusammengefassten Daten dieser experimentellen Reihe zeigen, dass homozygot TPC2 defiziente Männchen im Durchschnitt eine signifikant reduzierte Spermienzahl ($p=0,047$) und ein leicht reduziertes Hodengewicht im Vergleich zu TPC2^{+/+} Tieren aufwiesen. Auch das durchschnittliche Körpergewicht der TPC2^{-/-} Männchen war leicht reduziert ($p=0,057$) (s. Tabelle 7). Bei heterozygoten Männchen konnten hinsichtlich der drei analysierten Parameter dagegen keine Auffälligkeiten im Vergleich zu Wildtyp-Männchen festgestellt werden (s. Tabelle 7).

Ob sich diese veränderten Reproduktionsparameter auch in einer pathologischen Veränderung der Hoden- oder Nebenhodenmorphologie widerspiegeln, muss in weiterführenden anatomischen Analysen geklärt werden. Zudem sollte in zukünftigen Studien geprüft werden, ob der Hormonstatus, z. B. des Androgens Testosteron, durch eine Deletion des TPC2 beeinträchtigt ist, da eine reduzierte Testosteronproduktion unmittelbar Einfluss auf die Spermatogenese und damit die Anzahl epididymaler Spermien hat (W. H. Walker, 2011).

Tabelle 7 Effekt der genetischen Deletion des TPC2 auf das Körpergewicht, das Hodengewicht sowie die Anzahl epididymaler Spermien.

Nach zervikaler Dislokation wurde das Körpergewicht adulter, ca. 10 bis 14 Wochen alter, männlicher Mäuse der drei TPC2 Genotypen ([+/+], [+/-], [-/-]) bestimmt; zudem wurde das Gewicht der entnommenen Hoden dokumentiert sowie die Anzahl an Spermien im kaudalen Teil des Nebenhodens ausgezählt. Aufgeführt sind die Mittelwerte der Daten von 14 TPC2^{+/+}, 10 TPC2^{+/-} und 9 TPC2^{-/-} Tieren mit identischem C57Bl/6 Stammhintergrund.

	TPC2 Genotyp		
	[+/+]	[+/-]	[-/-]
Körpergewicht (g)	25,9 ± 0,4	25,0 ± 0,4	23,9 ± 0,9
Hodengewicht (mg)	172,1 ± 4,9	174,2 ± 5,8	162,7 ± 5,0
Spermienzahl (x 10 ⁶)	22,2 ± 1,6	21,9 ± 2,3	16,0 ± 2,4*

6.1.4.3 *Genotypverteilung*

Wie bereits unter 6.1.3.2 beschrieben, kann sich das Fehlen eines bestimmten Proteins sowohl auf die pränatale Entwicklung aber auch auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Jungtiere nach der Geburt auswirken; entsprechend kann der Anteil an Nachkommen mit der betreffenden Gen-Defizienz im Vergleich zu Jungtieren mit einem

Wildtyp oder heterozygoten Genotyp reduziert sein (Masel, 2011; Huang et al., 2013). Bei heterozygoten Zuchtpaaren würde sich dieser Effekt in einer Abweichung der Genotypverteilung von der erwarteten Mendel'schen Verteilung (25:50:25) widerspiegeln.

Die Untersuchung der Genotypverteilung von Nachkommen aus Verpaarungen von heterozygoten TPC2 Elterntieren erbrachte dazu folgende Ergebnisse: Von insgesamt 158 Nachkommen aus 8 Zuchtpaaren wurden 47 Jungtiere als TPC2^{+/+} (Wildtyp) identifiziert; 76 Jungtiere waren bezüglich des TPC2 Allels heterozygot und nur 36 Tiere hatten den Genotyp TPC2^{-/-}. Berechnet man daraus den prozentualen Anteil der Nachkommen mit einem bestimmten TPC2 Genotyp, wird deutlich, dass 22,8 % der Nachkommen einen TPC2^{-/-} Genotyp aufwiesen, was damit unter dem erwarteten Anteil von 25 % liegt, jedoch nicht signifikant davon abweicht (s. Abb. 24). Der Anteil der TPC2^{+/+} Jungtiere war mit 29,7 % hingegen größer als nach Mendel zu erwarten gewesen wäre; Heterozygote Nachkommen machten einen prozentualen Anteil von 48,1 % aus (s. Abb. 24).

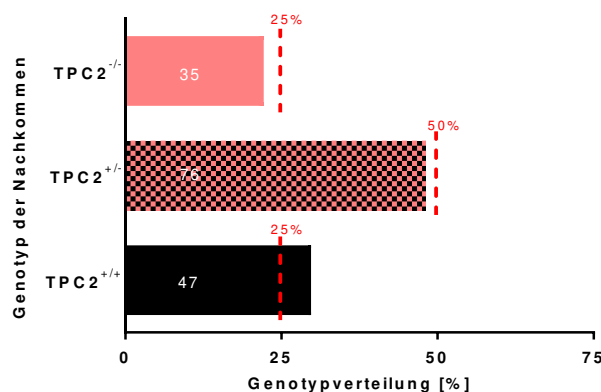


Abb. 24 Genotypverteilung von Nachkommen heterozygoter TPC2 Zuchtpaare.

Aus 8 TPC2^{+/-} Zuchtpaaren gingen 29 Würfe mit insgesamt 158 Nachkommen hervor. Durch Genotypisierung der Jungtiere konnte festgestellt werden, dass der Anteil der Nachkommen mit einem TPC2^{+/-} Genotyp bei 48,1 % lag, was in etwa dem erwarteten Anteil von 50 % entspricht. 29,7 % der Nachkommen konnten als TPC2 Wildtyp Tiere identifiziert werden, wohingegen nur 22,8 % der Nachkommen homozygot defizient für TPC2 waren. Die geringfügige Abweichung der beobachteten von der erwarteten Verteilung für Wildtyp und TPC2-defiziente Nachkommen erwies sich jedoch nach Durchführung eines Chi²-Tests als nicht signifikant unterschiedlich von der statistisch zu erwartenden Mendel'schen Verteilung von 25 % TPC2^{+/+}, 50 % TPC2^{+/-} und 25 % TPC2^{-/-} Tieren (gestrichelte Linien). Die Zahlen in den Balken geben die absolute Anzahl der Nachkommen für den jeweiligen Genotyp an.

6.1.4.4 Mortalität von TPC2 Jungtieren

Zur Bestimmung der Mortalitätsrate von Nachkommen TPC2-defizienter sowie TPC1/2 doppel-defizienter Elterntiere wurden neben heterozygoten und homozygot defizienten Zuchtpaaren zum Vergleich auch Wildtyp-Zuchtpaare mit gleichem genetischen C57Bl/6 Stammhintergrund angesetzt. Zunächst fiel auf, dass die Sterberate der Nachkommen mitgezüchteter Wildtyp-Elterntiere mit 25,3 % deutlich höher war, als die der TPC1^{+/+} Wildtyp-Zuchtpaare (12,1 %) (s. 6.1.3.3). Beim direkten Vergleich der Mortalitätsrate der Wildtyp-Jungtiere mit der Sterberate der anderen TPC2 Genotypen fiel jedoch auf, dass der Anteil der toten Nachkommen in einem Wurf von heterozygoten (30,7 %) und TPC2^{-/-} (46,9%) Zuchtpaaren noch deutlich über dem der Jungtiere der Wildtyp Zuchtpaare lag (s. Abb. 25). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Zahl der Tiere, die in diese Auswertung gingen (548 Mäuse), im Vergleich zu der Versuchsreihe der TPC1 Zuchtpaare (2008 Mäuse), wesentlich geringer war. Insgesamt scheinen die Daten aber doch einen ersten Hinweis darauf zu geben, dass dem TPC2 für das Überleben der Jungtiere in den ersten drei Wochen eine Rolle zukommt, die nicht durch den TPC1 übernommen werden kann.

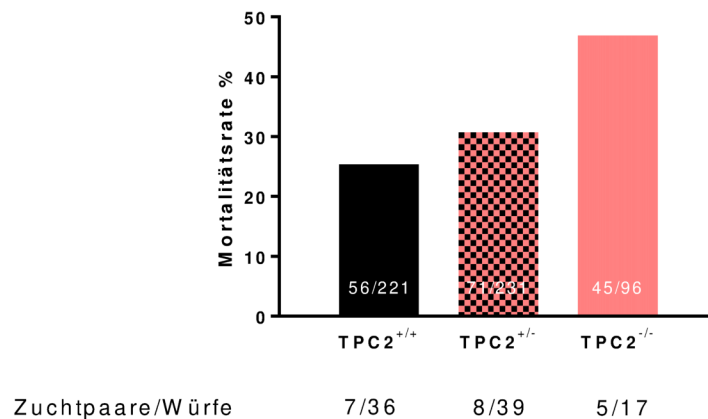


Abb. 25 Mortalitätsrate von Nachkommen genetisch unterschiedlicher TPC2 Zuchtpaare. Aus der Anzahl der in den ersten drei Wochen verstorbenen Jungtiere und der Gesamtzahl der Nachkommen aus TPC2^{+/+}, TPC2^{+/-} und TPC2^{-/-} Verpaarungen wurde die Mortalitätsrate für die Jungtiere verschiedener TPC2 Genotyp-Elterntiere berechnet. In den Säulen sind die Zahl der toten Tiere und die Gesamtzahl der Jungtiere aus den jeweiligen Verpaarungen vermerkt; unterhalb des Diagramms ist zusätzlich die Anzahl der für die Versuchsreihe analysierten Zuchtpaare angegeben sowie die Anzahl der daraus hervorgegangenen Würfe.

6.1.5 Zuchterfolg einer TPC1/2 Doppel-knockout Mauslinie

Durch die strategische Verpaarung von TPC1 und TPC2 knockout Mäusen entstehen Nachkommen, die heterozygot für beide Allele sind. Eine erneute Kreuzung dieser heterozygoten Tiere kann bei den Nachkommen in neun verschiedenen Genotypen

resultieren: Mit 25 % Wahrscheinlichkeit haben die Jungtiere wiederum heterozygote Genotypen für beide TPC Subtypen; je 6,25 % tragen dagegen nur Wildtyp-Allele oder sind sogenannte Doppel-knockout (DKO) Tiere (TPC1/2^{-/-}) (s. Abb. 12).

Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit war die Zahl der Nachkommen mit einer gleichzeitigen genetischen Deletion für TPC1 und TPC2 aus den TPC1/TPC2 heterozygoten Zuchtpaaren noch sehr gering. Aus diesem Grund standen nur wenige Tiere für homozygot defiziente TPC1/2^{-/-} Verpaarungen zur Verfügung, sodass lediglich drei Zuchtpaare für die Erfassung des Reproduktionsphänotyps angesetzt werden konnten. Für zwei dieser Zuchtpaare musste festgestellt werden, dass sie keine Nachkommen produzierten. Aus dem dritten Zuchtpaar gingen drei Würfe mit insgesamt 19 Jungtieren hervor, von denen allerdings keines die ersten drei Wochen nach der Geburt überlebte. Diese initialen Daten deuten darauf hin, dass eine gleichzeitige Deletion beider TPC-Subtypen die Überlebensfähigkeit der Nachkommen aus homozygot TPC1/2-defizienten Zuchtpaaren stark beeinflusst. Deshalb wurde der Fokus bei der Erfassung des Reproduktionsphänotyps der Männchen und hinsichtlich der Fertilität der Zuchtpaare auf TPC1/2 heterozygote Mäuse gelegt.

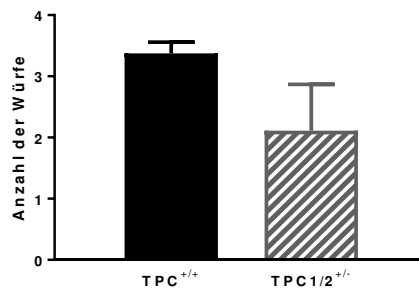
6.1.5.1 Fertilität heterozygoter TPC1/2 Doppel-knockout Zuchtpaare

Aus Verpaarungen TPC1/2 heterozygoter Mäuse gingen im Mittel Würfe mit 5,9 Jungtieren hervor. Diese Größe entspricht in etwa dem für TPC Wildtyp-Verpaarungen ermitteltem Wert von 5,7 Jungtieren pro Wurf (s. Tabelle 8). Auch die Geschlechterverteilung wich bei Nachkommen von heterozygoten Zuchtpaaren nicht von der statistisch erwarteten Verteilung ab: Bei 51,2 % der Jungtiere wurde ein männliches Geschlecht festgestellt. Die Zeitintervalle, die zwischen den Würfen lagen, waren mit 34,0 Tagen im Durchschnitt im Bereich des Zeitraums, der für die entsprechenden TPC^{+/+} Zuchtpaare ermittelt wurde (37,3 Tage). Die Zeit bis zum ersten Wurf eines heterozygoten Zuchtpaares (26,3 Tage) war im Vergleich zu TPC^{+/+} Verpaarungen (21,6 Tage) leicht, aber nicht signifikant erhöht. (s. Tabelle 8)

Tabelle 8 Fertilitätsparameter von TPC1/2 heterozygoten Zuchtpaaren.

Fertilitätsparameter	TPC1/2 Genotyp	
	[+/>] x [+/>]	[+/>] x [+/>]
Wurfgröße (Zuchtpaare/Würfe)	5,7 ± 0,2 (7/29)	5,9 ± 0,3 (7/21)
Geschlechterverteilung (% Männchen)	56,0	51,2
Zeit zwischen den Würfen (d) (Zuchtpaare)	37,3 ± 2,9 (8)	34,0 ± 2,9 (7)
Zeit bis zum ersten Wurf (d) (Zuchtpaare)	21,6 ± 1,1 (8)	26,3 ± 2,6 (7)

Die Anzahl der Würfe in einem Zeitraum von 120 Tagen nach Verpaarung schwankte für die TPC1/2 heterozygoten Zuchtpaare relativ stark. So konnten zwei der sieben analysierten Zuchtpaare gar keine Nachkommen produzieren, was dazu führt, dass die Zahl der Würfe pro 120 Tage mit 2,1 deutlich unter dem Wert für TPC^{+/+} Verpaarungen (3,4 Jungtiere) lag ($p=0,059$). (s. Abb. 26) TPC1/2 heterozygote Zuchtpaare sind also ebenfalls grundsätzlich fertil; für eine abschließende statistisch abgesicherte Beurteilung des Reproduktionsphänotyps sollten aber noch weitere Daten erhoben werden.

**Abb. 26 Anzahl der Würfe von Wildtyp und heterozygoten TPC1/2 Zuchtpaare innerhalb von 120 Tagen.**

Die durchschnittliche Zahl der Würfe aus Verpaarungen von TPC1/2 heterozygoten Elterntieren in einem definierten Zeitraum von 120 Tagen wurde ermittelt und der erfassten Anzahl von Würfen für Wildtyp Zuchtpaare gegenüber gestellt. Aus den 7 angesetzten TPC1/2 heterozygoten Zuchtpaaren gingen innerhalb des festgesetzten 120 Tage-Intervalls im Mittel 2,1 Würfe hervor; aus entsprechenden Verpaarungen von Wildtyp-Zuchtpaaren (8 Zuchtpaare) gingen im gleichen Zeitraum dagegen 3,4 Nachkommen hervor. Trotz des auffällig niedrigeren Reproduktionserfolgs der heterozygoten TPC1/2 Zuchtpaare konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zu dem Reproduktionserfolg der Wildtyp-Elterntiere festgestellt werden.

6.1.5.2 *Reproduktionsphänotyp von TPC1/2 heterozygoten Männchen*

Wie TPC2^{+/-} und TPC2^{-/-} Männchen wurden auch TPC1/2^{+/-} Männchen im Hinblick auf ihre Reproduktionsorgane untersucht. Das durchschnittliche Gewicht beider Hoden entsprach mit 170,4 mg in etwa dem von TPC^{+/+} Männchen (172,07 mg). Die durchschnittliche kaudale Spermienzahl im Nebenhoden war mit 21,48 x 10⁶ gegenüber den TPC^{+/+} Männchen mit 22,24 x 10⁶ ebenfalls unauffällig. Zusätzlich wurde auch das Körpergewicht der 10 untersuchten heterozygoten Männchen bestimmt: Das durchschnittliche Gewicht der TPC1/2^{+/-} Männchen betrug 25,43 g, was vergleichbar mit dem Durchschnittskörpergewicht von TPC^{+/+} Männchen (25,91 g) war (s. Tabelle 9). Eine Heterozygotie bezüglich der TPC1 und TPC2 Gene wirkte sich somit auf keinen der untersuchten Reproduktionsparameter aus.

Tabelle 9 Spermienzahl, Hoden- und Körpergewicht von TPC1/2 heterozygoten Männchen. Zur Bestimmung des Körpergewichts TPC1/2 heterozygoter adulter Männchen wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und umgehend gewogen; anschließend wurden beide Hoden präpariert und deren Gesamtgewicht bestimmt. Die Anzahl kaudaler Spermien wurde mit Hilfe einer Neubauerzählkammer erfasst. Dargestellt sind die Durchschnittswerte der jeweiligen untersuchten Parameter von 14 Wildtyp-Männchen bzw. 10 Tieren mit einem heterozygoten TPC1/2 Genotyp.

	TPC1/2 Genotyp	
	[+/-]	[+/-]
Körpergewicht (g)	25,9 ± 0,4	25,4 ± 0,4
Hodengewicht (mg)	172,1 ± 4,9	170,4 ± 6,0
Spermienzahl (x 10 ⁶)	22,2 ± 1,6	21,5 ± 2,2

6.1.5.3 *Genotypverteilung*

Wie bereits erwähnt, können aus einer Verpaarung von TPC1/2 heterozygoten Mäusen Nachkommen mit neun unterschiedlichen Genotypen entstehen (s. Abb. 12). Die Wahrscheinlichkeit für eine erneute Heterozygotie für beide Gene liegt bei 25 %; je 6,25 % der Jungtiere sind laut statistischer Wahrscheinlichkeit Wildtypen oder DKO.

Aus bisher neun TPC1/2^{+/-} Zuchtpaaren gingen insgesamt 136 Nachkommen hervor. Die jeweils erwartete Anzahl der Nachkommen mit Wildtyp oder DKO Genotyp lag damit bei 8,5 Tieren. Bis *dato* konnten 8 Wildtyp und 4 DKO Tiere genotypisiert werden. Der tatsächliche Anteil der Wildtyp-Nachkommen entspricht mit ca. 5,9 % in etwa dem erwarteten prozentualen Anteil von 6,25 %; der Anteil der DKO Jungtiere ist mit ca. 2,9 % hingegen deutlich geringer als statistisch zu erwarten wäre. (s. Abb. 27) Es deutet

sich also eine Genotypverschiebung zu Ungunsten des DKO Genotyps an, die sich möglicherweise nach Generierung weiterer Daten auch statistisch absichern lässt.

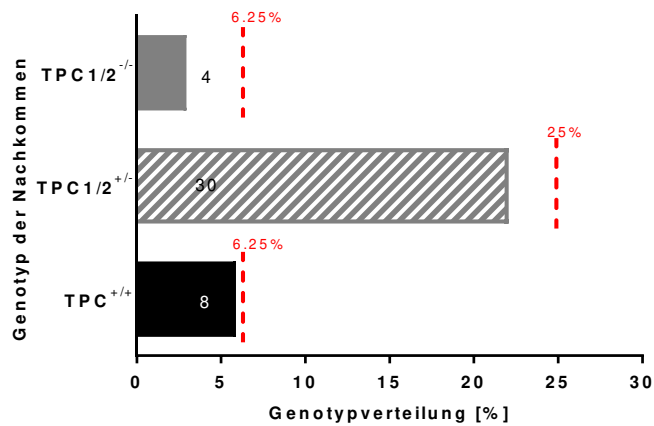


Abb. 27 Anteil verschiedener Genotypen von Nachkommen TPC1/2 heterozygoter Zuchtpaare.

Die Nachkommen aus TPC1/2 heterozygoten Zuchtpaaren wurden genotypisiert und der prozentuale Anteil der TPC^{+/+}, TPC1/2^{+/-} und TPC1^{-/-} Jungtiere berechnet und graphisch dargestellt. Die erwartete Verteilung der Genotypen nach den Mendelschen Regeln ist durch die rot gestrichelten Linien angedeutet (TPC1/2^{+/-}: 25 %; TPC1/2^{-/-} und TPC1/2^{+/+}: 6,25 %). In den Balken ist die absolute Zahl der Tiere, die für den jeweiligen Genotyp ermittelt wurde, angegeben. Sowohl Nachkommen mit dem Genotyp TPC1/2^{+/-} als auch TPC1/2^{-/-} Jungtiere scheinen innerhalb der Gesamtheit der Nachkommen unterrepräsentiert, nach Analyse der Daten mit Hilfe des Chi²-Tests ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der beobachteten und der erwarteten Verteilung der Genotypen.

6.1.5.4 Mortalitätsrate

In Abb. 28 ist zu sehen, dass 40 % der Nachkommen der TPC1/2^{+/-} Zuchtpaare während der ersten drei Wochen verstarben oder bereits bei der Geburt tot waren. Wie bereits unter 6.1.4.4 erwähnt, ist die Sterberate der mitgezüchteten TPC^{+/+} Mäuse mit 25,34 % allerdings relativ hoch. Dennoch liegt die Mortalitätsrate der TPC1/2 heterozygoten Nachkommen deutlich darüber. In diesem Zusammenhang muss nochmals darauf hingewiesen werden, dass bisher nur ein DKO Zuchtpaar in der Lage war, Nachkommen zu produzieren, wobei die Mortalitätsrate der Jungtiere aber bei 100 % lag. In weiteren Zuchtansätzen muss deshalb geprüft werden, ob es überhaupt möglich ist, Nachkommen aus TPC1/2 DKO Zuchtpaaren zu erhalten, die zu adulten Tieren heranwachsen.

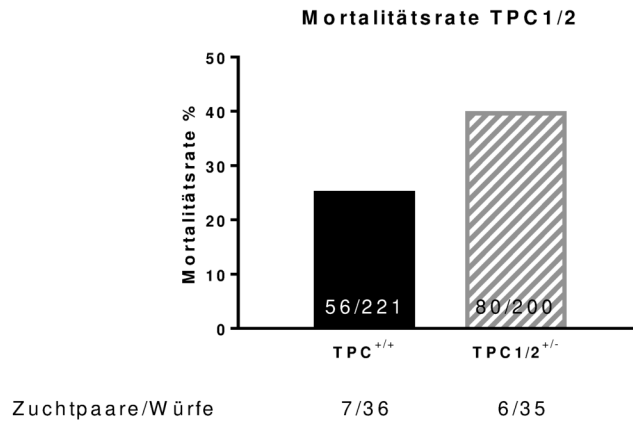


Abb. 28 Sterberate von Nachkommen aus Wildtyp Verpaarungen und TPC1/2 heterozygoter Zuchtpaare.

Aus der Gesamtzahl der Nachkommen von Wildtyp und TPC1/2 heterozygoten Zuchtpaaren und der Zahl der verstorbenen Jungtiere in den ersten drei Lebenswochen wurde die Mortalitätsrate für Nachkommen mit einem Wildtyp- bzw. TPC1/2 heterozygoten Genotyp berechnet. In den Säulen ist jeweils die Zahl der Nachkommen insgesamt und der toten Jungtiere angegeben. Unterhalb der Abbildung sind die Zahl der untersuchten Zuchtpaare sowie die Anzahl der daraus hervorgegangenen Würfe vermerkt.

6.2 Expression von TPC1 und TPC2 in peritonealen Zellen

Die *two-pore channel* Subtypen TPC1 und TPC2 werden ubiquitär in Geweben der Maus und der Ratte exprimiert (Calcraft et al., 2009; Zong et al., 2009). Da für die im Weiteren durchgeführten Versuche u. a. primäre murine Mastzellen aus dem Peritoneum und unterstützend auch die Basophilen-Zelllinie RBL-1 (Eccleston et al., 1973) aus der Ratte verwendet wurden, sollte zunächst die Expression von TPC1 in diesen Zellen auf Proteinebene mit Hilfe der Western Blot Technik verifiziert werden.

Das errechnete Molekulargewicht des murinen TPC1 liegt bei ca. 94 kDa (GenBank accession Nummer NM_145853.2). Typischerweise ist die immunoreaktive TPC1 Bande im Western Blot aber nicht als distinkte Bande bei ca. 94 kDa erkennbar, sondern zeigt einen charakteristischen „Schweif“, der auf die starke Glykolysierung des Proteins zurückzuführen ist (Hooper et al., 2011; Arndt et al., 2014). In den analysierten Zelllysaten der peritonealen Zellen und der RBL-1 Zellen konnte eine diese Beschreibung treffende Bande zwischen ca. 90 und 120 kDa mit Hilfe eines TPC1-spezifischen Antikörpers, der freundlicherweise von Prof. Norbert Klugbauer (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt wurde (Arndt et al., 2014), nachgewiesen werden (s. Abb. 29 A und B; Pfeilspitze).

Neben dem charakteristischen „Schweif“ der unterschiedlich stark glykosylierten TPC1-Proteine zwischen 100 und 120 kDa lässt sich in den Totallysaten der RBL-1 Zellen und der peritonealen Zellen aber auch eine einzelne Bande bei ca. 85 – 90 kDa erkennen (s.

Abb. 29 A und B; Pfeil). Diese Bande repräsentiert möglicherweise eine kürzlich identifizierte um ca. 70 Aminosäuren N-terminal verkürzte TPC1 Isoform (TPC1B), deren Transkription von einem alternativen Promotor im Exon 3 der TPC1-Gensequenz gesteuert wird (Ruas et al., 2014). Da der verwendete TPC1-Antikörper ein C-terminal lokalisiertes Epitop des TPC1 Proteins erkennt (Jan Castonguay, 2014), ist es theoretisch möglich, beide TPC1 Isoformen im Western Blot zu detektieren.

Die genetische Deletion von TPC1 in der für diese Arbeit verwendeten Mauslinie konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten (Arndt, 2012; Arndt et al., 2014; Ruas et al., 2014) bestätigt werden. Diese erfolgreiche genetische Deletion des TPC1 konnte im Rahmen dieser Arbeit auch für peritoneale Zellen bestätigt werden (s. Abb. 29 A). Um die Beladung der einzelnen Spuren der SDS-Gele mit gleichen Proteinmengen zu verifizieren, wurde für die hier durchgeführten Western-Blot Analysen folgende Vorgehensweise gewählt: Neben dem TPC1 Antikörper wurde auch ein gegen murines Aktin gerichteter Antikörper eingesetzt, der dieses Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa zuverlässig detektiert. Da das Strukturprotein Aktin ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts ist und in allen Zelltypen exprimiert wird (Carpenter, 2000), eignet es sich als aussagekräftige Kontrolle zur Überprüfung der gleichmäßigen Proteinbeladung der einzelnen Gel-Slots. In dem hier exemplarisch abgebildeten Western Blot ist zu erkennen, dass sowohl in den Lysaten der TPC1^{+/+} als auch der TPC1^{-/-} Zellen ein immunreaktives Signal des Aktin-Antikörpers im Bereich des erwarteten Molekulargewichts detektiert werden konnte (s. Abb. 29 A). Dabei fällt auf, dass die Intensität der Aktin-Bande in den Lysaten der peritonealen Zellen aus TPC1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den Lysaten der TPC1^{+/+} Zellen sogar stärker ist (Abb. 29 A), was darauf hindeutet, dass die Proteinkonzentration im TPC1^{-/-} Zelllysat höher ist als in den Lysaten der TPC1^{+/+} Zellen.

Insgesamt bestätigten die Ergebnisse der fehlenden Immunreaktivität in den TPC1^{-/-} Zelllysaten zum einen die Spezifität des TPC1-Antikörpers; zudem qualifizierten die Befunde die verwendete TPC1^{-/-}-Mauslinie als geeignetes „Werkzeug“ zur Charakterisierung der physiologischen Rolle des TPC1 für die Degranulation von Mastzellen.

Die Vorläufer vieler Immunzellen, sogenannte hämatopoetische Stammzellen, werden im Knochenmark gebildet (Zhao et al., 2012). Infolgedessen wurde die Expression von TPC1 auch in Zellen aus dem Knochenmark von TPC1^{+/+} Mäusen untersucht. Auch in Lysaten dieser Zellen konnte TPC1 durch den Einsatz des spezifischen anti-TPC1 Antikörpers nachgewiesen werden (s. Abb. 29 C); Die charakteristische immunreaktive TPC1-Bande erstreckt sich in den Lysaten der Knochenmarkszellen über einen Bereich von ca. 100 – 130 kDa, erscheint aber im Vergleich zum Signal des TPC1-Antikörpers

in den Lysaten der peritonealen Zellen deutlich schwächer ausgeprägt. Dieser Unterschied in der Immunreaktivität wird besonders deutlich, wenn man zusätzlich die Intensitäten der Aktin-Banden in der Ladekontrolle vergleicht: Während die immunoreaktive Aktin-Bande in den Lysaten der peritonealen Zellen bei einem gleichzeitig starken Signal des TPC1-Antikörpers nur schwach erkennbar ist, konnte in den Lysaten der Knochenmarkszellen bei einem starken Aktin-Signal nur eine schwache TPC1-Bande detektiert werden. Inwieweit sich die Expressionsstärke von TPC1 in den peritonealen Zellen und deren hämatopoetischen Vorläuferzellen tatsächlich unterscheidet, bleibt jedoch noch zu klären.

In den Lysaten von Knochenmarkszellen, die aus TPC1^{-/-} Mäusen isoliert wurden, konnte mit dem TPC1-spezifischen Antikörper keine Bande detektiert werden (s. Abb. 29 C), wodurch erneut die Spezifität des Antikörpers demonstriert und die genetische Deletion von TPC1 auch in Zellen des Knochenmarks bestätigt werden konnte. Auch in den Lysaten der Knochenmarkszellen von TPC1^{-/-} Mäusen konnte durch den Einsatz des spezifischen Antikörpers das Zytoskelett-Protein Aktin als Ladekontrolle nachgewiesen und somit eine gleichmäßige Beladung des SDS-Gels bestätigt werden.

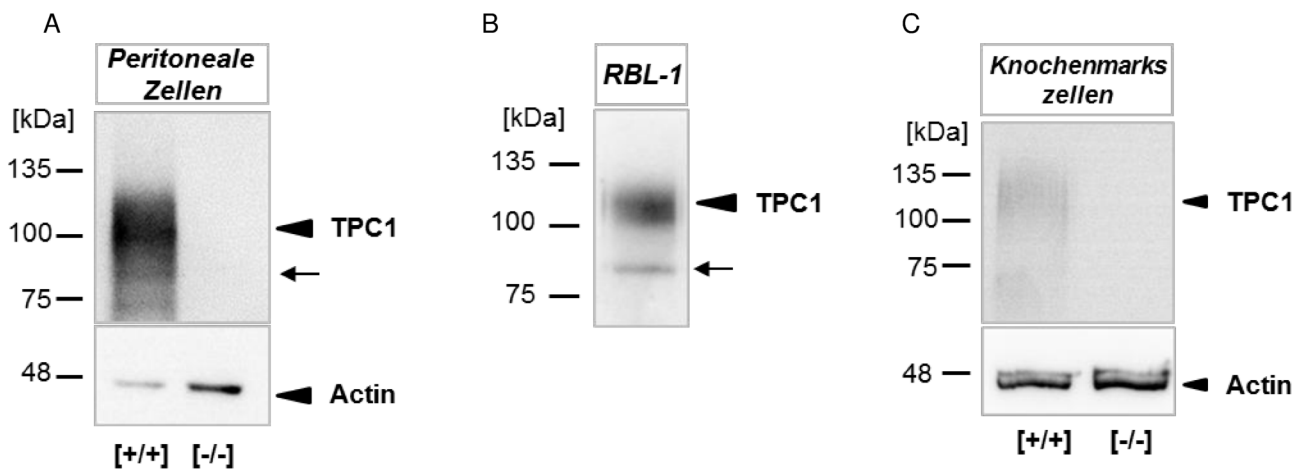


Abb. 29 Nachweis der Expression des TPC1 in Lysaten peritonealer Zellen, Knochenmarkszellen und RBL-1 Zellen mit Hilfe der Western Blot Technik.

Zellen aus dem Peritoneum (A) und dem Knochenmark (C) von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mäusen sowie Zellen der Mastzell-ähnlichen Zelllinie RBL-1 (B) wurden lysiert und die Lysate mittels SDS-Page aufgetrennt. Mit Hilfe der Western Blot Technik wurden alle enthaltenen Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und TPC1 sowie Aktin (als Ladekontrolle) durch spezifische Primärantikörper und HRP-gekoppelte Sekundärantikörper über eine Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht. Durch den Einsatz eines TPC1-spezifischen Antikörpers konnte in beiden Zellpräparaten aus TPC1^{+/+} Mäusen und in RBL-1-Lysaten eine charakteristische nicht klar abgegrenzte Bande detektiert werden, die sich insgesamt über einen Molekulargewichtsbereich von 90 bis 120 kDa hinzieht (A-C), und die in den Lysaten der TPC1^{-/-}-Zellen nicht erkennbar ist (A und C). Um die gleichmäßige Protein-Beladung der einzelnen Spuren der SDS-Gele zu überprüfen, wurde ein spezifischer Antikörper gegen Aktin verwendet. In den Lysaten der peritonealen Zellen (A) und Knochenmarkszellen (C) aus TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mäusen sind immunoreaktive Banden auf einer Höhe von ca. 45 kDa zu erkennen, was in etwa dem errechneten Molekulargewicht von Aktin entspricht. Die Intensität der Aktin-Bande im Lysat der peritonealen Zellen aus TPC1-defizienten Zellen ist dabei im Vergleich zu der entsprechenden TPC1^{+/+} Aktin-Bande etwas stärker (A). Links des jeweiligen Western Blots ist der parallel aufgetragene Proteinmarker in kDa dargestellt.

Um die Expression des TPC2 in peritonealen Zellen zu analysieren, wurde ebenfalls ein Subtyp-spezifischer polyklonaler Antikörper verwendet, der freundlicherweise von PD Dr. Dr. Christian Grimm (Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians Universität, München) zur Verfügung gestellt wurde (Hassan, 2014). Da der TPC2-Antikörper im Western Blot trotz verschiedener Standardisierungsversuche keine spezifische Immunreaktivität in den eingesetzten Totallysaten von peritonealen Zellen zeigte (Daten nicht gezeigt), wurde für den Nachweis von TPC2 die Methode der Immunzytochemie gewählt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus vor allem auf peritoneale Mastzellen als Modellsystem für die Ca^{2+} -regulierte Exozytose gelegt. Mastzellen können, wie bereits beschrieben (s. 5.3), neben anderen Zellen durch eine Spülung der Bauchhöhle aus dem Peritoneum isoliert werden. Da Mastzellen allerdings nur einen geringen Anteil an der gesamten peritonealen Zell-Lavage ausmachen (ca. 2 – 5 %) (Malbec et al., 2007), war es nötig, diese durch einen Sortiervorgang mit Hilfe von magnetischen Kügelchen (*beads*), an die ein Antikörper gegen das Mastzell-spezifische Oberflächenantigen CD117 gekoppelt wurde (Neu et al., 1996), im Vorfeld der Immunzytochemie anzureichern.

Nach Fixierung der aus Wildtyp und $\text{TPC2}^{-/-}$ Mäusen isolierten Mastzellen wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen blockiert, um die Zellen im nächsten Schritt mit den primären Antikörpern zu inkubieren. Anschließend wurden die entsprechenden Spezies-spezifischen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper eingesetzt, um die Bindung der Primärantikörper nachzuweisen; zudem wurde eine DAPI-Färbung zur Markierung der Zellkerne durchgeführt. In Abb. 30 sind Phasenkontrast- (A und E) und Fluoreszenzaufnahmen (B - D; F - H) je einer exemplarischen $\text{TPC2}^{+/+}$ und $\text{TPC2}^{-/-}$ Mastzelle dargestellt: Die typische Morphologie der Mastzellen, die sich vor allem durch die im Zytosol dicht gepackten Granula auszeichnet (Yong, 1997), lässt sich in den Phasenkontrastaufnahmen der fixierten Mastzellen leider nur sehr schwer erkennen (Abb. 30 A und E). Das DAPI-Signal (Abb. 30 B und F) in den Zellkernen der Mastzellen ist relativ unscharf, da der Fokus für die Aufnahmen der Fluoreszenzsignale auf die rote und grüne Fluoreszenzmarkierung eingestellt wurde. Zum Nachweis der Bindung des TPC2-Antikörpers wurde ein FITC-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet, dessen Signal mit Hilfe des grünen Fluoreszenzkanals (Wellenlänge ca. 510 bis 550 nm) detektiert werden konnte. In der $\text{TPC2}^{+/+}$ Mastzelle ist ein grünes Fluoreszenzsignal an der Plasmamembran (Pfeil) und zusätzlich im Inneren der Zelle (Pfeilspitze) zu erkennen (Abb. 30 D). Die Immunreaktivität scheint dabei in beiden Bereichen auf vesikuläre Strukturen beschränkt zu sein. In der $\text{TPC2}^{-/-}$ Mastzelle konnte keine immunoreaktive Markierung des TPC2-Antikörpers detektiert werden (Abb. 30 H), was die Spezifität des

Antikörpers und damit den positiven Nachweis der Expression des TPC2 in Mastzellen bestätigt.

Zusätzlich zu dem anti-TPC2 Antikörper wurde ein anti-Histamin Antikörper in Kombination mit einem Spezies-spezifischen Sekundärantikörper mit einem roten Fluorochrom (A546) verwendet, um so zu bestimmen, ob die Lokalisation von TPC2 in Mastzellen auf das endo-lysosomale System beschränkt ist, oder ob die in den Mastzellen erkennbaren TPC2-positiven Strukturen auch mit Lysosom-verwandten, mit Histamin gefüllten, sekretorischen Granula übereinstimmen. Tatsächlich konnte an der Plasmamembran, jedoch nicht im Inneren der TPC2^{+/+} Mastzelle ein Signal des Histamin-Antikörper mit Hilfe des roten Fluoreszenzkanals (Wellenlänge ab 590 nm) nachgewiesen werden (Abb. 30 C; Pfeil), sodass im Bereich der Plasmamembran eine Lokalisation von TPC2 in der Membran von Histamin-gefüllten Granula vorstellbar wäre. Die in den TPC2^{+/+} Mastzellen detektierte Fluoreszenzmarkierung des Histamin-Antikörpers konnte ebenso in TPC2^{-/-} Mastzellen dokumentiert werden.

TPC2 scheint also in vesikulären Strukturen in Mastzellen exprimiert zu sein und weist zudem offenbar eine partiell übereinstimmende Lokalisation mit dem in den granulären Vesikeln gespeichertem Immunmediator Histamin auf.

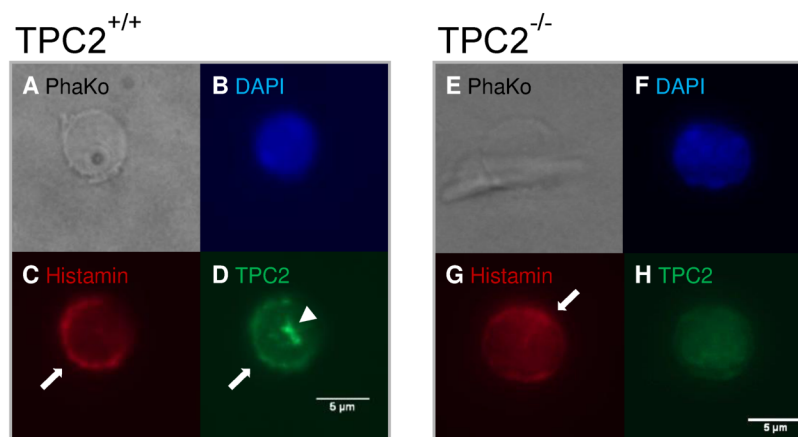


Abb. 30 Immunocytochemischer Nachweis des TPC2 in isolierten peritonealen Mastzellen. Nach Isolation der Mastzellen aus der peritonealen Lavage von TPC2^{+/+} und TPC2^{-/-} Mäusen mit Hilfe der *magnetic-activated cell sorting* (MACS)-Technik wurden die Mastzellen mit Methanol fixiert und mit spezifischen Primärantikörpern gegen Histamin und zusätzlich TPC2 inkubiert. Um die gebundenen primären Antikörper zu detektieren, wurden Spezies-spezifische Sekundärantikörper verwendet, an die unterschiedliche Fluorochrome gekoppelt waren (Histamin: anti-rat-A546; TPC2: anti-rabbit-FITC). Zur Kernfärbung wurde der nach UV-Anregung blau fluoreszierende, DNA-bindende Farbstoff DAPI verwendet (B und F). Gezeigt sind Phasenkontrast (PhaKo) (A und E) und Fluoreszenzaufnahmen exemplarischer TPC2^{+/+} (links) und TPC2^{-/-} (rechts) Mastzellen. Vergleichbare Signale konnten in sechs bzw. vier weiteren Zellen beobachtet werden. Der Immunmediator Histamin ist sowohl in TPC2^{+/+} (C) als auch in TPC2^{-/-} (G) vor allem nahe der Plasmamembran nachzuweisen (Pfeil). Die Fluoreszenzmarkierung des anti-TPC2 Antikörpers ist in TPC2^{+/+} Mastzellen ebenfalls an der Plasmamembran (Pfeil) zu erkennen; zusätzlich sind Fluoreszenzsignale in vesikulären Strukturen im Zellinneren zu sehen (Pfeilspitze) (D). In TPC2^{-/-} Mastzellen konnte kein immunoreaktives Signal des TPC2-Antikörpers detektiert werden (H).

6.3 Auswirkungen der genetischen Deletion des TPC1 auf den immunologischen Phänotyp von Mäusen

Mastzellen lassen sich relativ einfach durch eine Spülung (Lavage) des Peritoneums gewinnen. Bei der Anwendung dieses Verfahrens erhält man allerdings eine Mischkultur aus verschiedenen Zelltypen, die vor allem aus Immunzellen, wie T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Granulozyten (z. B. Neutrophilen), besteht.

Um zu überprüfen, ob eine Defizienz für TPC1 sich auf den prozentualen Anteil der verschiedenen Immunzelltypen auswirkt, wurde der jeweilige prozentuale Anteil an T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Neutrophile und Mastzellen in der peritonealen Lavage von TPC1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu TPC1^{+/+} Mäusen bestimmt.

In Abb. 31 ist ein beispielhafter *Dot-Plot* gezeigt, der die analysierten peritonealen Zellen, abhängig von ihrer Größe (*Forward Scatter*) und Granularität (*Side Scatter*), darstellt. Tote Zellen sind mit einem roten quadratischen Rahmen markiert und wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen, da sie oftmals unspezifisch Antikörper binden (Perfetto et al., 2004). Zellen mit einem niedrigen *Forward Scatter*-Wert, also einer geringen relativen Größe, wie zum Beispiel T-Zellen und nicht aktivierte B-Zellen, sind in Abb. 31 durch eine grüne elliptische Markierung begrenzt dargestellt. Darüber liegt eine weitere, leicht identifizierbare Zellpopulation, die aus größeren Zellen wie Makrophagen und Mastzellen besteht, die sich durch einen durchschnittlich höheren *Forward Scatter*- und *Side Scatter*-Wert auszeichnen; diese Zellgruppe ist durch eine blaue Markierung gekennzeichnet.

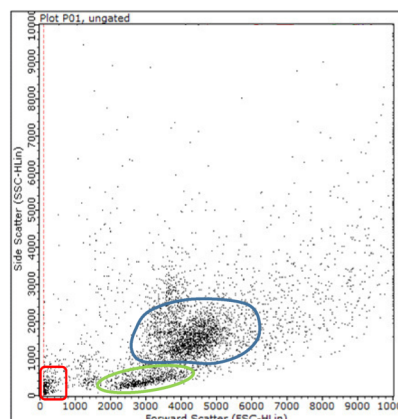


Abb. 31 Beispiel eines *Dot plots* zur Darstellung unterschiedlicher Zellpopulationen nach Durchflusszytometrie einer peritonealen Lavage.

Durch die Durchflusszytometrie können Zellen anhand ihrer Lichtstreuung hinsichtlich ihrer Größe (*Forward Scatter*, *FSC*) und Granularität (*Side Scatter*, *SSC*) analysiert werden. In einem *Dot plot* werden die ermittelten Werte der erfassten Parameter *FSC* und *SSC* für jede Zelle gegeneinander aufgetragen. So lassen sich in einem Gemisch aus Zellen verschiedene Populationen sichtbar machen: Auf Grund des Strukturverlusts sind tote Zellen als kleine Population am unteren Ende der Skala beider erfasster Parameter zu finden (roter Rahmen). Die Population der kleineren T-Zellen und B-Zellen ist mit einer grünen Ellipse hervorgehoben, die der größeren Zellen (Makrophagen, Mastzellen, Granulozyten) ist mit einer blauen Markierung gekennzeichnet.

Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen Zelltyp-spezifische Oberflächenantigene konnten die verschiedenen immunologischen Zelltypen in der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) auch konkret identifiziert werden. Um dabei aber zwischen unspezifischen Hintergrundsignalen und spezifischen Markierungen der verwendeten Antikörper zu unterscheiden, wurde zusätzlich ein Kontroll-Antikörper des selben Isotyps (Isotypkontrolle) eingesetzt, der die gleiche Fluorochrommarkierung aufwies wie der Zelltyp-spezifische Antikörper (Hulspas et al., 2009). Zur Analyse der jeweiligen prozentualen Verteilung der einzelnen Zelltypen wurde zunächst die Gesamtzahl der lebenden Zellen bestimmt; anschließend wurde die Zahl der fluoreszenzmarkierten Zellen in der der jeweiligen Zellgröße entsprechenden Population (s. Abb. 31) determiniert und in Relation zur Gesamtzellzahl gesetzt. In Abb. 32 sind exemplarische Histogramme für peritoneale Zellen aus TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mäusen gezeigt, die die Zellzahl (innerhalb der Populationen) in Abhängigkeit von der Stärke des Fluoreszenzsignals darstellen (ausgefüllte Bereiche im Histogramm). Die entsprechende Immunglobulin-Isotypkontrolle ist jeweils als unausgefüllter Bereich zu sehen. In den Histogrammen ist jeweils der nicht markierte Teil (erstes Maximum) der untersuchten Teilpopulation deutlich von den Fluoreszenz-markierten Zellen (zweites Maximum) zu unterscheiden. Für die Analyse der Anzahl der B-Zellen wurde die Zahl der Fluoreszenz-markierten Zellen in beiden Größenpopulationen miteinbezogen, da die Größe von B-Zellen, je nach Aktivierungsstatus, variiert (Monroe und Cambier, 1983; Hat et al., 2011), und sie somit in beiden Populationen zu finden sind.

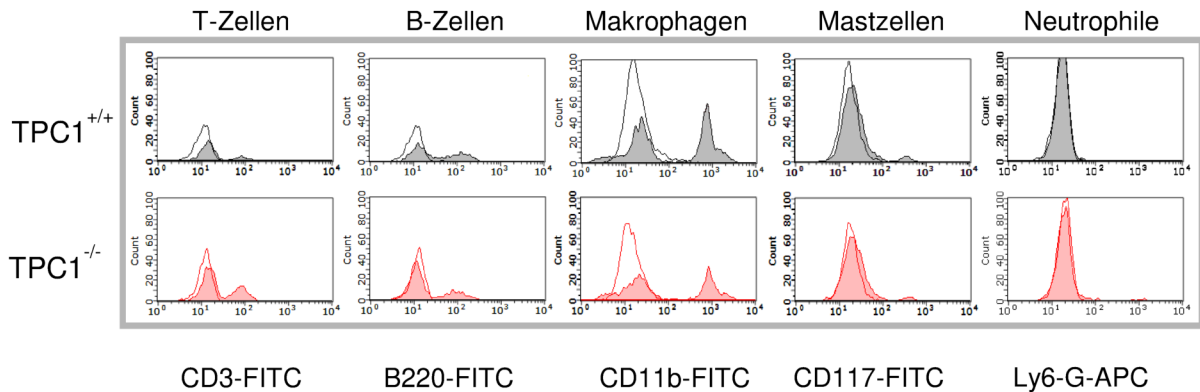


Abb. 32 Exemplarische Histogramme nach Durchflusszytometrie einer peritonealen Lavage.

Für jeden untersuchten Zelltyp (T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Mastzellen und Neutrophile) aus der peritonealen Lavage von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mäusen ist ein exemplarisches Histogramm abgebildet. Die zur Identifizierung des jeweiligen Zelltyps eingesetzten Fluoreszenzgekoppelten Antikörper sind jeweils unterhalb der Histogramme angegeben. Auf der X-Achse ist die gemessene Fluoreszenzintensität aufgetragen; auf der Y-Achse lässt sich die zugehörige Anzahl der Zellen ablesen. In den Histogrammen lassen sich jeweils zwei Populationen auf Grund der Fluoreszenzsignalstärke unterscheiden (gefüllte Bereiche). Lediglich die Population der fluoreszenz-markierten Neutrophilen ist auf Grund der geringen Zellzahl kaum zu erkennen. Das Histogramm der entsprechenden Immunglobulin-Isotypkontrolle ist als nicht gefüllter Bereich dargestellt.

In Tabelle 10 sind die resultierenden durchschnittlichen prozentualen Anteile der analysierten Zelltypen in der peritonealen Lavage von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mäusen aufgelistet. Der Anteil der T-Zellen (ca. 6,5 % für TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-}), der B-Zellen (ca. 27 % bzw. 29 %) und der Neutrophilen (ca. 1,3 % bzw. 1,9 %) ist bei beiden Genotypen in etwa gleich. Die Zahl der Makrophagen hingegen scheint mit einem Anteil von ca. 30 % an der peritonealen Zell-Lavage von TPC1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu TPC1^{+/+} Mäusen mit einem Anteil von ca. 40 % reduziert zu sein. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Anteil der Mastzellen bei gesunden Tieren in einer peritonealen Lavage etwa 2-5 % ausmacht (Malbec et al., 2007). Damit übereinstimmend wurden in der Lavage aus für diese Arbeit untersuchten TPC1^{+/+} Kontrolltieren ca. 4,8 % der Zellen als Mastzellen identifiziert. Der Anteil der Mastzellen in der peritonealen Lavage von TPC1^{-/-} Mäusen lag dagegen bei nur etwa 2 % und unterscheidet sich somit signifikant ($p=0,006$) vom Wildtyp.

Tabelle 10 Prozentualer Anteil verschiedener Immunzelltypen in der peritonealen Lavage von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mäusen.

Mit Hilfe Fluoreszenz-markierter Antikörper gegen Zelltyp-spezifische Oberflächenantigene wurde der Anteil bestimmter Immunzelltypen an der peritonealen Zell-Lavage von Wildtyp und TPC1-defizienten Mäusen in einer FACS-Analyse bestimmt. Dabei wurden zunächst die Gesamtzellzahl und die Zahl der in der jeweiligen Probe enthaltenen Zellen mit einer Fluoreszenz-Markierung ermittelt. Aus den erhaltenen Werten wurde schließlich der prozentuale Anteil der einzelnen Immunzelltypen an der gesamten peritonealen Lavage berechnet. Die Durchführung eines zweiseitigen ungepaarten T-tests ergab, dass der prozentuale Anteil der TPC1^{-/-} Mastzellen im Vergleich zu TPC1^{+/+} Mastzellen signifikant ($p=0,006$) geringer ist. In der rechten Spalte „n“ ist

Ergebnisse

die Zahl der mit den entsprechenden Antikörpern untersuchten Zellpräparationen aus TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mäusen angegeben.

Zelltyp	Zellanteil [%]		n
	TPC1 ^{+/+}	TPC1 ^{-/-}	
T-Zellen	6.51 ± 1.43	6.47 ± 1.06	6
B-Zellen	26.69 ± 4.00	29.23 ± 2.84	5
Makrophagen	40.64 ± 6.21	30.38 ± 2.38	6
Mastzellen	4.78 ± 0.73	2.01 ± 0.27 **	6
Neutrophile	1.32 ± 0.23	1.92 ± 0.37	3

Die nach Durchführung der Durchflusszytometrie erhaltenen Befunde deuten darauf hin, dass die Expression von TPC1 sich auf Prozesse auswirkt, die die Zahl der Mastzellen im Peritoneum bestimmen. Dazu zählen beispielsweise die Zelldifferenzierung von Mastzell-Vorläuferzellen zu reifen Mastzellen und/oder die Migration der Mastzellen in das Peritoneum (Dahlin und Hallgren, 2015).

6.4 Morphologie von Wildtyp und TPC1 KO Mastzellen

6.4.1 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Die Expression von TPC1 scheint einen Einfluss auf die Anzahl der Mastzellen im murinen Peritoneum zu haben (s. Tabelle 10). Um beurteilen zu können, ob neben dem prozentualen Anteil an der peritonealen Zell-Lavage auch die Morphologie der Mastzellen von der TPC1-Defizienz betroffen ist, wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Wennemuth vom Universitätsklinikum Essen (Institut für Anatomie) peritoneale Mastzellen aus TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mäusen mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. In Abb. 33 sind exemplarische Mastzellen aus Mäusen beider Genotypen dargestellt. Die Mastzellen lassen sich durch ihre eindeutige Morphologie gut von den anderen in der peritonealen Lavage enthaltenen Zellen unterscheiden: Sie sind mit elektronendichten sekretorischen Granula gefüllt, die Immunmediatoren wie Histamin oder Serotonin enthalten und vorgeformt in der Zelle vorliegen (Yong, 1997).

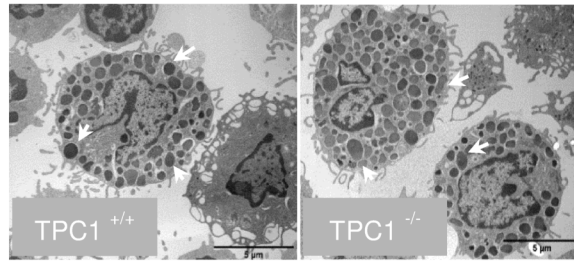


Abb. 33 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen.

Peritoneale Mastzellen von TPC1^{+/+} (links) und TPC1^{-/-} (rechts) Mastzellen wurden nach der Isolation mit Glutaraldehyd fixiert und zur Kontrastverstärkung mit Methylenblau gefärbt. Die elektronendichten sekretorischen Granula sind über die ganze Zelle verteilt und gut erkennbar (weiße Pfeile).

Um die Morphologie von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen zu vergleichen, wurden verschiedene Zell-spezifische Parameter von jeweils 20 Zellen pro Genotyp bestimmt. Da die sekretorischen Granula das charakterisierende Merkmal von Mastzellen sind, wurde zudem deren Anzahl, Größe und Dichte sowie deren flächenmäßiger Anteil an der Zelle ermittelt. Des Weiteren wurde die Gesamtgröße der Mastzellen bestimmt. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Die Anzahl der Vesikel und deren Größe sind in Mastzellen beider Genotypen vergleichbar. Ebenso verhält es sich mit dem flächenmäßigen Anteil der Vesikel an der gesamten Zelle und damit der Vesikeldichte. Die Zellgröße der TPC1^{-/-} Mastzellen ist aber gegenüber Mastzellen von Wildtyp-Tieren signifikant ($p=0,047$) reduziert (s. Tabelle 11, erste Spalte).

Tabelle 11 Erfasste Parameter zur Morphologie von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen.

Anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden 20 peritoneale Mastzellen von je zwei TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mäusen mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogrammes ImageJ vermessen. Dazu wurde die Fläche der Zellen sowie die Vesikelanzahl und deren mittlere Größe bestimmt. Aus den erhaltenen Messwerten wurden weitere Vergleichsparameter, wie der mittlere flächenmäßige Anteil der Vesikel an der ganzen Zelle und die durchschnittliche Vesikeldichte berechnet. Lediglich die Zellgröße der peritonealen Mastzellen aus TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mäusen unterschied sich signifikant ($p=0,047$).

	TPC1 ^{+/+}	TPC1 ^{-/-}
Zellgröße [μm^2]	58.21 ± 2.70	51.96 ± 1.43 *
Vesikelanzahl	65.29 ± 3.28	63.86 ± 3.22
Vesikelgröße [μm^2]	0.30 ± 0.01	0.29 ± 0.01
Vesikel/Zelle [%]	34.89 ± 2.10	35.44 ± 1.78
Vesikeldichte [Vesikel/ μm^2]	1.16 ± 0.07	1.24 ± 0.07

6.4.2 Einfluss von TPC1 auf den pH-Wert in sauren Organellen

Die Organellen des endo-lysosomalen Systems, vor allem Lysosomen, sind durch einen sehr niedrigen pH-Wert gekennzeichnet (Turk und Turk, 2009). Um dieses saure Milieu, das für die Aktivität vieler lysosomaler Enzyme notwendig ist, aufrechtzuerhalten, werden Protonen unter Energie-Verbrauch mit Hilfe der V-Typ-ATPase in das Lumen der sauren Organellen gepumpt (Mellman et al., 1986). Veränderungen des pH-Werts in den sauren Kompartimenten der Zelle, können einen Einfluss auf deren Funktionen haben. So wird z. B. angenommen, dass ein Zusammenhang zwischen dem pH-Wert und der Ca^{2+} -Konzentration in Lysosomen besteht (Christensen et al., 2002). Da die TPCs als Ca^{2+} -leitende Ionenkanäle im endo-lysosomalen System der Zelle lokalisiert sind, wurde mittels Lyotracker-Färbung untersucht, ob sich die Defizienz für TPC1 in peritonealen Mastzellen auf die Acidität der sauren Organellen auswirkt. Da der Fluoreszenzfarbstoff LysoTracker Red in Vesikeln mit saurem pH-Wert akkumuliert, können diese intrazellulären Vesikel spezifisch detektiert werden (Chazotte, 2011). Um die Fluoreszenzintensität in den Mastzellen nach Lyotracker-Färbung zu bestimmen, wurden mit Hilfe des Konfokalmikroskops Zeiss 880 Airy Scan Z-Stapel von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen aufgenommen, aus denen anschließend durch Projektion der Einzelbilder in eine Ebene je ein Gesamtbild generiert wurde. In dieser Projektion wurde die Fluoreszenzintensität der gesamten Zelle bestimmt, von der wiederum die Hintergrundfluoreszenz abgezogen wurde. Der erhaltenen Wert wird dabei als *corrected total cell fluorescence*, abgekürzt CTCF (McCloy et al., 2014) bezeichnet. In Abb. 34 A sind für beide Genotypen exemplarische Aufnahmen von mit Lyotracker gefärbten Mastzellen gezeigt. Die Lokalisation des Fluoreszenzfarbstoffs in den sauren Organellen ist in den Zellen beider Genotypen deutlich erkennbar, erscheint aber in den TPC1^{-/-} Mastzellen eine wesentlich höhere Intensität aufzuweisen. Eine verstärkte Akkumulation von LysoTracker Red in den TPC1-defizienten sauren Organellen würde auf einen niedrigeren pH-Wert hinweisen. Eine Quantifizierung der LysoTracker Red-Fluoreszenzintensität von 4 TPC1^{+/+} und 5 TPC1^{-/-} Mastzellen bestätigte diesen visuellen Eindruck: Die durchschnittliche nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz erhaltene Gesamtfluoreszenz (CTCF) ist in TPC1^{-/-} Mastzellen signifikant ($p=0,0065$) höher als in gleich behandelten TPC1^{+/+} Mastzellen (s. Abb. 34 B). Da der verwendete Fluoreszenzfarbstoff LysoTracker Red jedoch kein ratiometrischer Farbstoff ist (Guha et al., 2014), hängt die gemessene Fluoreszenzintensität von der initialen Beladung der Zellen mit dem Farbstoff ab; zudem können nur sehr große pH-Unterschiede mit diesem Farbstoff detektiert werden (Guha et al., 2014). Das deutlich stärkere LysoTracker Red-Fluoreszenzsignal in TPC1^{-/-} Mastzellen kann also lediglich als Hinweis auf einen reduzierten pH-Wert in den sauren Organellen der TPC1-defizienten Mastzellen

gewertet werden. Um eine quantitative Aussage über die Acidität der Vesikel in den TPC1^{-/-} Mastzellen zu treffen, sollten weitere Versuchsreihen mit ratiometrischen pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen (Canton und Grinstein, 2015) durchgeführt werden.

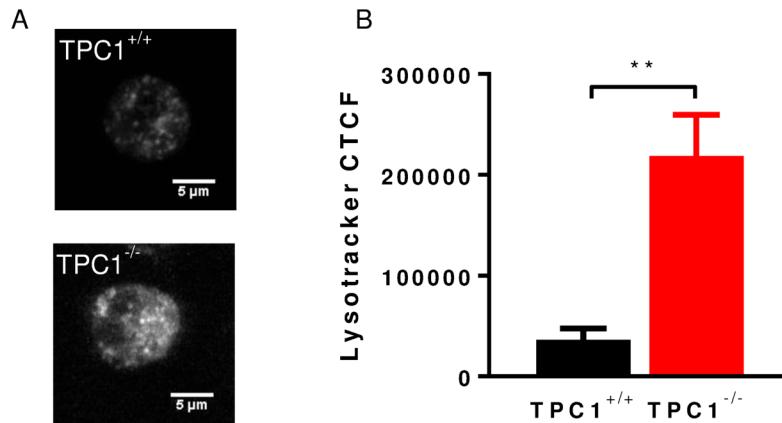


Abb. 34 LysoTracker Red Färbung von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen.

Peritoneale Mastzellen wurden für 2 h mit LysoTracker Red bei 37 °C inkubiert und die Färbung mit einem Konfokalmikroskop (Zeiss 880 Airy Scan) als Z-Stapel aufgenommen. **A** Die Einzelbilder aus den Z-Stapeln wurden in eine Ebene projiziert, um das gesamte Fluoreszenzsignal der Zellen zu erhalten. Abgebildet sind exemplarische TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen. **B** Die korrigierte Fluoreszenzintensität der gesamten Zelle (*corrected total cell fluorescence* = CTCF) wurde mit Hilfe von Image J bestimmt. Es wurden 4 TPC1^{+/+} und 5 TPC1^{-/-} Mastzellen analysiert und für jeden Genotyp die durchschnittliche CTCF berechnet. Die statistische Auswertung der Datensätze ergab, dass die durchschnittliche CTCF für TPC1^{-/-} Mastzellen signifikant ($p=0,0065$) größer war als für TPC1^{+/+} Mastzellen.

6.5 Kapazitätsmessungen

In Mastzellen werden viele in Vesikeln gespeicherte immunologisch wirksame Botenstoffe über Ca²⁺-regulierte Exozytose freigesetzt (Degranulation) (da Silva et al., 2014). Der Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ist dabei eine essentielle Voraussetzung für die Verschmelzung der Vesikel mit der Plasmamembran (Hay, 2007). Da die Mitglieder der TPC-Familie Ca²⁺-leitende Ionenkanäle darstellen (Zhu et al., 2010a; Zhu et al., 2010b), stellte sich die Frage, ob durch die Defizienz für einen oder beide TPC-Subtypen die Ca²⁺-abhängige Degranulation in Mastzellen beeinträchtigt wird. Um das Ausmaß der Degranulation quantitativ zu erfassen, wurden Kapazitätsmessungen im *whole-cell* Modus an Wildtyp und TPC1^{-/-}, TPC2^{-/-} und DKO Mastzellen durchgeführt. Dabei macht man sich zu Nutze, dass die Plasmamembran einer Zelle Ladungen trennt, und sich somit wie ein Kondensator verhält; die Kapazität (gemessen in [pF]) dieses „Lipid“-Kondensators ist dabei proportional zur Zellgröße. (Neher und Marty, 1982) Wenn also während der Degranulation von Mastzellen Vesikel mit der Plasmamembran fusionieren, nimmt die Zellgröße und somit die Kapazität zu.

Abhängig vom Ausmaß der Kapazitätsänderung über die Zeit kann auf die Stärke der Degranulationsreaktion einer Mastzelle geschlossen werden.

6.5.1 Maximale Stimulierung der Exozytose in Mastzellen mittels GTP γ S

Zunächst sollte untersucht werden, ob es einen quantitativen Unterschied in der Degranulationsreaktion von Wildtyp und TPC1-defizienten Mastzellen gibt. Ein nicht-hydrolysierbares Analog von GTP, GTP γ S, wurde als Stimulus eingesetzt, der eine starke Degranulationsreaktion auslöst (Neher, 1988). Da GTP γ S nicht membrangängig ist, wurde es über die Patch-Pipette appliziert, sodass es direkt in das Zytosol der Zelle gelangt und ohne zeitliche Verzögerung eine Aktivierung von G-Protein-abhängigen Prozessen auslöst, die schließlich zur Degranulation der Mastzellen führen (Neher, 1988; Pundir und Kulka, 2010).

6.5.1.1 Kapazitätzunahme der TPC1 Mastzellen

Im ersten Schritt wurde die basale, ohne Stimulierung mit GTP γ S registrierbare, Kapazität von Wildtyp TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} peritonealen Mastzellen im *whole-cell* Modus bestimmt. Wie in Abb. 35 dargestellt, ergaben die gemittelten Kapazitätswerte von insgesamt 23 TPC1^{+/+} Mastzellen bzw. 26 TPC1^{-/-} Mastzellen eine basale Kapazität von $5,12 \pm 0,25$ pF für TPC1^{+/+} Mastzellen, während diese für TPC1^{-/-} Mastzellen bei $4,33 \pm 0,23$ pF lag. Die statistische Auswertung zeigte, dass sich die ermittelten basalen Kapazitätswerte von Mastzellen beider Genotypen signifikant ($p=0,02$) voneinander unterscheiden. Zudem bestätigt dieser elektrophysiologische Ansatz die bereits bei der elektronenmikroskopischen Charakterisierung der Morphologie der Mastzellen beider Genotypen festgestellte reduzierte Zellgröße von TPC1^{-/-} Mastzellen (s. 6.4.1).

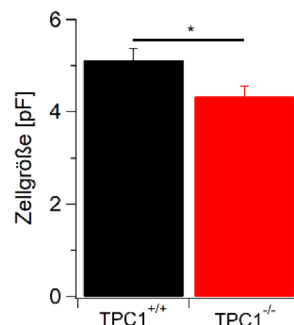


Abb. 35 Elektrophysiologische Kapazitätsmessungen zur Bestimmung der Zellgröße von Wildtyp und TPC1^{-/-} Mastzellen im Ruhezustand.

Die Kapazität von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen wurde mit Hilfe der Patch Clamp Technik im *whole-cell* Modus unter Verwendung eines HEKA Verstärkers bestimmt. Die Zellgröße (in pF) der unstimulierten Zellen (basale Zellgröße) wurde zum Zeitpunkt $t=10$ s nach Einbruch in die Zelle gemessen und der Durchschnittswert für alle Einzelzell-Messungen errechnet. Die basale

Ergebnisse

Zellgröße wurde von 23 TPC1^{+/+} bzw. 26 TPC1^{-/-} Mastzellen ermittelt. Mit einer durchschnittlichen basalen Zellgröße von 4,33 pF sind TPC1^{-/-} Mastzellen signifikant kleiner ($p=0,02$), als TPC1^{+/+} Mastzellen (5,12 pF).

Um die Stärke der Degranulationsantwort auf 100 μM GTP γS von Wildtyp und TPC1 knockout Zellen unabhängig von der unterschiedlichen Zellgröße der Mastzellen beider Genotypen im unstimulierten Ruhezustand (s. Abb. 35) zu erfassen, wurde jeweils die basale Zellgröße von denen über die Zeit gemessenen Kapazitätswerten subtrahiert (Δ Zellgröße). In Abb. 36 A ist der gemittelte, zeitliche Verlauf der GTP γS -induzierten Degranulation von Wildtyp und TPC1^{-/-} Mastzellen vergleichend dargestellt. Nach ca. 35 s beginnen die Zellen beider Genotypen an Größe bzw. Kapazität zuzunehmen, bis nach etwa 150 s eine Art Plateauphase erreicht ist. Vergleicht man die Größenzunahme der Mastzellen für den Zeitpunkt 300 s, beträgt diese für TPC1^{+/+} Mastzellen durchschnittlich 8,6 pF und für TPC1^{-/-} Mastzellen im Mittel 9,9 pF (Abb. 36 B). Die Kapazitätzunahme der TPC1^{-/-} Mastzellen ist also überraschenderweise höher als die der TPC1^{+/+} Mastzellen; es besteht aber kein signifikanter Unterschied zwischen den maximalen Degranulationsamplituden zum Zeitpunkt $t=300\text{s}$.

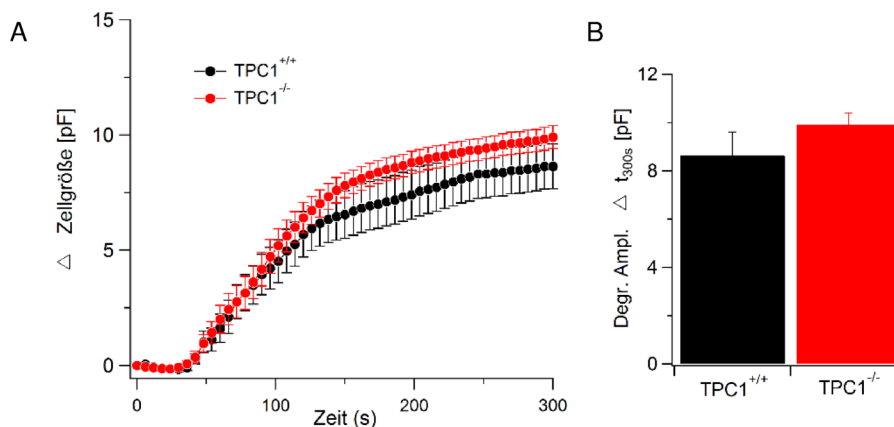


Abb. 36 Zeitlicher Verlauf der Degranulation von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen nach Stimulation mit GTP γS .

A Abgebildet ist die GTP γS -induzierte durchschnittliche Kapazitätzunahme von TPC1^{+/+} ($n=20$) und TPC1^{-/-} ($n=26$) Mastzellen über die Zeit. Die jeweilige basale Zellgröße der Einzelmessungen wurde von den gemessenen Kapazitätsdaten über die Zeit abgezogen (Δ Zellgröße [pF]). **B** Der Mittelwert \pm SEM für die Amplitude der Degranulation (Degr. Ampl.) nach 300s GTP γS Stimulation wurde für beide Genotypen der in **(A)** dargestellten Kurve entnommen und als Säulendiagramm dargestellt. Die Kapazitätzunahme nach GTP γS Applikation von TPC1^{+/+} Zellen beträgt zum Zeitpunkt $t=300$ s 8,6 pF, während die Kapazität von TPC1^{-/-} Zellen über die Zeit um 9,9 pF zunimmt. Die statistische Auswertung der Daten ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den gemessenen Kapazitätswerten für TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen zum Zeitpunkt 300s.

Um den beobachteten Effekt der TPC1 Defizienz auf den zeitlichen Verlauf und die Amplitude der Degranulationsantwort im Interesse der besseren Vergleichbarkeit als Vielfaches der initialen Zellgröße darzustellen, wurden im Folgenden die aufgezeichneten absoluten Kapazitätswerte auf die jeweilige basale Kapazität der Zelle normiert und wiederum der Mittelwert berechnet. Die entsprechenden zeitlichen Kurvenverläufe sind in Abb. 37 A dargestellt. Die verstärkte Kapazitätzunahme über die Zeit in TPC1^{-/-} Mastzellen ist in dieser Darstellung noch deutlicher zu erkennen: TPC1^{-/-} Mastzellen vergrößerten sich im Durchschnitt um das 3,4-fache, während die Kapazität von TPC1^{+/+} Mastzellen im Vergleich zum Basalwert nur um das 2,8-fache zunahm (Abb. 37 B). Dieser Unterschied in der Degranulations-Amplitude zwischen TPC1^{-/-} und TPC1^{+/+} Mastzellen zum Zeitpunkt t=300 s ist signifikant (p=0,02).

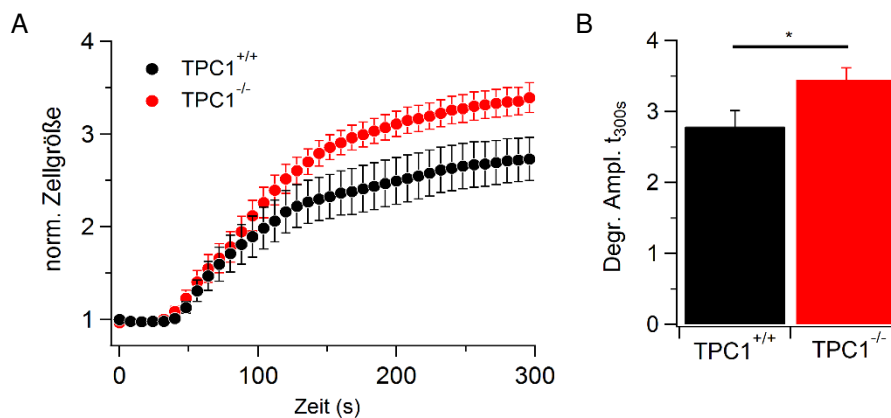


Abb. 37 Normierte Kapazitätzunahme von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen nach GTP γ S Stimulation.

A Die Zunahme der Zellgröße über die Zeit von 20 TPC1^{+/+} und 26 TPC1^{-/-} Mastzellen wurde auf die jeweilige initiale Zellgröße zum Zeitpunkt t=10 s normiert. **B** Eine Quantifizierung der durchschnittlichen Degranulationsamplitude nach 300 s und eine anschließende statistische Auswertung ergab, dass die normierte Kapazitätzunahme der TPC1^{-/-} Mastzellen (3,4-fache Vergrößerung) signifikant (p=0,02) höher ist als die von TPC1^{+/+} Mastzellen (2,8-fache Vergrößerung).

Um die zeitlichen Abläufe der Degranulationsreaktionen von Wildtyp und TPC1-defizienten Mastzellen noch genauer zu analysieren, wurde für die Kapazitätsmessung jeder einzelnen Zelle eine Kurvenanpassung (*Capfit*, Igor Wavemetrics) durchgeführt (s. 5.7.5) und daraus weitere Exozytose-relevante Parameter bestimmt: Das Zeitintervall bis zum Start der Exozytose-Reaktion wird als „delay“ bezeichnet und ist für TPC1^{-/-} Mastzellen im Mittel etwas kürzer als für TPC1^{+/+} Mastzellen (Abb. 38 A). Der Parameter „tau“ gibt die Zeit an, die benötigt wird, bis die Kurve 2/3 der maximalen Amplitude erreicht hat und ist somit ein Maß für die Geschwindigkeit der Exozytosereaktion der Zelle (Zierler et al., 2016). Im Mittel ist auch tau für die TPC1^{-/-} Mastzellen leicht reduziert, was zeigt, dass die Degranulationsreaktion in TPC1-defizienten Mastzellen schneller

abläuft als in Wildtyp-Mastzellen (s. Abb. 38 B). Zusammengefasst deuten die ermittelten Werte für die Parameter tau und delay an, dass die Degranulationsreaktion in TPC1^{-/-} Mastzellen im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen insgesamt etwas schneller anläuft und zudem schneller die maximale Exozytoserate erreicht.

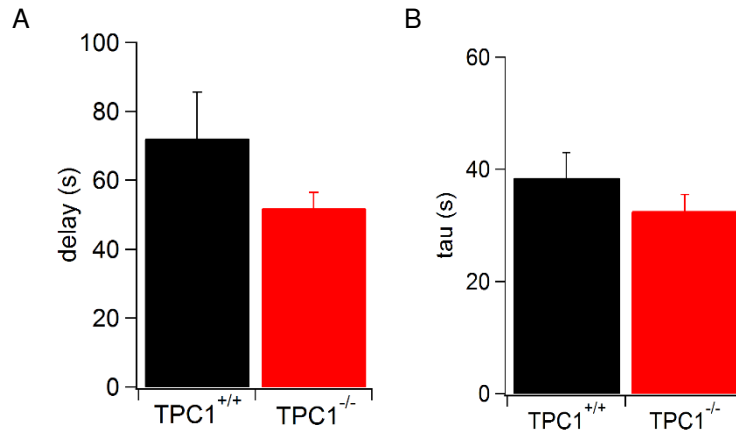


Abb. 38 Analyse des zeitlichen Verlaufs der GTPγS-induzierten Degranulationsreaktion in TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen.

Durch eine Kurvenanpassung für die einzelnen Kapazitätsmessungen verschiedener TPC1^{+/+} (n=19) und TPC1^{-/-} (n=26) Mastzellen erhält man die Parameter „delay“ (Zeitintervall bis zum Start der Reaktion) und „tau“ (Zeitspanne bis 2/3 der maximalen Amplitude der Kurve erreicht sind). Beide Parameter, delay (**A**) und tau (**B**), sind bei TPC1^{-/-} Mastzellen im Mittel gegenüber Wildtyp-Mastzellen leicht reduziert, woraus sich ableiten lässt, dass die Degranulation in TPC1^{-/-} Mastzellen nach GTPγS-Stimulierung etwas schneller abläuft und die maximale Exozytoserate schneller erreicht wird.

6.5.1.2 TPC2-defiziente und DKO Mastzellen

Die bisherigen Kapazitätsmessungen an TPC1-defizienten Mastzellen haben gezeigt, dass TPC1-defiziente Mastzellen nach Stimulierung mit GTPγS eine verstärkte Degranulationsreaktion zeigen (s. 6.5.1.1). Daher sollte im nächsten Schritt geprüft werden, ob eine Defizienz für TPC2 bzw. für beide TPC-Subtypen ähnliche Auswirkungen auf die Degranulation von Mastzellen hat. Deshalb wurden auch für TPC2^{-/-} und TPC1/2 Doppel-knockout Mastzellen Kapazitätsmessungen durchgeführt. Auch bei diesen Messungen wurde zunächst die durchschnittliche basale Zellgröße bestimmt. Für TPC2^{-/-} Mastzellen wurde eine Größe von 5,17 pF ermittelt, was in etwa der Größe von Wildtyp Zellen (5,12 pF) entspricht (Abb. 39 A). DKO Mastzellen, die weder TPC1 noch TPC2 exprimieren, wiesen, ähnlich wie TPC1^{-/-} Mastzellen, eine leicht reduzierte Zellgröße auf (4,78 pF), die sich aber nicht signifikant von Wildtyp-Zellen unterschied (Abb. 39 B).

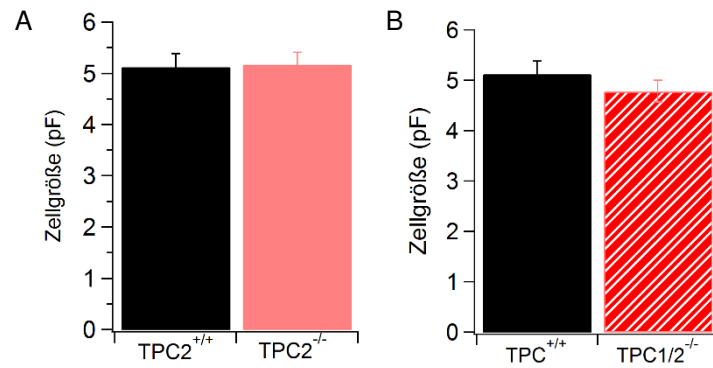


Abb. 39 Kapazitätsmessungen zur elektrophysiologischen Bestimmung der basalen Zellgröße von TPC2^{-/-} und DKO Mastzellen.

Die basale Kapazität (als Maß für die Zellgröße) wurde von 18 TPC2^{-/-} und 16 DKO Mastzellen in der patch clamp *whole-cell* Konfiguration mittels eines Heka Verstärkers bestimmt und der Mittelwert aus den Einzelzell-Messungen ermittelt. Während die Größe von TPC2^{-/-} Mastzellen (5,17 pF) sich nicht von Wildtyp-Mastzellen (5,12 pF) unterscheidet (A), ist die basale Kapazität von DKO Zellen (4,78 pF) leicht reduziert (B).

Um die Degranulation der TPC2^{-/-} und DKO Mastzellen auszulösen, wurden wiederum 100 µM GTPγS über die Patch-Pipette in die Zellen injiziert, die Kapazitätsänderung in pF über die Zeit aufgezeichnet und anschließend hinsichtlich ihrer Amplituden und des zeitlichen Verlaufs mit den erfassten Werten für Wildtyp-Mastzellen verglichen.

Die GTPγS-induzierte Degranulation in TPC2^{-/-} Mastzellen ist in Abb. 40 A dargestellt (hellrote Kurve). Die gemessenen Kapazitätswerte wurden auf die basale Kapazität normiert, gemittelt und als „normierte Zellgröße“ (norm. Zellgröße) abgebildet. Die Amplitude der Reaktion nach 300 s ist für TPC2^{-/-} Mastzellen (3,23-fache Vergrößerung) gegenüber dem Mittelwert von Wildtyp-Zellen (2,8-fache Vergrößerung) erhöht (Abb. 40 B). Die Degranulationsreaktion läuft also, wie auch bereits für TPC1^{-/-} Mastzellen beobachtet, verstärkt ab. Der für TPC2^{-/-} Mastzellen ermittelte durchschnittliche Wert für den Parameter delay, der die Zeit bis zum Start der Reaktion angibt, unterscheidet sich allerdings nicht von Wildtyp-Mastzellen (Abb. 40 C). Nach Ermittlung der durchschnittlichen Exozytoserate tau für TPC2^{-/-} Mastzellen, konnte festgestellt werden, dass diese zwar erhöht ist, allerdings besteht kein signifikanter Unterschied zu Wildtyp-Zellen (Abb. 40 D). TPC2-defiziente Mastzellen zeigten also als Antwort auf die Stimulierung mit GTPγS, ähnlich wie TPC1^{-/-} Mastzellen, eine etwas beschleunigte Degranulationsreaktion mit erhöhter Amplitude.

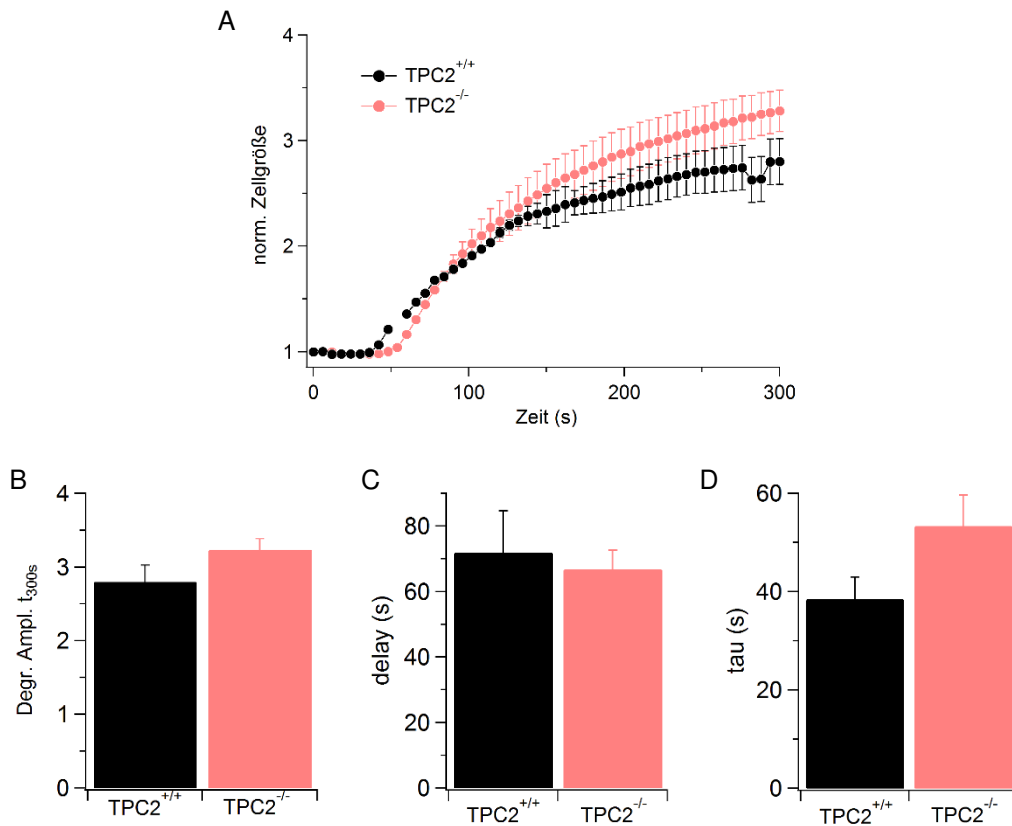


Abb. 40 Amplitude und zeitlicher Verlauf der GTP γ S-induzierten Degranulation von TPC2^{-/-} Mastzellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen.

A Die zeitliche Veränderung der normierten Zellgröße von 18 TPC2^{-/-} Zellen (hellrote Kurve) nach Stimulation mit 100 μ M GTP γ S wurde gemittelt und im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen (schwarze Kurve) dargestellt. **B** Die Degranulations-Amplitude ist bei TPC2^{-/-} Mastzellen im Vergleich zu Mastzellen von Wildtyp-Tieren leicht erhöht (3,23; zum Vergleich: TPC2^{+/+}: 2,8); **C** Der durchschnittliche delay der Reaktion der TPC2^{-/-} Zellen entspricht in etwa dem der Wildtyp-Zellen. **D** Der Parameter tau ist im Durchschnitt für TPC2^{-/-} Mastzellen leicht, aber nicht signifikant, erhöht.

Die Stimulation von peritonealen Mastzellen aus TPC1/2 Doppel-knockout Mäusen mit 100 μ M GTP γ S führte ebenfalls zu einer verstärkten Degranulationsreaktion im Vergleich zu TPC Wildtyp (TPC^{+/+})-Mastzellen (Abb. 41 A und B): Die Degranulationsamplitude nach 300 s zeigte für TPC1/2^{-/-} Mastzellen eine 3,2-fache Erhöhung im Vergleich zur basalen Zellgröße; für Wildtyp-Mastzellen entsprach die maximale Amplitude einer Vergrößerung der Zellen um das 2,8-fache. Wie auch bereits für die Kapazitätsmessungen an TPC2^{-/-} Mastzellen festgestellt, ist dieser Unterschied im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen jedoch nicht signifikant. Dieser Befund ist hinsichtlich der signifikant erhöhten maximalen Degranulationsamplitude nach GTP γ S-Stimulierung von TPC1-Einzelknockout Mastzellen bemerkenswert. (Zum Vergleich: Die Degranulations-Amplitude zum Zeitpunkt 300s lag für TPC1^{-/-} Mastzellen bei einem Wert von 3,4). Dass die genetische Deletion von TPC1 einen stärkeren Effekt auf die Degranulationsreaktion von Mastzellen hat, als die Deletion beider TPC-Subtypen

könnte auf verstärkte Kompensationsmechanismen anderer Ca^{2+} -Kanäle in Doppel-knockout Mastzellen zurückzuführen sein.

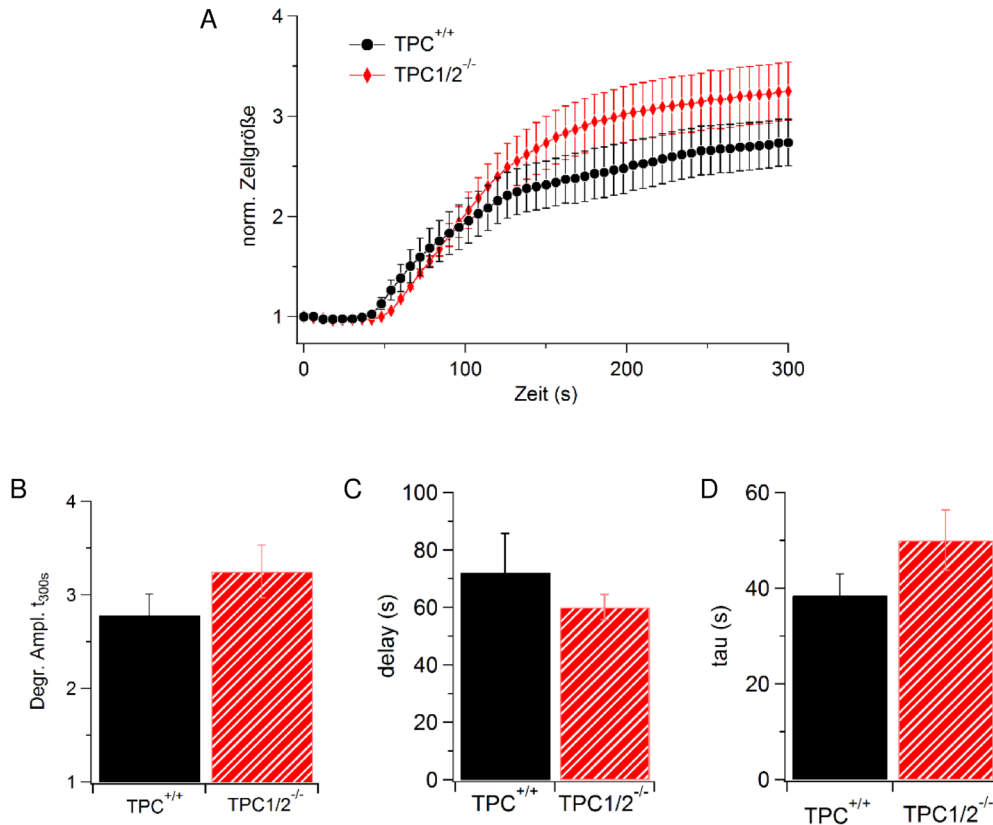


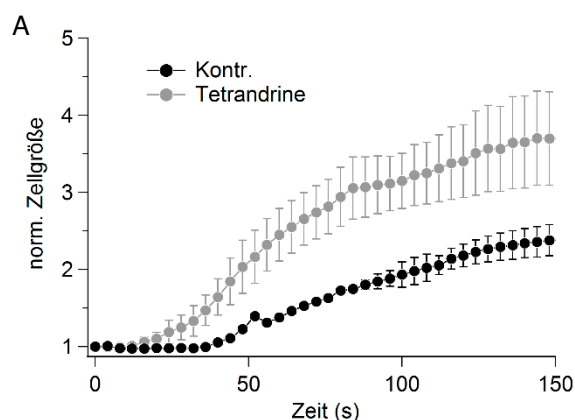
Abb. 41 GTP γ S induzierte Degranulation in TPC1/2 Doppel-knockout Mastzellen.
A Abgebildet ist die normierte Kapazitätzunahme von TPC^{+/+} und TPC1/2^{-/-} (n=16) Mastzellen nach Stimulation mit 100 μM GTP γ S über die Zeit. **B** Die Amplitude der Degranulation nach 300 s ist in TPC1/2 Doppel-knockout Mastzellen leicht erhöht. Die zur Analyse des Kurvenverlaufs bestimmten Parameter delay (**C**) und tau (**D**) sind leicht erniedrigt bzw. erhöht; insgesamt konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zu Wildtyp-Mastzellen festgestellt werden.

Die TPCs scheinen also an der Auslösung der Degranulation von Mastzellen funktionell beteiligt zu sein; dem Subtyp TPC1 scheint im Vergleich zu TPC2 jedoch die größere Bedeutung zuzukommen, da im Falle einer TPC1-Defizienz die Amplitude der Reaktion, die auf den auslösenden Stimulus GTP γ S folgt, im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen am Deutlichsten erhöht war.

6.5.2 Effekte des two-pore channel Blockers Tetrandrine auf die Degranulation von Mastzellen

Tetrandrine ist ein pflanzliches Alkaloid, das in der Lage ist, bei niedriger Dosierung (c.a. 500 nM) NAADP-induzierte Ca^{2+} -Signale zu blockieren und als Inhibitor für two-pore channels eingesetzt wird (Sakurai et al., 2015). Bei Verwendung höherer Konzentrationen werden zusätzlich auch andere Ca^{2+} -Kanäle blockiert (Liu et al., 1991).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Tetrandrine eingesetzt, um einen pharmakologischen TPC knockout in Mastzellen zu generieren, und so die in den genetischen TPC-knockout Modellen registrierten Befunde einer verstärkten Degranulationsreaktion zu überprüfen (s. 6.5.1). Dazu wurden peritoneale Mastzellen von Wildtyp-Mäusen isoliert; nach Vorinkubation mit 500 nM Tetrandrine in der externen Lösung wurden die Zellen über die Patch-Pipette mit 100 μ M GTP γ S stimuliert und anschließend die Kapazitätsänderungen über die Zeit erfasst. In Abb. 42 A ist zu erkennen, dass mit Tetrandrine behandelte Mastzellen (*Tetrandrine*) im Durchschnitt deutlich stärker auf den GTP γ S-Stimulus reagierten als unbehandelte Zellen (*Kontr.*). Die Zunahme der Zellgröße beginnt bereits nach wenigen Sekunden; nach einem Zeitintervall von 150 s haben sich die mit Tetrandrine behandelten Zellen im Durchschnitt auf das 3,7-fache ihrer Ausgangskapazität vergrößert. Zum gleichen Zeitpunkt (150 s) liegt die Amplitude der Reaktion von unbehandelten Mastzellen dagegen erst bei 2,4 (Abb. 42 B); Die statistische Auswertung für den Zeitpunkt 150 s ergab, dass die Kapazitätzunahme von mit Tetrandrine vorinkubierten Mastzellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen nach GTP γ S-Stimulierung signifikant ($p=0,025$) erhöht ist. Der veränderte zeitliche Verlauf der GTP γ S-induzierten Degranulationsreaktion nach Tetrandrine Inkubation ist auch deutlich an den, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, signifikant reduzierten Parametern delay ($p=0,03$) und tau ($p=0,003$) zu erkennen (Abb. 42 C und D). Nach pharmakologischer Blockierung der TPCs setzt die Degranulation also früher ein und verläuft schneller und verstärkt. Die Auswirkungen des „pharmakologischen knockouts“ der TPCs auf die Degranulation in Mastzellen sind also noch dramatischer, als die der genetischen Deletion der TPCs. Eine mögliche Erklärung für diesen starken Effekt von Tetrandrine im Vergleich zur genetischen Deletion der TPCs könnte sein, dass die genetische Deletion zum Teil funktionell kompensiert wird, so dass die Degranulation insgesamt weniger stark potenziert wird als nach direkter pharmakologischer Blockierung der TPCs (El-Brolosy und Stainier, 2017).



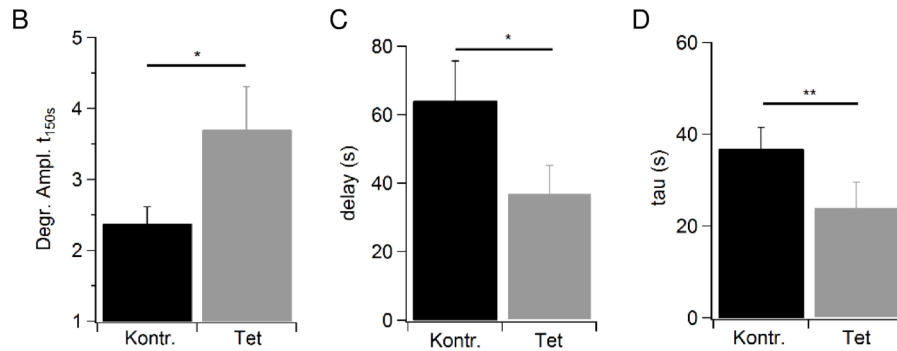


Abb. 42 Effekt des TPC-Blockers Tetrandrine auf die Degranulation von Mastzellen.

Peritoneale Mastzellen wurden für 5 min mit 500 nM Tetrandrine in der externen Lösung vorinkubiert und anschließend mit 100 μ M GTP γ S in der internen Lösung der Patch-Pipette stimuliert. **A** Die Kapazitätsänderungen wurden über die Zeit bestimmt und anschließend wurden die Daten auf die basale Kapazität normiert. (Tetrandrine n=12; Kontr. n=23) **B** Die durchschnittliche Degranulationsamplitude nach 150 s zeigt für mit Tetrandrine behandelte Zellen eine 3,7-fache Zunahme (*Tet*) und ist somit signifikant (p=0,025) größer als die durchschnittliche Amplitude von unbehandelten Zellen, die im Mittel bei 2,4 lag (*Kontr.*). Im Vergleich zum Antwortverhalten der Wildtyp-Zellen startet die GTP γ S-induzierte Degranulation der Mastzellen nach Tetrandrine Zugabe früher und läuft danach zudem beschleunigt ab. Die Parameter delay (**C**) und tau (**D**) sind im Vergleich zu unbehandelten Mastzellen jeweils signifikant reduziert (p=0,03 bzw. p=0,003).

6.5.3 Einfluss von NAADP auf die Degranulation von Mastzellen

Trotz anhaltender Diskussionen über den Aktivierungsmechanismus der TPCs wird weiterhin angenommen, dass sie eine Rolle bei der NAADP-vermittelten Ca^{2+} Freisetzung spielen (Morgan et al., 2015; Ruas et al., 2015). Um diese funktionellen Zusammenhänge zwischen NAADP und TPCs auch für die Exozytose von Mastzellen zu untersuchen, musste geprüft werden, ob die Applikation von NAADP die Degranulation von Wildtyp-Mastzellen auslöst. Da NAADP nicht membranpermeabel ist (Zhu et al., 2010b), wurden verschiedene Konzentrationen direkt über die Patch-Pipette in das Zytosol der Zellen geleitet. In Spermien und zytotoxischen T-Lymphozyten konnte beobachtet werden, dass TPC1 durch die Zugabe von 1 μ M NAADP aktiviert werden konnte (Davis et al., 2012; Arndt et al., 2014). Deshalb wurden zunächst Kapazitätsmessungen mit dieser NAADP Konzentration durchgeführt. Wie allerdings in Abb. 43 A zu erkennen ist, war es nicht möglich durch die Applikation von 1 μ M NAADP die Degranulation der Mastzellen auszulösen. Auch der Einsatz einer höheren Konzentration (100 μ M) führte nicht zu einer Änderung der Kapazität der Mastzellen (s. Abb. 43 B).

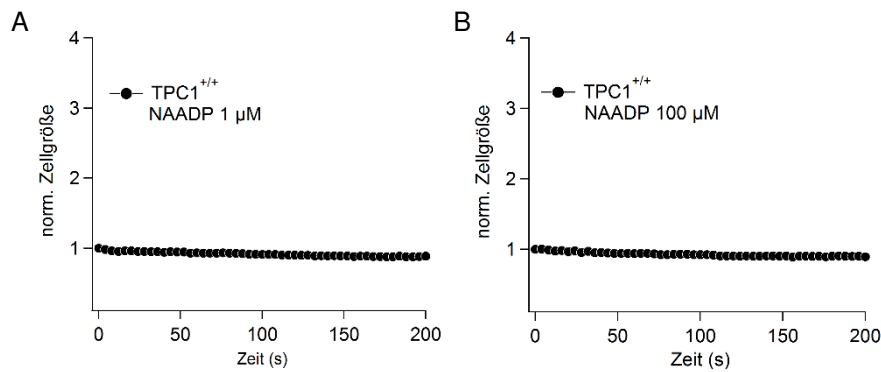


Abb. 43 Kapazitätsmessungen an peritonealen Mastzellen nach NAADP Applikation.

Verschiedene NAADP Konzentrationen wurden direkt über die Patch Pipette in Wildtyp-Mastzellen geleitet. Die Kapazität der Mastzellen wurde nach Stimulation mit 1 μM (**A**; n=5) und 100 μM (**B**; n=5) NAADP über einen Zeitraum von 200 s aufgezeichnet und auf die basale Kapazität jeder einzelnen Zelle normiert. Weder die Applikation von 1 μM (**A**) noch von 100 μM (**B**) führte zu einer Änderung der Kapazität der Mastzellen.

Da angenommen wird, dass für die Auslösung der Degranulation in Mastzellen neben der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auch andere Signalwege aktiviert werden müssen (Penner und Neher, 1988), ist NAADP als alleiniger Stimulus in Mastzellen möglicherweise nicht ausreichend, um eine Degranulation der Zellen zu initiieren.

Deshalb wurde im nächsten Schritt die Wirkung von NAADP auf die GTP γ S-induzierte Degranulation untersucht. Die pharmakologischen Wirkstoffe wurden simultan über die Patch-Pipette appliziert und wiederum die Kapazität der Zellen über die Zeit gemessen. Um erneut gezielt TPC1 zu aktivieren wurde eine Konzentration von 1 μM NAADP gewählt (Davis et al., 2012; Arndt et al., 2014). Im Vergleich zu den Kontrollzellen, die nur mit GTP γ S stimuliert wurden, reagierten die mit GTP γ S und 1 μM NAADP behandelten Mastzellen im Durchschnitt schwächer bezüglich der G-Protein vermittelten Degranulation (Abb. 44 A). Die nach 300 s ermittelte durchschnittliche Degranulationsamplitude für NAADP-behandelte Mastzellen (2,33) war im Vergleich mit den Kontrollreihen (2,8) erkennbar reduziert. Die Bestimmung der Parameter delay und tau ergab, dass der Start der Reaktion und die Geschwindigkeit der Exozytose nach zusätzlicher NAADP Stimulation nur leichte bis keine Änderungen im Vergleich zu den nur mit GTP γ S behandelten Zellen aufwiesen (Abb. 44 C und D).

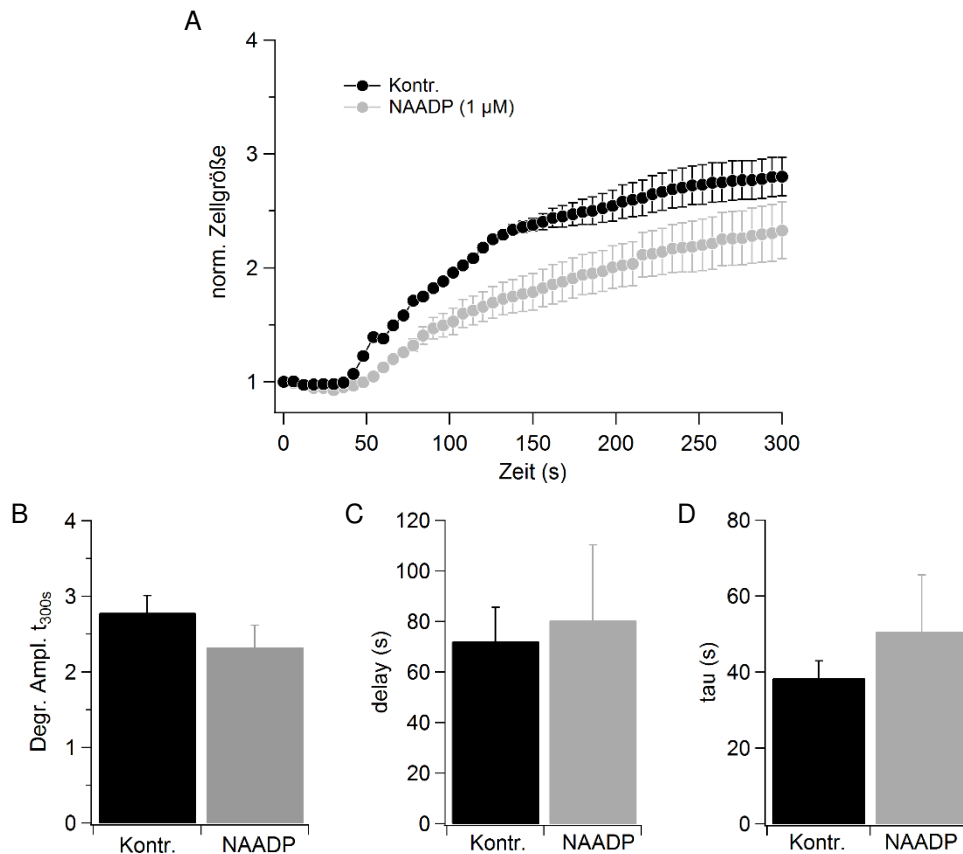


Abb. 44 Einfluss von NAADP auf die GTP γ S-induzierte Degranulation.

A Primäre peritoneale Mastzellen wurden simultan mit 1 μ M NAADP und 100 μ M GTP γ S stimuliert und die durchschnittliche Zunahme der Kapazität über die Zeit aufgezeichnet. Die gemessenen Kapazitätswerte wurden in Relation zur basalen Kapazität gesetzt, um so die normierte Zunahme der Zellgröße unter beiden Stimulationsbedingungen vergleichend darstellen zu können. (NAADP 1 μ M n=15; Kontrolle n=20) **B** Die durchschnittliche Amplitude der Degranulation nach 300 s betrug in Anwesenheit von NAADP einen Wert von 2,33 und ist somit gegenüber der Kontrolle (nur GTP γ S) mit 2,8 leicht reduziert. Die Parameter delay (**C**) und tau (**D**) unterscheiden sich nicht signifikant von den Kontrollwerten.

Um zu überprüfen, ob die veränderte Degranulationsantwort in Mastzellen in Anwesenheit von NAADP tatsächlich auf die Aktivierung von TPC1 zurückzuführen ist, wurden auch TPC1^{-/-} Mastzellen simultan mit 1 μ M NAADP und GTP γ S stimuliert. Dabei ließ sich jedoch feststellen, dass NAADP auch einen Einfluss auf die Stärke der Degranulationsreaktion von TPC1-defizienten Zellen hat (s. Abb. 45 A). Die maximale Degranulationsamplitude nach 300 s von mit 1 μ M NAADP behandelten TPC1^{-/-} Mastzellen liegt im Mittel bei 2,56. Damit ist sie im Vergleich zur Amplitude nur mit GTP γ S behandelter TPC1^{-/-} Kontrollzellen (3,4) signifikant reduziert (p=0,01) (Abb. 45 B). Die Analyse der kinetischen Parameter ergab weiter, dass die Degranulation, unabhängig von der Anwesenheit von NAADP, in allen Zellen in etwa zum gleichen Zeitpunkt startet, was sich in dem unveränderten delay nach NAADP-Zugabe widerspiegelt (Abb. 45 C). Allerdings läuft die Reaktion in NAADP-behandelten TPC1^{-/-} Mastzellen signifikant (p=0,018) verlangsamt ab (s. Abb. 45 D). Eine mögliche

Erklärung für diese Beobachtung könnte eine im Zuge der Defizienz für TPC1 auftretende Überexpression des ebenfalls durch NAADP aktivierbaren TPC-Subtyp TPC2 sein, der die Funktion von TPC1 teilweise übernimmt.

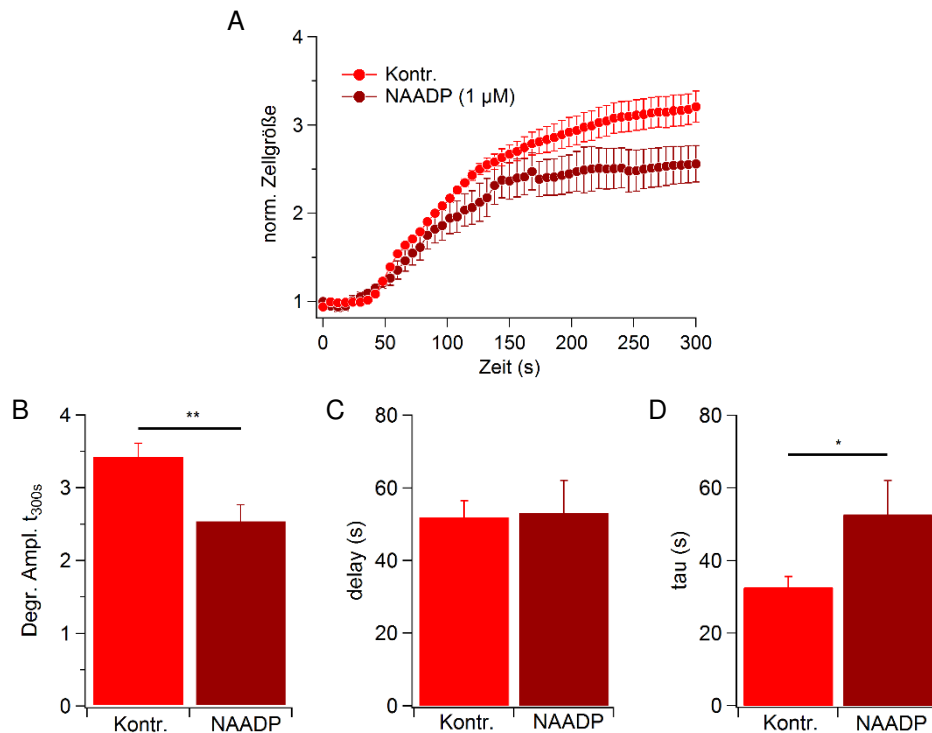


Abb. 45 Effekt von NAADP auf die GTP γ S-vermittelte Degranulation von TPC1^{-/-} Mastzellen.

A In Anwesenheit von 1 μ M NAADP ist die durch 100 μ M GTP γ S induzierte Degranulation im Vergleich zu mit GTP γ S alleine behandelten Zellen deutlich abgeschwächt. **B** Nach 300 s zeigten die mit NAADP und GTP γ S behandelten Zellen eine signifikant reduzierte Amplitude im Vergleich zu nur mit GTP γ S behandelten Zellen. **C** Im delay lies sich jedoch kein Unterschied im Antwortverhalten beider Zellpopulationen feststellen. Dies verhielt sich jedoch für die Geschwindigkeit der Exocytose Reaktion anders: Der Parameter tau ist bei zusätzlicher NAADP Applikation signifikant erhöht ($p=0,018$). (NAADP + GTP γ S: $n=17$; GTP γ S-Kontrolle: $n=26$)

Stimulierungsexperimente an murinen Stammzellen (Zhang et al., 2013) und Fibroblasten (Grimm et al., 2014) haben gezeigt, dass der TPC2 bereits durch deutlichere niedrigere Dosen an NAADP aktiviert wird als TPC1. Da dieses Charakteristikum des TPC2 die Möglichkeit eröffnet, gezielt die funktionelle Rolle des TPC2 für die Mastzelldegranulation zu analysieren, wurden Wildtyp Zellen mit GTP γ S und einer NAADP-Konzentration im niedrigen nanomolaren Bereich stimuliert. In Abb. 46 ist zu erkennen, dass die niedrigere NAADP-Dosis keinen Einfluss auf die Amplitude (Abb. 46 B) und den Zeitpunkt des Starts der Degranulationsreaktion (Abb. 46 C) hat. Lediglich die Geschwindigkeit der Exozytosereaktion ist verlangsamt, was sich an dem im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant ($p=0,035$) erhöhten tau erkennen lässt.

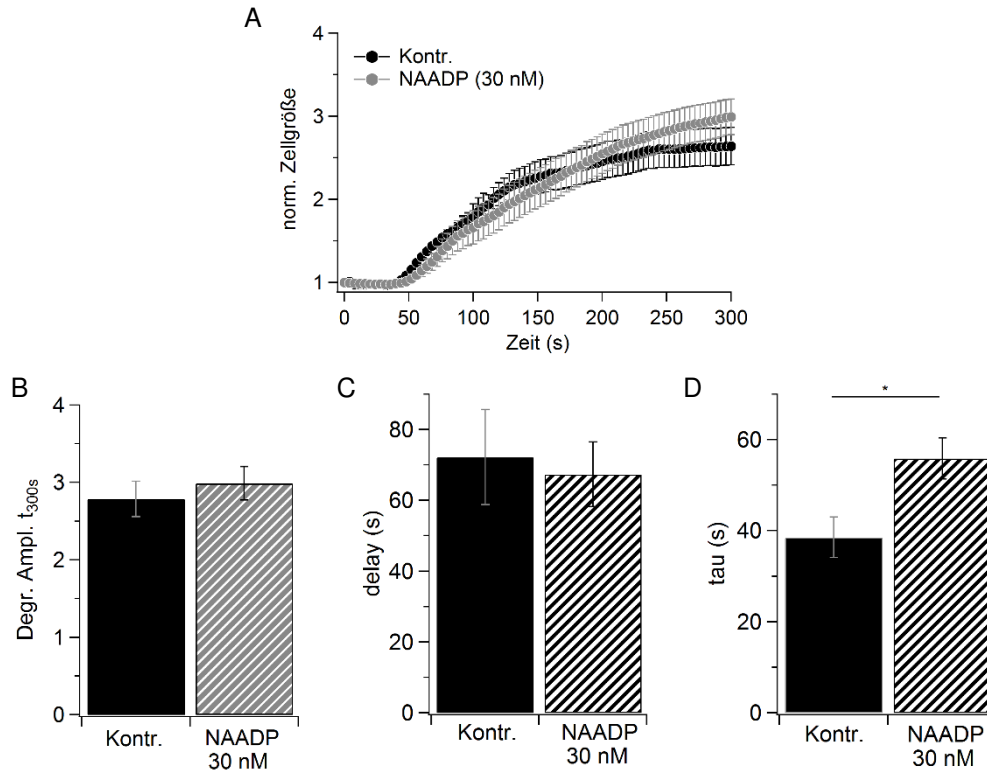


Abb. 46 Stimulation von Wildtyp Mastzellen mit GTP γ S und niedrigen Dosen an NAADP (30 nM).

A Gezeigt ist die durchschnittliche Kapazitätzunahme über die Zeit von Wildtyp-Mastzellen nach Stimulation mit GTP γ S (Kontr.; n=20) und GTP γ S + 30 nM NAADP (NAADP 30 nM; n=18). **B** Die Amplitude der Degranulation nach 300s war unter beiden Bedingungen vergleichbar. **C** Der delay als Maß für den Beginn der Degranulation unterschied sich ebenfalls nicht zwischen NAADP behandelten Mastzellen und Kontrollzellen. **D** Der Parameter tau als Indikator für die Exozytosegeschwindigkeit war hingegen in Anwesenheit von 30 nM NAADP im Vergleich zu nur mit GTP γ S behandelten Kontrollzellen signifikant erhöht (p=0,035).

Im Weiteren wurden auch TPC2^{-/-} Mastzellen mit GTP γ S und 30 nM NAADP stimuliert. Zum Zeitpunkt der Zusammenfassung dieser Datenreihe lag die Zahl der analysierten Mastzellen bei n=8, weshalb die folgenden Ergebnisse als vorläufig eingestuft werden sollten. Nach aktuellem Stand zeigten TPC2^{-/-} Mastzellen in Anwesenheit von 30 nM NAADP im Vergleich zu nur mit GTP γ S behandelten Zellen eine nur leicht veränderte Degranulationsreaktion (Abb. 47 A). Die Amplitude der Reaktion nach Stimulation mit GTP γ S und 30 nM NAADP erreichte nach 300 s einen Wert von 2,58, während sich die nur mit GTP γ S behandelten Kontrollzellen durchschnittlich um das 3,23-fache vergrößerten (Abb. 47 B). Die zur Analyse der Kinetik der Reaktion bestimmten Parameter delay und tau zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Kontrollzellen, die nur mit GTP γ S und ohne 30 nM NAADP stimuliert wurden (Abb. 47 C und D). Das die niedrigen Dosen an NAADP auch in TPC2-defizienten Mastzellen zu einer sowohl hinsichtlich der Amplitude als auch der Kinetik veränderten Degranulationsreaktion führten, könnte wiederum ebenfalls auf eine funktionelle Kompensation durch den anderen TPC-Subtyp TPC1 hindeuten. Somit sollte für eine

abschließende Beurteilung des Einfluss von NAADP auf die Mastzell-Degranulation eine Versuchsreihe mit NAADP/GTP γ S-Stimulation an TPC1/2 doppelt-defizienten Mastzellen durchgeführt werden, um kompensatorische Mechanismen der TPC-Subtypen auszuschließen.

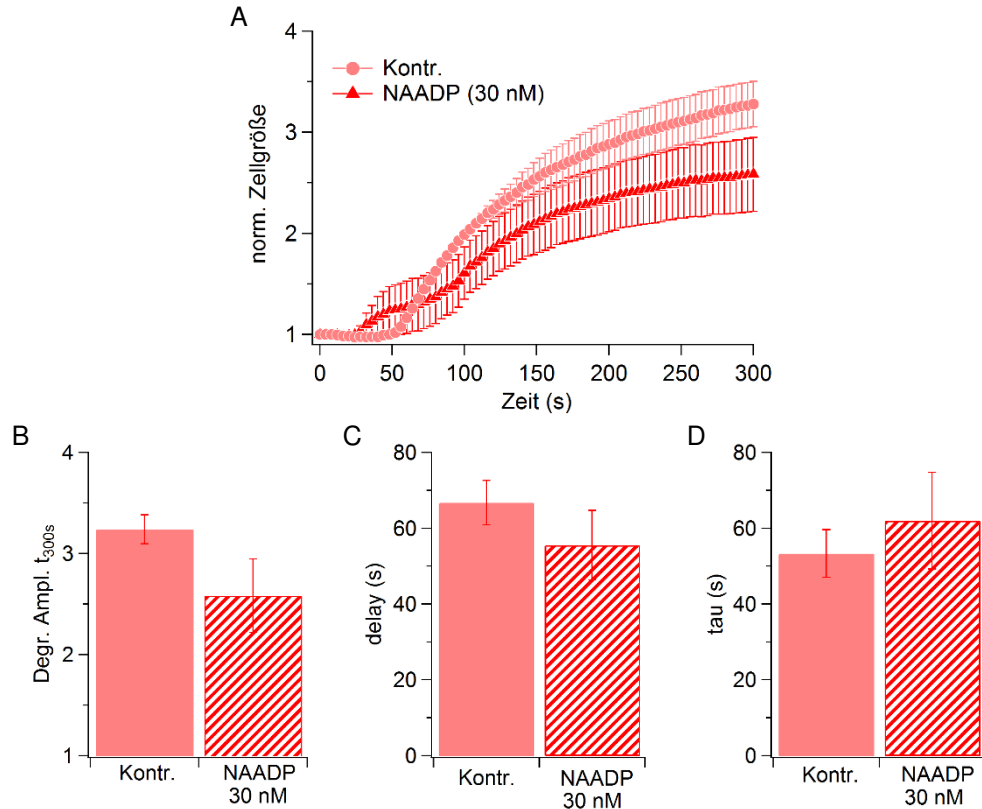


Abb. 47 Kapazitätsmessungen an TPC2^{-/-} Mastzellen nach GTP γ S und NAADP (30 nM) Applikation.

A Dargestellt ist die Veränderung der normierten Zellgröße von TPC2^{-/-} Mastzellen über die Zeit nach Zugabe von GTP γ S (Kontr.; n=18) oder GTP γ S mit 30 nM NAADP (n=8). **B** Mit GTP γ S alleine nimmt die Zellgröße um das 3,23-fache zu, eine simultane Gabe von NAADP vergrößert die Zelle nur auf das 2,58-fache. **C** In Anwesenheit von 30 nM NAADP startet die Exozytosereaktion etwas früher; dies lässt sich aus dem kleineren Wert für den Parameter delay schließen, der sich aber nicht signifikant von nur mit GTP γ S behandelten Kontrollzellen unterscheidet. **D** Der die Exozytoserate beschreibende Parameter tau ist bei simultaner Stimulation der Mastzellen mit GTP γ S und 30 nM NAADP leicht aber nicht signifikant erhöht.

Zusammenfassend konnte also festgestellt werden, dass die Amplitude der GTP γ S-induzierten Degranulationsreaktion speziell in TPC1-defizienten Mastzellen erhöht war. Zusätzlich ließen sich NAADP-vermittelte regulatorische Effekte auf die Degranulation vor allem nach Aktivierung von TPC1 durch eine NAADP Konzentration von 1 μ M beobachten. Daher legen die bisherigen Befunde nahe, dass dem TPC1 im Vergleich zum TPC2 eine bedeutendere Rolle bei der Mastzell-Degranulation zukommt. Weiterführende Studien wurden daher ausschließlich an Zellen und Geweben aus TPC1-defizienten Mäusen durchgeführt.

6.6 Ca²⁺-Signale in Wildtyp und TPC1-defizienten Mastzellen

Die Kapazitätsmessungen an TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen haben gezeigt, dass in Folge einer Defizienz des TPC1 die Mastzell-Degranulation verstärkt ist. Bezüglich der möglichen Ursachen haben die Analyse zur Morphologie von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen bereits ergeben, dass die Vesikelgröße in TPC1^{-/-} Mastzellen nicht verändert ist (s. 6.4.1), so dass die erhöhte Zunahme der Membrankapazität nicht auf die Integration größerer Mengen an Vesikelmembranen während der Granula-Plasmamembran-Fusion zurückzuführen ist. Da die Verschmelzung der Vesikel mit der Plasmamembran von der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration abhängig ist, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob veränderte intrazelluläre Ca²⁺-Signale in TPC1^{-/-} Mastzellen der Grund für die erhöhte Kapazitätzunahme sein könnten.

6.6.1 Untersuchung zytosolischer Ca²⁺-Signale mittels Fura-2-AM

Die vergleichenden zytosolischen Ca²⁺-Konzentrationsbestimmungen an Wildtyp und TPC1^{-/-} Mastzellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM durchgeführt (s. 5.7.1).

6.6.1.1 Basales zytosolisches Ca²⁺

Um zunächst zu überprüfen, ob die fehlende Expression von TPC1 in Mastzellen bereits eine Veränderung der Ca²⁺-Homöostase im unstimulierten Zustand der Zellen verursacht, wurde der basale Ca²⁺-Status mit Hilfe des ratiometrischen Ca²⁺-Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2-AM in TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen bestimmt.

Die Anregungswellenlänge von Fura-2-AM hängt von dessen Ca²⁺-Bindungszustand ab: Die Ca²⁺-gebundene Form wird bei 340 nm (F₃₄₀) angeregt, während Fura-2-AM ohne gebundenes Ca²⁺ eine Wellenlänge von 380 nm (F₃₈₀) zur Anregung benötigt. Bildet man den Quotient aus den registrierten Fluoreszenzintensitäten bei diesen beiden Anregungswellenlängen, erhält man, unabhängig von der Fura-2-AM Beladung der Zellen, den Ca²⁺-Status im Zytosol, und kann die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration von Wildtyp und TPC1-defizienten Mastzellen direkt miteinander vergleichen.

Nach Isolierung der Zellen aus dem Bauchraum der Mäuse wurden die in der peritonealen Lavage enthaltenen Mastzellen unter dem Mikroskop anhand ihrer charakteristischen Morphologie identifiziert. Eine Phasenkontrastaufnahme der Mastzellen konnte hier leider nicht eingefügt werden, da die vorhandene apparative Ausstattung des Ca²⁺-Imaging Systems entsprechende Aufnahmen nicht ermöglicht, in Abb. 48 sind jedoch zufällig ausgewählte, exemplarische Aufnahmen von Fura-2-AM-beladenen TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen in Falschfarbendarstellung gezeigt, wobei der Gradient der Fluoreszenzintensität die Ca²⁺-Konzentration widerspiegelt (von blau [wenig Ca²⁺] über grün und gelb zu rot [viel Ca²⁺]).

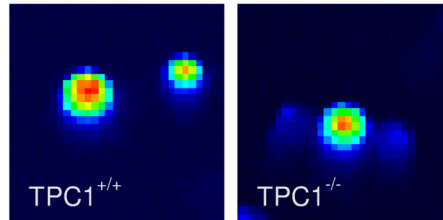


Abb. 48 Peritoneale Mastzellen nach Fura-2 Beladung.

Am Tag nach der Isolation wurden TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen in einer 5 μ M Fura-2-AM Färbelösung für 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Status der Fura-2-AM Beladung wurde an einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregung mit 360 nm Licht überprüft. Die Identifizierung der Mastzellen in der peritonealen Lavage erfolgte anhand ihrer charakteristischen Morphologie. Phasenkontrastaufnahmen waren im Rahmen der Ca²⁺-Messungen wegen der fehlenden Objektivausstattung allerdings nicht möglich. Der Grad der Ca²⁺-Beladung und somit der Fluoreszenzintensität der Zelle wurde jedoch mittels Falschfarben dargestellt. Dabei zeigt die Farbe blau geringe Ca²⁺-Konzentrationen an; eine tiefrote Färbung steht für die höchste Ca²⁺-Konzentration.

Aus den basalen Ca²⁺-Fluoreszenzintensitäts-Ratios (F_{340}/F_{380}) von 179 TPC^{+/+} und 164 TPC^{-/-} Mastzellen wurde jeweils der durchschnittliche basale Ca²⁺-Status ermittelt. In Abb. 49 ist das Ergebnis dieser Quantifizierung dargestellt: Der gemittelte Quotient der basalen Fluoreszenzintensitäten (F_{340}/F_{380}) ergab für TPC^{+/+}Mastzellen einen Wert von $378,3 \pm 6,5$; für TPC^{-/-} Mastzellen wurde im Mittel ein Wert von $372,8 \pm 7,5$ bestimmt. Die Defizienz für TPC1 scheint also offenbar in peritonealen Mastzellen keinen Einfluss auf die zytosolische Ca²⁺-Konzentration im Ruhezustand zu haben.

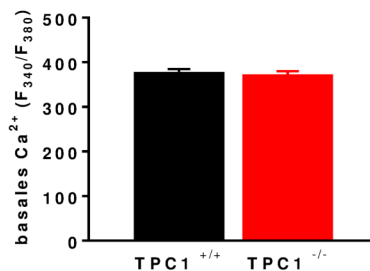


Abb. 49 Basaler zytosolischer Ca²⁺-Status von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen.

Peritoneale Mastzellen von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mäusen wurden mit Fura-2-AM beladen und die basalen Fluoreszenzintensitäten bei Anregungswellenlängen von 340 nm und 380 nm gemessen. Aus den erhaltenen Werten wurde für jede Einzelmessung die Ratio F_{340}/F_{380} berechnet und dann der Mittelwert aus allen erhaltenen Quotienten gebildet. Dadurch ergab sich für TPC1^{+/+} Mastzellen ein Wert von $378,3 \pm 6,5$; für TPC1^{-/-} Mastzellen wurde ein Wert von $372,8 \pm 7,5$ ermittelt. (TPC1^{+/+} n=179; TPC1^{-/-} n=164)

6.6.1.2 Effekt der Inhibition der SERCA auf die zytosolische Ca²⁺-Konzentration in TPC1-defizienten Mastzellen

Thapsigargin, ein Inhibitor für die ATP-abhängige Ca²⁺-Pumpe des Sarko-/Endoplasmatischen Retikulums SERCA, hemmt die Wiederaufnahme von Ca²⁺ in das ER (Thastrup et al., 1990). Das hat zur Folge, dass sich das ER nach Thapsigargin

Zugabe durch stetig auftretende Ca^{2+} -Leckströme passiv entleert; infolgedessen steigt die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration kontinuierlich an, so dass eine Degranulationsreaktion ausgelöst wird (Huber et al., 2000).

Um zu untersuchen, ob die Ursache für die verstärkte Degranulation in $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen möglicherweise auf ein im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen verändertes Ca^{2+} -Signal im Zytosol nach Aktivierung der Zellen zurückzuführen ist, wurden verschiedene Substanzen zur Stimulation der Zellen eingesetzt und wiederum die resultierenden Fura-2 Fluoreszenzsignale für Wildtyp- und $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen aufgezeichnet.

Im Einzelnen wurden für diese experimentelle Reihe initial die zytosolischen Ca^{2+} -Signale von mit Fura-2-AM beladenen $\text{TPC1}^{+/+}$ und $\text{TPC1}^{-/-}$ Zellen in Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} (1 mM) und nach Zugabe von 2 μM Thapsigargin über die Zeit aufgezeichnet. Um die Ca^{2+} -Signale aller Zellen miteinander vergleichen zu können, wurden die bestimmten Ratios der Fluoreszenzintensitäten (F_{340}/F_{380}) auf den Mittelwert der ersten zehn gemessenen Werte, der im Folgenden als „Basalwert“ bezeichnet wird, normiert (Abb. 50; *norm. $\text{Ca}^{2+} F_{340}/F_{380}$*). Anschließend wurden aus den normierten Daten die Mittelwerte \pm Standardfehler der Einzelmessungen gebildet. Im Ruhezustand vor Stimulation der Mastzellen zum Zeitpunkt $t=50$ s konnten in Mastzellen beider Genotypen keine Änderungen des Fluoreszenzsignals detektiert werden. Auf die Zugabe von Thapsigargin (s. Abb. 50 A; Pfeil) reagierten jedoch sowohl $\text{TPC1}^{+/+}$ wie auch $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen mit einem deutlichen Einstrom von Ca^{2+} in das Zytosol. Die durchschnittliche normierte Fluoreszenzintensität erreichte zum Zeitpunkt 300 s der Messung in Zellen beider Genotypen ein Maximum und ging danach allmählich in eine Plateauphase über (s. Abb. 50 A). Eine Bestimmung der normierten maximalen, zum Zeitpunkt $t=300$ s registrierten zytosolischen Ca^{2+} -Signale ergab für $\text{TPC1}^{+/+}$ Mastzellen eine Erhöhung um den Faktor 2,29; für $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen wurde eine Verfeifachung um den Faktor 2,38 registriert (s. Abb. 50 B). Die Amplitude des Ca^{2+} -Signals war in $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen zum Zeitpunkt des Erreichens der Plateauphase also nur sehr leicht erhöht. Vergleicht man aber die tatsächliche Ca^{2+} -Zunahme über den gesamten Inkubationszeitraum für Zellen beider Genotypen, so liegt die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der TPC1 -defizienten Mastzellen über den gesamten Stimulationszeitraum immer leicht über der der Wildtyp-Zellen. Da diese Beobachtung darauf hindeutet, dass die gesamte Ca^{2+} -Konzentrationszunahme über die Zeit in $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen insgesamt erhöht ist, wurde die gesamte Fluoreszenzintensitätszunahme über die Zeit quantifiziert. Dazu wurde das jeweilige Integral, also die Fläche unterhalb der beiden Mittelwertskurven (*area under the curve* = AUC), die nach unten durch eine Gerade bei $y=1$ begrenzt wurde, mit Hilfe der Statistik-Software Graphpad berechnet. Unter Angabe der Mittelwerte sowie des

zugehörigen Standardfehlers und der Stichprobengröße (n) kann das Graphpad-Programm direkt das Integral der Mittelwertskurve berechnen, das damit rechnerisch dem Mittelwert aus den Integralen der Einzelmessungen entspricht. Die auf diese Weise durchgeführte Auswertung der Datensätze macht deutlich, dass in TPC1^{-/-} Mastzellen über den gleichen Zeitraum (50 bis 300 s) signifikant (p=0,001) mehr Ca²⁺ in das Cytosol gelangt als in Wildtyp-Zellen.

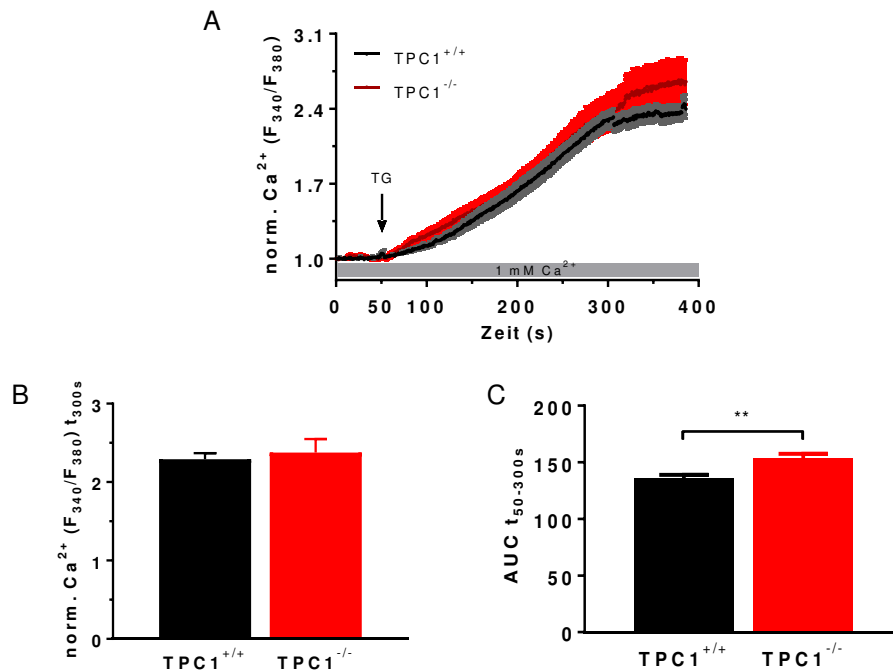


Abb. 50 Thapsigargin-vermittelte Ca²⁺-Signale in peritonealen TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen.

Peritoneale Mastzellen wurden direkt nach der Isolation über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und am nächsten Morgen für 30 min bei 37 °C mit dem Ca²⁺-Indikator Fura-2 beladen (5 µM Fura-2-AM, 0,02 % Pluronic F-127, 0,1 % BSA). Um die Ca²⁺-Konzentration zunächst den physiologischen Bedingungen gleichzusetzen, wurde eine extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration von 1 mM gewählt. Die Fluoreszenzintensität in den Zellen nach Anregung bei 340 nm bzw. 380 nm wurde bestimmt und der Quotient aus den erfassten Werten gebildet. Zur Auswertung wurde zunächst jede Einzelzell-Messung auf den Mittelwert der ersten zehn Messwerte (=Basalwert) normiert, indem alle Messwerte durch den berechneten Basalwert dividiert wurden (norm. Ca²⁺); anschließend wurden die Mittelwerte ± SEM aller Messungen über die Zeit gebildet (TPC1^{+/+} n=48; TPC1^{-/-} n=24). **A** 50 s nach Start der Messung wurde Thapsigargin (2 µM Endkonzentration) appliziert, was zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität im Zytosol von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen führte. **B** Eine Quantifizierung der Ca²⁺-Antwort nach Erreichen der Plateauphase bei 300 s (norm. Ca²⁺ (F₃₄₀/F₃₈₀)_{t300s}) zeigte nur geringfügige Unterschiede der Ca²⁺-Signalstärke von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen. **C** Um das Gesamtmaß der Zunahme an zytosolischem Ca²⁺ über die Thapsigargin-Inkubationszeit (50 bis 300 s) zu quantifizieren, wurden jeweils die Flächen unterhalb der Kurven mit Hilfe der Statistik-Software des Programms Graphpad berechnet (AUC t_{50-300s}) (Datenbegrenzung: y=1). Dadurch konnte durch Angabe der Mittelwerte, SEM und Stichprobengröße direkt das Integral unter den Mittelwertskurven berechnet werden, was dann dem Mittelwert der Integrale der Einzelmessungen entspricht. Die AUC der TPC1^{-/-} Kurve ist signifikant (p=0,001) größer als die der TPC1^{+/+} Kurve.

Die für diese Versuchsreihe eingestellte in extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration von 1 mM machte es unmöglich zu erfassen, ob das einströmende Ca²⁺ aus dem extrazellulären

Millieu oder intrazellulären Speichern stammt. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass durch den Einsatz von Thapsigargin zunächst Ca^{2+} aus dem ER in das Zytosol fließt; der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt aber auch zur Aktivierung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran. Über diese Ca^{2+} -Kanäle kann dann wiederum noch mehr Ca^{2+} entlang dem Konzentrationsgradienten aus dem extrazellulären Raum in das Zytosol gelangen (Catterall, 2011). Um zu untersuchen, welchen Anteil die intrazellulären Speicher, wie das ER, am vermehrten Ca^{2+} -Einstrom in das Zytosol von $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen haben, wurden Thapsigargin-induzierte Ca^{2+} -Signale als nächstes unter extrazellulär Ca^{2+} -freien Bedingungen gemessen. Um das extrazelluläre Ca^{2+} komplett zu chelatieren, wurde der Pufferlösung zusätzlich 0,5 mM EGTA zugesetzt. Abb. 51 fasst die Befunde dieser Versuchsreihe zusammen. Zunächst fällt auf, dass es in den $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen bereits vor der Zugabe von Thapsigargin zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität kam; nach etwa 25 s konnte keine weitere Zunahme des Signals beobachtet werden. Die anschließende Zugabe von Thapsigargin führte dann zu einer sehr schnellen Abnahme des Fluoreszenzsignals in $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen, die sich in einer Verschiebung der entsprechenden Mittelwertskurve nach unten widerspiegelt. Da diese Beobachtung für TPC1 -defiziente Mastzellen nur im Rahmen dieser Versuchsreihe gemacht wurde, bleibt zu klären, ob es sich hierbei um ein physiologisches Ca^{2+} -Signal der $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen handelte.

Insgesamt stiegen die normierten Ratios der Fluoreszenzintensitäten (F_{340}/F_{380}) in Folge der Thapsigargin Applikation bei $t=50$ s jedoch sowohl in $\text{TPC1}^{+/+}$ als auch in $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen an (s. Abb. 51 A). Nach ca. 120 s ist in $\text{TPC1}^{-/-}$ Zellen immer noch eine Zunahme des Fluoreszenzsignals zu erkennen, während die Intensität in den $\text{TPC1}^{+/+}$ Zellen eine Plateauphase erreicht hat (s. Abb. 51 A). Wie in Abb. 51 B zu sehen, liegt die durchschnittliche Fluoreszenzintensität in den $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen zum Zeitpunkt $t=150$ s etwas über der Intensität in $\text{TPC1}^{+/+}$ Mastzellen. Der Unterschied zwischen den Ca^{2+} -Signalen in $\text{TPC1}^{-/-}$ und Wildtyp-Mastzellen ist zu diesem Zeitpunkt allerdings nicht statistisch signifikant. Analysiert man allerdings das gesamte Ca^{2+} -Signal im Zeitraum zwischen 60 s und 200 s durch die Berechnung des Kurven-Integrals (AUC), so wird der Unterschied in der Stärke der Ca^{2+} -Signale von Wildtyp- und $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen erkennbar: Über die beschriebene Zeitspanne strömt in $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen im Vergleich zum Wildtyp signifikant ($p=0,0005$) mehr Ca^{2+} in das Zytosol ein (s. Abb. 51 C). Da kein extrazelluläres Ca^{2+} zur Verfügung steht, muss dieses aus internen Speichern, wie z. B. dem ER stammen.

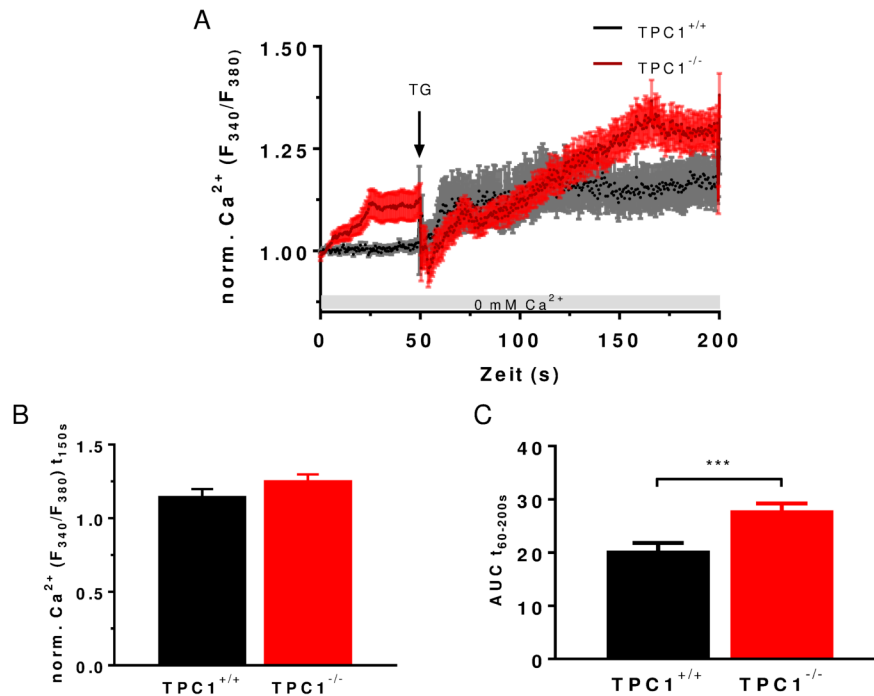


Abb. 51 Zytosolische Thapsigargin-induzierte Ca^{2+} -Signale in TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen unter extrazellulär Ca^{2+} -freien Bedingungen.

An peritonealen Mastzellen wurden Ca^{2+} -Messungen mit dem ratiometrischen Farbstoff Fura-2-AM in Ca^{2+} -freier, 0,5 mM EGTA-haltiger extrazellulärer Lösung durchgeführt. Aus den gemessenen Fluoreszenzsignalen bei 340 nm und 380 nm wurden der Quotient gebildet; Die über die Zeit ermittelten Werte wurden anschließend auf den Basalwert normiert (*norm. Ca^{2+}*) und der Mittelwert von 19 TPC1^{+/+} und 34 TPC1^{-/-} Zellen errechnet. **A** Die Zugabe von Thapsigargin (2 μ M) nach einer Adaptionszeit von 50 s führte zu einem Anstieg der mittleren Ratio der Fluoreszenzsignale von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Zellen. **B** Die Ca^{2+} -Signale nach Thapsigargin Stimulation wurden nach 150 s quantifiziert und als Säulendiagramm dargestellt (*norm. Ca^{2+} (F_{340}/F_{380}) t_{150s}*). **C** Die Thapsigargin-vermittelte Ca^{2+} -Antwort im Zeitraum zwischen 60 s und 200 s wurde durch die Berechnung der Integrale der Mittelwertskurven (*AUC $t_{60-200s}$*) (begrenzt durch eine Gerade durch $y=1$) quantifiziert. Die errechnete Fläche und damit der Einstrom von Ca^{2+} in das Zytosol ist für TPC1^{-/-} Mastzelle signifikant größer ($p=0,0005$).

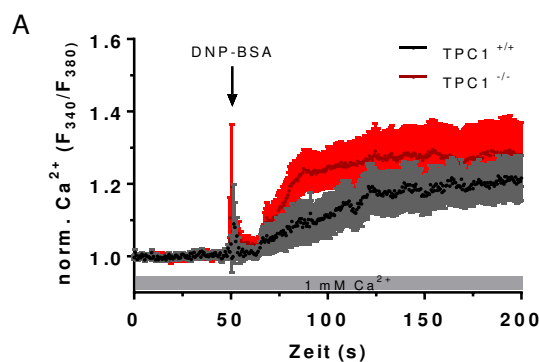
6.6.1.3 Stimulation der Mastzellen mit IgE/DNP-BSA

Da Thapsigargin lediglich durch passive Entleerung des ER eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und dadurch eine Degranulation von Mastzellen auslöst, handelt es sich dabei um einen unphysiologischen Stimulus. Ein klassischer physiologischer Stimulus zur Aktivierung von Mastzellen ist die in Folge einer Antigen-Bindung auftretende Quervernetzung von IgE an der Mastzelloberfläche, die zu einer Dimerisierung der $Fc\epsilon$ -Rezeptoren führt. Dadurch kommt es im Weiteren zu einer PLC-getriggerten Generierung von IP₃ und DAG und schließlich zur Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER (Galli und Tsai, 2012) (s. 3.2.4).

Um diesen Signalweg zu aktivieren, wurden isolierte primäre peritoneale Mastzellen zunächst über Nacht mit einem IgE-Antikörper inkubiert, der gegen das mit BSA gekoppelte Antigen Dinitrophenol (DNP-BSA) generiert wurde (Schema zum zeitlichen

Ablauf der anti-DNP-IgE/DNP-BSA Stimulation s. Abb. 14). Die Zugabe von DNP-BSA während der Ca^{2+} -Messung führt dann zur Quervernetzung der bereits an die Fcε-Rezeptoren gebundenen anti-DNP-IgEs und somit zur Aktivierung der Signalkaskade. Um nun die Bedeutung von TPC1 für die durch IgE Quervernetzung induzierte Ca^{2+} Mobilisierung zu bestimmen, wurden zuerst zytosolische Ca^{2+} -Signale in mit Fura-2 beladenen TPC1^{-/-} Mastzellen im Vergleich zu TPC1^{+/+} Mastzellen in Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} (1 mM) untersucht. Zur besseren Vergleichbarkeit der Signale von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen wurden die Einzelzellmessungen jeweils auf den Mittelwert der ersten zehn Messwerte (=Basalwert) normiert, und dann der Mittelwert aller Messungen gebildet (*norm. Ca²⁺*).

Die kinetische Darstellung der durch Fura-2 generierten Fluoreszenzsignale in Abb. 52 A zeigt zunächst, dass im Zeitraum vor der Zugabe des Antigens (0 – 50 s) keine spontanen Ca^{2+} -Signale der Mastzellen beider Genotypen zu erfassen waren. Die Applikation des Antigens DNP-BSA (t=50 s) führt dann in Wildtyp und TPC1^{-/-} Mastzellen erwartungsgemäß zu einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration; auffällig ist jedoch, dass die Zunahme des Fluoreszenzsignals in TPC1^{-/-} Mastzellen im Vergleich zu Wildtyp Zellen erhöht war. Vor allem zu Beginn des Signals strömten in den TPC1^{-/-} Zellen mehr Ca^{2+} -Ionen in das Zytosol (Abb. 52 A). Die Quantifizierung des Signals zum Zeitpunkt t=125 s (*norm. Ca²⁺ (F₃₄₀/F₃₈₀) t_{125 s}*) dokumentiert nur geringe Unterschiede in der Fluoreszenzintensität (Abb. 52 B); die Analyse der Integrale beider Mittelwertskurven (*AUC t_{50-200 s}*) hingegen zeigt klar, dass der gesamte Ca^{2+} Einstrom über die Zeit in TPC1^{-/-} Mastzellen im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen signifikant (p=0,0001) erhöht ist (Abb. 52 C).



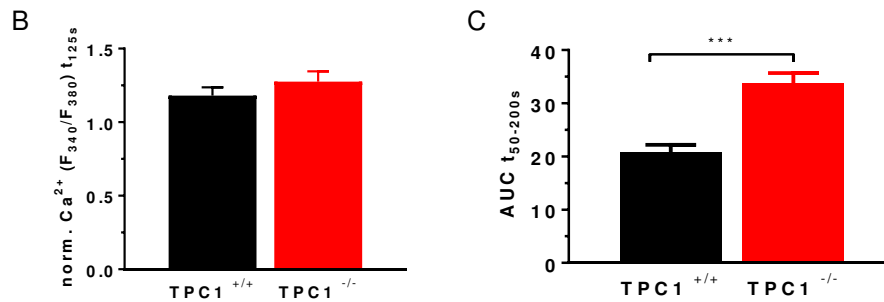


Abb. 52 Stimulierung von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen durch IgE/Antigen-Bindung als physiologischen Stimulus der Degranulation.

Nach der Isolation wurden peritoneale Mastzellen von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mäusen mit 100 nM anti-DNP-IgE über Nacht bei 37 °C, 5 % CO₂ vorinkubiert. 2 h vor Beginn der Ca²⁺-Messung wurden die Zellen erneut mit 100 nM IgE behandelt und anschließend für 30 min mit Fura-2-AM beladen. Um die Daten für Wildtyp und TPC1^{-/-} Mastzellen vergleichen zu können, wurden die erfassten Werte auf den Mittelwert der ersten zehn Messwerte (=Basalwert) normiert. Aus den normierten Ratios der Fluoreszenzsignale von 19 TPC1^{+/+} und 23 TPC1^{-/-} Mastzellen wurden dann die Mittelwerte gebildet. **A** Die Zugabe von DNP-BSA (Endkonzentration 100 nM) erfolgte 50 s nach Start der Messung. Sowohl TPC1^{+/+} als auch TPC1^{-/-} Mastzellen reagierten mit einer Erhöhung des zytosolischen Fluoreszenzsignals auf den Stimulus. **B** Nach 125 s war das Fluoreszenzsignal in TPC1^{-/-} Mastzellen leicht erhöht (*norm. Ca²⁺ (F₃₄₀/F₃₈₀)_{t_{125s}}*). **C** Insgesamt löste die Applikation von DNP-BSA eine verstärkte Ca²⁺-Antwort in TPC1^{-/-} Zellen aus. Die berechnete Fläche unter der TPC1^{-/-} Mittelwertskurve im Bereich zwischen 50 s und 200 s (*AUC t_{50-200s}*) ist signifikant größer ($p=0,0001$).

Auch für IgE/Antigen-vermittelte Ca²⁺-Signale sollte im nächsten Schritt die Rolle der internen Ca²⁺-Speicher näher untersucht werden. Dazu wurde, wie bereits unter 6.6.1.2 beschrieben, die IgE/Antigen-Stimulierung ohne extrazelluläres Ca²⁺ und mit Zusatz des Ca²⁺-Chelators EGTA in der extrazellulären Lösung wiederholt.

Die Applikation von DNP-BSA nach einer Adaptionsphase von 50 s führte auch unter diesen Bedingungen zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität in Zellen beider Genotypen, was bestätigt, dass eine IgE/Antigen-Stimulation tatsächlich zur Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speicherorganellen führt. Das Signal erreichte in TPC1^{+/+} Zellen sein Maximum bei etwa 115 s, in TPC1^{-/-} Mastzellen bei ca. 125 s. Das IgE/Antigen-induzierte Ca²⁺-Signal war auch in Abwesenheit von extrazellulärem Ca²⁺ in TPC1^{-/-} Mastzellen größer als in Wildtyp-Zellen (Abb. 53 A). Eine Quantifizierung der Fluoreszenzsignale zum Zeitpunkt t=125 s zeigte, dass die durchschnittliche Fluoreszenzintensität in TPC1-defizienten Mastzellen signifikant ($p=0,0096$) höher war als in Wildtyp-Zellen (Abb. 53 B). Dieser Befund wird durch die Berechnung der Kurven-Integrale (AUC) noch deutlicher: Die Fläche unter der Mittelwertskurve der Fluoreszenzsignale der TPC1^{-/-} Mastzellen ist signifikant ($p=0,0001$) größer als unter der Kurve der TPC1^{+/+} Mastzellen (Abb. 53 C). Diese Daten führen insgesamt zu dem Fazit, dass, wie bereits für die Thapsigargin Applikation beobachtet (s. Abb. 51), auch nach Aktivierung der Zellen mit IgE/DNP-BSA, im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen, im gleichen Zeitraum mehr Ca²⁺-Ionen in das Zytosol von TPC1^{-/-} Mastzellen gelangen. Da

auch bei dieser Versuchsreihe kein extrazelluläres Ca^{2+} vorhanden war, muss das in das Zytosol einströmende Ca^{2+} auch in diesem Fall aus internen Speichern stammen.

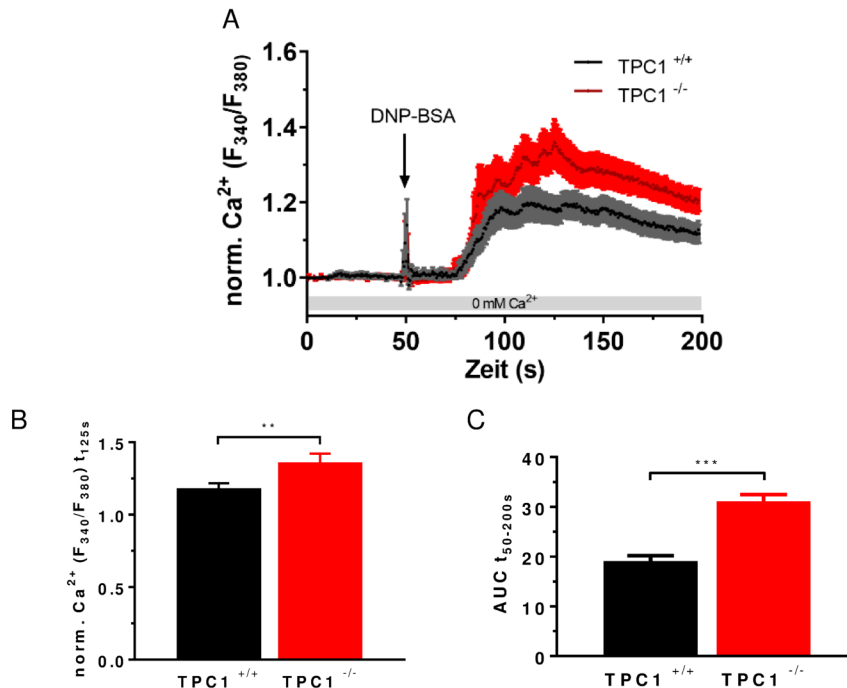


Abb. 53 IgE/DNP-BSA vermittelte Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speicherorganellen von Wildtyp- und TPC1-defizienten Mastzellen.

TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} peritoneale Mastzellen wurden mit anti-DNP-IgE (100 nM) über Nacht und 2 h vor der Stimulation vorinkubiert und in Ca^{2+} -haltiger extrazellulärer Lösung für 30 min mit Fura-2-AM beladen. Unmittelbar vor Start der Messung wurden die Mastzellen in Ca^{2+} -freie, EGTA-haltige extrazelluläre Lösung überführt. **A** Gezeigt sind die Mittelwertkurven der auf den Basalwert normierten Ratios (F_{340}/F_{380}) der Fluoreszenzintensitäten von 36 TPC1^{+/+} und 27 TPC1^{-/-} Zellen (*norm. Ca²⁺*). Nach Applikation von 100 nM DNP-BSA nehmen die durchschnittlichen Fluoreszenzsignale in TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen zunächst in vergleichbarem Maße zu. Nach ca. 100 s erreicht das Ca^{2+} -Signal in Wildtyp-Mastzellen eine Plateauphase, während das Fura-2-Fluoreszenzsignal in TPC1^{-/-} Mastzellen weiter ansteigt. **B** Zum Zeitpunkt $t = 125$ s (*norm. Ca²⁺* (F_{340}/F_{380}) t_{125s}) ist die Fluoreszenzintensität in TPC1^{-/-} gegenüber TPC1^{+/+} Mastzellen signifikant ($p=0,0096$) erhöht. **C** Die zur Beurteilung der gesamten Ca^{2+} -Antwort berechneten Integrale der Mittelwertkurven (AUC) im Zeitraum zwischen 50 s und 200 s (*AUC $t_{50-200s}$*) zeigen ein deutlich stärkeres Ca^{2+} -Signal in TPC1^{-/-} Mastzellen als in Wildtyp-Mastzellen ($p=0,0001$).

6.6.2 Rolle des Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern bei der Degranulation

Die im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen erhöhten Ca^{2+} -Signale in TPC1^{-/-} Mastzellen scheinen ihren Ursprung in den intrazellulären Speichern der Mastzellen zu haben (s. Abb. 51 und Abb. 53). Daher sollte im nächsten Schritt der Ca^{2+} Beladungszustand des ER sowie der Lysosomen in Wildtyp und TPC1-defizienten Mastzellen vergleichend analysiert werden.

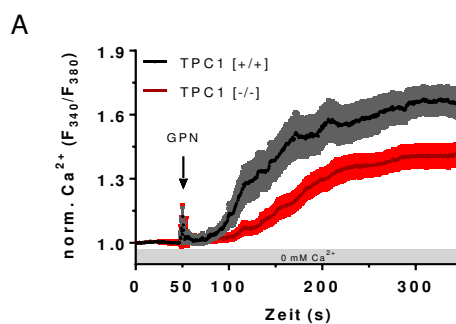
6.6.2.1 Lysosomaler Ca^{2+} Status

Neben dem ER und den Mitochondrien können auch saure Organellen wie sekretorische Vesikel und Lysosomen Ca^{2+} aufnehmen und speichern (Haller et al., 1996; Mitchell et

al., 2001; Contreras et al., 2010). Da die Subtypen der TPC Familie vor allem im endolysosomalen System zu finden sind (Xu und Ren, 2015), wurde untersucht, welche Rolle die endolysosomalen Organellen bei der Generierung von Ca^{2+} -Signalen in $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen spielen.

Lysosomales Ca^{2+} kann durch den Einsatz der Substanz Gly-Phe- β -Naphtylamid (GPN), einem Substrat der lysosomalen Cystein-Protease Cathepsin C, freigesetzt werden. Die Hydrolyse von GPN führt zu einer osmotischen Destabilisierung und zur Permeabilisierung der lysosomalen Membran (Jadot et al., 1984). Zur Messung der so entstehenden Ca^{2+} -Signale im Zytosol wurde der Ca^{2+} -bindende Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM verwendet. Da auch im Rahmen dieser Versuchsreihe Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern detektiert werden sollte, wurde abermals eine extrazelluläre EGTA-haltige, Ca^{2+} -freie Lösung verwendet.

Die Applikation von GPN ($t = 50$ s) resultierte in $\text{TPC1}^{+/+}$ und $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen in einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität in $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen ist aber über den gesamten Zeitraum der Messung deutlich niedriger als in $\text{TPC1}^{+/+}$ Mastzellen (s. Abb. 54 A). Die Quantifizierung des Signals zum Zeitpunkt $t=300$ s, also 250 s nach der Zugabe von GPN, zeigt eine signifikante ($p=0,027$) Reduzierung der Fluoreszenz in den TPC1 -defizienten Mastzellen gegenüber den Wildtyp-Zellen (s. Abb. 54 B). Berechnet man die Flächen unterhalb der Kurven (AUC), so wird die unterschiedliche Stärke der gesamten Ca^{2+} -Signale noch deutlicher: Die AUC der $\text{TPC1}^{-/-}$ Mittelwertskurve ist signifikant ($p<0,0001$) kleiner als die der entsprechenden $\text{TPC1}^{+/+}$ Kurve (s. Abb. 54 C). Lysosomen TPC1 -defizienter Mastzellen enthalten also weniger Ca^{2+} als Lysosomen von Wildtyp-Zellen.



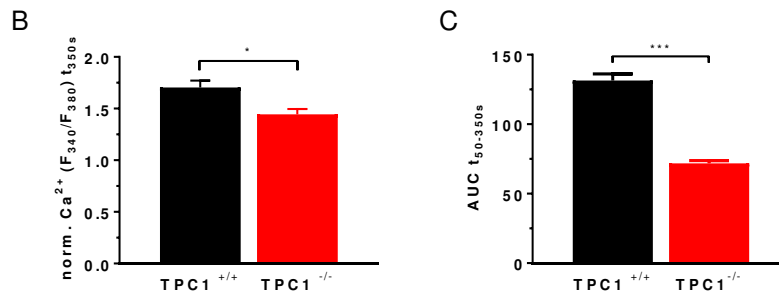


Abb. 54 Zytosolische Ca²⁺-Signale in Mastzellen nach Stimulation mit der Lysosomen-lysiierenden Substanz GPN.

Fura-2-AM beladene TPC1^{+/+} (n=62) und TPC1^{-/-} Mastzellen (n=32) wurden direkt vor Beginn der Messung in Ca²⁺-freie extrazelluläre Lösung mit 0,5 mM EGTA transferiert. **A** Die ermittelten Ratios (F₃₄₀/F₃₈₀) der Fluoreszenzsignale wurden auf den Basalwert normiert und die jeweiligen Mittelwertskurven bestimmt (*norm. Ca²⁺*). Bei t = 50 s wurden 100 µM GPN auf die TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen gegeben, was zu einer starken Zunahme des Ca²⁺-Signals in TPC1^{+/+} und in reduzierter Form auch in TPC1^{-/-} Mastzellen führte. **B** Eine Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten zum Zeitpunkt t=350 s (*norm. Ca²⁺ (F₃₄₀/F₃₈₀) t_{350s}*) zeigte ein signifikant (p=0,027) verringertes Fluoreszenzsignal für die TPC1^{-/-} Mastzellen. **C** Bestimmt man die Integrale der beiden Mittelwertskurven (*AUC t_{60-350s}*), so zeigt sich eine signifikant (p<0,0001) kleinere Fläche für das Integral des TPC1^{-/-} Ca²⁺-Signals.

Insgesamt kann also festgestellt werden, dass die gegenüber Wildtyp-Mastzellen erhöhten Ca²⁺-Signale in TPC1-defizienten Mastzellen nicht durch eine vermehrte Ca²⁺-Freisetzung aus Lysosomen entstehen. Da die intrazellulären Ca²⁺-Speicher miteinander in Kontakt stehen (Raffaello et al., 2016), liegt die Vermutung nahe, dass ein anderer intrazellulärer Ca²⁺-Speicher zum einen für die erhöhten zytosolischen Ca²⁺-Signale und zum anderen für die reduzierte lysosomale Ca²⁺-Konzentration in den TPC1-defizienten Mastzellen verantwortlich ist. So interagieren auch die Komponenten des endolysosomalen Systems und das ER auf der Basis von Kontaktstellen der Membranen miteinander (Kilpatrick et al., 2013). Daher sollte im Folgenden auch der Ca²⁺ Status im ER von Wildtyp und TPC1-defizienten Mastzellen vergleichend analysiert werden.

6.6.2.2 Basaler Ca²⁺ Status des ER

Um mehr über den Ca²⁺-Beladungszustand des ER von Wildtyp- und TPC1-defizienten Mastzellen herauszufinden, wurde der ratiometrische Fluoreszenzfarbstoff Fura-2FF eingesetzt. Dieses Derivat von Fura-2-AM zeichnet sich durch seine niedrige Affinität für Ca²⁺ aus (K_d-Wert von ≈ 35 µM) (Hycr et al., 2000; Paredes et al., 2008) und ist dadurch optimal für Ca²⁺-Messungen im ER, dem größten Ca²⁺-Speicher in der Zelle, geeignet (Paredes et al., 2008; Kaufman und Malhotra, 2014).

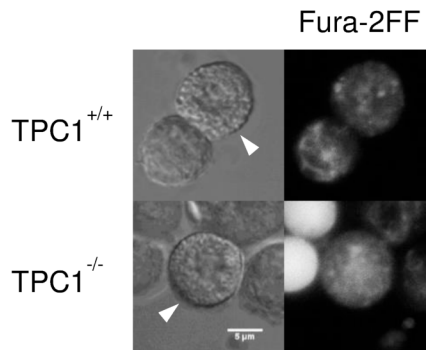


Abb. 55 Konfokale Aufnahmen von Mastzellen nach Beladung mit Fura-2FF.

Nach der Isolation wurden Mastzellen von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mäusen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zur Beladung der Zellen mit dem ratiometrischen niedrig-affinen Ca²⁺-Fluoreszenzfarbstoff Fura-2FF wurden diese für 45 min bei 37 °C mit einer 5 µM Fura-2FF Färbelösung (mit 0,1 % BSA und 0,02 % Pluronic) inkubiert. Mit Hilfe eines konfokalen Mikroskop (LSM 880, Zeiss) wurden Fluoreszenz- (rechts) und Durchlichtaufnahmen (links) der beladenen TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen erstellt. Die Fluoreszenzintensität wurde in Graustufen abgebildet.

In nicht aktivierten Zellen liegt die Konzentration der freien Ca²⁺-Ionen im ER bei ca. 100 - 1000 µM (M. K. Park et al., 2002), was in etwa dem 1000 bis 10000-fachen der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration entspricht. Um den Ca²⁺-Staus des ER im Ruhezustand vergleichend zu analysieren, wurden isolierte peritoneale TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Zellen für 45 min mit Fura-2FF inkubiert. Anschließend wurde zunächst die Beladung der Zellen mit Hilfe eines Konfokalmikroskops überprüft. In Abb. 55 sind Fluoreszenz- und entsprechende Durchlichtaufnahmen von Mastzellen (Pfeilspitzen) beider Genotypen abgebildet. In den Durchlichtaufnahmen (links) sind die dicht mit Granula gefüllten Mastzellen gut von anderen peritonealen Zellen zu unterscheiden. Die Intensität der Fluoreszenz in Wildtyp und TPC1^{-/-} Mastzellen wurde in Graustufen dargestellt. In Zellen beider Genotypen sind über die gesamte Zelle verteilte konzentrierte Areale zu erkennen, die auf eine erfolgreiche Fura-2-FF Beladung des ER hinweisen. Dabei erschien das in den TPC1^{-/-} Mastzellen detektierte Fluoreszenzsignal stärker.

Um den basalen Ca²⁺-Status des ER der Mastzellen zu quantifizieren, wurden die Ratios (F₃₄₀/F₃₈₀) der im Ruhezustand der Zellen gemessenen Fluoreszenzintensitäten gebildet und die Mittelwerte für TPC1^{+/+} (n=49) und TPC1^{-/-} (n=38) Mastzellen berechnet. Dabei stellte sich heraus, dass die Fluoreszenzintensität und somit die Ca²⁺-Konzentration im ER von TPC1^{-/-} Mastzellen unter Ruhebedingungen im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen tatsächlich signifikant (p=0,014) erhöht war (s. Abb. 56).

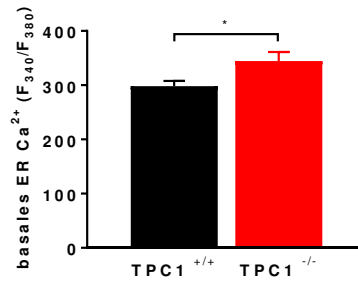


Abb. 56 Basaler Ca²⁺-Beladungsstatus des ER in TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen.

Von 49 TPC1^{+/+} und 38 TPC1^{-/-} Fura-2FF beladenen Mastzellen wurden die Ratios der basalen Fluoreszenzsignale bei 340 nm und 380 nm gebildet. Die Fluoreszenzintensität in TPC1^{-/-} Mastzellen ist gegenüber Wildtyp-Zellen signifikant ($p=0,014$) erhöht.

6.6.2.3 IgE/DNP-BSA

Im nächsten Schritt sollte nun überprüft werden, ob eine IP₃-vermittelte Aktivierung der Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER durch den physiologischen Stimulus der IgE/Antigen-Bindung zu einem vermehrten Ausstrom von Ca²⁺ aus dem ER von TPC1^{-/-} Mastzellen führt. Dazu wurden TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen zunächst mit IgE vorinkubiert und anschließend mit Fura-2FF beladen. Der Stimulus DNP-BSA wurde 50 s nach Start der Ca²⁺-Messung appliziert (s. Abb. 57 A, Pfeil). In Abb. 57 A ist zu sehen, dass die Zugabe von DNP-BSA vor allem in der Mittelwertskurve der TPC1^{-/-} Mastzellen, aber auch in der der TPC1^{+/+} Zellen ein deutliches Artefakt verursacht. Gleichzeitig kommt es zu einer unspezifischen Verschiebung der Fluoreszenzsignale: Während das durchschnittliche Signal in TPC1^{+/+} Mastzellen nach dem Zugabeartefakt niedriger ist als vor der Applikation, verläuft die Mittelwertskurve der TPC1^{-/-} Mastzellen nach der Zugabe von DNP-BSA auf einem erhöhten Niveau. Im weiteren Verlauf kommt es dann bis zum Zeitpunkt $t=100$ s in den Zellen beider Genotypen zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität. Ob diese Zunahme des Fluoreszenzsignals tatsächlich einer physiologischen Erhöhung der ER Ca²⁺-Konzentration als Reaktion auf die Quervernetzung der Fcε-Rezeptoren nach Antigen Bindung entspricht, muss in weiteren Versuchsreihen geklärt werden. Unabhängig davon kommt es aber sowohl in Wildtyp wie auch in TPC1^{-/-} Mastzellen ca. 50 s nach der Zugabe von DNP-BSA ($t=100$ s) zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals.

Um im Folgenden nur die Abnahme der Fluoreszenzsignale durch eine vergleichende Analyse der Kurvenverläufe ab diesem Zeitpunkt zu ermöglichen, wurden die jeweiligen Kurven auf das Maximum nach dem Zugabeartefakt bei ca. 100 s (Abb. 57 B; *norm. Ca²⁺ (F₃₄₀/F₃₈₀) Maximum t_{100s}*) normiert. In der daraus resultierenden Darstellung (s. Abb. 57 C) war deutlich zu erkennen, dass die normierte Fluoreszenzintensität der TPC1^{-/-} Zellen über die Zeit stärker abnimmt als die der TPC1^{+/+} Zellen (*norm ER Ca²⁺ Abnahme*). Da für diese Versuchsreihe die Abnahme der Fluoreszenz in den Mastzellen analysiert

werden sollte, wurden zur Quantifizierung des gesamten Signals über die Zeit ($t=100-350$ s) die Integrale oberhalb der Kurven berechnet. Eine Gerade bei $y=1$ stellte die Begrenzung der Fläche nach oben dar (s. Abb. 57 C, gestrichelte Linie). Die Fläche über der normierten $TPC1^{-/-}$ Kurve ist signifikant ($p<0,0001$) größer, als die über der $TPC1^{+/+}$ Mittelwertskurve (s. Abb. 57 D); über den gleichen Zeitraum gelangte also in $TPC1^{-/-}$ Mastzellen mehr Ca^{2+} aus dem ER in das Zytosol als in $TPC1^{+/+}$ Mastzellen. Die im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen erhöhte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER von $TPC1^{-/-}$ Mastzellen könnte also die in den $TPC1$ -defizienten Mastzellen verstärkte Degranulation erklären.

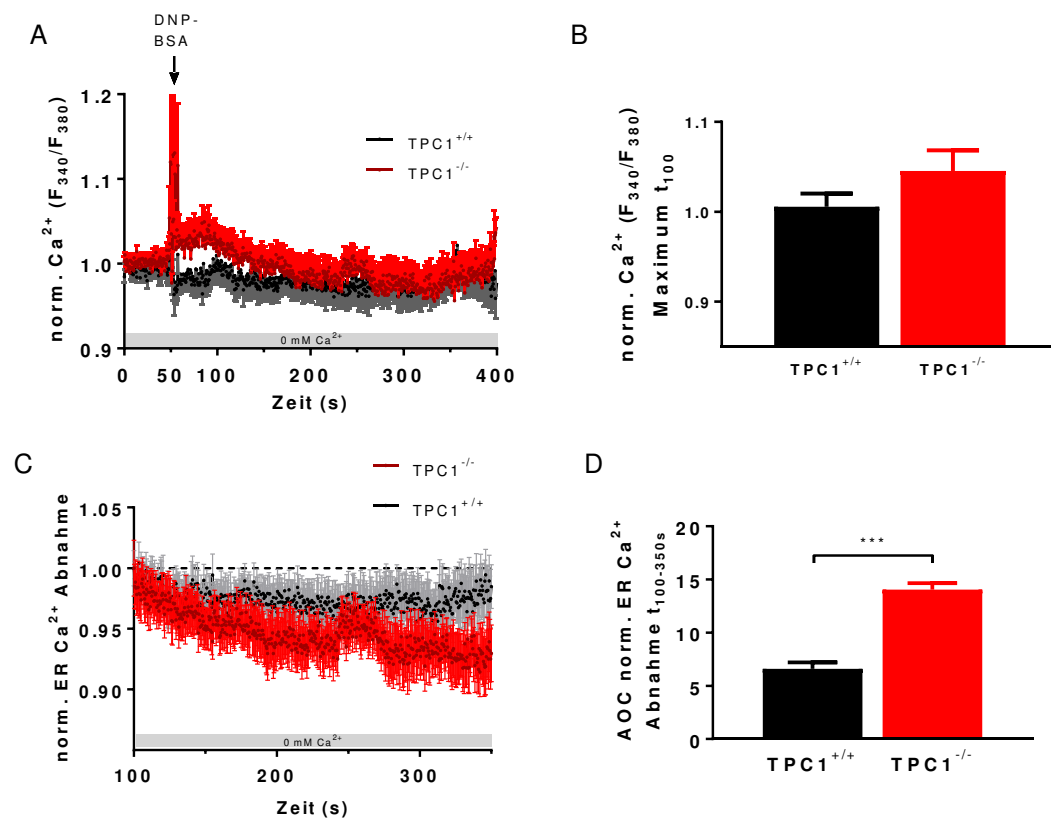


Abb. 57 Veränderung des ER- Ca^{2+} -Status in $TPC1^{+/+}$ und $TPC1^{-/-}$ Mastzellen durch den physiologischen Stimulus der IgE/Antigen-Bindung.

Zur Vorbereitung der Stimulation wurden die isolierten peritonealen Mastzellen aus $TPC1^{+/+}$ und $TPC1^{-/-}$ Mäusen über Nacht und nochmals 2 h vor Beginn der Messung mit IgE (100 nM) inkubiert. Nach der Beladung mit Fura-2FF wurden die Zellen in Ca^{2+} -freie extrazelluläre Lösung mit 0,5 mM EGTA überführt, die Fluoreszenzintensitäten bei 340 nm und 380 nm gemessen und anschließend wurde die Ratio gebildet. ($TPC1^{+/+}$ n=18; $TPC1^{-/-}$ n=17) **A** Durch die Zugabe von DNP-BSA (Endkonzentration 100 nM) bei $t = 50$ s entstanden größere Messartefakte in den Mittelwertskurven der normierten Fluoreszenzintensitäten und es kam zu einer unspezifischen Verschiebung der Fluoreszenzsignale. Danach ist eine leichte Abnahme des Signals in beiden Kurven zu erkennen. (Diese Daten sind als Mittelwert + SEM ($TPC1^{-/-}$) bzw. Mittelwert - SEM ($TPC1^{+/+}$) abgebildet) **B** Die maximalen Fluoreszenzintensitäten ca. 50 s nach Stimulus-Applikation zum Zeitpunkt $t=100$ s wurden quantifiziert ($norm. Ca^{2+} (F_{340}/F_{380}) Maximum t_{100s}$), um die unterschiedlichen Ausgangspunkte der Kurven zu illustrieren. **C** Um diese Verschiebung der Mittelwertskurven auszugleichen, wurden die Datensätze beider Genotypen auf die Fluoreszenzintensitäten bei $t = 100$ s normiert, und die Kurven nochmals für den Zeitraum zwischen 100 s und 350 s dargestellt ($norm. ER Ca^{2+} Abnahme$). Bei $y=1$ wurde eine gestrichelte Linie eingefügt, um die Begrenzung der Fläche für die anschließende Berechnung der Kurven-

Integrale zu verdeutlichen. **D** Die Berechnung der Flächen über den normierten Mittelwertskurven (*AOC norm. ER Ca²⁺ Abnahme t_{100-350 s}*) (Begrenzung nach oben: $y=1$; siehe **C**) ergab eine signifikant ($p<0,0001$) größere Abnahme des gesamten ER-Ca²⁺-Signals über die Zeit.

6.7 Intrazelluläre Lokalisation von TPC1 in Mastzellen

6.7.1 Nachweis von TPC1 in LAMP-1 positiven Zellfraktionen

Die Subtypen der TPC-Familie weisen innerhalb des endolysosomalen Systems unterschiedliche Lokalisationen auf: TPC2 ist fast ausschließlich in Lysosomen zu finden, wohingegen TPC1 vornehmlich in Endosomen, aber auch in Lysosomen lokalisiert ist (Morgan et al., 2011). Die bisher beschriebenen Befunde lassen darauf schließen, dass der Ca²⁺-Beladungszustand der Lysosomen von Mastzellen von der Expression von TPC1 abhängig ist. Daher sollten in weiteren Studien zusätzlich Erkenntnisse über eine mögliche lysosomale Lokalisation von TPC1 in Mastzellen gewonnen werden.

Dazu wurde zunächst eine Isolierung der Lysosomen mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Zwei Sucrosekonzentrationen wurden so gewählt und übereinander geschichtet, dass sich Lysosomen durch Zentrifugation an der Interphase der beiden Sucrosekonzentrations-Schichten auf Grund ihrer spezifischen Dichte anreichern (Repnik et al., 2013). Der Gradient wurde nach der Zentrifugation von oben nach unten in insgesamt elf Fraktionen à 1 ml abgenommen und jeweils gleiche Volumina der Fraktionen zur Bestimmung der TPC1-Lokalisation mit Hilfe der Western-Blot Technik analysiert. Um zu überprüfen, ob sich die Lysosomen in der erwarteten Fraktion befanden, wurde die Lokalisation des lysosomalen Markerproteins LAMP-1 (*lysosomal-membrane associated protein 1*) in den verschiedenen Gradienten-Fraktionen bestimmt (Andrejewski et al., 1999). Da die Anzahl der Mastzellen in der peritonealen Lavage nur sehr gering ist (s. Tabelle 10), wurden zunächst RBL-1 Zellen für die Isolierung der Lysosomen eingesetzt, um so ausreichende Proteinmengen für die Detektion des TPC1 im Western Blot zu erhalten. In Abb. 58 ist ein exemplarischer Western Blot zum Nachweis von LAMP-1 (unten) und TPC1 (oben) in fraktionierten RBL-1 Zelllysaten dargestellt. Da das murine LAMP-1 ein Molekulargewicht von ca. 120 kDa (GenBank Accession Number: AY069968.1) hat, sind die am unteren Rand der Membran in den Spuren 1 bis 7 sichtbaren Banden bei ca. 60 kDa wohl auf unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zurückzuführen. Gleiches gilt wohl auch für die in den Spuren 1 bis 3 erkennbaren scharfen Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 110 kDa. Durch den Einsatz des spezifischen Blockierungspeptids, gegen das der LAMP-1 Antikörper generiert wurde, könnte verifiziert werden, ob es sich tatsächlich um unspezifische Bindungen des Antikörpers handelt. Die in den Fraktionen 7 und 8 zu

erkennenden sehr starken immunoreaktiven Banden bei ca. 120 kDa entsprechen dagegen exakt der zu erwartenden Größe des murinen LAMP-1. Da die Fraktionen 7 und 8 die Interphase der beiden Sucrosekonzentrationen bilden, konnte durch den Nachweis von LAMP-1 die Lysosomenanreicherung in den erwarteten Fraktionen bestätigt werden. In diesen LAMP-1 positiven Fraktionen (7 und 8) ist auch eine starke Expression für TPC1 erkennbar (s. Abb. 58, oben). Zusätzlich zu einer Bande bei ca. 94 kDa ist der charakteristische „Schweif“ der TPC1-Bande zu sehen, der sich über einen Molekulargewichtsbereich von 110 kDa bis 130 kDa zieht.

Um auszuschließen, dass die immunoreaktiven Signale des TPC1- und des LAMP-1 Antikörpers durch einen insgesamt erhöhten Anteil von Proteinen in den Spuren 7 und 8 entstanden sind, wurde der Gesamt-Proteingehalt der einzelnen Fraktionen nach einer erneuten elektrophoretischen Auftrennung der Proben durch eine Coomassie-Färbung der SDS-Gele überprüft. Ein exemplarisches Bild einer solchen Färbung ist in Abb. 58 unter den Western Blots abgebildet. In den ersten drei Spuren ist nach der Proteinfärbung ein deutliches Bandenmuster zu erkennen. In den Spuren 4 bis 11 nimmt die Intensität der Färbung immer weiter ab, bis sie in den letzten drei Fraktionen kaum noch wahrnehmbar ist. In Spur 7 und 8 konnte somit keine generelle Anreicherung von Proteinen durch die Dichtegradientenzentrifugation beobachtet werden, was bedeutet, dass es sich bei den immunoreaktiven Signalen der Primärantikörper um einen spezifischen Nachweis der Proteine LAMP-1 und TPC1 in den entsprechenden Fraktionen handelt.

Der Nachweis der Expression von TPC1 in LAMP-1 positiven Zellfraktionen deutet also insgesamt auf eine lysosomale Lokalisation des Kanals in RBL-1 Zellen hin. Dabei muss aber darauf hingewiesen werden, dass mittels des verwendeten Sucrosegradienten nicht zweifelsfrei zwischen Lysosomen und späten Endosomen unterschieden werden kann, da der Übergang von Endosomen zu Lysosomen teilweise nur schwer abzugrenzen ist und auch LAMP-1 in beiden Organellen lokalisiert ist (Waugh et al., 2011).

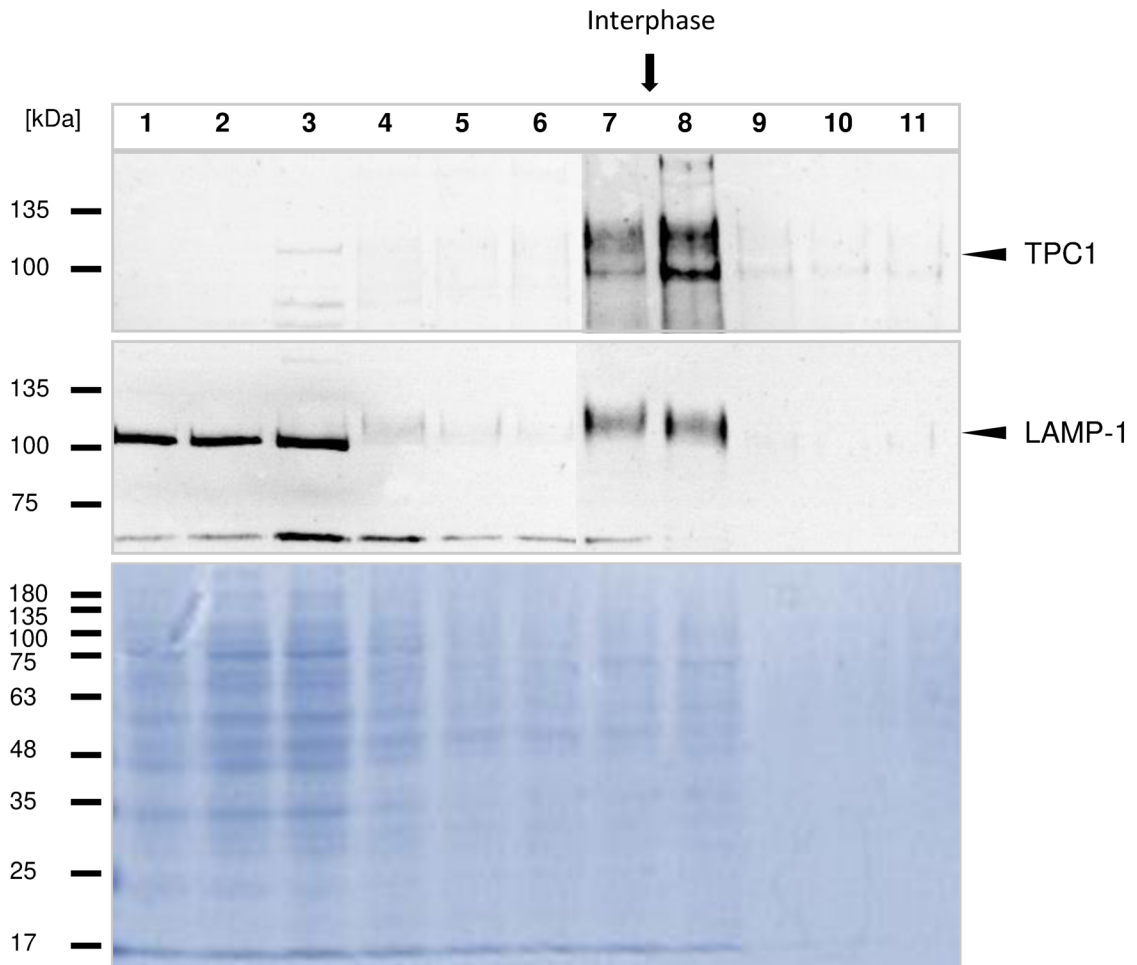


Abb. 58 Nachweis der Lokalisation von TPC1 in lysosomalen Fraktionen von RBL-1 Lysaten.

RBL-1 Zellen wurden lysiert und die Zellkerne abzentrifugiert. In einem Dichtegradienten aus zwei Sucrosekonzentrationen (46 % und 28,8%) wurden die enthaltenen Lysosomen an der Interphase der beiden Konzentrationen (zwischen Fraktion 7 und 8) angereichert. Gleiche Volumina der verschiedenen Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen; nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese mit Hilfe der Western Blot Technik auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und die Proteine TPC1 und LAMP-1 mittels spezifischer Primär- und Spezies-spezifischer Sekundärantikörper detektiert. Abgebildet ist jeweils ein exemplarischer Western Blot (aus vier unabhängigen Versuchen) zur Überprüfung der Lysosomenanreicherung mit Hilfe des Markerproteins LAMP-1 (**mitte**) und zur Analyse der Lokalisation von TPC1 (**oben**). In Spur 7 und 8 sind für beide untersuchten Proteine deutliche immunoreaktive Banden im Bereich der entsprechenden Molekulargewichte (LAMP-1: 120 kDa, TPC1: eigentlich 94 kDa; auf Grund von Glykosylierungen zusätzliche Banden im Bereich darüber) sichtbar. Sowohl die Banden bei ca. 60 kDa in Spur 1 bis 8, als auch die in den Spuren 1 bis 3 knapp unter 120 kDa im mittleren Blot werden vermutlich durch unspezifische Bindungen des LAMP-1 Antikörpers verursacht. Zur Überprüfung des Proteingehalts wurde eine Coomassie-Färbung der Fraktionen nach elektrophoretischer Auftrennung im SDS-Gel durchgeführt (**unten**). Der Proteingehalt nimmt von Fraktion 1 (oben im Gradient) nach Fraktion 11 (unten im Gradient) ab, und die Färbung zeigt keine generelle Anreicherung von Proteinen in den Spuren 7 und 8. Somit kann von einem spezifischen Nachweis von LAMP-1 und TPC1 in den Fraktionen 7 und 8 ausgegangen werden.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Lysosomen auch aus den Zellen der gesamten peritonealen Lavage isoliert, um, wie bereits für die RBL-1 Zellen gezeigt, zu überprüfen, ob eine TPC1 Lokalisation in Lamp-1 positiven Zellfraktionen nachweisbar ist.

Leider war es unter den angewendeten Bedingungen und trotz mehrerer Standardisierungsversuche nicht möglich, LAMP-1 in einer der aufgetragenen Fraktionen mit dem spezifischen LAMP-1 Antikörper nachzuweisen (Abb. 59 unten; Pfeilspitze: Höhe der erwarteten Bande). Bei der Untersuchung der Expression von TPC1 in den Fraktionen zeigte sich jedoch, dass mit Hilfe des spezifischen TPC1-Antikörpers immunreaktive Banden in den Fraktionen 4 bis 8 detektiert werden konnten, die sich über ein Molekulargewicht von 110 – 120 kDa erstrecken. Wie bereits in 6.2 beschrieben, ist diese „schmierige“ Bande typisch für TPC1: In den Proben sind unterschiedlich stark glykosylierte TPC1-Proteine enthalten (Hooper et al., 2011), die oberhalb des eigentlichen Molekulargewichts von 94 kDa detektiert werden. Die Banden in den Fraktionen 4 bis 6 sind gut erkennbar, und die Intensität dieser Signale ist in etwa vergleichbar. Die Bande in Fraktion 7 erscheint im Vergleich dazu intensiver, während in Fraktion 8 nur ein sehr schwaches Signal zu erkennen ist (Abb. 59). TPC1 ist nach der Dichtegradientenzentrifugation der lysierten peritonealen Zellen also auch in denjenigen Fraktionen angereichert, in denen die Lysosomen zu erwarten gewesen wären.

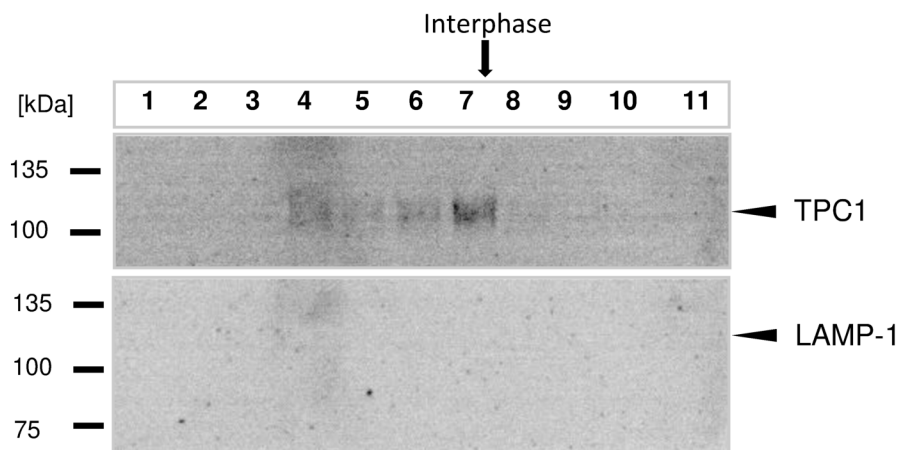


Abb. 59 Expression von LAMP-1 und TPC1 in fraktionierten Lysaten von primären Peritonealzellen.

Durch eine Lavage des Bauchraums von Wildtyp-Mäusen wurden peritoneale Zellen isoliert und anschließend lysiert. Nach Pelletierung der Zellkerne wurde der Überstand auf einen zweischichtigen Sucrosegradienten (46 % bzw. 28,8 %) geladen und ultrazentrifugiert. Die Anreicherung von Lysosomen an der Interphase der beiden Sucrosekonzentrationen sollte durch einen Nachweis des lysosomalen Markerproteins LAMP-1 in den entsprechenden Fraktionen überprüft werden. Gezeigt ist je ein exemplarischer Western Blot (von vier unabhängigen Experimenten) zur Analyse der Lokalisation von LAMP-1 (unten) und TPC1 (oben) in den verschiedenen Fraktionen. Für den LAMP-1 Antikörper konnte kein Signal detektiert werden (Pfeilspitze: erwartete Höhe der Bande). Für TPC1 ließen sich in den Spuren 4 – 8 charakteristische immunreaktive Banden unterschiedlicher Stärke mit ca. 110 kDa -120 kDa nachweisen. Die starke Glykosylierung von TPC1 ist dafür verantwortlich, dass das immunreaktive Signal des Antikörpers für das eigentlich 94 kDa große PriRBITotein auf der Membran im Bereich über dem erwarteten Molekulargewicht zu erkennen ist. Die Größenzuordnung der Banden erfolgte durch den Vergleich mit einem mitgeführten Proteinstandard, der Markerproteine bekannter Größe enthält (links).

Da es sich bei den Peritonealzellen, aus denen die Lysosomen isoliert wurden, um eine gemischte Kultur von Zellen handelte, lassen sich mit den beschriebenen Ergebnissen jedoch keine spezifischen Aussagen über Mastzellen machen.

6.7.2 Immunogold-Färbungen

Eine weitere Methode, die Lokalisation von TPC1 in Mastzellen genauer zu bestimmen, sind elektronenmikroskopische Untersuchungen von Zellen nach Immunogold-Färbungen mit einem spezifischen Antikörper. Die an den Sekundärantikörper gekoppelten Gold-Partikel zum Nachweis der Bindung des Primärantikörpers sind auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen gut zu erkennen und lassen Rückschlüsse über die Lokalisation des betreffenden Proteins zu. In murinen Spermien konnte mit Hilfe dieser Methode bereits gezeigt werden, dass TPC1 in der äußeren akrosomalen Membran zu finden ist (Arndt et al., 2014). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der gleiche TPC1 Antikörper eingesetzt, um TPC1 in Ultradünnschnitten von Mastzellen nachzuweisen. Dabei wurden die isolierten peritonealen Mastzellen einem ähnlichen Fixierungsverfahren unterzogen, das auch bereits für die murinen Spermien angewandt wurde. Im Anschluss an die Fixierung der Mastzellen wurden diese eingebettet und Ultradünnschnitte der Präparate angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte zunächst mit dem TPC1 Antikörper in der bereits für die Spermien etablierten Verdünnung inkubiert und danach mit dem entsprechenden Gold-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Kaninchen IgG) behandelt. Um die Spezifität der Antikörperbindungen zu überprüfen, wurden auch Mastzellen von TPC1-defizienten Mäusen isoliert und für die Immunogoldfärbung mit dem TPC1-Antikörper eingesetzt.

Abb. 60 zeigt auf der linken Seite jeweils Übersichtsaufnahmen von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen (gekennzeichnet mit *) und auf der rechten Seite einen daraus vergrößerten Ausschnitt. Anhand ihrer charakteristischen Morphologie lassen sich Mastzellen leicht von den anderen aus dem Peritoneum isolierten Zellen unterscheiden. Bei Betrachtung sowohl der Übersichtsaufnahmen als auch der vergrößerten Details fällt auf, dass die Ultrastruktur der Zellen sehr schlecht erhalten ist. Möglicherweise könnte die Erhaltung der Morphologie in zukünftigen Studien durch eine Anpassung der Fixierungsbedingungen erreicht werden.

Im vergrößerten Ausschnitt der Wildtyp Mastzelle sind vier Markierungen (rot umrandet) mit Gold-Partikeln zu erkennen. Leider konnten diese Markierungen weder einer bestimmten subzellulären Struktur zugeordnet noch als spezifisch bezeichnet werden, da auch in den TPC1^{-/-} Mastzellen Goldmarkierungen nach Inkubation mit dem TPC1 Antikörper zu finden sind (s. Abb. 60, unten). Unter den gewählten Bedingungen war es

also nicht möglich, die subzelluläre Lokalisation von TPC1 in Mastzellen mit Hilfe von Immunogoldfärbungen zu bestimmen.

Um die Ultrastruktur der Zellen während der Aufarbeitung besser zu erhalten, könnte auch eine sogenannte *Pre-Embedding* Immunogold-Färbung angewendet werden, bei der die Antikörper-Inkubationsschritte vor der Fixierung, dem Einbetten und dem Schneiden der Präparate durchgeführt werden. In ersten Versuchen konnte aber leider weder eine Verbesserung hinsichtlich der Erhaltung der Zellmorphologie noch der Spezifität der Antikörperbindung durch die *Pre-Embedding* Technik erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

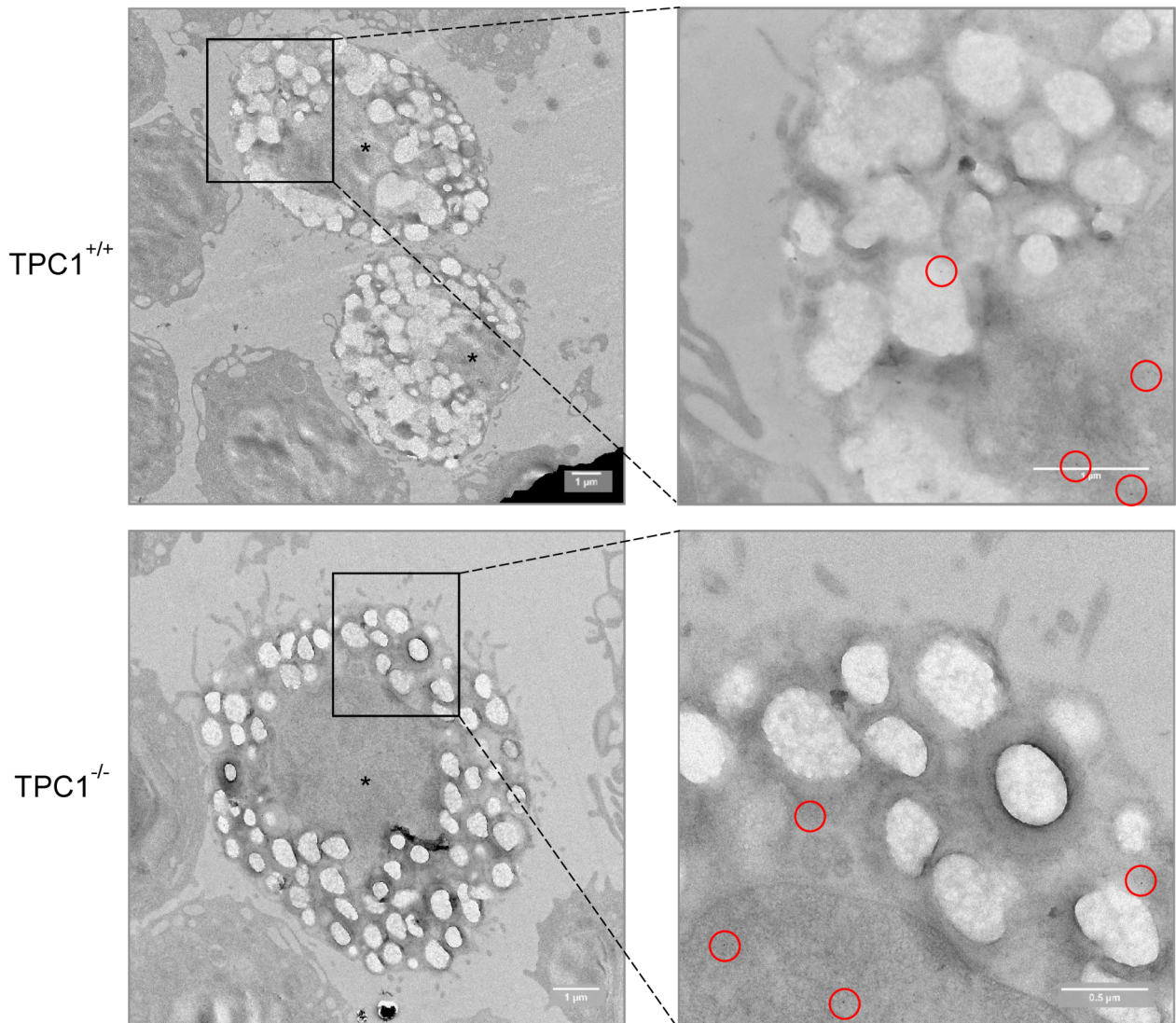


Abb. 60 Analyse der subzellulären Lokalisation von TPC1 durch Immunogold-Färbungen.

Nach der Isolation wurden peritoneale Mastzellen fixiert, unspezifische Antikörper-Bindungsstellen blockiert, und die Zellen mit dem TPC1-spezifischen Primär- und anschließend einem Goldpartikel-gekoppelten anti-Kaninchen IgG inkubiert. Nach dem Einbetten der Zellen wurden Ultradünnschnitte angefertigt und elektronenmikroskopische Aufnahmen von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen gemacht. Auf der linken Seite sind Übersichtsaufnahmen von TPC1^{+/+} (oben) und TPC1^{-/-} (unten) Mastzellen (*) gezeigt. Daraus wurden einzelne Bereiche vergrößert (rechts), um mögliche Goldpartikel-Markierungen zu detektieren (rote Umrandungen). Da sowohl in TPC1^{+/+} als auch in TPC1^{-/-} Mastzellen Goldpartikelmarkierungen zu erkennen sind, handelt es sich hierbei offensichtlich um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers.

6.8 Mediatorfreisetzung aus Wildtyp und TPC1 KO Mastzellen

Die bisherigen elektrophysiologischen Kapazitäts- und Ca^{2+} -Messungen (s. 6.5 und 6.6) haben ergeben, dass eine Defizienz für TPC1 zu einer verstärkten Degranulationsreaktion führt, die möglicherweise auf eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration im ER von TPC1-defizienten Zellen zurückzuführen ist (s. 6.5.1.1 und 6.6.2.2). Um als nächstes gezielt zu überprüfen, ob sich die Veränderung in der Degranulationsreaktion von TPC1^{-/-} Mastzellen auch direkt auf die Sekretion auswirkt, wurde die Freisetzung des Immunmediators Histamin und des Enzyms β -Hexosaminidase vergleichend für TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen analysiert.

6.8.1 Histamin

Mastzellen sind in erster Linie für ihre Rolle bei der IgE-vermittelten allergischen Reaktion bekannt, bei der die Ausschüttung von Histamin von zentraler Bedeutung ist (Amin, 2012). Mit Hilfe eines zeitlich aufgelösten, immunokompetitiven Assays (Histamine-Assay, Cisbio) wurde die Histaminkonzentration in Kulturüberständen von primären peritonealen Mastzellen aus TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mäusen im unstimulierten und stimulierten Zustand bestimmt.

In Abb. 61 A sind zunächst die über einen Zeitraum von 30 min basal freigesetzten Histaminmengen von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen dargestellt. Die durchschnittlich gemessene Konzentration im Überstand von Wildtyp-Mastzellen betrug 71,9 nM; im Überstand von TPC1^{-/-} Mastzellen wurden im Mittel 107,5 nM Histamin gemessen. Normiert man die für die Histaminkonzentration im Überstand von TPC1^{-/-} Mastzellen erfassten Einzelwerte je eines Versuchstags auf den entsprechenden Wert der Wildtyp-Zellen (x-fache Freisetzung), und bildet anschließend den Durchschnitt der x-fachen Freisetzung, so ergibt sich im Mittel sogar eine 1,7-fache signifikante ($p=0,001$) Erhöhung der basalen Histamin-Ausschüttung von TPC1-defizienten Mastzellen im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen (Abb. 61 B).

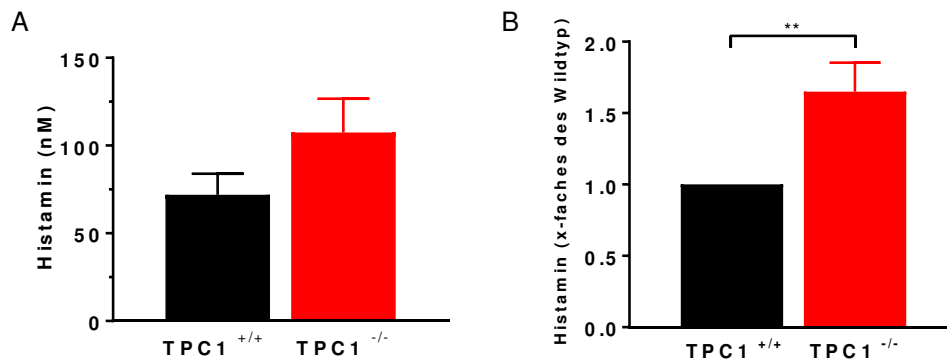


Abb. 61 Basale Histaminausschüttung von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen.

In einem zeitlich aufgelösten immunokompetitiven Assay wurden anhand einer Standardkurve die über 30 min basal freigesetzten Histaminmengen im Kulturüberstand von je 11 unabhängigen Mastzell-Präparationen aus Wildtyp und TPC1-defizienten Mäusen ermittelt. **A** Im Überstand von TPC1^{+/+} Mastzellen wurde durchschnittlich eine Konzentration von 71,9 nM Histamin bestimmt; der Kulturüberstand von TPC1^{-/-} Mastzellen enthielt im Mittel 107,5 nM Histamin. **B** Um die Schwankungen der absolut erfassten Werte innerhalb der Datensätze der Genotypen auszugleichen, wurden die jeweiligen TPC1^{-/-} Einzelmessungen auf den entsprechenden TPC1^{+/+} Wert des jeweiligen Versuchstags normiert und der Durchschnitt der x-fachen Ausschüttung gebildet. TPC1^{-/-} Mastzellen setzen 1,7-mal mehr Histamin frei als Wildtyp-Mastzellen ($p=0,001$).

Zur Stimulation der Histamin-Freisetzung aus den Zellen wurde zum einen der Mastzell-Aktivator Compound 48/80 (*C48/80*) (Paton, 1951), der G-Protein abhängige Prozesse in Mastzellen aktiviert (Mousli et al., 1990), eingesetzt; zum anderen wurde der SERCA-Inhibitor Thapsigargin (*TG*) (Lytton et al., 1991) verwendet. Nach 30-minütiger Inkubation der Zellen mit 30 $\mu\text{g/ml}$ C48/80 bzw. 2 μM TG konnten in den Kulturüberständen der TPC1^{-/-} Mastzellen jeweils erhöhte Histaminmengen festgestellt werden (Abb. 62 A). Da bereits die basale Histaminausschüttung der TPC1-defizienten Mastzellen im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen erhöht war, wurden die Werte der entsprechenden unstimulierten Kontrollen von den stimulierten Werten subtrahiert (Δ *Histamin*), um nur den durch Stimulation freigesetzten Anteil an der gesamten Histaminmenge zu erhalten. Nach Abzug der jeweiligen Basalwerte war festzustellen, dass TPC1^{-/-} Mastzellen nicht nur im Ruhezustand, sondern auch nach Stimulation mehr Histamin ausschütten als Wildtyp-Mastzellen (s. Abb. 62 B).

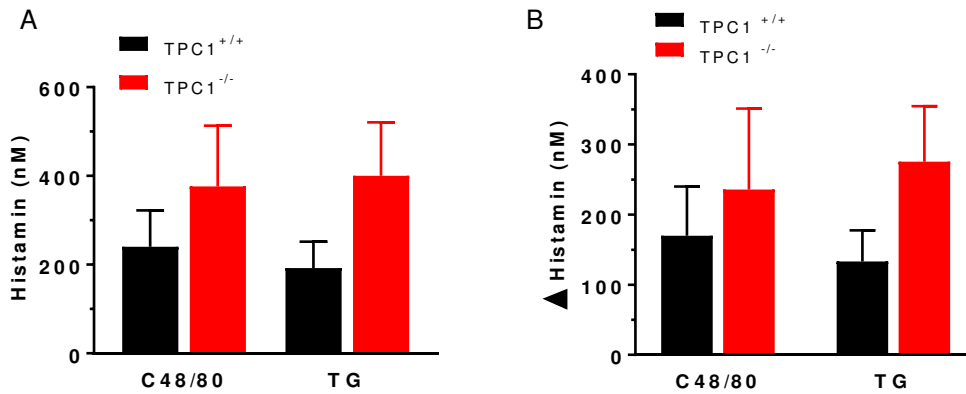


Abb. 62 Stimulierte Histaminfreisetzung primärer peritonealer Mastzellen von Wildtyp und TPC1-defizienten Mäusen.

Durch eine 30-minütige Stimulation mit 2 μ M Thapsigargin bzw. 30 μ g/ml C48/80 wurde die Degranulation von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen ausgelöst. Dabei wurde die Stimulation mit Thapsigargin an Wildtyp und TPC1^{-/-} Mastzellen aus unabhängigen Zellpräparationen von insgesamt vier Mäusen durchgeführt; für die Versuchsreihe zur Stimulation der Mastzellen mit C48/80 wurden jeweils fünf Zellpräparationen von Wildtyp und TPC1^{-/-} Mäusen eingesetzt. **A** Im Kulturüberstand von TPC1^{-/-} Mastzellen wurde für beide Stimuli eine gegenüber Wildtyp-Zellen erhöhte Histamin Konzentration gemessen. **B** Um nur den Stimulationseffekt von C48/80 und TG zu erfassen, wurden die jeweiligen Basalwerte des zugehörigen Genotyps subtrahiert (Δ Histamin).

Um auszuschließen, dass die Ursache für die erhöhte Histaminfreisetzung von TPC1 defizienten Mastzellen möglicherweise nur die Folge einer generell erhöhten Histaminkonzentration in den Zellen ist, sollte auch der totale Histamingehalt in Wildtyp und TPC1^{-/-} Mastzellen vergleichend bestimmt werden. Dazu wurden die peritonealen Mastzellen mit 0,5 % Triton-X 100 lysiert und das Lysat zur Histamin-Bestimmung eingesetzt. In Abb. 63 ist zu sehen, dass der Histamingehalt in TPC1^{-/-} Zellen gegenüber dem in TPC1^{+/+} Zellen gemessenen Gehalt nur leicht erhöht ist. Im Rahmen der Erhebung dieser Daten muss aber einschränkend hinzugefügt werden, dass die gemessenen Konzentrationen in den Lysaten teilweise unterhalb der Werte liegen, die nach Stimulation im Kulturüberstand registriert wurden. Das angewendete Protokoll zur Lyse der Zellen führte also offenbar nicht zur vollständigen Freisetzung des Histamins aus den Zellen. Möglicherweise ist die verwendete Konzentration an Triton-X 100 nicht ausreichend, um alle vesikulären Membranen zu destabilisieren, so dass ein Teil des Histamins in den Granula verbleibt und somit nicht detektiert werden konnte.

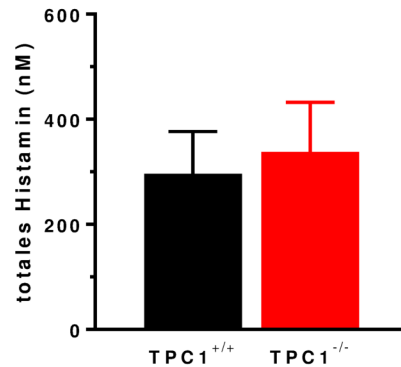


Abb. 63 Gesamter Histamingehalt von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen.

Peritoneale Mastzellen aus drei unabhängigen Zellpräparationen von Wildtyp und TPC1-defizienten Mäusen wurden jeweils für 10 min bei 37 °C mit 0,5 % Triton-X 100 in extrazellulärer Lösung lysiert. Die jeweils an einem Versuchstag erfassten Werte der totalen Histaminkonzentrationen in den Mastzellen beider Genotypen wurden gemittelt und als Säulendiagramm dargestellt. In den Lysaten von TPC1^{-/-} Mastzellen konnte im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen eine leicht erhöhte Histaminkonzentration gemessen werden; die statistische Auswertung der Datensätze zeigte allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen.

6.8.2 β -Hexosaminidase

Neben Histamin schütten Mastzellen auch andere Substanzen wie z. B. Serotonin oder Cytokine aus (Hart, 2001; Ringvall et al., 2008). Ein weiterer Mediator, der von Mastzellen freigesetzt wird, ist das Enzym β -Hexosaminidase, das den Abbau von Glykoproteinen katalysiert, und dem deshalb eine wichtige Rolle bei der Bakterien-Abwehr zukommt (Fukuishi et al., 2014). Die Freisetzung des Enzyms, das wie Histamin in vorgeformten Granula aber auch in Lysosomen gespeichert ist (Moon et al., 2014), erfolgt durch Exozytose der sekretorischen Vesikel. Deshalb kann die β -Hexosaminidase-Ausschüttung, wie auch die Freisetzung von Histamin, als Indikator für die Degranulation von Mastzellen angesehen werden: Zur Untersuchung der β -Hexosaminidase-Freisetzung wurde nach einer 30-minütigen Stimulation der Zellen der Kulturüberstand entnommen, und anschließend wurden die Zellen durch die Zugabe von 0,5 % Triton -X 100 lysiert. Im nächsten Schritt wurden sowohl der Überstand als auch das Lysat der Zellen mit 4-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminid (pNAG), einem Substrat der β -Hexosaminidase, versetzt. Bei der Umsetzung von pNAG durch β -Hexosaminidase entsteht 4-Nitrophenol; durch eine Erhöhung des pH-Werts wird die Aktivität der β -Hexosaminidase inhibiert und die Umsetzungsreaktion gestoppt. Anschließend wird die Absorption des Spaltproduktes 4-Nitrophenol bei 405 nm als Maß für die Aktivität der β -Hexosaminidase in den Proben gemessen. Um den gesamten Enzymgehalt der Zellen zu bestimmen, wurden die im Zellkultur-Überstand gemessenen Absorptionswerte und die in den Lysaten erfassten Werte addiert. Anschließend wurde

der prozentuale Anteil des freigesetzten Enzyms im Überstand am Gesamtgehalt ermittelt.

Zur Etablierung der β -Hexosaminidase-Messung wurde zunächst die basale und die stimulierte Freisetzung des Enzyms aus RBL-1 Zellen analysiert. Für die Stimulation der Enzym-Freisetzung aus den Zellen wurde unter anderem erneut der SERCA-Inhibitor Thapsigargin eingesetzt; zusätzlich sollte durch Vorinkubation der Zellen mit anti-DNP-IgE und anschließender Zugabe des Antigens DNP-BSA (s. Abb. 14) geprüft werden, ob es unter den für diese Arbeit verwendeten Versuchsbedingungen auch in RBL-1 Zellen durch die IgE-vermittelte Aktivierung zu einer Freisetzung der β -Hexosaminidase kommt. Die Ausschüttung des Enzyms in Folge der Antigen-Bindung induzierten IgE-Quervernetzung konnte bereits für eine ähnliche Zelllinie (RBL-2H3) (Tanaka et al., 1991) und für aus Knochenmark-Vorläuferzellen differenzierte Mastzellen (BMMC) (Kuehn et al., 2010) gezeigt werden. Um weiterhin zu überprüfen, ob auch NAADP/TPC-abhängigen Signalwegen bereits bei der Freisetzung der β -Hexosaminidase im Ruhezustand eine Rolle zukommt, wurden zudem der TPC-Inhibitor Tetrandrine (Sakurai et al., 2015) und der NAADP-Antagonist *trans*-Ned 19 (Naylor et al., 2009) auf die Zellen gegeben. Nach 30-minütiger Stimulation mit Thapsigargin (s. Abb. 64; *TG*) bzw. anti-DNP-IgE/DNP-BSA (s. Abb. 64; *IgE/DNP-BSA*) konnte im Vergleich zum unstimulierten Kontrollansatz (s. Abb. 64; *Kontr.*) jeweils ein signifikant erhöhter β -Hexosaminidase-Gehalt im Überstand der Zellen gemessen werden (s. Abb. 64). Es konnte also bestätigt werden, dass die anti-DNP-IgE/DNP-BSA vermittelte Aktivierung der RBL-1 Zellen zur Freisetzung von β -Hexosaminidase führt. Während die Zugabe des TPC-Inhibitors Tetrandrine (s. Abb. 64; *Tet*) zu einer leichten Erhöhung der β -Hexosaminidase Ausschüttung führte, bewirkte die Applikation von 1 μ M *trans*-Ned 19 (s. Abb. 64; *Ned19*) sogar eine signifikant ($p=0,033$) vermehrte Freisetzung des Enzyms. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die TPCs offenbar bereits im unstimulierten Zustand eine regulierende Wirkung bei der Freisetzung des Enzyms β -Hexosaminidase haben und eine pharmakologische Inhibition der TPCs zu einer basal erhöhten Ausschüttung des Enzyms führt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der unter 6.8.1 beschriebenen basal erhöhten Histamin-Freisetzung der TPC1-defizienten Mastzellen. In zukünftigen Studien bleibt zu klären, ob den TPCs zusätzlich auch eine Rolle bei der stimulierten exozytotischen β -Hexosaminidase-Freisetzung in RBL-1 Zellen zukommt.

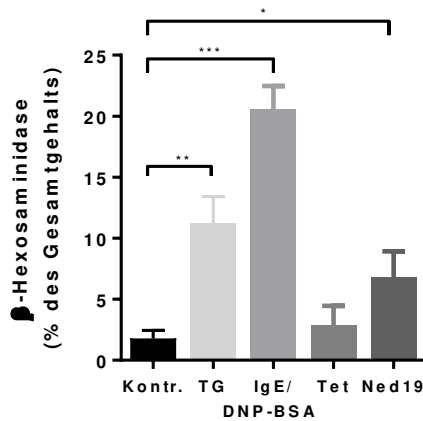


Abb. 64 Basale und stimulierte Freisetzung der β -Hexosaminidase aus RBL-1 Zellen.

RBL-1 Zellen wurden für 30 min mit 2 μ M Thapsigargin (TG), anti-DNP-IgE/DNP-BSA (je 100 ng/ml) (IgE/DNP-BSA), 500 nM Tetrandrine (Tet) oder 1 μ M trans-Ned 19 (Ned19) stimuliert. Für die Stimulation mit IgE/DNP-BSA wurden die Zellen zunächst über Nacht und nochmals zwei Stunden vor der DNP-BSA Zugabe mit anti-DNP-IgE vorinkubiert. Nach der Stimulation wurde der Kulturüberstand abgenommen und die Zellen durch Zugabe von 0,5 % Triton-X 100 lysiert. Überstand und Lysat wurden dann mit 4-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminid (pNAG), einem Substrat der β -Hexosaminidase, versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Erhöhung des pH-Werts gestoppt und die Absorption von 4-Nitrophenol, einem Produkt der enzymatischen Umsetzung von pNAG durch β -Hexosaminidase, bei 405 nm gemessen. Die im Überstand gemessene Absorptionswerte als Maß für die Enzymaktivität der β -Hexosaminidase sind als prozentualer Anteil der addierten Absorptionswerte aus dem Überstand und dem jeweiligen Lysat der Proben dargestellt [β -Hexosaminidase (% des Gesamtgehalts)]. Die Stimulation der RBL-1 Zellen mit TG und IgE/DNP-BSA führte zu einer Erhöhung der Freisetzung von β -Hexosaminidase, die sich teilweise hochsignifikant von der unstimulierten Kontrolle (Kontr.) unterscheidet (TG: $p=0,002$, IgE/DNP-BSA: $p<0,001$). Die Zugabe von Tetrandrine führte zu einer leicht erhöhten β -Hexosaminidase-Freisetzung; die Applikation von trans-Ned 19 resultierte sogar in einer signifikant ($p=0,03$) erhöhten Ausschüttung des Enzyms.

Nachdem für RBL-1 Zellen die Ausschüttung von β -Hexosaminidase erfolgreich als Maß für die Degranulation getestet werden konnte, wurde die basale und stimulierte Freisetzung des Enzyms auch an murinen peritonealen Zellen von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mäusen untersucht. Zur Stimulation der Degranulation wurden die Zellen für 30 min wiederum mit Thapsigargin und, nach einer Vorinkubation mit anti-DNP-IgE, auch mit DNP-BSA behandelt. Zudem wurde der Mastzell-Aktivator C48/80, der über eine Aktivierung von G-Proteinen die Degranulation der Mastzellen vermittelt (Mousli et al., 1990), eingesetzt. Als Kontrollansatz wurden Mastzellen verwendet, auf die statt eines Stimulus reine Pufferlösung gegeben wurde.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass TPC1^{-/-} Zellen im Ruhezustand signifikant ($p=0,04$) mehr β -Hexosaminidase freisetzen als TPC1^{+/+} Zellen (s. Abb. 65; *basal*). Auch nach Stimulation mit Thapsigargin und anti-DNP-IgE/DNP-BSA (s. Abb. 65; TG und IgE/DNP-BSA) wurde ein höherer Anteil an β -Hexosaminidase im Überstand von TPC1^{-/-} Zellen registriert. Nach C48/80 Behandlung konnte dieser Effekt jedoch nicht festgestellt werden (s. Abb. 65; C48/80). Da die durch Thapsigargin bzw. anti-DNP-

IgE/DNP-BSA Zugabe erhöhte Freisetzung der β -Hexosaminidase der TPC1^{-/-} Mastzellen allerdings in etwa der bereits basal vermehrten Enzym-Ausschüttung in diesen Zellen entspricht (s. Abb. 65; *basal*), muss wahrscheinlich davon ausgegangen werden, dass es zu keiner zusätzlich erhöhten β -Hexosaminidase-Freisetzung nach Stimulation in den TPC1-defizienten Mastzellen kommt. Es wäre aber auch vorstellbar, dass die Menge an Substrat in den Proben mit hoher Enzymaktivität nicht ausreichend war, was zu einem ähnlichen Ergebnis führen würde. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten weitere Versuchsreihen mit unterschiedlichen Substrat-Konzentrationen durchgeführt werden.

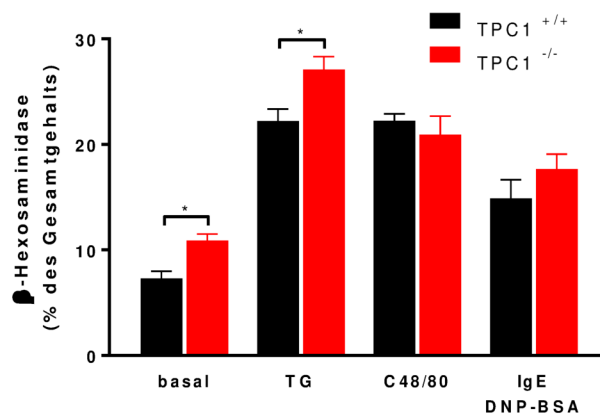


Abb. 65 Freisetzung des Enzyms β -Hexosaminidase im Ruhezustand und nach Stimulation.

TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen wurden für 30 min mit 2 μ M Thapsigargin, 30 μ g/ml C48/80 und nach zweistündiger Vorinkubation mit 100 ng/ml anti-DNP-IgE mit 100 ng/ml DNP-BSA stimuliert. Der Kulturüberstand wurde abgenommen, und die verbleibenden Zellen mit 0,5 % Triton-X 100 lysiert. Überstand und Lysat wurden mit dem Substrat der β -Hexosaminidase, 4-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminid (pNAG), versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Umsetzung des Substrats führte zu einem Farbumschlag und wurde durch Zugabe von Carbonatpuffer (pH 10) gestoppt. Das durch Spaltung von pNAG erhaltene Produkt 4-Nitrophenol konnte durch eine Absorptionsmessung bei 405 nm nachgewiesen werden. Die als Maß für die Enzymaktivität der β -Hexosaminidase gemessene Absorption von 4-Nitrophenol wurde im Überstand und Lysat der Proben bestimmt, und anschließend der prozentuale Anteil des freigesetzten Enzyms berechnet. Im Ruhezustand ist die β -Hexosaminidase-Freisetzung in TPC1^{-/-} Mastzellen signifikant ($p=0,04$) erhöht (*basal*). Die Stimulation der Zellen mit Thapsigargin (TG) führt ebenfalls zu einer signifikant ($p=0,012$) vermehrten Ausschüttung des Enzyms in TPC1-defizienten Mastzellen. Die statistische Auswertung der Datensätze zur Stimulation der Zellen beider Genotypen mit C48/80 und anti-DNP-IgE/DNP-BSA (*IgE/DNP-BSA*) ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und TPC1-defizienten Mastzellen.

6.9 Endozytose in TPC1-defizienten Mastzellen

Während der Exozytose mit der Plasmamembran verschmolzene Vesikelmembran kann über den Mechanismus der Endozytose recycelt werden (Cabeza et al., 2013). Dadurch wird zum einen gewährleistet, dass ausreichend neue Vesikel gebildet werden, so dass weiterhin exozytotische Prozesse ablaufen können, und zum anderen wird

sichergestellt, dass die Zelle im Verlauf einer exozytotischen Reaktion ihre Größe behält. (L. G. Wu et al., 2014) Da die beiden Ca^{2+} -abhängigen Prozesse der Endo- und Exozytose eng miteinander verbunden sind (L. G. Wu et al., 2014), sollte untersucht werden, ob die in $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen registrierte verstärkte Degranulation (s. 6.5.1.1) auch eine veränderte Endozytose zur Folge hat.

Der Fluoreszenzfarbstoff FM1-43 wird durch Endozytose in die Zellen aufgenommen (Balseiro-Gomez et al., 2016) und erlaubt so die Beobachtung des Prozess der Endozytose mit Hilfe konfokaler Mikroskopie (LSM 880, Zeiss) in Echtzeit. Lagert sich der Farbstoff FM1-43 an der Zellmembran an, so wird er teilweise bereits im Zuge der kontinuierlichen Endozytose in die Zelle aufgenommen (Bertrand et al., 2006); nach Stimulation der Zellen mit Thapsigargin, sollte es dann über einen Zeitraum von wenigen Minuten durch aktivierte Endozytose zur weiteren Anreicherung von FM1-43 kommen, die abhängig von der Stärke der vorausgegangenen Exozytose ist (L. G. Wu et al., 2014).

Nach Behandlung der Zellen mit FM1-43 wurden Z-Stapel von Wildtyp und $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen aufgenommen, aus denen für die nachfolgende Analyse Maximumintensitätsprojektionen (MIP) generiert wurden. Um die Veränderungen in der Fluoreszenzintensität von $\text{TPC1}^{+/+}$ und $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen über die Zeit zu quantifizieren, wurde mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware *Image J* die Fluoreszenzintensität in den MIPs der Zellen beider Genotypen zu verschiedenen Zeitpunkten sowie die Hintergrundfluoreszenz bestimmt. Um dann die Fluoreszenzsignale von Wildtyp und $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen miteinander zu vergleichen, wurde für jede analysierte Mastzelle die *corrected total cell fluorescence* (CTCF) berechnet: Dazu wurde die Hintergrundfluoreszenz mit der entsprechenden Zellgröße multipliziert, und der so erhaltene Wert von der für die jeweilige Zelle bestimmten Fluoreszenzintensität abgezogen (McCloy et al., 2014) (s. 5.7.4.3).

In Abb. 66 sind jeweils exemplarische Fluoreszenzaufnahmen FM1-43-beladener $\text{TPC1}^{+/+}$ und $\text{TPC1}^{-/-}$ Mastzellen im Ruhezustand und nach Thapsigargin-Stimulation abgebildet. Unter basalen Bedingungen ist deutlich sichtbar, dass die gut zu erkennenden Mastzellen mit ihrer charakteristischen Morphologie eine diffuse Hintergrundfluoreszenz aufweisen; zudem sind aber auch punktförmige, sehr starke Fluoreszenzspots auszumachen (s. Abb. 66; Pfeile). Insgesamt scheinen die $\text{TPC1}^{-/-}$ Zellen sich aber durch eine deutliche stärkere Fluoreszenz auszuzeichnen. Da es sich bei FM1-43 aber nicht um einen ratiometrischen Farbstoff handelt (Balseiro-Gomez et al., 2016), ist ein direkter Vergleich der Fluoreszenzintensitäten beider Genotypen nur eingeschränkt möglich, da die beobachteten Unterschiede möglicherweise durch eine

unterschiedliche Beladung der Mastzellen mit dem Farbstoff FM1-43 entstanden sein könnten.

Vergleicht man jetzt die Änderung der Fluoreszenzintensität nach Applikation von Thapsigargin, erkennt man, dass direkt (*0 min*) und 5 min nach der Stimulation keine

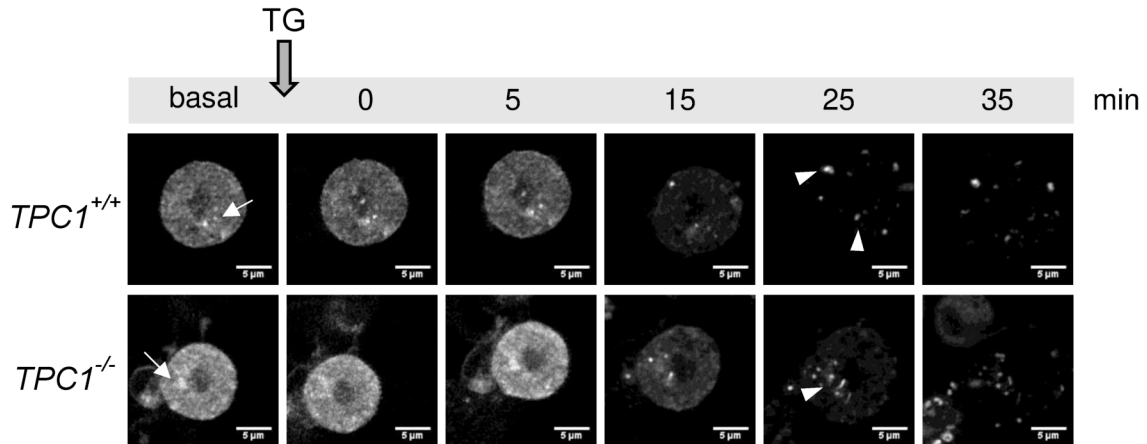


Abb. 66 Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von $TPC1^{+/+}$ und $TPC1^{-/-}$ Mastzellen nach FM1-43-Färbung zur Untersuchung der Endozytose.

Peritoneale Mastzellen wurden für 1 min mit 5 µg/ml FM1-43 auf Eis inkubiert. Mit Hilfe eines Konfokalmikroskops (LSM 880, Zeiss) wurden direkt nach dem Färbeprozess (*basal*) und nach Applikation von 2 µM TG (*0 min*) Z-Stapel der ausgewählten Zellen aufgenommen. Vor der Thapsigargin Stimulation sind konzentrierte Fluoreszenzspots des Farbstoffs FM1-43 in den Mastzellen beider Genotypen zu erkennen (*basal*; Pfeile). Um den zeitlichen Ablauf der Endozytose zu verfolgen, wurden weitere Z-Stapel nach 5, 15, 25 und 35 min aufgenommen. Ca. 25 min nach Thapsigargin Applikation scheinen sich die äußeren abgegrenzten Zellstrukturen aufzulösen; es bleiben jedoch immer noch einige konzentrierte Fluoreszenzspots erkennbar (*25 min*; Pfeilspitzen). Abgebildet sind Maximumintensitätsprojektionen (MIP) exemplarischer $TPC1^{+/+}$ und $TPC1^{-/-}$ Mastzellen. Insgesamt wurden jeweils vier unabhängige Endozytose-Analysen an Mastzellen aus drei Zellpräparationen von Wildtyp und $TPC1^{-/-}$ Mäusen durchgeführt.

Veränderung des Fluoreszenzsignals im Vergleich zum basalen Signal (*basal*) zu beobachten ist. 15 min nach der Zugabe von Thapsigargin scheint die Fluoreszenzintensität dann aber insgesamt für Zellen beider Genotypen abzunehmen; ab 25 min nach der Thapsigargin Stimulation ist dann sogar eine Auflösung der abgegrenzten äußeren Zellstruktur zu erkennen, wobei immer noch einige wenige spotartige konzentrierte Signale sichtbar sind (s. Abb. 66; Pfeilspitzen).

Um nun tatsächlich Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Endozytose zwischen $TPC1^{+/+}$ und $TPC1^{-/-}$ Mastzellen zu erfassen, wurden die Signale quantifiziert: Mit Hilfe des Programms *ImageJ* wurde, wie bereits unter 5.7.4.3 beschrieben, die CTCF zu verschiedenen Zeitpunkten für jeweils vier Mastzellen jedes Genotyps berechnet. Die so erhaltenen Fluoreszenzintensitäten für einen bestimmten Zeitpunkt wurden dann auf das basale Fluoreszenzsignal normiert, um die Reaktionen von $TPC1^{+/+}$ und $TPC1^{-/-}$ Mastzellen über die Zeit vergleichend analysieren zu können.

Abb. 67 zeigt, dass die durchschnittliche normierte CTCF zunächst nach der Aufnahme des Farbstoffs durch unstimulierte Endozytose (*basal*) für Zellen beider Genotypen

abnimmt. Durch die Applikation von Thapsigargin steigt das Fluoreszenzsignal in TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen dann bis zum Zeitpunkt 15 min an und verbleibt schließlich in etwa auf diesem Niveau. Insgesamt ist der Kurvenverlauf für TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Zellen sehr ähnlich; die Kurve der TPC1^{-/-} Mastzellen verläuft aber immer etwas unterhalb der Wildtyp-Kurve. Diese Differenz ist aber zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich zu Wildtyp-Mastzellen, was unter anderem daran liegen könnte, dass die Schwankungen der Messwerte relativ groß sind.

Zusammenfassend zeigt diese initiale Versuchsreihe, dass der Endozytose-Prozess nicht durch die TPC1-Defizienz beeinflusst zu sein scheint. Zu beachten ist allerdings, dass bisher lediglich jeweils vier Zellen jedes Genotyps analysiert wurden. Um eventuelle tatsächliche Unterschiede in den endozytotischen Prozessen von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen aufzudecken, sind also möglicherweise weitere Messungen notwendig.

Zudem muss angemerkt werden, dass der für die Versuchsreihe gewählte Zeitrahmen eventuell angepasst werden muss, um Unterschiede während der Endozytose zwischen Wildtyp und TPC1-defizienten Mastzellen zu erkennen. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass zwar generell eine zeitliche wie auch räumliche Kopplung der Endo- und Exozytose existiert (Haucke et al., 2011), die Regeneration von Granula in Mastzellen aber wesentlich länger als beispielsweise in Neuronen dauern kann (bis zu 72 h) (Lorentz et al., 2012).

Einen weiteren zu standardisierenden Parameter für eine solche Versuchsreihe könnte der verwendete Stimulus darstellen: Thapsigargin blockiert die SERCA irreversibel und führt somit zwar zur Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und zur Degranulation; die anhaltende sehr hohe zytosolische Ca²⁺-Konzentration ist auf Dauer aber toxisch für die Zelle (Soboloff und Berger, 2002). Eine erst zeitverzögert auf die Exozytose folgende Endozytose ist deshalb unter den verwendeten Bedingungen eventuell gar nicht zu beobachten, da in der Mastzelle möglicherweise bereits vorher schon destruktive Prozesse ablaufen.

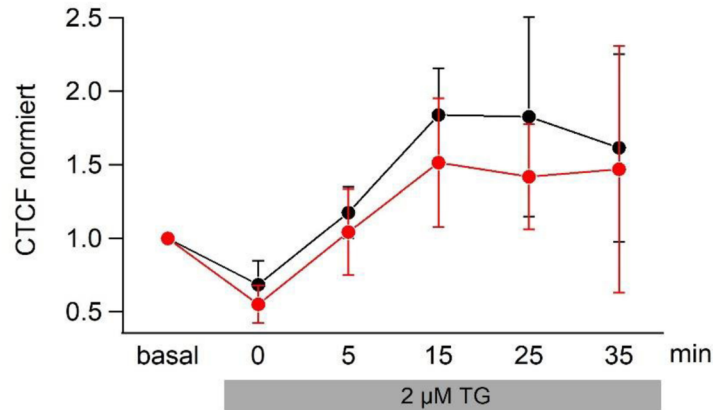


Abb. 67 Zeitlicher Verlauf der Endozytose von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen.

TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff FM1-43 beladen, um anschließend Z-Stapel der gefärbten Zellen mit einem Konfokalmikroskop (LSM 880, Zeiss) aufzunehmen. Zur Stimulation der Exozytose wurde Thapsigargin (TG) (Endkonzentration 2 μ M) appliziert. Aus den Z-Stapeln wurden mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware *ImageJ* Maximumintensitätsprojektionen (MIP) generiert und daraus die korrigierte totale Zellfluoreszenz (CTCF) ermittelt. Die CTCF wurde für jeweils 4 TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen im Ruhezustand (*basal*) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe von Thapsigargin bestimmt und jeweils der Mittelwert \pm SEM für die verschiedenen Inkubationszeitpunkte berechnet.

6.10 Identifizierung möglicher Interaktionspartner von TPC1

6.10.1 Co-Immunoprecipitations-Studien

Zwischen dem endo-lysosomalen System und anderen intrazellulären Ca²⁺-Speichern der Zelle existieren Kontaktstellen, bei deren Formation TPCs eine mögliche Rolle spielen könnten (Kilpatrick et al., 2013). Da für die Entstehung dieser inter-Organellen Kontakte aber direkte oder indirekte TPC-Bindungspartner existieren müssen, wurden verschiedene experimentelle Ansätze zur Identifizierung von TPC-Interaktionspartner durchgeführt. Dies schien auch deshalb sinnvoll, da jüngste Photoaffinitätsstudien mit radioaktivem NAADP gezeigt haben, dass die Aktivierung von TPCs durch NAADP offenbar nicht direkt erfolgt sondern sehr wahrscheinlich über bisher nicht identifizierte Regulatorproteine vermittelt wird (Lin-Moshier et al., 2012).

Um Interaktionspartner von TPC1 zu identifizieren, wurden zuerst (Co-) Immunoprecipitationsstudien (IP) mit dem bereits eingeführten TPC1-Antikörper durchgeführt; die aufgereinigten anti-TPC1-IgG bzw. normale Kaninchen IgG als Negativkontrolle wurden dazu, wie unter 5.5.8.1 beschrieben, an Epoxy-beads (*TPC1-beads*, *IgG-beads*) gekoppelt. Für die IP wurden solubilisierter Totallysate peritonealer Zellen und RBL-1-Zellen mit TPC1 beads oder mit IgG-gekoppelten beads über Nacht inkubiert. Zusätzlich zu den Mastzellen wurden Lysate aus TPC1^{+/+} Hodengewebe eingesetzt; das erschien vielversprechend, da mit dem eingesetzten TPC1-Antikörper eine starke Expression von TPC1 in testikularem murinen Gewebe nachgewiesen wurde

(Arndt et al., 2014) und zudem Hodengewebe in ausreichender Menge zur Verfügung stand.

Um die Effizienz der IP zu überprüfen, wurde die Western-Blot Technik verwendet, wobei der Nachweis des TPC1-Proteins nicht nur für die entsprechenden Eluate (s. Abb. 68, Abb. 69, Abb. 70 *Elution*) durchgeführt wurde sondern zusätzlich für aliquotierte Proben jedes Einzelschritts der IP erfolgte. Im Einzelnen handelte es sich dabei um Aliquots des Gesamt-Lysats (s. Abb. 68, 69, 70 *Lysat*) sowie der pelletierten, nicht-solubilisierten Bestandteile der Proteinproben (s. Abb. 68, 69, 70 *Pellet*). Zusätzlich dazu wurden Aliquots des Solubilisats (s. Abb. 68, 69, 70 *Input*) und des nichtgebundenen Anteils des Solubilisats nach der Inkubation mit den gekoppelten beads (s. Abb. 68, 69, 70 *Durchfluss = DF*) sowie der Waschschriffe (s. Abb. 68, 69, 70 *W*) bezüglich der Präsenz von TPC1 überprüft; auch die Elution der gebundenen TPC1 Proteine von den beads wurde überprüft (s. Abb. 68, 69, 70 *beads*).

Um im ersten Schritt den Erfolg der TPC1-Immunopräzipitation nachzuweisen, wurde die Expression von TPC1 zunächst in den Eluaten der eingesetzten Präparationen untersucht. In allen drei eingesetzten Totallysaten (s. Abb. 68, Peritoneale Zellen [A], Testis [B], RBL-1 Zellen [C]; *Elution*) konnte TPC1 erfolgreich in den entsprechenden Eluaten nachgewiesen werden: Es ist jeweils die für TPC1 charakteristische Markierung zu erkennen, die sich wegen der starken Glykosylierung des Ionenkanals über einen Molekulargewichtsbereich von 90 bis 120 kDa hinzieht. In den parallel durchgeführten Versuchsreihen mit IgG-gekoppelten beads konnte in keinem der Ansätze ein TPC1-Signal im Eluat festgestellt werden (s. Abb. 68 A-C, jeweils unterer Blot), was die Spezifität der durchgeführten Immunopräzipitationen bestätigt.

Bei der Überprüfung der Einzelschritte des verwendeten IP-Protokolls fiel jedoch auf, dass sich für die peritonealen Zelllysate schwache TPC1-Banden im Lysat, im nicht-solubilisierten Pellet und vor allem in der Input Kontrolle sowie im Durchfluss erkennen ließen (s. Abb. 68 A). In den Hoden und RBL-1 Präparationen sind in den ersten vier Spuren sogar relativ starke TPC1-Banden sichtbar (s. Abb. 68 B und C); TPC1 ist also, wie erwartet, in allen eingesetzten Totallysaten und in der solubilisierten Input-Fraktion nachzuweisen. Der noch sehr starke Nachweis von TPC1 in der Pellet-Fraktion der Hoden- und RBL-1-Präparationen deutet allerdings darauf hin, dass die Detergenzmenge (0,1 % Natriumdesoxycholat) sowie die mechanischen Solubilisierungsbedingungen offenbar für eine vollständige Solubilisierung nicht ausreichen. Zudem war eine TPC1-Bande auch in der Durchfluss-Spur der Hoden- und RBL-1-Präparationen zu erkennen (Abb. 68 B und C), was vermuten lässt, dass nur ein Teil des vorhandenen TPC1 in der Probe durch die Antikörper-gekoppelten beads gebunden wurde.

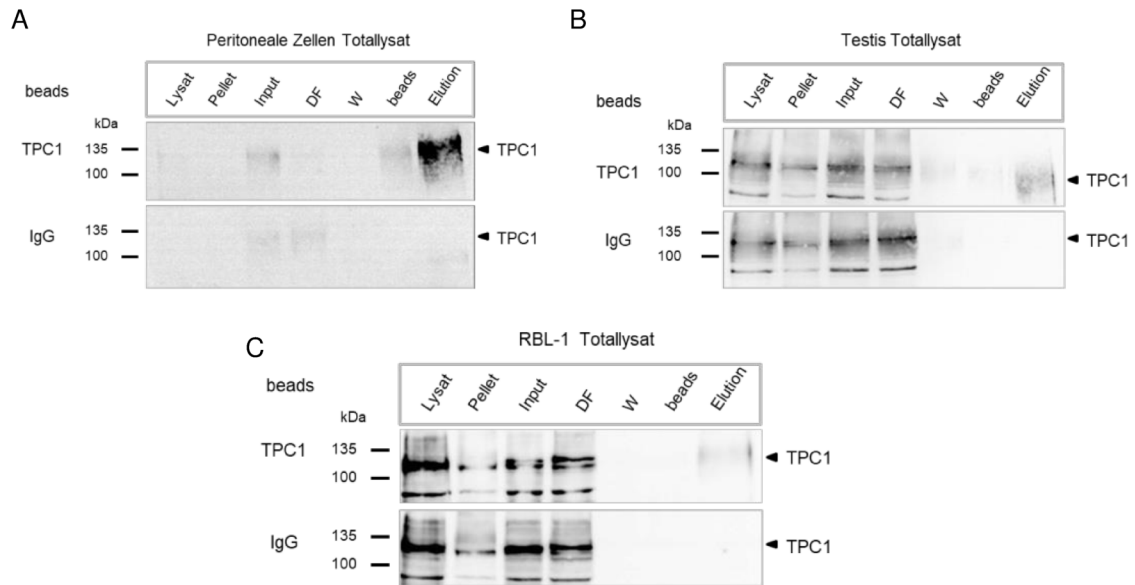


Abb. 68 Immunopräzipitation von TPC1 aus unterschiedlichen Zell- bzw. Gewebe-Lysaten. Totallysate (Lysat) von Peritonealen Zellen (**A**), Testisgewebe (**B**) und RBL-1 Zellen (**C**) wurden mit 0,1 % Natriumdesoxycholat und 1 mM EDTA solubilisiert, zentrifugiert (Pellet) und der Überstand (Input) mit TPC1-Antikörper gekoppelten Epoxy-beads versetzt. Nicht gebundenes Material (DF) wurde abgenommen und die beads anschließend gewaschen (W). Durch den Einsatz eines SDS-haltigen Elutionspuffer wurden gebundene TPC1-Proteine wieder von den Epoxy-beads (beads) getrennt. In allen Eluat (Elution) konnte die Anwesenheit von TPC1 und somit eine erfolgreiche IP bestätigt werden. Die molekulare Masse des TPC1 und damit die Höhe, in der die Markierung zu erwarten ist, ist durch einen Pfeil auf der rechten Seite der Western Blots gekennzeichnet. Um die Spezifität der IP zu überprüfen, wurden zusätzlich normale Kaninchen-IgG-gekoppelte beads eingesetzt (jeweils unterer Blot). In den entsprechenden Eluat dieser IgG-Negativkontrollen konnte TPC1 nicht nachgewiesen werden. Gezeigt sind repräsentative Western Blots der drei Zell/Gewebe-Lysate von mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen. Auf der linken Seite der Western Blots ist jeweils der parallel mitgeführte Molekulargewichtsstandard dargestellt.

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob Proteine, die bereits als mögliche Interaktionspartner von TPC1 diskutiert werden, oder die auf Grund ihrer Funktion als TPC1-Bindungspartner in Betracht kommen könnten, in den TPC1 Immunopräzipitationen nachweisbar sind. Da die Signalstärke der TPC1-Bande im Eluat der RBL-1 Zelllysate (s. Abb. 68 C) im Vergleich zu den TPC1-Banden in den Eluatfraktionen der Lysate der peritonealen Zellen und des Hodengewebes (s. Abb. 68 A und B) eher relativ schwach waren, wurden zunächst nur die Immunopräzipitationen aus peritonealen Zellen und Hodengewebe auf eine Co-Immunopräzipitation anderer Proteine untersucht.

Im Zusammenhang mit der NAADP-Trigger-Hypothese und dem damit einhergehenden CICR (s. 3.3) spielen die TPCs auf Seiten der sauren Organellen und der IP₃-Rezeptor auf der Seite des ER eine wichtige Rolle (Calcraft et al., 2009). Eine Kolokalisation von TPC1 und dem IP₃R in spezialisierten Kompartimenten von Membranen, den

sogenannten Lipid rafts, die dem Clustering von Signalmolekülen dienen (Lingwood und Simons, 2010), konnten wir in unserem Labor bereits für Spermien nachweisen (Arndt et al., 2014).

In den hier vorgestellten Co-IP Versuchsreihen wurde der IP₃R mit einem polyklonalen Antikörper nachgewiesen, der gegen den ubiquitär exprimierten Subtyp IP₃R1 (Arruda und Hotamisligil, 2015) generiert wurde. Dabei zeigte sich allerdings, dass der IP₃R1 weder in den Lysaten peritonealer Zellen noch in einer der anderen Fraktionen nachzuweisen war (Abb. 69 A; linker Blot). Für die Hodenproben zeigte sich in den Lysaten, der Input- und der Durchfluss-Fraktion zwar eine schwache Bande oberhalb der 180 kDa Markerbande, die wahrscheinlich dem IP₃R-Protein mit einer Masse von ca. 310 kDa entspricht. Da aber in der nicht-solubilisierten Pellet-Fraktion die stärkste immunoreaktive Bande zu erkennen ist, muss davon ausgegangen werden, dass ein großer Anteil des in der Probe enthaltenen IP₃R-Proteins unter den hier eingesetzten Solubilisierungsbedingungen nicht in Lösung gebracht werden konnte, und somit eine Interaktion zwischen TPC1 und dem IP₃R in der Elutions-Fraktion experimentell nicht möglich war (s. Abb. 69 A; rechter Blot).

Neben der Rolle der TPCs für die Kommunikation mit der ER kommt den TPCs eine wichtige Rolle bei der Fusion von endolysosomalen Vesikeln zu (Grimm et al., 2014; J. Castonguay et al., 2017). Dabei scheint das Zusammenspiel mit Mitgliedern der Rab-GTPase-Familie von besonderer Bedeutung zu sein (Marchant und Patel, 2015). Die bisherigen Studien haben sich unter anderem auf Rab5 konzentriert, das als Marker für frühe Endosomen angesehen wird, wobei es deren Fusion und Reifung reguliert (Bucci et al., 1992). In humanen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (HeLa Zellen) konnte z. B. bereits eine Kolo-kalisation von Rab5 und TPC1 gezeigt werden (J. Castonguay et al., 2017). Und auch in anderen humanen Zelllinien wurde Rab5 mit Hilfe von Massenspektrometrie als potenzieller Interaktionspartner von TPC1 identifiziert (Lin-Moshier et al., 2014).

Unsere Co-IP Studien mit TPC1-gekoppelten beads haben dazu gezeigt, dass Rab5 (Molekulargewicht ca. 25 kDa) weder in den peritonealen Zellen noch in den Immunopräzipitaten des Hodens mit TPC1 interagiert (s. Abb. 69 B). Allerdings muss dazu angemerkt werden, dass auch hier offenbar eine stärkere Solubilisierung erforderlich gewesen wäre, da Rab5 ausschließlich in den Lysaten und in den nicht-solubilisierten, pelletierten Zellbestandteilen nachzuweisen war (s. Abb. 69 B). Es lässt sich somit auch über Rab5 als TPC1-Interaktionspartner in den untersuchten Geweben und Zellen bisher keine finale Aussage treffen.

Ein weiterer interessanter und vielversprechender potentieller Interaktionspartner von TPC1 könnte das Regulatorprotein IRBIT (*IP₃R binding protein released with inositol*

1,4,5-trisphosphate) sein. IRBIT ist ein endogener kompetitiver Antagonist für den IP₃R (Ando et al., 2003; Devogelaere et al., 2008), der mit IP₃ um dessen Bindedomäne am Rezeptor konkurriert, so dass eine erhöhte IP₃-Konzentration erforderlich ist, um den Ionenkanal zu öffnen und Ca²⁺ aus dem ER freizusetzen (Ando et al., 2006). Kürzlich konnte in einer Studie sogar gezeigt werden, dass IRBIT im Zusammenspiel mit dem IP₃R die Bildung von Kontaktstellen zwischen dem ER und Mitochondrien vermittelt (Bonneau et al., 2016). Darüberhinaus hat sich insgesamt herausgestellt, dass IRBIT nicht nur mit dem IP₃R interagiert, sondern einen Bindungspartner für eine Vielzahl anderer Ionenkanäle aber auch Transportproteine darstellt (Bonneau et al., 2016; Borth et al., 2016). Auf der Grundlage dieser Befunde sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob eine Interaktion zwischen IRBIT und TPC1 stattfindet. In den TPC1-positiven Eluaten aus peritonealen Zellen und Testislysaten konnten tatsächlich immunoreaktive IRBIT-Banden mit einer Größe von ca. 60 kDa detektiert werden. Allerdings sind Banden dieses Molekulargewichts auch in den Kontrollansätzen mit IgG-gekoppelten beads zu sehen (s. Abb. 69 C). Die Anwesenheit von IRBIT in den Eluaten kann also nicht ausschließlich auf eine Interaktion mit TPC1 zurückgeführt werden.

Ergebnisse

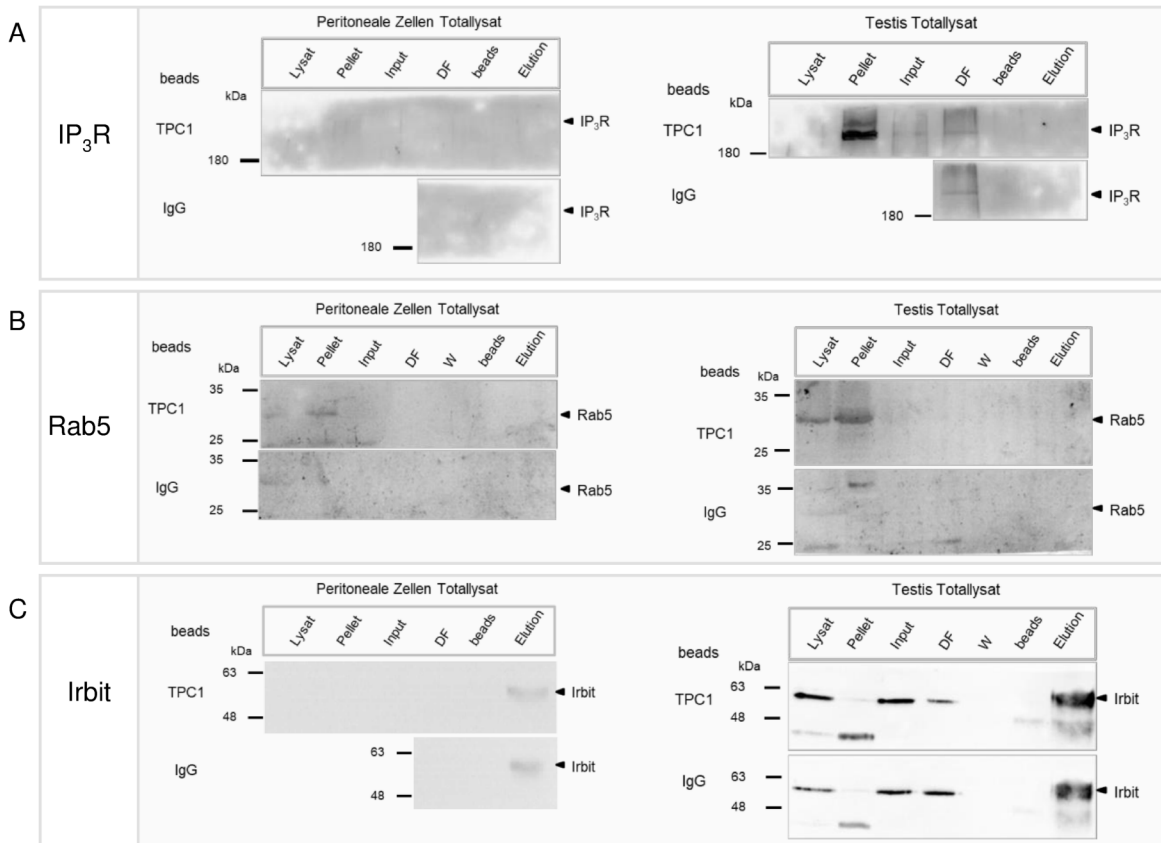


Abb. 69 Versuch der Co-Immunopräzipitation potentieller Interaktionspartner von TPC1. Nach Immunopräzipitation von TPC1 mit Antikörper-gekoppelten Epoxy-beads wurden die Elutionsfraktionen von peritonealen Zelllysaten (links) und Testislysaten (rechts) mit Hilfe der Western Blot Technik auf Anwesenheit des IP₃R (**A**), von Rab5 (**B**) und dem Regulatorprotein IRBIT (**C**) untersucht. Zur Überprüfung der Spezifität der Immunopräzipitation wurden die entsprechenden Antikörper auch für Kontrollansätze mit IgG-gekoppelten beads verwendet. Das zu erwartende Molekulargewicht der Banden ist jeweils durch einen Pfeil auf der rechten Seite der Western Blots markiert. Lediglich mit dem IRBIT Antikörper (**C**) ist eine Bande in den Elutions-Fractionen sowohl für die peritonealen Zellen als auch für das Testisgewebe zu erkennen, die allerdings auch in den zugehörigen IgG-Kontrollansätzen zu finden ist. Abgebildet sind exemplarische Western Blots von jeweils mindestens zwei Versuchsansätzen. Die Banden des parallel mitgeführten Molekulargewichtsstandards sind auf der linken Seite jedes Western Blots dargestellt.

Unter den verwendeten Bedingungen konnte also keine Interaktion von TPC1 mit dem IP₃R, Rab5 oder IRBIT nachgewiesen werden, was unter anderem auf die nicht ausreichend optimierten Solubilisierungsbedingungen zurückzuführen ist. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass ein Interaktionsnachweis nach Anpassung der experimentellen Bedingungen während der Immunopräzipitation gelingen kann.

Lipid rafts oder auch Lipidflöße sind speziell organisierte Membranbereiche, die besonders reich an Sphingolipiden und Cholesterin sind (Simons und Ikonen, 1997; Pike, 2009). Diese spezialisierten Mikrodomänen kompartimentieren zelluläre Prozesse, sodass eine effiziente Signaltransduktion erfolgen kann, und stellen daher eine Plattform für Protein-Interaktionen dar (Pike, 2003). Studien aus unserem Labor haben gezeigt, dass TPC1 in Lipid rafts, die aus Spermien isoliert wurden, nachgewiesen werden konnte

(Arndt et al., 2014). Die Isolation von Lipid rafts und deren Einsatz in einer Co-IP sollte eine gezielte Analyse potentieller TPC1-Bindungspartner ermöglichen; gleichzeitig könnten dadurch zelluläre Komponenten, die eventuell für die unspezifischen Bindungen von IRBIT verantwortlich sind, im Vorfeld der Immunopräzipitation eliminiert werden. Aus diesen Gründen wurden Lipid rafts aus peritonealen Zellen, RBL-1 Zellen und Testisgewebe isoliert und anschließend für die Immunopräzipitation eingesetzt.

TPC1 konnte in allen Elutions-Fractionen aus Lipid rafts erfolgreich nachgewiesen werden. In den jeweiligen IgG-Kontrollansätzen war in den Eluat-Spuren kein immunoreaktives Signal mit dem TPC1-Antikörper zu erkennen. Lediglich in den Eluaten von IgG-gekoppelten beads, die mit Lipid rafts aus RBL-1 Zellen versetzt wurden, war eine schwache TPC1-Bande sichtbar (s. Abb. 70 A-C, links). Deshalb wurden nur Lipid rafts von peritonealen Zellen und Hodengewebe auf eine Interaktion von IRBIT und TPC1 untersucht. In den Elutions-Fractionen war erneut jeweils sowohl bei Verwendung von TPC1- als auch IgG-gekoppelten beads eine IRBIT-Bande sichtbar. Im Falle der peritonealen Zellen ist die entsprechende Bande bei den IgG-Kontrollansätzen sogar deutlich stärker (s. Abb. 70 A und B, rechts). Die Verwendung von Lipid rafts führte also nicht zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen des IRBIT-Antikörpers.

Um auszuschließen, dass es sich bei den vermeintlichen IRBIT-Banden in den Kontrollansätzen mit IgG-gekoppelten beads tatsächlich nur um eine unspezifische Bindung des IRBIT-Antikörpers handelt, ist es notwendig, weitere Western-Blot Versuchsreihen, beispielsweise mit anderen Blockierungsbedingungen, durchzuführen. Alternativ könnten die Studien auch mit anderen *beads* oder einem anderen IRBIT-Antikörper wiederholt werden. Zudem könnte überprüft werden, ob TPC1 in Immunopräzipitaten des IRBIT-Antikörpers nachzuweisen ist.

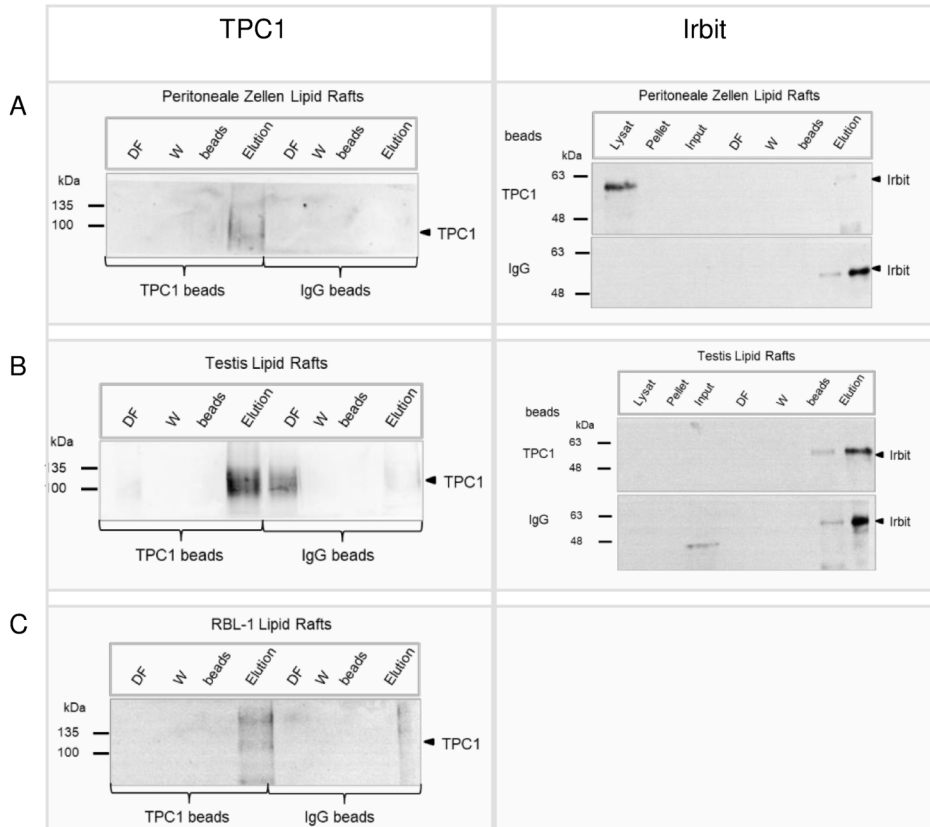


Abb. 70 (Co)-Immunopräzipitation von TPC1 und IRBIT in lipid rafts.

Lipid rafts wurden durch die Verwendung von kalten, nicht-ionischen Detergenzien (Triton-X 100) aus peritonealen Zellen (A), Testisgewebe (B) und RBL-1 Zellen (C) extrahiert und nach einer Solubilisierung für eine Immunopräzipitation eingesetzt. In allen Elutionsfraktionen konnte TPC1 nachgewiesen werden (A-C, links). Nur in Kontrollansätzen mit IgG-gekoppelten beads von RBL-1 Zellen wurde ebenfalls ein Signal detektiert (C). Die TPC1-positiven Eluate von *lipid rafts* aus peritonealen Zellen und Testisgewebe wurden auf spezifische Signale des IRBIT-Antikörpers untersucht. Allerdings konnten immunoreaktive Banden sowohl in den Ansätzen mit TPC1-beads als auch mit IgG-beads nachgewiesen werden. Gezeigt sind exemplarische Western Blots von jeweils mindestens zwei Versuchsansätzen. Die Höhe der zu erwartenden Banden wurde jeweils durch Pfeile auf der rechten Seite der Western Blots gekennzeichnet. Der parallel mitgeführte Molekulargewichtsstandard ist jeweils auf der linken Seite der Western Blots dargestellt.

Durch die bisherigen hier vorgestellten Studien konnten also keine Interaktionspartner von TPC1 identifiziert werden. Da einer der Gründe für diese durchweg negativen Befunde darin liegen könnte, dass die Methode des Western Blots eventuell nicht sensitiv genug ist, um gezielt Interaktionen von TPC1 nachzuweisen, wurden an den entsprechenden Immunopräzipitationen massenspektrometrische Analysen durchgeführt.

6.10.2 Massenspektrometrische Analyse

Um zu untersuchen, welche Proteine sich in den Immunopräzipitaten des TPC1-Antikörpers aus Totallysaten von Hodengewebe bzw. peritonealen Zellen befinden, wurde in Kooperation mit Frau Dr. Claudia Fecher-Trost vom Institut für experimentelle

Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes, massenspektrometrische Analysen der IP-Proben durchgeführt (s. 5.5.8.4). Zur Überprüfung der Spezifität wurden auch hier Kontrollansätze, für die IgG- statt TPC1-gekoppelte Epoxy-Beads verwendet wurden, analysiert.

Nach einem Trypsin-Verdau der in den Immunopräzipitaten des TPC1-Antikörpers enthaltenen Proteine wurden die entstehenden Peptide in einem Massenspektrometer analysiert, und die Ergebnisse mit Angaben der Datenbank des Protein-Massenspektrometrie Analyse-Programms Mascot abgeglichen. Als Co-Immunopräzipitate, und damit potentielle Interaktionspartner, von TPC1 wurden nur die Proteine gewertet, von denen zwei oder mehr Peptide in den TPC1-Antikörper-Immunopräzipitationen identifiziert wurden, und die kein entsprechendes Signal in den Kontrollansätzen zeigten. Alternativ wurde auch ein, im Vergleich zum Kontrollansatz, fünffacher Überschuss eines nachgewiesenen Peptids in den TPC1-Immunopräzipitaten als positive Immunopräzipitation beurteilt (Nele Weber, 2014).

Auf diese Weise konnten neben TPC1 (9 Peptide) in den Hodengewebe-Lysaten insgesamt 446 Proteine identifiziert werden, die potenziell mit TPC1 Komplexe bilden könnten. Leider war es nicht möglich, TPC1 Peptide in den Totallysaten der peritonealen Zellen nachzuweisen, weshalb im Folgenden nur die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Hodengewebe-Totallysate ausgeführt werden. In Tabelle 12 sind verschiedene Proteine mit der Anzahl der in den Totallysaten von Hodengewebe detektierten Peptide aufgeführt; diese Proteine wurden entweder wegen ihrer bereits bekannten Funktionen oder auf Grund von Ergebnissen vorangegangener massenspektrometrischer Analysen an anderen Modellsystemen als mögliche TPC1 Interaktionspartner eingestuft. Zur Übersicht wurden die ausgewählten Proteine anhand ihrer Lokalisation (Membranständige Proteine, Lysosomen, Mitochondrien) bzw. zellulären Funktion (Gerüstproteine, Cytoskelett, Transport, Ca²⁺-bindende Proteine, Sonstige) in verschiedene Kategorien eingeteilt.

In früheren massenspektrometrischen Analysen von TPC1-Präzipitaten aus HeLa Zellen konnten bereits einige Proteine als TPC1-Interaktionspartner registriert werden, die auch in unseren Versuchsreihen an Hodengeweben identifiziert wurden: Dazu zählen die *Na/K-transporting ATPase subunit alpha-1* (s. Tabelle 12; Position 3), Annexine (5), Myosin (7), *Rab GDP dissociation inhibitor beta* (10), *4F2 cell-surface antigen heavy chain* (12), Mitglieder der Rab-Familie (13-17), *Vesicular integral-membrane protein VIP36* (19), Calreticulin (20), VDAC2 (22) und verschiedene Peroxiredoxine (24) (Lin-Moshier et al., 2014). Zusätzlich konnten membranständige ER ATPasen (1 und 2), das Gerüstprotein 14-3-3 (4) und Vinculin (6), ein Bestandteil des Zytoskeletts, identifiziert werden. Aus der Kategorie vesikulärer Transport wurden neben der Rab-Familie einige

Ergebnisse

weitere Proteine wie Importin (8), Clathrin (9), das *Vesicle-associated membrane protein-associated protein A* (11) und das *Vesicle-trafficking protein SEC22b* (18) gefunden. Außerdem konnten das lysosomale Markerprotein LAMP2 (21), der mitochondriale Ca²⁺-Transporter VDAC2 (22) und das Chaperon *75 kDa glucose-regulated protein* (GRP75) (23) nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden auch Peptide des *potassium channel tetramerization domain protein* (KCTD) 9 (25) und der Adenosylhomocysteinase (26) identifiziert.

Tabelle 12 Auswahl von Proteinen, die durch eine massenspektrometrische Analyse in TPC1-Antikörper-Immunopräzipitaten aus Testis Totallysaten identifiziert wurden.

	Protein	Anzahl der Peptide
	TPC1	9
Membranständige Proteine		
1	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	28
2	SERCA 2	4
3	<i>Na/K-transporting ATPase subunit alpha-1</i>	4
Gerüstproteine		
4	14-3-3	24
5	Annexin (verschiedene Subtypen)	15
Cytoskelett		
6	Vinculin	30
7	Myosin	2
Transport		
8	Importin (verschiedene Subtypen)	14
9	Clathrin	7
10	<i>Rab GDP dissociation inhibitor beta</i>	7
11	<i>Vesicle-associated membrane protein-associated protein A VAPA</i>	6
12	<i>4F2 cell-surface antigen heavy chain</i>	5
13	Rab 2A	4
14	Rab 11A	4
15	Rab 1a	3
16	Rab 5C	3
17	Rab 10	2

Ergebnisse

18	<i>Vesicle-trafficking protein SEC22b</i>	2
19	<i>Vesicular integral-membrane protein VIP36</i>	2
Ca ²⁺ bindende Proteine		
20	Calreticulin	6
Lysosomen		
21	LAMP2	3
Mitochondrien		
22	VDAC2	2
23	<i>75 kDa glucose-regulated protein GRP75</i>	12
Sonstige		
24	Peroxiredoxin (verschiedene Subtypen)	28
25	<i>Potassium channel tetramerization domain protein 9</i> KCTD9	15
26	Adenosylhomocysteinase	3

7 Diskussion

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchsreihen zeigten bezüglich der *Zona pellucida*-induzierten Akrosomreaktion, dass diese durch die Gabe von NAADP induziert werden kann (s. 6.1.2). Außerdem konnten die bereits veröffentlichten Ergebnisse zur Funktion von TPC1 für die akrosomale Exozytose durch den Einsatz eines membranpermeablen NAADP-Analogs an unpermeabilisierten Spermien bestätigt werden (s. 6.1.1). Trotz der registrierten offensichtlichen Bedeutung der TPCs für den Prozess der Befruchtung konnte jedoch sowohl für TPC1- als auch für TPC2-defiziente Zuchtpaare nur ein milder Reproduktionsphänotyp festgestellt werden (s. 6.1.3 und 6.1.4). Erst die gleichzeitige Deletion beider TPC-Subtypen führte zu einer deutlichen Einschränkung der Reproduktionsfähigkeit (s. 6.1.5).

TPC1- und TPC2-Proteine konnten außerdem in peritonealen Zellen der Maus nachgewiesen werden (s. 6.2). Überraschenderweise ergaben elektrophysiologische Kapazitätsmessungen an Mastzellen aus dem Peritoneum, dass TPC1-defiziente Mastzellen einerseits eine verringerte Zellgröße und andererseits eine erhöhte Amplitude der Degranulationsreaktion aufweisen (s. 6.5.1.1). Ca^{2+} -Imaging Studien zeigten dazu, dass die Applikation des SERCA-Inhibitors Thapsigargin sowie die Stimulation der Mastzellen mit IgE, im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen, zu erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Signalen führten (s. 6.6.1). Dahingegen waren die Ca^{2+} -Signale nach selektiver osmotischer Freisetzung des lysosomalen Ca^{2+} durch die Zugabe des Cathepsin C Substrats GPN (Sbano et al., 2017) in TPC1-defizienten Mastzellen reduziert (s. 6.6.2.1). Die Analyse des Ca^{2+} -Status des ER mit Hilfe des niedrig-affinen Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2FF zeigte dagegen, dass die Ca^{2+} -Konzentration im ER von TPC1-defizienten Mastzellen erhöht war (s. 6.6.2.2). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass TPC1-defiziente Mastzellen sowohl im Ruhezustand als auch nach Stimulation mit Thapsigargin bzw. dem G-Protein-aktivierenden Compound 48/80 (Mousli et al., 1990; Palomaki und Laitinen, 2006) eine erhöhte Ausschüttung des Immunmediators Histamin aufweisen (s. 6.8.1). Hinsichtlich der Lokalisation des TPC1 konnte festgestellt werden, dass er in Zellfraktionen zu finden ist, in denen auch das lysosomale Markerprotein angereichert war (s. 6.7.1). Mittels massenspektrometrischer Analysen konnten zudem verschiedene Proteine identifiziert werden, die als potentielle Interaktionspartner von TPC1 in Frage kommen und denen eine Funktion hinsichtlich der Interaktion zwischen dem ER und dem endo-lysosomalen System zukommen könnte (s. 6.10.2).

In den folgenden Abschnitten sollen die gesammelten Ergebnisse unter Einbeziehung aktueller Literatur im Detail diskutiert werden.

7.1 Funktionelle Kompensation von *two pore channel*-Subtypen in TPC-defizienten Mäusen

Die Auswertung der gesammelten Daten zum Reproduktionserfolg TPC2-defizienter Mäuse ergab, dass sowohl die Verpaarungszeit bis zum ersten Wurf (Wildtyp: 21,6 Tage; TPC2^{-/-}: 43,4 Tage, s. Tabelle 6) als auch die durchschnittliche Größe der Würfe (Wildtyp: 5,7 Jungtiere pro Wurf; TPC2^{-/-}: 4,3 Jungtiere pro Wurf) heterozygoter und homozygoter TPC2 Zuchtpaare im Vergleich zu Wildtyp-Zuchtpaaren der gleichen Rückkreuzungsgeneration verändert ist, was insgesamt auf einen subfertilen Reproduktionsphänotyp TPC2-defizienter Mäuse hinweist. Als eine mögliche Ursache dafür konnte bei der gezielten Untersuchung TPC2-defizienter Männchen neben einem leicht verringerten Hoden- und Körpergewicht festgestellt werden, dass die Zahl der kaudalen Spermien, im Vergleich zu Wildtyp-Männchen, signifikant reduziert ist (Wildtyp: $22,2 \times 10^6$; TPC2^{-/-}: $16,0 \times 10^6$, s. Tabelle 7). Auch für TPC1-defiziente Männchen wurde bereits in unseren früheren Studien eine statistisch signifikante Reduktion der Spermienzahl registriert (Arndt et al., 2014). Dazu passend ergab die Auswertung der Reproduktionsdaten der TPC1 Mauslinie im Rahmen dieser Arbeit auch für TPC1-defiziente Zuchtpaare ein im Vergleich zu Wildtyp-Tieren verlängertes Zeitintervall bis zum ersten Wurf (Wildtyp: 21,5 Tage; TPC1^{-/-}: 36,0 Tage) sowie eine reduzierte Wurfgröße (Wildtyp: 5,3 Jungtiere pro Wurf; TPC1^{-/-}: 4,1 Jungtiere pro Wurf) (s. 6.1.3.1, Tabelle 5). Die genetische Deletion jeweils eines der beiden in Mäusen exprimierten TPC-Subtypen führt also zu einer Subfertilität der Tiere, was auf eine funktionelle Rolle des TPC1 und des TPC2 am Reproduktionsprozess hindeutet.

Bis *dato* konnte hinsichtlich der Expression der beiden TPCs im männlichen Reproduktionssystem lediglich die Lokalisation des TPC1-Proteins in der inneren akrosomalen Membran nachgewiesen werden; allerdings zeigten RT-PCR Analysen mit spezifischen Primern für TPC1 und TPC2 und cDNA aus Hodengewebe, dass TPC2 offensichtlich auch im testikulären Gewebe exprimiert wird (Arndt et al., 2014). Die Tatsache, dass beide TPC-Subtypen im männlichen Reproduktionssystem exprimiert werden, könnte auf eine ähnliche Funktion beider Kationenkanäle hinweisen und damit auch auf eine mögliche funktionelle Redundanz. Dadurch könnte sichergestellt werden, dass im Falle einer Defizienz oder eines Defekts eines der beiden TPC-Subtypen eine funktionelle Kompensation durch den jeweiligen anderen TPC-Subtyp erfolgt. Im Rahmen meiner Masterarbeit habe ich diese Hypothese bereits für TPC2^{-/-} Mäuse untersucht und konnte unter anderem zeigen, dass die Expression von TPC1 in TPC2-defizientem Hoden- und Nierengewebe tatsächlich hochreguliert ist (Arlt, 2013). Auch für andere Ionenkanal-Familien wurde ein funktioneller Kompensationsmechanismus bereits beschrieben: So findet z. B. in Neuronen des Hippocampus eine Hochregulation

der Aktivität von P/Q-Typ Ca^{2+} -Kanälen im Falle einer Blockierung von N-Typ Ca^{2+} -Kanälen statt (Grimm et al., 2008). Ebenso kann das Fehlen eines spannungsabhängigen Natrium-Kanals durch die Überexpression eines anderen Subtyps derselben Natrium-Kanal-Familie kompensiert werden (F. H. Yu et al., 2006). Bezüglich der den TPCs strukturell ähnlichen TRP-Kanälen wurde für glatte Gefäßmuskelzellen beobachtet, dass die Auswirkungen einer Defizienz für TRPC6 durch die Hochregulation von TRPC3, einem dem TRPC6 nahe verwandten, konstitutiv aktivem Subtyp der TRPC-Familie, maskiert werden (Dietrich et al., 2005). Eine gegenseitige funktionelle Kompensation beider TPCs könnte also eine Erklärung dafür sein, dass sowohl TPC1 als auch TPC2-defiziente Mäuse nicht völlig steril sind, sondern nur einen mild ausgeprägten Reproduktionsphänotyp aufweisen (M. J. Berridge et al., 2003; Parrington et al., 2015). In diesem Zusammenhang muss aber angemerkt werden, dass in vorangegangenen TPC-Studien anderer Labore bisher weder über Veränderungen hinsichtlich der Reproduktionsfähigkeit der TPC1- oder TPC2-defizienten Mäuse noch über eine eingeschränkte Überlebensfähigkeit ihrer Nachkommen berichtet wurde (Calcraft et al., 2009; Ruas et al., 2014; Ruas et al., 2015). Dazu muss allerdings auch erwähnt werden, dass keine dieser Studien auf den Reproduktionsphänotyp der TPC-Mäuse fokussiert war, so dass möglicherweise die entscheidenden Parameter (s. o.) nicht erfasst wurden und so der milde subfertile Phänotyp der Tiere nicht auffiel.

Eine gegenseitige funktionelle Kompensation der beiden TPC-Subtypen spiegelt sich möglicherweise auch darin wieder, dass homozygot TPC-defiziente Elterntiere nur extrem eingeschränkt in der Lage sind, Nachkommen zu produzieren (s. 6.1.5.1). Lediglich eines der vier untersuchten homozygot TPC1/2-defizienten Zuchtpaare brachte Jungtiere hervor, wobei auch für dieses Zuchtpaar nur ein einzelner Wurf erfasst wurde. Alle Nachkommen dieses Wurfs starben allerdings innerhalb der ersten drei Wochen nach der Geburt, was darauf hindeutet, dass die TPCs nicht nur für die Fertilität sondern auch für das postnatale Überleben der Nachkommen wichtig sind. Zudem gingen aus TPC1/2 heterozygoten Zuchtpaaren weniger TPC1/2 Doppel-Knockout Jungtiere hervor als nach der Mendel'schen Verteilung zu erwarten gewesen wäre (s. Abb. 27; 2,90 % statt 6,25 % für Wildtyp-Tiere), so dass eine pränatale Funktion der TPCs ebenfalls wahrscheinlich ist.

Da die gleichzeitige genetische Deletion beider TPCs aber nicht zur völligen Sterilität aller TPC1/2 doppelt-defizienten Zuchtpaare führte (s. 6.1.5), ist durchaus vorstellbar, dass strukturell sehr ähnliche Ionenkanäle, die ebenfalls im männlichen Reproduktionssystem exprimiert werden, wie z. B. die bereits erwähnten Vertreter der TRP-Kanalfamilie (Darszon et al., 2006; Darszon et al., 2012), die Funktion der beiden

TPCs zum Teil übernehmen, was sich dann in einem zwar ausgeprägten aber nicht völlig sterilen Reproduktionsphänotyp widerspiegeln würde. Ob bestimmte TRPs aber tatsächlich in TPC1/2 doppelt-defizienten Mäusen stärker exprimiert werden, soll in weiterführenden quantitativen PCR-Studien mit spezifischen Primern untersucht werden. Auch wenn partiell eine funktionelle Kompensation der TPC-Funktion durch andere Ionenkanäle möglich ist, ist es dennoch überraschend, dass es auch in der für TPC1/2 doppelt-defiziente Mäuse publizierten Literatur (Lear et al., 2015; Ruas et al., 2015) keine Hinweise auf Einschränkungen der Reproduktionsfähigkeit der Mäuse gibt. In diesem Zusammenhang könnte aber spekuliert werden, dass die verwendeten TPC1/2^{-/-} Mäuse aus TPC1/2 heterozygoten Zuchtpaaren stammten, deren Fertilität weitaus weniger eingeschränkt ist als die der TPC1/2 doppelt-defizienten Zuchtpaare (s. 6.1.5).

7.2 Bedeutung der two-pore channels für die NAADP-induzierte Akrosomreaktion

Erste Erkenntnisse über die Funktion von NAADP für die Fertilisation konnten bereits vor einiger Zeit an Spermien und Eiern von Seeigeln gesammelt werden (Galione et al., 2000; Billington et al., 2002; Churchill et al., 2003). Dabei wurde festgestellt, dass der Kontakt mit der Glykoproteinmatrix der Eizelle zu einer deutlichen Erhöhung der NAADP-Konzentration in den Seeigel-Spermien führt (Churchill et al., 2003). Zusätzlich wurde gezeigt, dass das in den Spermien produzierte NAADP in den Eiern für die Auslösung der sogenannten kortikalen Reaktion und damit für die Unterdrückung einer Polyspermie mitverantwortlich ist (Churchill et al., 2003). In Studien an humanen (Sanchez-Tusie et al., 2014) wie auch an murinen (Arndt et al., 2014) Spermien konnte dagegen eine Beteiligung von NAADP an der Initiation der Akrosomreaktion nachgewiesen werden; weder für das humane noch für das murine System wurden allerdings bisher Studien zur Bedeutung von NAADP für die kortikale Reaktion durchgeführt, so dass vorstellbar ist, dass NAADP, analog zum Seeigel-System, auch in Säugetier Eizellen eine funktionelle Rolle übernimmt.

Hinsichtlich des *second messengers* NAADP und dessen Fähigkeit, die Akrosomreaktion in Säugerspermien auszulösen, konnten wir in unserem Labor unter Verwendung einer TPC1-defizienten Mauslinie zeigen, dass es sich bei einer der NAADP Zielstrukturen um den durch hohe NAADP-Dosen aktivierbaren TPC1 handelt. Die Dosis-Wirkungskurven an TPC1-defizienten Spermien lassen zudem die Vermutung zu, dass TPC2 als hochaffines NAADP Ziel zur Auslösung der Akrosomreaktion dient (Arndt et al., 2014).

Ich konnte durch meinen Beitrag an dieser Publikation zudem zeigen, dass TPCs sogar für die durch den physiologischen Stimulus, die *Zona pellucida*, induzierte Akrosomreaktion verantwortlich sind. Im Einzelnen zeigten meine Experimente, dass eine Vorinkubation muriner Wildtyp-Spermien mit dem NAADP Antagonisten *trans*-Ned 19 dazu führt, dass eine durch isolierte *Zona pellucida* ausgelöste Akrosomreaktion in ihrer Amplitude drastisch reduziert wird (s. 6.1.2 und Arndt et al. (2014)).

Dieser Befund einer *Zona pellucida*-vermittelten NAADP Generierung und anschließenden Akrosomreaktion scheint vor allem im Hinblick auf die gleichzeitige Beteiligung von zwei TPCs mit unterschiedlicher Affinität für NAADP interessant zu sein. Im Rahmen von *live cell imaging* Experimenten an murinen Spermien konnte nämlich kürzlich beobachtet werden, dass der Kontakt mit der Eizelle, jedoch nicht die Stimulation mit einem Ionophor, zu einem gerichteten Fortschreiten der Fusionsporenbildung vom posterioren Bereich des Akrosoms zu dessen Spitze führt (Buffone et al., 2009). Da NAADP nur eine Lebensdauer von wenigen Sekunden hat (G. Berridge et al., 2002), wäre vorstellbar, dass sich die NAADP-Konzentration, ausgehend von der Kontaktstelle mit der *Zona pellucida*, kontinuierlich reduziert. Denkbar ist, dass TPC1 eher im posterioren Bereich der äußeren akrosomalen Membran lokalisiert ist, wo der niedrig-affine TPC-Subtyp durch die dort hohen NAADP-Konzentrationen aktiviert werden kann; mit zunehmender Entfernung von der Kontaktstelle mit der *Zona pellucida* nimmt die NAADP-Konzentration ab, so dass die Expression einer hoch-affinen NAADP-Zielstruktur, vermutlich TPC2, im anterioren Bereich sinnvoll ist, um die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Akrosom und damit die Fusionsporenbildung auch in dieser Region zu initiieren (s. Abb. 71). Geht man also davon aus, dass sich das Expressionsmuster der TPC-Subtypen auf distinkte Regionen der akrosomalen Sichel beschränkt (s. Abb. 71), könnte die Expression von zwei NAADP-Zielstrukturen mit unterschiedlichen Affinitäten einer breiten Abdeckung eines möglichen NAADP-Konzentrationsspektrums in der Zelle dienen, und so einen Mechanismus darstellen, der die vollständige Fusion des riesigen akrosomalen Vesikels und somit die Freilegung der gesamten inneren akrosomalen Membran gewährleistet (Arndt et al., 2014).

Ein solcher Mechanismus ist aus physiologischer Sicht sinnvoll, da die vollständige Exposition der inneren akrosomalen Membran nötig ist, damit im nächsten Schritt die für die Fertilisation essentiellen funktionellen Komplexe aus dem in der inneren akrosomalen Membran lokalisierten Protein Izumo und dessen Rezeptor Juno auf der Seite der Eizelle gebildet werden (Bianchi et al., 2014). In weiterführenden Studien wäre es nun wichtig, das subzelluläre Expressionsmuster beider TPCs in Spermien zu bestimmen. Die tatsächliche funktionelle Rolle der TPCs für eine erfolgreiche Fertilisation könnte dann weiter untermauert werden, indem untersucht wird, ob auch in

TPC2- oder TPC1/2 doppelt-defizienten Spermien eine reduzierte akrosomale Exozytoserate nach Stimulation mit solubilisierter *Zona pellucida* registriert werden kann.

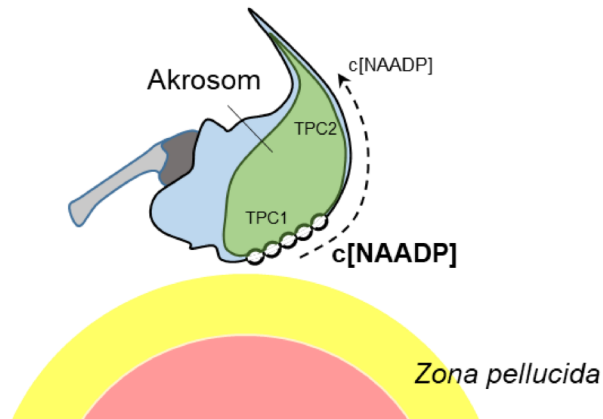


Abb. 71 Modellvorstellung zum gerichteten Fortschreiten der Fusionsporenbildung während der Akrosomreaktion nach *Zona pellucida* Kontakt durch die Beteiligung von TPC1 und TPC2.

Nach dem Kontakt mit der *Zona pellucida* schreitet die Akrosomreaktion von der Kontaktstelle am posterioren Bereich des Spermienkopfes zu dessen Spitze fort. Durch den *Zona pellucida* Stimulus kommt es zur Bildung von NAADP nahe der Kontaktstelle. In diesem Bereich herrscht zu Beginn des Spermium-Eizell-Kontakts eine hohe NAADP Konzentration, die sich mit zunehmender Entfernung von der Eizell-Spermium-Interaktionsregion nach anterior reduziert. Um zu gewährleisten, dass auch niedrige NAADP-Konzentrationen noch zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus den akrosomalen Vesikeln führen, könnte man sich vorstellen, dass der niedrig-affine NAADP-Rezeptor TPC1 im posterioren Bereich der äußeren akrosomalen Membran nahe der Kontaktstelle mit der *Zona pellucida* exprimiert wird, während die hoch-affine NAADP-Zielstruktur (vermutlich TPC2) eher im anterioren Bereich zu finden ist.

Die früheren in unserem Labor durchgeführten Studien zur Rolle von NAADP bei der Akrosomreaktion an murinen männlichen Keimzellen wurden, im Gegensatz zu den hier vorgestellten Versuchsreihen mit *Zona pellucida*, an permeabilisierten Spermien durchgeführt, da zum Zeitpunkt der Untersuchungen das membranpermeable Analog NAADP-AM nicht kommerziell erhältlich war (Arndt et al., 2014). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass NAADP-AM in nicht-permeabilisierten Spermien vergleichbare Effekte auslöst wie nicht-membrangängiges NAADP an mit SLO permeabilisierten Spermien (s. 6.1.1). Bezüglich der Expression unterschiedlich affiner NAADP-Zielstrukturen und mit Hilfe eines breiten Konzentrationsspektrums an NAADP-AM haben auch diese Versuchsreihen gezeigt, dass eine Stimulierung mit NAADP-AM ebenfalls in zwei glockenförmigen Dosis-Wirkungskurven resultiert, die Maxima im nanomolaren und mikromolaren Konzentrationsbereich aufweisen. In TPC1-defizienten Spermien wurde diese maximale akrosomale Exozytoserate nur noch durch die Zugabe von nanomolaren NAADP-Konzentrationen erreicht. Die Gabe höherer NAADP-AM Dosen führte in TPC1-defizienten Spermien nicht mehr zur akrosomalen Exozytose, was darauf hindeutet,

dass TPC1 als die niedrig-affine NAADP-Zielstruktur bei der Akrosomreaktion in murinen Spermien fungiert.

Ob TPC2 tatsächlich die hoch-affine NAADP Zielstruktur darstellt, und ob die TPCs in Spermien direkt durch NAADP oder eventuell indirekt über ein akzessorisches Protein aktiviert werden (Lin-Moshier et al., 2012), muss in weiterführenden Studien überprüft werden.

7.3 Einfluss des genetischen Stammhintergrund auf den Phänotyp des TPC1-defizienten Mausmodells

Gendefiziente knockout-Mausmodelle sind ein wichtiges Werkzeug, um mehr über die Funktion/en verschiedener Proteine zu erfahren (Eisener-Dorman et al., 2009). Bei der Anwendung des üblichen Verfahrens zur Erzeugung von knockout-Mäusen wird die Sequenz des betreffenden Gens verändert und mit Hilfe eines Vektors in embryonale Stammzellen eingebracht (Limaye et al., 2009). Dort erfolgt über homologe Rekombination die Integration der fehlerhaften Gensequenz in das Genom. Die veränderten Stammzellen können dann in Blastozysten injiziert werden, die wiederum in scheinchwangere Weibchen transferiert werden. Die Nachkommen sind chimäre Tiere, in denen sowohl Zellen mit der veränderten als auch mit der ursprünglichen Gensequenz zu finden sind. Kreuzt man diese Chimären mit einer genetisch unveränderten Maus, so entstehen aus dieser Verpaarung neben homozygoten Wildtyp-Tieren auch Tiere, die bezüglich der betreffenden Gensequenz heterozygot sind. Aus weiteren Verpaarungen der heterozygoten Mäuse entstehen dann neben Wildtyp- und heterozygoten Jungtieren, auch homozygot genmodifizierte Nachkommen (Eisener-Dorman et al., 2009).

Allerdings gilt es trotz der enormen Möglichkeiten, die genmodifizierte Mausmodelle bieten, auch die damit einhergehenden Einschränkungen zu beachten (Eisener-Dorman et al., 2009). Bei der üblicherweise angewendeten Technik werden embryonale Stammzellen des Inzuchtmausstamms 129/Sv verwendet, weil diese sich leicht genetisch manipulieren lassen und einfach zu kultivieren sind (Limaye et al., 2009). Da 129/Sv Mäuse sich aber nur schlecht fortpflanzen, werden meist Blastozysten und austragende Weibchen des Inzuchtstammes C57Bl/6 verwendet, sodass die genetisch veränderten Mäuse anschließend auf einen C57Bl/6 Stammhintergrund zurückgekreuzt werden können (Eisener-Dorman et al., 2009). Das hat zur Folge, dass durch die erste Kreuzung der chimären Maus mit einem Tier mit C57Bl/6 Stammhintergrund Nachkommen entstehen, die jeweils 50 % des C57Bl/6 und 50 % des 129/Sv Stammhintergrundes aufweisen. Durch weitere Rückkreuzungsschritte wird der Anteil des 129/Sv Stammhintergrundes zwar weiter reduziert, es bleiben jedoch um die

veränderte Gensequenz flankierende Regionen, sogenannte *flanking* oder *modifier genes*, mit 129/Sv Ursprung erhalten. In diesen Regionen können Gene enthalten sein, die für die Ausprägung spezifischer Eigenschaften des 129/Sv Stammes verantwortlich sind und/oder regulierende Wirkung auf C57Bl/6 Gene haben (Eisener-Dorman et al., 2009). Somit kann es vorkommen, dass bestimmte Phänotypen nicht auf die betreffende Gendefizienz zurückzuführen sind, sondern auf Effekte der *flanking genes*. So wurden beispielsweise bei *neuronal nitric oxide synthase* (nNOS)-defizienten Mäusen mit einem gemischten Stammhintergrund (129S4/SvJae-C57BL/6J) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren vermehrt aggressive Verhaltensweisen beobachtet, die nach Rückkreuzung der Mäuse auf einen C57Bl/6J Hintergrund in der fünften Generation nicht mehr zu erkennen waren (Le Roy et al., 2000). Der genetische Stammhintergrund der verwendeten Mäuse kann weiterhin (unabhängig von den flankierenden Regionen um die modifizierte Sequenz) einen Einfluss auf den durch die Gendefizienz verursachten Phänotyp haben. Während z. B. Mäuse mit einem C57BK/KsJ Stammhintergrund in Folge einer *obese* (*ob*) Gendefizienz eine schwere Diabetes entwickelten, konnte ein solcher Effekt in *ob*^{-/-} Mäusen mit C57Bl/6J Stammhintergrund nicht festgestellt werden (Coleman und Hummel, 1973).

Um den Effekt der Gendefizienz also einigermaßen verlässlich bewerten zu können, sollten die Mäuse mindestens in der zehnten Generation auf den jeweiligen Stammhintergrund zurückgekreuzt werden, sodass der Anteil der *flanking genes* am Genom möglichst gering wird (Eisener-Dorman et al., 2009). Im Interesse der Vergleichbarkeit bietet sich dabei der weit verbreitete C57Bl/6 Stammhintergrund an (Bryant et al., 2008), der auch für die Generierung der für diese Arbeit verwendeten Mauslinien verwendet wurde (s. 5.1.1). Bei der Analyse der Reproduktion von TPC1-defizienten Mäusen zeigte sich, dass zwischen Zuchtpaaren bestehend aus TPC1^{-/-} Elterntieren der dritten Rückkreuzungsgeneration und Wildtyp-Zuchtpaaren sowohl hinsichtlich der Wurfgröße als auch hinsichtlich des Zeitintervalls bis zum ersten Wurf nur geringfügige Unterschiede beobachtet werden konnten (s. Tabelle 4). Nach Rückkreuzung der Mäuse in der zwölften Generation auf den C57Bl/6 Stammhintergrund konnte dann allerdings festgestellt werden, dass für TPC1-defiziente Zuchtpaare im Vergleich zu Wildtyp-Zuchtpaaren zum einen die Wurfgröße deutlich reduziert und zum anderen das Zeitintervall bis zum ersten Wurf statistisch signifikant verlängert war (s. Tabelle 5). Da durch die Rückkreuzung der Mäuse auf den C57Bl/6 Hintergrund in der zwölften Generation der Anteil der Gene mit 129/Sv Ursprung minimiert wurde, kann mit relativ großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass sich tatsächlich die TPC1-Defizienz der Elterntiere letztlich auf die Wurfgröße und das Zeitintervall vor dem ersten Wurf auswirkt. Eine mögliche Erklärung für den nur gering ausgeprägten

Unterschied zwischen TPC1^{-/-} Zuchtpaaren der dritten Rückkreuzungsgeneration und vergleichbaren Wildtyp-Zuchtpaaren könnte sein, dass die flankierenden Bereiche mit 129/Sv Ursprung um die veränderte TPC1 Gensequenz herum Gene enthalten, deren Produkte wiederum den Effekt der TPC1-Defizienz auf die Wurfgröße und das Zeitintervall bis zum ersten Wurf eines TPC1^{-/-} Zuchtpaares teilweise kompensieren könnten.

Insgesamt sind die verringerte Wurfgröße und das verlängerte Zeitintervall bis zum ersten Wurf vermutlich sekundäre Effekte der TPC1 Defizienz, die, wie bereits unter 7.1 erwähnt, auf die im Vergleich zu Wildtyp-Männchen reduzierte Spermienzahl TPC1-defizienter Männchen zurückzuführen sind (Arndt et al., 2014). Ob aber möglicherweise ein veränderter Testosteronspiegel (W. H. Walker, 2011) oder aber beispielsweise eine erhöhte Apoptoserate (Shukla et al., 2012) während der Spermatogenese die Ursache für die geringere Spermienzahl der TPC1^{-/-} und auch der TPC2^{-/-} Männchen ist, bleibt noch zu klären.

Des Weiteren konnte bei der Auswertung der gesammelten Daten zur Genotypverteilung der Nachkommen von heterozygoten TPC1 Zuchtpaaren ermittelt werden, dass bei Verpaarungen von heterozygoten Mäusen der dritten Rückkreuzungsgeneration eine Genotypverschiebung unter den Nachkommen zu Gunsten des Wildtyps zu beobachten war, die nach abgeschlossener Rückkreuzung auf den C57Bl/6 Stammhintergrund (Rückkreuzungsgeneration N12) nicht mehr festgestellt werden konnte (s. 6.1.3.2). In diesem Fall ist die beobachtete Genotypverschiebung also wahrscheinlich auf Effekte der flankierenden Gene der veränderten TPC1^{-/-} Gensequenz zurückzuführen, die durch heterologe Rekombinationsereignisse in jeder Rückkreuzungsgeneration reduziert werden.

Da der genetische Hintergrund möglicherweise also großen Einfluss auf die Ausprägung eines bestimmten in Folge einer Gendefizienz auftretenden Phänotyps haben kann, ist es absolut notwendig, auf den Stammhintergrund der verwendeten Mäuse zu achten. Eine Möglichkeit, um in Zukunft die Problematik des gemischten Stammhintergrunds und die damit einhergehenden aufwendigen und langwierigen Rückkreuzungen zu umgehen, könnte die Verwendung von C57Bl/6-129/Sv Hybrid-Stammzellen sein. Diese Hybrid-Stammzellen weisen einerseits weiterhin die für die Kultivierung der Zellen erforderlichen Eigenschaften der 129/Sv Stammzellen auf, andererseits kann für sie ein C57Bl/6 DNA-Vektor zur Modifizierung der betreffenden Gensequenzen verwendet werden (Rivera und Tessarollo, 2008).

Weitere Untersuchungen müssen in Zukunft zeigen, welche Bedeutung die TPCs für die Fortpflanzung haben; dabei muss vor allem geprüft werden, ob die für die TPC2 und TPC1/2-defiziente Mäuse der siebten Rückkreuzungsgeneration beobachteten

Veränderungen auch noch nach vollständiger Rückkreuzung auf den C57Bl/6 Stammhintergrund auftreten. Darüber hinaus ist es notwendig, weitere Daten zur Sterblichkeit der Nachkommen von homozygot und heterozygot TPC-defizienten Zuchtpaaren zu sammeln, um die Bedeutung der TPCs für das postnatale Überleben der Jungtiere gezielt zu untersuchen. Bisher stehen keine vergleichbaren Daten zur Mortalitätsrate der Nachkommen der entsprechenden Zuchtpaare aus anderen Studien zur Verfügung. Es ist lediglich bekannt, dass die genetische Deletion von TPC1 bzw. TPC2 keinen Einfluss auf die Lebensdauer adulter Mäuse hat (Grimm et al., 2017).

Wahrscheinlich ist, dass der Reproduktionserfolg TPC-defizienter Mäuse nicht nur auf Grund der Bedeutung der TPCs für die Akrosomreaktion beeinträchtigt ist, sondern möglicherweise auch durch die generellen Auswirkungen der TPC-Defizienz auf die zelluläre Differenzierung (Parrington und Tunn, 2014), was sich neben den erhöhten Mortalitätsraten der Jungtiere auch in den reduzierten Spermienzahlen der TPC1- bzw. TPC2-defizienten Männchen widerspiegelt.

7.4 Rolle von TPC1 bei der Differenzierung und Migration von Mastzellen

Die Auswertung der mit Hilfe der FACS-Methode gesammelten Daten bezüglich der Anteile der Immunzelltypen im Peritoneum von Wildtyp- und TPC1-defizienten Mäusen ergab, dass sich der prozentuale Anteil von T-Zellen, B-Zellen und Neutrophilen in TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Tieren nicht unterschied. Bei der Analyse von Makrophagen und Mastzellen wurde jedoch jeweils ein geringerer prozentualer Anteil der beiden Zelltypen in der peritonealen Lavage von TPC1-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ermittelt, wobei sich hinsichtlich der peritonealen Gesamtzellzahl kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen feststellen ließ. Insbesondere für den Anteil der Mastzellen ergab sich ein signifikanter Unterschied beim Vergleich von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mäusen. Die vier im Nachfolgenden aufgelisteten Hypothesen könnten jeweils alleine oder auch in Kombination einen Erklärungsansatz für die reduzierte Zahl der peritonealen Mastzellen in TPC1-defizienten Mäusen bieten:

i) TPC1 könnte eine Rolle bei der Migration der Mastzell-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in das periphere Gewebe spielen.

Die Einwanderung (*homing*) von Mastzellen in das Peritoneum ist unter anderem abhängig von der Expression der Integrine $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ und $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, die mit Komponenten der extrazellulären Matrix interagieren (Dahlin und Hallgren, 2015; Paul et al., 2015). In Mäusen mit einer genetischen Deletion für jeweils eines der beiden Integrine konnte eine Reduktion der Mastzellzahl im Peritoneum um bis zu 70 % festgestellt werden

(Rosenkranz et al., 1998; Berlanga et al., 2005). Wie unter 3.4 beschrieben, konnte tatsächlich bereits *in vitro* gezeigt werden, dass beide TPC Subtypen eine Rolle bei der Adhäsion und Migration von invasiven Krebszellen spielen. Die Inhibition der TPCs führt dabei zu einer Störung des endo-lysosomalen *traffickings*, wodurch es zu einer Akkumulation von Integrinen in endo-lysosomalen Vesikeln kommt (Nguyen et al., 2017). Des Weiteren ist für den TPC-Subtyp TPC2 bekannt, dass dieser mit dem t-SNARE-Protein Syntaxin 6 interagiert (Grimm et al., 2014), das wiederum ebenfalls wichtig für das endo-lysosomale Recycling von Integrinen und die chemotaktische Zellmigration ist (Riggs et al., 2012). Möglicherweise tritt in Mastzellen also in Folge der genetischen Deletion von TPC1 eine Störung beim Recycling der Integrine durch das endo-lysosomale System auf, was dazu führt, dass die Migration der Mastzell-Vorläuferzellen in das Peritoneum beeinträchtigt ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese ist es in zukünftigen Studien notwendig, das Migrationsverhalten und Integrin-trafficking TPC1-defizienter Mastzell-Vorläuferzellen zu studieren.

ii) Die Differenzierung von Mastzell-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zu reifen Mastzellen könnte durch die TPC1-Defizienz gestört sein.

Wie für die meisten anderen zellulären Prozesse spielen Ca^{2+} -Signale auch eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Stammzellen. Für Neuronen, Muskelzellen und Osteoclasten konnte bereits gezeigt werden, dass NAADP/TPC vermittelte Ca^{2+} -Signale von großer Bedeutung für die Differenzierung der Vorläuferzellen zu reifen Zellen sind (Parrington und Tunn, 2014). Für Mastzell-Vorläuferzellen ist darüber hinaus bereits bekannt, dass ihre Differenzierung zu reifen Mastzellen nicht von SOCE-Mechanismen sondern scheinbar von einer anderen Ca^{2+} -Quelle abhängig ist, die bisher nicht identifiziert wurde (Vig und Kinet, 2009). Sollte sich dazu im Rahmen weiterführender Studien herausstellen, dass das zur Differenzierung der Mastzell-Vorläuferzellen notwendige Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern stammt, könnte die genetische Deletion von TPC1 und eine damit einhergehende Veränderung der NAADP-vermittelten Ca^{2+} -Signale auch zu einer Beeinträchtigung der Differenzierungsprozesse in Mastzellen führen.

iii) TPC1 könnte in zellulären Signalwegen involviert sein, die entscheidend für das Überleben der Mastzellen sind.

Sollten weder die Differenzierung (i) noch die Migration (ii) von Mastzell-Vorläuferzellen durch die TPC1-Defizienz beeinträchtigt sein, könnte auch eine erhöhte Apoptoserate die reduzierte Anzahl der Mastzellen im Peritoneum der TPC1^{-/-} Mäuse erklären. Dazu passt, dass TPC1-defiziente Mastzellen verstärkte Ca^{2+} -Signale nach Stimulation zeigten, wobei Veränderungen des intrazellulären Ca^{2+} -*signallings* in der Aktivierung von apoptotischen Signalwegen resultieren können (Rizzuto et al., 2003). Möglicherweise

führen also durch die genetische Deletion von TPC1 verursachte Veränderungen in den Ca^{2+} -Signalen von Mastzellen vermehrt zum programmierten Zelltod (Apoptose) und somit zu einer verstärkten Reduktion der Mastzellzahl. Darüber hinaus konnte im humanen System gezeigt werden, dass sowohl TPC1 als auch TPC2 mit dem anti-apoptotischen Protein HAX-1 interagieren (Lam et al., 2013), und im Rahmen dieser Interaktion möglicherweise eine Bedeutung für das Überleben der Mastzellen haben könnten. Ein weiterer Faktor, der zur Apoptose der Zellen führen kann, ist eine Veränderung im intrazellulären pH-Wert. So konnte in HL-60 Zellen (humane promyelotische Leukämiezellen) gezeigt werden, dass die Aktivität der Apoptose-vermittelnden Cysteinproteasen Caspase-1 und -3 bei einem reduzierten pH-Wert verstärkt war (H. J. Park et al., 1999). Mit Hilfe einer Lysotracker-Färbung konnte, wie unter 6.4.2 dargestellt, gezeigt werden, dass TPC1^{-/-} Mastzellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen deutlich mehr Areale mit saurem pH-Wert aufwiesen. Somit könnte eventuell ein höheres Apoptose-Risiko als Folge der genetischen Deletion von TPC1 bestehen.

Neben einem veränderten pH-Wert kann auch metabolischer Stress zur Induktion der Apoptose führen (Altman und Rathmell, 2012). Um dies zu verhindern, können Zellen durch Autophagie, also den Abbau von zellulären Komponenten mit Hilfe des endo-lysosomalen Systems, Nährstoffe gewinnen und so ihr Überleben sichern (Glick et al., 2010). In Studien an Ratten Astrozyten und murinen Kardiomyozyten wurde gezeigt, dass TPCs den Prozess der Autophagie positiv regulieren und dass deren Abwesenheit sich negativ auf die Überlebensfähigkeit der Zellen auswirkt (Pereira et al., 2011; Garcia-Rua et al., 2016). Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass möglicherweise eine verringerte Überlebensrate in Folge der TPC1-Defizienz die Erklärung für die reduzierte Mastzellzahl im Peritoneum der TPC1^{-/-} Mäuse ist.

iv) In Folge der verstärkten Degranulation von TPC1^{-/-} Mastzellen könnte es zu einer Kompensation durch eine Reduzierung der Zellzahl kommen.

Dieser Hypothese steht zunächst die Beobachtung entgegen, dass die Freisetzung von Histamin in Kombination mit dem Chemokin CXCL12 sogar in einer durch den H₄-Rezeptor vermittelten vermehrten Migration von Mastzell-Vorläuferzellen resultiert (Godot et al., 2007), was letztlich zu einer erhöhten Zahl reifer Mastzellen im Peritoneum führen würde. So wäre also eher anders herum vorstellbar, dass die reduzierte Zahl der Mastzellen im Peritoneum der TPC1^{-/-} Mäuse durch die verstärkte Degranulation der wenigen TPC1^{-/-} Mastzellen kompensiert wird. Ein ähnlicher Mechanismus konnte bereits in Minischweinen mit einer verringerten Anzahl an beta-Zellen beobachtet werden: Nach Reduktion der Anzahl der beta-Zellen konnte eine verstärkte Insulin-Freisetzung aus den verbliebenen beta-Zellen festgestellt werden (Larsen et al., 2004).

Neben dem reduzierten prozentualen Anteil der Mastzellen an der peritonealen Lavage von TPC1^{-/-} Mäusen konnte zudem in morphologischen (s. 6.4.1) und elektrophysiologischen (s. 6.5.1.1) Analysen festgestellt werden, dass TPC1-defiziente Mastzellen im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen kleiner sind. Ein Grund dafür könnte womöglich ebenfalls die verstärkte Degranulation der TPC1-defizienten Zellen sein, die eventuell mit einer insgesamt verstärkten Endozytose auf die bereits basal vermehrte Exozytoserate reagieren. Eine mögliche Überkompensation bei der Rückgewinnung der eingebauten Membranen nach einer Granulafusion (Xue et al., 2012) könnte letztendlich zu einer geringeren Zellgröße der TPC1^{-/-} Mastzellen führen.

In einer Studie an Ratten Fibroblasten konnte außerdem ein Zusammenhang zwischen der Inhibition des Nährstoff-Sensors mTOR und einer Beeinträchtigung des Zellwachstums hergestellt werden (Fingar et al., 2002). Zusammen mit TPC1 und TPC2 bildet mTOR wiederum einen ATP-sensitiven Komplex, durch den die Nährstoffversorgung der Zelle überwacht und reguliert werden kann (Cang et al., 2013). In TPC1-defizienten Mastzellen ist somit möglicherweise dieser „Überwachungs-Mechanismus“ und infolgedessen auch das Zellwachstum gestört. Da mTOR, wie die TPCs, ubiquitär exprimiert wird (Kim et al., 2002), wären allerdings alle Zellen von dieser Problematik betroffen, was im Rahmen dieser Arbeit nicht beurteilt werden kann.

7.5 Modell zur Rolle von TPC1 bei der Ca²⁺-Homöostase in Mastzellen

Peritoneale Mastzellen aus TPC1- und TPC2-defizienten sowie TPC1/2-Doppelknockout Mäusen zeigten eine im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen verstärkte GTPγS-induzierte Degranulation (s. 6.5.1). Dieser Befund war hinsichtlich der Ergebnisse anderer Exozytosestudien an TPC1-defizienten Zellen (Arndt et al., 2014) überraschend, konnte aber zusätzlich auch nach pharmakologischer Inhibition der TPCs durch Tetrandrine beobachtet werden (s. 6.5.2). Zudem führte eine Aktivierung der TPCs durch NAADP sogar zu einer reduzierten Degranulation (s. 6.5.3). In verschiedenen anderen Zellsystemen konnte bisher gezeigt werden, dass der Verlust eines oder beider TPC-Subtypen dazu führt, dass Ca²⁺-abhängige exozytische Prozesse, wie z.B. die Akrosomreaktion in Spermien (Arndt et al., 2014) oder die Freisetzung zytolytischer Enzyme aus zytotoxischen T-Zellen (Davis et al., 2012), in einem reduzierten Maß ablaufen. Somit erscheint eine verstärkte Degranulation in TPC-defizienten Mastzellen zunächst widersprüchlich. Durch die Analyse von Stimulus-induzierten Ca²⁺-Signalen konnte im Rahmen der hier vorgestellten Studien allerdings festgestellt werden, dass die in TPC1^{-/-} Mastzellen sowohl durch Thapsigargin als auch durch IgE/DNP-BSA

hervorgerufenen zytosolischen Ca^{2+} -Signale im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen tatsächlich größer waren (s. 6.6.1). Die Unterschiede in der Stärke der Ca^{2+} -Signale konnten auch in Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} beobachtet werden (s. Abb. 50 bzw. Abb. 52), waren aber vor allem ohne Ca^{2+} in der externen Lösung sehr deutlich zu erkennen (s. Abb. 51 bzw. Abb. 53). Da diese Beobachtung zu der Hypothese führte, dass die Ca^{2+} -Konzentration in den intrazellulären Speichern TPC1-defizienter Mastzellen verändert ist, wurde mit Hilfe des niedrig-affinen Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2-FF zunächst der Ca^{2+} -Status des ER von TPC1^{-/-} Mastzellen erfasst. Dabei konnte gezeigt werden, dass nicht nur die basale Ca^{2+} -Konzentration im ER erhöht ist (s. Abb. 56), sondern auch, dass nach Stimulierung der Mastzellen mit IgE/DNP-BSA mehr Ca^{2+} aus dem ER freigesetzt wird (s. Abb. 57). Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass die Ca^{2+} -Konzentration in Lysosomen von TPC1^{-/-} Mastzellen im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen reduziert ist (s. Abb. 54), und die sauren Organellen der TPC1-defizienten Mastzellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen einen niedrigeren pH-Wert aufweisen (s. 6.4.2). Die veränderten Ca^{2+} -Konzentrationsverhältnisse weisen darauf hin, dass der zwischen den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern herrschende „*crosstalk*“ (Morgan et al., 2013) in TPC1-defizienten Mastzellen teilweise gestört ist. In diesem Zusammenhang muss nochmals auf die bereits unter 3.3 vorgestellten Studien zur Interaktion von intrazellulären Ca^{2+} -Speichern eingegangen werden, die gezeigt haben, dass Membrankontaktstellen zwischen dem ER und Lysosomen bestehen (Kilpatrick et al., 2013). Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass für die Bildung von Kontaktstellen, auch zwischen dem ER und Endosomen, NAADP-vermittelte Ca^{2+} -Signale benötigt werden, und dass sowohl eine pharmakologische Blockierung durch *trans*-Ned-19, als auch eine Inhibition von TPC1 bzw. TPC2 durch spezifische siRNA zu einer Reduzierung der Anzahl dieser Kontaktstellen führte (Kilpatrick et al., 2017). Zusätzlich konnten die TPCs, die mit Hilfe von Goldpartikel-gekoppelten Antikörpern markiert wurden, in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Fibroblasten vor allem an Membrankontaktstellen zwischen Endosomen bzw. Lysosomen und dem ER identifiziert werden (Kilpatrick et al., 2017). Zu den mechanistischen Zusammenhängen der Membrankontaktstellen-Bildung wurde in dieser Studie vermutet, dass die im endo-lysosomalen System lokalisierten TPCs NAADP-abhängig Ca^{2+} aus den sauren Vesikeln liefern, das für die Bildung der transienten Membrankontaktstellen mit dem ER benötigt wird (Kilpatrick et al., 2017).

Unter Berücksichtigung der Annahme, dass die TPCs den Kontakt zwischen dem endo-lysosomalen System und dem ER vermitteln, wurden die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten in einem hypothetischen Modell zusammengefasst, das eine potentielle Funktion von TPC1 bei der Ca^{2+} -Homöostase und dem Ca^{2+} -*signaling* in

Mastzellen erklären könnte, und in dem die Organellen des endo-lysosomalen Systems die Rolle eines Ca^{2+} -Puffersystems übernehmen (s. Abb. 72 A): Bereits im Ruhezustand existieren Membrankontaktstellen, sogenannte *nanojunctions* (H. C. Lee und Aarhus, 1995), zwischen dem ER und dem endo-lysosomalen System. Für deren Bildung ist unter Umständen bereits eine basale Aktivität von TPC1, die zu einer lokalen Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration führt (Zhu et al., 2010a), ausreichend. Dieser Kontakt dient zunächst dem kontinuierlichen Austausch von Metaboliten und Lipiden zwischen den intrazellulären Speichern (Hariri et al., 2016); darüber hinaus könnte die direkte Interaktion der endo-lysosomalen Vesikel mit dem ER auch die Befüllung der sauren Organellen mit Ca^{2+} ermöglichen (Garrity et al., 2016). Wird nun eine Mastzelle z. B. durch die Bindung eines IgE/Antigen-Komplexes aktiviert, könnte es zur Bildung von NAADP und dadurch zu einem TPC1-vermittelten lokalen Ca^{2+} -Ausstrom aus Endosomen und/oder Lysosomen kommen. Dieser räumlich begrenzte Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration würde zur Aktivierung der lokalen SNARE-Maschinerie und somit zur Bildung weiterer *nanojunctions* zwischen den sauren Ca^{2+} -Speichern und dem ER führen. Dadurch wird ein vermehrter Austausch zwischen den Speichern ermöglicht, und ein Teil des Ca^{2+} , das nach Aktivierung der Zelle über den IP_3 -R und den RyR aus dem ER freigesetzt werden würde, kann in endo-lysosomale Kompartimente aufgenommen werden. In Abhängigkeit von der Anzahl der Kontaktstellen kann die Stärke des entstehenden Ca^{2+} -Signals und damit der zellulären Antwort moduliert werden. Die genetischen Deletion von TPC1 hätte nach diesem Modell zur Folge, dass es zu einer Reduzierung der Membrankontaktstellen zwischen dem ER und dem endo-lysosomalen System kommt, und damit zu einer reduzierten Ca^{2+} -Befüllung der Endosomen und Lysosomen sowie zur Reduzierung ihrer Pufferfunktion. Daraus resultiert eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration im ER und ein verminderter Ca^{2+} -Gehalt in endo-lysosomalen Kompartimenten. Die durch Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER resultierende Amplitude des Ca^{2+} -Signals im Zytosol würde dadurch größer, was letztlich zu einer verstärkten Degranulationsreaktion der Mastzellen führen würde (s. Abb. 72 B).

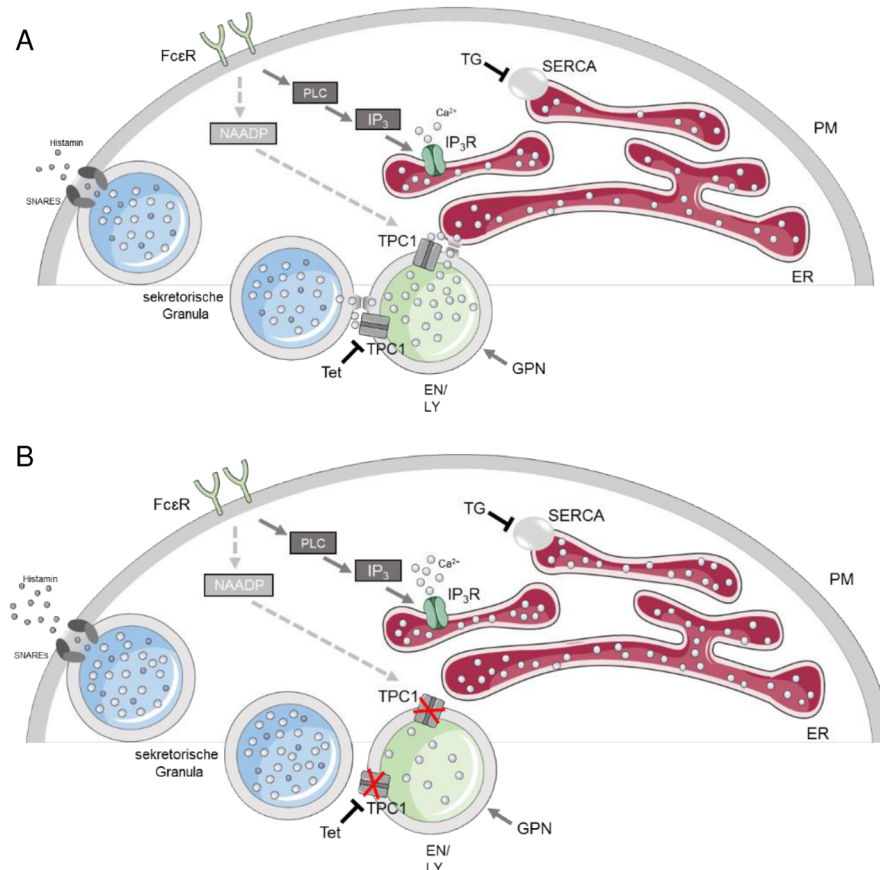


Abb. 72 Modell zur potenziellen Rolle von TPC1 in Mastzellen

A Ca²⁺-Homöostase und -signaling in Wildtyp-Mastzellen.

Im Ruhezustand existieren TPC1-vermittelte Membrankontaktstellen, sogenannte *nanojunctions*, zwischen den Organellen des endo-lysosomalen Systems (EN/LY) und dem ER. Über diese Kontaktstellen kommt es zu einem Austausch zwischen den intrazellulären Ca²⁺-Speichern und unter anderem zur Befüllung der Endosomen und Lysosomen mit Ca²⁺. Die Aktivierung einer Mastzelle z. B. durch die Bindung eines Antigen/IgE-Komplexes an den FcεR führt neben der Aktivierung der PLC zur Generierung von NAADP, das wiederum TPC1 aktiviert. Dadurch kommt es zur vermehrten Ausbildung weiterer Kontaktstellen zwischen dem endo-lysosomalen System und dem ER, sodass die endo-lysosomalen Organellen einen Teil des aus dem ER ausströmenden Ca²⁺ direkt aufnehmen können und als Ca²⁺-Puffersystem fungieren. Auf diese Weise kann das intrazelluläre Ca²⁺-Signal moduliert und somit die Art, Dauer und Intensität der zellulären Antwort der Mastzelle auf einen bestimmten Stimulus genau abgestimmt werden. Durch die regulierte Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration fusionieren mit Immunmediatoren (z. B. Histamin) gefüllte sekretorische Granula mit der Plasmamembran und setzen ihren Inhalt in den extrazellulären Raum frei. Möglicherweise existieren TPC1-vermittelte Kontaktstellen auch zwischen Endosomen/Lysosomen und sekretorischen Granula.

B Einfluss der genetischen Deletion von TPC1 auf die Ca²⁺-Homöostase und das Ca²⁺-signaling in Mastzellen.

In Abwesenheit von TPC1 können Endosomen und Lysosomen nur eingeschränkt mit dem ER in Kontakt treten. Es existieren nur wenige Membrankontakte, sodass es zu einer reduzierten Ca²⁺-Befüllung der Endosomen und Lysosomen kommt und mehr Ca²⁺ im ER verbleibt. Wird eine TPC1-defiziente Mastzelle stimuliert, können keine zusätzlichen *nanojunctions* ausgebildet werden und die Ca²⁺-Pufferfunktion des endo-lysosomalen Systems entfällt. So entsteht ein im Vergleich zu Wildtyp-Mastzellen erhöhtes zytosolisches Ca²⁺-Signal, das zu einer verstärkten Degranulationsreaktion der Mastzelle führt. Potenziell durch TPC1-vermittelte Kontaktstellen zwischen Endosomen/Lysosomen und sekretorischen Granula wären in TPC1-defizienten Mastzellen ebenfalls reduziert und der Ca²⁺-Austausch zwischen den sauren Organellen eingeschränkt. Dadurch könnte eine erhöhte Ca²⁺-Konzentration in den sekretorischen Granula entstehen, die im Ruhezustand bereits zur vermehrten Fusion der Granula mit der Plasmamembran führt.

Eine weitere Folge des reduzierten Ca^{2+} -Gehalts in Lysosomen könnte eine Azidifizierung der sauren Organellen sein. Möglicherweise kommt es über die V-Typ ATPase zum Einstrom von Protonen in das lysosomale Lumen, um einen Ausgleich für die fehlenden positiven Ladungen der Ca^{2+} -Ionen zu schaffen.

Ob TPCs den pH-Wert der sauren Organellen tatsächlich beeinflussen, ist noch nicht geklärt. Bisher wurden nur Daten veröffentlicht, die entweder keine Veränderung des pH-Werts oder eine Alkalinisierung der sauren Vesikel in Folge eines TPC2 *knockouts* zeigten (Grimm et al., 2017). Welchen Einfluss TPC1 tatsächlich auf den pH-Wert von endo-lysosomalen Organellen hat, muss in weiterführenden Studien systematisch analysiert werden.

Über eine mögliche Funktion des endo-lysosomalen Systems als Ca^{2+} -Puffersystem wurde bereits mehrfach spekuliert (Morgan, 2016): Beispielsweise konnte in einer Studie an HEK und COS-7 Zellen gezeigt werden, dass IP_3 - jedoch nicht SOCE-abhängige zytosolische Ca^{2+} -Signale vergrößert waren, wenn die Zellen zuvor mit Substanzen (Bafilomycin A1, Vacuolin oder GPN) behandelt wurden, die den lysosomalen Ca^{2+} -Status reduzieren. Im unbehandelten Zustand konnte zudem festgestellt werden, dass die luminalen Ca^{2+} -Konzentration in Lysosomen nach Aktivierung des IP_3 -R anstieg. Die Autoren folgerten daraus, dass Lysosomen Ca^{2+} , das aus dem ER freigesetzt wird, aufnehmen können und dadurch als Puffersystem wirken, wodurch IP_3 -abhängige Ca^{2+} -Signale moduliert werden können (Lopez-Sanjurjo et al., 2013). Weiterführende Untersuchungen zeigten zwar, dass die Ca^{2+} -Konzentration im ER der behandelten Zellen im Gegensatz zu den für die vorliegende Arbeit verwendeten Mastzellen unverändert blieb (Lopez-Sanjurjo et al., 2013), was aber möglicherweise auf die nur transiente Reduzierung der lysosomalen Ca^{2+} -Speicherkapazität durch die Bafilomycin A1 Behandlung zurückzuführen ist. In Folge der genetischen Deletion von TPC1 kommt es in Mastzellen aber wahrscheinlich zu einer dauerhaften Störung des intrazellulären „*crosstalks*“ und damit zu einer anhaltenden Veränderung der luminalen Ca^{2+} -Konzentration in den Speichern.

Um zu untersuchen, ob TPC1 bei der Formation der Membrankontaktstellen neben der Ca^{2+} -Bereitstellung noch weitere Funktionen hat, wurde eine massenspektrometrische Analyse von Immunopräzipitaten des TPC1-Antikörpers zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner durchgeführt. In den TPC1-Antikörper-Imunopräzipitaten der lysierten peritonealen Zellen war es unter den angewendeten Versuchsbedingungen jedoch nicht möglich, TPC1 nachzuweisen. Deshalb wurden die TPC1-Imunopräzipitate der Hodengewebe-Lysate mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert, um dennoch Informationen über mögliche TPC1-Interaktionspartner zu erhalten, die möglicherweise auch auf das System der Mastzellen übertragbar sind.

Dabei wurde unter anderem das mitochondriale Protein VDAC2 als möglicher Bindungspartner von TPC1 identifiziert. Dieser Befund ist insofern interessant, da, wie unter 3.3 bereits beschrieben, auch für Mitochondrien bekannt ist, dass diese mit dem ER in Verbindung stehen und als Ca^{2+} -Puffersysteme in der Zelle dienen können (Rizzuto et al., 2012). Der Kontakt zwischen dem ER und den Mitochondrien wird dabei über eine Interaktion des Chaperons GRP75 mit dem mitochondrialen Ionenkanal VDAC1 in der äußeren mitochondrialen Membran (OMM) und dem IP_3 -R auf Seiten des ERs hergestellt (Szabadkai et al., 2006). Mit Hilfe der massenspektrometrischen Analysen wurde festgestellt, dass auch TPC1 mit GRP75 interagiert (s. 6.10.2). Der TPC1-GRP75-Komplex könnte so möglicherweise eine Verbindung der sauren Organellen zum ER, aber auch zu Mitochondrien herstellen.

Zusätzlich konnte das evolutionär konservierte Protein VAP A in den TPC1-Antikörper Immunopräzipitaten identifiziert werden (s. 6.10.2). *Vesicle associated membrane protein* (VAMP)-*associated proteins* (VAPs) sind evolutionär konservierte kleine Proteine auf der zytoplasmatischen Seite der ER-Membran, die mit einer großen Anzahl von Proteinen interagieren. Viele dieser Interaktionspartner sind dabei auf anderen intrazellulären Organellenmembranen lokalisiert (Murphy und Levine, 2016). Unter anderem werden Membrankontaktstellen zwischen dem ER und Mitochondrien durch die Interaktion von VAPB mit dem mitochondrialen Protein PTPIP51 vermittelt (Stoica et al., 2014). Tatsächlich konnten auch bereits Interaktionen von VAPs mit den Sterin-bindenden Proteinen ORP1L und STARD3, die auf späten Endosomen und Lysosomen zu finden sind (Johansson et al., 2003; Clark, 2012), gezeigt werden (Rocha et al., 2009; Alpy et al., 2013). In den TPC1-Immunopräzipitaten konnte der VAP Subtyp VAPA identifiziert werden; ein Komplex aus VAPA und TPC1 könnte also an der Formation von Membran-Kontaktstellen zwischen dem ER und dem endo-lysosomalen System beteiligt sein. Das Zusammenspiel des ER mit dem endo-lysosomalen System wird weiterhin durch den Befund einer möglichen Interaktion von TPC1 mit der *Na/K-transporting ATPase subunit alpha-1* und Myosin unterstützt, die beide auch mit dem IP_3 R interagieren (Lin-Moshier et al., 2014). Auch das in den Immunopräzipitaten identifizierte Ca^{2+} -bindende Protein Calreticulin ist im ER zu finden, wo es neben der Faltung von Glykoproteinen, auch eine wichtige Funktion bei der Ca^{2+} -Homöostase übernimmt (Michalak et al., 2009). Eine Interaktion von TPC1 mit Calreticulin würde ebenfalls auf wechselseitige Beziehungen zwischen den sauren Ca^{2+} -Speichern und dem ER hindeuten.

Wie genau die Verbindungen zwischen den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern entstehen und aufrechterhalten werden, ist noch nicht vollständig geklärt. Die in den TPC1-Antikörper-Immunopräzipitationen und im Rahmen einer weiteren unabhängigen Studie

(Lin-Moshier et al., 2014) identifizierten Annexine könnten dabei als Ca^{2+} -Sensoren (Monastyrskaya et al., 2007) eine entscheidende Funktion übernehmen. Der Subtyp Annexin A1 konnte als Schlüsselprotein an Kontaktstellen zwischen dem ER und einer Subpopulation von Endosomen, die dem Transport von Cholesterin dienen, identifiziert werden (Eden et al., 2016). Für die Subtypen A2 bzw. A8 konnte eine Rolle bei der Exozytose von sekretorischen Granula in Endothelzellen von Blutgefäßen (Gerke, 2016) und neuroendokrinen Zellen (Chasserot-Golaz et al., 2005) gezeigt werden.

Für intervesikuläre Fusionsprozesse wurden Interaktionen zwischen TPC Subtypen und Rab-Proteinen schon mehrfach beschrieben. Dabei wurden für TPC1 meist Interaktionen mit endosomal exprimierten Rab Isoformen, wie z. B. Rab5, beobachtet, was sich mit der angenommenen subzellulären TPC1 Lokalisation deckt (Morgan et al., 2011). Auch in den im Rahmen dieser Arbeit analysierten TPC1-Antikörper-Immunpräzipitaten konnte der endosomale Subtyp Rab5 nachgewiesen werden. Zudem konnte aber auch das lysosomale LAMP2 als potentieller Interaktionspartner identifiziert werden. Dieser Befund deckt sich wiederum mit der in 6.7.1 dargestellten Präsenz von TPC1 in späten endosomalen/lysosomalen Fraktionen von peritonealen Zellen. Demnach kann im ganzen endo-lysosomalen System von einer funktionellen Rolle von TPC1 ausgegangen werden, worauf bereits auch Ergebnisse aus anderen Studien hindeuteten (Morgan et al., 2011).

In den vorliegenden Versuchsreihen zur Identifizierung von TPC1-Interaktionspartnern konnten zudem Proteine in den TPC1-Antikörper-Immunopräzipitaten nachgewiesen werden, für die bisher keinerlei Daten zu einer Interaktion mit TPC1 existieren. Dazu zählt unter anderem das Protein KCTD9, das sich durch eine N-terminale BTB-Domäne auszeichnet, die eine Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht (Ji et al., 2016). Mittels der BTB-Domäne bilden KCTD9 Proteine Homopentamere, die unter anderem mit dem an der Bildung eines E3 Ubiquitin-Protein Ligase Komplexes beteiligten Cullin-3 interagieren (Ji et al., 2016). Der E3 Ubiquitin-Protein Ligase Komplex ist für die selektive Modifikation von Proteinen durch Ubiquitynilierung zuständig, um diese Proteine für den Abbauprozess zu markieren (Pintard et al., 2004). Für Cullin-3 konnte wiederum eine Rolle im Rahmen des endo-lysosomalen *traffickings* beschrieben werden (Huotari et al., 2012). Auf Grund dieser Zusammenhänge könnte eine Interaktion zwischen TPC1 und KCTD9 ebenfalls eine Bedeutung für das *trafficking* im endo-lysosomalen System haben.

Eine Ausbildung von Kontaktstellen könnte aber auch durch Bindungspartner der IP_3R ermöglicht werden. Dazu haben Befunde aus unserem Labor bereits zum einen gezeigt, dass der IP_3R -Regulator IRBIT stark im Hodengewebe und in reifen Spermien exprimiert wird (Borth et al., 2016) und zum anderen, dass sowohl der IP_3R als auch der TPC1 in

lipid rafts nachweisbar sind (Arndt et al., 2014). Auf Grund dieser Befunde stellte sich die Frage, ob eine Interaktion zwischen TPC1 und IRBIT stattfindet, die möglicherweise eine funktionelle Relevanz sowohl für die Akrosomreaktion, aber auch für die Mastzell-Degranulation haben könnte. Deshalb wurde mit einem spezifischen Antikörper mit Hilfe der Western Blot Technik die Präsenz von IRBIT in den TPC1-Antikörper-Immunopräzipitaten untersucht (s. 6.10.1). Zwar konnte IRBIT weder mittels Western Blot, noch in den massenspektrometrischen Analysen nachgewiesen werden; jedoch war es möglich, Peptide der strukturell verwandten Adenosylhomocysteinase (AHCY) im Immunopräzipitat des TPC1-Antikörpers zu identifizieren. In Abb. 73 sind die Domänenstrukturen der AHCY-like (AHCYL) Proteinfamilie, zu der auch IRBIT zählt, und der Adenosylhomocysteinase dargestellt. Zwar ist die IRBIT-Domäne spezifisch für die Mitglieder der AHCYL-Familie (Devogelaere et al., 2008), da aber auch diese Proteine eine AHCY-Domäne aufweisen, kann eine potentielle Interaktion zwischen TPC1 und IRBIT nicht ausgeschlossen werden.

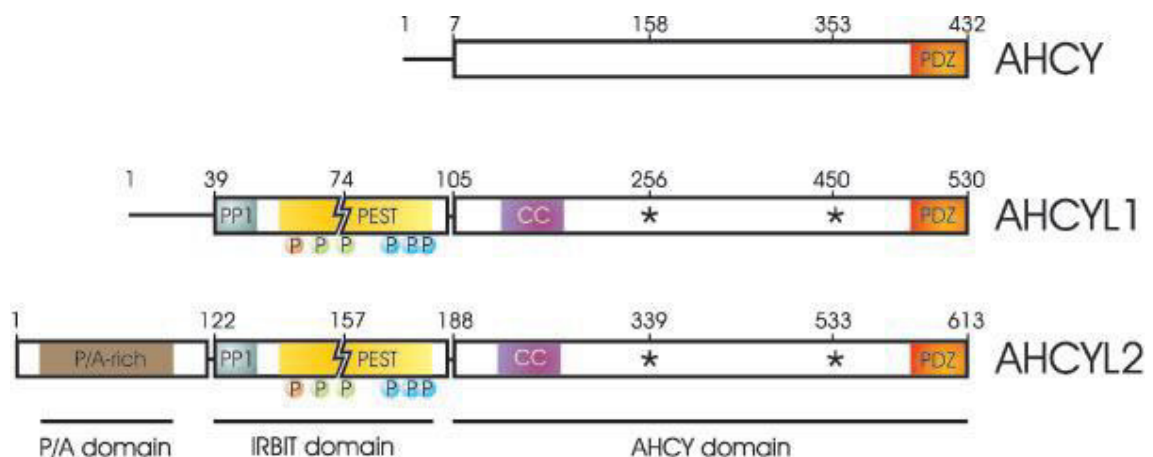


Abb. 73 Vergleich der Domänenstrukturen der Adenosylhomocysteinase (AHCY) und AHCY-like (AHCYL) Proteinfamilien.

Die AHCY Domäne mit einem C-terminalen PDZ-Bindungsmodul, findet sich sowohl in Proteinen der AHCY als auch der AHCYL Familie; die AHCYL Proteine weisen innerhalb der Domäne zusätzlich eine *Coiled-Coil* (CC) Region auf. Je zwei Mutationen in wichtigen Aminosäureresten (*) von AHCYL 1 und 2 führen jedoch zum Verlust der katalytischen Aktivität. Die AHCYL-Proteine unterscheiden sich von der AHCY aber vor allem durch die N-terminale IRBIT-Domäne, die eine PEST-Sequenz und eine PP1 Bindestelle enthält. AHCYL 2 zeichnet sich weiterhin durch eine benachbarte Prolin- und Alanin-reiche P/A Domäne aus.
Modifiziert nach Devogelaere et al. (2008).

Insgesamt kann festgehalten werden, dass TPC1 bei der Bildung der *nanojunctions* mit dem ER wahrscheinlich mehrere Funktionen übernehmen könnte: Zum einen könnten die Interaktionen mit ER-Membranproteinen direkt oder in Verbindung mit akzessorischen Proteinen der Positionierung der sauren Organellen in unmittelbarer Nähe zum ER dienen, zum anderen werden NAADP/TPC1-vermittelte Ca^{2+} -Signale offenbar zur tatsächlichen Ausbildung der Membrankontaktstellen benötigt (Kilpatrick et

al., 2017). Zur Bestätigung dieser Vermutungen könnten beispielsweise die hier beschriebenen Versuchsreihen zur elektrophysiologischen Charakterisierung und zum Ca^{2+} -*signaling* nach Behandlung der Mastzellen mit spezifischer siRNA für die hier identifizierten TPC1-Bindungspartner wiederholt werden.

Vorstellbar ist auch, dass die Granula in Mastzellen ebenfalls am Ca^{2+} -*signaling* beteiligt sind. In einer Studie an zytotoxischen T-Lymphozyten wurde bereits vermutet, dass zytolytische Granula ihre eigene Fusion mit der Plasmamembran durch die Freisetzung von in ihnen gespeichertem Ca^{2+} katalysieren (Davis et al., 2012). Da die sekretorischen Granula der Mastzellen, wie auch die zytolytischen Granula der T-Lymphozyten, zu den Lysosom-verwandten Organellen zählen und damit als intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher dienen (Patel und Docampo, 2010), wäre es vorstellbar, dass auch die sekretorischen Mastzell-Granula das für ihre Verschmelzung mit der Plasmamembran benötigte Ca^{2+} NAADP/TPC1-abhängig selbst liefern. Bisher ist allerdings ungeklärt, ob die verschiedenen TPC Subtypen auch in Mastzellen auf Endosomen und Lysosomen lokalisiert sind.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wären elektronenmikroskopische Aufnahmen von Immunogold-Färbungen mit TPC1 bzw. TPC2 Primärantikörpern und Goldpartikelgekoppelten Sekundärantikörpern an Semidünnschnitten hilfreich. Da es unter den bisher verwendeten Bedingungen nur in Spermien (Arndt et al., 2014), jedoch nicht in Mastzellen möglich war, spezifische Signale des TPC1-Antikörpers zu detektieren (s. 6.7.2), müssen zunächst weitere Versuchsreihen zur Standardisierung der Immunogoldfärbung an Semidünnschnitten fixierter Mastzellen durchgeführt werden. Im nächsten Schritt könnte dann gezielt untersucht werden, ob die TPCs auch auf den sekretorischen Granula vorkommen; dafür könnten Immunogold Co-Lokalisationsstudien durchgeführt werden, für die, neben TPC-Antikörpern, ein Granulaspezifischer Antikörper (z. B. Histamin-Antikörper) verwendet werden würde. Sollten TPCs auf den Mastzell-Granula lokalisiert sein, besteht die Möglichkeit, dass nicht nur Endosomen und Lysosomen über die TPC-vermittelte Bildung von Membrankontaktstellen mit dem ER kommunizieren, sondern auch sekretorische Granula in Mastzellen. Weiterhin wären natürlich auch Kontakte zwischen endo-lysosomalen Organellen und sekretorischen Granula vorstellbar. Um herauszufinden, ob zwischen den verschiedenen intrazellulären Ca^{2+} -Speichern tatsächlich Membrankontaktstellen existieren, wurden die unter 6.4.1 gezeigten transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen zur detaillierten Darstellung verschiedener intrazellulärer Strukturen in den Mastzellen nochmals eingehend untersucht. Leider sind auf Grund der gewählten Fixierungstechnik, die ausschließlich

auf eine starke Kontrastierung elektronendichter Bereiche abzielt, die Lipidstrukturen und damit die Membranen nicht in den Aufnahmen zu erkennen (Winey et al., 2014) (s. Abb. 74). Deshalb kann auf Basis von vergrößerten Ausschnitten aus diesen Bildern auch keine definitive Aussage über die Existenz bzw. TPC1-abhängige Bildung von Kontaktstellen zwischen den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern in Mastzellen gemacht werden. Dennoch konnten einige Regionen identifiziert werden, in denen auf Grund der auffälligen räumlichen Nähe ein direkter Kontakt zwischen den Organellen vorstellbar wäre (s. Abb. 74, Pfeile). Durch die Verwendung von alternativen Methoden zur Fixierung der Präparate, z. B. mit Osmiumtetroxid, das sich bevorzugt in Membranen einlagert (de Bruijn et al., 1984), könnten in zukünftigen Studien Membranstrukturen erhalten und so möglicherweise Kontaktstellen sichtbar gemacht werden (Winey et al., 2014). Ein direkter Vergleich zwischen Wildtyp und TPC1-defizienten Mastzellen könnte es zudem erlauben zu untersuchen, ob die entsprechenden Membrankontaktstellen in TPC1-defizienten Mastzellen reduziert sind.

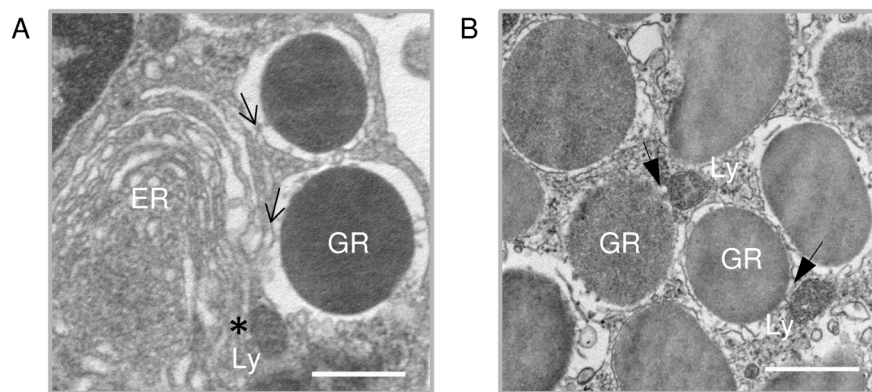


Abb. 74 Potentielle Membrankontaktstellen zwischen intrazellulären Ca^{2+} -Speichern in Mastzellen.

Mastzellen aus dem Peritoneum von Wildtyp-Mäusen wurden für 2 Stunden in 2 % Glutaraldehyd fixiert. Nach dem Einbetten in LR resin Gold wurden Semidünnschnitte der Präparate angefertigt und eine Kontrastfärbung mit Methylenblau durchgeführt. Der Maßstabsbalken entspricht 0,5 μm . Gekennzeichnet sind das Endoplasmatische Retikulum (ER), sekretorische Granula (GR) und Lysosomen (Ly).

A Mögliche Kontaktstellen zwischen dem ER und sekretorischen Granula bzw. Lysosomen.

Sowohl sekretorische Granula als auch Lysosomen befinden sich in unmittelbarer Nähe zum ER. Eventuelle Kontaktstellen zwischen den Ca^{2+} -Speichern sind mit einem Pfeil (ER/Granula Kontakt) bzw. einem Sternchen (ER/Lysosom) gekennzeichnet.

B Mögliche Kontaktstellen zwischen Lysosomen und sekretorischen Granula.

Auch zwischen sekretorischen Granula und Lysosomen könnten möglicherweise Kontaktstellen existieren (gefüllter Pfeil).

Da die genetische Deletion von TPC1 die Pufferfunktion des endo-lysosomalen Systems vermutlich beeinträchtigt, ist möglicherweise nicht nur die Ca^{2+} -Konzentration im ER erhöht, sondern auch in den sekretorischen Granula. Geht man, wie bereits oben erwähnt, davon aus, dass die Granula das für die Fusion mit der Plasmamembran benötigte Ca^{2+} selbst bereitstellen, könnte ein erhöhter Ca^{2+} -Gehalt eine Erklärung für

die bereits im Ruhezustand erhöhte Histaminfreisetzung aus TPC1^{-/-} Mastzellen (s. 6.8.1, Abb. 61) sein. Um diese These initial zu überprüfen, wäre eine vergleichende Analyse des Ca²⁺-Status der Granula in Wildtyp und TPC1-defizienten Mastzellen notwendig. Dazu könnten in naher Zukunft möglicherweise Granula-spezifische, genetisch-kodierte Ca²⁺-Indikatoren zumindest für die Mastzell-ähnliche RBL-1 Zelllinie eingesetzt werden; eine analoge Vorgehensweise mit Lysosomen-spezifischen Indikatoren wurde bereits erfolgreich in Studien zur Untersuchung des lysosomalen Ca²⁺-Status angewendet (Lopez-Sanjurjo et al., 2013).

Welchen Einfluss eine Veränderung des lysosomalen Ca²⁺-Status tatsächlich haben könnte, zeigt sich bei der neurodegenerativen Erkrankung Niemann-Pick Typ C (NPC). In Folge einer Mutation im NPC1 und/oder NPC2 Gen kommt es zu einer Akkumulation von Sphingosin in späten Endosomen und Lysosomen und dadurch im Weiteren zu einem Abfall der luminalen Ca²⁺-Konzentration (Lloyd-Evans et al., 2008; Hoglinger et al., 2015). Interessanterweise konnte dazu gezeigt werden, dass der Ca²⁺-Ausstrom aus den endo-lysosomalen Vesikeln dabei sehr spezifisch über TPC1 erfolgt (Hoglinger et al., 2015). Auf Grund des verringerten Ca²⁺-Gehalts kommt es letztlich zu einer Störung des endo-lysosomalen *traffickings*, was wiederum z. B. die Akkumulation von Cholesterin in späten Endosomen und Lysosomen und letztendlich vor allem das Absterben von Neuronen verursacht (Bi und Liao, 2010). Da auch die genetische Deletion sowie die pharmakologische Inhibition der TPCs zu einer Beeinträchtigung des endo-lysosomalen *traffickings* (Grimm et al., 2017) und vermutlich auch zu einer Reduktion der lysosomalen Ca²⁺ Konzentration führt (s. 6.6.2.1), liegt nahe, dass auch Mutationen in den TPCN-Genen unmittelbar für bestimmte Erkrankungen verantwortlich sind. In verschiedenen Studien konnte bereits ein Zusammenhang zwischen TPCs und so diversen Krankheitsbildern wie der Parkinson'schen Krankheit (Rivero-Rios et al., 2016), der nicht-alkoholischen Fettleber (NASH) (Grimm et al., 2014) und einer Ebola-Virusinfektion (Sakurai et al., 2015) hergestellt werden.

7.6 Besondere Bedeutung von TPC1 für die Mastzell-Degranulation

Mastzellen sind an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt. So werden sie z. B. sowohl im Rahmen einer Immunantwort des angeborenen wie auch des erworbenen Immunsystems aktiviert. Die funktionelle Diversität von Mastzellen entsteht dabei vor allem durch die Vielfalt der von ihnen bereitgestellten Mediatoren (Gilfillan und Beaven, 2011). Allerdings ergibt sich durch diese Bandbreite an Botenstoffen auch die unbedingte Notwendigkeit, deren Freisetzung selektiv zu regulieren: Auf einen

bestimmten Stimulus hin muss zudem die Ausschüttung eines oder einer Kombination von bestimmten Immunmediatoren sowohl zeitlich als auch räumlich koordiniert ablaufen (Rivera und Gilfillan, 2006; Hong-Tao M, 2010). Darüber hinaus muss gesteuert werden, welcher Exozytose-Modus (Verbund-Exozytose, PMD oder *kiss and run*) ablaufen soll (Ales et al., 1999; L. G. Wu et al., 2014). Wie genau diese logistische Herausforderung in Mastzellen bewältigt wird, ist bis zum heutigen Zeitpunkt aber nur teilweise verstanden. Allerdings sind zahlreiche Rezeptoren und Signalwege bekannt, die bei der Aktivierung von Mastzellen eine Rolle spielen (Gilfillan und Beaven, 2011). Erste Studien geben außerdem Hinweise darauf, dass die ausschließliche Exozytose einer Granula-Subpopulation durch ganz bestimmte SNARE-Proteine vermittelt wird. So konnten z. B. die SNAREs SNAP23 und VAMP-8 speziell auf Serotonin-, aber nicht auf Histamin-gefüllten Granula identifiziert werden (Puri und Roche, 2008). Neben der Art des freizusetzenden Mediators muss auch die Stärke und Dauer der Degranulationsreaktion in Mastzellen geregelt sein, um eine unerwünschte Überreaktion des Immunsystems zu verhindern (Rivera und Gilfillan, 2006). Dabei ist vor allem eine präzise Justierung der Ca^{2+} -Signale in der Zelle wichtig. Legt man das oben beschriebene Modell (s. Abb. 72) zu Grunde, könnte das TPC1/NAADP regulierte Zusammenspiel der verschiedenen intrazellulären Ca^{2+} -Speicher eine solche Feinabstimmung der Ca^{2+} -Signale in Mastzellen ermöglichen. Dabei wäre die nach Aktivierung der Mastzellen produzierte NAADP-Menge ausschlaggebend dafür, wie viele TPC1-abhängige Membrankontaktstellen zwischen dem endo-lysosomalen System und dem ER entstehen, wodurch letztlich die Pufferkapazität des endo-lysosomalen System und dadurch die Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol bestimmt würde. Dazu ist z. B. bereits bekannt, dass eine hohe zytosolische Ca^{2+} -Konzentration vermehrt zum *kiss-and-run* Exozytose-Modus führt (Ales et al., 1999), und dass bestimmte Vesikel-Subpopulationen unterschiedlich sensibel für Ca^{2+} sind (Dolensek et al., 2011).

Auf der Basis dieser Annahmen ist nicht ausgeschlossen, dass ein Fehlen der TPC1-vermittelten Ca^{2+} -Signal Regulation eine der Ursachen für die Überaktivierung von Mastzellen im Rahmen von verschiedenen Krankheitsbildern wie Atherosklerose, Morbus Crohn und Autoimmunerkrankungen sein könnte (s. 3.2.5). Besonders auch im Hinblick auf die jüngsten Erkenntnisse zu MCAS Erkrankungen, die nach neuesten Schätzungen ca. 17 % der Deutschen betreffen (G. J. Molderings et al., 2013), ist es von großer Bedeutung, Mechanismen aufzuklären, die zur Überaktivierung von Mastzellen führen, um betroffenen Patienten möglichst optimierte Therapiemöglichkeiten zu bieten. So könnten TPC-Aktivatoren eventuell eine Möglichkeit darstellen der Überaktivierung von Mastzellen entgegenzuwirken.

Ob sich schließlich die genetische Deletion von TPC1 und damit die verstärkte Degranulation der TPC1-defizienten Mastzellen tatsächlich auch auf der Ebene des gesamten Organismus auswirkt und z. B. zu einer allergischen Hypersensibilität führt, wird gegenwärtig von uns in einem murinen *in vivo* Kontaktallergiemodell vergleichend für Wildtyp und TPC1-defiziente Mäuse in Zusammenarbeit mit der Eurofins BioPharma Product Testing Munich GmbH untersucht. Dazu ist geplant pro Genotyp jeweils sechs Weibchen im Alter von acht bis elf Wochen zunächst durch die Verabreichung des Allergens Oxazolone (Kobayashi et al., 2010; Zierler et al., 2016) in das Abdomen zu immunisieren. Nach sieben Tagen werden beide Ohren der Mäuse zur Auslösung einer lokalen allergischen Reaktion erneut mit Oxazolone behandelt. Um die Stärke der allergischen Reaktion vergleichend für Wildtyp und TPC1-defiziente Mäuse zu quantifizieren, sollen die Ohrdicken der Tiere beider Genotypen dann im Anschluss an die Behandlung sowie an drei nachfolgenden Tagen bestimmt werden. Zusätzlich sollen nach Euthanasierung der Tiere histologische Präparate von behandelten und unbehandelten Ohren von Wildtyp und TPC1-defizienten Tieren angefertigt werden, um durch einen Vergleich der Gewebeschnitte, Veränderungen z. B. hinsichtlich der in das Gewebe eingewanderten Zellen festzustellen. Des Weiteren soll die Histaminkonzentration im Ohrgewebe vergleichend für Tiere beider Genotypen bestimmt werden. Um zudem festzustellen, ob auch die genetische Deletion des TPC2 zu einer allergischen Hypersensibilität führt, soll die beschriebene Versuchsanordnung auch mit einer Gruppe TPC2-defizienter Mäuse durchgeführt werden.

Da es sich bei der geplanten Versuchsreihe um einen genehmigungspflichtigen Tierversuch handelt, musste zunächst ein Antrag an die zuständige Behörde der Regierung Oberbayern gestellt werden. Der entsprechende Antrag befindet sich zum jetzigen Zeitpunkt noch in der Genehmigungsphase; aufgrund dessen kann die Veröffentlichung der Befunde zur Rolle von TPC1 bei der Degranulation von Mastzellen inklusive der Daten der *in vivo* Studie erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen.

7.7 TPC1 in Mastzellen und Spermien

Wie bereits einleitend erwähnt (s. 3.1), ist der ungestörte Ablauf der Exozytose des akrosomalen Vesikels in Spermien von essentieller Bedeutung für eine erfolgreiche Befruchtung der Eizelle. Bedingt durch die funktionellen und morphologischen Unterschiede zwischen Spermien und Mastzellen ergibt sich im Zusammenhang mit der akrosomalen Exozytose, im Vergleich zur Mastzell-Degranulation, eine andere Bedeutung für den TPC1. Offenbar ist den beiden physiologischen Prozessen zwar gemein, dass die Freisetzung von Ca^{2+} aus den sauren Speichern durch die Aktivierung

von TPC1 durch NAADP erfolgt. Während jedoch TPC1-vermittelte Ca^{2+} -Signale in Mastzellen scheinbar vor allem für die Interaktion der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher von Bedeutung sind, steht im Kontext der Akrosomreaktion wohl die Amplifikation des Ca^{2+} -Signals durch das Zusammenspiel der TPCs mit dem IP_3R im Rahmen des CICR im Vordergrund (Arndt et al., 2014). Somit scheint der TPC1 in Mastzellen an einer die Degranulation regulierenden Funktion beteiligt zu sein, jedoch in Spermien eine unmittelbare Bedeutung für die Auslösung der akrosomalen Exozytose zu haben.

Hinsichtlich der Akrosomreaktion soll durch die Amplifikation des Ca^{2+} -Signals durch TPC1 wahrscheinlich sichergestellt werden, dass die akrosomale Exozytose erfolgreich initiiert wird, so dass es letztendlich zur Befruchtung der Eizelle kommt. Dabei ist in Spermien wohl eine weitere Besonderheit, dass die TPCs als Ausgangspunkt des CICR-Mechanismus im gleichen intrazellulären Speicherorganell, dem Akrosom, lokalisiert sind wie der $\text{IP}_3\text{-R}$ (Arndt et al., 2014). Hinzu kommt, dass die Akrosomreaktion nur einmal stattfinden kann und es anschließend nicht zu einer Regeneration der Zellen durch endozytotische Prozesse kommt (Mayorga et al., 2007). Somit besteht in Spermien, im Gegensatz zu Mastzellen, ein viel geringerer Bedarf für eine fein abgestimmte Modulierung der Ca^{2+} -Signale.

Insgesamt kann also festgehalten werden, dass der TPC1 eine wichtige Rolle für exozytotische Prozesse sowohl in Spermien als auch in Mastzellen spielt, dass die intrazellulären Effekte der TPC1-vermittelten Ca^{2+} -Signale jedoch, je nach Zellsystem, variieren. Das in den sauren Organellen der beiden Zelltypen gespeicherte Ca^{2+} wird also in Mastzellen vermutlich für die Interaktion der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher und somit für die „*buffering*“-Funktion des endo-lysosmalen Systems benötigt, wohingegen es in Spermien unmittelbar als „*trigger*“ dient, der lokale in globale Ca^{2+} -Signale umwandelt.

8 Literaturverzeichnis

- Aaij, C., and Borst, P. (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochimica et biophysica acta* 269, 192-200.
- Aarhus, R., Dickey, D.M., Graeff, R.M., et al. (1996). Activation and inactivation of Ca²⁺ release by NAADP⁺. *The Journal of biological chemistry* 271, 8513-8516.
- Abe, M., Kurosawa, M., Ishikawa, O., et al. (2000). Effect of mast cell-derived mediators and mast cell-related neutral proteases on human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production. *J Allergy Clin Immunol* 106, S78-84.
- Akin, C. (2017). Mast cell activation syndromes. *J Allergy Clin Immunol* 140, 349-355.
- Akin, C., Valent, P., and Metcalfe, D.D. (2010). Mast cell activation syndrome: Proposed diagnostic criteria. *J Allergy Clin Immunol* 126, 1099-1104 e1094.
- Albrecht, T., Zhao, Y., Nguyen, T.H., et al. (2015). Fluorescent biosensors illuminate calcium levels within defined beta-cell endosome subpopulations. *Cell calcium* 57, 263-274.
- Ales, E., Tabares, L., Poyato, J.M., et al. (1999). High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nature cell biology* 1, 40-44.
- Alpy, F., Rousseau, A., Schwab, Y., et al. (2013). STARD3 or STARD3NL and VAP form a novel molecular tether between late endosomes and the ER. *Journal of cell science* 126, 5500-5512.
- Altman, B.J., and Rathmell, J.C. (2012). Metabolic stress in autophagy and cell death pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a008763.
- Alvarez de Toledo, G., and Fernandez, J.M. (1990). Compound versus multigranular exocytosis in peritoneal mast cells. *J Gen Physiol* 95, 397-409.
- Amin, K. (2012). The role of mast cells in allergic inflammation. *Respiratory medicine* 106, 9-14.
- Ando, H., Mizutani, A., Kiefer, H., et al. (2006). IRBIT suppresses IP₃ receptor activity by competing with IP₃ for the common binding site on the IP₃ receptor. *Mol Cell* 22, 795-806.
- Ando, H., Mizutani, A., Matsu-ura, T., et al. (2003). IRBIT, a novel inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptor-binding protein, is released from the IP₃ receptor upon IP₃ binding to the receptor. *The Journal of biological chemistry* 278, 10602-10612.
- Andrejewski, N., Punnonen, E.L., Guhde, G., et al. (1999). Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* 274, 12692-12701.
- Arlt, E. (2013). Master Thesis: Two Pore Channel Proteins: Functional reproductive studies using different TPC gene deficient mouse strains. Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie. Vol. Master: LMU Munich.
- Arndt, L. (2012). Diploma Thesis: Identifizierung und funktionelle Charakterisierung der TPCN-Ionenkanäle in Nagerspermien. Medizinische Fakultät, Walther-Straub-Institute. Munich: Ludwig-Maximilians-University.
- Arndt, L., Castonguay, J., Arlt, E., et al. (2014). NAADP and the Two Pore Channel Protein 1 participate in the Acrosome Reaction in Mammalian Spermatozoa. *Molecular biology of the cell*.
- Arnoult, C., Zeng, Y., and Florman, H.M. (1996). ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *The Journal of cell biology* 134, 637-645.
- Arredouani, A., Ruas, M., Collins, S.C., et al. (2015). Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) and Endolysosomal Two-pore Channels Modulate Membrane Excitability and Stimulus-Secretion Coupling in Mouse Pancreatic beta Cells. *The Journal of biological chemistry* 290, 21376-21392.
- Arruda, A.P., and Hotamisligil, G.S. (2015). Calcium Homeostasis and Organelle Function in the Pathogenesis of Obesity and Diabetes. *Cell Metab* 22, 381-397.

- Azouz, N.P., Hammel, I., and Sagi-Eisenberg, R. (2014). Characterization of mast cell secretory granules and their cell biology. *DNA Cell Biol* 33, 647-651.
- Babcock, D.F., First, N.L., and Lardy, H.A. (1976). Action of ionophore A23187 at the cellular level. Separation of effects at the plasma and mitochondrial membranes. *The Journal of biological chemistry* 251, 3881-3886.
- Bagur, R., and Hajnoczky, G. (2017). Intracellular Ca²⁺ Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Mol Cell* 66, 780-788.
- Baker, R.W., and Hughson, F.M. (2016). Chaperoning SNARE assembly and disassembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 465-479.
- Balseiro-Gomez, S., Flores, J.A., Acosta, J., et al. (2016). Transient fusion ensures granule replenishment to enable repeated release after IgE-mediated mast cell degranulation. *Journal of cell science* 129, 3989-4000.
- Balzar, S., Chu, H.W., Strand, M., et al. (2005). Relationship of small airway chymase-positive mast cells and lung function in severe asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 171, 431-439.
- Barclay, J.W., Morgan, A., and Burgoyne, R.D. (2005). Calcium-dependent regulation of exocytosis. *Cell calcium* 38, 343-353.
- Barros, C., Bedford, J.M., Franklin, L.E., et al. (1967). Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *The Journal of cell biology* 34, C1-5.
- Benhamou, M., Gutkind, J.S., Robbins, K.C., et al. (1990). Tyrosine phosphorylation coupled to IgE receptor-mediated signal transduction and histamine release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 5327-5330.
- Berlanga, O., Emambokus, N., and Frampton, J. (2005). GPIIb (CD41) integrin is expressed on mast cells and influences their adhesion properties. *Exp Hematol* 33, 403-412.
- Berridge, G., Cramer, R., Galione, A., et al. (2002). Metabolism of the novel Ca²⁺-mobilizing messenger nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate via a 2'-specific Ca²⁺-dependent phosphatase. *The Biochemical journal* 365, 295-301.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 517-529.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11-21.
- Berruti, G., Ripolone, M., and Ceriani, M. (2010). USP8, a regulator of endosomal sorting, is involved in mouse acrosome biogenesis through interaction with the spermatid ESCRT-0 complex and microtubules. *Biology of reproduction* 82, 930-939.
- Bertrand, C.A., Laboissee, C., Hopfer, U., et al. (2006). Methods for detecting internalized, FM 1-43 stained particles in epithelial cells and monolayers. *Biophys J* 91, 3872-3883.
- Bi, X., and Liao, G. (2010). Cholesterol in Niemann-Pick Type C disease. *Subcell Biochem* 51, 319-335.
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., et al. (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* 508, 483-487.
- Billington, R.A., Ho, A., and Genazzani, A.A. (2002). Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) is present at micromolar concentrations in sea urchin spermatozoa. *The Journal of physiology* 544, 107-112.
- Blank, U., and Rivera, J. (2004). The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends Immunol* 25, 266-273.
- Boatman, D.E., and Robbins, R.S. (1991). Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biology of reproduction* 44, 806-813.
- Bonneau, B., Ando, H., Kawaai, K., et al. (2016). IRBIT controls apoptosis by interacting with the Bcl-2 homolog, Bcl2l10, and by promoting ER-mitochondria contact. *eLife* 5.

- Bootman, M.D. (2012). Calcium signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a011171.
- Borg, C.L., Wolski, K.M., Gibbs, G.M., et al. (2010). Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'non-performer'. *Hum Reprod Update* 16, 205-224.
- Borish, L., and Joseph, B.Z. (1992). Inflammation and the allergic response. *The Medical clinics of North America* 76, 765-787.
- Borth, H., Weber, N., Meyer, D., et al. (2016). The IP3 R Binding Protein Released With Inositol 1,4,5-Trisphosphate Is Expressed in Rodent Reproductive Tissue and Spermatozoa. *J Cell Physiol* 231, 1114-1129.
- Bouabe, H., and Okkenhaug, K. (2013). Gene targeting in mice: a review. *Methods in molecular biology* 1064, 315-336.
- Bradding, P. (1999). Allergen immunotherapy and mast cells. *Clin Exp Allergy* 29, 1445-1448.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Brailoiu, E., Churamani, D., Cai, X., et al. (2009). Essential requirement for two-pore channel 1 in NAADP-mediated calcium signaling. *The Journal of cell biology* 186, 201-209.
- Bray, D. (1998). Signaling complexes: biophysical constraints on intracellular communication. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27, 59-75.
- Brini, M., and Carafoli, E. (2011). The plasma membrane Ca(2)+ ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Brown, D.A., and London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 111-136.
- Bryant, C.D., Zhang, N.N., Sokoloff, G., et al. (2008). Behavioral differences among C57BL/6 substrains: implications for transgenic and knockout studies. *J Neurogenet* 22, 315-331.
- Bucci, C., Parton, R.G., Mather, I.H., et al. (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70, 715-728.
- Buffone, M.G., Rodriguez-Miranda, E., Storey, B.T., et al. (2009). Acrosomal exocytosis of mouse sperm progresses in a consistent direction in response to zona pellucida. *J Cell Physiol* 220, 611-620.
- Burgess, T.L., and Kelly, R.B. (1987). Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu Rev Cell Biol* 3, 243-293.
- Burgoyne, R.D. (1995). Fast exocytosis and endocytosis triggered by depolarisation in single adrenal chromaffin cells before rapid Ca²⁺ current run-down. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 430, 213-219.
- Burgoyne, R.D., and Morgan, A. (2003). Secretory granule exocytosis. *Physiological reviews* 83, 581-632.
- Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry* 112, 195-203.
- Burry, R.W. (2011). Controls for immunocytochemistry: an update. *J Histochem Cytochem* 59, 6-12.
- Cabeza, J.M., Acosta, J., and Ales, E. (2013). Mechanisms of granule membrane recapture following exocytosis in intact mast cells. *The Journal of biological chemistry* 288, 20293-20305.
- Calcraft, P.J., Ruas, M., Pan, Z., et al. (2009). NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature* 459, 596-600.
- Calvano, C.D., De Ceglie, C., and Zamboni, C.G. (2014). Proteomic analysis of complex protein samples by MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods in molecular biology* 1129, 365-380.

- Cang, C., Zhou, Y., Navarro, B., et al. (2013). mTOR regulates lysosomal ATP-sensitive two-pore Na⁽⁺⁾ channels to adapt to metabolic state. *Cell* *152*, 778-790.
- Canton, J., and Grinstein, S. (2015). Measuring lysosomal pH by fluorescence microscopy. *Methods in cell biology* *126*, 85-99.
- Carpenter, C.L. (2000). Actin cytoskeleton and cell signaling. *Crit Care Med* *28*, N94-99.
- Castonguay, J. (2014). Zur molekularen und vesikulären Umgebung des Ionenkanals TPC1. Experimentelle und Klinische Pharmakologie. Vol. Dr. rer. nat.: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
- Castonguay, J., Orth, J.H.C., Muller, T., et al. (2017). The two-pore channel TPC1 is required for efficient protein processing through early and recycling endosomes. *Sci Rep* *7*, 10038.
- Catterall, W.A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *3*, a003947.
- Ceridono, M., Ory, S., Momboisse, F., et al. (2011). Selective recapture of secretory granule components after full collapse exocytosis in neuroendocrine chromaffin cells. *Traffic* *12*, 72-88.
- Chasserot-Golaz, S., Vitale, N., Umbrecht-Jenck, E., et al. (2005). Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Molecular biology of the cell* *16*, 1108-1119.
- Chazotte, B. (2011). Labeling lysosomes in live cells with LysoTracker. *Cold Spring Harbor protocols* *2011*, pdb prot5571.
- Chen, Y.A., and Scheller, R.H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 98-106.
- Christensen, K.A., Myers, J.T., and Swanson, J.A. (2002). pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *Journal of cell science* *115*, 599-607.
- Churchill, G.C., O'Neill, J.S., Masgrau, R., et al. (2003). Sperm deliver a new second messenger: NAADP. *Current biology : CB* *13*, 125-128.
- Churchill, G.C., Okada, Y., Thomas, J.M., et al. (2002). NAADP mobilizes Ca⁽²⁺⁾ from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell* *111*, 703-708.
- Clapham, D.E. (2007). Calcium signaling. *Cell* *131*, 1047-1058.
- Clark, B.J. (2012). The mammalian START domain protein family in lipid transport in health and disease. *J Endocrinol* *212*, 257-275.
- Cochilla, A.J., Angleson, J.K., and Betz, W.J. (1999). Monitoring secretory membrane with FM1-43 fluorescence. *Annual review of neuroscience* *22*, 1-10.
- Coleman, D.L., and Hummel, K.P. (1973). The influence of genetic background on the expression of the obese (Ob) gene in the mouse. *Diabetologia* *9*, 287-293.
- Collington, S.J., Williams, T.J., and Weller, C.L. (2011). Mechanisms underlying the localisation of mast cells in tissues. *Trends Immunol* *32*, 478-485.
- Conti, P., and Kempuraj, D. (2016). Important role of mast cells in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* *5*, 77-80.
- Conti, P., and Shaik-Dasthagirisaeab, Y. (2015). Atherosclerosis: a chronic inflammatory disease mediated by mast cells. *Cent Eur J Immunol* *40*, 380-386.
- Contreras, L., Drago, I., Zampese, E., et al. (2010). Mitochondria: the calcium connection. *Biochimica et biophysica acta* *1797*, 607-618.
- Cook, N.R., Row, P.E., and Davidson, H.W. (2004). Lysosome associated membrane protein 1 (Lamp1) traffics directly from the TGN to early endosomes. *Traffic* *5*, 685-699.
- Crivellato, E., Beltrami, C., Mallardi, F., et al. (2003a). Paul Ehrlich's doctoral thesis: a milestone in the study of mast cells. *Br J Haematol* *123*, 19-21.
- Crivellato, E., Nico, B., Gallo, V.P., et al. (2010). Cell secretion mediated by granule-associated vesicle transport: a glimpse at evolution. *Anat Rec (Hoboken)* *293*, 1115-1124.
- Crivellato, E., Nico, B., Mallardi, F., et al. (2003b). Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* *274*, 778-784.

- da Silva, E.Z., Jamur, M.C., and Oliver, C. (2014). Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem* *62*, 698-738.
- Dahlborn, K., Bugnon, P., Nevalainen, T., et al. (2013). Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification. *Lab Anim* *47*, 2-11.
- Dahlin, J.S., Ding, Z., and Hallgren, J. (2015). Distinguishing Mast Cell Progenitors from Mature Mast Cells in Mice. *Stem Cells Dev* *24*, 1703-1711.
- Dahlin, J.S., and Hallgren, J. (2015). Mast cell progenitors: origin, development and migration to tissues. *Mol Immunol* *63*, 9-17.
- Darszon, A., Acevedo, J.J., Galindo, B.E., et al. (2006). Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* *131*, 977-988.
- Darszon, A., Sanchez-Cardenas, C., Orta, G., et al. (2012). Are TRP channels involved in sperm development and function? *Cell Tissue Res* *349*, 749-764.
- Davis, L.C., Morgan, A.J., Chen, J.L., et al. (2012). NAADP activates two-pore channels on T cell cytolytic granules to stimulate exocytosis and killing. *Current biology : CB* *22*, 2331-2337.
- De Blas, G.A., Roggero, C.M., Tomes, C.N., et al. (2005). Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. *PLoS Biol* *3*, e323.
- de Bruijn, W.C., Memelink, A.A., and Riemersma, J.C. (1984). Cellular membrane contrast and contrast differentiation with osmium triazole and tetrazole complexes. *Histochem J* *16*, 37-50.
- de Cassia Campos, M.R., Toso, V.D., de Souza, D.A., Jr., et al. (2014). Differential effects of chemoattractants on mast cell recruitment in vivo. *Cell Immunol* *289*, 86-90.
- De Young, M.B., Nemeth, E.F., and Scarpa, A. (1987). Measurement of the internal pH of mast cell granules using microvolumetric fluorescence and isotopic techniques. *Arch Biochem Biophys* *254*, 222-233.
- Degorce, F., Card, A., Soh, S., et al. (2009). HTRF: A technology tailored for drug discovery - a review of theoretical aspects and recent applications. *Curr Chem Genomics* *3*, 22-32.
- Deluca, H.F., and Engstrom, G.W. (1961). Calcium uptake by rat kidney mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *47*, 1744-1750.
- Devogelaere, B., Sammels, E., and De Smedt, H. (2008). The IRBIT domain adds new functions to the AHCY family. *Bioessays* *30*, 642-652.
- Diaz, A., Dominguez, L., Fornes, M.W., et al. (1996). Acrosome content release in streptolysin O permeabilized mouse spermatozoa. *Andrologia* *28*, 21-26.
- Dietrich, A., Mederos, Y.S.M., Gollasch, M., et al. (2005). Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Molecular and cellular biology* *25*, 6980-6989.
- Dolensek, J., Skelin, M., and Rupnik, M.S. (2011). Calcium dependencies of regulated exocytosis in different endocrine cells. *Physiol Res* *60 Suppl 1*, S29-38.
- Drago, I., De Stefani, D., Rizzuto, R., et al. (2012). Mitochondrial Ca²⁺ uptake contributes to buffering cytoplasmic Ca²⁺ peaks in cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 12986-12991.
- Dvorak, A.M., Mihm, M.C., Jr., and Dvorak, H.F. (1976). Degranulation of basophilic leukocytes in allergic contact dermatitis reactions in man. *Journal of immunology* *116*, 687-695.
- Dvorak, H.F., and Dvorak, A.M. (1975). Basophilic leucocytes: structure, function and role in disease. *Clin Haematol* *4*, 651-683.
- Dvorak, H.F., Dvorak, A.M., and Churchill, W.H. (1973). Immunologic rejection of diethylnitrosamine-induced hepatomas in strain 2 guinea pigs: participation of basophilic leukocytes and macrophage aggregates. *The Journal of experimental medicine* *137*, 751-775.

- Dvorak, H.F., Mihm, M.C., Jr., Dvorak, A.M., et al. (1974). Morphology of delayed type hypersensitivity reactions in man. I. Quantitative description of the inflammatory response. *Lab Invest* 31, 111-130.
- Eccleston, E., Leonard, B.J., Lowe, J.S., et al. (1973). Basophilic leukaemia in the albino rat and a demonstration of the basopoietin. *Nature: New biology* 244, 73-76.
- Eden, E.R. (2016). The formation and function of ER-endosome membrane contact sites. *Biochimica et biophysica acta* 1861, 874-879.
- Eden, E.R., Sanchez-Heras, E., Tsapara, A., et al. (2016). Annexin A1 Tethers Membrane Contact Sites that Mediate ER to Endosome Cholesterol Transport. *Developmental cell* 37, 473-483.
- Eden, E.R., White, I.J., Tsapara, A., et al. (2010). Membrane contacts between endosomes and ER provide sites for PTP1B-epidermal growth factor receptor interaction. *Nature cell biology* 12, 267-272.
- Ehrlich, P. (1878). Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Medizinische Fakultät. Leipzig.
- Eisener-Dorman, A.F., Lawrence, D.A., and Bolivar, V.J. (2009). Cautionary insights on knockout mouse studies: the gene or not the gene? *Brain Behav Immun* 23, 318-324.
- El-Brolosy, M.A., and Stainier, D.Y.R. (2017). Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet* 13, e1006780.
- Elstak, E.D., Neeft, M., Nehme, N.T., et al. (2011). The munc13-4-rab27 complex is specifically required for tethering secretory lysosomes at the plasma membrane. *Blood* 118, 1570-1578.
- Fingar, D.C., Salama, S., Tsou, C., et al. (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 16, 1472-1487.
- Fukuishi, N., Murakami, S., Ohno, A., et al. (2014). Does beta-hexosaminidase function only as a degranulation indicator in mast cells? The primary role of beta-hexosaminidase in mast cell granules. *Journal of immunology* 193, 1886-1894.
- Galione, A. (2011). NAADP receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a004036.
- Galione, A., Evans, A.M., Ma, J., et al. (2009). The acid test: the discovery of two-pore channels (TPCs) as NAADP-gated endolysosomal Ca(2+) release channels. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 458, 869-876.
- Galione, A., Patel, S., and Churchill, G.C. (2000). NAADP-induced calcium release in sea urchin eggs. *Biol Cell* 92, 197-204.
- Galione, A., and Ruas, M. (2005). NAADP receptors. *Cell calcium* 38, 273-280.
- Galli, S.J., Grimaldeston, M., and Tsai, M. (2008). Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nature reviews. Immunology* 8, 478-486.
- Galli, S.J., Nakae, S., and Tsai, M. (2005). Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6, 135-142.
- Galli, S.J., and Tsai, M. (2010). Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol* 40, 1843-1851.
- Galli, S.J., and Tsai, M. (2012). IgE and mast cells in allergic disease. *Nature medicine* 18, 693-704.
- Garcia-Rua, V., Feijoo-Bandin, S., Rodriguez-Penas, D., et al. (2016). Endolysosomal two-pore channels regulate autophagy in cardiomyocytes. *The Journal of physiology* 594, 3061-3077.
- Garrity, A.G., Wang, W., Collier, C.M., et al. (2016). The endoplasmic reticulum, not the pH gradient, drives calcium refilling of lysosomes. *eLife* 5.
- Gerasimenko, J.V., Tepikin, A.V., Petersen, O.H., et al. (1998). Calcium uptake via endocytosis with rapid release from acidifying endosomes. *Current biology : CB* 8, 1335-1338.
- Gerke, V. (2016). Annexins A2 and A8 in endothelial cell exocytosis and the control of vascular homeostasis. *Biol Chem* 397, 995-1003.

- Ghably, J., Saleh, H., Vyas, H., et al. (2015). Paul Ehrlich's mastzellen: a historical perspective of relevant developments in mast cell biology. *Methods in molecular biology* 1220, 3-10.
- Gilfillan, A.M., and Beaven, M.A. (2011). Regulation of mast cell responses in health and disease. *Crit Rev Immunol* 31, 475-529.
- Gincel, D., Zaid, H., and Shoshan-Barmatz, V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *The Biochemical journal* 358, 147-155.
- Glick, D., Barth, S., and Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 221, 3-12.
- Godot, V., Arock, M., Garcia, G., et al. (2007). H4 histamine receptor mediates optimal migration of mast cell precursors to CXCL12. *J Allergy Clin Immunol* 120, 827-834.
- Gomez-Suaga, P., and Hilfiker, S. (2012). LRRK2 as a modulator of lysosomal calcium homeostasis with downstream effects on autophagy. *Autophagy* 8, 692-693.
- Griffiths AJF, M.J., Suzuki DT, et al. (2000). *An Introduction to Genetic Analysis*. (7th edition edn). New York: W. H. Freeman <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22098/>.
- Grimm, C., Chen, C.C., Wahl-Schott, C., et al. (2017). Two-Pore Channels: Catalyzers of Endolysosomal Transport and Function. *Front Pharmacol* 8, 45.
- Grimm, C., Holdt, L.M., Chen, C.C., et al. (2014). High susceptibility to fatty liver disease in two-pore channel 2-deficient mice. *Nat Commun* 5, 4699.
- Grimm, C., Holter, N.I., Draguhn, A., et al. (2008). Compensatory increase in P/Q-calcium current-mediated synaptic transmission following chronic block of N-type channels. *Neurosci Lett* 442, 44-49.
- Gruber, B.L., Marchese, M.J., and Kew, R.R. (1994). Transforming growth factor-beta 1 mediates mast cell chemotaxis. *Journal of immunology* 152, 5860-5867.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry* 260, 3440-3450.
- Guha, S., Coffey, E.E., Lu, W., et al. (2014). Approaches for detecting lysosomal alkalinization and impaired degradation in fresh and cultured RPE cells: evidence for a role in retinal degenerations. *Exp Eye Res* 126, 68-76.
- Gupta, S.K., and Bhandari, B. (2011). Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian journal of andrology* 13, 97-105.
- Haller, T., Dietl, P., Deetjen, P., et al. (1996). The lysosomal compartment as intracellular calcium store in MDCK cells: a possible involvement in InsP₃-mediated Ca²⁺ release. *Cell calcium* 19, 157-165.
- Hamilton, M.J., Frei, S.M., and Stevens, R.L. (2014). The multifaceted mast cell in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 20, 2364-2378.
- Hammel, I., Lagunoff, D., and Galli, S.J. (2010). Regulation of secretory granule size by the precise generation and fusion of unit granules. *J Cell Mol Med* 14, 1904-1916.
- Hariri, H., Ugrankar, R., Liu, Y., et al. (2016). Inter-organelle ER-endolysosomal contact sites in metabolism and disease across evolution. *Commun Integr Biol* 9, e1156278.
- Harris, B.Z., and Lim, W.A. (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *Journal of cell science* 114, 3219-3231.
- Harrison, R.A., and Gadella, B.M. (2005). Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* 63, 342-351.
- Hart, P.H. (2001). Regulation of the inflammatory response in asthma by mast cell products. *Immunology and cell biology* 79, 149-153.
- Hassan, S. (2014). Funktionelle Charakterisierung des Two-Pore-Loop-Kanals 2 (TPC2) im endolysosomalen System. Fakultät für Chemie und Pharmazie. Vol. Dr. rer. nat. München: Ludwig-Maximilians-Universität.

- Hat, B., Kazmierczak, B., and Lipniacki, T. (2011). B cell activation triggered by the formation of the small receptor cluster: a computational study. *PLoS Comput Biol* 7, e1002197.
- Haucke, V., Neher, E., and Sigrist, S.J. (2011). Protein scaffolds in the coupling of synaptic exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Neurosci* 12, 127-138.
- Hay, J.C. (2007). Calcium: a fundamental regulator of intracellular membrane fusion? *EMBO Rep* 8, 236-240.
- Heavey, D.J., Ernst, P.B., Stevens, R.L., et al. (1988). Generation of leukotriene C4, leukotriene B4, and prostaglandin D2 by immunologically activated rat intestinal mucosa mast cells. *Journal of immunology* 140, 1953-1957.
- Herrick, S.B., Schweissinger, D.L., Kim, S.W., et al. (2005). The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J Cell Physiol* 202, 663-671.
- Hibi, T., Hirashima, N., and Nakanishi, M. (2000). Rat basophilic leukemia cells express syntaxin-3 and VAMP-7 in granule membranes. *Biochemical and biophysical research communications* 271, 36-41.
- Hitomi, T., Zhang, J., Nicoletti, L.M., et al. (2004). Phospholipase D1 regulates high-affinity IgE receptor-induced mast cell degranulation. *Blood* 104, 4122-4128.
- Hoglinger, D., Haberkant, P., Aguilera-Romero, A., et al. (2015). Intracellular sphingosine releases calcium from lysosomes. *eLife* 4.
- Hong-Tao M, B.M. (2010). REGULATORS OF CA2+ SIGNALING IN MAST CELLS Potential Targets for Treatment of Mast-Cell Related Diseases? *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Vol. 2017. Austin (TX): Landes Bioscience.
- Hood, J.D., and Cheresh, D.A. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2, 91-100.
- Hooper, R., Churamani, D., Brailoiu, E., et al. (2011). Membrane topology of NAADP-sensitive two-pore channels and their regulation by N-linked glycosylation. *The Journal of biological chemistry* 286, 9141-9149.
- Horny, H.P., Sotlar, K., and Valent, P. (2007). Mastocytosis: state of the art. *Pathobiology* 74, 121-132.
- Hoth, M., and Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355, 353-356.
- Hoth, M., and Penner, R. (1993). Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *The Journal of physiology* 465, 359-386.
- Hu, F., Xu, Y., and Liu, F. (2016). Hypothalamic roles of mTOR complex I: integration of nutrient and hormone signals to regulate energy homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 310, E994-E1002.
- Huang, L.O., Labbe, A., and Infante-Rivard, C. (2013). Transmission ratio distortion: review of concept and implications for genetic association studies. *Hum Genet* 132, 245-263.
- Huber, M., Hughes, M.R., and Krystal, G. (2000). Thapsigargin-induced degranulation of mast cells is dependent on transient activation of phosphatidylinositol-3 kinase. *Journal of immunology* 165, 124-133.
- Hulspas, R., O'Gorman, M.R., Wood, B.L., et al. (2009). Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 76, 355-364.
- Huotari, J., Meyer-Schaller, N., Hubner, M., et al. (2012). Cullin-3 regulates late endosome maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 823-828.
- Hycr, K.L., Bownik, J.M., and Goldberg, M.P. (2000). Ionic selectivity of low-affinity ratiometric calcium indicators: mag-Fura-2, Fura-2FF and BTC. *Cell calcium* 27, 75-86.
- Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., et al. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434, 234-238.
- Irani, A.A., Schechter, N.M., Craig, S.S., et al. (1986). Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 4464-4468.

- Ishibashi, K., Suzuki, M., and Imai, M. (2000). Molecular cloning of a novel form (two-repeat) protein related to voltage-gated sodium and calcium channels. *Biochemical and biophysical research communications* 270, 370-376.
- Iwaki, S., Tkaczyk, C., Metcalfe, D.D., et al. (2005). Roles of adaptor molecules in mast cell activation. *Chem Immunol Allergy* 87, 43-58.
- Jadot, M., Colmant, C., Wattiaux-De Coninck, S., et al. (1984). Intralysosomal hydrolysis of glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide. *The Biochemical journal* 219, 965-970.
- Jahn, R., Lang, T., and Sudhof, T.C. (2003). Membrane fusion. *Cell* 112, 519-533.
- Jemima, E.A., Prema, A., and Thangam, E.B. (2014). Functional characterization of histamine H4 receptor on human mast cells. *Mol Immunol* 62, 19-28.
- Jeziorska, M., McCollum, C., and Woolley, D.E. (1997). Mast cell distribution, activation, and phenotype in atherosclerotic lesions of human carotid arteries. *J Pathol* 182, 115-122.
- Ji, A.X., Chu, A., Nielsen, T.K., et al. (2016). Structural Insights into KCTD Protein Assembly and Cullin3 Recognition. *J Mol Biol* 428, 92-107.
- Johansson, M., Bocher, V., Lehto, M., et al. (2003). The two variants of oxysterol binding protein-related protein-1 display different tissue expression patterns, have different intracellular localization, and are functionally distinct. *Molecular biology of the cell* 14, 903-915.
- Kalesnikoff, J., and Galli, S.J. (2008). New developments in mast cell biology. *Nat Immunol* 9, 1215-1223.
- Kaufman, R.J., and Malhotra, J.D. (2014). Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et biophysica acta* 1843, 2233-2239.
- Kilpatrick, B.S., Eden, E.R., Hockey, L.N., et al. (2017). An Endosomal NAADP-Sensitive Two-Pore Ca²⁺ Channel Regulates ER-Endosome Membrane Contact Sites to Control Growth Factor Signaling. *Cell reports* 18, 1636-1645.
- Kilpatrick, B.S., Eden, E.R., Schapira, A.H., et al. (2013). Direct mobilisation of lysosomal Ca²⁺ triggers complex Ca²⁺ signals. *Journal of cell science* 126, 60-66.
- Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., et al. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163-175.
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G., and Clapham, D.E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427, 360-364.
- Kittel, R.J., and Heckmann, M. (2016). Synaptic Vesicle Proteins and Active Zone Plasticity. *Front Synaptic Neurosci* 8, 8.
- Kobayashi, M., Nunomura, S., Gon, Y., et al. (2010). Abrogation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation at the effector phase prevents contact hypersensitivity to oxazolone. *J Invest Dermatol* 130, 725-731.
- Krystal-Whittemore, M., Dileepan, K.N., and Wood, J.G. (2015). Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol* 6, 620.
- Kuehn, H.S., Radinger, M., and Gilfillan, A.M. (2010). Measuring mast cell mediator release. *Current protocols in immunology Chapter 7, Unit7* 38.
- Kulczycki, A., Jr., Isersky, C., and Metzger, H. (1974). The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. I. Evidence for specific binding of IgE. *The Journal of experimental medicine* 139, 600-616.
- Lam, A.K., Galione, A., Lai, F.A., et al. (2013). Hax-1 identified as a two-pore channel (TPC)-binding protein. *FEBS letters* 587, 3782-3786.
- Larsen, M.O., Rolin, B., Gotfredsen, C.F., et al. (2004). Reduction of beta cell mass: partial insulin secretory compensation from the residual beta cell population in the nicotinamide-streptozotocin Gottingen minipig after oral glucose in vivo and in the perfused pancreas. *Diabetologia* 47, 1873-1878.
- Larson, J.L., and Miller, D.J. (1999). Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Molecular reproduction and development* 52, 445-449.

- Le Roy, I., Pothion, S., Mortaud, S., et al. (2000). Loss of aggression, after transfer onto a C57BL/6J background, in mice carrying a targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Behav Genet* *30*, 367-373.
- Lear, P.V., Gonzalez-Touceda, D., Porteiro Couto, B., et al. (2015). Absence of intracellular ion channels TPC1 and TPC2 leads to mature-onset obesity in male mice, due to impaired lipid availability for thermogenesis in brown adipose tissue. *Endocrinology* *156*, 975-986.
- Lee, C.S., Tong, B.C., Cheng, C.W., et al. (2016). Characterization of Two-Pore Channel 2 by Nuclear Membrane Electrophysiology. *Sci Rep* *6*, 20282.
- Lee, H.C. (2006). Structure and enzymatic functions of human CD38. *Mol Med* *12*, 317-323.
- Lee, H.C., and Aarhus, R. (1995). A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *The Journal of biological chemistry* *270*, 2152-2157.
- Lemieux, B., Percival, M.D., and Falgueyret, J.P. (2004). Quantitation of the lysosomotropic character of cationic amphiphilic drugs using the fluorescent basic amine Red DND-99. *Analytical biochemistry* *327*, 247-251.
- Li, L., and Chin, L.S. (2003). The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. *Cell Mol Life Sci* *60*, 942-960.
- Limaye, A., Hall, B., and Kulkarni, A.B. (2009). Manipulation of mouse embryonic stem cells for knockout mouse production. *Curr Protoc Cell Biol Chapter 19*, Unit 19 13 19 13 11-24.
- Lin-Moshier, Y., Keebler, M.V., Hooper, R., et al. (2014). The Two-pore channel (TPC) interactome unmasks isoform-specific roles for TPCs in endolysosomal morphology and cell pigmentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 13087-13092.
- Lin-Moshier, Y., Walseth, T.F., Churamani, D., et al. (2012). Photoaffinity labeling of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) targets in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* *287*, 2296-2307.
- Lin, W.K., Bolton, E.L., Cortopassi, W.A., et al. (2017). Synthesis of the Ca²⁺-mobilizing messengers NAADP and cADPR by intracellular CD38 enzyme in the mouse heart: Role in beta-adrenoceptor signaling. *The Journal of biological chemistry* *292*, 13243-13257.
- Lingwood, D., and Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* *327*, 46-50.
- Liu, Q.Y., Karpinski, E., Rao, M.R., et al. (1991). Tetrandrine: a novel calcium channel antagonist inhibits type I calcium channels in neuroblastoma cells. *Neuropharmacology* *30*, 1325-1331.
- Lloyd-Evans, E., Morgan, A.J., He, X., et al. (2008). Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nature medicine* *14*, 1247-1255.
- Lopez-Sanjurjo, C.I., Tovey, S.C., Prole, D.L., et al. (2013). Lysosomes shape Ins(1,4,5)P₃-evoked Ca²⁺ signals by selectively sequestering Ca²⁺ released from the endoplasmic reticulum. *Journal of cell science* *126*, 289-300.
- Lorentz, A., Baumann, A., Vitte, J., et al. (2012). The SNARE Machinery in Mast Cell Secretion. *Front Immunol* *3*, 143.
- Lundequist, A., and Pejler, G. (2011). Biological implications of preformed mast cell mediators. *Cell Mol Life Sci* *68*, 965-975.
- Lytton, J., Westlin, M., and Hanley, M.R. (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *The Journal of biological chemistry* *266*, 17067-17071.
- MacDonald, P.E., Joseph, J.W., and Rorsman, P. (2005). Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *360*, 2211-2225.
- Maintz, L., and Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *Am J Clin Nutr* *85*, 1185-1196.

- Malbec, O., Roget, K., Schiffer, C., et al. (2007). Peritoneal cell-derived mast cells: an in vitro model of mature serosal-type mouse mast cells. *Journal of immunology* *178*, 6465-6475.
- Marchand, F., Mecheri, S., Guilloux, L., et al. (2003). Human serum IgE-mediated mast cell degranulation shows poor correlation to allergen-specific IgE content. *Allergy* *58*, 1037-1043.
- Marchant, J.S., and Patel, S. (2015). Two-pore channels at the intersection of endolysosomal membrane traffic. *Biochemical Society transactions* *43*, 434-441.
- Maritzen, T., Schachtner, H., and Legler, D.F. (2015). On the move: endocytic trafficking in cell migration. *Cell Mol Life Sci* *72*, 2119-2134.
- Marquez, B., and Suarez, S.S. (2004). Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biology of reproduction* *70*, 1626-1633.
- Marshall, J.S. (2004). Mast-cell responses to pathogens. *Nature reviews. Immunology* *4*, 787-799.
- Martin-Verdeaux, S., Pombo, I., Iannascoli, B., et al. (2003). Evidence of a role for Munc18-2 and microtubules in mast cell granule exocytosis. *Journal of cell science* *116*, 325-334.
- Masel, J. (2011). Genetic drift. *Current biology : CB* *21*, R837-838.
- Maurer, M., Theoharides, T., Granstein, R.D., et al. (2003). What is the physiological function of mast cells? *Exp Dermatol* *12*, 886-910.
- Maximov, A., Tang, J., Yang, X., et al. (2009). Complexin controls the force transfer from SNARE complexes to membranes in fusion. *Science* *323*, 516-521.
- Mayorga, L.S., Tomes, C.N., and Belmonte, S.A. (2007). Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB life* *59*, 286-292.
- McCloy, R.A., Rogers, S., Caldon, C.E., et al. (2014). Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle* *13*, 1400-1412.
- Melicoff, E., Sansores-Garcia, L., Gomez, A., et al. (2009). Synaptotagmin-2 controls regulated exocytosis but not other secretory responses of mast cells. *The Journal of biological chemistry* *284*, 19445-19451.
- Mellman, I., Fuchs, R., and Helenius, A. (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* *55*, 663-700.
- Melo, R.C., Morgan, E., Monahan-Earley, R., et al. (2014). Pre-embedding immunogold labeling to optimize protein localization at subcellular compartments and membrane microdomains of leukocytes. *Nature protocols* *9*, 2382-2394.
- Merickel, A., and Edwards, R.H. (1995). Transport of histamine by vesicular monoamine transporter-2. *Neuropharmacology* *34*, 1543-1547.
- Metcalf, D.D., Baram, D., and Mekori, Y.A. (1997). Mast cells. *Physiological reviews* *77*, 1033-1079.
- MGI. (2017a). Inbred Strains of Mice: 129.
- MGI. (2017b). Inbred Strains of Mice: C57BL.
- Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., et al. (2009). Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *The Biochemical journal* *417*, 651-666.
- Miettinen, M., and Lasota, J. (2005). KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* *13*, 205-220.
- Miller, H.R., and Pemberton, A.D. (2002). Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut. *Immunology* *105*, 375-390.
- Mitchell, K.J., Pinton, P., Varadi, A., et al. (2001). Dense core secretory vesicles revealed as a dynamic Ca(2+) store in neuroendocrine cells with a vesicle-associated membrane protein aequorin chimaera. *The Journal of cell biology* *155*, 41-51.
- Mizuno, K., Tolmachova, T., Ushakov, D.S., et al. (2007). Rab27b regulates mast cell granule dynamics and secretion. *Traffic* *8*, 883-892.

- Molderings, G. (2010). Mast cell function in physiology and pathophysiology.
- Molderings, G.J., Haenisch, B., Bogdanow, M., et al. (2013). Familial occurrence of systemic mast cell activation disease. *PloS one* *8*, e76241.
- Molderings, G.J., Haenisch, B., Brettner, S., et al. (2016). Pharmacological treatment options for mast cell activation disease. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* *389*, 671-694.
- Moller-Tank, S., and Maury, W. (2015). Ebola virus entry: a curious and complex series of events. *PLoS Pathog* *11*, e1004731.
- Monastyrskaya, K., Babiyshuk, E.B., Hostettler, A., et al. (2007). Annexins as intracellular calcium sensors. *Cell calcium* *41*, 207-219.
- Monroe, J.G., and Cambier, J.C. (1983). Sorting of B lymphoblasts based upon cell diameter provides cell populations enriched in different stages of cell cycle. *J Immunol Methods* *63*, 45-56.
- Moon, T.C., Befus, A.D., and Kulka, M. (2014). Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved. *Front Immunol* *5*, 569.
- Moreira, V.B., Mattaraia, V.G., and Moura, A.S. (2015). Lifetime reproductive efficiency of BALB/c mouse pairs after an environmental modification at 3 mating ages. *J Am Assoc Lab Anim Sci* *54*, 29-34.
- Morgan, A.J. (2016). Ca²⁺ dialogue between acidic vesicles and ER. *Biochemical Society transactions* *44*, 546-553.
- Morgan, A.J., Davis, L.C., Ruas, M., et al. (2015). TPC: the NAADP discovery channel? *Biochemical Society transactions* *43*, 384-389.
- Morgan, A.J., Davis, L.C., Wagner, S.K., et al. (2013). Bidirectional Ca²⁺(+) signaling occurs between the endoplasmic reticulum and acidic organelles. *The Journal of cell biology* *200*, 789-805.
- Morgan, A.J., and Galione, A. (2014). Two-pore channels (TPCs): current controversies. *Bioessays* *36*, 173-183.
- Morgan, A.J., Platt, F.M., Lloyd-Evans, E., et al. (2011). Molecular mechanisms of endolysosomal Ca²⁺ signalling in health and disease. *The Biochemical journal* *439*, 349-374.
- Mousli, M., Bronner, C., Landry, Y., et al. (1990). Direct activation of GTP-binding regulatory proteins (G-proteins) by substance P and compound 48/80. *FEBS letters* *259*, 260-262.
- Murphy, S.E., and Levine, T.P. (2016). VAP, a Versatile Access Point for the Endoplasmic Reticulum: Review and analysis of FFAT-like motifs in the VAPome. *Biochimica et biophysica acta* *1861*, 952-961.
- Nakae, S., Suto, H., Iikura, M., et al. (2006). Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell costimulatory molecules and secreted TNF. *Journal of immunology* *176*, 2238-2248.
- Nautiyal, K.M., Dailey, C.A., Jahn, J.L., et al. (2012). Serotonin of mast cell origin contributes to hippocampal function. *Eur J Neurosci* *36*, 2347-2359.
- Navarrete, F.A., Garcia-Vazquez, F.A., Alvau, A., et al. (2015). Biphasic role of calcium in mouse sperm capacitation signaling pathways. *J Cell Physiol* *230*, 1758-1769.
- Naylor, E., Arredouani, A., Vasudevan, S.R., et al. (2009). Identification of a chemical probe for NAADP by virtual screening. *Nature chemical biology* *5*, 220-226.
- Neesen, J., Hartwich, T., Brandhorst, G., et al. (2002). Tep22, a novel testicular expressed gene, is involved in the biogenesis of the acrosome and the midpiece of the sperm tail. *Biochemical and biophysical research communications* *297*, 737-748.
- Neher, E. (1988). The influence of intracellular calcium concentration on degranulation of dialysed mast cells from rat peritoneum. *The Journal of physiology* *395*, 193-214.
- Neher, E., and Marty, A. (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *79*, 6712-6716.

- Neu, S., Geiselhart, A., Kuci, S., et al. (1996). Isolation and phenotypic characterization of CD117-positive cells. *Leuk Res* 20, 963-971.
- Nguyen, O.N., Grimm, C., Schneider, L.S., et al. (2017). Two-Pore Channel Function Is Crucial for the Migration of Invasive Cancer Cells. *Cancer Res* 77, 1427-1438.
- Nomikos, M., Kashir, J., and Lai, F.A. (2017). The role and mechanism of action of sperm PLC-zeta in mammalian fertilisation. *The Biochemical journal* 474, 3659-3673.
- Norrby, K. (2002). Mast cells and angiogenesis. *APMIS* 110, 355-371.
- Ohtsu, H., Kuramasu, A., Tanaka, S., et al. (2002). Plasma extravasation induced by dietary supplemented histamine in histamine-free mice. *Eur J Immunol* 32, 1698-1708.
- Okayama, Y., and Kawakami, T. (2006). Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol Res* 34, 97-115.
- Olszewski, M.B., Groot, A.J., Dasty, J., et al. (2007). TNF trafficking to human mast cell granules: mature chain-dependent endocytosis. *Journal of immunology* 178, 5701-5709.
- Orban, P.C., Chui, D., and Marth, J.D. (1992). Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 6861-6865.
- Palomaki, V.A., and Laitinen, J.T. (2006). The basic secretagogue compound 48/80 activates G proteins indirectly via stimulation of phospholipase D-lysophosphatidic acid receptor axis and 5-HT_{1A} receptors in rat brain sections. *Br J Pharmacol* 147, 596-606.
- Palty, R., Silverman, W.F., Hershfinkel, M., et al. (2010). NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 436-441.
- Paredes, R.M., Etzler, J.C., Watts, L.T., et al. (2008). Chemical calcium indicators. *Methods* 46, 143-151.
- Park, H.J., Lyons, J.C., Ohtsubo, T., et al. (1999). Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity. *Br J Cancer* 80, 1892-1897.
- Park, M.K., Tepikin, A.V., and Petersen, O.H. (2002). What can we learn about cell signalling by combining optical imaging and patch clamp techniques? *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 444, 305-316.
- Parkesh, R., Lewis, A.M., Aley, P.K., et al. (2008). Cell-permeant NAADP: a novel chemical tool enabling the study of Ca²⁺ signalling in intact cells. *Cell calcium* 43, 531-538.
- Parrington, J., Lear, P., and Hachem, A. (2015). Calcium signals regulated by NAADP and two-pore channels--their role in development, differentiation and cancer. *Int J Dev Biol* 59, 341-355.
- Parrington, J., and Tunn, R. (2014). Ca(2+) signals, NAADP and two-pore channels: role in cellular differentiation. *Acta Physiol (Oxf)* 211, 285-296.
- Patel, S., and Cai, X. (2015). Evolution of acidic Ca(2+)(+) stores and their resident Ca(2+)(+)-permeable channels. *Cell calcium* 57, 222-230.
- Patel, S., Churchill, G.C., and Galione, A. (2001). Coordination of Ca²⁺ signalling by NAADP. *Trends Biochem Sci* 26, 482-489.
- Patel, S., and Docampo, R. (2010). Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca²⁺ signaling. *Trends in cell biology* 20, 277-286.
- Patel, S., Marchant, J.S., and Brailoiu, E. (2010). Two-pore channels: Regulation by NAADP and customized roles in triggering calcium signals. *Cell calcium* 47, 480-490.
- Patel, S., and Muallem, S. (2011). Acidic Ca(2+) stores come to the fore. *Cell calcium* 50, 109-112.
- Paton, W.D. (1951). Compound 48/80: a potent histamine liberator. *Br J Pharmacol Chemother* 6, 499-508.
- Paul, N.R., Jacquemet, G., and Caswell, P.T. (2015). Endocytic Trafficking of Integrins in Cell Migration. *Current biology : CB* 25, R1092-1105.

- Pearce, F.L. (1985). Calcium and mast cell activation. *Br J Clin Pharmacol* *20 Suppl 2*, 267S-274S.
- Pejler, G., Ronnberg, E., Waern, I., et al. (2010). Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood* *115*, 4981-4990.
- Penner, R., and Neher, E. (1988). Secretory responses of rat peritoneal mast cells to high intracellular calcium. *FEBS letters* *226*, 307-313.
- Pereira, G.J., Hirata, H., Fimia, G.M., et al. (2011). Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) regulates autophagy in cultured astrocytes. *The Journal of biological chemistry* *286*, 27875-27881.
- Perfetto, S.P., Chattopadhyay, P.K., and Roederer, M. (2004). Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nature reviews. Immunology* *4*, 648-655.
- Perry, R.L., Naeeni, M., Barratt, C.L., et al. (1995). A time course study of capacitation and the acrosome reaction in human spermatozoa using a revised chlortetracycline pattern classification. *Fertility and sterility* *64*, 150-159.
- Peters, P.J., Borst, J., Oorschot, V., et al. (1991). Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *The Journal of experimental medicine* *173*, 1099-1109.
- Phillips, M.J., and Voeltz, G.K. (2016). Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* *17*, 69-82.
- Pickett, J.A., and Edwardson, J.M. (2006). Compound exocytosis: mechanisms and functional significance. *Traffic* *7*, 109-116.
- Pike, L.J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* *44*, 655-667.
- Pike, L.J. (2009). The challenge of lipid rafts. *J Lipid Res* *50 Suppl*, S323-328.
- Pintard, L., Willems, A., and Peter, M. (2004). Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *EMBO J* *23*, 1681-1687.
- Polishchuk, E.V., and Polishchuk, R.S. (2013). Analysis of Golgi complex function using correlative light-electron microscopy. *Methods in cell biology* *118*, 243-258.
- Pombo, I., Martin-Verdeaux, S., Iannascoli, B., et al. (2001). IgE receptor type I-dependent regulation of a Rab3D-associated kinase: a possible link in the calcium-dependent assembly of SNARE complexes. *The Journal of biological chemistry* *276*, 42893-42900.
- Porcelli, A.M., Ghelli, A., Zanna, C., et al. (2005). pH difference across the outer mitochondrial membrane measured with a green fluorescent protein mutant. *Biochemical and biophysical research communications* *326*, 799-804.
- Poulsen, L.K., and Hummelshoj, L. (2007). Triggers of IgE class switching and allergy development. *Ann Med* *39*, 440-456.
- Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., et al. (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological reviews* *74*, 595-636.
- Primakoff, P., and Myles, D.G. (2007). Cell-cell membrane fusion during mammalian fertilization. *FEBS letters* *581*, 2174-2180.
- Publicover, S., Harper, C.V., and Barratt, C. (2007). $[Ca^{2+}]_i$ signalling in sperm--making the most of what you've got. *Nature cell biology* *9*, 235-242.
- Pundir, P., and Kulka, M. (2010). The role of G protein-coupled receptors in mast cell activation by antimicrobial peptides: is there a connection? *Immunology and cell biology* *88*, 632-640.
- Puri, N., and Roche, P.A. (2008). Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 2580-2585.
- Quesada, I., Chin, W.C., Steed, J., et al. (2001). Mouse mast cell secretory granules can function as intracellular ionic oscillators. *Biophys J* *80*, 2133-2139.
- Raffaello, A., Mammucari, C., Gherardi, G., et al. (2016). Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes. *Trends Biochem Sci* *41*, 1035-1049.
- Rao, K.N., and Brown, M.A. (2008). Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* *1143*, 83-104.

- Raposo, G., Tenza, D., Mecheri, S., et al. (1997). Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Molecular biology of the cell* 8, 2631-2645.
- Ray, A., and Dittel, B.N. (2010). Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Repnik, U., Cesen, M.H., and Turk, B. (2013). The endolysosomal system in cell death and survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a008755.
- Reuter, S., Stassen, M., and Taube, C. (2010). Mast cells in allergic asthma and beyond. *Yonsei Med J* 51, 797-807.
- Rietdorf, K., Funnell, T.M., Ruas, M., et al. (2011). Two-pore channels form homo- and heterodimers. *The Journal of biological chemistry* 286, 37058-37062.
- Riggs, K.A., Hasan, N., Humphrey, D., et al. (2012). Regulation of integrin endocytic recycling and chemotactic cell migration by syntaxin 6 and VAMP3 interaction. *Journal of cell science* 125, 3827-3839.
- Riley, J.F., and West, G.B. (1952). Histamine in tissue mast cells. *J Physiol* 117, 72P-73P.
- Ringvall, M., Ronnberg, E., Wernersson, S., et al. (2008). Serotonin and histamine storage in mast cell secretory granules is dependent on serglycin proteoglycan. *J Allergy Clin Immunol* 121, 1020-1026.
- Rivera, J., and Gilfillan, A.M. (2006). Molecular regulation of mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 117, 1214-1225; quiz 1226.
- Rivera, J., and Tessarollo, L. (2008). Genetic background and the dilemma of translating mouse studies to humans. *Immunity* 28, 1-4.
- Rivero-Rios, P., Fernandez, B., Madero-Perez, J., et al. (2016). Two-Pore Channels and Parkinson's Disease: Where's the Link? *Messenger (Los Angel)* 5, 67-75.
- Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., et al. (1993). Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 262, 744-747.
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., et al. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 566-578.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., et al. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* 280, 1763-1766.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Ferrari, D., et al. (2003). Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene* 22, 8619-8627.
- Rocha e Silva, M., Scroggie, A.E., and et al. (1947). Liberation of histamine and heparin by peptone from the isolated dog's liver. *Proc Soc Exp Biol Med* 64, 141-146.
- Rocha, N., Kuijl, C., van der Kant, R., et al. (2009). Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *The Journal of cell biology* 185, 1209-1225.
- Rosenkranz, A.R., Coxon, A., Maurer, M., et al. (1998). Impaired mast cell development and innate immunity in Mac-1 (CD11b/CD18, CR3)-deficient mice. *Journal of immunology* 161, 6463-6467.
- Rothschild, A.M., and Schayer, R.W. (1959). Characterization of histidine decarboxylase from rat peritoneal fluid mast cells. *Biochimica et biophysica acta* 34, 392-398.
- Ruas, M., Chuang, K.T., Davis, L.C., et al. (2014). TPC1 has two variant isoforms, and their removal has different effects on endo-lysosomal functions compared to loss of TPC2. *Molecular and cellular biology* 34, 3981-3992.
- Ruas, M., Davis, L.C., Chen, C.C., et al. (2015). Expression of Ca²⁺-permeable two-pore channels rescues NAADP signalling in TPC-deficient cells. *EMBO J* 34, 1743-1758.
- Rubin, D.C., Shaker, A., and Levin, M.S. (2012). Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Front Immunol* 3, 107.

- Sakurai, Y., Kolokoltsov, A.A., Chen, C.C., et al. (2015). Ebola virus. Two-pore channels control Ebola virus host cell entry and are drug targets for disease treatment. *Science* *347*, 995-998.
- Salicioni, A.M., Platt, M.D., Wertheimer, E.V., et al. (2007). Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Society of Reproduction and Fertility supplement* *65*, 245-259.
- Sanchez-Tusie, A.A., Vasudevan, S.R., Churchill, G.C., et al. (2014). Characterization of NAADP-mediated calcium signaling in human spermatozoa. *Biochemical and biophysical research communications* *443*, 531-536.
- Santodomingo, J., Vay, L., Camacho, M., et al. (2008). Calcium dynamics in bovine adrenal medulla chromaffin cell secretory granules. *Eur J Neurosci* *28*, 1265-1274.
- Sbano, L., Bonora, M., Marchi, S., et al. (2017). TFEB-mediated increase in peripheral lysosomes regulates store-operated calcium entry. *Sci Rep* *7*, 40797.
- Schulz, I. (1990). Permeabilizing cells: some methods and applications for the study of intracellular processes. *Methods in enzymology* *192*, 280-300.
- Schwartz, L.B. (2006). Analysis of MC(T) and MC(TC) mast cells in tissue. *Methods in molecular biology* *315*, 53-62.
- Schwartz, L.B., and Austen, K.F. (1981). Acid hydrolases and other enzymes of rat and human mast cell secretory granules. *Kroc Found Ser* *14*, 103-121.
- Servier, L.L. (2017). *Medical Art*. Vol. 2017.
- Sharp, P.A., Sugden, B., and Sambrook, J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* *12*, 3055-3063.
- Shelburne, C.P., and Abraham, S.N. (2011). The mast cell in innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* *716*, 162-185.
- Shen, D., Wang, X., Li, X., et al. (2012). Lipid storage disorders block lysosomal trafficking by inhibiting a TRP channel and lysosomal calcium release. *Nat Commun* *3*, 731.
- Shoshan-Barmatz, V., De, S., and Meir, A. (2017). The Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channel 1, Ca²⁺ Transport, Apoptosis, and Their Regulation. *Front Oncol* *7*, 60.
- Shuai, J., and Parker, I. (2005). Optical single-channel recording by imaging Ca²⁺ flux through individual ion channels: theoretical considerations and limits to resolution. *Cell calcium* *37*, 283-299.
- Shukla, K.K., Mahdi, A.A., and Rajender, S. (2012). Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Front Biosci (Elite Ed)* *4*, 746-754.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* *387*, 569-572.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* *1*, 31-39.
- Soboloff, J., and Berger, S.A. (2002). Sustained ER Ca²⁺ depletion suppresses protein synthesis and induces activation-enhanced cell death in mast cells. *The Journal of biological chemistry* *277*, 13812-13820.
- Sohn, E.H., Jang, S.A., Joo, H., et al. (2011). Anti-allergic and anti-inflammatory effects of butanol extract from *Arctium Lappa* L. *Clinical and molecular allergy : CMA* *9*, 4.
- Sorkin, A., and Von Zastrow, M. (2002). Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 600-614.
- Stelekati, E., Bahri, R., D'Orlando, O., et al. (2009). Mast cell-mediated antigen presentation regulates CD8⁺ T cell effector functions. *Immunity* *31*, 665-676.
- Stoica, R., De Vos, K.J., Paillusson, S., et al. (2014). ER-mitochondria associations are regulated by the VAPB-PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nat Commun* *5*, 3996.
- Stone, K.D., Prussin, C., and Metcalfe, D.D. (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* *125*, S73-80.

- Strauss-Albee, D.M., Horowitz, A., Parham, P., et al. (2014). Coordinated regulation of NK receptor expression in the maturing human immune system. *Journal of immunology* *193*, 4871-4879.
- Strehler, E.E., and Treiman, M. (2004). Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. *Curr Mol Med* *4*, 323-335.
- Sudhof, T.C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* *27*, 509-547.
- Sudhof, T.C. (2012). The presynaptic active zone. *Neuron* *75*, 11-25.
- Sudhof, T.C., and Rizo, J. (2011). Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *3*.
- Sudhof, T.C., and Rothman, J.E. (2009). Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* *323*, 474-477.
- Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R., et al. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* *395*, 347-353.
- Suzuki, R., Furuno, T., McKay, D.M., et al. (1999). Direct neurite-mast cell communication in vitro occurs via the neuropeptide substance P. *Journal of immunology* *163*, 2410-2415.
- Swamydas, M., Luo, Y., Dorf, M.E., et al. (2015). Isolation of Mouse Neutrophils. *Current protocols in immunology* *110*, 3 20 21-23 20 15.
- Szabadkai, G., Bianchi, K., Varnai, P., et al. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *The Journal of cell biology* *175*, 901-911.
- Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J.D., et al. (1999). Measurement of intracellular calcium. *Physiological reviews* *79*, 1089-1125.
- Tanaka, Y., Takagaki, Y., and Nishimune, T. (1991). Effects of metal elements on beta-hexosaminidase release from rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3). *Chem Pharm Bull (Tokyo)* *39*, 2072-2076.
- Tanphaichitr, N., and Hansen, C. (1994). Production of motile acrosome-reacted mouse sperm with nanomolar concentration of calcium ionophore A23187. *Molecular reproduction and development* *37*, 326-334.
- Thastrup, O., Cullen, P.J., Drobak, B.K., et al. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *87*, 2466-2470.
- Theoharides, T.C., Alysandratos, K.D., Angelidou, A., et al. (2012). Mast cells and inflammation. *Biochimica et biophysica acta* *1822*, 21-33.
- Thorn, P., and Gaisano, H. (2012). Molecular control of compound Exocytosis: A key role for VAMP8. *Commun Integr Biol* *5*, 61-63.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *76*, 4350-4354.
- Tsai, P.S., Brewis, I.A., van Maaren, J., et al. (2012). Involvement of complexin 2 in docking, locking and unlocking of different SNARE complexes during sperm capacitation and induced acrosomal exocytosis. *PloS one* *7*, e32603.
- Turk, B., and Turk, V. (2009). Lysosomes as "suicide bags" in cell death: myth or reality? *The Journal of biological chemistry* *284*, 21783-21787.
- Tuvim, M.J., Adachi, R., Chocano, J.F., et al. (1999). Rab3D, a small GTPase, is localized on mast cell secretory granules and translocates to the plasma membrane upon exocytosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* *20*, 79-89.
- Ungermann, C., and Langosch, D. (2005). Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing. *Journal of cell science* *118*, 3819-3828.
- Ursu, D., Schuhmeier, R.P., and Melzer, W. (2005). Voltage-controlled Ca²⁺ release and entry flux in isolated adult muscle fibres of the mouse. *The Journal of physiology* *562*, 347-365.
- Vardjan, N., Jorgacevski, J., and Zorec, R. (2013). Fusion pores, SNAREs, and exocytosis. *Neuroscientist* *19*, 160-174.

- Vasington, F.D., and Murphy, J.V. (1962). Ca ion uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 237, 2670-2677.
- Verhage, M., and Sorensen, J.B. (2008). Vesicle docking in regulated exocytosis. *Traffic* 9, 1414-1424.
- Vig, M., and Kinet, J.P. (2009). Calcium signaling in immune cells. *Nat Immunol* 10, 21-27.
- Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., et al. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121, 1129-1137.
- Voehringer, D. (2013). Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nature reviews. Immunology* 13, 362-375.
- Voets, T. (2000). Dissection of three Ca²⁺-dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* 28, 537-545.
- Walensky, L.D., and Snyder, S.H. (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *The Journal of cell biology* 130, 857-869.
- Walker, L.R., Hussein, H.A., and Akula, S.M. (2016). Subcellular fractionation method to study endosomal trafficking of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Cell Biosci* 6, 1.
- Walker, W.H. (2011). Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis* 1, 116-120.
- Walseth, T.F., Lin-Moshier, Y., Jain, P., et al. (2012). Photoaffinity labeling of high affinity nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)-binding proteins in sea urchin egg. *The Journal of biological chemistry* 287, 2308-2315.
- Wang, X., Zhang, X., Dong, X.P., et al. (2012). TPC proteins are phosphoinositide-activated sodium-selective ion channels in endosomes and lysosomes. *Cell* 151, 372-383.
- Wassarman, P.M., and Litscher, E.S. (2008). Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida. *The International journal of developmental biology* 52, 665-676.
- Waugh, M.G., Chu, K.M., Clayton, E.L., et al. (2011). Detergent-free isolation and characterization of cholesterol-rich membrane domains from trans-Golgi network vesicles. *J Lipid Res* 52, 582-589.
- Weber, N. (2014). Akrosomale Exozytose von Säugerspermien: das synaptische Multidomänenprotein RIM2 α als molekularer Knotenpunkt eines regulatorischen Protein-Netzwerkes. Medizinische Fakultät. Vol. Dr. rer. nat. Munich: LMU.
- Weber, N., Vieweg, L., Henze, F., et al. (2014). RIM2 α is a molecular scaffold for Zona pellucida-induced acrosome reaction. *J Mol Cell Biol* 6, 434-437.
- Wernersson, S., and Pejler, G. (2014). Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nature reviews. Immunology* 14, 478-494.
- Wezel, A., Quax, P.H., Kuiper, J., et al. (2015). The role of mast cells in atherosclerosis. *Hamostaseologie* 35, 113-120.
- Whitehead, T.P., Kricka, L.J., Carter, T.J., et al. (1979). Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clinical chemistry* 25, 1531-1546.
- Williams, P.D., Laska, D.A., Shetler, T.J., et al. (1991). Vancomycin-induced release of histamine from rat peritoneal mast cells and a rat basophil cell line (RBL-1). *Agents and actions* 32, 217-223.
- Winey, M., Meehl, J.B., O'Toole, E.T., et al. (2014). Conventional transmission electron microscopy. *Molecular biology of the cell* 25, 319-323.
- Woska, J.R., Jr., and Gillespie, M.E. (2012). SNARE complex-mediated degranulation in mast cells. *J Cell Mol Med* 16, 649-656.
- Wu, L.G., Hamid, E., Shin, W., et al. (2014). Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annu Rev Physiol* 76, 301-331.
- Wu, M.M., Llopis, J., Adams, S., et al. (2000). Organelle pH studies using targeted avidin and fluorescein-biotin. *Chem Biol* 7, 197-209.

- Xu, H., and Ren, D. (2015). Lysosomal physiology. *Annu Rev Physiol* 77, 57-80.
- Xue, L., McNeil, B.D., Wu, X.S., et al. (2012). A membrane pool retrieved via endocytosis overshoot at nerve terminals: a study of its retrieval mechanism and role. *J Neurosci* 32, 3398-3404.
- Yamasaki, M., Masgrau, R., Morgan, A.J., et al. (2004). Organelle selection determines agonist-specific Ca²⁺ signals in pancreatic acinar and beta cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 7234-7240.
- Yong, L.C. (1997). The mast cell: origin, morphology, distribution, and function. *Exp Toxicol Pathol* 49, 409-424.
- Yu, F.H., Mantegazza, M., Westenbroek, R.E., et al. (2006). Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat Neurosci* 9, 1142-1149.
- Yu, Y., Blokhuis, B.R., Garssen, J., et al. (2016). Non-IgE mediated mast cell activation. *Eur J Pharmacol* 778, 33-43.
- Yunes, R., Michaut, M., Tomes, C., et al. (2000). Rab3A triggers the acrosome reaction in permeabilized human spermatozoa. *Biology of reproduction* 62, 1084-1089.
- Zhang, Z.H., Lu, Y.Y., and Yue, J. (2013). Two pore channel 2 differentially modulates neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *PloS one* 8, e66077.
- Zhao, E., Xu, H., Wang, L., et al. (2012). Bone marrow and the control of immunity. *Cellular & molecular immunology* 9, 11-19.
- Zhu, M.X., Ma, J., Parrington, J., et al. (2010a). Calcium signaling via two-pore channels: local or global, that is the question. *American journal of physiology. Cell physiology* 298, C430-441.
- Zhu, M.X., Ma, J., Parrington, J., et al. (2010b). TPCs: Endolysosomal channels for Ca²⁺ mobilization from acidic organelles triggered by NAADP. *FEBS letters* 584, 1966-1974.
- Zierler, S., Sumoza-Toledo, A., Suzuki, S., et al. (2016). TRPM7 kinase activity regulates murine mast cell degranulation. *The Journal of physiology* 594, 2957-2970.
- Zong, X., Schieder, M., Cuny, H., et al. (2009). The two-pore channel TPCN2 mediates NAADP-dependent Ca²⁺-release from lysosomal stores. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 458, 891-899.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Aufbau des trans-SNARE-Komplexes.....	8
Abb. 2 Schematische Darstellung der molekularen Vorgänge während der Akrosomreaktion.....	10
Abb. 3 Entwicklung und Lokalisation verschiedener Mastzell-Subtypen.	14
Abb. 4 Zeitlicher Ablauf der Freisetzung von Immunmediatoren aus Mastzellen im Zuge einer Immunantwort.....	16
Abb. 5 IgE-vermittelte Aktivierung von Mastzellen.....	17
Abb. 6 Luminale Ca^{2+} -Konzentrationen und pH-Werte in intrazellulären Ca^{2+} -Speichern.....	24
Abb. 7 Interaktion von intrazellulären Ca^{2+} -Speichern (ER und saure Vesikel). ...	26
Abb. 8 Schematische Darstellung der Topographie der two-pore-channels.	27
Abb. 9 Konzentrationsabhängige Effekte von NAADP und NADP auf die Akrosomreaktion.....	31
Abb. 10 Effekte der Defizienz für TPC1 auf die Akrosomreaktionsrate.....	32
Abb. 11 Strategien zur Generierung von TPC Knockout-Mausmodellen.	48
Abb. 12 Kreuzungsstrategie zur Generierung einer TPC1/2 Doppel-Knockout Mauslinie.....	49
Abb. 13 Schematische Darstellung des Aufbaus der Komponenten beim Semi-Dry Western Blot Verfahren.....	59
Abb. 14 Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der anti-DNP-IgE/DNP-BSA Stimulation.....	72
Abb. 15 Prinzip des zeitlich aufgelösten Kompetitionsassay zur Bestimmung der Histaminkonzentration in Kulturüberständen.	74
Abb. 16 Schema zum Versuchsaufbau des β -Hexosaminidase Assays.....	75
Abb. 17 Schematischer Ablauf zur Untersuchung von vesikulären Transportprozessen in Mastzellen.....	76
Abb. 18 Akrosomreaktionsraten unpermeabilisierter Wildtyp- und TPC1-defizienter Spermien	82
Abb. 19 Zona pellucida induzierte Akrosomreaktion und inhibitorische Effekte des NAADP-Antagonisten trans-Ned19.	84
Abb. 20 Anzahl der Würfe von TPC1 ^{+/+} , TPC1 ^{+/-} und TPC1 ^{-/-} Zuchtpaaren über ein Zeitintervall von 120 Tagen.	88
Abb. 21 Genotypverteilung der Nachkommen heterozygoter TPC1-Zuchtpaare unterschiedlicher C57Bl/6 Rückkreuzungsgenerationen.....	89

Abb. 22 Mortalitätsrate der Nachkommen aus Wildtyp-Verpaarungen und heterozygot sowie homozygot TPC1-defizienten Zuchtpaaren.....	90
Abb. 23 Durchschnittliche Anzahl der Würfe von Wildtyp und heterozygot sowie homozygot TPC2-defizienten Zuchtpaaren in einem Verpaarungszeitraum von 120 Tagen.	92
Abb. 24 Genotypverteilung von Nachkommen heterozygoter TPC2 Zuchtpaare.	94
Abb. 25 Mortalitätsrate von Nachkommen genetisch unterschiedlicher TPC2 Zuchtpaare.....	95
Abb. 26 Anzahl der Würfe von Wildtyp und heterozygoten TPC1/2 Zuchtpaare innerhalb von 120 Tagen.	97
Abb. 27 Anteil verschiedener Genotypen von Nachkommen TPC1/2 heterozygoter Zuchtpaare.....	99
Abb. 28 Sterberate von Nachkommen aus Wildtyp Verpaarungen und TPC1/2 heterozygoter Zuchtpaare.	100
Abb. 29 Nachweis der Expression des TPC1 in Lysaten peritonealer Zellen, Knochenmarkszellen und RBL-1 Zellen mit Hilfe der Western Blot Technik.	102
Abb. 30 Immunocytochemischer Nachweis des TPC2 in isolierten peritonealen Mastzellen.....	104
Abb. 31 Beispiel eines Dot plots zur Darstellung unterschiedlicher Zellpopulationen nach Durchflusszytometrie einer peritonealen Lavage.....	105
Abb. 32 Exemplarische Histogramme nach Durchflusszytometrie einer peritonealen Lavage.....	107
Abb. 33 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen.....	109
Abb. 34 LysoTracker Red Färbung von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen.	111
Abb. 35 Elektrophysiologische Kapazitätsmessungen zur Bestimmung der Zellgröße von Wildtyp und TPC1^{-/-} Mastzellen im Ruhezustand.	112
Abb. 36 Zeitlicher Verlauf der Degranulation von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen nach Stimulation mit GTPyS.....	113
Abb. 37 Normierte Kapazitätzunahme von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen nach GTPyS Stimulation.....	114
Abb. 38 Analyse des zeitlichen Verlaufs der GTPyS-induzierten Degranulationsreaktion in TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen.....	115
Abb. 39 Kapazitätsmessungen zur elektrophysiologischen Bestimmung der basalen Zellgröße von TPC2^{-/-} und DKO Mastzellen.	116
Abb. 40 Amplitude und zeitlicher Verlauf der GTPyS-induzierten Degranulation von TPC2^{-/-} Mastzellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen.....	117

Abb. 41 GTPyS induzierte Degranulation in TPC1/2 Doppel-knockout Mastzellen.	118
Abb. 42 Effekt des TPC-Blockers Tetrandrine auf die Degranulation von Mastzellen.	120
Abb. 43 Kapazitätsmessungen an peritonealen Mastzellen nach NAADP Applikation.	121
Abb. 44 Einfluss von NAADP auf die GTPyS-induzierte Degranulation.	122
Abb. 45 Effekt von NAADP auf die GTPyS-vermittelte Degranulation von TPC1^{-/-} Mastzellen.	123
Abb. 46 Stimulierung von Wildtyp Mastzellen mit GTPyS und niedrigen Dosen an NAADP (30 nM).	124
Abb. 47 Kapazitätsmessungen an TPC2^{-/-} Mastzellen nach GTPyS und NAADP (30 nM) Applikation.	125
Abb. 48 Peritoneale Mastzellen nach Fura-2 Beladung.	127
Abb. 49 Basaler zytosolischer Ca²⁺-Status von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen.	127
Abb. 50 Thapsigargin-vermittelte Ca²⁺-Signale in peritonealen TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen.	129
Abb. 51 Zytosolische Thapsigargin-induzierte Ca²⁺-Signale in TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen unter extrazellulär Ca²⁺-freien Bedingungen.	131
Abb. 52 Stimulierung von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen durch IgE/Antigen-Bindung als physiologischen Stimulus der Degranulation.	133
Abb. 53 IgE/DNP-BSA vermittelte Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speicherorganellen von Wildtyp- und TPC1-defizienten Mastzellen.	134
Abb. 54 Zytosolische Ca²⁺-Signale in Mastzellen nach Stimulation mit der Lysosomen-lysierenden Substanz GPN.	136
Abb. 55 Konfokale Aufnahmen von Mastzellen nach Beladung mit Fura-2FF.	137
Abb. 56 Basaler Ca²⁺-Beladungsstatus des ER in TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen.	138
Abb. 57 Veränderung des ER-Ca²⁺-Status in TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen durch den physiologischen Stimulus der IgE/Antigen-Bindung.	139
Abb. 58 Nachweis der Lokalisation von TPC1 in lysosomalen Fraktionen von RBL-1 Lysaten.	142
Abb. 59 Expression von LAMP-1 und TPC1 in fraktionierten Lysaten von primären Peritonealzellen.	143
Abb. 60 Analyse der subzellulären Lokalisation von TPC1 durch Immunogold-Färbungen.	145
Abb. 61 Basale Histaminausschüttung von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen.	147

Abb. 62 Stimulierte Histaminfreisetzung primärer peritonealer Mastzellen von Wildtyp und TPC1-defizienten Mäusen.....	148
Abb. 63 Gesamter Histamingehalt von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen.....	149
Abb. 64 Basale und stimulierte Freisetzung der β-Hexosaminidase aus RBL-1 Zellen.....	151
Abb. 65 Freisetzung des Enzyms β-Hexosaminidase im Ruhezustand und nach Stimulation.....	152
Abb. 66 Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen nach FM1-43-Färbung zur Untersuchung der Endozytose.....	154
Abb. 67 Zeitlicher Verlauf der Endozytose von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen.	156
Abb. 68 Immunopräzipitation von TPC1 aus unterschiedlichen Zell- bzw. Gewebe-Lysaten.	158
Abb. 69 Versuch der Co-Immunopräzipitation potentieller Interaktionspartner von TPC1.....	161
Abb. 70 (Co)-Immunopräzipitation von TPC1 und IRBIT in lipid rafts.	163
Abb. 71 Modellvorstellung zum gerichteten Fortschreiten der Fusionsporenbildung während der Akrosomreaktion nach Zona pellucida Kontakt durch die Beteiligung von TPC1 und TPC2.....	172
Abb. 72 Modell zur potenziellen Rolle von TPC1 in Mastzellen	182
Abb. 73 Vergleich der Domänenstrukturen der Adenosylhomocysteinase (AHCY) und AHCY-like (AHCYL) Proteinfamilien.	186
Abb. 74 Potentielle Membrankontaktstellen zwischen intrazellulären Ca²⁺-Speichern in Mastzellen.....	188

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PCR-Protokoll zur Genotypisierung der TPC1-defizienten Mauslinie. .51	51
Tabelle 2: Programm zur Durchführung der Genotypisierungs-PCR der TPC2-defizienten Mauslinie.	51
Tabelle 3 Zelltypen in einer murinen peritonealen Lavage sowie spezifische Oberflächenantigene und die zur Quantifizierung in der Durchflusszytometrie genutzten Fluorochrome.	64
Tabelle 4 Fertilitätsparameter für TPC1 Verpaarungen der N3-Rückkreuzungsgeneration (87,5 % C57Bl/6) (Arndt et al., 2014).....	87
Tabelle 5 Fertilitätsparameter für TPC1 Zuchtpaare mit kongenem C57Bl/6 Hintergrund (N12-Rückkreuzungsgeneration, 99,8 % C57Bl/6 Stammhintergrund).	87

Tabelle 6 Fertilitätsparameter für Zuchtpaare mit unterschiedlichem TPC2 Genotyp.	92
Tabelle 7 Effekt der genetischen Deletion des TPC2 auf das Körpergewicht, das Hodengewicht sowie die Anzahl epididymaler Spermien.	93
Tabelle 8 Fertilitätsparameter von TPC1/2 heterozygoten Zuchtpaaren.	97
Tabelle 9 Spermienzahl, Hoden- und Körpergewicht von TPC1/2 heterozygoten Männchen.	98
Tabelle 10 Prozentualer Anteil verschiedener Immunzelltypen in der peritonealen Lavage von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mäusen.	107
Tabelle 11 Erfasste Parameter zur Morphologie von TPC1^{+/+} und TPC1^{-/-} Mastzellen.	109
Tabelle 12 Auswahl von Proteinen, die durch eine massenspektrometrische Analyse in TPC1-Antikörper-Immunopräzipitaten aus Testis Totallysaten identifiziert wurden.	165

9.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
<	kleiner als
>	größer als
#	Nummer
ADP	Adenosindiphosphat
AM	Acetoxymethylester
AOC	<i>area over the curve</i>
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintrisphosphat
ATPase	Adenosintrisphosphat-Hydrolase
AUC	<i>area under the curve</i>
BMMC	<i>bone marrow-derived mast cell</i>
BP	Blockierungspeptid
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius
C48/80	Compound 48/80
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CICR	<i>Ca²⁺-induced Ca²⁺ release</i>

Anhang

Abkürzung	Bedeutung
cm	Zentimeter
CTCF	<i>corrected total cell fluorescence</i>
DAG	Diacylglycerol
ddH ₂ O	Zweifach demineralisiertes Wasser
DKO	Doppel-knockout
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DNP	Dinitrophenol
dNTP	Desoxy-Nukleotid-5'-Triphosphat
DRM	Detergens-resistente Membranfraktion
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>fluorecence-activated cell sorting</i>
F _c -Teil	<i>crystallisable fragment</i> ; die konstante, speziesspezifische Region eines Antikörpers
FcεR	Fcε-Rezeptor
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gravitationskonstante
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GPN	Glycyl-L-phenylalanin 2-naphthylamid
GTP	Guanosintrisphosphat
GTPase	Guanosintrisphosphat-Hydrolase
GTPγS	Guanosin 5'-O-(3-thiotriphosphat)
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
IgG/E	Immunglobulin G/E
IL	Interleukin
IMM	<i>inner mitochondrial membrane</i>
IP	Immunpräzipitation
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP ₃ R	Inositoltriphosphat-Rezeptor
IRBIT	<i>IP3 receptor binding protein released with IP3</i>
kDa	Kilodalton
KO	<i>knockout</i>
l	Liter

Anhang

Abkürzung	Bedeutung
LAMP	<i>lysosomal marker protein</i>
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LSM	<i>Laser Scanning</i> Mikroskop
M	Molar
mA	Milliampère
MCAS	Mastzell-Aktivierungssyndrom
MCP	<i>mast cell progenitor</i>
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
mind.	mindestens
MIP	<i>maximum intensity projection</i>
ml	Milliliter
mM	millimolar
MP	Milchpulver
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
Na ⁺	Natrium-Ion
NAADP	Nikotinsäureadenosindinukleotidphosphat
NADP	Nikotinsäureamidadenindinukleotidphosphat
NGS	normales Ziegenserum
nm	Nanometer
nM	nanomolar
norm.	normiert
n.s.	nicht significant
OMM	<i>outer mitochondrial membrane</i>
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit in der Statistik
P _{TX}	Präzipitat nach Triton X-100-Behandlung, Detergens-resistente Membranfraktion
PCR	Polymerasekettenreaktion
pF	pico Farad
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI(3,5)P ₂	Phosphatidylinositol-3,5-biphosphat

Anhang

Abkürzung	Bedeutung
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
PMC	<i>peritoneal mast cell</i>
PMD	<i>piecemeal degranulation</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROI	<i>region of interest</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
s.	siehe
SCF	<i>stem cell factor</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	Sarko-/Endoplasmatisches Retikulum Ca ²⁺ ATPase
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimid-sensitive factor attachment receptor</i>
SNAP	<i>synaptosomal associated protein</i>
SOCE	<i>store-operated Ca²⁺ entry</i>
s. o.	siehe oben
SSC	<i>side scatter</i>
STIM	<i>stromal interaction molecule</i>
s. u.	siehe unten
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
TG	Thapsigargin
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TPC	<i>two-pore channel</i>
TRP	<i>transient receptor potential</i>
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
v/v	<i>volume/volume</i> , Volumenprozent
V	Volt
v. a.	vor allem
VAMP	<i>vesicle-associated membrane protein</i>
VDAC	<i>voltage-dependent anion channel</i>

Abkürzung	Bedeutung
w/v	<i>weight/volume</i> , Massenprozent
WT	Wildtyp
x	mal
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

9.4 Publikationsverzeichnis

9.4.1 Originalarbeiten

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. (2014). *NAADP and the Two Pore Channel Protein 1 participate in the Acrosome Reaction in Mammalian Spermatozoa*. *Molecular Biology of the Cell*.

Borth, H., Weber, N., Meyer, D., Wartenberg, A., **Arlt, E.**, Zierler, S., Breit, A., Wennemuth, G., Gudermann, T., Boekhoff, I. (2016). *The IP3 R Binding Protein Released With Inositol 1,4,5-Trisphosphate Is Expressed in Rodent Reproductive Tissue and Spermatozoa*. *J Cell Physiol* 231, 1114-1129.

9.4.2 Tagungsbeiträge

Lilli Arndt, **Elisabeth Arlt**, Jan Castonguay, Dorke Meyer, Sami Hassan, Heike Borth, Andreas Breit, Gunther Wennemuth, Martin Biel, Christian Wahl, Thomas Gudermann, Norbert Klugbauer, Ingrid Boekhoff: *Two-Pore Channel Protein 1 contributes to NAADP triggered Acrosome Reaction*. 4th international Caesar Conference, Bonn, 09.-11.04.2014

Elisabeth Arlt, Lilli Arndt, Jan Castonguay, Dorke Meyer, Sami Hassan, Heike Borth, Andreas Breit, Gunther Wennemuth, Martin Biel, Christian Wahl, Thomas Gudermann, Norbert Klugbauer, Ingrid Boekhoff: *Two-Pore Channel Protein 1 contributes to NAADP triggered Acrosome Reaction*. Summer Academy Pharmacology, Bonn, 27.-29.09.2015

Elisabeth Arlt, Lilli Arndt, Jan Castonguay, Dorke Meyer, Sami Hassan, Heike Borth, Andreas Breit, Gunther Wennemuth, Martin Biel, Christian Wahl, Thomas Gudermann, Norbert Klugbauer, Ingrid Boekhoff: *Two-Pore Channel Protein 1 contributes to NAADP*

triggered Acrosome Reaction. International Meeting of the German Society for Cell Biology (DGZ) with support of Austrian Association of Molecular Life Sciences and Biotechnology (ÖGMBT), München, 14.-16.03.2016

Elisabeth Arlt, Lilli Arndt, Jan Castonguay, Dorke Meyer, Sami Hassan, Heike Borth, Andreas Breit, Gunther Wennemuth, Martin Biel, Christian Wahl, Thomas Gudermann, Norbert Klugbauer, Ingrid Boekhoff: *Two-Pore Channel Protein 1 contributes to NAADP triggered Acrosome Reaction*. 50. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und 42. Veterinär-Humanistische Gemeinschaftstagung, München, 15.-17.02.2017

9.5 Eidesstattliche Versicherung

Arlt, Elisabeth

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Studien zur funktionellen Bedeutung der Kationenkanalfamilie der *two-pore channels* für exozytotische Prozesse in Mastzellen und Spermien

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 08.11.2018

Elisabeth Arlt

9.6 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gudermann dafür bedanken, dass ich die Möglichkeit erhalten habe, am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der LMU München meine Dissertation anzufertigen.

Ein sehr großes Dankeschön möchte ich an meine Doktormutter und Betreuerin Ingrid Boekhoff richten. Vielen Dank dafür, dass ich in den letzten Jahren die Gelegenheit hatte an den spannenden Projekten mitzuarbeiten und so viel Neues zu lernen. Du warst einfach jederzeit ansprechbar bei allen Fragen und Problemen, hast mir Mut gemacht und warst immer offen für Ideen. Danke für deine Geduld, deine Unterstützung und dein Engagement.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die große Hilfe unserer Kooperationspartner. Deswegen möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Klugbauer von der Universität Freiburg für die TPC1-defizienten Mäuse und den TPC1-Antikörper bedanken. Ebenfalls ein großes Dankeschön gilt Herrn Prof. Biel, Herrn Prof. Wahl-Schott und bei Herrn PD Dr. Grimm von der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU dafür, dass sie uns die TPC2-defiziente Mauslinie und den TPC2-Antikörper zur Verfügung gestellt haben. Zusätzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Grimm und seinen Mitarbeitern (Yu-Kai Chao, Cheng-Chang Chen und Elisabeth Butz) für die elektrophysiologischen Messungen an den Lysosomen unserer Zellen und die konstruktiven Besprechungen bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Wennemuth vom Institut für Anatomie der Universität Duisburg-Essen möchte ich mich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Mastzellen bedanken und Frau Dr. Fecher-Trost von der Universität des Saarlandes danke ich herzlich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.

Ein weiteres großes Dankeschön möchte ich an Susanna Zierler richten. Vielen Dank dafür, dass du mir das Patchen beigebracht hast und dabei so geduldig warst! Ich habe unsere gemütlichen Besprechungen, ob bei dir zu Hause oder in deinem Büro, immer sehr genossen und schätze es sehr, dass du immer ein offenes Ohr für meine Fragen hattest und sie auch immer (!) beantworten konntest.

Auch bei Sarah, Wiebke und Sheila möchte ich mich für die nette Zeit in eurem Labor bedanken! Ihr wart immer zur Stelle, um mir zu helfen, obwohl ihr so oft im Dunkeln arbeiten musstet, wenn ich da war... Und liebe Wiebke, es hat viel Spaß gemacht sich das Patch-Setup mit dir zu teilen!

Auch den Mitarbeiterinnen im Tierstall möchte ich Danke sagen. Ohne eure zuverlässige Arbeit wären wir ziemlich aufgeschmissen gewesen.

Liebe Dorke, liebe Heike, liebe Nele, liebe Lilli, lieber Heinz, lieber Jürgen und liebe Steffi, auch bei euch möchte ich mich bedanken. Als ich für mein Forschungspraktikum an das WSI gekommen bin, habt ihr mich so herzlich aufgenommen, dass ich gar nicht anders konnte als mich wohlfühlen! Danke für eure Unterstützung, die GNTM Abende, die drei Fragezeichen Folgen und ein paar unvergessliche Verteidigungsfeiern!

Lieber Andreas, dir möchte ich für deinen Humor, deine Ehrlichkeit und deine Allwissenheit danken, für die vielen Mittagspausen mit Gesprächen über gutes Essen (obwohl wir dabei nicht immer einer Meinung sind), Football und andere weltbewegende Themen. Ohne deinen Einsatz wäre das Institut sicher nicht das was es ist.

Natürlich möchte ich mich auch bei der ganzen AG Breit für die gute Nachbarschaft im EG bedanken. Allen voran bei dir Ute, weil du jederzeit für alle da bist, egal ob gerade eine praktische Lösung oder ein gutes Gespräch nötig ist. Liebe Katrin vielen Dank für unsere kleinen Schwätzchen zwischendurch. Dennis und Steffi, Danke euch dafür, dass es auch im letzten Jahr viel zu lachen gab. Meine liebe Medizin-Lisa, ich bin froh dich kennen gelernt zu haben und hätte dich gerne noch länger im Labor nebenan gehabt! Liebe Irini, Danke dir für deine ruhige, besonnene und warmherzige Art und für die vielen netten Gespräche auf dem Flur.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Praktikantinnen Nadine, Sandra, Julia, Kate und Carmen für eure Unterstützung bei meiner Arbeit. Ein besonderer Dank gilt dabei natürlich meinem „fancy schmanzy“ Praktikanten/Hiwi Thomas! It was always a pleasure und ich wünsche Dir alles Gute für deine Promotion!

Liebe Renate, liebe Lisa, meine kleine, aber feine Arbeitsgruppe während der letzten Zeit! Vielen Dank auch für eure Hilfe und Unterstützung! Lisa, alles Gute für deinen weiteren Weg, ich weiß du wirst ihn gut machen!

Andrea und Evi (aka Frau Schweighöfer und Miss Cupcake), meine Liebsten! Ich bin unheimlich dankbar dafür, dass ich euch beide kennen gelernt habe. Ihr wart vom ersten Tag an nicht nur meine Kolleginnen, sondern auch meine Freundinnen. Unsere Zeit zu dritt am Institut und den unglaublichen Spaß den wir hatten werde ich nie vergessen. Unsere vielen äußerst tiefgründigen Gespräche bei den gemeinsamen Frühstückten und Mittagessen, die Ratschereien im Labor zwischendurch und die höchst-wissenschaftlichen Wetten (gut, dass wir keine Meteorologen geworden sind...) waren absolute Highlights. Ich freue mich sehr darüber, dass wir uns auch weiterhin so gut verstehen und einfach über alles sprechen können. Bis bald im Mariandl!

Meine lieben Rochen, was würde ich nur ohne euch machen? Eigentlich gibt es kein Problem, das bei einem Glas Wein (ist das der Rosé vom Lidl?) zusammen mit euch nicht gelöst werden kann. Danke, dass ich immer auf euch zählen kann! Wir haben schon so viel gemeinsam erlebt und ich freue mich auf die nächsten Jahre zusammen mit euch! (irgendwann werden wir vielleicht auch mal erwachsen...nicht)
Danke auch an meine Überacker Crew dafür, dass ihr so ein verrückter Haufen seid und es nie langweilig mit euch wird!

Natürlich geht auch ein sehr großes Dankeschön an meine Familie, vor allem meine Eltern und Geschwister. Ohne eure großartige Unterstützung in allen Lebenslagen wäre ich sicher nicht da, wo ich jetzt bin. Es ist ein großes Geschenk, wenn man innerhalb einer glücklichen Familie aufwächst und dafür bin ich sehr dankbar.

Liebe Julia, Danke dir für das schnelle Korrektur lesen!

Luki, ich werde dir niemals genug für deine Liebe, Unterstützung und Geduld danken können. Egal, was passiert, du bist einfach immer da und bringst mich wieder zum Lachen. Danke Utti.

Des is wia bei jeda Wissenschaft, am Schluss stellt sich dann heraus, dass alles ganz anders war. – Karl Valentin