Universität Ulm

Institut für Allgemeine Physiologie

Direktor: Prof. Dr. med. Paul Dietl

Austausch zwischen Plasma- und Lamellärkörperchenmembran während Endo- und Exozytose

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Susanne Albrecht
Bad Mergentheim

2009

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Dietl

2. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Barth

Tag der Promotion: 10.5.2012

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen
das Mögliche getan hat.

Johann Wolfgang von Goethe,
***Italienische Reise*, 1787**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis iii

1 Einleitung 1
1.1 Das Surfactantsystem der Lunge 1
1.2 Lamellärkörperchen als sekretorische Organellen und Bestandteil endozytotischer Recyclingwege 4
1.3 Mechanismen der Surfactantexozytose 4
1.4 Metabolischer Kreislauf des Surfactants 6
1.5 Membrane trafficking in ATII Zellen 7
1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit 8

2 Material und Methoden 9
2.1 Chemikalien 9
2.2 Lösungen und Medien 11
2.3 Enzyme 13
2.4 Geräte 13
2.5 Kits 15
2.6 Oligonukleotide 16
2.7 Bakterienstämme 16
2.8 Zelllinien 16
2.9 Klonierungsvektoren 17
2.10 Antikörper 17
2.11 Verbrauchsmaterialien 17
2.12 Software 18
2.13 Mikroskopische Setups 18
2.14 Molekularbiologische Methoden 20
2.15 Generierung Adenoviraler Expressionssysteme 21
2.16 Virusisolation 25
2.17 Zellisolation und -kultivierung 26
2.18 Transfektion der ATII Zellen 27
2.19 Membrane mixing 27
2.20 Untersuchung fixierter ATII Zellen 28

2.21 Immunhistochemie 30
2.22 Richardson Kontrastmikroskopie 31
2.23 Statistische Analyse 31

3 Ergebnisse 32
3.1 Membrane mixing während der Endozytose 32
3.2 Membrane mixing während der Exozytose 49

4 Diskussion 53
4.1 Kotransfektion von ATII Zellen mit Lamp3-GFP und DsRed-Farn/ DsRed-Mem 53
4.2 Membrane mixing durch Endozytose 55
4.3 Membrane mixing durch Exozytose 61

5 Zusammenfassung/ Abstract 64/ 65

6 Literaturverzeichnis 66

Anhang 75

Danksagung 80

Lebenslauf 81

Abkürzungsverzeichnis

$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Calciumkonzentration
2-APB	2-Aminoethyldiphenyl-borinat
2YT	Yest Extract Tryptone
ATII Zelle	alveolare Typ II Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
attB/ L/ P/ R	attachment site B/ L/ P/ R
BAF A1	Bafilomycin A1
BSA	Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumin*)
CB	Composite Body (aus unterschiedlichen Bestandteilen zusammengesetztes Organell)
CD	Cluster of differentiation (immunphänotypisches Oberflächenmerkmal von Zellen)
cDNA	komplementäre DNA (engl. *Complementary DNA*)
CPZ	Capsazepin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynukleosidtri-phosphat
E. coli	*Echerichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA1	Early endosomal associated protein 1
EGFP	*enhanced green fluorescent protein* (zeigt gegenüber Wildtyp GFP 5 – 10-fach stärkere Expression)
ER	endoplasmatisches Retikulum
FBS	Fetales Kälberserum (engl. *Fetal bovine serum*)
F-Primer	Forward Primer
GFP	grün fluoreszierendes Protein (*engl. green fluorescent protein*)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IE	Internationale Einheit
IgG	Immunglobulin G
Indo	Indomethacin
ITR	inverted terminal repeat
KG	Körpergewicht
Lamp3	Lysosom-assoziiertes Membranglykoprotein 3
LB	Lamellärkörperchen (engl. *Lamellar body*)
LB-Agar	lysogeny broth-Agar
LSM	Laserscanning Mikroskop
MCS	Multi cloning site
MEM	Minimal Eagle's Medium
N	Anzahl der ausgewerteten Zellen

PAO	Phenylarsinoxid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. *Phosphate buffered saline*)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PI(3)K	Phosphatidylinositol3-kinase
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
REM	Rasterelektronenmikroskop(ie)
RER	Raues endoplasmatisches Retikulum
RGB	Rot-Grün-Blau
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of Interest
RPA	relative Pixelfläche (relative pixel area)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. *revolutions per minute*)
R-Primer	Reverse Primer
RT	Raumtemperatur
RZPD	Ressourcenzentrum und Primärdatenbank des deutschen Genomprojekts (Berlin)
SEM	Standardfehler (engl. *Standard error of the mean*)
SF	Surfactantfilm
SLID	scattered light intensity decrease
SLO	Streptolysin O
SOB	Super Optimal Broth
SOC	store operated Ca^{2+}
SOC-Medium	Super Optimal Broth plus Carbon-Medium
SP	Surfactantassoziertes Protein, z.B. SP-A, SP-B, SP-C, SP-D
T_{an}	Anlagerungstemperatur
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskop(ie)
TM	tubuläres Myelin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Vesikel
Wort	Wortmannin

1 Einleitung

Die Wiederaufnahme und das Recycling von Plasmamembranbestandteilen sind für die Biogenese von Exozytosegranula exokriner Zellen essentiell (Patzak und Winkler, 1986). Dies gilt auch für die alveolaren Typ II Zellen (ATII Zellen), den exokrinen Zellen der alveolaren Epithelschicht in der Lunge. ATII Zellen synthetisieren eine komplexe Mischung oberflächenaktiver Substanzen, welche in ihrer Gesamtheit als Surfactant bezeichnet werden. Surfactant wird nach der Synthese in exozytotischen Vesikeln, den sog. Lamellärkörperchen (*engl. lamellar bodies*, LBs), gespeichert und via Exozytose in den Alveolarraum ausgeschüttet. Im Alveolarraum wird das Surfactant in einen Surfactantfilm umgewandelt. Er kleidet die Alveolen gleichmäßig aus und setzt somit die alveolare Oberflächenspannung herab. Dadurch wird ein Kollabieren der Alveolen verhindert und die Inspiration ermöglicht. Neben der Surfactantfreisetzung spielen die ATII Zellen auch eine wesentliche Rolle bei der Entfernung exozytierter Surfactantbestandteile aus dem Alveolarraum (Wissel et al., 2001; Wissel et al., 2000; Rider et al., 1992).

1.1 Das Surfactantsystem der Lunge

Die Alveolen stellen die terminalen und kleinsten Einheiten des Respirationssystems dar und sind derjenige Ort, an dem der Gasaustausch mit dem Blut stattfindet (siehe **Abbildung 1**). Sie werden gleichmäßig von einem spezialisierten Epithel ausgekleidet, das aus zwei Zelltypen besteht, den alveolaren Typ I und Typ II Zellen. Während die flachen alveolaren Typ I Zellen vorwiegend Auskleidungs- und Gasaustauschfunktion besitzen, sind die kuboidalen ATII Zellen u. a. für die Synthese und Sekretion des sog. Surfactants zuständig.

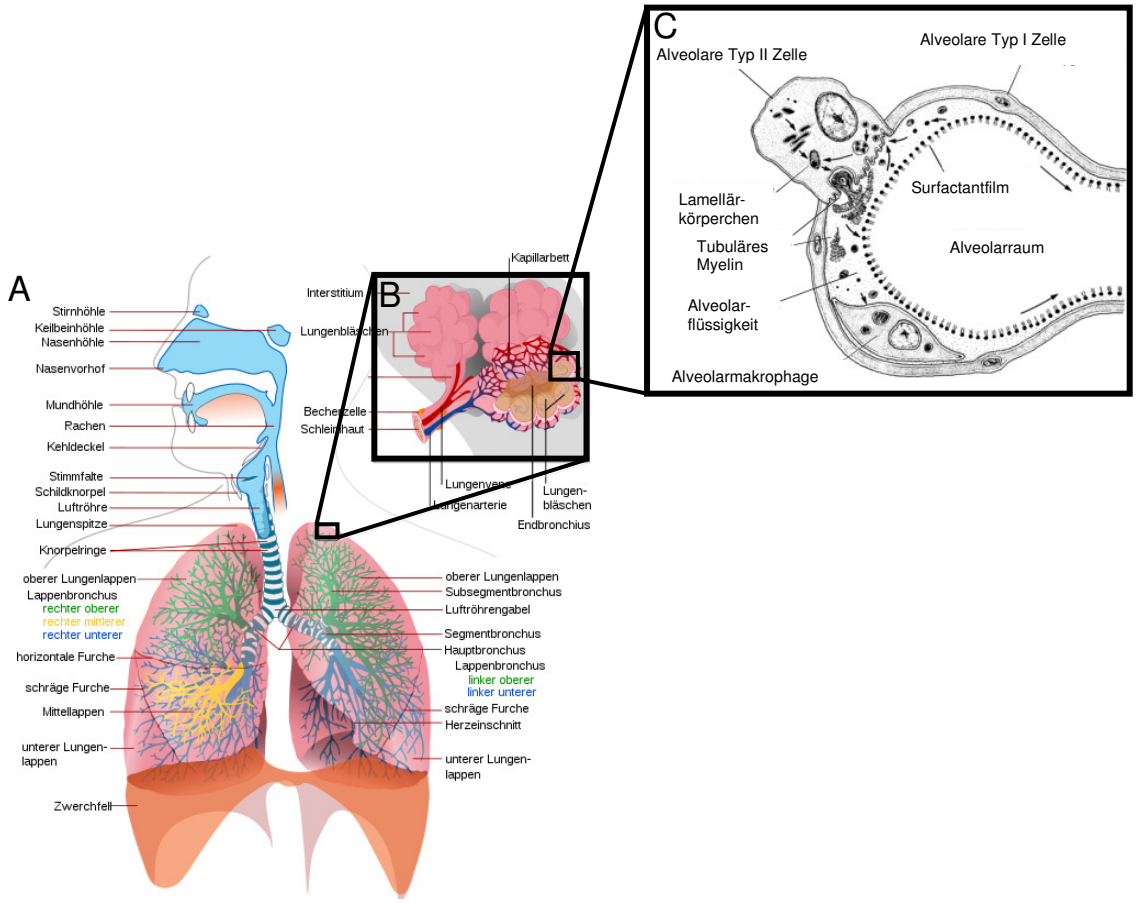


Abbildung 1 Anatomie des Respirationstraktes. **A** zeigt eine Übersicht der Atemwege und der Lunge. Die Lunge ist transparent dargestellt, um die Aufzweigung der Bronchien nachzuvollziehen. **B:** Vergrößerung einer terminalen Aufzweigung des Bronchialsystems, in die kleinsten Einheiten des Respirationstrakts- den Alveolen. **C** stellt eine schematische Zeichnung eines Alveolus und dessen auskleidende Epithelschicht mit den verschiedenen Zelltypen und deren Anordnung dar. (A + B: modifiziert nach © Marina R. Villarreal, 2008. C: modifiziert nach Hawgood und Clements, 1990).

Das Surfactant stellt eine komplexe Mixtur oberflächenaktiver Substanzen dar, bestehend aus Lipiden, vor allem Phospholipiden, und speziellen surfactant-assoziierten Proteinen (SP-A, SP-B, SP-C und SP-D).

Dass das Surfactant eine lebensnotwendige Substanz ist, wird vor allem in jenen Fällen klar, in denen ein Mangel an Surfactant vorliegt. Dieser Mangel verursacht bei Frühgeborenen das Atemnotsyndrom, was in entwickelten Ländern die Hauptursache der Morbidität und Mortalität von Frühgeborenen darstellt (Clements und Avery, 1998; Engle und the Committee on Fetus and Newborn, 2008). Die Schädigung des Gleichgewichts der Surfactantsynthese kann bestimmte Lungenerkrankungen auslösen oder zusätzlich zu diesen auftreten und diese verschlimmern. Beim Erwachsenen kann dadurch ein akutes Atemnotsyndrom hervorgerufen werden (Playfor und Nootigattu, 2006).

Die Speicherung des Surfactants erfolgt in intrazellulären Vesikeln, den sog. Lamellärkörperchen (*engl. lamellar bodies*, LB). Von dort wird das Surfactant durch Exozytose in den Alveolarraum sezerniert (Clements, 1997; Dietl et al., 2004) (**Abbildung 2**). Hier bildet das Surfactant einen die Alveolen gleichmäßig auskleidenden Film, der teilweise durch die Aufnahme in die ATII Zellen recycelt wird (Dietl und Haller, 2005; Wright und Clements, 1987; Wright, 1990). Des Weiteren werden Surfactantkomponenten durch extrazelluläre Degradation innerhalb der Alveoli, durch Makrophagen, sowie durch mukoziliären Transport aus dem Alveolarraum beseitigt (Wright, 1990). Der größte Teil der Surfactantentfernung aus dem Alveolarraum erfolgt über die Surfactantendozytose durch ATII Zellen und Makrophagen (Bates und Fisher, 1996; Fisher et al., 1987; Fisher et al., 1991; Chander et al., 1987). Somit spielen ATII Zellen eine wesentliche Rolle für die Aufrechterhaltung der Surfactanthomöostase in den Alveoli.

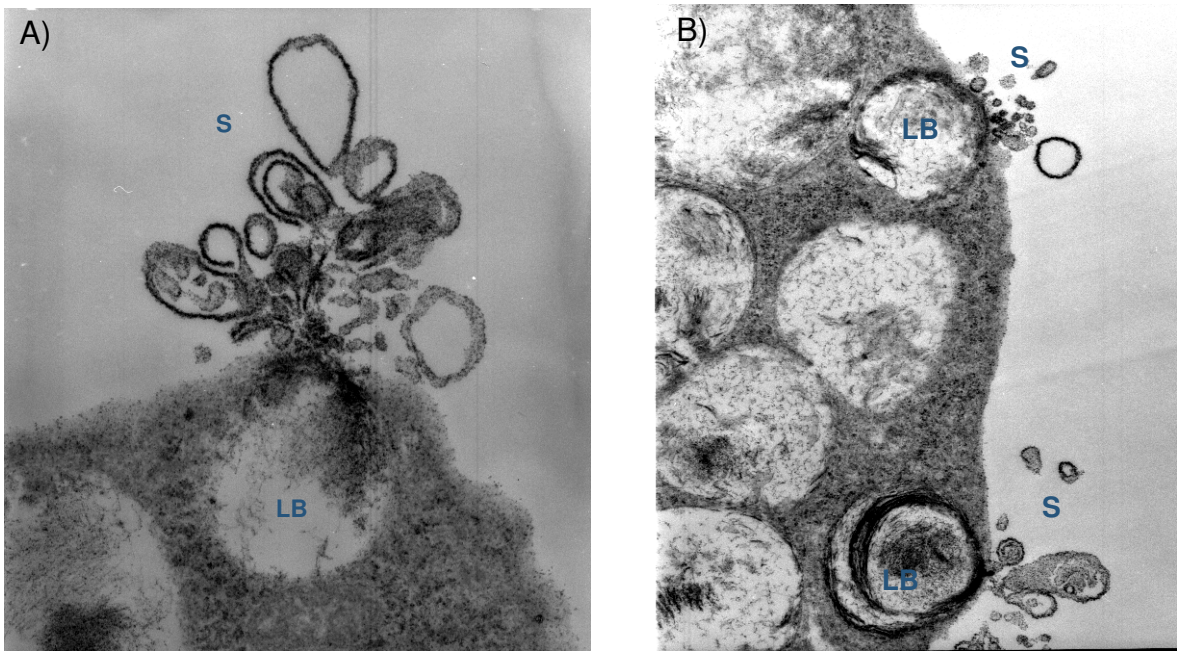


Abbildung 2 Momentaufnahme der Surfactantfreisetzung. **A)** Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahme der Fusion eines Lamellärkörperchens (LB) mit der Plasmamembran. Es bildet sich eine Fusionspore, durch die das Surfactant (S) in den Extrazellularraum entlassen wird. Im Extrazellularraum bildet das ausgeschüttete phospholipidreiche Surfactant membranähnliche Strukturen. **B)** TEM-Aufnahme eines Zellausschnittes mit mehreren unfusionierten, sowie zwei beschrifteten fusionierten Lamellärkörperchen (LB), die ihr gespeichertes Surfactant (S) in den Extrazellularraum entlassen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von S. Albrecht.

1.2 Lamellärkörperchen als sekretorische Organellen und Bestandteil endozytotischer Recyclingwege

Ein besonderes Charakteristikum der exokrinen ATII Zelle sind ihre sekretorischen Vesikel, die sog. Lamellärkörperchen (*engl. lamellar bodies, LBs*). Sie dienen der Speicherung und exozytotischen Freisetzung des Surfactants. Darüber hinaus sind LBs auch das Ziel von Surfactantbestandteilen, die im Zuge der Surfactantclearance (Rider et al., 1992) und des Surfactantrecyclings (Wissel et al., 2001; Wissel et al., 2000) durch Endozytose von den ATII Zellen aus dem Alveolarraum aufgenommen wurden. Somit kommt den LBs, neben ihrer Bedeutung als sekretorische Organellen, auch eine wichtige Stellung in den verschiedenen Endozytosewegen alveolarer Typ II Zellen zu.

Dass LBs Bestandteil der Endozytosewege in ATII Zellen sind, wird durch ihre Ähnlichkeit zu spezialisierten endozytotischen Organellen einer Zelle, den sog. Endosomen und Lysosomen, verdeutlicht. Wie endosomale und lysosomale Organellen weisen auch LBs einen niedrigen intravesikulären pH-Wert (< pH 6,1) auf, der durch eine vakuoläre H^+-ATPase aufrechterhalten wird (Wadsworth et al., 1997). Darüber hinaus beinhalten LBs neben lysosomalen Enzymen (Hook und Gilmore, 1982) auch endosomale und lysosomale Markerproteine (Wasano und Hirakawa, 1994), wie z. B. CD63 (Voorhout et al., 1993). CD63 wird auch als lysosom-assoziiertes Membranglykoprotein 3 (Lamp3) bezeichnet (Fukuda, 1991). In der vorliegenden Arbeit wurde Lamp3 als Fusionsprotein mit dem grün fluoreszierenden Protein (Lamp3-GFP) als spezifischer Marker der limitierenden LB-Membran verwendet.

1.3 Mechanismen der Surfactantexozytose

Zahlreiche Studien belegen, dass durch Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) die Surfactantexozytose ausgelöst wird (Haller et al., 1998; Dobbs et al., 1986; Wirtz und Dobbs, 1990; Frick et al., 2004). Ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ kann mit Adenosintriphosphat (ATP) (Dietl und Haller, 2005), Ca^{2+}-Ionophoren (Haller et al., 1999; Pian et al., 1988) oder durch mechanische Stimulation (Dehnung) (Wirtz und Dobbs, 1990; Frick et al., 2004) induziert werden. Dies führt zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der LB-Fusion mit der Plasmamembran und somit zur Surfactantexozytose (Kliewer et al., 1985; Ryan et al., 1975). Viele Studien (Fesce et al., 1994; Artalejo et al., 1998; Schneider, 2001; Valtorta et al., 2001; Wightman und Haynes, 2004; Sokac und Bement, 2006) beschäftigen sich mit der Aufklärung der Interaktion zwischen dem sekretorischem Vesikel und der Plasmamembran während

des Fusionsvorgangs. Dabei werden im Wesentlichen zwei Mechanismen beschrieben: Während nach der einen Theorie der sekretorische Vesikel während der Fusion vollständig in die Plasmamembran übergeht und die überschüssige Membran im Rahmen der Membranhomöostase im Anschluss über clathrinabhängige und –unabhängige Endozytose wieder internalisiert wird („full fusion“), gibt es auch Anzeichen dafür, dass der Vesikel während der Fusion erhalten bleibt und nur ein bestimmter Anteil des Vesikelinhaltes nach extrazellulär abgegeben wird („kiss-and-run“) (siehe **Abbildung 3**).

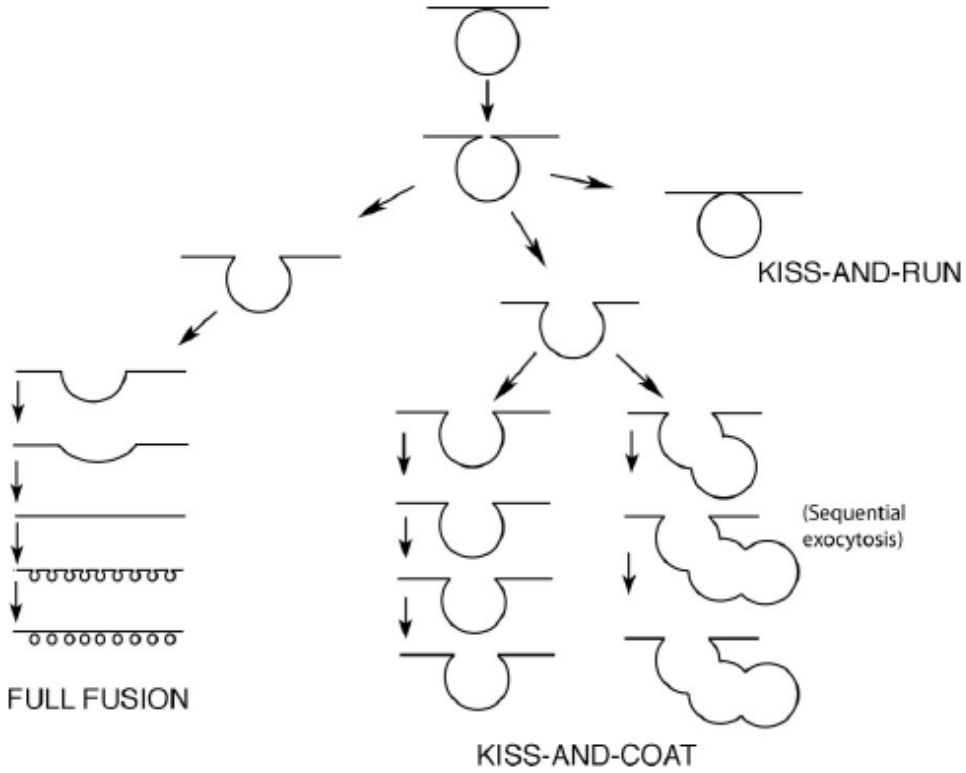


Abbildung 3 Schematisches Diagramm unterschiedlicher Mechanismen der Exozytose nach Sokac und Bement, 2006, S. 1496. Während der „full fusion“ geht der sekretorische Vesikel vollständig in die Plasmamembran über. Im Rahmen der Membranhomöostase werden Membranbestandteile im Anschluss wieder internalisiert. Während eines „kiss-and-run“-Ereignisses kommt es zu einer vorübergehenden Fusion des Vesikels mit der Plasmamembran. Der Vesikel bleibt an sich erhalten. Während einer „kiss-and-coat“-Exozytose bleiben die sekretorischen Vesikel nach der Fusion lange Zeit morphologisch bestehen. Außerdem kommt es hier zu einer Ummantelung des Vesikels mit Aktin.

Des Weiteren wurde ein dritter Mechanismus der Exozytose beschrieben (Schneider, 2001; Sokac und Bement, 2006). Hier kommt es im Rahmen der Fusion zur Ummantelung des sekretorischen Vesikels mit Aktin („kiss-and-coat“) (**Abbildung 3**). Sie verleiht dem fusionierten Vesikel für seine spätere Wiederaufnahme Stabilität und ist bei der Ausschüttung des Vesikelinhaltes involviert. Die Ummantelung wird dieser Studie nach am wahrscheinlichsten durch die Vermischung von Plasma- und Vesikelmembrananteilen („Compartment mixing“) vermittelt (Yu und Bement, 2007).

1.4 Metabolischer Kreislauf des Surfactants

Neben der Surfactantfreisetzung spielen die ATII Zellen eine wichtige Rolle in der Clearance von Surfactantbestandteilen aus dem Alveolarraum (Rider et al., 1992; Wright, 1990; Fisher et al., 1987; Fisher et al., 1991; Chander et al., 1987). Daher befinden sich einzelne Surfactantbestandteile in einem metabolischen Kreislauf, wie er in **Abbildung 4** (nach Schmitz und Müller, 1991) angedeutet ist. Extrazelluläre Lipide und surfactantassoziierte Proteine werden vorwiegend durch clathrinabhängige Endozytosewege aufgenommen (Stevens et al., 2001). Daneben sind auch clathrinunabhängige Endozytosewege an der Wiederaufnahme von Surfactant beteiligt (Ruckert et al., 2003). Nach der Endozytose von Surfactant aus dem Alveolarraum werden surfactantassoziierte Lipide und Proteine unterschiedlich transportiert. Das surfactantassoziierte Protein-A (SP-A) wird via Early und Recycling Endosome zum größten Teil erneut sezerniert (Wissel et al., 1996; Wissel et al., 2001). Im Gegensatz zum SP-A wird der größte Teil der internalisierten surfactantassoziierten Lipide in die LBs aufgenommen (Ruckert et al., 2003). Diese Recyclingwege umfassen allerdings nur die Surfactantbestandteile, die zuvor von den ATII Zellen durch Exozytose ausgeschüttet wurden.

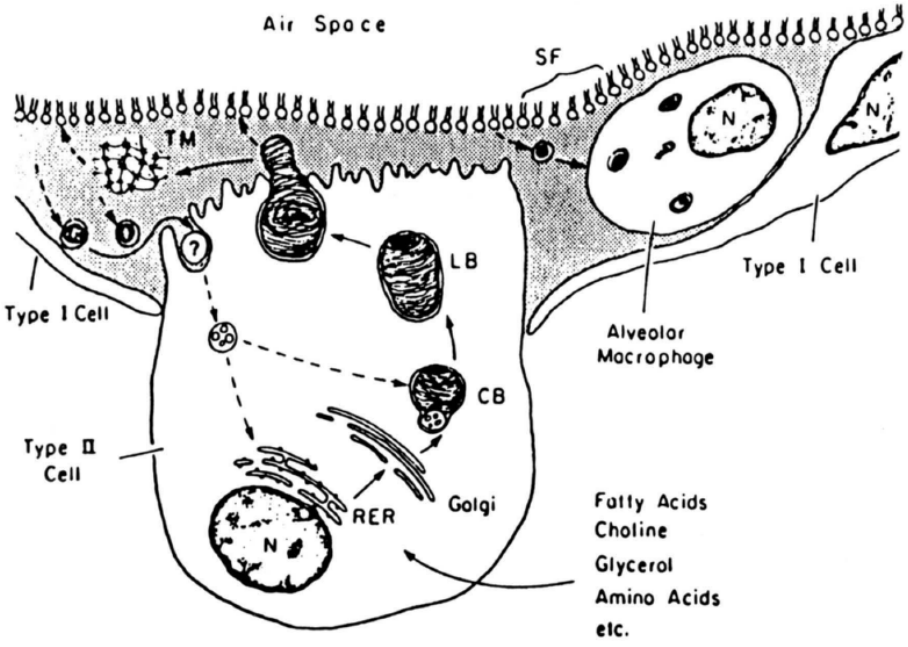


Abbildung 4 Metabolischer Kreislauf des Lungensurfactants (aus Schmitz und Müller, 1991, S. 1554). RER = Raues endoplasmatisches Retikulum; CB = Composite Body; LB = Lamellärkörperchen; N = Nucleus; TM = tubuläres Myelin; SF = Surfactantfilm; V = Vesikel.

1.5 Membrane trafficking in ATII Zellen

Der Transport von Membranbestandteilen zwischen den verschiedenen Membrankompartimenten einer Zelle wurde als „Membrane trafficking“ bezeichnet. Eine besondere Rolle spielt Membrane trafficking in sekretorischen Zellen, wie den ATII Zellen: die Sekretionsproteine werden hierbei im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und passieren den Golgi-Komplex, um in Granula für die anschließende Exozytose an der Plasmamembran verpackt zu werden. Besonders treffend vergleichen I. Mellman und G. Warren (Mellman und Warren, 2000) diesen Syllogismus der Exozytose ER→Golgi→Plasmamembran als das zellbiologische Äquivalent zum molekularbiologischen DNA→RNA→Protein-Syllogismus. Der umfangreiche Transfer zwischen den Kompartimenten erfolgt dabei durch kleine Vesikel, ohne dass die Individualität der beteiligten Kompartimente beeinträchtigt wird (Mellman und Warren, 2000). Membranbestandteile sekretorischer Vesikel, die während der Exozytose in die Plasmamembran übergehen, müssen demnach zurückgewonnen bzw. recycelt werden (Heuser und Reese, 1973).

Wie unter 1.4 beschrieben, kommt es in den sekretorischen ATII Zellen im Rahmen des Surfactantmetabolismus gleichzeitig auch zum Recycling und somit zur Internalisierung von Surfactantbestandteilen. Durch das Membrane trafficking zwischen Plasma- und Vesikelmembran im Rahmen der Exozytose ist es möglich, die sekretorische Aktivität einer Zelle durch Bestimmung der Exposition von Vesikelmembranbestandteilen auf der Zelloberfläche zu messen. Im speziellen Fall der Surfactantexozytose in ATII Zellen wurde die Oberflächenexposition des Lipidtransporters ABCA3, einem spezifischen Marker der limitierenden LB-Membran (Ban et al., 2007), quantifiziert (Bates et al., 2000). Dabei konnte gezeigt werden, dass in ATII Zellen sekretionsstimulierende Substanzen den Transport des ABCA3-Proteins von der Plasmamembran zurück zu den LBs erleichtern (Bates et al., 2000; Mulugeta et al., 2002). Dieser Rücktransport des ABCA3 verläuft clathrinunabhängig und unterliegt somit einem anderen Mechanismus, als er für das Surfactantrecycling aus dem Alveolarraum beschrieben wurde (Jain et al., 2005; Ruckert et al., 2003; Stevens et al., 2001).

1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit

Ziel der Arbeit war es, Austauschprozesse von Lipid- bzw. Proteinbestandteilen zwischen der Plasmamembran und der limitierenden LB-Membran zu untersuchen.
Dazu war es notwendig, beide Membrankompartimente selektiv in der lebenden Zelle zu markieren, den Austausch von Membrananteilen während exo- und endozytotischer Prozesse zu quantifizieren und die zugrundeliegenden Mechanismen zu identifizieren.
Hierfür wurden adenovirale Expressionskonstrukte generiert: Als Marker der limitierenden LB-Membran diente das grün fluoreszierende Fusionsprotein des lysosomassoziierten Membranglykoprotein 3 (Lamp3-GFP). Als Marker für den Lipidanteil der Plasmamembran wurde DsRed-Farn eingesetzt, ein rot fluoreszierendes Protein, das durch Farnesylierung selektiv in das innere Blatt der Plasmamembran inkorporiert wird. Somit wurde hier erstmals ein Marker der Lipidfraktion der Plasmamembran an intakten lebenden Zellen eingesetzt.
Erstmals sollten innovative Ansätze des „Life cell imaging“ genutzt werden, um das Trafficking von Plasmamembrankomponenten an lebenden Zellen in Echtzeit zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Tabelle 1 Chemikalien. (ATP = Adenosintriphosphat, BSA = Rinderserumalbumin (bovine serum albumin), DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMSO = Dimethylsulfoxid, DNase = Desoxyribonuclease, dNTP = Desoxynukleosidtriphosphat, EDTA = Ethylendiamintetraacetat, FBS = Fetales Kälberserum (Fetal bovine serum), HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, IgG = Immunglobulin G, LB= lysogeny broth, MEM = Minimal Eagle´s Medium, PEG = Polyethylenglykol, PBS = Phosphat-gepufferte Salzlösung, PCR = Polymerasekettenreaktion, SOB = Super Optimal Broth, Tris = Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, YT = Yest Extract Tryptone)

Chemikalien	**Hersteller (Ort)**
0,25% Trypsin-EDTA Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
10x Ligation Buffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
10x PCR Buffer	QIAGEN GmbH (Hilden)
2-Aminoethyldiphenylborinat (2-APB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
2xYT-Medium	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
50% PEG 4000 Solution	Fermentas (St. Leon-Rot)
Ampicillin	AGS GmbH (Heidelberg)
ATP	Fluka Chemika (Buchs, Schweiz)
Bacillol®	BODE Chemie GmbH & Co. KG
Bafilomycin A1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Buffer Tango™ with BSA (10x)	Fermentas (St. Leon-Rot)
$CaCl_2$	Merck KGaA (Darmstadt)
Capsazepin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Chloramphenicol	AGS GmbH (Heidelberg)
Dithiothreitol (DTT)	Plusone® Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
DMEM (4,5 $^{mg}/_{l}$ Glucose, 25 mM HEPES)	Gibco/ Invitrogen (Karlsruhe)
DMSO	Fluka Chemika (Buchs, Schweiz)
dNTP-Mix	PeQLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Dulbecco’s MEM Medium (100x)	Gibco/ Invitrogen (Karlsruhe)
Essigsäure	RdH Laborchemikalien GmbH & Co. KG (Seelze)

Ethanol	Universität Ulm, Klinik Apotheke (Ulm)
Ethidium Bromid	Eurobio (Les Ulis, Frankreich)
Filipin III	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Formaldehyd	Fluka Chemika (Buchs, Schweiz)
Glucose	Merck KGaA (Darmstadt)
Glutaraldehyd	Plano
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
HCl	Merck KGaA (Darmstadt)
Heparin-Natrium Braun „Multi“ 10000 $^{IE}/_{ml}$	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
IgG aus Rattenserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Indomethacin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Ionomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Isopropanol	Fluka Chemika (Buchs, Schweiz)
Isotonische Kochsalzlösung	Serag-Wiessner KG (Naila)
Kanamycin	AGS GmbH (Heidelberg)
KCl	Merck KGaA (Darmstadt)
Ketamin 10%	WDT (Garbsen)
Ladepuffer 6x MassRuler^{TM} Loading Dye Solution	Fermentas (St. Leon-Rot)
LB-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
L-Glutamin	Invitrogen Molecular Probes (Karlsruhe)
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	Invitrogen^{TM} Ltd (Paisley, UK)
LY-294002	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
$MgCl_2$	Merck KGaA (Darmstadt)
NaCl	AppliChem GmbH (Darmstadt)
NE-Buffer 1 (10x) (New England Buffer)	New England BioLabs GmbH (Frankfurt am Main)
PBS	Biochrom AG (Berlin)
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen Molecular Probes (Karlsruhe)
Phenylarsinoxid (PAO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Calbiochem, Merck KGaA (Darmstadt)
Purifed BSA (100x)	New England BioLabs GmbH (Frankfurt am Main)

Q-Solution (5x)	QIAGEN GmbH (Hilden)
Research Grade FBS	HyClone (Logan, UT, USA)
Rompun® 2%	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
SeaKem® LE agarose	Cambrex Bio Science Rockland, Inc. (Rockland, ME, USA)
Smart Ladder MW-1700-02 (5 µl/lane)	Eurogentec Deutschland GmbH (Köln)
SOB-Medium	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Streptolysin O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Tris	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Wortmannin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)

2.2 Lösungen und Medien

2.2.1 Zellkultur

Tabelle 2 Lösungen und Medien der Zellkultur. (DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMSO = Dimethylsulfoxid, DNase = Desoxyribonuclease, EDTA = Ethylendiamintetraacetat, FBS = Fetales Kälberserum (Fetal bovine serum), HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, IgG = Immunglobulin G, MEM = Minimal Eagle´s Medium, PBS = Phosphat-gepufferte Salzlösung, Tris = Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)

293A-Medium	DMEM, 4,5 $^{g}/_{l}$ Glucose, 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin (10 000 $^{U}/_{ml}$ Penicillin, 10 $^{mg}/_{ml}$ Streptomycin) und 1% Dulbecco's MEM Medium
Anästhesielösung	0,75 ml Ketamin, 0,6 ml Rompun (Xylazine), 1,65 ml NaCl; Verabreichung: $3^{ml}/_{kg\ KG}$ intraperitoneal
DNAse-haltige Lösung	2 mg DNase, 1,5 ml Präparationslösung II
Einfriermedium	90 % Komplettmedium (DMEM , 10% FBS, 0,1 mM Dulbecco's MEM Medium, 2 mM L-glutamine, 1% Penicillin/Streptomycin (10 000 $^{U}/_{ml}$ Penicillin, 10 $^{mg}/_{ml}$ Streptomycin)) + 10% DMSO
Elastase-Trypsin-Lösung	10 mg Elastase, 2 mg Trypsin, 40 ml Präparations-lösung II
IgG/Tris-Lösung	50 mM Tris, 500 $^{\mu g}/_{ml}$ IgG (Ratte)
Kontrolllösung	140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 1mM $MgCl_2$, 2mM $CaCl_2$; titrieren auf pH 7,4

Präparationslösung I	140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,5 mM PBS, 10 mM HEPES, 6 mM Glucose, 0,2 mM EDTA; titrieren auf pH 7,4
Präparationslösung II	140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,5 mM PBS, 10 mM HEPES, 2 mM $CaCl_2$, 1,3 mM $MgSO_4$; titrieren auf pH 7,4
Transfektionsmedium	DMEM, 4,5 $^{g}/_{l}$ Glucose, 10% FBS und 1% Dulbecco's MEM Medium
Transfektionsmedium ohne Serum	DMEM, 4,5 $^{g}/_{l}$ Glucose und 1% Dulbecco's MEM Medium
Zellmedium	DMEM, 1% Streptomycin/Penicillin (10 000 $^{U}/_{ml}$ Penicillin, 10 $^{mg}/_{ml}$ Streptomycin), 10% FBS

2.2.2 Molekulare Biologie

Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-Q; Millipore) angesetzt. Falls nicht anderweitig erwähnt, wurden die pH-Werte mit NaOH bzw. HCl eingestellt und die Lösungen anschließend steril filtriert.

Tabelle 3 Lösungen und Medien der Molekulare Biologie. (EDTA = Ethylendiamintetraacetat, LB = lysogeny broth, SOB = Super Optimal Broth, SOC = super optimized broth plus carbon, TBE = Tris-Borat-EDTA, TE = Tris-EDTA, Tris = Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, YT = Yest Extract Tryptone)

2xYT-Medium	31,06 g 2xYT-Medium, 1 l bidestiliiertes Wasser; autoklavieren (15 min, 121°C)
LB-Agar	40 g LB-Agar, 1 l bidestilliertes Wasser; autoklavieren (15 min, 121°C)
SOC-Medium	30,67 g SOB-Medium, 1 l bidestilliertes Wasser; autoklavieren (15 min, 121°C); abkühlen lassen auf unter 60°C, dann Zugabe von 20 ml 1 M Glucose (18 g Glucose in 100 ml bidestilliertem Wasser lösen)
TBE-Puffer (einfach) pH 8,0	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA-Na_2; mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen
TE-Puffer pH 7,4	10 mM Tris x Cl (pH 7,4), 1 mM EDTA (pH 8)
TE-Puffer pH 8,0	10 mM Tris x Cl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8)

2.2.3 Immunhistochemie

Tabelle 4 Lösungen der Immunhistochemie. (HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, KOAc = Kaliumacetat, PBS = Phosphat-gepufferte Salzlösung, PFA = Paraformaldehyd, SLO = Streptolysin O)

4%PFA-Lösung	PBS, 4% Formaldehyd
SLO-Puffer	25 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 115 mM KOAc, 2,5 mM MgCl

2.3 Enzyme

2.3.1 Zellkultur

Tabelle 5 Enzyme Zellkultur. (DNase = Desoxyribonuclease)

DNase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Elastase	Elastin Products Company, Inc. (Owensville, MO, USA)

2.3.2 Molekulare Biologie

Tabelle 6 Enzyme Molekulare Biologie. (DNA = Desoxyribonukleinsäure, Taq = Thermus aquaticus)

BamHI	Fermentas (St. Leon-Rot)
PacI	New England BioLabs GmbH (Frankfurt am Main)
Proteinase K	Invitrogen™ Ltd (Paisley, UK)
T4 DNA Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Taq DNA Polymerase	QIAGEN GmbH (Hilden)
XhoI	Fermentas (St. Leon-Rot)

2.4 Geräte

2.4.1 Geräte Zellkultur

Tabelle 7 Geräte Zellkultur. (UV = Ultraviolett)

Absaugstation MINI—VAC EC	Axon Lab AG (Reichenbach/ Stuttgart)
FST 250 Sterillizer	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
Gas Profi1SCS	WLD-Tec GmbH (Göttingen)
Heizplatten-Magnetrührer	Bibby Scintific LTD (Staffordshire, UK)

HERAcell® 150 CO_2 Inkubator	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
HERAsafe® HS 15 Sicherheitswerkbank (S1)	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)
Labofuge 400e Function Line	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)
Membranvakuumpumpe	Biometra biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen)
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH (München)
Mikroskop Leitz Labovert	Leica Camera AG (Solms)
pH-Meter CG 822	SCHOTT Instruments GmbH (Mainz)
Pipetus® Pipetierhilfe	Hirschmann Laborgeräte GmbH und Co. KG (Eberstadt)
Präzisionswaage	Sartorius AG (Göttingen)
REAX 2000 Vibrationsmixer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach)
S@feflow1.2 Sicherheitswerkbank (S2)	Nunc™ Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Co., Inc. (Edison, NJ, USA)
UV crosslinker	Amersham Life Science (Buckinghamshire, UK)
Varioklav 300 Autoklav (S1)	H+P Labortechnik GmbH (Oberschleißheim)
Wasserbad JB series	Grant Instruments Ltd. (Cambridge, UK)

2.4.2 Geräte Molekulare Biologie

Tabelle 8 Geräte Molekulare Biologie. (DNA = Desoxyribonukleinsäure, RNA = Ribonukleinsäure, UV = Ultraviolett)

Biofuge primoR	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)
Centrifuge 5417R	Eppendorf AG (Hamburg)
Elektrophoeresegerät PowerPac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Elektrophoresekammer WIDE MINI-SUB® CELL GT	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Inkubator (Jouan)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
MC 6 Centrifuge	SARSTEDT AG und Co. (Nümbrecht)
REAX 2000 Vibrationsmixer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach)
RNA/DNA Calculator GeneQuant II	Pharmacia Biotech (Cambridge, UK)
Schüttelinkubator (3031)	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)

Thermocycler PCR-System Primus 96 advanced	PeQLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
ThermoE (CHB-A4-HH)	BIOER TECHNOLOGY CO., LTD. (Hangzhou, China)
Thermomixer compact	Eppendorf AG (Hamburg)
Transilluminator	Biometra® biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen)
UV-Lampe/-Schirm	Ltf-Labortechnik (Wasserburg/ Bodensee)
UV-Schirm Drucker: IP-001-SD	Ltf-Labortechnik (Wasserburg/ Bodensee)
UV-Schirm Kamera: Hama nah (close up)+1 M49	Ltf-Labortechnik (Wasserburg/ Bodensee)
UV-Schirm Monitor: Sony black and white Monitor SSM-930CE	Ltf-Labortechnik (Wasserburg/ Bodensee)
Wasserbad (Type 1002)	Gesellschaft für Labortechnik GmbH (Burgwedel)

2.5 Kits

Tabelle 9 Kits. (PCR = Polymerasekettenreaktion)

BP Clonase II enzyme mix	Invitrogen™ Ltd (Paisley, UK)
illustra™ plasmid Prep Mini Spin Kit	GE Healthcare UK Limited Little Chalfont (Buckinghamshire, UK)
InFusion Dry-Down PCR Cloning Kit	Clontech Laboratories Inc. (Mountain View, CA, USA)
LR Clonase II enzyme mix	Invitrogen™ Ltd (Paisley, UK)
MultiShot™ StripWell Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
QIAfilter™ Plasmid Midi Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)
ViraBind™ Adenovirus Purification Kit	Cell Biolabs Inc. (San Diego, CA, USA)
ViraPower™ Adenoviral Gateway™ Expression Kit	Invitrogen™ Ltd (Paisley, UK)

2.6 Oligonukleotide

Tabelle 10 Oligonukleotide. (MCS = Multi cloning site, RZPD = Ressourcenzentrum und Primärdatenbank des deutschen Genomprojekts)

	Sequenz **5' --- > 3'**
DsRed-Farn-F2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGG
DsRed-Farn-R2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAGCTTGAGCTCGAGATCTGGATCC
DsRed-Mem-F2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATTCTGCAGTCGACGGTACCG
DsRed-Mem-R2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGGCTGATTATGATCTAGAGTCGCGG
Lamp3 cDNA	IRBPp993D126D2; RZPD (Berlin)
Lamp3-F3	GGACTCAGATCTCGAGATGCCTGGGCAGACCTCTGCAGTAGCTG
Lamp3-R3	GGCGACCGGTGGATCGATTCTCTGGTATGCAGATGACTGACGC
MCSgfp-F1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGCTAGCGCTACCGGACTCAG
MCSgfp-R1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTTACTTGTACAGCTCGTCC

2.7 Bakterienstämme

Tabelle 11 Bakterienstämme. (*E. coli* = *Echerichia coli*)

E. coli OmniMax^{TM}2-T1^{R}	Invitrogen (Karlsruhe)
E. coli One Shot® ccdB survival T1$_{R}$	Invitrogen (Karlsruhe)
E. coli One Shot® TOP10	Invitrogen (Karlsruhe)
E. coli One Shot® TOP10F'	Invitrogen (Karlsruhe)
E. coli XL1-Blue	Stratagene (Waldbronn)

2.8 Zelllinien

Tabelle 12 Zelllinien.

293A (human, Gewebe: Niere)	Invitrogen^{TM} Ltd (Paisley, UK)

2.9 Klonierungsvektoren

Genkarten und Beschreibung der Vektoren siehe Anhang.

Tabelle 13 Klonierungsvektoren.

pAd/CMV/V5-DEST	Invitrogen (Karlsruhe)
pDONR 221	Invitrogen (Karlsruhe)
pDsRed-Monomer-F	Clontech (Saint-Germaine-en-Laye, Frankreich)
pDsRed-Monomer-Mem	Clontech (Saint-Germaine-en-Laye, Frankreich)
pEGFP1-N1	Clontech (Saint-Germaine-en-Laye, Frankreich)

2.10 Antikörper

Tabelle 14 Antikörper. (IgG = Immunglobilin G)

Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG	Invitrogen (Karlsruhe)
Anti-Early Endosomal Antigen 1 (N-Terminal)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Steinheim)

2.11 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 15 Verbrauchsmaterialien.

Impfösen	VWR International GmbH (Darmstadt)
Cellstar® 24 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-one GmbH (Frickenhausen)
Deckelkette für 0,2 ml Kette	SARSTEDT AG und Co. (Nümbrecht)
Falcon Tubes	SARSTEDT AG und Co. (Nümbrecht)
Falcon® Polypropylene Round-Bottom Tube	Becton Dickinson Labware Europe (Le Pont De Claix, Frankreich)
Gestopfte Pipettenspitzen: Biosphere® Filter Tips	SARSTEDT AG und Co. (Nümbrecht)
Ibidi 15 µ-Slide 18 Well for Cell Analysis	Ibidi GmbH BioDiagnostics (Martinsried/München)
Ibidi 60 µ-Dish for Live cell Analysis	Ibidi GmbH BioDiagnostics (Martinsried/München)
Lab-Tek® Chamber Slide™	Nalge Nunc International (Rochester, NY, USA)
Multiply® µ-Strip 0,2 ml Kette	SARSTEDT AG und Co. (Nümbrecht)
Nitrocellulose Membranen 0,45	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Steinheim)
Serologische Einmalpipetten Costar® Stripette	Corning Inc. (New York, USA)
Tissue culture dishes, 60x15 mm	SARSTEDT AG und Co. (Nümbrecht)

Tissue Culture Plate 6 Well Flat Bottom with Lid	SARSTEDT AG und Co. (Nümbrecht)
Unsterile Pipettenspitzen	Eppendorf AG (Hamburg)
Zellkulturflaschen (Tissue Culture Flask), 25 cm^2	SARSTEDT AG und Co. (Nümbrecht)

2.12 Software

Tabelle 16 Software.

ImageJ	National Institute of Health, USA; http://rsb.info.nih.gov/ij
Adobe Photoshop CS2	Adobe Systems GmbH, München
MetaMorph	Molecular Devices, Downingtown (USA)
Microsoft Excel	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Velocity Software	Improvision Deutschland, Tübingen
SigmaPlot 10.0	Systat Software GmbH, Erkrath

2.13 Mikroskopische Setups

2.13.1 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurde zur konfokalen Laserscanning Mikroskopie ein Setup von Visitron Systems (Puchheim) mit folgenden Komponenten benutzt:

- Zeiss Meta LSM Mikroskop
- Photometrics® Cascade 2 512 Kamera (Photometrics, Tuscon (USA))
- planapochromates 63x und 100x Öl-Immersionsobjektiv von Zeiss
- MetaMorph software (Molecular Devices, Downingtown (USA))
- vtInfinity-2D Konfokalscanner (Visitron Systems GmbH, Puchheim)

Verwendete Filter:

- Für die Detektion von Lamp3-GFP: 488 nm Anregungslaser kombiniert mit einem 500-530 nm Emissionsfilter
- Für die Detektion von DsRed-Farn/-Mem: 568 nm Anregungslaser kombiniert mit einem LP 560 nm Emissionsfilter

2.13.2 Richardson Kontrastmikroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Richardson RTM 2.5 Mikroskop (Improvision, Tübingen) mit der Möglichkeit zur Kombination von Dunkelfeld- und Fluoreszenzbildgebung verwendet.

Das Setup enthielt folgende zusätzliche Komponenten:

- 3CCD Farbkamera (ExwaveHAD DXC-C33, Sony), mit der das Dunkelfeld- als auch das Fluoreszenzlicht detektiert wurden
- 63x Leica Wasserimmersionsobjektiv (numerische Aperatur = 0.90)
- Volocity Software (Improvision Deutschland, Tübingen)
- Jeweils passenden Filterblock für die beiden Fluoreszenzexperimente:
  RTM-3.0 blauer Filterblock (490 nm dichroitisch, 400-500 nm Anregungsfilter, 510 nm LP Emissionsfilter) für die Lamp3-GFP- Experimente
  RTM-3.0 grüner Filterblock (560 nm dichroitisch, 540-560 nm Anregungsfilter, 590 nm LP Emissionsfilter) für die DsRed-Farn-Experimente

2.13.3 Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie

In Zusammenarbeit mit der Sektion Elektronenmikroskopie der Universität Ulm unter der Leitung von Prof. Dr. P. Walther wurden zur ultrastrukturellen Untersuchung der ATII Zellen transmissions- sowie rasterelektronenmikroskopische Experimente durchgeführt. Aufgrund der geringen Wellenlänge des Elektronenstrahls kann mit diesen Methoden eine Auflösung von bis zu 0,1 nm erreicht werden.

Vorgefertigte ultradünne Schnitte (50 nm Dicke) von ATII Zellen wurden mit einem Zeiss EM10 Elektronenmikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen) untersucht. Die aufgenommenen Negative wurden nach der Entwicklung mit einem Scanner (Umax Systems GmbH, Willich) für die weitere Auswertung digitalisiert. Die rasterelektonenmikroskopische Oberflächenanalyse der Zellproben wurde unter Verwendung eines Hitachi S-5200 Rasterelektronenmikroskop (Hitachi High Technologies America, Inc. Pleasanton (USA)) durchgeführt.

Die bei der Ultradünnschnittanfertigung hergestellten Semidünnschnitte (500 nm Dicke) wurden mittels konventioneller Hellfeldmikroskopie (Zeiss Meta LSM Mikroskop) untersucht.

2.14 Molekularbiologische Methoden

2.14.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur Vervielfältigung von cDNA (Vermehrungsansatz), sowie zur Überprüfung der einzelnen Klonierungsschritte (analytische PCR) verwendet und gemäß **Tabelle 17** und **Tabelle 18** durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in 1%-igem Agarosegel (Agarose, TBE-Puffer (pH 8,0), Ethidiumbromid (5 $^{mg}/_{ml}$) in TBE-Puffer (pH 8,0)) aufgetrennt (Ansatz siehe **Tabelle 19**) und aus dem Gel ausgeschnitten.

Tabelle 17 PCR-Ansätze. (dNTPs = Desoxynukleosidtriphoshate; F-Primer = Forward Primer; R-Primer = Revers Primer)

	Vermehrungsansatz	**Analytische PCR**
Jeweiliger F-Primer	10 pmol	10 pmol
Jeweiliger R-Primer	10 pmol	10 pmol
10x-Puffer	5 µl	2 µl
5x-Q-Solution	10 µl	4 µl
Plasmid (template) (1:2000 mit H_2O verdünnt)	0,5 µl	0,5 µl
dNTPs	0,5 µl	0,5 µl
Taq-Polymerase	2 U	2 U
ad H_20	50 µl	20 µl

Tabelle 18 PCR-Programm.

PCR-Programm:
1. Initiale Denaturierung: 96°C, 2 min
2. 25 Zyklen mit folgenden Schritten (2a-c):
2a. Denaturierung (Schmelzen): 96°C, 15 s
2b. Anlagerungstemperatur T_{an}: 55°C, 15 s
2c. Elongation: 72°C, 40 s
3. Abschließende Elongation: 72°C, 15 min
4. Lagerung bei 4°C

Tabelle 19 Ansatz für die gelelektrophoretische Auftrennung.

Ansatz für PCR-Produkt:	Ansatz für zugehöriges Plasmid (Vergleich):
1 µl Plasmid	20 µl PCR-Produkt
3 µl H_2O	5 µl Ladepuffer
2 µl Ladepuffer	

2.14.2 DNA-Extraktion und -Konzentrationsbestimmung

PCR-Produkte wurden unter Verwendung des QIAquick® Gel Extraction Kit (QUIAGEN) gemäß Herstellerprotokoll aus dem Agarosegel extrahiert. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde photometrisch durch Adsorption bei 260 nm bestimmt.

2.15 Generierung adenoviraler Expressionssysteme

Um Fluoreszenzfusionsproteine in ATII Zellen überexprimieren zu können, wurden adenovirale Expressionskonstrukte generiert.

2.15.1 Plasmidvermehrung

Die Einschleusung von DNA in chemisch kompetente Bakterien wird als Transformation bezeichnet. Ziel der Kultivierung transformierter Bakterien ist die Vervielfältigung der hergestellten Klonierungsprodukte (Plasmide). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Ausgangsvektoren und dazugehörigen Genkarten sind in **Tabelle 13** bzw. in **Abbildung 30** bis **Abbildung 31** (siehe Anhang) dargestellt.

Die Transformation der Vektoren pDsRed-Monomer-Mem bzw. pDsRed-Monomer-F erfolgte in chemisch kompetenten *E. coli* One Shot® TOP10. Für die Vermehrung des Ausgangsvektors pEGFP-N1 wurden chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue verwendet, für den Donorvektor pDONR221 chemisch kompetente *E. coli* One Shot® ccdB survival $T1_R$. Der Lamp3-kodierende pExpress-1-Vektor wurde in chemisch kompetente *E. coli* One Shot® TOP10F' transformiert. Für die Transformation wurde gemäß Herstellerprotokoll 1 - 5 µl (10 pg - 100 ng) Plasmid in 40 µl TE-Puffer (pH 7,4) gegeben und nach Zugabe zu den kompetenten Bakterienzellen (50 µl) der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz im Wasserbad 45 s auf 42°C erwärmt und dann 1 min im Eisbad abgekühlt. Nach Zugabe von 450 µl vorgewärmten (37°C) SOC-Medium wurde die Bakteriensuspension 60 min bei 37°C unter Schütteln bei 225 rpm inkubiert und zuletzt auf Selektions-Antibiotika-Agar-Platten (50 $^{\mu g}/_{ml}$ Kanamycin, 100 $^{\mu g}/_{ml}$ Ampicillin bzw. 15 $^{\mu g}/_{ml}$ Chloramphenicol; je nach vorliegendem Resistenzgen im Plasmid) ausplattiert. Die Platten wurden 12 - 16 h bei 37°C inkubiert.

2.15.2 Plasmidisolation

Um die Plasmide nach ihrer Vermehrung aus *E. coli*-Zellen zu isolieren, wurde zunächst eine DNA-Minipräparation unter Verwendung des illustra™ plasmid Prep Mini Spin Kit durchgeführt. Hierfür wurden 8 - 10 Klone der in 2.15.1 ausplatierten Übernachtkulturen in je 5 ml 2xYT-Medium mit entsprechendem selektiven Antibiotika (50 $^{\mu g}/_{ml}$ Kanamycin, 100 $^{\mu g}/_{ml}$ Ampicillin bzw. 15 $^{\mu g}/_{ml}$ Chloramphenicol; je nach vorliegendem Resistenzgen im Plasmid) überführt und bei 37°C 12 - 18 h unter Schütteln kultiviert. Anschließend wurden 1,5 ml der Kultur entnommen und die Zellen sedimentiert. Nach alkalischer Zelllyse wurden die denaturierten Proteine und hochmolekulare DNA durch Zentrifugation sedimentiert. Die Plasmid-DNA wurde an eine Silicamatrix absorbiert und nach Entfernung von verunreinigenden DNA-Fragmenten und Salzen durch Waschschritte mit Waschlösung, in Elutionspuffer eluiert. Die cDNA wurde durch PCR amplifiziert und das PCR-Produkt gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.14.1), um zu überprüfen, ob das klonierte cDNA-Fragment im isolierten Plasmid vorhanden ist. Plasmid-DNA für weitere Experimente wurde unter der Verwendung des QIAfilter™ Plasmid Midi Kit aus ausgewählten Klonen gewonnen. Hierfür wurden zu 25 ml 2xYT-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (50 $^{\mu g}/_{ml}$ Kanamycin, 100 $^{\mu g}/_{ml}$ Ampicillin bzw. 15 $^{\mu g}/_{ml}$ Chloramphenicol; je nach vorliegendem Resistenzgen im Plasmid) 100 µl der Übernachtkultur des ausgewählten Klons gegeben und die Zellen bei 37°C 12 - 18 h unter Schütteln kultiviert. Die Zellen wurden anschließend sedimentiert. Nach alkalischer Zelllyse wurde die Plasmid-DNA von denaturierten Proteinen und hochmolekularer DNA getrennt und, wie oben beschrieben, durch Adsorbtionschromatographie über eine Silicamatrix aufgereinigt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mittels Elutionspuffer. Für die Konzentrierung der Plasmid-DNA wurde eine Isopropanolfällung durchgeführt. Die klonierte cDNA wurde durch Sequenzierung (GATC Biotech AG, Konstanz) verifiziert.

2.15.3 Herstellung adenoviraler Expressionskonstrukte pAdLamp3-GFP und pAdDsRed-Farn/-Mem

Um die Fusionsproteine Lamp3-GFP und DsRed-Farn bzw. DsRed-Mem in ATII Zellen überexprimieren zu können, wurden die entsprechenden adenoviralen Expressions-konstrukte folgendermaßen hergestellt:

pAdDsRed-F und pAdDsRed-Mem. Das attB-PCR-Produkt beider DsRed-Fusions-proteine wurde mit Hilfe der Primer DsRed-Farn-F2/-R2 bzw. DsRed-Mem-F2/-R2 (Sequenzen siehe **Tabelle 10**) aus den Plasmiden pDsRed-Monomer-F bzw. pDsRed-Monomer-Mem mittels PCR erzeugt. Der Eingangsvektor wurde generiert, indem nach Isolation 150 ng der jeweiligen attB-PCR-Produkte und 150 ng des Donorvektors pDONR221 in 8 µl TE-Puffer (pH 8,0) gemischt, zum BP Clonase II enzyme mix

gegeben und der Ansatz 1 h bei 25°C inkubiert wurde. Die Rekombinationsreaktion wurde durch Zugabe von 1 µg Proteinase K und 10-minütige Inkubation bei 37°C beendet. Für die Klonierung des Eingangsvektors wurden 5 µl des BP-Rekombinationsansatz in 40 µl TE-Puffer (pH 7,4) gelöst und zu 50 µl *E. coli* OmniMax^{TM}2-T1^{R} gegeben. Die Plasmidvermehrung und –isolation erfolgte wie in 2.15.1 und 2.15.2 beschrieben. Der Expressionsvektor wurde durch Zugabe von 150 ng des isolierten Eingangsvektors und 150 ng des Zielvektors pAD/CMV/V5-DEST in 8 µl TE-Puffer (pH 8,0) zum LR Clonase II enzyme mix erzeugt. Nach 1 h bei 25°C wurde die Reaktion durch Inkubation des Reaktionsansatzes mit 1 µg Proteinase K bei 37°C für 10 min beendet. Für die Klonierung des Expressionsvektors wurden 5 µl des LR-Rekombinationsansatz in 40 µl TE-Puffer (pH 7,4) gelöst und zu 50 µl *E. coli* OmniMax^{TM}2-T1^{R} gegeben. Anschließend wurde das Plasmid vermehrt und isoliert (siehe 2.15.1 und 2.15.2).

pAdLamp3-GFP. Das attB-PCR-Produkt des Lamp3-GFP wurde unter Verwendung der Primer MCSgfp-F1 und MCSgfp-R1 (Sequenz siehe **Tabelle 10**) aus dem Plasmid pEGFP-N1 mittels PCR unter Erhaltung der Multi cloning site (MCS) und der kodierenden Bereiche des EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) generiert. Der Eingangsvektor wurde durch Zugabe von 150 ng des attB-PCR-Produkts und 150 ng des Donorvektors pDONR221 in 8 µl TE-Puffer (pH 8,0) zum BP Clonase II enzyme mix erzeugt. Der Rekombinationsansatz wurde nach 1 h bei 25°C durch 10-minütige Inkubation mit 1 µg Proteinase K bei 37°C beendet. Für die Klonierung des Eingangsvektors wurden 5 µl des BP-Rekombinationsansatz in 40 µl TE-Puffer (pH 7,4) gelöst und zu 50 µl *E. coli* OmniMax^{TM}2-T1^{R} gegeben und das Plasmid gemäß 2.15.1 und 2.15.2 vermehrt und isoliert. Die *Lamp3-cDNA* wurde vom cDNA-Klon IRBPp993D126D2 mittels PCR unter Verwendung der Primer Lamp3-R3 und Lamp3-F3 (Sequenz siehe **Tabelle 10**) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in den Eingangsvektor eingefügt, indem 10 µg des PCR-Produkts, sowie 10 µg des Eingangsvektors mit den Restriktionsendonukleasen BamHI (10 U) und XhoI (10 U) in jeweils 30 µl Tango-Puffer (2x) gespalten wurden. Der Restriktionsverdau wurde 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zur Generierung eines rekombinanten Vektors je 50 - 400 ng des linearisierten Eingangsvektors und 50 - 400 ng des Lamp3-PCR-Produkts in 5 - 10 µl TE-Puffer (pH 7,8) gemischt und 2 µl Ligationspuffer (10x), sowie 2 µl 50% PEG 4000 Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde mit Nuklease-freiem H_2O auf 20 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 5 U T4 DNA Ligase für 1 h bei 22°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zur Inaktivierung der T4 DNA Ligase 10 min auf 65°C erhitzt. Für die Klonierung des generierten Vektors wurden 5 µl des Ligationsansatzes in 40 µl TE-Puffer (pH 7,4) gelöst. Zur Vermehrung des Vektors wurde der Ansatz zu

50 µl *E. coli* XL1-blue gegeben und der vervielfältigte Vektor isoliert (siehe 2.15.1 und 2.15.2). Zur Erzeugung des Expressionsvektors wurden 150 ng des isolierten rekombinierten Vektors und 150 ng des Zielvektors pAD/CMV/V5-DEST in 8 µl TE-Puffer (pH 8,0) gemischt und zu 2 µl LR Clonase II enzyme mix gegeben. Der Rekombinationsansatz wurde 1 h bei 25°C inkubiert und die Reaktion durch 10-minütige Inkubation mit 1 µg Proteinase K bei 37°C beendet. Für die Klonierung des Expressionsvektors wurden 5 µl des LR-Rekombinationsansatz in 40 µl TE-Puffer (pH 7,4) gelöst und zu 50 µl *E. coli* OmniMax^{TM}2-T1^{R} gegeben und der Vektor gemäß 2.15.1 und 2.15.2 vermehrt und isoliert.

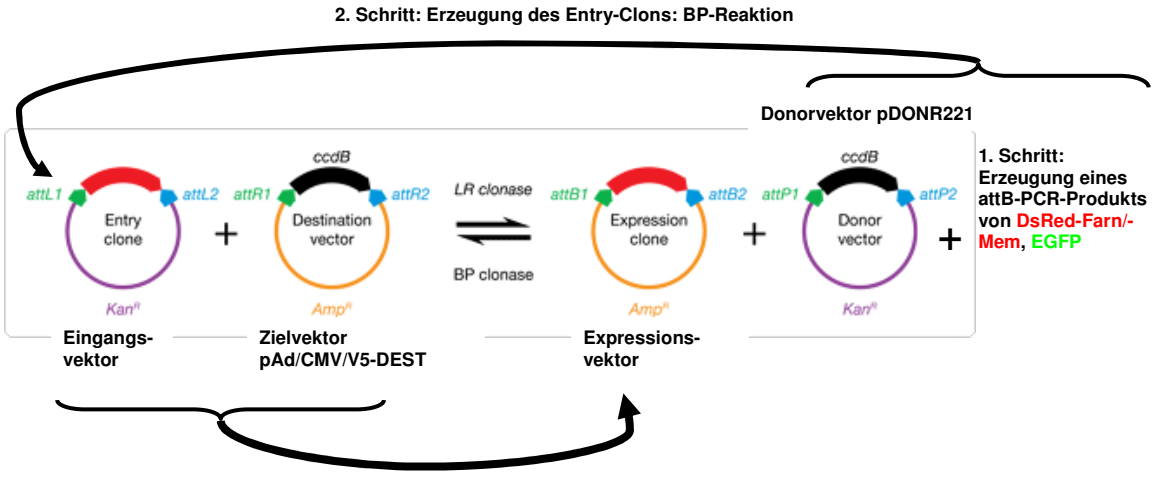


Abbildung 5 Schema der **BP**- und **LR**-Rekombinationsreaktion (modifiziert nach Invitrogen^{TM} Ltd (Paisley, UK)). **1. Schritt:** Erzeugung eines attB-PCR-Produkts (att = attachment site, RCR = Polymerasekettenreaktion) von DsRed-Farn/-Mem und EGFP (enhanced green fluorescent protein). **2. Schritt:** Erzeugung des Eingangsvektors (Entry clone) durch eine **BP**-Reaktion aus dem att**B**-PCR-Produkt und dem Donor-Vektor (att**P**). **3. Schritt:** Erzeugung des Expressionsvektors (Expression clone) durch eine **LR**-Reaktion aus dem generierten Eingangsvektor (att**L**) und dem Zielvektor (Destination vektor, att**R**) pAd/CMV/V5-DEST. Der Expressionsvektor dient zur Einschleusung und Expression der generierten Konstrukte in den Säugetierzellen.

2.15.4 Herstellung rekombinanter Adenoviren

HEK-293A Zelllinie. Die Generierung und Vervielfältigung der infektiösen rekombinanten und replikationsdefizienten Adenoviren erfolgte in der Zelllinie HEK-293A. Diese Zelllinie exprimiert die Gene der adenoviralen E1-Region. Auf diese Weise wird das Genom der replikationsdefizienten Adenoviren komplimentiert (Graham et al., 1977; Harrison et al., 1977).

3 x 10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium (**Tabelle 2**) wurden gemäß Herstellerprotokoll in 10 ml HEK-293A-Medium (**Tabelle 2**) (entspricht einer Zelldichte von etwa 2 - 5 x 10^4 $^{Zellen}/_{cm^2}$) überführt. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (Tissue Culture Flask (25 cm^2), Sarstedt) bei 37°C, 10% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit bis zu einer Zelldichte von

etwa 5 x $10^{5\ Zellen}/_{ml}$ (entspricht einem etwa 80%-igen konfluenten Wachstum) kultiviert und anschließend passagiert. Hierfür wurde das vorhandene HEK-293A-Medium abgesaugt und die Zellen in 5 ml frischem, vorgewärmten (37°C) HEK-293A-Medium resuspendiert. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wurde auf neue Zellkulturflaschen verteilt und mit 9 ml HEK-293A-Medium aufgefüllt. Zur Transfektion wurden 5 x 10^5 HEK-293A-Zellen in 2 ml HEK-293A-Medium pro Well (9,6 cm^2) auf 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und für die Transfektion bis zu einem 90 - 95%-igen konfluenten Wachstum kultiviert. Das HEK-293A.Medium wurde vor Durchführung der Transfektion gegen 1,5 ml Transfektionsmedium (**Tabelle 2**) ersetzt.

Für die Transfektion wurden die rekombinanten adenoviralen Expressionsvektoren pAdDsRed-Farn, pAdDsRed-Mem und pAdLamp3-GFP zur Freilegung der ITRs (inverted terminal repeats) linearisiert. Hierfür wurden 5 µg des jeweiligen Expressionsvektors mit 10 U der Restriktionsendonuklease PacI in 4 µl NE-Puffer mit BSA gelöst. Der Ansatz wurde mit H_20 auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt und bei 37°C 12 - 16 h inkubiert. Die DNA-Konzentration wurde gemäß 2.14.2 bestimmt und in TE-Puffer (pH 8,0) auf eine Endkonzentration von 0,1 - 3,0 $^{\mu g}/_{\mu l}$ verdünnt. Für die Transfektion wurde 1 µg des jeweiligen PacI-verdauten Expressionsplasmids in 250 µl Transfektionsmedium ohne Serum (**Tabelle 2**) gelöst. 3 µl Lipofectamine 2000 wurden zu 250 µl Transfektionslösung ohne Serum gegeben und bei RT 5 min inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze gemischt und auf die HEK-293A-Zellen gegeben. Die transfizierten HEK-293A-Zellen wurden bei 37°C, 10% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. 24 h nach der Transfektion wurde ein Mediumwechsel mit 293A-Medium durchgeführt.

2.16 Virusisolation

Wenn sich nach der Transfektion circa 80% der HEK-293A-Zellen abgelöst hatten, wurden die Zellen suspendiert und sedimentiert. Das Virus wurde aus dem Zellsediment und 15 ml Überstand unter Verwendung des ViraBind™ Adenovirus Purifikation Kit (Cell Biolabs Inc.) isoliert. Hierfür wurden die adenoviralen Partikel aus den Zellen durch mechanische Zelllyse, d. h. durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Erwärmen auf 37°C, freigesetzt und an einen Filter gebunden. Nach mehreren Waschschritten wurden die Viruspartikel mit Elutionspuffer eluiert und durch Zugabe einer 50%-igen Glycerollösung auf eine Glycerolkonzentration von 10% eingestellt.

2.17 Zellisolation und -kultivierung

Die Gewinnung von Lungengewebe aus Ratten zum Zweck experimenteller Studien zur „Regulation der Surfactantfreisetzung aus Typ II Alveolarzellen der Lunge“ wurde vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (beantragt am 21. Juni 2005 durch Prof. Dr. Paul Dietl).

Die ATII Zellen wurden aus männlichen, 180 - 200 g schweren Sprague Dawley Ratten, wie folgt, isoliert (Dobbs et al., 1986; Haller et al., 1998):
Die Narkotisierung der Ratte erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 3 $^{ml}/_{kg\ KG}$ Anästhesielösung (**Tabelle 2**). Nach vollständiger Muskelrelaxation wurden der Thorax und das Abdomen des Tieres eröffnet und zur Antikoagulation 400 $^{IE}/_{kg\ KG}$ Heparin in die Vena Cava injiziert. Anschließend wurden die Lungen durch Tracheotomie mit der Präparationslösung II (**Tabelle 2**) infundiert, aus der Ratte entnommen und zunächst mit 10 ml Präparationslösung I und danach zweimal mit 10 ml Präparationslösung II (**Tabelle 2**) gespült. Zum Verdau des Lungengewebes wurde eine Elastase-Trypsin-Lösung (**Tabelle 2**) infundiert und bei 37°C 15 min inkubiert. Das Lungenparenchym wurde von den Bronchien und der Trachea entfernt, mit 1,5 ml DNAse-haltiger Lösung (**Tabelle 2**) getränkt und in etwa 1 mm^3 große Stücke zerkleinert. Nachdem die Enzymreaktion durch Inkubation (37°C, 2 min) in 5 ml FBS beendet wurde, wurde die Gewebesuspension dreimal durch Verbandsmull- und dreimal durch Nylonnetze (Machenweite: 150 µm, 20 µm und 10 µm) filtriert. Das Filtrat wurde daraufhin mit der Präparationslösung II auf 30 ml aufgefüllt und 8 min bei 130 x g zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 30 ml DMEM resuspendiert und auf IgG-Petrischalen gegeben (Beschichtung mit je 5 ml IgG (500 $^{\mu g}/_{ml}$) und 50 mM Tris; Inkubation 3 h bei RT vor Zugabe der Zellsuspension (**Tabelle 2**) und 15 min bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 inkubiert. Die nicht-adhärenten Zellen wurden suspendiert und durch Zentrifugation (8 min, 130 x g) pelletiert. Die pelletierten Zellen wurden anschließend in Zellmedium (**Tabelle 2**) suspendiert und zuletzt auf Deckgläschen (Richardson Kontrastmikroskopie), Ibidi® Petrischalen (Konfokale Fluoreszenzmikroskopie), 18-Well (Immunhistochemie) oder 24-Well Petrischalen (TEM, REM) mit einer Dichte von 40 Zellen pro mm^3 ausgesät. Die Zellen wurden vor der Durchführung der Experimente entsprechend den verschiedenen Protokollen (s. u.) behandelt und circa 48 h bei 37°C, 5% CO_2, und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.18 Transfektion der ATII Zellen

ATII Zellen wurden unmittelbar nach der Isolation, je nach Versuchsprotokoll, mit 10 - 20 $^{\mu l}/_{ml}$ des aufgereinigten Adenovirus pAdLamp3-GFP und/ oder mit 1 - 5 $^{\mu l}/_{ml}$ des Adenovirus pAdDsRed-Farn bzw. pAdDsRed-Mem transfiziert (diese Werte entsprechen etwa 5 x 10^5 Plaque-bildenden Einheiten). Die aufgereinigten Adenoviren wurden hierfür direkt in das Zellmedium gegeben. Anschließend wurden die transfizierten Zellen bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert und circa 48 h nach der Isolation für die Experimente verwendet. Für die Experimente wurden die transfizierten ATII Zellen zweimal mit Kontrolllösung (**Tabelle 2**) gewaschen. Die Experimente wurden in Kontrolllösung bei Raumtemperatur (21 - 24°C) durchgeführt.

2.19 Membrane mixing

Für die Zeitserien-Experimente wurden die Bilder der unstimulierten Zellen zu Beginn jedes Experiments, sowie nach Stimulation konfokal aufgenommen.

Die Zellen wurden entweder mit Adenosintriphosphat (ATP; angegeben sind die Endkonzentrationen: 100 µM), Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA; 0,1 µM) in Kombination mit Ionomycin (5 µM) oder ATP (100 µM) zusammen mit PMA (0,1 µM) und Ionomycin (5 µM) bzw. mit der Kombination Capsazepin (CPZ; 50 µM) und 2-Aminoethyldiphenylborinat (2-APB; 100 µM) stimuliert. CPZ wurde hierfür 1 min nach Applikation von 2-APB zum Zellmedium gegeben. Die Kontrollzellen wurden in gleicher Weise behandelt, blieben jedoch unstimuliert. Bilder wurden 5 min, 10 min, 20 min und 30 min nach Applikation der genannten Substanzen konfokal aufgenommen.

Um die Wirkung der verschiedenen Endozytosemodulatoren zu testen, wurden die Zellen 20 min bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit mit jeweils einem der folgenden Modulatoren vorinkubiert: Filipin (10 µM), Indomethacin (300 µM), Bafilomycin A1 (0,1 µM), Wortmannin (1 µM), LY294002 (70 µM) bzw. Phenylarsinoxid (PAO; 2 µM). Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen durch Zugabe von ATP (100 µM) zum Zellmedium und Inkubation bei 30 min bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit.

2.19.1 Bildanalyse und Datenevaluation

Die Aufnahmen der Konfokalmikroskopie wurden mit ImageJ (National Institute of Health, USA; http://rsb.info.nih.gov/ij) und/ oder Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems GmbH, München) ausgewertet. Die z-Querschnitte wurden mit Hilfe von MetaMorph (Molecular Devices, Downingtown (USA)) aus den konfokalen Aufnahmen rekonstruiert.

Zur Identifizierung DsRed-positiver LBs in ATII Zellen wurden die Bildstapel beider Fluoreszenzkanäle (DsRed-Mem/-Farn und Lamp3-GFP) mittels MetaMorph kombiniert und anschließend die Gesamtzahl der LBs pro Zelle, sowie DsRed-markierte LBs ausgezählt. Der Anteil DsRed-markierter LBs pro Zelle wurde wie folgt errechnet: $N_{rel} = N_{gesamt} / N_{DsRed}$; wobei N_{rel} den Anteil DsRed-markierter LBs an der Gesamtzahl der LBs einer Zelle, N_{gesamt} die Gesamtzahl der LBs einer Zelle und N_{DsRed} die Anzahl der DsRed-markierten LBs einer Zelle angeben.

Die Bildanalyse zur Auswertung des Membrane mixing (siehe Kapitel 3.1.2 und 3.1.3) wurde mit ImageJ durchgeführt. Die Analyse erfolgte entsprechend Bertrand et al., 2006: Demnach wurden die Aufnahmen zunächst in 8-bit-Graustufen konvertiert. Es wurde manuell ein Messbereich (region of interest; ROI) um den Umriss der zusammen gelagerten LBs definiert. Für jede Aufnahme wurde die Hintergrundintensität als Durchschnittsgrauintensität über einen repräsentativen Bereich individuell bestimmt und anschließend abgezogen. Um Intensitätsgradienten hervorzuheben, wurden die Bilder mittels eines Laplacian-Operators differenziert. Störsignale im neu graduierten Bild wurden mit Hilfe eines 3 x 3 Durchschnittsfilters geglättet. Anschließend wurde durch Anpassung des Schwellenwerts an bedeutende Fluoreszenzpartikel eine binäre Darstellung der Abbildung generiert. Alle Schritte wurden für jeden der beiden Fluoreszenzkanäle separat durchgeführt. Bei der Auswertung wurden als grün fluoreszierende Bereiche der LB-Membranen nur diejenigen Pixel der binären Darstellung des grünen Kanals berücksichtigt, die sich im definierten Messbereich (ROI) befanden. Die Bestimmung derjenigen Bereiche auf der LB-Oberfläche, die mit beiden, d.h. mit roten und grünen Fluoreszenzfusionsproteinen markiert waren, erfolgte nach Kombination der binären Darstellungen beider Fluoreszenzkanäle durch die Boolsche UND-Funktion. Es wurden ebenfalls nur die Pixel innerhalb des definierten Messbereichs (ROI) berücksichtigt. Da sowohl die Anzahl der LBs pro Zelle, als auch deren Größe variiert, wurde die doppelt gefärbte Fluoreszenzfläche der LB-Umrisse auf die grüne Fluoreszenzfläche der LB-Konturen nach folgender Gleichung normalisiert: $RPA = N_{(rot+grün)} / N_{(grün)}$; wobei RPA die relative Pixelfläche (relative pixel area), $N_{(rot+grün)}$ die Pixelanzahl der überlappenden roten und grünen Fluoreszenz und $N_{(grün)}$ die Pixelanzahl der grünen Fluoreszenz angeben.

2.20 Untersuchung fixierter ATII Zellen

Für die Transmissions- (TEM) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden die Zellen nach der Isolation (siehe 2.17) 2 d in 24-Well Petrischalen kultiviert. Zur Stimulation wurden im Abstand von 1 min zunächst 2-APB (100 µM; Angaben als Endkonzentrationen) und danach CPZ (50 µM) ins Zellmedium gegeben. Die Zellen

wurden bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min, 10 min, 20 min bzw. 30 min nach Zugabe von CPZ, wurden die Zellen mit Kontrolllösung (**Tabelle 2**) gespült und anschließend fixiert (s. u.). Um den Effekt von PAO auf die durch 2-APB und CPZ induzierte Vakuolisierung zu testen, wurden die Zellen nach Zugabe von 2 µM PAO ins Zellmedium 20 min bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend 2-APB (100 µM) und CPZ (50 µM) dem Zellmedium zugefügt. Nach 20-minütiger Inkubation bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit wurden die Zellen mit Kontrolllösung gespült und anschließend fixiert (s. u.). Die Kontrollzellen wurden auf dieselbe Art und Weise behandelt, sie blieben jedoch unstimuliert.

2.20.1 Aufbereitung der Proben für die TEM/ Semidünnschnitte

Die Zellen wurden in 2,5% Glutaraldehyd und 1% Sucrose enthaltendem 0,1 M Phosphatpuffer (PBS) fixiert. Zur Kontrastierung wurden die Zellen 1 h mit 2%-igem Osmiumtetroxid (OsO_4) postfixiert. Nach Dehydration mittels aufsteigender Alkoholreihe wurden die Zellen in gesättigter Uranylacetatlösung für 30 min bei 37°C en-bloc gefärbt, in Epon eingebettet und bei 60°C 48 h ausgehärtet.

Die Proben wurden zunächst semidünn (500 nm) geschnitten und mit Toluidinblau gefärbt. Ultradünnschnitte (50 nm) wurden aus repräsentativen Arealen mit Hilfe eines Ultramikrotom (Reichert-Jung/Leica, Bensheim) hergestellt und anschließend auf einen Probenträger (Plano, Wetzlar) aufgebracht. Semidünnschnitte wurden zur Analyse auf Objektträger fixiert und mittels konventioneller Hellfeldmikroskopie untersucht.

Der Vakuolisierungseffekt wurde in repräsentativen Bildern von Semidünnschnitten durch Auszählung der Anzahl der Vakuolen pro Zelle mit Hilfe von ImageJ ausgewertet.

2.20.2 Aufbereitung der Proben für die REM/ Bildanalyse und Datenevaluation

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden die Zellen mit 2,5% Glutaraldehyd und 1% Sucrose enthaltendem 0,1 M Phosphatpuffer (PBS) fixiert und mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydriert. Anschließend wurden die Proben nach dem „Kritisch-Punkt-Verfahren“ getrocknet (CPD 030) und in einem BAF 300-Apparat rotierend mit einem 3 nm dickem Platin-Überzug versehen.

Die Bildanalyse wurde mit ImageJ durchgeführt. Die Aufnahmen wurden in 8-bit-Graustufen konvertiert und binarisiert. Es wurde die durchschnittliche Pixelanzahl pro Microvilli bestimmt. Die Anzahl der Microvilli wurde mit Hilfe eines Intensitätsintegrals nach folgender Formel berechnet: $\sum_{i=0}^{i=255}(i \cdot N_i)$; (i = Graustufen und N_i = Pixelanzahl).

2.21 Immunhistochemie

Der Nachweis von DsRed-Farn-markierten Plasmamembrananteilen in endosomalen Zellkompartimenten erfolgte in immunhistochemischen Experimenten. Die DsRed-Farn-überexprimierenden Zellen wurden nach Zugabe von 0,1 µM Wortmannin ins Zellmedium bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit 30 min inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde anschließend nach Zugabe von ATP (100 µM) ins Zellmedium für weitere 30 min bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Kontrollzellen wurden auf dieselbe Weise behandelt, sie blieben jedoch unstimuliert. Die Anfärbung erfolgte laut Protokoll (**Tabelle 20**). Als Primärantikörper wurde das Anti-Early Endosomal Antigen 1 und als Sekundärantikörper das Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (siehe **Tabelle 14**) verwendet.

Die gefärbten Zellen wurden mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Aufnahmen wurden mit ImageJ und/ oder Adobe Photoshop CS2 bearbeitet.

Tabelle 20 Immunhistochemie-Protokoll. (FBS = Fetal calw serum, PBS = Phosphat-gepufferte Salzlösung, PFA = Paraformaldehyd, RT = Raumtemperatur)

Schritt	Lösung	Inkubation
1. Vor Fixierung: a) Absaugen des Mediums b) Waschen	Medium ohne FBS	1 min, RT
2. Fixierung	4% PFA in PBS	4 min, RT
3. Waschen	PBS	a) spülen b) spülen & 5 min inkubieren, RT c) spülen & 10 min inkubieren, RT
Permeabilisierung	a) SLO-Puffer b) SLO-Puffer c) SLO + 1 mM DTT d) SLO + 1mM DTT + Streptolysin (1 $^{U}/_{ml}$)	a) spülen b) spülen & 5 min inkubieren, RT c) spülen & 10 min inkubieren, RT d) spülen & 30 min inkubieren, 37°C
Waschen	Siehe 3.	Siehe 3.
Absättigung unspezifischer Bindungen (Blockierung)	PBS + 7% FBS	1 h, RT
Waschen	Siehe 3.	Siehe 3.
Primärantikörper	Antikörper verdünnt in PBS	2 h, RT
Waschen	Siehe 3.	Siehe 3.
Sekundärantikörper, fluoreszenzgekoppelt	Antikörper verdünnt in PBS	1 h, RT

Waschen	Siehe 3.	Siehe 3.
Waschen	PBS	12 h, 4°C
Spülen	PBS	Vor Benutzung der Proben am Mikroskop

2.22 Richardson Kontrastmikroskopie

Die Richardson Kontrastmikroskopie ermöglicht die Darstellung der limitierenden Membran von LBs in ATII Zellen, sowie die Detektion von Fusionen der LBs mit der Plasmamembran (Miklavc et al., 2009b): Bei der Fusion kommt es zur Abnahme der Intensität an gestreutem Licht, dem sog. SLID-Phänomen (scattered light intensity decrease). Um das SLID-Phänomen besser sichtbar zu machen, wurde für die Dunkelfeldbeleuchtung ein roter bzw. blauer Farbfilter in den Kondensor eingesetzt. Um Fusionsereignisse zu detektieren, wurden vom Dunkelfeld- (rot bzw. blau) und vom Fluoreszenzkanal (Lamp3-GFP = grün; DsRed-Farn = rot) über einen Beobachtungszeitraum von 40 min im Abstand von 6 s Aufnahmen gemacht.

Die Aufnahmen am Richardson Kontrastmikroskop wurden mit Hilfe der Velocity Software (Improvision Deutschland, Tübingen) analysiert. Für die Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen wurde ein rechteckiger Messbereich (region of interest; ROI) um den fusionierten LB definiert, in dem die Lichtintensität der Fluoreszenz von DsRed-Farn bzw. Lamp3-GFP und des Dunkelfelds gemessen wurde. Bei den Dunkelfeld- und Fluoreszenzmessungen wurde das Hintergrundsignal von allen Werten subtrahiert und die Lichtintensitätsänderung in % angegeben.

2.23 Statistische Analyse

Wenn nicht anders erwähnt, sind alle Ergebnisse als Mittelwerte ± Standardfehler (Standard Error of the Mean, SEM) angegeben. Um die experimentellen Gruppen auf Verschiedenheit zu überprüfen, wurden zweiseitige ungepaarte studentische T-Tests angewandt. Werte von $p < 0,05$ wurden als signifikant bewertet.

Zur Zusammenfassung und Gruppierung der Daten und grundlegenden statistischen Analyse wurde Excel 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) bzw. SigmaPlot 10.0 (Systat Software GmbH, Erkrath) verwendet.

3 Ergebnisse

Sowohl die Exozytose als auch die Endozytose sind wesentliche Mechanismen des Surfactantmetabolismus und im Rahmen des Membrangleichgewichts einer sekretorischen Zelle, wie der ATII Zelle, unweigerlich miteinander gekoppelt. Gleichzeitig stellen beide Mechanismen die Möglichkeit zum Austausch von Membranbestandteilen zwischen der limitierenden Membran der LBs und der Plasmamembran in ATII Zellen dar. Dabei sind die LBs einerseits als sekretorische Vesikel während der Exozytose und andererseits als lysosomale Organellen bei der Endozytose von Recyclingprodukten des Surfactants involviert. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses „Membrane mixing", d.h. Austauschprozesse zwischen den Membrankompartimenten während beider Vorgänge untersucht und die zu Grunde liegenden Mechanismen aufgeklärt.

Die folgenden dargelegten Ergebnisse wurden in Albrecht et al., 2010, Usmani et al., 2010 und Miklavc et al., 2009a publiziert.

3.1 Membrane mixing während der Endozytose

3.1.1 Heterologe Überexpression von Lamp3-GFP und DsRed-Farn

ATII Zellen, die Lamp3-GFP und DsRed-Farn exprimierten, wurden in Zeitserien-experimenten mit Hilfe der konfokalen Laserscanning Mikroskopie (LSM) untersucht.
Das Fusionsprotein Lamp3-GFP ließ sich aufgrund seiner grünen Fluoreszenz, die Fluoreszenzproteine DsRed-Farn und DsRed-Mem aufgrund ihrer roten Fluoreszenz in den lebenden ATII Zellen beobachten. DsRed-Farn bzw. DsRed-Mem akkumulierte in der Plasmamembran der ATII Zellen. Lamp3-GFP lokalisierte gleichmäßig auf der Oberfläche der LBs verteilt. Damit war es möglich, beide Membrankompartimente in lebenden Zellen zu unterscheiden (**Abbildung 6 A – D).**
Es konnte somit gezeigt werden, dass DsRed-Mem bzw. DsRed-Farn entsprechend seinem postulierten Insertionsmechanismus tatsächlich ein kraftvoller Marker der Plasmamembran in ATII Zellen ist, während Lamp3-GFP selektiv die LBs markiert (siehe auch Diskussion 4.1). Einige LBs zeigten allerdings beide Fluoreszenzsignale (**Abbildung 6 A, Pfeilspitzen + Abbildung 6 D**). Dabei verteilte sich die grüne Fluoreszenz gleichmäßig über die Oberfläche der LBs. Die rote Fluoreszenz akkumulierte hingegen in begrenzten Bereichen der LB-Oberfläche.

Für die Insertion des DsRed-Mem bzw. des DsRed-Farn in die limitierende LB-Membran kommen prinzipiell zwei Möglichkeiten in Betracht: Zum einen ist eine nicht-selektive Insertion denkbar. Es könnte hierbei zu einer Expression der beiden Plasmamembranmarker auch in der LB-Membran gekommen sein. Zum anderen könnte DsRed-Mem bzw. DsRed-Farn durch Membrane trafficking von der Plasmamembran zur limitierenden LB-Membran transportiert worden sein.

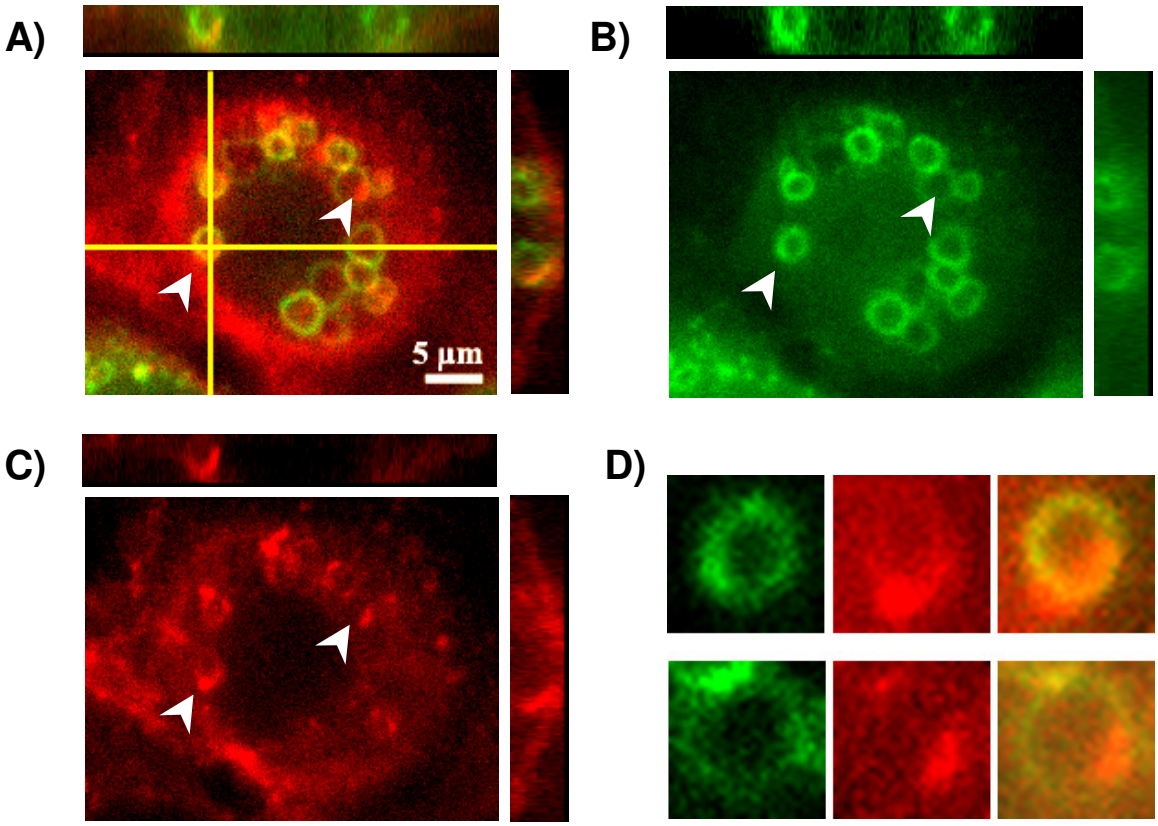


Abbildung 6 DsRed-Farn- und Lamp3-GFP-überexprimierende alveolare Typ II (ATII) Zelle (DsRed-Farn = Plasmamembranmarker; Lamp3-GFP = Fusionsprotein des Lysosom-assoziierten Membranglykoprotein 3 mit dem grün fluoreszierenden Protein). **A)** Rot-Grün-Blau-Bild einer repräsentativen ATII Zelle, die Lamp3-GFP (grüne Fluoreszenz) und DsRed-Farn (rote Fluoreszenz) überexprimiert. DsRed lokalisiert vorwiegend in der Plasmamembran, wohingegen Lamp3-GFP in der limitierenden Membran der Lamellärkörperchen (LBs) akkumuliert. Pfeilspitzen markieren LBs, die sowohl Lamp3-GFP als auch DsRed-Farn auf ihrer Oberfläche aufweisen. Die Querschnitte entlang der gelben Linien sind am oberen bzw. rechten Rand des Bildes gezeigt. **B)** Grüner Fluoreszenzkanal mit Lamp3-GFP. **C)** Roter Fluoreszenzkanal mit DsRed-Farn. **D)** Vergrößerung der in Abbildung **A – C)** durch Pfeilspitzen markierten LBs, die sowohl DsRed-Farn als auch Lamp3-GFP auf ihrer Oberfläche aufweisen. DsRed-Farn lokalisiert in diskreten Bereichen auf der LB-Oberfläche.

3.1.2 Sekretionsstimulierende, sowie endozytosestimulierende Substanzen erhöhen den Anteil der zusätzlich mit DsRed markierten LBs

Um zu überprüfen, ob die Akkumulation des DsRed-Mem bzw. -Farn in der Membran der LBs durch regulierte Internalisierung des rot fluoreszierenden Proteins vermittelt wird, wurden zunächst ungepaarte Experimente durchgeführt.

In diesen Experimenten wurden ATII Zellen, die Lamp3-GFP und einen der Plasmamembranmarker DsRed-Mem oder DsRed-Farn überexprimierten, mit den sekretionsstimulierenden Substanzen ATP (100 µM) oder PMA (0,1 µM) + Ionomycin (5 µM) behandelt. Zur Quantifizierung wurden nach 30-minütiger Behandlung die Gesamtzahl der LBs, sowie die Anzahl der DsRed-Mem- bzw. DsRed-Farn-positiven LBs einer ATII Zellen ausgezählt.
In Kontrollzellen betrug der Anteil der DsRed-Mem-positiven LBs nach 30 min 0,23 ± 0,03; N = 27 (Mittelwert ± SEM, N = Anzahl der Zellen). Für DsRed-Farn-überexprimierende Kontrollzellen betrug der Anteil 0,245 ± 0,04; N = 22. Transfizierte ATII Zellen, die 30 min mit ATP bzw. mit PMA + Ionomycin behandelt wurden, wiesen einen signifikant höheren Anteil an DsRed-Mem- bzw. -Farn-positiven LB im Vergleich zu den Kontrollzellen auf (**Abbildung 7**) (ATP-Stimulation: 0,58 ± 0,08; N = 9 (DsRed-Mem) bzw. 0,54 ± 0,04; N = 35 (DsRed-Farn); Stimulation mit PMA + Ionomycin: 0,77 ± 0,05; N = 17 (DsRed-Mem) bzw. 0,63 ± 0,07; N = 6 (DsRed-Farn)).

Es konnte somit gezeigt werden, dass durch die Behandlung von ATII Zellen mit sekretionsstimulierenden Substanzen der Anteil an DsRed-positiven LBs zunimmt. Zudem konnte ein vergleichbarer Anteil DsRed-positiver LBs in DsRed-Mem- und DsRed-Farn-überexprimierenden ATII Zellen unter gleichen Bedingungen detektiert werden (**Abbildung 7**). Die beobachtete Akkumulation des DsRed auf der LB-Oberfläche findet somit unabhängig vom verwendeten Konstrukt in vergleichbarem Ausmaß statt. In den folgenden Experimenten wurde aus diesem Grund die Verwendung des DsRed-Farn als spezifischer Marker für das innere Blatt der Plasmamembran in den weiteren Versuchen dem weniger spezifischen DsRed-Mem vorgezogen.

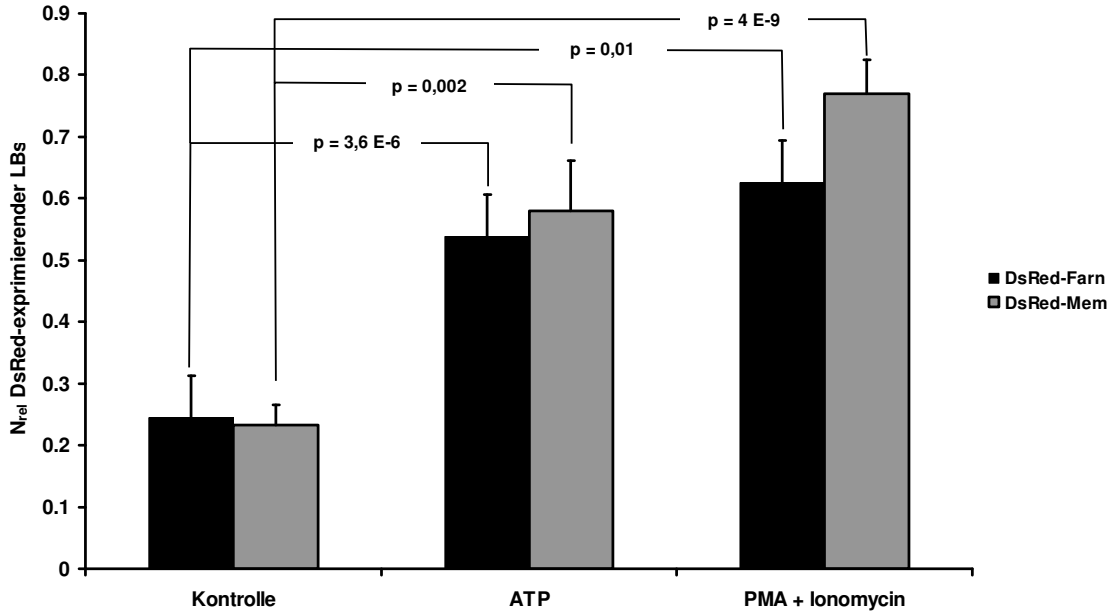


Abbildung 7 Anteil der DsRed-Farn-/DsRed-Mem-exprimierenden Lamellärkörperchen (LBs) an LB-Gesamtzahl von alveolaren Typ II (ATII) Zellen (DsRed-Farn/-Mem = jeweils verwendeter Plasmamembranmarker; Lamp3-GFP = Fusionsprotein des Lysosom-assoziierten Membranglykoprotein 3 mit dem grün fluoreszierenden Protein). In DsRed-Farn- bzw. -Mem- und Lamp3-GFP-überexprimierenden ATII Zellen wurde unter Kontrollbedingungen, nach 30-minütiger Stimulation mit Adenosintriphosphat (ATP), sowie nach 30-minütiger Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) + Ionomycin die Anzahl der DsRed-exprimierenden LBs gezählt. Anschließend wurde die Anzahl der doppelt gefärbten, DsRed-exprimierenden LBs durch die Gesamtanzahl der LBs der Zelle geteilt um die relative Anzahl der DsRed-exprimierenden LBs (N_{rel} DsRed-exprimierender LBs) zu erhalten. Statistisches Signifikanzniveau ist im Vergleich zu den Kontrollzellen angegeben.

Um die Akkumulation des DsRed-Farn in der Membran der LBs weiter zu untersuchen, wurden Zeitserien-Experimente durchgeführt. ATII Zellen, die beide Fluoreszenzfusionsproteine (Lamp3-GFP und DsRed-Farn) überexprimierten, wurden mit den sekretionsstimulierenden Substanzen ATP (100 µM), PMA (0,1 µM) + Ionomycin (5 µM) oder ATP (100 µM) + PMA (0,1 µM) + Ionomycin (5µM) bzw. mit Capsazepin (CPZ; 50 µM) + 2-Aminoethyldiphenylborinat (2-APB; 100 µM) behandelt. CPZ + 2-APB induziert in ATII Zellen eine verstärkte Ca^{2+}-vermittelte clathrinabhängige Endozytose (Usmani et al., 2010).

Der Anteil der DsRed-Farn-positiven Bereiche auf der LB-Oberfläche wurde als relative Pixelfläche (relative pixel area (RPA)) quantifiziert. Die RPA betrug in Kontrollzellen 0,10 ± 0,02; N = 9 (**Abbildung 8 A; Abbildung 9 A**). Nach 30-minütiger Untersuchung der Kontrollzellen kam es zu keiner signifikanten Änderung der RPA (0,11 ± 0,02; N = 9). Sobald die ATII Zellen mit sekretionsstimulierenden Substanzen bzw. mit CPZ + 2-APB inkubiert wurden, stieg die RPA im Zeitverlauf an (**Abbildung 8 B + C**; **Abbildung 9 B - E**). Im Vergleich der stimulierten Zellpopulationen untereinander bzw. zu den Kontrollzellen zeigten die einzelnen Zellpopulationen zum Zeitpunkt 0 (vor der Applikation von sekretionsstimulierenden Substanzen) keinen statistisch signifikanten Unterschied ihrer RPA. Nach 30-minütiger Behandlung mit den verschiedenen sekretionsstimulierenden

Substanzen konnte eine signifikant erhöhte RPA in den stimulierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen beobachtet werden (in **Abbildung 9** gekennzeichnet).

Es konnte somit gezeigt werden, dass durch Behandlung der ATII Zellen sowohl mit sekretionsstimulierenden Substanzen als auch mit den endozytosestimulierende Substanzen CPZ + 2-APB der Anteil von DsRed-Farn auf der LB-Oberfläche zunimmt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der DsRed-Farn-Akkumulation auf der LB-Oberfläche ein endozytotischer Prozess zugrunde liegt, dessen Mechanismus und intrazellulärer Weg in den folgenden Experimenten geprüft wurde.

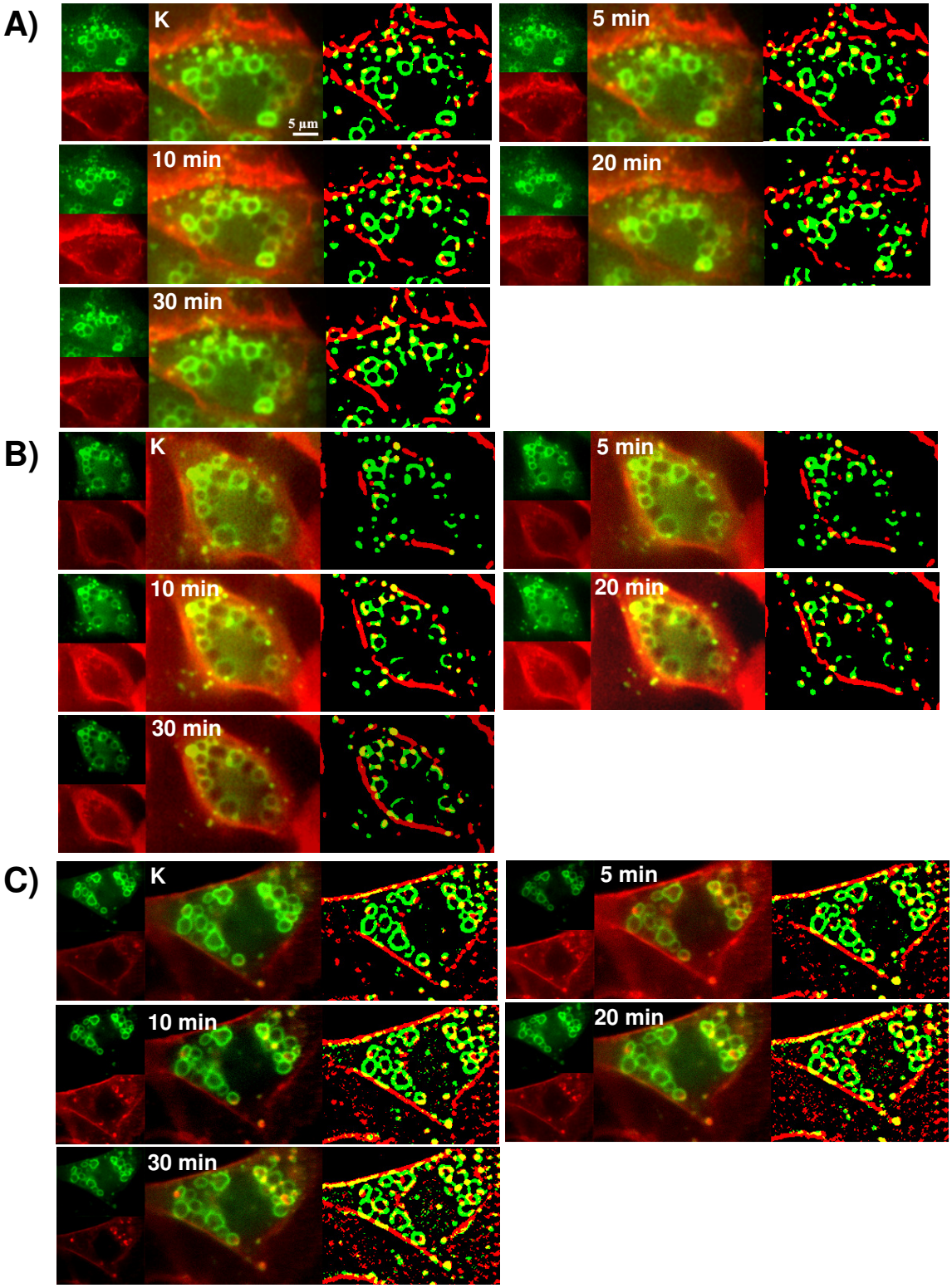


Abbildung 8 Repräsentative Zeitserien-Experimente einzelner DsRed-Farn- und Lamp3-GFP-überexprimierender alveolarer Typ (ATII) Zellen (DsRed-Farn = Plasmamembranmarker; Lamp3-GFP = Fusionsprotein des Lysosom-assoziierten Membranglykoprotein 3 mit dem grün fluoreszierenden Protein). Zu jedem Zeitpunkt sind das Rot-Grün-Blau-Bild beider Fluoreszenzkanäle (große Abbildung), die einzelnen Fluoreszenzkanäle (kleine Abbildungen; grün = Lamp3-GFP, rot = DsRed-Farn), sowie die binäre Abbildung (rechts) gezeigt. In den binären Abbildungen sind die Bereiche, die DsRed-Farn und Lamp3-GFP aufweisen, gelb dargestellt. **A)** Kontrollzellen **B)** Adenosintriphosphat (ATP)-stimulierte Zellen **C)** Capsazepin (CPZ) + 2-Aminoethyldiphenylborinat (2-APB)-stimulierte ATII Zellen; (K = ATII Zellen in Kontrolllösung zu Beginn des Experiments; Zeitpunkte = Zeit nach Zugabe von A) zusätzlicher Kontrolllösung, B) ATP und C) CPZ + 2-APB in die extrazelluläre Lösung).

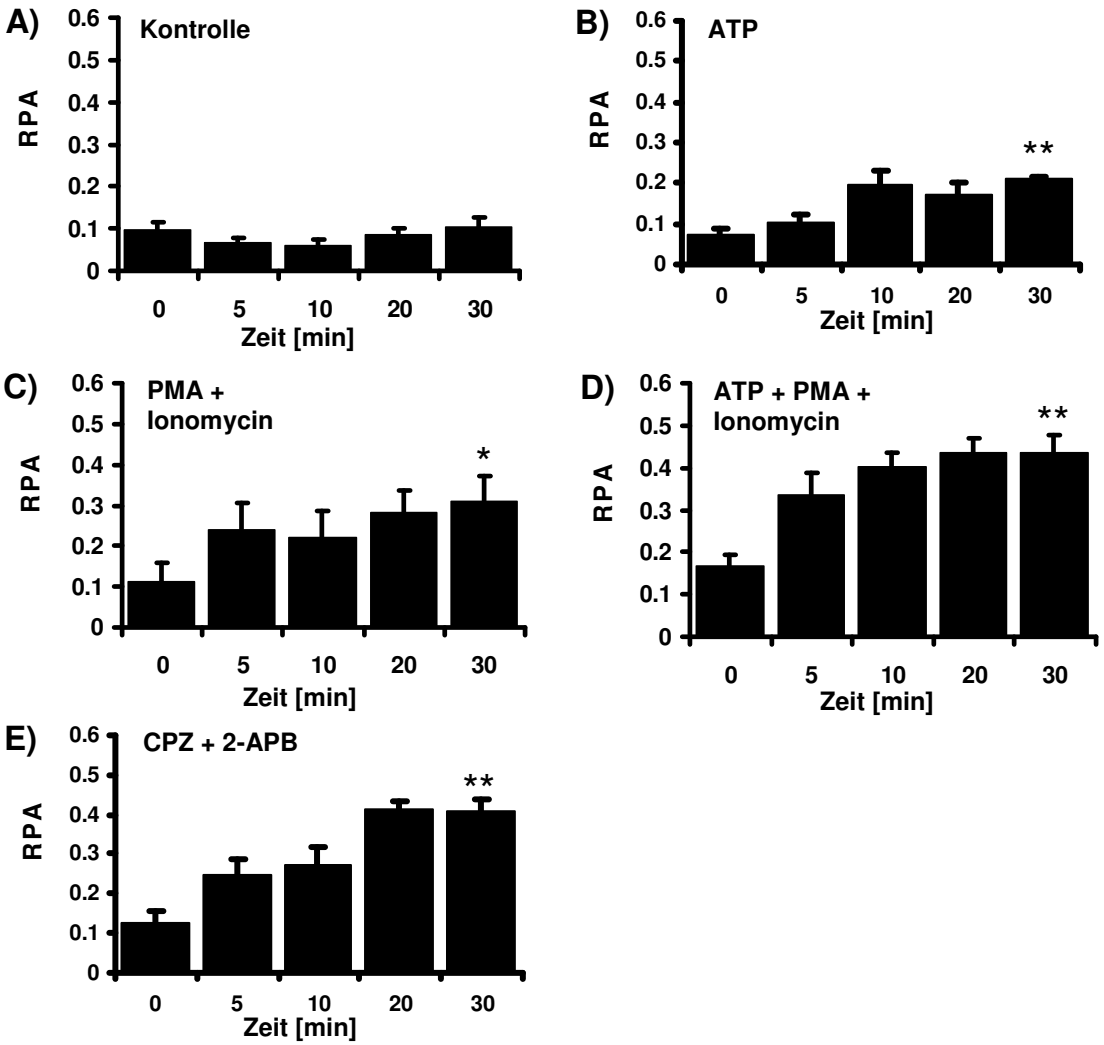


Abbildung 9 Relative Pixelfläche (RPA, relative pixel area) versus Zeit. Die RPA wurde wie in 2.19.1 beschrieben, gemessen. **A)** Kontrollzellen **B)** Adenosintriphosphat (ATP)-stimulierte alveolare Typ II (ATII) Zellen **C)** Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) + Ionomycin-stimulierte ATII Zellen **D)** ATP + PMA + Ionomycin-stimulierte ATII Zellen **E)** Capsazepin (CPZ) + 2-Aminoethyldiphenylborinat (2-APB)-stimulierte ATII Zellen. Signifikanzniveau im Vergleich zum 0 min-Wert der jeweiligen Zellen: *: p = 0,05-0,001; **: p < 0,001.

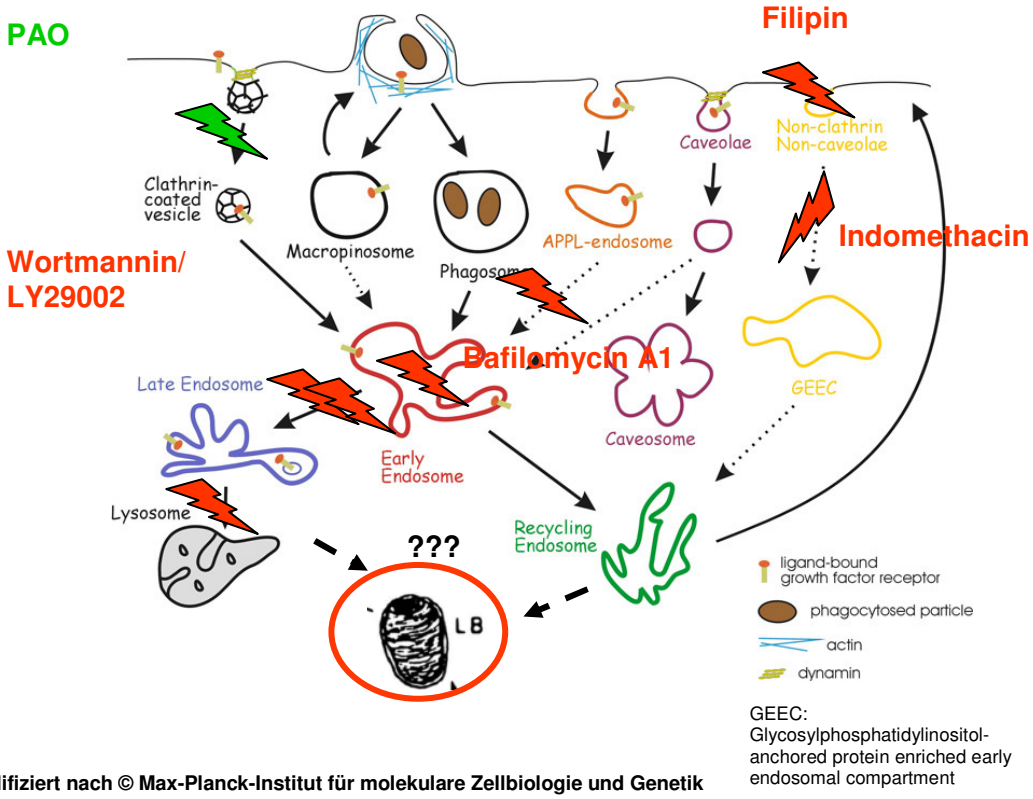
Tabelle 21 Werte-Tabelle zu den Abbildungen **Abbildung 9 A – E**. Angegeben sind RPA (Relative Pixelfläche) ± Standardfehler (Standard Error of the Mean, SEM) (2-APB = 2-Aminoethyldiphenylborinat; ATP = Adenosintriphosphat; CPZ = Capsazepin; PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat; N = Anzahl der ausgewerteten Zellen)

Zeit [min]	A) Kontrolle (N = 9)	B) ATP (N = 9)	C) Ionomycin + PMA (N = 6)	D) ATP + Ionomycin + PMA (N = 7)	E) CPZ + 2-APB (N = 7)
0	0,098 ± 0,018	0,072 ± 0,018	0,110 ± 0,048	0,167 ± 0,025	0,125 ± 0,031
5	0,066 ± 0,013	0,101 ± 0,022	0,240 ± 0,068	0,334 ± 0,055	0,246 ± 0,041
10	0,060 ± 0,012	0,02 ± 0,035	0,222 ± 0,063	0,401 ± 0,037	0,274 ± 0,046
20	0,085 ± 0,014	0,173 ± 0,029	0,283 ± 0,056	0,435 ± 0,034	0,415 ± 0,018
30	0,105 ± 0,023	0,209 ± 0,001	0,310 ± 0,061	0,434 ± 0,042	0,409 ± 0,028

3.1.3 Endozytotische Aufnahme und intrazellulärer Transport von DsRed-Farn

Ein möglicher Mechanismus der DsRed-Farn-Akkumulation auf der LB-Oberfläche ist die Endozytose. Um dies zu überprüfen, wurden ATII Zellen mit Substanzen stimuliert, die entweder die Endozytose oder den darauf folgenden intrazellulären vesikulären Transport inhibieren. Anschließend wurden die Zellen mit ATP stimuliert und die Anreicherung von DsRed-Farn auf der LB-Oberfläche als RPA quantifiziert.

Falls der getestete Modulator mit dem Endozytoseweg des DsRed-Farn interferiert, sollte dies zu einer verringerten DsRed-Farn-Akkumulation auf der LB-Oberfläche im Vergleich zur alleinigen ATP-Stimulation führen (Schema siehe **Abbildung 10**).



Modifiziert nach © Max-Planck-Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik

Abbildung 10 Übersicht über die Endozytosewege der Zelle und die verwendeten Endozytosemodulatoren. In **Rot (Filipin, Indomethacin, Bafilomycin A1, Wortmannin, LY294002)** sind diejenigen Modulatoren dargestellt, welche die DsRed-Aufnahme in die LBs bei gleichzeitiger ATP-Stimulation verhinderten. **Grüne (Phenylarsinoxid (PAO))** Modulatoren zeigten keinen inhibierenden Effekt. LB = Lamellärkörperchen

In Kontrollzellen betrug die RPA 0,16 ± 0,008; N = 73 und in Zellen, die mit ATP (100 µM) stimuliert wurden 0,31 ± 0,003; N = 69 (**Abbildung 11** + **Abbildung 12**). In Zellen, die in Gegenwart von 2 µM Phenylarsinoxid (PAO), einem Inhibitor der clathrinabhängigen Endozytose, mit ATP behandelt wurden, ergab die RPA 0,34 ±0,01; N = 54. Im Gegensatz hierzu, konnten Filipin (10 µM) und Indomethacin (100 µM), beides Blocker der clathrinunabhängigen Endozytose, die ATP-induzierte Aufnahme des DsRed-Farn in die LBs nahezu vollständig aufheben (RPA bei Filipin: 0,13 ± 0,05; N = 24 und RPA für Indomethacin: 0,16 ± 0,03; N = 18) (**Abbildung 11** + **Abbildung 12**).

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Aufnahme von DsRed-Farn nach ATP-Stimulation clathrinunabhängig erfolgt. Ein clathrinabhängiger Endozytoseweg kann somit ausgeschlossen werden.

Komponenten, die den intrazellulären Transport beeinflussen, zeigten ebenfalls einen inhibierenden Effekt auf die DsRed-Farn-Aufnahme in die limitierende LB-Membran (**Abbildung 11** + **Abbildung 12**). Die Inkubation der ATII Zellen mit Bafilomycin A1 (0,1µM), einem Inhibitor der vakuolären H^+-ATPase, konnte die ATP-induzierte Aufnahme des DsRed-Farn verhindern (RPA: 0,12 ± 0,01; N = 20). Auch Wortmannin (1 µM) und LY294002 (70 µM), beides Inhibitoren der Typ III Phosphatidylinositol-3-kinase, blockierten die DsRed-Farn-Translokation auf die LB-Oberfläche (RPA für Wortmannin: 0,16 ± 0,016; N = 35 und RPA für LY294002: 0,17 ± 0,017; N = 42). Demzufolge ist die Translokation des DsRed-Farn von der Plasmamembran zu den LBs von vesikulären Transportprozessen abhängig.

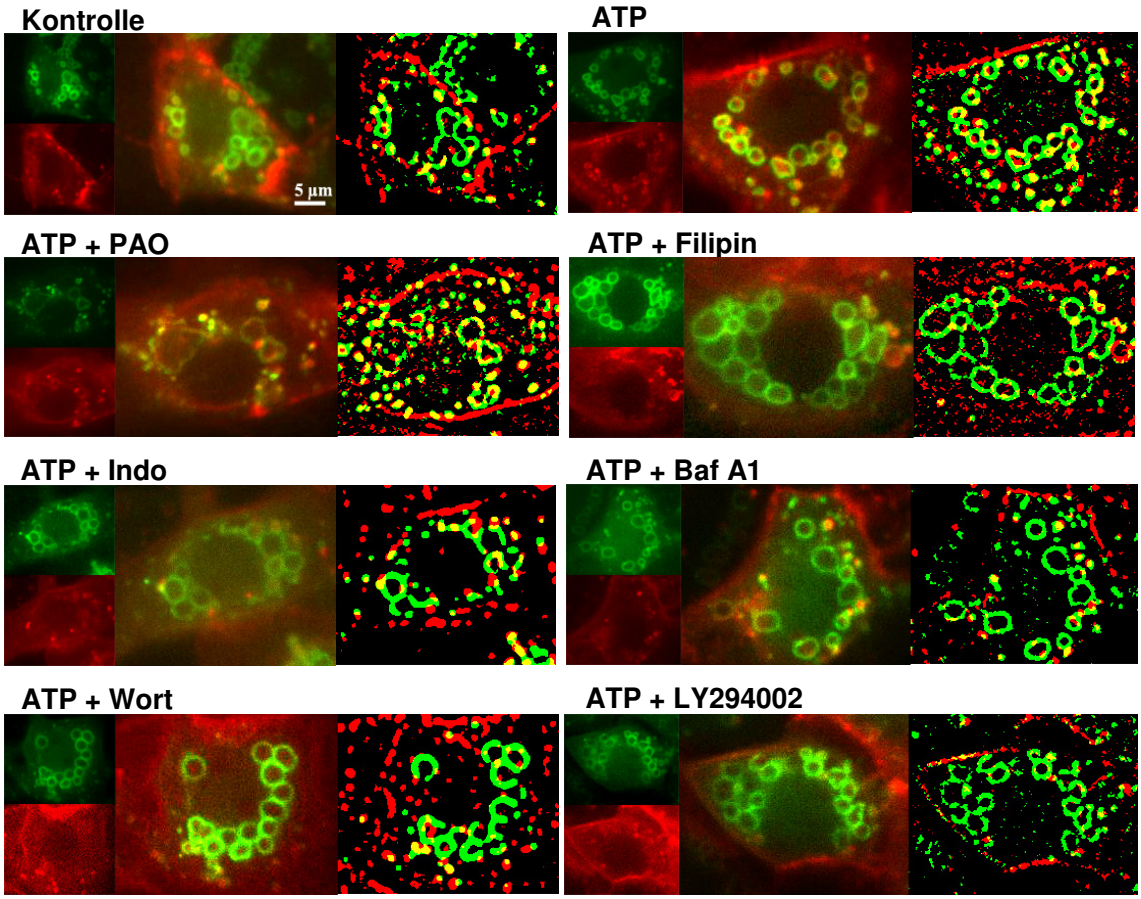


Abbildung 11 Effekt der Endozytosemodulatoren auf die Adenosintriphosphat (ATP)-induzierte DsRed-Farn-Aufnahme (DsRed-Farn = Plasmamembranmarker; Lamp3-GFP = Fusionsprotein des Lysosom-assoziierten Membranglykoprotein 3 mit dem grün fluoreszierenden Protein). Gezeigt sind repräsentative Experimente einzelner DsRed-Farn- und Lamp3-GFP-überexprimierender alveolarer Typ II (ATII) Zellen: Rot-Grün-Blau-Bild beider Fluoreszenzkanäle (große Abbildung), einzelne Fluoreszenzkanäle (kleine Abbildungen; grün = Lamp3-GFP, rot = DsRed-Farn) und binäre Abbildung (rechts). In den binären Abbildungen sind diejenigen Bereiche, die DsRed-Farn und Lamp3-GFP aufweisen, gelb dargestellt. (Kontrolle = nicht stimulierte Kontrollzellen; ATP = Zellen nach 30-minütiger ATP-Stimulation; ATP + „Substanz“: Zellen, die vor ATP-Stimulation mit genannter Substanz inkubiert wurden (PAO = Phenylarsinoxid, Filipin, Indo = Indomethacin, Baf A1 = Bafilomycin A1, Wort = Wortmannin, LY294002).

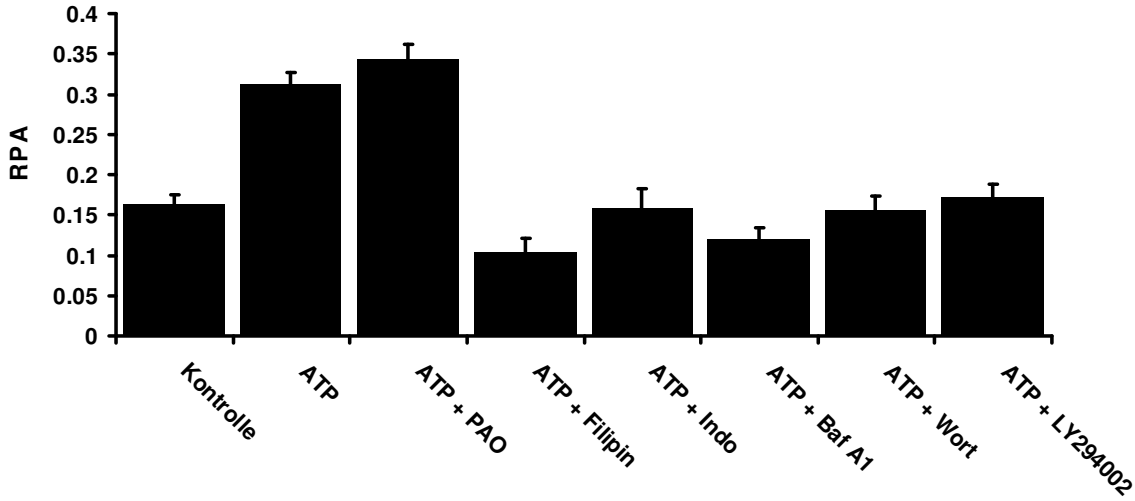


Abbildung 12 Relative Pixelflächenanalyse der **Abbildung 11**. Die relative Pixelfläche (RPA) wurde wie in 2.19.1 beschrieben, gemessen. (Kontrolle = nicht stimulierte Kontrollzellen; ATP = Zellen nach 30-minütiger Adenosintriphosphat (ATP)-Stimulation; ATP + „Substanz": Zellen, die vor ATP-Stimulation mit genannter Substanz inkubiert wurden (PAO = Phenylarsinoxid, Filipin, Indo = Indomethacin, Baf A1 = Bafilomycin A1, Wort = Wortmannin, LY294002).

3.1.4 Aufnahme von DsRed-Farn in endosomale Kompartimente

ATII Zellen wurden immunhistochemisch angefärbt und mit dem konfokalen LSM analysiert um den Verbleib des internalisierten DsRed-Farn aufzuklären. In DsRed-Farn-überexprimierenden ATII Zellen wurden endosomale Kompartimente mit einem Antikörper gegen das early endosomal associated protein 1 (EEA1) (Mu et al., 1995) markiert. In nicht stimulierten ATII Zellen war EEA1 ungleichmäßig im Zytoplasma verteilt (**Abbildung 13 A**). Nach 30-minütiger ATP-Stimulation (100 µM) nahm die Anzahl EEA1-positiver vesikulärer Strukturen zu (**Abbildung 13 B**). ATP führte zur Translokation von DsRed-Farn in die EEA1-positiven Granula (**Abbildung 13 B, Pfeilspitzen**), was in Kontrollzellen nicht zu beobachten war. Die ATP-induzierte DsRed-Farn-Lokalisation in EEA1-positiven Granula wurde durch die Vorbehandlung der Zellen mit Wortmannin deutlich reduziert (**Abbildung 13 D).**

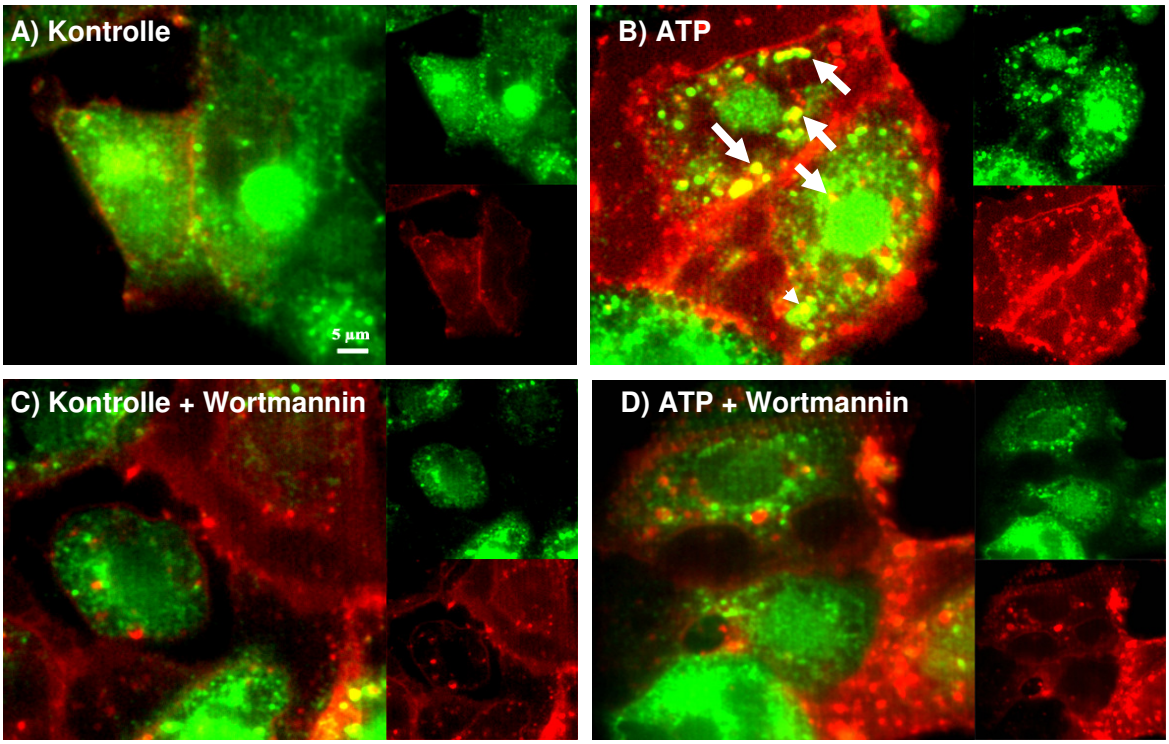


Abbildung 13 Immunhistochemie gegen EEA1 (early endosomal associated protein 1) in DsRed-Farn exprimierenden alveolaren Typ II (ATII) Zellen (DsRed-Farn = Plasmamembranmarker). Die grüne Fluoreszenz zeigt die Verteilung des EEA1, die rote Fluoreszenz entspricht dem DsRed-Farn. **A)** unstimulierten Kontrollzellen **B)** ATII Zellen nach 30-minütiger Adenosintriphosphat (ATP)-Stimulation **C)** Wortmannin-vorbehandelte unstimulierte ATII Zellen **D)** Wortmannin-vorbehandelte ATII Zellen nach 30-minütiger ATP-Stimulation.

3.1.5 Ultrastrukturelle (TEM) Veränderungen der ATII Zellen während der CPZ + 2-APB-Stimulation

Fixierte unstimulierte und CPZ + 2-APB-stimulierte ATII Zellen wurden mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskops (TEM) ultrastrukturell analysiert. In den dafür angefertigten Ultradünnschnitten von fixierten Kontrollzellen wiesen die ATII Zellen große Organellen mit z. T. zwiebelschalenartig organisiertem Material im Lumen auf (**Abbildung 14 A**). Diese Organellen entsprechen den surfactantspeichernden LBs. ATII Zellen, die 20 min mit CPZ + 2-APB stimuliert wurden, zeigten zusätzlich zu den größeren LBs kleinere Vakuolen (**Abbildung 14 B, Pfeile**). Außerdem konnten zwischen den LBs furchenähnliche Strukturen beobachtet werden (**Abbildung 14 B, Pfeilspitzen**).

A) Kontrolle **B)** 20 min CPZ + 2-APB

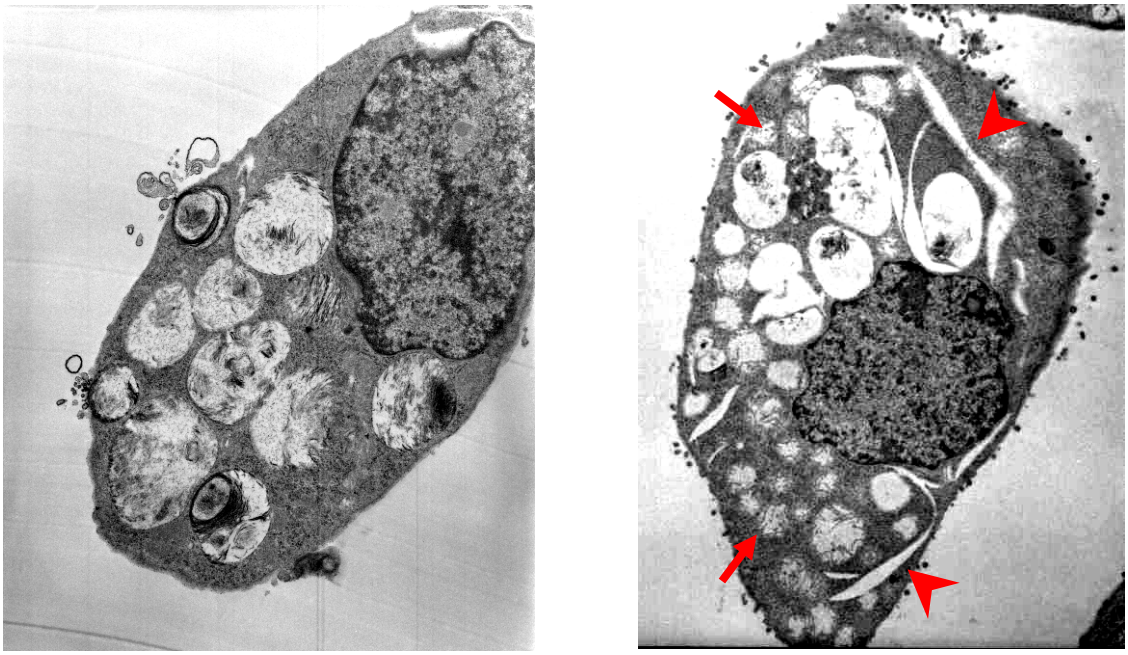


Abbildung 14 Ultrastrukturelle intrazelluläre Veränderungen während der Capsazepin (CPZ) + 2-Aminoethyldiphenylborinat (2-APB) Stimulation (Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten). **A)** Übersicht über eine unstimulierte alveolare Typ II (ATII) Zelle mit fusionierten Lamellärkörperchen (LBs). **B)** zeigt eine repräsentative ATII Zelle nach 20-minütiger Stimulation mit CPZ + 2-APB. Die roten Pfeile deuten auf die zusätzlichen Vakuolen nach CPZ + 2-APB-Stimulation. Die Pfeilspitzen zeigen auf Furchungen zwischen den LBs, welche nur in den Ultradünnschnitten mittels Transmissionselektronenmikroskop beobachtbar waren.

Aufgrund der sehr geringen Schnittdicke (50 nm) können in Ultradünnschnitten sehr viel weniger Vakuolen angeschnitten und detektiert werden als in Semidünnschnitten (Schnittdicke 500 nm). Zur Quantifizierung der Vakuolisierung wurden aus diesem Grund Semidünnschnitte mit einem Phasenkontrastmikroskop untersucht.

In Semidünnschnitten wiesen unstimulierte ATII Zellen Vakuolen auf, die optisch dichtes Material beinhalteten. Bei ihnen handelt es sich um LBs. In ATII Zellen, die 20 min mit CPZ + 2-APB stimuliert wurden, konnte eine massive Anhäufung von Vakuolen beobachten werden (**Abbildung 15 D; Abbildung 16 C**). Diese Vakuolisierung ließ nach 30-minütiger Stimulation wieder nach (**Abbildung 15 E + F**). Die durchschnittliche Vakuolengröße nahm nach 20-minütiger CPZ + 2-APB-Stimulation gegenläufig dazu ab und stieg nach 30 min wieder an (**Abbildung 15 G**). Die Werte sind in **Tabelle 22** angegeben.

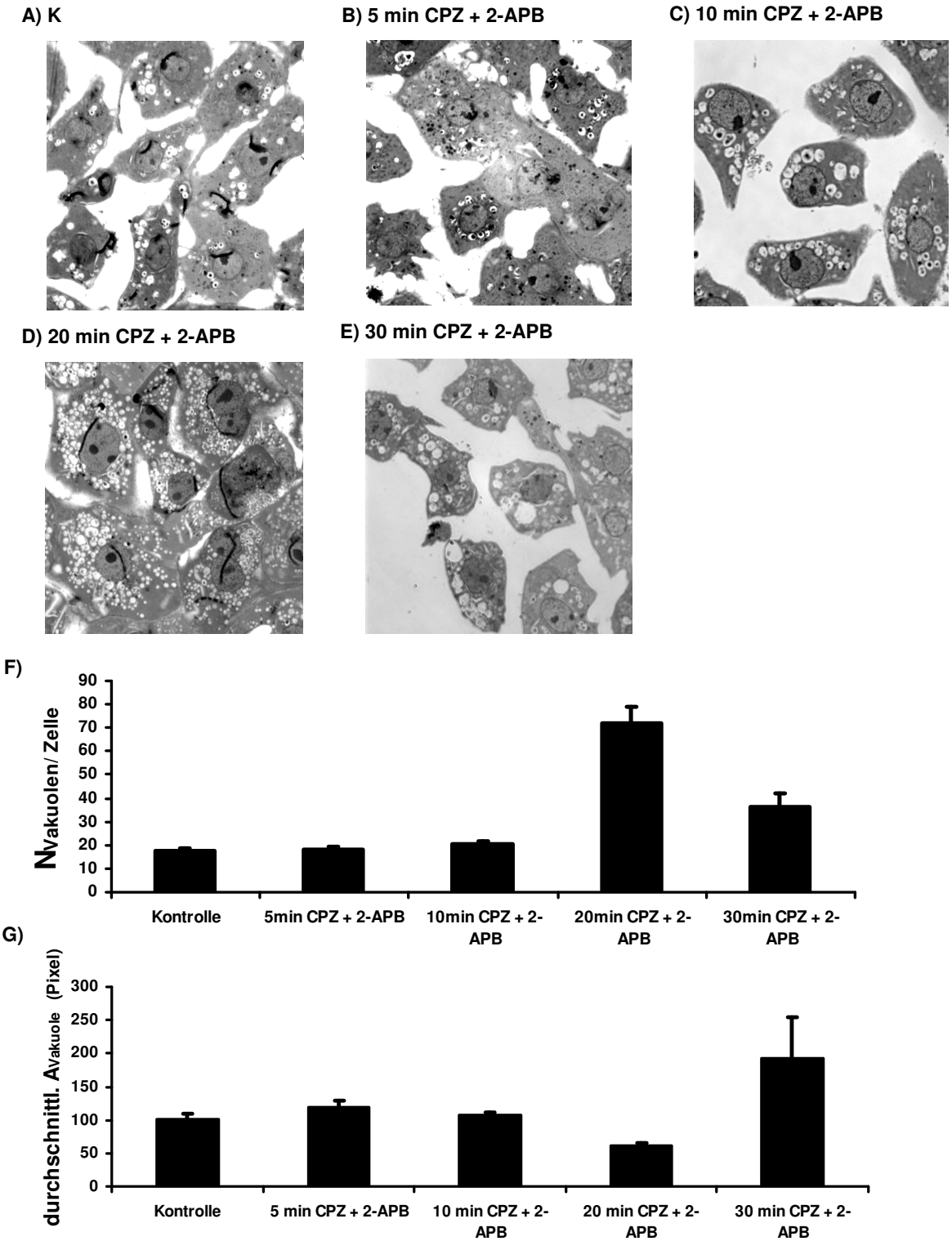


Abbildung 15 Vakuolisierung durch Stimulation mit Capsazepin + 2-Aminoethyldiphenylborinat (CPZ + 2-APB). **A)** K = unstimulierte Kontrollzellen **B - E)** Zeitpunkte = Zeit nach Zugabe CPZ + 2-APB in extrazelluläre Lösung und anschließender Fixierung. **F)** Auswertung der Vakuolenanzahl nach CPZ + 2-APB-Stimulation. Die Zeitpunkte geben die Dauer der CPZ +2-APB-Stimulation an. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. **G)** Auswertung der durchschnittlichen Fläche der Vakuolen ($A_{Vakuole}$) nach CPZ + 2-APB-Stimulation, angegeben in Pixel. Die Zeitpunkte geben die Dauer der CPZ + 2-APB-Stimulation an. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt.

Tabelle 22 Werte-Tabelle zu den **Abbildung 15 F + G**. Aufgeführt sind die durchschnittliche Anzahl der Vakuolen ($N_{Vakuolen/\ Zelle}$), sowie die durchschnittliche Fläche der Vakuolen einer Zelle (durchnschnittl. $A_{Vakuole}$), angegeben in Pixel. Alle Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler (Standard Error of the Mean, SEM); N = Anzahl der ausgewerteten Zellen. (2-APB = 2-Aminoethyldiphenylborinat; CPZ = Capsazepin)

	Kontrolle (N = 47)	**5 min CPZ + 2-APB (N = 21)**	**10 min CPZ + 2-APB (N = 57)**	**20 min CPZ + 2-APB (N = 28)**	**30 min CPZ + 2-APB (N = 16)**
$N_{Vakuolen/\ Zelle}$	17,77 ± 1,18	18,29 ± 0,74	20,68 ± 1,13	71, 61 ± 7,23	36,13 ± 5,67
durchschnittl. $A_{Vakuole}$ (Pixel)	101,67 ± 6,63	119,02 ± 10,67	106,75 ± 5,28	61,19 ± 4,64	192,59 ± 61,78

Bei ATII Zellen, die vor der CPZ + 2-APB-Stimulation mit PAO (10 µM) inkubiert wurden, konnte diese gesteigerte Vakuolisierung nicht beobachtet werden (Vakuolenanzahl: 20,3 ± 1,5; N = 30 Zellen) (**Abbildung 16 D + E**). Die Vakuolisierung scheint somit clathrinvermittelt zu sein.

Im Gegensatz zu Kontrollzellen wiesen die CPZ + 2-APB-behandelten Zellen zwei unterschiedliche Arten von Vakuolen auf. Die eine Art der Vakuolen war ähnlich der Vakuolen in Kontrollzellen und beinhaltete Material im Lumen. Der zweiten Vakuolenart fehlte dieses Material, so dass diese Vakuolen vermutlich unter der CPZ + 2-APB-Stimulation entstanden sind. Auch in ATII Zellen, die 20 min unter Kontrollbedingungen behandelt wurden, zeigte sich ein leichter, aber dennoch statistisch signifikanter Anstieg der Vakuolenanzahl (**Abbildung 16 B + E**). Dieser Anstieg konnte durch PAO blockiert werden. Dies weist auf eine basale clathrinabhängige Endozytose in ATII Zellen hin.

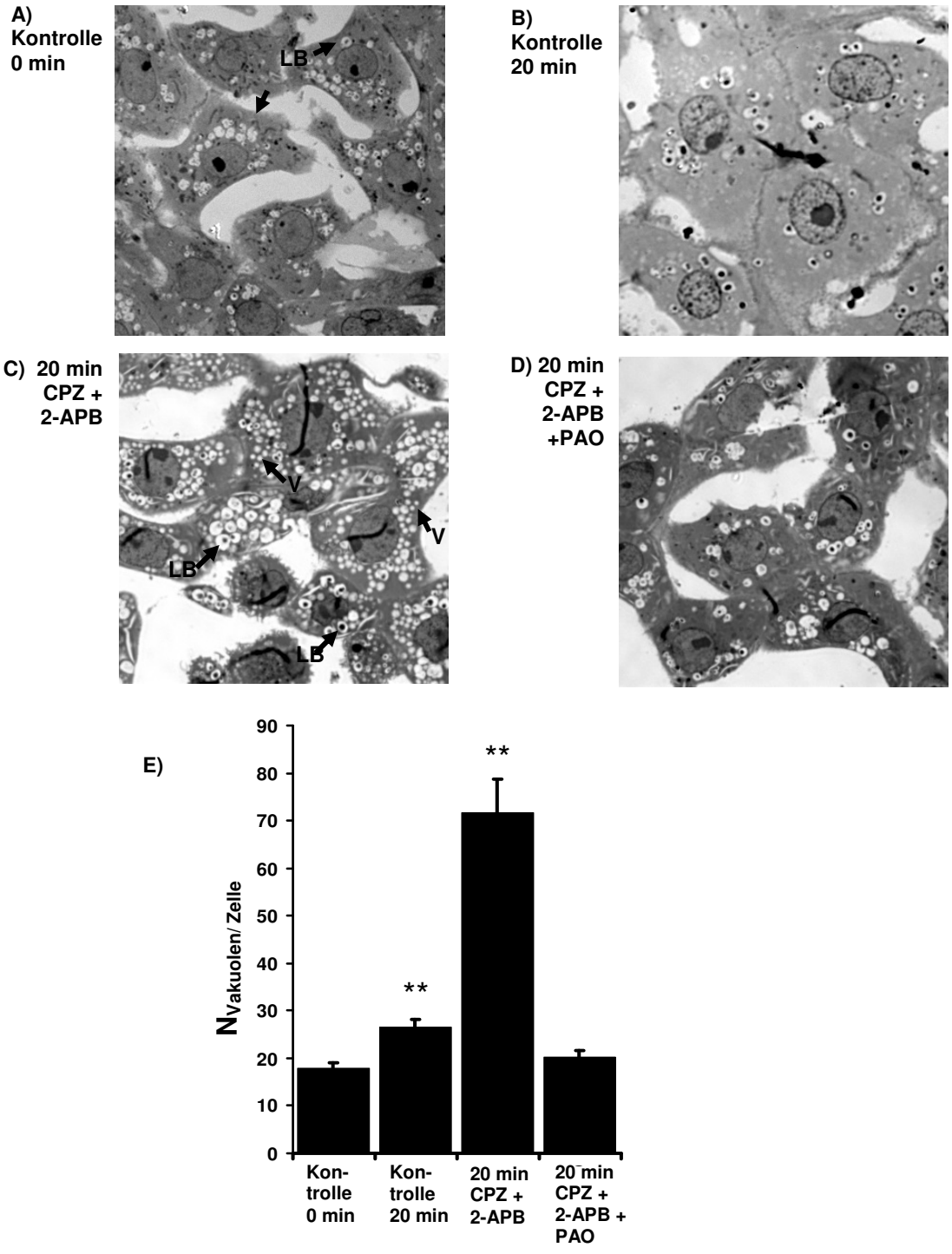


Abbildung 16 Vakuolisierung in alveolaren Typ II Zellen unter verschiedenen Bedingungen. Gezeigt sind unstimulierte Zellen, die **A)** direkt nach dem Spülen mit Kontrolllösung bzw. **B)** nach 20-minütiger Inkubation in Kontrolllösung fixiert wurden und Zellen, die **C)** nach 20 min Capsazepin (CPZ) + 2-Aminoethyldiphenylborinat (2-APB)-Stimulation bzw. **D)** in Gegenwart von Phenylarsinoxid (PAO) 20 min mit CPZ + 2-APB stimuliert und dann fixiert wurden. **E)** Balkendiagramm mit Darstellung der mittleren Anzahl der Vakuolen pro Zelle ± Standardfehler (SEM) (Kontrolle 0 min/ Kontrolle 20 min = Kontrollzellen mit Zeitpunkt der Fixation 0 min bzw. 20 min; 20 min 2-APB + CPZ bzw. 20 min CPZ + 2-APB + PAO = Zellen, die nach 20 min CPZ + 2-APB-Stimulation bzw. in Gegenwart von PAO 20 min mit CPZ + 2-APB stimuliert und dann fixiert wurden. Pfeile deuten auf LBs = Lamellärkörperchen und auf V = Vakuole. Signifikanzniveau im Vergleich zu Kontrolle 0 min angegeben: **: $p < 0{,}001$.

3.1.6 Ultrastrukturelle (REM) Oberflächenanalyse CPZ + 2-APB-stimulierter ATII Zellen

Da die Endozytose mit einer Internalisierung von Plasmamembranbestandteilen einhergeht, wurden CPZ + 2-APB stimulierte ATII Zellen mittels eines Rasterelektronenmikroskops auf Oberflächenveränderungen untersucht. In Kontrollzellen wurden filamentartige Oberflächenstrukturen, die aufgrund ihrer Größe, Form und ihres Durchmesser als Microvilli beschrieben werden können, beobachtet (**Abbildung 17 A + B; Abbildung 18 A + B**).

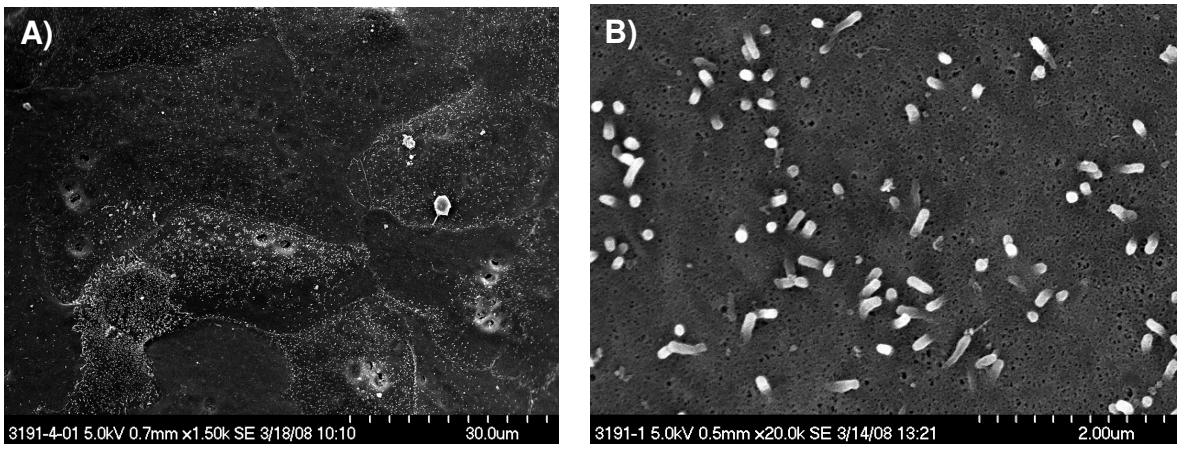


Abbildung 17 Oberflächenstruktur repräsentativer unstimulierter alveolarer Typ II (ATII) Zellen. **A + B)** Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen unstimulierter ATII Zellen. **A)** Übersicht über die Oberflächenstruktur mehrer ATII Zellen. Auf dem Zellrasen sind die Zellgrenzen zu erkennen, die Microvilli sind zu erahnen. **B)** zeigt eine Vergrößerung der microvillären Strukturen auf der Oberfläche einer ATII Zelle.

Unter Kontrollbedingungen betrug die Oberflächendichte der Microvilli 38,46 ± 4,49 $N_{Microvilli}$/ 10 µm^2; N = 25 (Mittelwert ± SEM, N = Anzahl der Zellen) (**Abbildung 19**). 5 und 10 min nach CPZ + 2-APB-Stimulation kam es zu einer starken Reduktion der Microvillidichte (nach 5 min: 7,49 ± 1,45 $N_{Microvilli}$/ 10 µm^2; N = 19 bzw. nach 10 min: 6,99 ± 1,41 $N_{Microvilli}$/ 10 µm^2; N = 21) (**Abbildung 18 C + D und E + F; Abbildung 19**). Nach 20-minütiger CPZ + 2-APB-Stimulation stieg die Oberflächendichte der Microvilli auf 45,7 ± 8,38 $N_{Microvilli}$/ 10 µm^2; N = 20 (**Abbildung 18 G + H; Abbildung 19**).

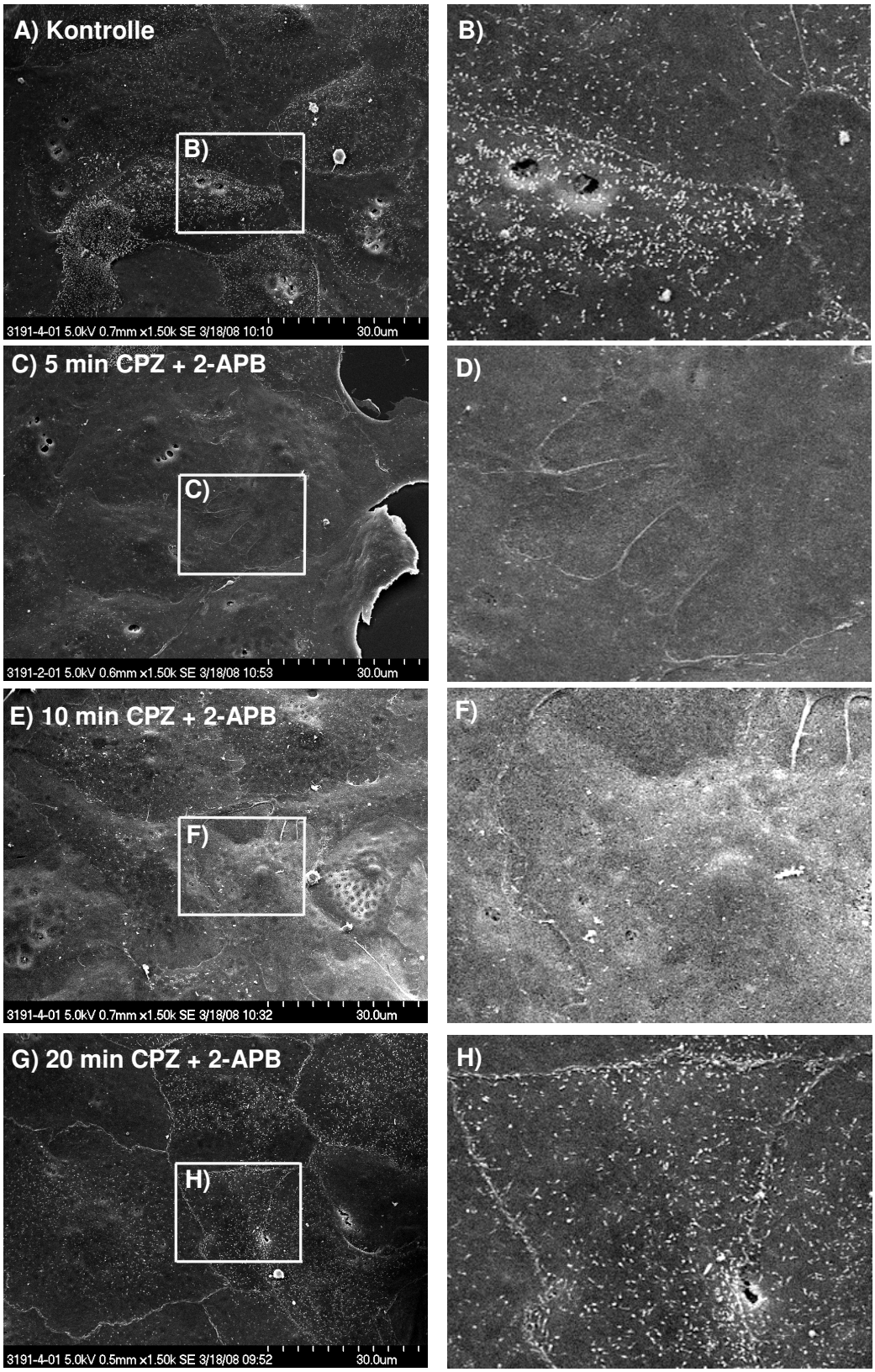


Abbildung 18 Oberflächendynamik der alveolaren Typ II (ATII) Zellen unter der Stimulation mit Capsazepin + 2-Aminoethyldiphenylborinat (CPZ + 2-APB). **A + B)** Kontrolle = Zellen ohne Stimulation. **C - H)** Zeitpunkte = Zeit nach Zugabe CPZ + 2-APB in die extrazelluläre Lösung und anschließender Fixierung. **B, D, F, H)** Bereiche, die rechts vergrößert dargestellt sind.

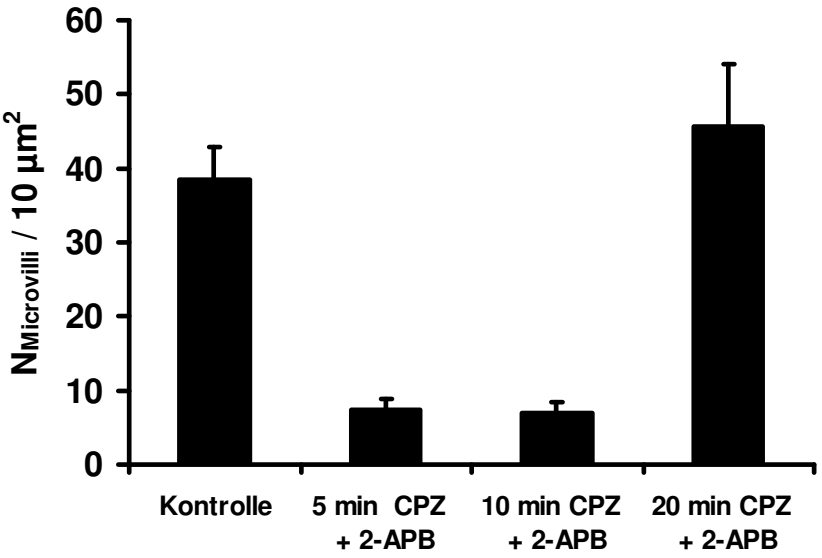


Abbildung 19 Auswertung der Microvilli-Expression während der Stimulation mit Capsazepin + 2-Aminoethyldiphenylborinat (CPZ + 2-APB) (**Abbildung 18**). Kontrolle = Zellen ohne Stimulation; Zeitpunkte = Zeit nach Zugabe CPZ + 2-APB in die extrazelluläre Lösung und anschließender Fixierung.

3.2 Membrane mixing während der Exozytose

Die Translokation des DsRed-Farn auf die LB-Oberfläche könnte auch durch eine Membranvermischung zwischen der Plasmamembran und LB-Membran während der Exozytose entstehen (z. B. „kiss-and-run“, siehe 1.3). Um diesen potentiellen Weg der DsRed-Farn-Aufnahme zu testen, wurden ATII Zellen mit dem Richardson Kontrastmikroskop untersucht.

Da das Licht im Dunkelfeld des Richardson Kontrastmikroskops an der limitierenden Membran der LBs gestreut wird, ist es möglich, mit dieser Art von Mikroskop die limitierende Membran der LBs zu detektieren. Durch das Einsetzen eines roten bzw. blauen Farbfilters in den Kondensor stellt sich die limitierende LB-Membran als roter bzw. blauer Ring gestreuten Lichts dar. Diese Art der Mikroskopie bietet vor allem für die Untersuchung der Exozytose von surfactantbeladenen LBs von ATII Zellen den entscheidenden Vorteil, dass die Fusion der LBs mit der Plasmamembran mit einer Abnahme der Intensität an gestreuten Licht (sog. SLID-Phänomen = scattered light intensity decrease) einher geht (Miklavc et al., 2009b). Das SLID-Phänomen kann somit zur Detektion von Fusionen der LBs während der Surfactantexozytose verwendet werden, ohne dass sonstige Fusionsmarker oder Fluoreszenzfarbstoffe notwendig sind. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode mit den generierten Fluoreszenz-fusionsproteinen kombiniert.

Es wurden ATII Zellen untersucht, die entweder Lamp3-GFP oder DsRed-Farn exprimierten. Die transfizierten ATII Zellen wurden mit ATP, einer der in vitro stärksten Sekretionsstimuli in ATII Zellen (Frick et al., 2001), zur regulierten Surfactantexozytose angeregt.

Bei der Untersuchung der Lamp3-GFP-überexprimierenden ATII Zellen überlagerte das grüne Fluoreszenzsignal des Lamp3-GFP mit dem roten Streulicht der LBs im Dunkelfeld. Bei den beobachteten Fusionsereignissen kam es, neben der Abnahme des Dunkelfeldsignals (SLID-Effekt), auch zu einer Veränderung der Verteilung des Lamp3-GFP-Signals (**Abbildung 20**). Während vor der Fusion das Lamp3-GFP-Fluoreszenzsignal gleichmäßig stark über die gesamte limitierende Membran der LBs verteilt war, war es nach der Fusion deutlich schwächer und bei manchen fusionierten LBs nicht mehr detektierbar (Abbildung 21). Zum Teil waren nach der Fusion nur noch diffus verteilte Bereiche des Lamp3-GFP-Fluoreszenzsignals sichtbar (**Abbildung 20**).

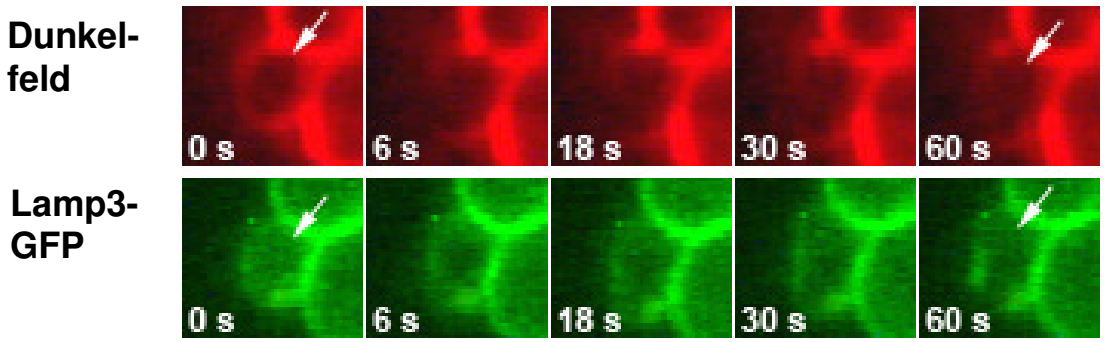


Abbildung 20 Lamp3-GFP-Lokalisation während der Fusion eines Lamellärkörperchen (LB) (Lamp3-GFP = Fusionsprotein des Lysosom-assoziierten Membranglykoprotein 3 mit dem grün fluoreszierenden Protein). Die Fusion des LBs findet in den ersten 6 s statt. Beim Zeitpunkt 6 s hat die Fusion bereits stattgefunden, erkennbar durch die Abnahme des Dunkelfeldsignals (rot). Gleichzeitig nimmt auch die Fluoreszenz des Lamp3-GFP-Signals (grün) ab, wenngleich das Lamp3-GFP nicht völlig verschwindet, sondern sich zu diskreten Bereichen reorganisiert. Zeitpunkte = Zeit nach der Fusion. Pfeile markieren den fusionierenden LB.

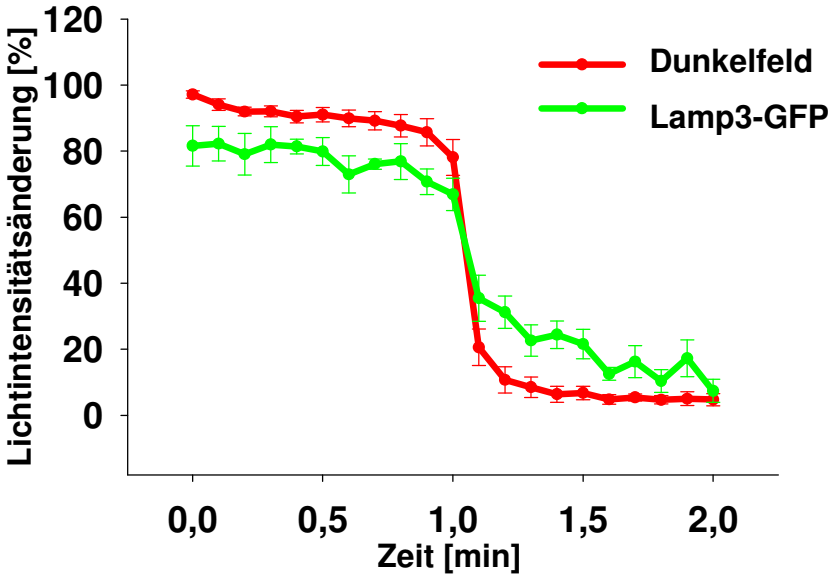


Abbildung 21 Änderungen in der Intensität des Dunkelfeld- (rot) und Lamp3-GFP-Signals (grün) (Lamp3-GFP = Fusionsprotein des Lysosom-assoziierten Membranglykoprotein 3 mit dem grün fluoreszierenden Protein). Anzahl der untersuchten Fusionsereignisse N = 11; Zeitpunkte = Zeit nach Beginn der Messung. Messzeitraum = 10 Abbildungen (= 60 s) vor und nach dem Fusionsereignis (zum Zeitpunkt 1 min).

In ATII Zellen, die DsRed-Farn exprimierten, konnten die limitierenden Membranen der LBs im Dunkelfeld (blau) von der Plasmamembran DsRed-Farn-positiver ATII Zellen im Fluoreszenzkanal (rot) unterschieden werden. Bei den detektierten Fusionsereignissen kam es zu einer homogenen Anfärbung der LB-Membran mit DsRed-Farn. DsRed-Farn erschien dort, wo sich vor der Fusion das Dunkelfeldsignal befand (**Abbildung 22** und **Abbildung 23**). Wie bei der Stimulation der ATII Zellen mit sekretionsstimulierenden Substanzen oder CPZ + 2-APB (3.1.2) kommt es auch hier zu einer Translokation des DsRed-Farn in die limitierende LB-Membran. Die durch die Sekretionsstimulanzien bzw. CPZ + 2-APB induzierte Domänenbildung des DsRed-Farn unterscheidet sich jedoch von der hier beobachteten homogenen Verteilung des DsRed-Farn. Dies weist auf unterschiedliche Translokationsmechanismen hin.

Im weiteren zeitlichen Verlauf verkleinerte sich der neugebildete Ring aus DsRed-Farn kontinuierlich innerhalb weniger Minuten zu einer diffusen Struktur (**Abbildung 24**).

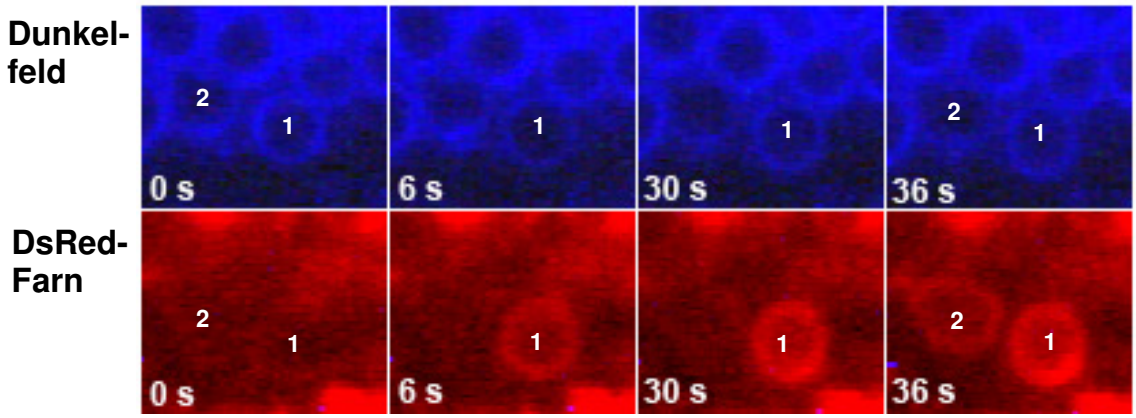


Abbildung 22 DsRed-Farn-Lokalisation während der Fusion eines Lamellärkörperchen (LB). (DsRed-Farn = Plasmamembranmarker). In der Abbildung sind zwei LBs dargestellt (mit **1** und **2** markiert), die nur kurz nacheinander fusionieren. Zum Zeitpunkt 0 s sind beide LBs noch nicht fusioniert und haben ein deutliches Dunkelfeldsignal. Das DsRed-Farn-Signal beider Vesikel ist zu diesem Zeitpunkt negativ. Der rechte Vesikel (**1**) fusioniert innerhalb der ersten 6 s, zum Zeitpunkt 6 s ist er bereits fusioniert, im Fluoreszenzkanal hat sich ein Ring aus DsRed-Farn (**1**) gebildet. Gleichzeitig zeigt sich eine Abnahme der Intensität des Dunkelfeldsignals (**1**). Die Fusion des linken Vesikels (**2**) findet zwischen den Zeitpunkten 30 s und 36 s statt. Zum Zeitpunkt 36 s hat sich nach erfolgter Fusion auch beim linken Vesikel im Fluoreszenzkanal ein Ring aus DsRed-Farn gebildet (**2**).

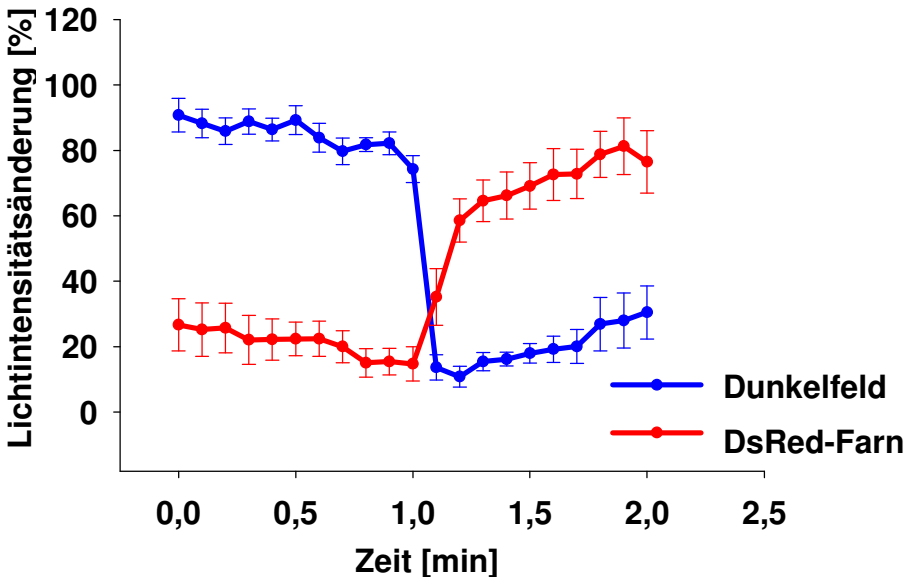


Abbildung 23 Änderungen in der Intensität des Dunkelfeld- (blau) und des DsRed-Farn-Signals (rot). Anzahl der untersuchten Fusionsereignisse N = 13; Zeitpunkte = Zeit nach Beginn der Messung. Messzeitraum = 10 Abbildungen (= 60 s) vor und nach dem Fusionsereignis (zum Zeitpunkt 1 min).

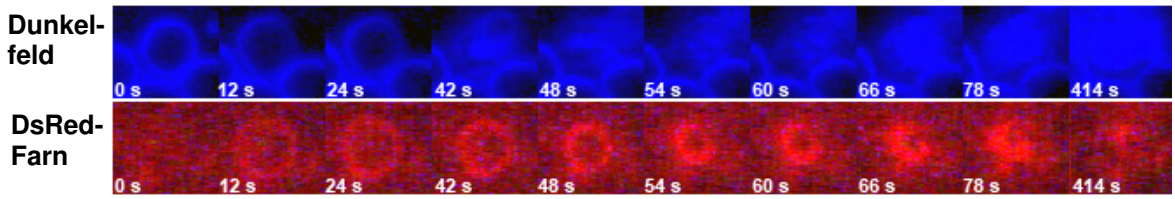


Abbildung 24 Verhalten des nach der Fusion neugebildeten DsRed-Farn-Rings. Die Fusion findet zwischen dem Zeitpunkt 0 s und 12 s statt. Zum Zeitpunkt 12 s ist das Lamellärkörperchen (LB) bereits fusioniert, es hat sich ein Ring aus DsRed-Farn (rot) gebildet. Dieser Ring wird im beobachteten Zeitraum immer kleiner und diffuser. Ab Zeitpunkt 42 s führt das ausgeschüttete Surfactant zu einer Streuung des Dunkelfeldsignals (blau).

4 Diskussion

4.1 Kotransfektion von ATII Zellen mit Lamp3-GFP und DsRed-Farn/ DsRed-Mem

In der vorliegenden Arbeit wurde Lamp3-GFP in Kombination mit dem rot fluoreszierenden Protein DsRed-Farn bzw. DsRed-Mem in ATII Zellen überexprimiert.

DsRed-Mem. Dieses Fusionsprotein besteht aus dem rot fluoreszierenden Protein DsRed und einem Fragment des Proteins Neuromodulin, auch als GAP-43 benannt. Das Fragment besteht aus den 20 N-terminalen Aminosäuren des Neuromodulins und stellt ein posttranlationales Palmitoylierungssignal dar. Dadurch wird DsRed-Mem nach der Translation an einen Palmitoylrest gekoppelt und in zelluläre Membranen wie der Plasmamembran verankert (Arni et al., 1998; Denny, 2006; Skene und Virag, 1989). Die Verankerung erfolgt in das innere Blatt der Membranen (Denny, 2006). DsRed-Mem kann somit als Marker für die Plasmamembran verwendet werden. Aufgrund der möglichen partiellen Markierung anderer intrazellulärer Membranen ist es jedoch als Plasmamembranmarker unspezifisch.

DsRed-Farn. Dieses Fusionsprotein besteht aus dem rot fluoreszierenden Protein DsRed und einem Fragment des Proteins c-Ha-Ras. Das Fragment besteht aus dem 20 Aminosäuren langen Farnesylierungssignal von c-Ha-Ras (Hancock et al., 1991; Aronheim et al., 1994), welches an das C-terminale Ende des DsRed-Monomers gekoppelt wurde (**Abbildung 25**). Durch die posttranskriptionelle Farnesylierung wird das Protein ins innere Blatt der Plasmamembran verankert, während die unmodifizierte Vorstufe im Zytoplasma verbleibt und mit keiner Membran assoziiert ist (Fujiyama und Tamanoi, 1990; Magee und Hanley, 1988). Somit kann das DsRed-Farn-Fusionsprotein im Gegensatz zum DsRed-Mem als spezifischer Marker für das innere Blatt der Plasmamembran verwendet werden.

DsRed-Mem und DsRed-Farn zeigten bezüglich ihrer Expression, sowie ihrer Verteilung in der Plasmamembran keine Unterschiede. Durch sekretionsstimulierende Subtanzen konnte eine Translokation beider DsRed-Fusionsproteine in die limitierende LB-Membran induziert werden. In den weiteren Versuchen wurde DsRed-Farn als spezifischer Marker des inneren Blatts der Plasmamembran dem weniger spezifischen DsRed-Mem vorgezogen.

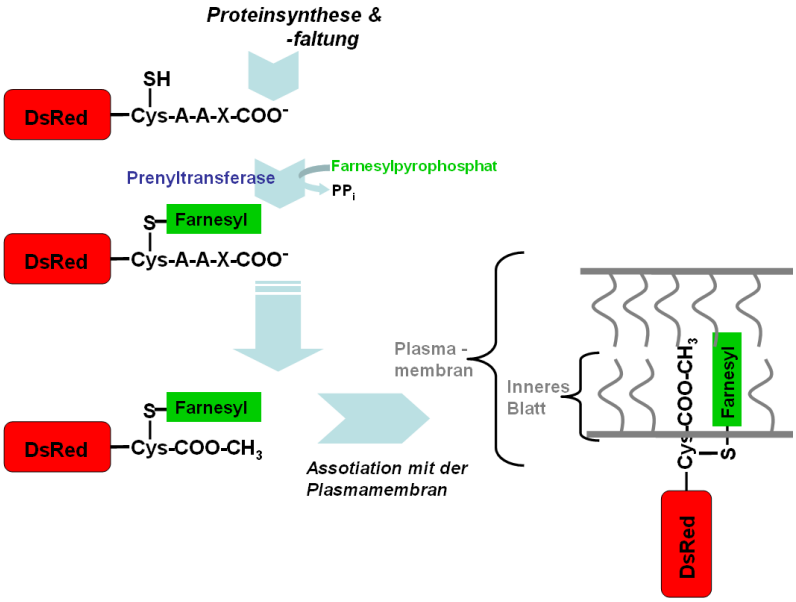


Abbildung 25 Schema der posttranskriptionellen Farnesylierung des DsRed-Farn (modifiziert nach Lehninger, Nelson und Cox, Prinzipien der Biochemie, 1994). Durch das sich am C-Terminus befindende Farnesylierungssignal kommt es nach der Synthese und Faltung des Proteins zur posttranskriptionellen Modifizierung (Farnesylierung) mit anschließender Verankerung der modifizierten Form im inneren Blatt der Plasmamembran.

Lamp3-GFP ist ein Fusionsprotein aus dem Lysosom-assoziierten Membranglykoprotein 3 (Lamp3) und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP). Es färbte nach seiner Expression die limitierende Membran der LBs homogen an. Lamp3 besitzt als Transmembranprotein der Tetraspanin-Superfamilie vier Transmembrandomänen. Sowohl das C-terminale als auch N-terminale Ende sind auf der zytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert (Maecker et al., 1997). Das GFP wurde mit dem C-terminalen Ende des Lamp3-Proteins fusioniert und befindet sich somit auf der zytoplasmatischen Seite der limitierenden Membran der LBs (siehe **Abbildung 26**).

Lamp3, das in der Literatur auch als CD63 bezeichnet wird, befindet sich in der limitierenden Membran von Late endosomalen und multivesikulären Organellen. Es lässt sich auch in sekretorischen Organellen wie Weibel-Palate-Körperchen (Kobayashi et al., 2000), sowie sekretorischen Lysosomen (Griffiths, 1996) nachweisen. In ATII Zellen kolokalisiert Lamp3/ CD63 mit dem LB-Membranmarker ABCA3 (Matsumura et al., 2006). Somit stimmt die beobachtete Lokalisation von Lamp3-GFP mit bisherigen Studien überein und kann als Marker für die limitierende LB-Membran verwendet werden.

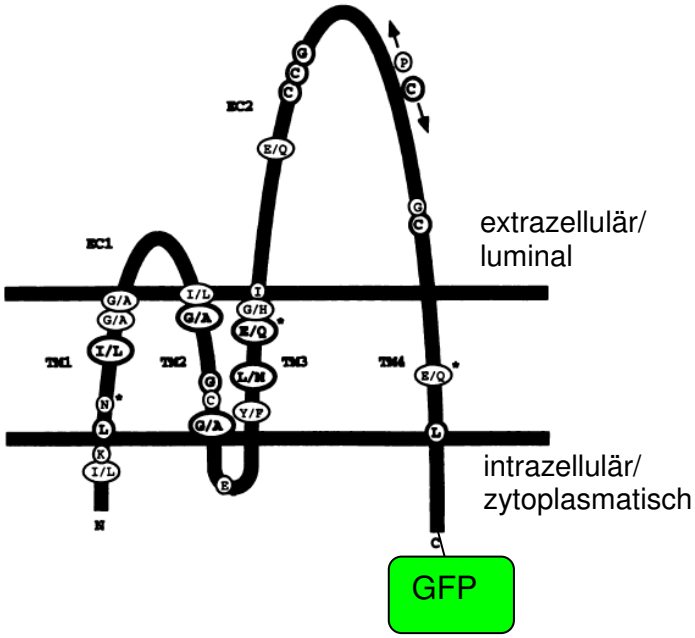


Abbildung 26 Schematische Struktur des Lamp3-GFP (Lamp3-GFP = Fusionsprotein des Lysosom-assoziierten Membranglykoprotein 3 mit dem grün fluoreszierenden Protein). Das Lysosom-assoziierte Membranglykoprotein 3 (Lamp3) besitzt als Tetraspanin-Protein vier Transmembrandomänen. Der N- und C-Terminus liegen auf der zytoplasmatischen Seite der limitierenden Membran der LBs. Das grün fluoreszierende Protein (GFP) wurde mit dem C-terminalen Ende des Lamp3 fusioniert und befindet sich somit auf der zytoplasmatischen Seite der limitierenden Membran der LBs. (Schema modifiziert nach Maecker et al., 1997).

4.2 Membrane mixing durch Endozytose

Es ist bisher noch unklar, ob Membranbestandteile zwischen der Plasma- und der LB-Membran auf einem selektiven vesikulären oder auf einem weniger organisierten, diffusiblen Weg translokalisiert werden. Um dies zu untersuchen, wurde in Lamp3-GFP- und DsRed-Farn-überexprimierenden ATII Zellen die Translokation vom Plasmamembranmarker DsRed-Farn auf die limitierende LB-Membran durch sekretionsstimulierende Substanzen, sowie durch Capsazepin und 2-Aminoethyldiphenylborat (CPZ + 2-APB) induziert und der zu Grunde liegende Mechanismus aufgeklärt.

4.2.1 Transportweg der durch sekretionsstimulierende Substanzen induzierten Endozytose

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Translokation des DsRed-Farn auf die LB-Oberfläche durch sekretionsstimulierende Substanzen wie ATP, der Kombination von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin, sowie der Kombination aller drei Substanzen erleichtert wird. Dieser Effekt ist somit durch

mehrere unabhängige Wege auslösbar: Durch purinerge Stimulation mittels ATP (Dietl und Haller, 2005; Nguyen et al., 1998), als auch durch die Kombination des Calciumionophors Ionomycin mit dem Proteinkinase C (PKC)-aktivierenden PMA (Koh et al., 2000). Alle drei Substanzen führen zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) und modulieren über diesen Weg üblicherweise die Exozytoserate sekretorischer Zellen (Dietl und Haller, 2005).

Um den Effekt von Endozytosemodulatoren auf die DsRed-Farn-Internalisierung in einer standardisierten Weise zu testen, wurde die RPA nach 30-minütiger ATP-Stimulation gemessen. Phenylarsinoxid (PAO) ist in der Lage, die clathrinabhängige Endozytose durch Vernetzung der Clathrinuntereinheiten zu verhindern (Hertel et al., 1985; Takano et al., 2004; Visser et al., 2004). In den vorliegenden Experimenten zeigte PAO keinen blockierenden Einfluss auf die ATP-induzierte DsRed-Farn-Translokation in die limitierende LB-Membran. Ein clathrinvermittelter Endozytose-mechanismus kann demnach ausgeschlossen werden.
Im Gegensatz zu PAO zeigten sowohl Filipin, als auch Indomethacin einen blockierenden Effekt auf die ATP-induzierte DsRed-Farn-Translokation. Filipin interferiert mit cholesterinreichen Membrandomänen, die für die Caveolae-Formation notwendig sind (Schnitzer et al., 1994; Rothberg et al., 1990). Indomethacin wiederum blockiert die Ablösung der Caveolae von der Plasmamembran (Smart et al., 1995). Obwohl diese Beobachtungen einen caveolinabhängigen Endozytosemechanismus nahelegen, muss ein solcher Endozytoseweg für ATII Zellen sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Für die caveolinabhängige Endozytose muss Caveolin-1 funktionell von den Zellen exprimiert werden (Drab et al., 2001). Eine solche Expression wurde für ATII Zellen ausgeschlossen (Stevens et al., 2001; Dahlin et al., 2004). Weitere Filipin- und Indomethacin-sensitive Endozytoseweg verlaufen cholesterolabhängig (Llorente et al., 2000) und sind unabhängig von Clathrin und Caveolin (Nabi und Le, 2003). Filipin blockiert diese cholesterolabhängigen Wege über die Bindung an Cholesterol (Llorente et al., 2000). Ein vergleichbarer Mechanismus wurde für das Recycling von ABCA3, einem Marker der LB-Membran, beschrieben (Bates et al., 2000).
Von der Zelle endozytiertes Material wird in das Early Endosome aufgenommen (**Abbildung 27**). Hier werden Komponenten, die für das Recycling zurück zur Plasmamembran vorgesehen sind, von denjenigen getrennt, die auf endosomalem bzw. lysosomalem Weg prozessiert werden. Aus dem Alveolarraum aufgenommenes Surfactant gelangt ebenfalls ins Early Endosome. Hier wird das surfactantassoziierte Protein-A (SP-A) von den Surfactantlipiden abgespalten und zur Sekretion zurück zur

Plasmamembran transportiert (Wissel et al., 2001). Die surfactantassoziierten Lipide werden über endosomale/ lysosomale Transportwege weiterprozessiert (Wissel et al., 2001; Wissel et al., 2000). Bafilomycin A1 verhindert die Azidifizierung endosomaler Kompartimente durch Inhibition der vakuolären Protonen-ATPase (Harada et al., 1997) und damit auch die early endosomale Proteinprozessierung (Presley et al., 1997). Auch der Weitertransport endozytierter Komponenten zu sog. late endosomalen Organellen wird verhindert, die endozytotische Aufnahme von Partikeln in die Zelle bleibt hingegen unbeeinflusst (Bayer et al., 1998). Bafilomycin A1 verhinderte die Akkumulation von DsRed-Farn auf der LB-Oberfläche. Die Translokation von DsRed-Farn ist folglich von einer entsprechenden Prozessierung im Early Endosome abhängig.

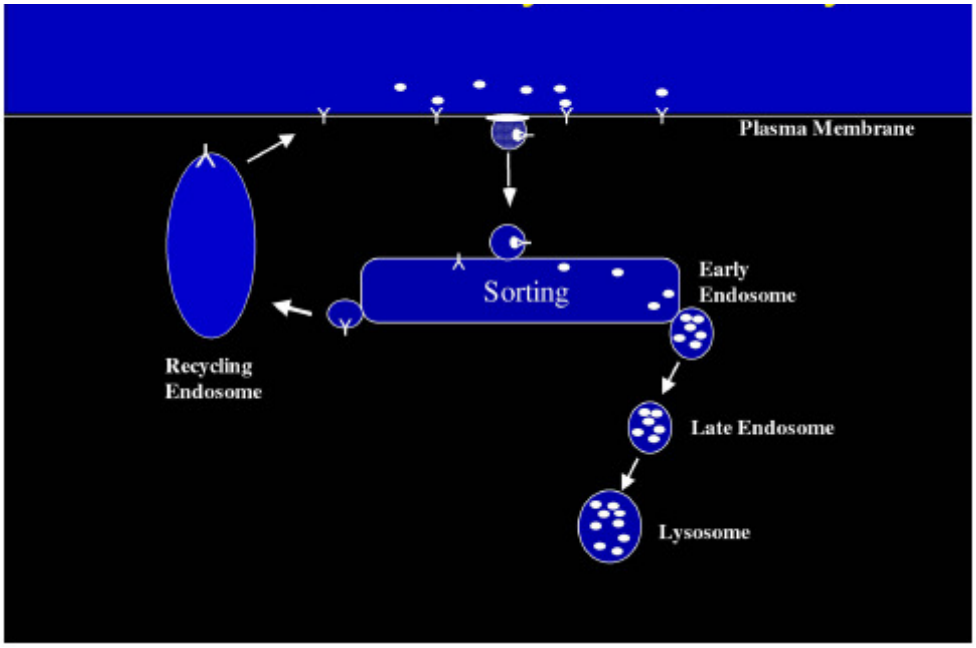


Abbildung 27 Allgemeines Modell des Endozytose-Transportwegs (aus Grant und Sato, 2006, S. 2). Endozytiertes Material wird nach der Internalisierung in early endosomale Organellen aufgenommen. Hier erfolgt das sog. Sorting. Ein Teil des endozytierten Materials wird weiter zu den Lysosomen via late endosomale Organellen transportiert. Der andere Teil des endozytierten Materials rezykliert wiederum über den Recycling-Transportweg zurück zur Plasmamembran.

Sowohl Wortmannin als auch LY294002 zeigten einen blockierenden Effekt auf die Translokation von DsRed-Farn in die LBs. In ATP-stimulierten ATII Zellen akkumulierte EEA1 in DsRed-Farn-positiven vesikulären Strukturen. Diese Akkumulation konnte durch Wortmannin verhindert werden.

Typ III Phosphatidylinositol-3-kinase-Inhibitoren wie Wortmannin und LY294002 beeinträchtigen den Transport und die Prozessierung von internalisiertem Material zu verschiedenen Zeitpunkten entlang des endosomalen/ lysosomalen Transportwegs

(Johnson et al., 2006; Brown et al., 1995; Reaves et al., 1996; Mills et al., 1998; Christoforidis et al., 1999). Wortmannin verhindert die Bindung von EEA1 an die Organellmembran des Early Endosomes (Mills et al., 1998; Simonsen et al., 1998) und hemmt deren homotypische Fusion (Jones et al., 1998). Dieser Zusammenhang kann dadurch erklärt werden, da EEA1 für die Rab5-abhängige Endosomenfusion essentiell ist und die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI(3)K) die Aktivität von EEA1 reguliert (Simonsen et al., 1998). EEA1 bindet dabei am Phosphatidylinositol-3-phosphat, dem Produkt der PI(3)K, auf der Endosomenoberfläche und dient in gebundener Form Rab5 als Effektor (Simonsen et al., 1998). In den vorliegenden immunhistochemischen Experimenten verhinderte Wortmannin die EEA1-Aggregation. Die Blockierung der DsRed-Farn-Translokation durch Wortmannin und LY294002 kann somit durch eine Funktionsbeeinträchtigung der early endosomalen Organellen erklärt werden.
Für den Umsatz des ABCA3-Proteins, einem Marker der LB-Membran, wurde beschrieben, dass ihm die Surfactantexozytose vorausgeht (Bates et al., 2000; Schaller-Bals et al., 2000). Der internalisierte ABCA3-Transporter rezykliert nach der Exozytose mittels endosomalen Organellen zurück in bestehende LBs (Schaller-Bals et al., 2000), umgeht dabei aber das Early Endosome (Wissel et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass DsRed-Farn nach Stimulation der ATII Zellen mit sekretionsinduzierenden Substanzen ebenfalls internalisiert wird. Im Gegensatz zum ABCA3-Protein, wird DsRed-Farn über das Early Endosome transportiert. Anders als die recycelten ABCA3-Proteine und internalisierten ambiphilen Fluophore wurde DsRed-Farn nicht ins Lumen der LBs aufgenommen, sondern kolokalisierte mit Lamp3-GFP unter Bildung unstetiger Domänen. Aufgenommene Lipide werden von den ATII Zellen über einen nicht-degradativen Weg zu den LBs transportiert. Dieser Weg beinhaltet Organellen, die den late endosomalen Organellen ähneln (Wissel et al., 1996). ABCA3 kann nach Internalisierung nicht in lysosomalen Organellen nachgewiesen werden, erscheint aber kurz nach der Stimulation mit sekretionsinduzierenden Substanzen auch in den LBs (Schaller-Bals et al., 2000).

Somit existiert in ATII Zellen ein Transportweg zu den LBs, der von klassischen lysosomalen Kompartimenten unabhängig ist. DsRed-Farn wird höchstwahrscheinlich nach dem Early Endosome auf demselben Weg zu den LBs transportiert. Da DsRed-Farn durch die Farnesylierung in das innere Blatt der Plasmamembran verankert wird, muss DsRed-Farn zusammen mit Plasmamembrananteilen transportiert werden, um in die limitierende LB-Membran aufgenommen zu werden. Internalisierte Plasmamembrandomänen werden demnach anders als der ABCA3-Transporter transportiert und konvergieren in diskreten Bereichen der limitierenden LB-Membran.
Die Translokation von DsRed-Farn zu den LBs ist von der LB-Sekretion unabhängig.

Dafür sprechen folgende Beobachtungen:

1.) Nur ein relativ geringer Anteil an ATII Zellen reagiert auf die Stimulation mit sekretionsinduzierenden Substanzen mit der LB-Exozytose (Wemhoner et al., 2006). In dieser Arbeit konnte eine deutlich erhöhte RPA in allen stimulierten Zellen beobachtet werden.

2.) In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass es durch die LB-Fusion mit der Plasmamembran zu einer homogenen Verteilung des DsRed-Farn auf der LB-Oberfläche kommt (3.2). Die Translokation des DsRed-Farn durch sekretionsstimulierende Substanzen führt hingegen zur Formierung von DsRed-Farn-Domänen auf den LBs.

4.2.2 Transportweg der durch CPZ + 2-APB-induzierten Endozytose

CPZ + 2-APB induzierte in den ATII Zellen eine vermehrte Vakuolisierung, die durch Phenylarsinoxid (PAO) inhibiert werden konnte. Wie bereits erwähnt, blockiert PAO die clathrinabhängige Endozytose (Visser et al., 2004; Takano et al., 2004; Hertel et al., 1985). Hierdurch, sowie durch weitere Untersuchungen (Usmani et al., 2010) konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von ATII Zellen mit CPZ + 2-APB über einen $[Ca^{2+}]_i$-Anstieg eine verstärkte clathrinabhängige Endozytose auslöst.

In ATII Zellen wird die Surfactantaufnahme aus dem extrazellulären Raum überwiegend über clathrinabhängige Endozytose vermittelt (Wissel et al., 2001; Bayer et al., 1998). Die surfactantassoziierten Lipide werden nach Internalisierung zu den LBs transportiert (Wissel et al., 2001). Durch Stimulation der ATII Zellen mit CPZ + 2-APB wird chemisch ein Endozytosemechanismus ausgelöst, der in ATII Zellen unter physiologischen Bedingungen im Rahmen des Surfactantrecyclings stattfindet. Nach CPZ + 2-APB-Stimulation akkumulierten DsRed-Farn-markierte Plasmamembran-anteile unter Ausbildung von Domänen auf der LB-Oberfläche. Dies konnte auch nach Stimulation der ATII Zellen mit sekretionsinduzierenden Substanzen beobachtet werden. Demzufolge werden Plasmamembrananteile auch auf clathrinabhängigen Endozytosewegen in die LBs translokalisiert.

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass endozytiertes Material in die LBs aufgenommen wird. Das gilt sowohl für Proteine (ABCA3 (Schaller-Bals et al., 2000)) als auch für Lipide (surfactantassoziierte Lipide (Wissel et al., 2001)). LBs dienen als Speicher für surfactantassoziierte Lipide. Zusätzlich handelt es sich bei LBs um Lysosomen-verwandte Organellen. Lysosomen sind wiederum typische late

endosomale Organellen. Es kann daher nachvollzogen werden, dass endozytierte Plasmamembrananteile in den LBs akkumulieren.

Es ist möglich, dass nur bestimmte Membranbereiche, die beispielsweise membrangebundene Rezeptoren oder Signalmoleküle exprimieren, internalisiert werden. Der SP-A-Rezeptor p63 (CKAP) könnte ein solcher Rezeptor sein. SP-A reguliert durch Bindung auf der ATII Zelloberfläche die Aufnahme von surfactantassoziierten Lipiden und inhibiert deren Sekretion (Bates et al., 2003; Kuroki et al., 1988; Wright et al., 1989; Bates et al., 2008). SP-A kolokalisiert mit p63 auf der Plasmamembran und in early endosomalen Kompartimenten. Dies weist auf eine gemeinsame Internalisierung hin (Gupta et al., 2006). Die Internalisierung von SP-A ist clathrinabhängig (Jain et al., 2005; Stevens et al., 2001; Wissel et al., 2001; Young et al., 1989; Ryan et al., 1989). Auf der ATII Zelloberfläche ist p63 vorwiegend in den Microvilli lokalisiert. Microvilli bieten neben zusätzlicher Zelloberfläche eine ideale Position für die Interaktion des p63 mit SP-A, das sich im den Alveolus auskleidenden Surfactantfilm befindet (Bates et al., 2008).

Der Mechanismus der Oberflächenvergrößerung mittels Microvilli ist ein Charakteristikum des Bürstensaums von Nierentubuluszellen und Enterozyten. Hier sind viele Transporter lokalisiert, über deren Regulation die absorbtive Funktion dieser Zellen an verschiedene Bedingungen angepasst wird. Die physiologische Regulation der renalen Phosphatreabsorption erfolgt beispielsweise durch eine hormonabhängige Internalisierung eines Phosphattransporters (Miyamoto et al., 2004). Die Internalisierung findet clathrinvermittelt in den intermicrovillären Regionen statt. Der internalisierte Transporter wird anschließend zwecks Degradation zu den Lysosomen transportiert. Ein vergleichbarer Mechanismus könnte demnach der in den rasterelektronenmikroskopischen Experimenten beobachtbaren Microvillioberflächen-reduktion zu Grunde liegen. Die CPZ + 2-APB-induzierte massive clathrinabhängige Endozytose und die damit verbundene Abschnürung von Coated pits von der Plasmamembran führt zwangsläufig zur Reduktion der Membranoberfläche.

Die übermäßige Vakuolisierung der ATII Zellen nach CPZ + 2-APB-Stimulation deutet auf eine unzureichende Prozessierung des endozytierten Materials hin. Es akkumuliert daraufhin in den betroffenen Organellen, die sich dadurch vergrößern bzw. vermehren. Es wurde gezeigt, dass das endozytierte Material in nicht azide Organellen aufgenommen wird (Usmani et al., 2010). Das endozytierte Material wird somit auf einer Stufe noch vor dem Eingang in das Late Endosome insuffizient prozessiert. Die Azidifizierung findet im Rahmen des endosomalen Sortings in early endosomalen Kompartimenten statt. Folglich handelt es sich bei den Vakuolen um endozytotische Organellen, die sich noch vor dem Eingang in das Early Endosome befinden.

Die im späteren Verlauf beobachtete Vergrößerung der Vakuolen bei gleichzeitiger Abnahme ihrer Anzahl lässt sich durch eine Fusion der Vakuolen erklären. Solche Fusionen könnten analog der Lysosom-Endosom-Fusion im Rahmen der Lysosom-Biogenese (Luzio et al., 2000; Luzio et al., 2009) oder der homotypische Vakuolenfusion in Hefezellen (Ostrowicz et al., 2008) erfolgen.

4.3 Membrane mixing durch Exozytose

Die regulierte Exozytose ist durch eine stimulierte Fusion zwischen der limitierenden Membran eines Speichervesikels und der Plasmamembran gekennzeichnet und wird durch SNARE-Proteine unter dem Einfluss von zytoplasmatischen Faktoren, wie Ca^{2+}, katalysiert (Almers, 1990; Chen and Scheller, 2001; Neher, 1998; Burgoyne und Morgan, 2003; Chieregatti und Meldolesi, 2005) (**Abbildung 28**). Die dabei entstehende Fusionspore stellt die initiale wässrige Verbindung zwischen dem Vesikellumen und dem extrazellulären Raum dar (Chandler und Heuser, 1980). Neben dem Modell der Membranfusion zur Bildung der Fusionspore werden auch Modelle proteinöser Exozytoseporen diskutiert (Han et al., 2004).

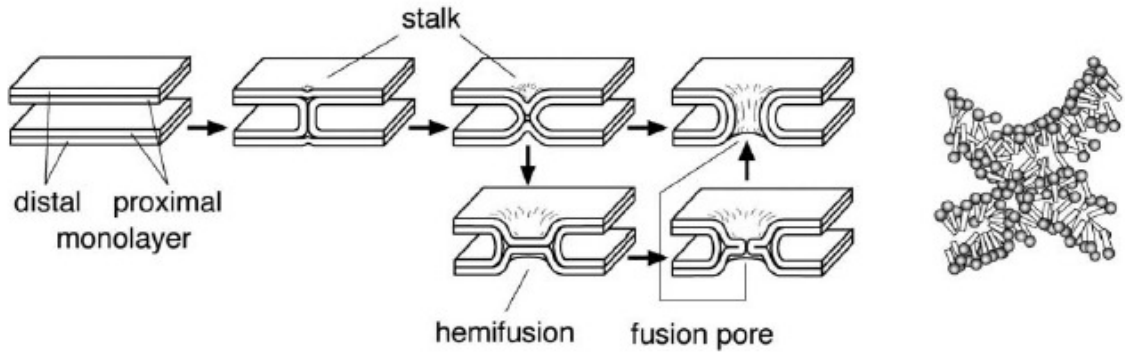


Abbildung 28 Übergangsstadien der Membranfusion (nach Jahn et al., 2003, S. 520). Zunächst müssen die Membranen in enge Nachbarschaft gebracht werden (linke Seite), damit die Lipide der beiden proximalen Monolayer interagieren können. Zusätzlich muss die Bindung zwischen hydrophilen und hydrophoben Anteilen der Lipid-Doppelschicht einer Membran destabilisiert werden. Nicht-Doppelschicht-Übergangsstadien (rechts) werden generiert, an dessen Ende die Bildung einer wässrigen Fusionspore steht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die LB-Fusion mit einer plötzlichen und homogenen Verteilung des DsRed-Farn über die gesamte limitierende LB-Membran einhergeht. Der DsRed-Farn-Translokation während der Exozytose liegt somit ein völlig anderer Mechanismus zu Grunde, als der während endozytotischen Vorgängen beobachteten Domänenbildung (4.2). Die homogene und schnelle Verteilung des DsRed-Farn deutet auf eine Diffusion des DsRed-Farn in die limitierende LB-Membran hin (Schema siehe **Abbildung 29**). Während der Fusion kommt

es zur Interaktion der beiden proximalen Monolayer von LB- und Plasmamembran (**Abbildung 28**).

DsRed-Farn markiert spezifisch das innere Blatt, d. h. den proximalen Monolayer der Plasmamembran. Damit DsRed-Farn in die limitierende LB-Membran diffundieren kann, muss eine Vermischung von Membrananteilen des inneren Blattes der Plasmamembran mit dem äußeren Blatt der limitierenden LB-Membran stattfinden. Während der Exozytose kommt es zu einem Lipidfluss von der Plasmamembran in die Vesikelmembran, der zu einer 40%-igen Abnahme der Plasmamembranfläche führt (Monck et al., 1990). Die Diffusion des DsRed-Farn ist somit ein weiterer Hinweis dafür, dass im vorliegenden Fall an der Ausbildung der Fusionspore eine Membranfusion mit Vermischung beider Membrankompartimente beteiligt ist.



Abbildung 29 Schematische Darstellung der Diffusion des DsRed-Farn während der Fusion eines Lamellärkörperchens (LB) (aus Miklavc et al., 2009a, S. 10) (DsRed-Farn = Plasmamembranmarker). Gezeigt ist das Stadium der Präfusion (links), Hemifusion (Mitte) und Postfusion (rechts). In rot ist die DsRed-Farn-Lokalisation während den unterschiedlichen Stadien der LB-Fusion angedeutet. Beispiele von DsRed-Farn-Fluoreszenzaufnahmen eines einzelnen LBs vor und nach Fusion sind links und rechts des Schemas gezeigt.

Während der bei der Vesikelfusion stattfindenden Membranvermischung können darüber hinaus spezifische Faktoren von der Plasmamembran auf die Membran sekretorischer Vesikel übertragen werden. Solche Faktoren können beispielsweise eine Aktinassemblierung induzieren und die spätere Mobilität des fusionierten Vesikel beeinflussen (Yu und Bement, 2007; Miklavc et al., 2009b; Malacombe et al., 2006). Bei der Exozytose von Sekretionsgranula in sekretorischen Zellen wie den Xenopus Oozyten und den Azinuszellen des Pankreas kommt es zu einer solchen Aktinummantelung des fusionierten Vesikels („kiss-and-coat“). Die Aktinassemblierung fördert die Stabilisierung bzw. die Wiederaufnahme des Vesikels (Nemoto et al., 2004; Sokac et al., 2003). In ATII Zellen konnte ebenfalls eine Aktinummantelung fusionierter LBs nachgewiesen werden (Miklavc et al., 2009b; Nemoto et al., 2004). Die Sekretionsgranula in den Zelltypen, die kiss-and-coat-Exozytose betreiben, sind erheblich größer als in Neuronen oder neuroendokrinen Zellen. Zusätzlich ist deren Vesikelinhalt oft sehr schwer löslich (Sokac und Bement, 2006). Dieser Sachverhalt trifft auch für die LBs zu. Ihr Vesikelinhalt, das Surfactant, löst sich, als eine Mixtur aus Phospholipiden und Proteinen, sehr schwer (Dietl und Haller, 2005). TEM-Studien

deuteten bereits früh auf eine Aktinbeteiligung an der Surfactantextrusion hin (Tsilibary und Williams, 1983).

Es kommen prinzipiell zwei Mechanismen dieser Aktinassemblierung in Betracht: Einerseits könnte der Exozytosestimulus, also ein $[Ca^{2+}]_i$-Anstieg, andererseits aber auch das Fusionsereignis an sich diese Assemblierung auslösen (Sokac und Bement, 2006). Es gibt einige Hinweise dafür, dass die Fusion selbst, genauer die dabei stattfindende Vermischung von Komponenten des sekretorischen Vesikels mit der Plasmamembran („Compartment mixing“) die Aktinummantelung einleiten (Sokac und Bement, 2006). Yu und Bement, 2007 konnten die Hypothese des Compartment mixing als Auslöser des Aktincoating bestätigen. Sie zeigten an Xenopus Oozyten, dass die Vermischung von Lipiden zwischen fusioniertem Vesikel und Plasmamembran via eines C2-Ceramid-sensitiven Weg hierfür entscheidend ist. In der vorliegenden Arbeit konnte mit der beobachteten Diffusion des DsRed-Farn während der LB-Fusion gezeigt werden, dass der Mechanismus des Compartment mixing auch bei der Exozytose von LBs in ATII Zellen involviert ist. Das LB bleibt nach der Fusion weiterhin bestehen. Es kommt zur Diffusion von DsRed-Farn-markierte Plasmamembran-anteilen, die die limitierende LB-Membran homogen anfärben. Die beobachtete allmähliche Verkleinerung des DsRed-Farn-markierten, fusionierten LBs könnte die Aktincoating-vermittelte Surfactantextrusion darstellen (Miklavc et al., 2009b; Tsilibary und Williams, 1983; van Weeren et al., 2004).

Im Rahmen der LB-Fusion nahm die Lamp3-GFP-Fluoreszenzintensität ab. Lamp3-GFP verschwand in keinem der untersuchten Fälle vollständig, sondern schien zum Teil an gewissen Bereichen zu akkumulieren. Es gab keine Anzeichen dafür, dass Lamp3-GFP im Rahmen des Compartment mixing von der LB- in die Plasmamembran diffundiert. Ein weiterer möglicher Verbleib des Lamp3-GFP stellt dessen Internalisierung dar. Eine solche Internalisierung konnte beispielsweise für den ABCA3-Transporter nachgewiesen werden (Bates et al., 2000).

5 Zusammenfassung

Alveolare Typ II Zellen (ATII Zellen) synthetisieren ein oberflächenaktives Substanzgemisch, das sog. Surfactant. Es wird in den Lamellärkörperchen (LBs) gespeichert und in den Alveolarraum sezerniert. Darüber hinaus recyceln ATII Zellen exozytiertes Surfactant. Dies bedingt einen intensiven Membranaustausch zwischen den an der Exo- und Endozytose beteiligten Kompartimenten.

Ziel dieser Arbeit war es, den Austausch von Lipidkomponenten zwischen Plasma- und LB-Membran erstmals mit Life cell imaging Verfahren in diesen Zellen zu untersuchen. Hierfür wurden das Lysosom-assoziierte Membranglykoprotein 3 als Fusionsprotein des grün fluoreszierenden Proteins (Lamp3-GFP) und der farnesylierte Plasmamembranmarker DsRed-Farn entwickelt, die mithilfe eines adenoviralen Expressionssystems in primärkultivierten ATII Zellen überexprimiert wurden. Durch die Fusionsproteine gelang es erstmalig, in lebenden ATII Zellen die LB- und Plasmamembran spezifisch zu markieren und dadurch mikroskopisch in Echtzeit untersuchen zu können. Mit konfokaler Laserscanning Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass Sekretionsstimulanzien den Transport von Plasmamembrananteilen zu den LBs über einen clathrinunabhängigen endosomalen/ lysosomalen Endozytoseweg bewirken. Die Induktion einer clathrinabhängigen Endozytose durch Capsazepin und 2-Aminoethyldiphenylborinat führte zu einer vergleichbaren Akkumulation DsRed-markierter Plasmamembrananteilen auf den LBs, bei gleichzeitiger massiver ultrastruktureller Veränderung der Zellen. In beiden Fällen bildeten sich auf den LBs Domänen aus internalisierten Plasmamembranlipidkomponenten aus. Die LBs stellen somit ein allgemeines Zielorganell für internalisierte Membrankomponenten dar.

Um den Austausch von Membranbestandteilen während der Exozytose zu untersuchen, kam eine neuentwickelte Dunkelfeldtechnik zur Anwendung. Das Fusionsereignis kann durch die Intensitätsabnahme des am LB gestreuten Lichts (scattered light intensity decrease, SLID) detektiert werden. Die LB-Fusion ging mit einer Diffusion des DsRed-Farn in die limitierende LB-Membran einher. Dabei kam es zu einer homogenen Verteilung der Plasmamembrankomponenten über die gesamte Oberfläche des fusionierten LBs.

Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass durch endo- und exozytotische Prozesse DsRed-Farn-markierte Plasmamembranfraktionen auf unterschiedliche Weise in die LB-Membran integriert werden, was gleichzeitig auch die verschiedenen Transportmechanismen (vesikulärer Transport vs. Diffusion) während beider Prozesse wiederspiegelt.

Abstract

Alveolar type II (ATII) cells produce a mixture of surface active substances, so-called surfactant. It is stored in lamellar bodies (LBs) and secreted into the alveolar space. Beside this, ATII cells recycle exocytosed surfactant. This requires an extensive membrane trafficking between exo- and endocytotic compartments.

The aim of the present study was to investigate the exchange of lipid components between plasma membrane and limiting LB membrane with life cell imaging techniques.

Therefore, fusion proteins of lysosome-associated membrane glycoprotein 3 with green fluorescent protein (Lamp3-GFP) and farnesylated plasma membrane marker DsRed-Farn were developed and overexpressed in primary cultivated ATII cells using an adenoviral expression system. This allowed the specific labeling of the plasma and LB membrane in living ATII cells and their investigation in life cell imaging experiments. Using confocal laser scanning microscopy I showed that secretagogues fascilitate the transport of plasma membrane components to the limiting LB membrane via a clathrin-independent endosomal/ lysosomal endocytotic pathway. The induction of clathrin-independent endocytosis by capsazepine and 2-aminoethyldiphenylborinate resulted in a comparable accumulation of DsRed-labeled plasma membrane components on the LB's surface, with a simultaneous massive ultrastructural cell alteration. In both cases, internalized plasma membrane components formed distinct domains at the LBs. Thus, the LBs are the common target organelle of internalized membrane components.

To investigate the exchange of membrane components during exocytosis I used a newly developed darkfield microscopic technique. The fusion event can be detected as an intensity decrease of scattered light at the LB.

In contrast, exocytotic fusion events were accompanied by diffusion of DsRed-Farn into the limiting LB membrane, resulting in a homogenous distribution of DsRed-Farn over the LB membrane.

These results indicate that endo- and exocytotic processes cause a different integration of DsRed-Farn-labeled plasma membrane lipid fractions to the limiting LB membrane, reflecting different transport mechanisms (vesicular transport vs. diffusion) during endo- and exocytotic processes.

6 Literaturverzeichnis

1. Albrecht S, Usmani SM, Dietl P, Wittekindt OH (2010). Plasma Membrane Trafficking in Alveolar Type II Cells. Cell Physiol Biochem 25:81-90.
2. Almers W (1990). Exocytosis. Annu Rev Physiol 52:607-624.
3. Arni S, Keilbaugh SA, Ostermeyer AG, Brown DA (1998). Association of GAP-43 with Detergent-resistant Membranes Requires Two Palmitoylated Cysteine Residues. J Biol Chem 273:28478-28485.
4. Aronheim A, Engelberg D, Li N, al-Alawi N, Schlessinger J, Karin M (1994). Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. Cell 78:949-961.
5. Artalejo CR, Elhamdani A, Palfrey HC (1998). Secretion: dense-core vesicles can kiss-and-run too. Curr Biol 8:R62-R65.
6. Ban N, Matsumura Y, Sakai H, Takanezawa Y, Sasaki M, Arai H, Inagaki N (2007). ABCA3 as a Lipid Transporter in Pulmonary Surfactant Biogenesis. J Biol Chem 282:9628-9634.
7. Bates SR, Fisher AB (1996). Surfactant protein A is degraded by alveolar macrophages. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 271:L258-L266.
8. Bates SR, Kazi AS, Tao JQ, Yu KJ, Gonder DS, Feinstein SI, Fisher AB (2008). Role of P63 (CKAP4) in binding of surfactant protein-A to type II pneumocytes. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 295:L658-L669.
9. Bates SR, Tao JQ, Notarfrancesco K, DeBolt K, Shuman H, Fisher AB (2003). Effect of surfactant protein A on granular pneumocyte surfactant secretion in vitro. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 285:L1055-L1065.
10. Bates SR, Tao JQ, Schaller S, Fisher AB, Shuman H (2000). Lamellar body membrane turnover is stimulated by secretagogues. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 278:L443-L452.
11. Bayer N, Schober D, Prchla E, Murphy RF, Blaas D, Fuchs R (1998). Effect of Bafilomycin A1 and Nocodazole on Endocytic Transport in HeLa Cells: Implications for Viral Uncoating and Infection. J Virol 72:9645-9655.
12. Bertrand CA, Laboisse C, Hopfer U, Bridges RJ, Frizzell RA (2006). Methods for Detecting Internalized, FM 1-43 Stained Particles in Epithelial Cells and Monolayers. Biophys J 91:3872-3883.
13. Brown WJ, DeWald DB, Emr SD, Plutner H, Balch WE (1995). Role for phosphatidylinositol 3-kinase in the sorting and transport of newly synthesized lysosomal enzymes in mammalian cells. J Cell Biol 130:781-796.

14. Burgoyne RD, Morgan A (2003). Secretory Granule Exocytosis. Physiol Rev 83:581-632.
15. Chander A, Reicherter J, Fisher AB (1987). Degradation of dipalmitoyl phosphatidylcholine by isolated rat granular pneumocytes and reutilization for surfactant synthesis. J Clin Invest 79:1133-1138.
16. Chandler DE, Heuser JE (1980). Arrest of membrane fusion events in mast cells by quick-freezing. J Cell Biol 86:666-674.
17. Chen YA, Scheller RH (2001). SNARE-mediated membrane fusion. Nat Rev Mol Cell Biol 2:98-106.
18. Chieregatti E, Meldolesi J (2005). Regulated exocytosis: new organelles for non-secretory purposes. Nat Rev Mol Cell Biol 6:181-187.
19. Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD, Zerial M (1999). The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. Nature 397:621-625.
20. Clements J, Avery M (1998). Lung Surfactant and Neonatal Respiratory Distress Syndrome. Am J Respir Crit Care Med 157:S59-S66.
21. Clements JA (1997). Lung surfactant: A Personal Perspective. Annual Review of Physiology 59:1-21.
22. Dahlin K, Mager EM, Allen L, Tigue Z, Goodglick L, Wadehra M, Dobbs L (2004). Identification of Genes Differentially Expressed in Rat Alveolar Type I Cells. Am J Respir Cell Mol Biol 31:309-316.
23. Denny JB (2006). Molecular Mechanisms, Biological Actions, and Neuropharmacology of the Growth-Associated Protein GAP-43. Curr Neuropharmacol 4:293-304.
24. Dietl P, Frick M, Mair N, Bertocchi C, Haller T (2004). Pulmonary consequences of a deep breath revisited. Biol Neonate 85:299-304.
25. Dietl P, Haller T (2005). Exocytosis of lung surfactant: From the Secretory Vesicle to the Air-Liquid Interface. Annual Review of Physiology 67:595-621.
26. Dobbs LG, Gonzalez R, Williams MC (1986). An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. Am Rev Respir Dis 134:141-145.
27. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV (2001). Loss of Caveolae, Vascular Dysfunction, and Pulmonary Defects in Caveolin-1 Gene-Disrupted Mice. Science 293:2449-2452.
28. Engle WA, and the Committee on Fetus and Newborn (2008). Surfactant-Replacement Therapy for Respiratory Distress in the Preterm and Term Neonate. Pediatrics 121:419-432.

29. Fesce R, Grohovaz F, Valtorta F, Meldolesi J (1994). Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'? Trends Cell Biol 4:1-4.
30. Fisher AB, Chander A, Reicherter J (1987). Uptake and degradation of natural surfactant by isolated rat granular pneumocytes. Am J Physiol Cell Physiol 253:C792-C796.
31. Fisher AB, Dodia C, Chander A (1991). Alveolar uptake of lipid and protein components of surfactant. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 261:L334-L340.
32. Frick M, Bertocchi C, Jennings P, Haller T, Mair N, Singer W, Pfaller W, Ritsch-Marte M, Dietl P (2004). Ca2+ entry is essential for cell strain-induced lamellar body fusion in isolated rat type II pneumocytes. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 286:L210-L220.
33. Frick M, Eschertzhuber S, Haller T, Mair N, Dietl P (2001). Secretion in Alveolar Type II Cells at the Interface of Constitutive and Regulated Exocytosis. Am J Respir Cell Mol Biol 25:306-315.
34. Fujiyama A, Tamanoi F (1990). RAS2 protein of Saccharomyces cerevisiae undergoes removal of methionine at N terminus and removal of three amino acids at C terminus. J Biol Chem 265:3362-3368.
35. Fukuda M (1991). Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. J Biol Chem 266:21327-21330.
36. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. J Gen Virol 36:59-72.
37. Grant BD, Sato M (2006). Intracellular trafficking. WormBook1-9.
38. Griffiths GM (1996). Secretory lysosomes - a special mechanism of regulated secretion in haemopoietic cells. Trends in Cell Biol 6:329-332.
39. Gupta N, Manevich Y, Kazi AS, Tao JQ, Fisher AB, Bates SR (2006). Identification and characterization of p63 (CKAP4/ERGIC-63/CLIMP-63), a surfactant protein A binding protein, on type II pneumocytes. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 291:L436-L446.
40. Haller T, Ortmayr J, Friedrich F, Volkl H, Dietl P (1998). Dynamics of surfactant release in alveolar type II cells. Proc Natl Acad Sci U S A 95:1579-1584.
41. Haller T, Auktor K, Frick M, Mair N, Dietl P (1999). Threshold calcium levels for lamellar body exocytosis in type II pneumocytes. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 277:L893-L900.

42. Han X, Wang CT, Bai J, Chapman ER, Jackson MB (2004). Transmembrane Segments of Syntaxin Line the Fusion Pore of Ca2+-Triggered Exocytosis. Science 304:289-292.
43. Hancock JF, Cadwallader K, Paterson H, Marshall CJ (1991). A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins. EMBO J 10:4033-4039.
44. Harada M, Shakado S, Sakisaka S, Tamaki S, Ohishi M, Sasatomi K, Koga H, Sata M, Tanikawa K (1997). Bafilomycin A1, a specific inhibitor of V-type H+-ATPases, inhibits the acidification of endocytic structures and inhibits horseradish peroxidase uptake in isolated rat sinusoidal endothelial cells. Liver 17:244-250.
45. Harrison T, Graham F, Williams J (1977). Host-range mutants of adenovirus type 5 defective for growth in HeLa cells. Virology 77:319-329.
46. Hawgood S, Clements JA (1990). Pulmonary surfactant and its apoproteins. J Clin Invest 86:1-6.
47. Hertel C, Coulter SJ, Perkins JP (1985). A comparison of catecholamine-induced internalization of beta- adrenergic receptors and receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor in human astrocytoma cells. Inhibition by phenylarsine oxide. J Biol Chem 260:12547-12553.
48. Heuser JE, Reese TS (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. J Cell Biol 57:315-344.
49. Hook GE, Gilmore LB (1982). Hydrolases of pulmonary lysosomes and lamellar bodies. J Biol Chem 257:9211-9220.
50. Jahn R, Lang T, Sudhof TC (2003). Membrane fusion. Cell 112:519-533.
51. Jain D, Dodia C, Fisher AB, Bates SR (2005). Pathways for clearance of surfactant protein A from the lung. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 289:L1011-L1018.
52. Johnson EE, Overmeyer JH, Gunning WT, Maltese WA (2006). Gene silencing reveals a specific function of hVps34 phosphatidylinositol 3-kinase in late versus early endosomes. J Cell Sci 119:1219-1232.
53. Jones AT, Mills IG, Scheidig AJ, Alexandrov K, Clague MJ (1998). Inhibition of Endosome Fusion by Wortmannin Persists in the Presence of Activated rab5. Mol Biol Cell 9:323-332.
54. Kliewer M, Fram EK, Brody AR, Young SL (1985). Secretion of surfactant by rat alveolar type II cells: morphometric analysis and three-dimensional reconstruction. Exp Lung Res 9:351-361.

55. Kobayashi T, Vischer UM, Rosnoblet C, Lebrand C, Lindsay M, Parton RG, Kruithof EKO, Gruenberg J (2000). The Tetraspanin CD63/lamp3 Cycles between Endocytic and Secretory Compartments in Human Endothelial Cells. Mol Biol Cell 11:1829-1843.
56. Koh DS, Moody MW, Nguyen TD, Hille B (2000). Regulation of Exocytosis by Protein Kinases and Ca2+ in Pancreatic Duct Epithelial Cells. J Gen Physiol 116:507-520.
57. Kuroki Y, Mason RJ, Voelker DR (1988). Chemical modification of surfactant protein A alters high affinity binding to rat alveolar type II cells and regulation of phospholipid secretion. J Biol Chem 263:17596-17602.
58. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM: Lipidbiosynthese. In: Tschesche H (Hrsg) Prinzipien der Biochemie, 2. Auflage, Spektrum Akad. Verl., S. 782 (1994)
59. Llorente A, van Deurs B, Garred O, Eker P, Sandvig K (2000). Apical endocytosis of ricin in MDCK cells is regulated by the cyclooxygenase pathway. J Cell Sci 113:1213-1221.
60. Luzio JP, Parkinson MD, Gray SR, Bright NA (2009). The delivery of endocytosed cargo to lysosomes. Biochem Soc Trans 37:1019-1021.
61. Luzio JP, Rous BA, Bright NA, Pryor PR, Mullock BM, Piper RC (2000). Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. J Cell Sci 113:1515-1524.
62. Maecker HT, Todd SC, Levy S (1997). The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. FASEB J 11:428-442.
63. Magee T, Hanley M (1988). Protein modification. Sticky fingers and CAAX boxes. Nature 335:114-115.
64. Malacombe M, Bader MF, Gasman S (2006). Exocytosis in neuroendocrine cells: new tasks for actin. Biochim Biophys Acta 1763:1175-1183.
65. Matsumura Y, Ban N, Ueda K, Inagaki N (2006). Characterization and Classification of ATP-binding Cassette Transporter ABCA3 Mutants in Fatal Surfactant Deficiency. J Biol Chem 281:34503-34514.
66. Max-Planck-Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik, http://www.mpg.de/bilderBerichteDokumente/dokumentation/pressemitteilungen/2006/pressemitteilung200607141/index.html
67. Mellman I, Warren G (2000). The road taken: past and future foundations of membrane traffic. Cell 100:99-112.
68. Miklavc P, Albrecht S, Wittekindt OH, Schullian P, Haller T, Dietl P (2009a). Existence of exocytotic hemifusion intermediates with a lifetime of up to seconds in type II pneumocytes. Biochem J 424:7-14.

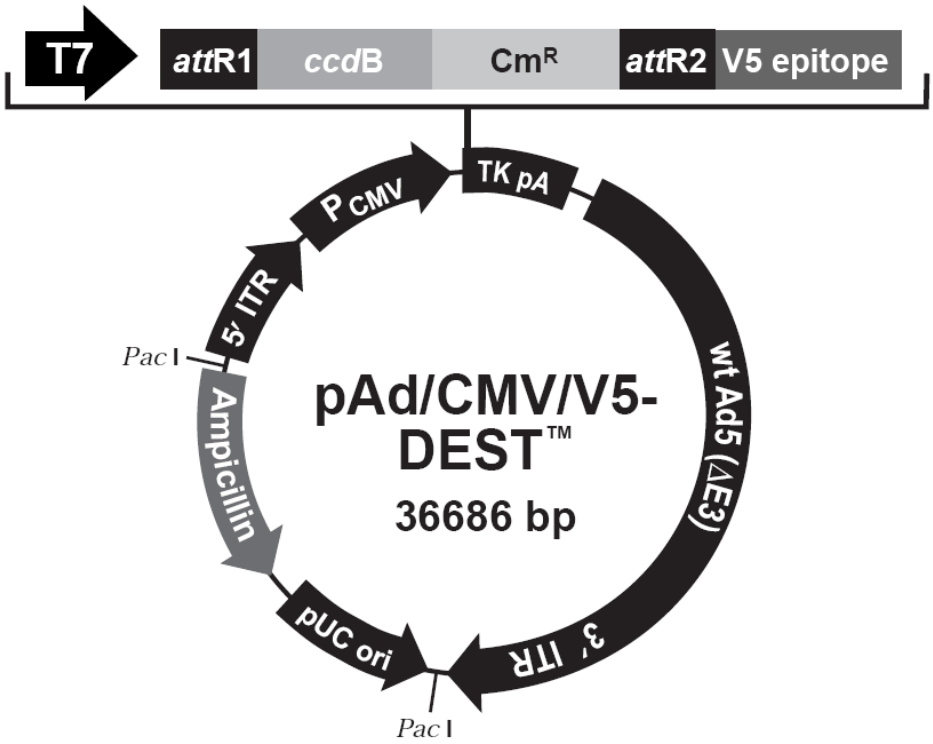
69. Miklavc P, Wittekindt OH, Felder E, Dietl P (2009b). Ca2+-dependent actin coating of lamellar bodies after exocytotic fusion: a prerequisite for content release or kiss-and-run. Ann N Y Acad Sci 1152:43-52.:43-52.
70. Mills IG, Jones AT, Clague MJ (1998). Involvement of the endosomal autoantigen EEA1 in homotypic fusion of early endosomes. Curr Biol 8:881-884.
71. Miyamoto K, Segawa H, Ito M, Kuwahata M (2004). Physiological regulation of renal sodium-dependent phosphate cotransporters. Jpn J Physiol 54:93-102.
72. Monck JR, varez de TG, Fernandez JM (1990). Tension in secretory granule membranes causes extensive membrane transfer through the exocytotic fusion pore. Proc Natl Acad Sci U S A 87:7804-7808.
73. Mu FT, Callaghan JM, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton RG, Campbell PL, McCluskey J, Yeo JP, Tock EPC, Toh BH (1995). EEA1, an Early Endosome-Associated Protein. J Biol Chem 270:13503-13511.
74. Mulugeta S, Gray JM, Notarfrancesco KL, Gonzales LW, Koval M, Feinstein SI, Ballard PL, Fisher AB, Shuman H (2002). Identification of LBM180, a Lamellar Body Limiting Membrane Protein of Alveolar Type II Cells, as the ABC Transporter Protein ABCA3. J Biol Chem 277:22147-22155.
75. Nabi IR, Le PU (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. J Cell Biol 161:673-677.
76. Neher E (1998). Vesicle pools and Ca2+ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. Neuron 20:389-399.
77. Nemoto T, Kojima T, Oshima A, Bito H, Kasai H (2004). Stabilization of Exocytosis by Dynamic F-actin Coating of Zymogen Granules in Pancreatic Acini. J Biol Chem 279:37544-37550.
78. Nguyen TD, Moody MW, Savard CE, Lee SP (1998). Secretory effects of ATP on nontransformed dog pancreatic duct epithelial cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 275:G104-G113.
79. Ostrowicz CW, Meiringer CT, Ungermann C (2008). Yeast vacuole fusion: a model system for eukaryotic endomembrane dynamics. Autophagy 4:5-19.
80. Patzak A, Winkler H (1986). Exocytotic exposure and recycling of membrane antigens of chromaffin granules: ultrastructural evaluation after immunolabeling. J Cell Biol 102:510-515.
81. Pian MS, Dobbs LG, Duzgunes N (1988). Positive correlation between cytosolic free calcium and surfactant secretion in cultured rat alveolar type II cells. Biochim Biophys Acta 960:43-53.

82. Playfor SD, Nootigattu VK (2006). Exogenous surfactant in paediatric Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome. Curr Drug Saf 1:159-168.
83. Presley JF, Mayor S, McGraw TE, Dunn KW, Maxfield FR (1997). Bafilomycin A1 Treatment Retards Transferrin Receptor Recycling More than Bulk Membrane Recycling. J Biol Chem 272:13929-13936.
84. Reaves BJ, Bright NA, Mullock BM, Luzio JP (1996). The effect of wortmannin on the localisation of lysosomal type I integral membrane glycoproteins suggests a role for phosphoinositide 3-kinase activity in regulating membrane traffic late in the endocytic pathway. J Cell Sci 109:749-762.
85. Rider ED, Ikegami M, Jobe AH (1992). Localization of alveolar surfactant clearance in rabbit lung cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 263:L201-L209.
86. Rothberg KG, Ying YS, Kamen BA, Anderson RG (1990). Cholesterol controls the clustering of the glycophospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. J Cell Biol 111:2931-2938.
87. Ruckert P, Bates SR, Fisher AB (2003). Role of clathrin- and actin-dependent endocytotic pathways in lung phospholipid uptake. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284:L981-L989.
88. Ryan RM, Morris RE, Rice WR, Ciraolo G, Whitsett JA (1989). Binding and uptake of pulmonary surfactant protein (SP-A) by pulmonary type II epithelial cells. J Histochem Cytochem 37:429-440.
89. Ryan US, Ryan JW, Smith DS (1975). Alveolar type II cells: studies on the mode of release of lamellar bodies. Tissue Cell 7:587-599.
90. Schaller-Bals S, Bates SR, Notarfrancesco K, Tao JQ, Fisher AB, Shuman H (2000). Surface-expressed lamellar body membrane is recycled to lamellar bodies. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279:L631-L640.
91. Schmitz G, Muller G (1991). Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. J Lipid Res 32:1539-1570.
92. Schneider SW (2001). Kiss and Run Mechanism in Exocytosis. Journal of Membrane Biology 181:67-76.
93. Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J (1994). Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. J Cell Biol 127:1217-1232.

94. Simonsen A, Lippe R, Christoforidis S, Gaullier JM, Brech A, Callaghan J, Toh BH, Murphy C, Zerial M, Stenmark H (1998). EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. Nature 394:494-498.
95. Skene JH, Virag I (1989). Posttranslational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neuronal growth cone protein, GAP-43. J Cell Biol 108:613-624.
96. Smart EJ, Estes K, Anderson RG (1995). Inhibitors that block both the internalization of caveolae and the return of plasmalemmal vesicles. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 60:243-8.:243-248.
97. Sokac AM, Co C, Taunton J, Bement W (2003). Cdc42-dependent actin polymerization during compensatory endocytosis in Xenopus eggs. Nat Cell Biol 5:727-732.
98. Sokac AM, Bement WM (2006). Kiss-and-Coat and Compartment Mixing: Coupling Exocytosis to Signal Generation and Local Actin Assembly. Mol Biol Cell 17:1495-1502.
99. Stevens PA, Wissel H, Zastrow S, Sieger D, Zimmer KP (2001). Surfactant protein A and lipid are internalized via the coated-pit pathway by type II pneumocytes. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 280:L141-L151.
100. Takano M, Koyama Y, Nishikawa H, Murakami T, Yumoto R (2004). Segment-selective absorption of lysozyme in the intestine. Eur J Pharmacol 502:149-155.
101. Tsilibary EC, Williams MC (1983). Actin in peripheral rat lung: S1 labeling and structural changes induced by cytochalasin. J Histochem Cytochem 31:1289-1297.
102. Usmani SM, Fois G, Albrecht S, von Aulock S, Dietl P, Wittekindt OH (2010). 2-APB and Capsazepine-induced Ca^{2+} Influx Stimulates Clathrin-dependent Endocytosis in Alveolar Epithelial Cells. Cell Physiol Biochem 25:91-102.
103. Valtorta F, Meldolesi J, Fesce R (2001). Synaptic vesicles: is kissing a matter of competence? Trends Cell Biol 11:324-328.
104. van Weeren L, de Graaff AM, Jamieson JD, Batenburg JJ, Valentijn JA (2004). Rab3D and Actin Reveal Distinct Lamellar Body Subpopulations in Alveolar Epithelial Type II Cells. Am J Respir Cell Mol Biol 30:288-295.
105. Villarreal MR (2008). http://de.wikibooks.org/wiki/Lunge:_Allgemeines
106. Visser CC, Stevanovi-ç S, Voorwinden LH, Gaillard PJ, Crommelin DJA, Danhof M, de Boer AG (2004). Validation of the Transferrin Receptor for Drug Targeting to Brain Capillary Endothelial Cells in Vitro. Journal of Drug Targeting 12:145-150.

107. Voorhout WF, Weaver TE, Haagsman HP, Geuze HJ, Van Golde LM (1993). Biosynthetic routing of pulmonary surfactant proteins in alveolar type II cells. Microsc Res Tech 26:366-373.
108. Wadsworth SJ, Spitzer AR, Chander A (1997). Ionic regulation of proton chemical (pH) and electrical gradients in lung lamellar bodies. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 273:L427-L436.
109. Wasano K, Hirakawa Y (1994). Lamellar bodies of rat alveolar type 2 cells have late endosomal marker proteins on their limiting membranes. Histochemistry 102:329-335.
110. Wemhoner A, Frick M, Dietl P, Jennings P, Haller T (2006). A Fluorescent Microplate Assay for Exocytosis in Alveolar Type II Cells. J Biomol Screen 11:286-295.
111. Wightman RM, Haynes CL (2004). Synaptic vesicles really do kiss and run. Nat Neurosci 7:321-322.
112. Wirtz HR, Dobbs LG (1990). Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells. Science 250:1266-1269.
113. Wissel H, Looman AC, Fritzsche I, Rustow B, Stevens PA (1996). SP-A-binding protein BP55 is involved in surfactant endocytosis by type II pneumocytes. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 271:L432-L440.
114. Wissel H, Lehfeldt A, Klein P, Muller T, Stevens PA (2001). Endocytosed SP-A and surfactant lipids are sorted to different organelles in rat type II pneumocytes. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 281:L345-L360.
115. Wissel H, Zastrow S, Richter E, Stevens PA (2000). Internalized SP-A and lipid are differentially resecreted by type II pneumocytes. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 278:L580-L590.
116. Wright JR (1990). Clearance and recycling of pulmonary surfactant. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 259:L1-12.
117. Wright JR, Borchelt JD, Hawgood S (1989). Lung surfactant apoprotein SP-A (26-36 kDa) binds with high affinity to isolated alveolar type II cells. Proc Natl Acad Sci U S A 86:5410-5414.
118. Wright JR, Clements JA (1987). Metabolism and turnover of lung surfactant. Am Rev Respir Dis 136:426-444.
119. Young SL, Wright JR, Clements JA (1989). Cellular uptake and processing of surfactant lipids and apoprotein SP-A by rat lung. J Appl Physiol 66:1336-1342.
120. Yu HY, Bement WM (2007). Control of local actin assembly by membrane fusion-dependent compartment mixing. Nat Cell Biol 9:149-159.

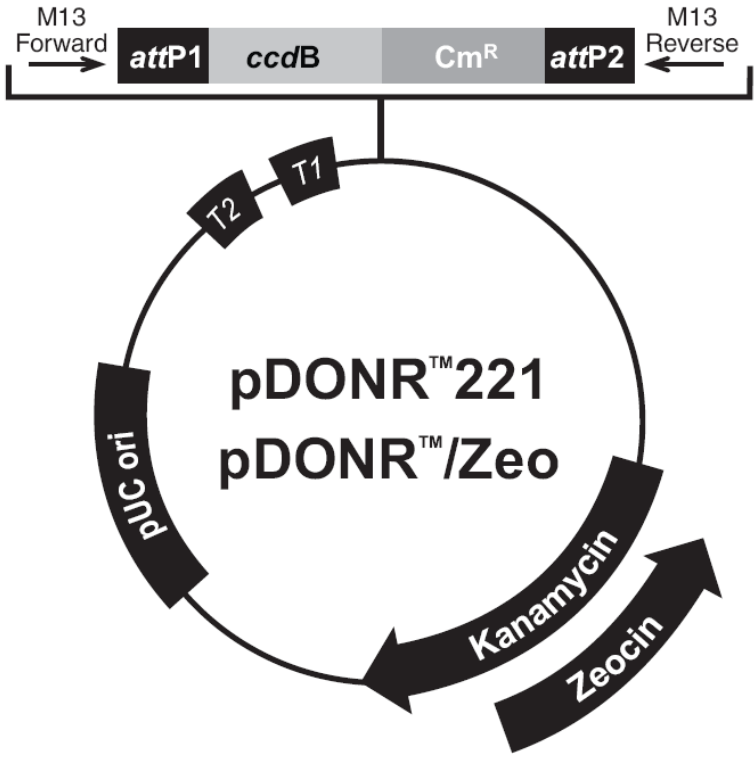
Anhang



Comments for pAd/CMV/V5-DEST™
36686 nucleotides

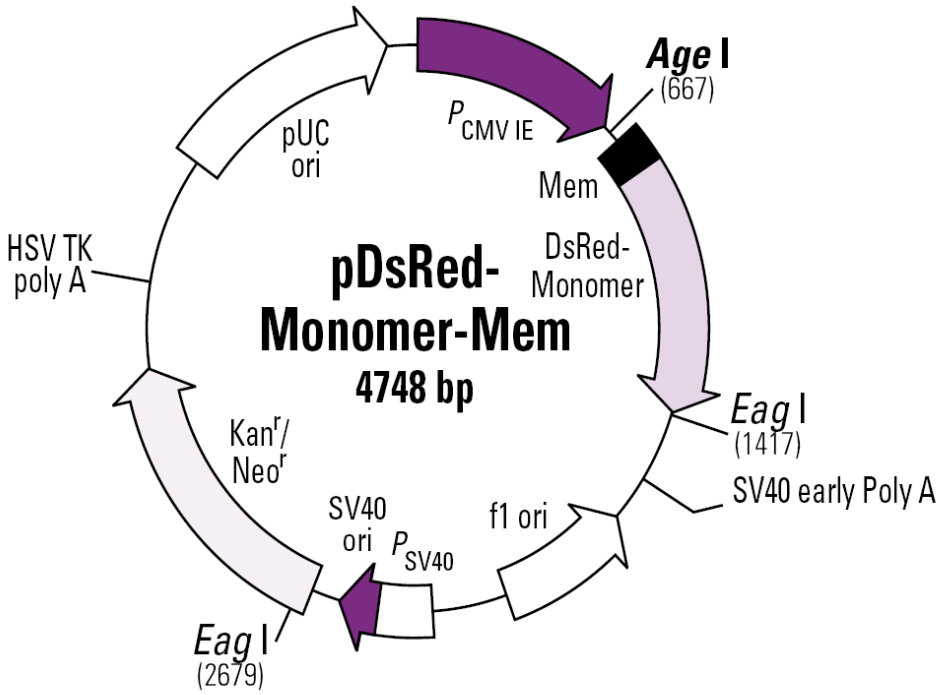
Human Ad5 sequences (wt 1-458; includes 5′ L-ITR and packaging signal): 1-458
pAd forward priming site: bases 361-384
CMV promoter: bases 728-1315
T7 promoter/priming site: bases 1359-1378
*att*R1 site: bases 1407-1531
*ccd*B gene: bases 1960-2265 (C)
Chloramphenicol resistance gene (Cm^R): bases 2607-3266 (C)
*att*R2 site: bases 3547-3671
V5 epitope: bases 3697-3738
TK polyadenylation signal: bases 3765-4036
Human Ad5 sequences (wt 3513-35935; E3 region deleted, includes 3′ R-ITR): bases 4056-34604
pAd reverse priming site: bases 4059-4082
pUC origin: bases 34781-35442 (C)
Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 35568-36428 (C)
bla promoter: bases 36429-36527 (C)
Pac I restrictions sites: bases 34610 and 36684
(C) = complementary strand

Abbildung 30 Genkarte und Beschreibung des *pAd/CMV/V5-DEST™*–Vektor. (Information Invitrogen)



Comments for:	**pDONR™221** **4762 nucleot**
*rrn*B T2 transcription termination sequence (c):	268-295
rrnB T1 transcription termination sequence (c):	427-470
M13 Forward (-20) priming site:	537-552
*att*P1:	570-801
*ccd*B gene (c):	1197-1502
Chloramphenicol resistance gene (c):	1847-2506
*att*P2 (c):	2754-2985
T7 Promoter/priming site (c):	3000-3019
M13 Reverse priming site:	3027-3043
Kanamycin resistance gene:	3156-3965
EM7 promoter (c):	---
Zeocin resistance gene (c):	---
pUC origin:	4086-4759

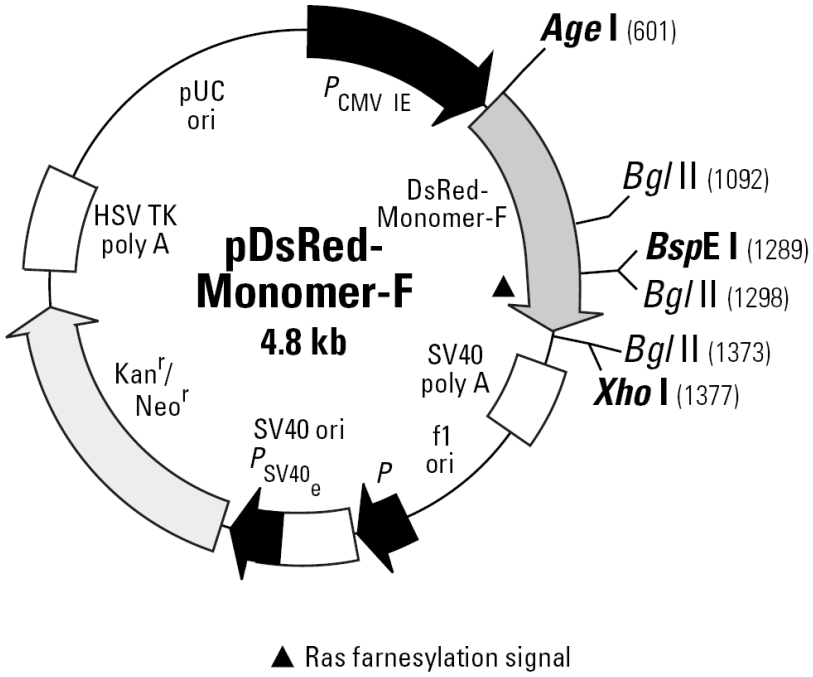
Abbildung 31 Genkarte und Beschreibung des *pDONR™*221-Vektor. (Information Invitrogen)



Location of features

- Human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter: 1–589
  Enhancer region: 59–465; TATA box: 554–560
- DsRed-Monomer-Mem fusion gene
  Start codon (ATG): 679–681
  Neuromodulin N-terminal sequence: 679–738
  Discosoma sp. monomeric red fluorescent protein (DsRed-Monomer) gene: 739–1410
  Stop codon: 1411–1413
- SV40 early mRNA polyadenylation signal
  Polyadenylation signals: 1567–1572 & 1596-1601; mRNA 3′ ends: 1605 & 1617
- f1 single-strand DNA origin: 1664–2119 (packages the noncoding strand of DsRed-Monomer)
- Bacterial promoter for expression of Kan^r gene
  –35 region: 2181-2186; –10 region: 2204–2209
- SV40 origin of replication: 2460–2598
- SV40 early promoter
  Enhancer (72 bp tandem repeats): 2293–2364 & 2365–2436
  21 bp repeats: 2440–2460, 2461–2481 & 2483–2503
  Early promoter element: 2516–2522
- Kanamycin/neomycin resistance gene
  Neomycin phosphotransferase coding sequences:
  Start codon (ATG): 2644–2646; stop codon: 3436–3438
- Herpes simplex virus (HSV) thymidine kinase (TK) polyadenylation signal
  Polyadenylation signals: 3674–3679 & 3687–3692
- pUC plasmid replication origin: 4023–4666

Abbildung 32 Genkarte und Beschreibung des *pDsRed-Monomer-Mem*-Vektor. (Information Clontech)



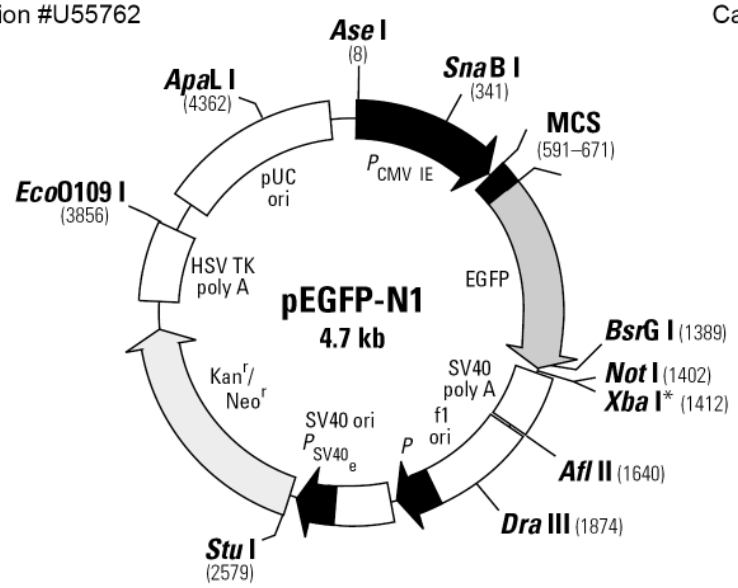
Location of features:

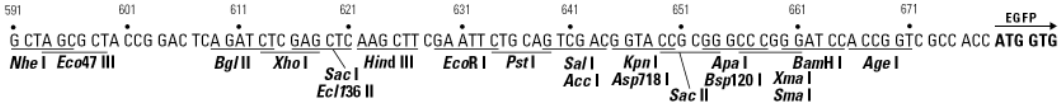
- Human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter: 1–589
  - Enhancer region: 59–465; TATA box: 554–560
  - Transcription start point: 583
  - C→G mutation to remove *Sac* I site: 569
- Farnesylated monomeric red fluorescent protein (DsRed-Monomer-F) gene
  - Kozak consensus translation initiation site: 606–616
  - Start codon (ATG): 613–615; Stop codon: 1363–1365
  - Last amino acid in DsRed-Monomer: 1285–1287
  - c-Ha-Ras farnesylation signal: 1303–1365
- SV40 early mRNA polyadenylation signal
  - Polyadenylation signals: 1583–1588 & 1612–1617; mRNA 3' ends: 1621 & 1633
- f1 single-strand DNA origin: 1680–2135 (packages the noncoding strand of DsRed-Monomer)
- Bacterial promoter for expression of Kan^r gene
  - –35 region: 2197–2202; –10 region: 2220–2225
  - Transcription start point: 2232
- SV40 origin of replication: 2476–2611
- SV40 early promoter
  - Enhancer (72-bp tandem repeats): 2309–2380 & 2382–2452
  - 21-bp repeats: 2456–2476, 2477–2497 & 2499–2519
  - Early promoter element: 2532–2538
  - Major transcription start points: 2528, 2566, 2572 & 2577
- Kanamycin/neomycin resistance gene
  - Neomycin phosphotransferase coding sequences:
  - Start codon (ATG): 2660–2662; stop codon: 3452–3454
  - G→A mutation to remove *Pst* I site: 2842
  - C→A (Arg to Ser) mutation to remove *Bss*H II site: 3188
- Herpes simplex virus (HSV) thymidine kinase (TK) polyadenylation signal
  - Polyadenylation signals: 3690–3695 & 3703–3708
- pUC plasmid replication origin: 4039–4682

Abbildung 33 Genkarte und Beschreibung des *pDsRed-Monomer-F*-Vektor. (Information Clontech)

pEGFP-N1 Vector Information PT3027-5

GenBank Accession #U55762 Catalog #6085-1





Restriction Map and Multiple Cloning Site (MCS) of pEGFP-N1 Vector. All restriction sites shown are unique. The *Not* I site follows the EGFP stop codon. The *Xba* I site (*) is methylated in the DNA provided by BD Biosciences Clontech. If you wish to digest the vector with this enzyme, you will need to transform the vector into a *dam*⁻ and make fresh DNA.

Abbildung 34 Genkarte und Beschreibung des *pEGFP-N1*-Vektor. (Information Clontech)

Danksagung

Die Zeit der Mitarbeit im Institut der Allgemeinen Physiologie unter Leitung von Herrn Prof. Paul Dietl gehört sicherlich zu den eindrücklichsten Abschnitten meines Studiums. Hierfür bedanke ich mich bei Herrn Prof. Paul Dietl, sowie für die freundliche Aufnahme in seinem Institut und für seine Unterstützung während dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Oliver H. Wittekindt bedanken ohne dessen Wissen, Geduld und Hilfe diese Arbeit, sowie die daraus hervorgegangene Publikation nie entstanden wäre. Seine fortwährende und kompetente Betreuung und Diskussionsbereitschaft half mir, den Weg in die bis dahin unbekannte wissenschaftliche Arbeit zu finden. Durch seine große fachliche Kompetenz und Menschlichkeit schaffte er es, eine produktive und freundliche Atmosphäre zu schaffen, welche mir immer wieder über die alltäglichen Schwierigkeiten des Experimentierens hinweg halfen. Auf diesem Weg wünsche ich ihm viel Glück und Erfolg für die Zukunft.

Dr. Schiebe danke ich für die Übermittlung seiner Begeisterung für die Physiologie. Dr. Edward Felder für seine fachkundige Unterstützung, besonders „mikroskopischer Art". Herzlichen Dank an Melanie Timmler und Tatjana Felder für die Isolation der Zellen und die technische Unterstützung. Dr. Pika Miklavc u. a. für Ihre Hilfe am Richardson Mikroskop. Ganz besonderen Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts der Allgemeinen Physiologie, insbesondere Herrn Dr. med. Axel Gerstmair.

Prof. Walther der Sektion Elektronenmikroskopie und seinen Mitarbeitern Herrn Weih und Herrn Schmid schulde ich Dank für die Möglichkeit der Benutzung und die Unterstützung an den Elektronenmikroskopen, sowie der Präparateherstellung.

Prof. Haller und den Mitarbeitern des Instituts für Physiologie und Balneologie der Universität Innsbruck für die Betreuung, Diskussionsbereitschaft und die Realisierung meines Aufenthaltes in Innsbruck.

Dem Dekanat der Medizinischen Fakultät der Uni Ulm danke ich für die Bereitstellung eines Promotionsstipendiums. Außerdem bedanke ich mich bei den anderen Stipendiaten des Promotionsprogramms, sowie Prof. Wirth und Prof. Barth für ihre Anregungen und Diskussionsbeiträge.

Ganz zum Schluss möchte ich mich bei meinen Eltern und meinen beiden Geschwistern Jürgen und Christiane dafür bedanken, dass sie mich auf meinem bisherigen Lebensweg immer unterstützt und stets an mich geglaubt haben, sowie bei allen Freunden, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.