

Site.4

Aus der Abteilung Psychiatrie und Psychotherapie  
(komm. Leiter Prof. Dr. med. B. Bandelow)  
im Zentrum Psychosoziale Medizin  
der medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# Cholesterin-abhängige subzelluläre Lokalisation von Flotillin

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Jan Sievert Weiss

aus  
Braunschweig

Berlin 2012

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichtstatterin: PD Dr. med. A. Schneider

II. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. F. S. Wouters

Tag der mündlichen Prüfung: 15. April 2013

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Tabellenverzeichnis	iv
Abbildungsverzeichnis	v
Abkürzungsverzeichnis	vi
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Flotillin	1
1.1.1 Expressionsmuster in verschiedenen Zelltypen und intrazelluläre Lokalisation	2
1.1.2 Struktur von Flotillin	2
1.1.2.1 SPFH-Sequenz	2
1.1.2.2 Flotillin-Domäne	3
1.1.2.3 Membranassoziation	4
1.1.2.4 CRAC-Domäne	4
1.1.3 Funktionen von Flotillin	4
1.1.3.1 Signaltransduktion	4
1.1.3.2 Flotillin-abhängige Endozytose	5
1.1.3.3 Zytoskeletumbau	5
1.1.3.4 Pathophysiologische Bedeutung	5
1.2 Cholesterin	6
1.2.1 Physiologie	6
1.2.1.1 Homöostase des Cholesterinhaushalts	6
1.2.1.2 Besonderheiten des Cholesterinmetabolismus im ZNS	9

1.3	Morbus Niemann-Pick Typ C . . . . .	9
1.4	Exosomen . . . . .	12
1.5	Ziele der Arbeit . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	Material . . . . .	14
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsgüter . . . . .	14
2.1.2	Zelllinien . . . . .	14
2.1.3	Antikörper . . . . .	14
2.1.4	Oligonukleotide . . . . .	15
2.1.4.1	Plasmide . . . . .	15
2.1.5	Modifikatoren der Cholesterin-Homöostase in der Zelle . .	16
2.1.6	Lösungen und Puffer . . . . .	16
2.1.6.1	Phosphatpuffer in Kochsalzlösung (PBS) . . . . .	16
2.1.6.2	CHAPS-Lysepuffer . . . . .	17
2.1.6.3	Ladepuffer für Proteine . . . . .	17
2.1.7	Medien und Seren . . . . .	18
2.1.8	Software . . . . .	19
2.2	Methoden . . . . .	19
2.2.1	Molekularbiologie . . . . .	19
2.2.1.1	Site-Directed Mutagenesis . . . . .	19
2.2.1.2	E. Coli-Transformation . . . . .	20
2.2.1.3	Isolation von Plasmid-DNA aus E. Coli . . . . .	20
2.2.1.4	DNA-Konzentrationsbestimmung . . . . .	20
2.2.2	Kryokonservierung der Zellen . . . . .	21
2.2.3	Kultivierung der Zellen . . . . .	21
2.2.3.1	Modifikation der Cholesterin-Homöostase in der Zelle . . . . .	22
2.2.3.2	Beeinflussung des Zytoskeletts . . . . .	24
2.2.3.3	Plasmidtransfektion . . . . .	24
2.2.4	Protein- und Lipidbiochemie . . . . .	24
2.2.4.1	Zellysate . . . . .	24
2.2.4.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen . . . . .	24
2.2.4.3	SDS-Page . . . . .	25
2.2.4.4	Western Blot . . . . .	26

2.2.5	Immunzytochemie . . . . .	26
2.2.5.1	Färbung mittels Immunfluoreszenz . . . . .	26
2.2.5.2	Färbung mit Filipin . . . . .	27
2.2.6	Mikroskopie . . . . .	28
2.2.7	Bildbearbeitung und statistische Auswertung . . . . .	28
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
3.1	Die Verteilung von Flotillin in der Zelle . . . . .	30
3.1.1	Subzelluläre Lokalisation und Verteilung von Flotillin . . .	30
3.1.2	Depletion von Cholesterin führt zu einer Umverteilung von Flotillin hin zur Plasmamembran . . . . .	31
3.1.3	Zufuhr von freiem Cholesterin führt zu einer endosomalen Akkumulation von Flotillin . . . . .	33
3.1.4	Einfluss der putativen <i>Cholesterol Recognition/ Interaction Domäne</i> auf die Cholesterin-abhängige Umverteilung von Flotillin . . . . .	37
3.1.5	Cholesterin-abhängige Umverteilung in Abhängigkeit vom zytoskelettalen System . . . . .	38
3.2	Der Einfluss von Cholesterin auf die Expressionsrate von Flotillin	41
3.2.1	Depletion von Cholesterin hat keinen Effekt auf die Expres- sion Flotillins . . . . .	41
3.2.2	Erhöhung der zellulären Cholesterinkonzentration hat kei- nen Effekt auf die Expression Flotillins . . . . .	41
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse . . . . .	44
3.3.1	Publikation der Ergebnisse . . . . .	44
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>50</b>

# Tabellenverzeichnis

2.1	Zelllinien . . . . .	15
2.2	Primärantikörper . . . . .	15
2.3	Plasmide . . . . .	15
2.4	Cholesterinmodifikatoren . . . . .	16
2.5	Medien und Lösungen . . . . .	18
2.6	Kommerzielle Kits . . . . .	19
2.7	Software . . . . .	19
2.8	Transfektionsansätze . . . . .	24

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Struktur von Flotillin . . . . .	3
1.2	Intrazellulärer Cholesterintransport und NPC . . . . .	11
2.1	Quantifizierung der Verteilung . . . . .	28
3.1	Flotillin-2 wird durch Depletion von Cholesterin in die PM umverteilt	32
3.2	Zufuhr von Cholesterin führt zur intrazellulären Umverteilung von Flotillin . . . . .	34
3.3	Cholesterinakkumulation führt zur Umverteilung von Flotillin in endosomale Kompartimente . . . . .	36
3.4	Die CRAC-Domänen beeinflussen die subzelluläre Lokalisation von Flotillin . . . . .	38
3.5	Die Cholesterin-abhängige Umverteilung benötigt ein intaktes Zy- toskelett . . . . .	40
3.6	Die Expressionsrate von Flotillin zeigt keine Abhängigkeit von Cholesterin . . . . .	43



# Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$	Beta-Amyloid-Peptid
ABCA1	ATP-binding cassette transporter 1
AD	Alzheimer-Erkrankung
apo	Apolipoprotein
CRAC	Cholesterol recognition/interaction consensus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr Virus
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
FCS	Fetales Kälberserum
flot-1/-2	Flotillin-1/-2
g	Gramm
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GTPase	Guanin-Triphosphatase
h	Stunde(n)
HDL	High-density-Lipoprotein
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
ILV	Intraluminale Vesikel
LAMP-1	Lysosomal-associated membrane protein 1
LDL	Low-density-Lipoprotein
m $\beta$ CD	Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin
min	Minute(n)
MLD	Metachromatische Leukodystrophie
MVB	Multi-vesicular body
NPC	Niemann-Pick Typ C
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PBR	Peripheral type benzodiazpine receptor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PLP	Proteolipid Protein
PM	Plasmamembran
Rab	ras-like proteine in brain
RNA	Ribonukleinsäure
SCAP	SREBP-cleavage-activating Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
SH3-Domäne	SRC homology 3 -Domäne
SoHo-Domäne	Sorbin-Homologie-Domäne
SPFH	Stomatin/Prohibitin/Flotillin/hflK/C
SREBP	Sterol-regulatory element-binding Protein
START-Protein	StAR-related acute regulatory Protein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
U18666A	3- $\beta$ -[(2-diethyl-amino)ethoxy]androst-5-en-17-one
ZNS	Zentrales Nervensystem

# Danksagung

Meinen herzlichen Dank möchte ich meiner Betreuerin Anja Schneider aussprechen, ohne deren unermüdliche und immerwährende Anleitung und Unterstützung die Erstellung dieser Arbeit niemals möglich gewesen wäre.

Mikael Simons möchte ich dafür danken, dass er mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und seine wissenschaftliche Erfahrung mit mir geteilt hat.

Desweiteren freue ich mich die Mitglieder dieser Arbeitsgruppe (weiter) kennen- und schätzen gelernt zu haben, als da wären: Armin Sturm, Giselheid Schulz, Angelika Kippert, Dirk Fitzner, Katharina Trajkovic, Chieh Hsu, Larisa Yurlova und Karla Hans.

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Flotillin

Die Familie der Flotilline zählt zwei homologe Proteine zu ihren Mitgliedern: Flotillin-1 und Flotillin-2. Sie sind ubiquitär in allen Zelltypen vorhanden (Volonte et al. 1999, Babuke und Tikkanen 2007). Die Tatsache, dass man diese oder homologe Varianten auch in Pflanzen, Bakterien und Pilzen identifizieren konnte (Edgar und Polak 2001, Borner et al. 2005), machen sie zu evolutionär hoch konservierten Proteinen (Galbiati et al. 1998, Málaga-Trillo et al. 2002). Das apparente Molekulargewicht liegt bei ca. 47 kDa (Babuke und Tikkanen 2007). Das Gen für Flotillin-1 liegt beim Menschen auf Chromosom 6 und für Flotillin-2 auf Chromosom 17 (Cho et al. 1995, Bickel et al. 1997). Drei Gruppen haben die Flotilline in unterschiedlichen Zusammenhängen gefunden: Schroeder et al. (1994) haben sie als erstes publiziert, nachdem sie die komplementäre DNA zu einer verkürzten Version von Flotillin-2 fanden, welche sie *epidermal surface antigen* (ESA) benannten. Als sogenannte *reggies* wurden sie kurze Zeit später von Schulte et al. (1997) publiziert, die zwei Proteine identifizierten, die bei der Axonregeneration nach Läsion des Optikusnervs eines Goldfischs eine Rolle spielten. Im gleichen Jahr isolierten Bickel et al. (1997) die beiden Proteine als Bestandteil einer Triton-unlöslichen, flottierenden Lipidfraktion aus dem Lungengewebe der Maus und nannten sie *Flotilline*.

### 1.1.1 Expressionsmuster in verschiedenen Zelltypen und intrazelluläre Lokalisation

Im Zebrafisch (*Danio rerio*) und im Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) hat man die Flotilline ubiquitär, aber stark exprimiert in neuronalem Gewebe gefunden (von Philipsborn et al. 2005, Pandur et al. 2004). Beim Säugetier sind Flotillin-1 und Flotillin-2 in allen Zelltypen ubiquitär exprimiert, aber ebenfalls neuronal angereichert (Volonte et al. 1999, Rajendran et al. 2003, Babuke und Tikkanen 2007). Die intrazelluläre Lokalisation der Flotilline ist vom Zelltyp abhängig. In vielen Zelltypen sind sie hauptsächlich an der Plasmamembran (PM) lokalisiert, wo sie in cholesterin- und sphingolipidreichen Membransubdomänen, den sog. *lipid rafts* angereichert sind. Flotillin-1 und Flotillin-2 bilden Homo- und Heterooligomere und finden sich assoziiert an verschiedene zelluläre Membranen, u.a. die Plasmamembran (Stuermer et al. 2001, Kokubo et al. 2003), in endosomalen Kompartimenten (de Gassart et al. 2003, Langui et al. 2004), Exosomen (Trajkovic et al. 2008), dem Golgiapparat (Gkantiragas et al. 2001) und in Lipid-droplets (Reuter et al. 2004, Liu et al. 2005). Ein überlappender Aufenthaltsort der beiden Proteine ist in den meisten Zelltypen zu finden. Dort, wo sich Unterschiede zeigten, hielt sich Flotillin-2 an der PM und Flotillin-1 an intrazellulären Organellen auf.

### 1.1.2 Struktur von Flotillin

#### 1.1.2.1 SPFH-Sequenz

Die Flotilline sind zytosolische Proteine und über eine *hairpin*-ähnliche Struktur mit der PM assoziiert, ohne diese zu überwinden oder Transmembrandomänen auszubilden (Bauer und Pelkmans 2006). Am N-Terminus befindet sich die sog. „SPFH-Sequenz“, was die Proteine zu einem Mitglied der Gruppe der Stomatin/ Prohibitin/Flotillin/HflK/C-Proteine macht. Die exakte molekulare Funktion dieser Sequenz ist bisher ungeklärt (Tavernarakis et al. 1999). Die gemeinsame Struktur legt aber ähnliche Funktionen für die Mitglieder dieser Gruppe nahe. Aufgrund der weiten Verbreitung der Proteine dieser Gruppe ist eine grundlegende und wichtige Rolle zu vermuten. Die topologischen Eigenschaften erinnern sehr an Caveolin, auch wenn sich die molekularen Strukturen deutlich voneinander unterscheiden. Auch Caveolin hat eine *hairpin*-ähnliche Struktur mit zentralem

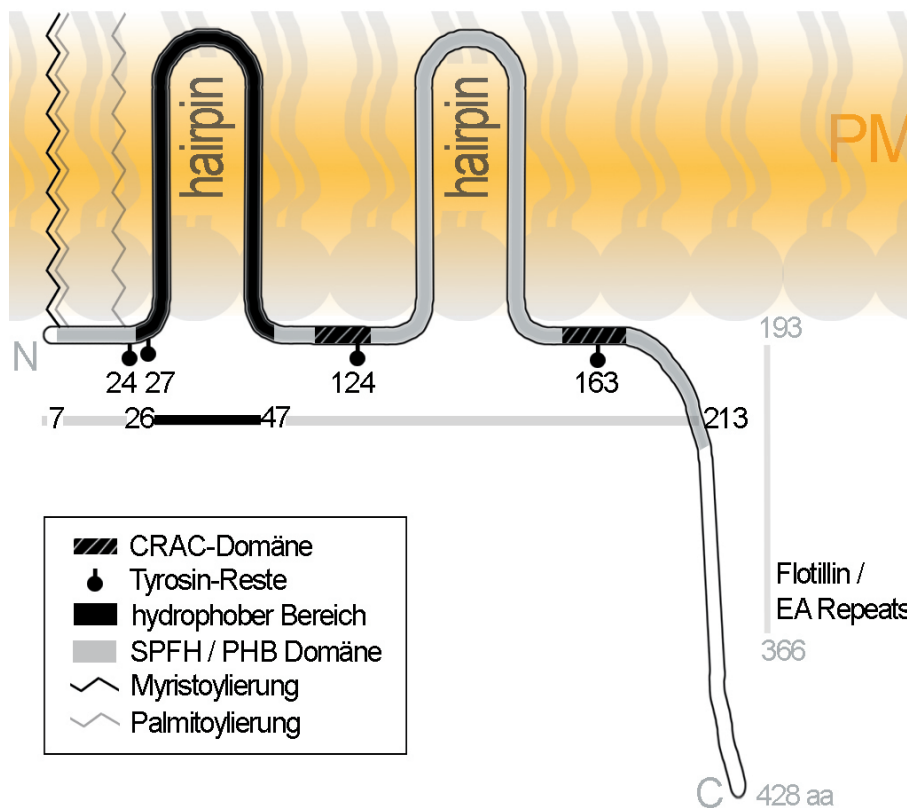


Abbildung 1.1: **Struktur von Flotillin-2:** aa = Aminosäuren; (nach Babuke und Tikkanen 2007).

hydrophoben Bereich, die mit der PM interagiert, aber keine Transmembrandomäne ausbildet; ebenso, wie bei den Flotillinen, sind N- und C-Terminus ins Zytosol gerichtet (Okamoto et al. 1998); auch Caveolin ist an mehreren Stellen palmitoyliert und bildet Oligomere (Dietzen et al. 1995, Monier et al. 1995). Caveolin hat verschiedene Funktionen bei der Signaltransduktion, sowie Endozytose und Transzytose (Cohen et al. 2004).

### 1.1.2.2 Flotillin-Domäne

Am C-Terminus befindet sich eine einzigartige und den Flotillinen eigene Sequenz, die Flotillin-Domäne. Diese besteht aus einer Reihe von Glutaminsäure- und Alaninrepeats (*EA-repeats*), welche eine *Coiled-Coil*-Struktur ausbilden kann und damit wahrscheinlich durch Homo-/Heterooligomerbildung die Flotilline stabilisiert (Schroeder et al. 1994, Bickel et al. 1997). Die Oligomerbildung ist wichtig

für die Stabilität von Flotillin-1. Knockdown von Flotillin-2 führt zum zellulären Abbau von Flotillin-1. Umgekehrt ist dies nicht der Fall (Langhorst et al. 2005).

### 1.1.2.3 Membranassoziation

N- und C-Terminus sind Richtung Zytosol gerichtet. Eine Assoziation mit der PM besteht durch modifizierte Fettketten und hydrophobe Bereiche. Diese zentralen, hydrophoben Aminosäurebereiche bilden eine Schleife aus, den bereits erwähnten *hairpin-loop*, mit dem sich Flotillin an die Plasmamembran anlagert (Morrow et al. 2002, Gkantiragas et al. 2001). Die Membranassoziation wird durch Acylierung verstärkt: beide Proteine sind an mehreren Cysteinresten palmitoyliert, allerdings weist nur Flotillin-2 eine Myristoylierung an einem Glycinrest auf.

### 1.1.2.4 CRAC-Domäne

Flotilline enthalten zwei putative *cholesterol recognition/ interaction amino acid consensus* (CRAC) – Domänen ((L/V-(X))(1-5)-Y-(X)(1-5)-R/K)), eine im Abschnitt der Aminosäuren 120-127 (VEQIYQDR), die andere im Abschnitt 157-169 (VYDKVDYLSSLGK) (Roitbak et al. 2005). CRAC-Motive wurden durch Li und Papadopoulos (1998) erstmalig im *peripheral type benzodiazepine receptor* (PBR) beschrieben, wo sie eine Funktion bei der Cholesterinbindung beschrieben, sowie eine potentielle Rolle beim Transport von Cholesterin ins Mitochondrium diskutierten (Li et al. 2001, Jamin et al. 2005). Auch Caveolin enthält eine solche CRAC-Domäne, wobei Caveolin mit dieser Domäne Cholesterin leichter in cholesterinreiche Membranabschnitte sortieren kann (Epanand et al. 2005).

## 1.1.3 Funktionen von Flotillin

Die Funktion der Flotilline ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Bisherige Erkenntnisse lassen aber auf eine Beteiligung an mehreren Prozessen, wie rezeptorvermittelter Signaltransduktion, Endo- und Phagozytose, sowie Regulation des Zytoskeletts schließen (Babuke und Tikkanen 2007).

Die Expression von Flotillin-1 und 2 ist u.a. entwicklungsabhängig reguliert. Die erhöhte Expression während neuronaler Differenzierung (Volonte et al. 1999, Pandur et al. 2004, von Philipsborn et al. 2005) und Regeneration (Schulte et al. 1997) deutet auf eine Funktion von Flotillin bei diesen Schritten hin.

### 1.1.3.1 Signaltransduktion

In Immunopräzipitationsversuchen wurde eine Interaktion von Flotillin mit GPI-gekoppelten Proteinen (Reuter et al. 2004, Stuermer et al. 2001, Stuermer et al. 2004), verschiedenen Rezeptoren (Hazarika et al. 2004, Wakasugi et al. 2004), Src-Kinasen (lck und fyn) (Liu et al. 2005, Slaughter et al. 2003) und Transmembranproteinen (ABCA1) (Bared et al. 2004) nachgewiesen. Dies deutet auf eine Funktion der Flotilline in verschiedenen Signaltransduktionsprozessen hin.

In Adipozyten wurde gezeigt, dass Flotillin-1 an einem Zwischenschritt eines alternativen Insulinsignalweges beteiligt ist. Nach Insulinstimulation bewirkt Flotillin-1 die Rekrutierung des sog. „c-Cbl–CAP–Protein-Komplexes“ in Lipid Rafts. Erst dadurch wird die Glukoseaufnahme in die Adipozyten durch den GLUT4-Glukosetransporter ermöglicht (Baumann et al. 2000).

Aktuellere Untersuchungen haben sogar gezeigt, dass die Wirkung von Flotillin-1 in dem Signalweg unabhängig von CAP geschieht (Morrow und Parton 2005, Liu et al. 2005).

### 1.1.3.2 Flotillin-abhängige Endozytose

Glebov et al. (2006) haben einen Flotillin-1-abhängigen Endozytoseweg charakterisiert, der unabhängig von Dynamamin, Clathrin und Caveolin ist und über den Choleratoxin B und GPI-gekoppelte Proteine internalisiert werden.

### 1.1.3.3 Zytoskelettbau

Die Überexpression von Flotillin-2 kann in verschiedenen Zellen Filopodienbildung induzieren (Hazarika et al. 1999, Neumann-Giesen et al. 2004). Zusätzlich interagieren auch bestimmte Mitglieder der Vinexin-Familie (Vinexin- $\alpha$  und - $\beta$  und ArgBP2) durch die N-terminale SoHo-Domäne mit Flotillin. Diese können wiederum mit ihren C-terminalen SH3-Domänen mit anderen entscheidenden Zytoskelettregulatoren wie Vinculin, Afadin und Regulatoren der kleinen GTPasen Grb4 und Sos kommunizieren (Kimura et al. 2001, Kioka et al. 2002).

Flotilline spielen zudem eine Rolle bei dem Aktivierungsprozess von T-Zellen, indem sie den Aufbau einer Makrodomäne aus verschiedenen Signalkomplexen und zytoskelettalen Umbauvorgängen organisieren (Rajendran et al. 2003, Stuermer et al. 2004).



### 1.1.3.4 Pathophysiologische Bedeutung

Bedeutung in der Pathogenese verschiedener Krankheiten wurde ebenfalls beschrieben. Auch die Bildung seniler Plaques aus dem A $\beta$ -Peptid aus dem Vorläufer APP in neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer (AD) scheint mit den Flotillinen assoziiert zu sein: Schneider et al. (2008) zeigten, dass die APP-Prozessierung durch die  $\beta$ -Sekretase von Flotillin-2 und Cholesterin abhängig ist. Flotillin-2 und Cholesterin begünstigen Clusterbildung von APP an der PM. Dies erleichtert eine spezielle, clathrin-abhängige Endozytose von APP mit konsekutiver amyloidogener Prozessierung.

AD-Patienten zeigen zudem deutlich höhere Flotillin-Expressionen im Kortex und Flotillin wurde in senilen Plaques nachgewiesen (Kokubo et al. 2000). Auch in der Pathophysiologie von Krebserkrankungen wurde den Flotillin-Proteinen eine Funktion zugeschrieben: in Melanomzellen beeinflusst Flotillin-2 das Invasionspotenzial (Hazarika et al. 2004) und Flotillin-1 spielt eine Rolle bei der Metastasierung (Neumann-Giesen et al. 2007).

## 1.2 Cholesterin

### 1.2.1 Physiologie

#### 1.2.1.1 Homöostase des Cholesterinhaushalts

Die zelluläre Konzentration von Cholesterin wird streng reguliert. Der Cholesterinbedarf jeder Zelle kann auf zwei Arten gedeckt werden: entweder die Zelle synthetisiert Cholesterin selbst oder sie nimmt das benötigte Cholesterin durch Endozytose von sog. „Low-density-Lipoproteinen“ (LDL) auf. Ein negativer Feedbackmechanismus durch das Endprodukt Cholesterin, der über bestimmte Transkriptionsfaktoren agiert, die *sterol regulatory element binding proteins* (SREBP), ist für die Regulierung entscheidend. Bei Mangel an Cholesterin binden diese an bestimmte Regionen der DNA, die *sterol regulatory elements* (SRE), um das intrazelluläre Cholesterin zu vermehren, indem sie über 30 Gene stimulieren können, die z.B. die HMG-CoA-Reduktase oder LDL-Rezeptoren ausbilden (Goldstein et al. 2006).

Diese SREBP sind am ER lokalisiert. Am C-Terminus befindet sich ein zweites Protein, das *SREBP cleavage activating protein* (Scap). Scap agiert als Sensor für

Cholesterin, der, wenn Cholesterin bindet, den gesamten SREBP-Scap-Komplex über Bindung an ein drittes Protein namens „Insig“ an das ER bindet (Yang et al. 2002, Radhakrishnan et al. 2004).

Wenn kein Cholesterin an Scap bindet, löst sich der SREBP-Scap-Komplex von Insig und verlässt das ER hin zum Golgiapparat (Goldstein et al. 2006). Damit der wirksame Teil des Transkriptionsfaktors in den Kern gelangen kann, wird im Golgi SREBP von zwei Proteasen (Site-1 Protease (S1P) und Site-2 Protease (S2P)) zurechtgeschnitten (Nohturfft et al. 2000).

Die HMG-CoA-Reduktase spielt eine weitere entscheidende Rolle im Cholesterinhaushalt. Das Expressionsniveau der Reduktase wird – neben der bereits genannten transkriptionellen Kontrolle über die SREBPs – auch auf posttranskriptioneller Ebene reguliert. Bei diesem Weg initiiert im ER akkumulierendes Lanosterol (eine Vorstufe des Cholesterins) die Bindung von Insig an die Reduktase. Insig vermittelt daraufhin die Ubiquitinierung der Reduktase und nachfolgend dessen Degradierung (Sever et al. 2003, Song et al. 2005).

## **Biosynthese**

Der Großteil (etwa 90%) des zellulären Cholesterins wird beim Säuger de novo vom Organismus selbst synthetisiert. Bei der Neusynthese bedarf es der Ausgangssubstanz Acetyl-Coenzym-A (Acetyl-CoA), die aus verschiedenen Stoffwechselfvorgängen, wie der oxidativen Decarboxylierung des Pyruvats (als Endprodukt der Glykolyse) oder aus dem Abbau von Fettsäuren, hervorgeht.

Ein komplexer Weg führt in mehreren Schritten vom Acetyl-CoA über die Zwischenstufen  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-CoA (HMG-CoA), Mevalonat, Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP), Geranyl- und Farnesylpyrophosphat, Squalen und Lanosterol zu Cholesterin. Die enzymatische Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonat durch die HMG-CoA-Reduktase stellt beim Menschen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Cholesterinsynthese dar (Bloch 1952, Gould et al. 1953).

## **Aufnahme von Cholesterin**

Das wasserunlösliche Cholesterin wird im Blutplasma mit Hilfe von LDL zu den peripheren Zellen gebracht und dort via rezeptorvermittelter Endozytose aufgenommen (Brown und Goldstein 1986). Intrazellulär werden aufgenommene Cho-

lesterinester durch die lysosomale saure Lipase (LAL) zu freiem Cholesterin gespalten. Cholesterin wird darauf aus dem späten Endosom/Lysosom in das ER oder an die PM transportiert (Sugii et al. 2003, Wojtanik und Liscum 2003).

### **Intrazellulärer Transport von Cholesterin**

Intrazellulär kann Cholesterin z.B. zur PM transportiert und dort als wesentlicher Membranbestandteil integriert werden (Sugii et al. 2003) oder an High-density Lipoproteine (HDL) abgegeben werden, um über das Blutplasma in andere Organe (Leber, Nebennieren) zu gelangen (Yamauchi et al. 2004). Weiterhin kann Cholesterin mit Fettsäuren durch die ER-ständige Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) zu Cholesterinestern (CE) verestert und in den Lipid Droplets gespeichert werden (Spector et al. 1979). Durch die Cholesterin-Ester-Hydrolase (CEH) können diese Ester wieder aufgelöst werden (Brown et al. 1980). Im Mitochondrium dient Cholesterin als Basis u.a. für die Steroidhormone (Liscum und Dahl 1992).

### **Transport zwischen ER und PM**

Zwischen ER und PM wird Cholesterin im Wesentlichen durch nicht-vesikulären Transport, unabhängig vom Mikrotubulisystem und vom Golgi-Apparat, aber bisweilen ATP-abhängig befördert (Urbani und Simoni 1990, Skiba et al. 1996, Heino et al. 2000). Es wurden sog. *Lipid transfer Proteine* (LTP) identifiziert (hierzu gehört auch NPC2, außerdem Osh4p, StarD4 und MLN64-START), die Cholesterin in einer kleinen hydrophoben Tasche bedeutend schneller zwischen Membranen vermitteln können, als es reine Diffusion zuließe (Murcia et al. 2006, Prinz 2007). Der genaue Mechanismus ist unklar.

### **Transport ins Mitochondrium**

Als Ausgangssubstanz für die Steroidhormone muss Cholesterin ins Mitochondrium transportiert werden. Das *steroidogenic acute regulatory* (StAR)-Protein kann Cholesterin zur äußeren Mitochondrienmembran (OMM) befördern, von wo es von dem *OMM-translocator proteine* (auch als *peripheral benzodiazepine receptor* (PBR) bekannt) und anderen Proteinen zu der inneren Mitochondrienmembran (IMM) transloziert wird (Alpy et al. 2001, Zhang et al. 2002, Hauet

et al. 2005).

### **Efflux**

Cholesterin kann durch die Zelle nicht abgebaut werden. Etwa ein Drittel des Cholesterineffluxes geschieht über einfache Diffusion. High-density-Lipoproteine, globuläre Partikel, bestehend aus Phospholipiden und den Apolipoproteinen A1 und A2, können Cholesterin und Cholesterinester im Rahmen des reversen Cholesterin-Transports von den peripheren Zellen abtransportieren.

Der Efflux wird durch verschiedene Proteine erleichtert. Der Transport von Cholesterin kann durch prä- $\beta$ -HDL über Aktivierung des *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1) unterstützt werden.  $\alpha$ -HDL fungiert als Akzeptor für freies, von der PM diffundierendes Cholesterin, wobei die Cholesterinverschiebung durch den *ATP-binding cassette transporter G1* (ABCG1) und den *scavenger receptor class B type I* (SR-BI) begünstigt wird (Klucken et al. 2000, Yancey et al. 2000, Mulya et al. 2007).

#### **1.2.1.2 Besonderheiten des Cholesterinmetabolismus im ZNS**

Im ZNS befindet sich eine besonders hohe Konzentration von Cholesterin. In der einzelnen Zelle befinden sich 50-90% in der PM (Spady und Dietschy 1983).

Die Fähigkeit der extraneuralen Gewebe, neben der endogenen Synthese auch Cholesterin aus dem Blutplasma aufnehmen zu können, fehlt im Gehirn aufgrund der Blockade durch die Bluthirnschranke. Deswegen wird nahezu das gesamte Cholesterin des ZNS lokal synthetisiert (Jurevics und Morell 1995). Das Gehirn weist eine Reihe von auch im übrigen Körper befindlichen Mechanismen zur Cholesterinaufnahme auf: Mitglieder der LDL-Rezeptorgruppe (LDL-Rezeptor, LDL-receptor-related Protein und apo ER2-Rezeptor) und der Apolipoproteine (E, A1, D und J), sowie der *ATP-binding cassette* (ABC)-Membrantransporter (ABCA1, ABCG1 und ABCA4) (Wang et al. 2004). Apolipoprotein E (apo E), als wichtigstes Apolipoprotein im ZNS, wird hauptsächlich von Gliazellen hergestellt. Cholesterinhaltige Lipoproteine, in denen sich apo E befindet, werden über die genannten Rezeptoren aufgenommen (Rothe und Müller 1991).

### 1.3 Morbus Niemann-Pick Typ C

Die Niemann-Pick-Krankheit Typ C (NPC) ist eine autosomal rezessive Lipidspeicherkrankheit, bei der Cholesterin und Sphingolipide in späten Endosomen in verschiedenen Geweben (hauptsächlich in Leber, Milz, Knochenmark und Gehirn) akkumulieren und welche mit progressiver Neurodegeneration einhergeht. Die Ursache sind Mutationen im NPC1- (95% der Fälle) oder NPC2-Gen (Vanier 2010). Die variable Klinik kann sich neurologisch in zerebellärer Ataxie, Dysarthrie, Dysphagie und progressiver Demenz und extraneural v.a. in Hepatosplenomegalie äußern (Kandt et al. 1982).

Cholesterinablagerungen wurden in Neuronen beschrieben (Reid et al. 2004, Vance et al. 2005), obwohl zunächst keine absolute Cholesterinkonzentrationserhöhung im ZNS betroffener Patienten gefunden werden konnte (Vanier 1999). Eine Lipidverteilungsstörung dürfte somit ebenfalls von Bedeutung sein: Cholesterin akkumuliert intrazellulär, wobei es gleichzeitig an anderen Orten, wie der PM und den Axonen, fehlt (Karten et al. 2002). Die Cholesterin-veresternde Aktivität der ACAT ist reduziert (Pentchev et al. 1985, Lin et al. 2003), was niedrige Cholesterinspiegel in der PM, bei gleichzeitig vermehrtem, intrazellulären Cholesterin begünstigt (Sokol et al. 1988). In der PM ist Cholesterin essentiell, um die Permeabilität und die Fluidität der Membran aufrecht zu erhalten (Mesmin und Maxfield 2009).

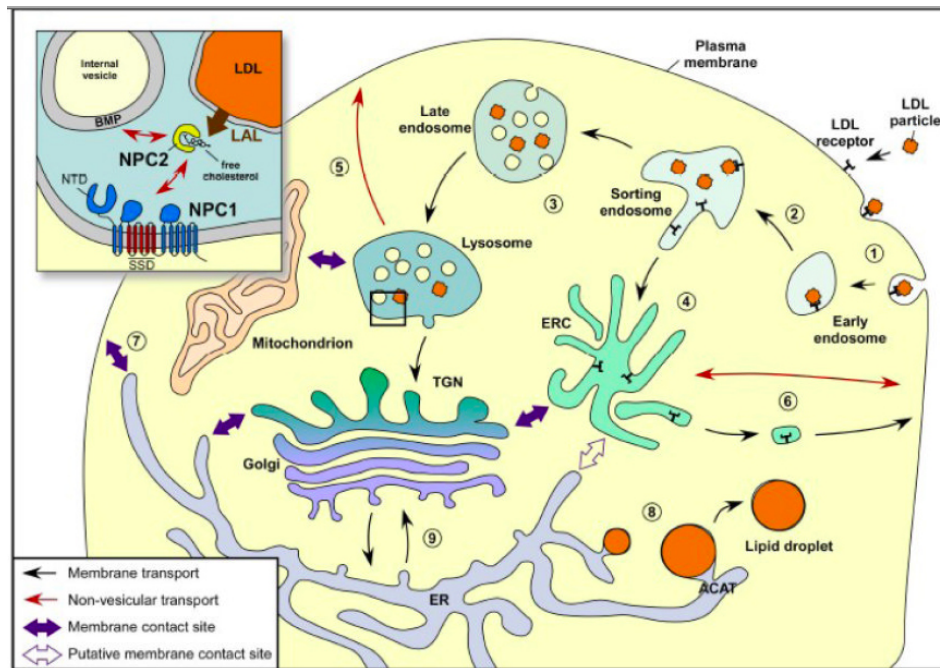


Abbildung 1.2: **Intrazellulärer Cholesterintransport und NPC:** Über den Blutstrom gelangen LDL-Partikel zu peripheren Zellen, binden an LDL-Rezeptoren und werden via *clathrin-coated pits* endozytiert (1) und gelangen über verschiedene endosomale Stadien (frühes Endosom, Sortierendes Endosom) (2) zum späten Endosom/Lysosom (3), während der LDL-Rezeptor zur PM zurückkehrt (4,6). Die Cholesterinester werden innerhalb des späten Endosom/Lysosom durch die lysosomale saure Lipase (LAL) hydrolysiert und können dieses mit Hilfe von NPC1 und NPC2 verlassen und zu anderen Kompartimenten, wie der PM, gelangen (5). Es findet sowohl vesikulärer, wie auch nicht-vesikulärer Transport zwischen PM und ERC statt. Hauptsächlich nicht-vesikulärer Transport existiert zwischen PM und ER, der Informationen über Cholesterinspiegel der Zelle mitliefert (6). Direkter Informationsaustausch über zellulären Cholesteringehalt zwischen Membrankontaktstellen wird angenommen (7). Bei Überfluss an Cholesterin kann Cholesterin durch die ACAT verestert und mitsamt Fettsäuren in Lipid-Droplets gespeichert werden (8). Im ER neu-synthetisiertes Cholesterin geht üblicherweise zur PM, kann aber auch über den Golgiapparat die Zelle verlassen (9). Durch Mutation in einem der Transporter, NPC1 oder NPC2, können diese Cholesterin nicht von der LAL übernehmen und aus dem Lysosom bringen. Das führt zu einem *trapping* (=Nichtfreigabe) von Cholesterin in *Lysosome-like storage Organelles* (Detailansicht). Bild entnommen aus Mesmin und Maxfield (2009).

## 1.4 Exosomen

Exosomen sind Vesikel mit einer Größe von 40-100 nm (Théry et al. 2006). Exosomen entstehen in späten Endosomen durch Invagination der äußeren Membran. Dies führt zunächst zur Ausbildung intraluminaler Vesikel (ILV). Die mit ILV gefüllten späten Endosomen werden als multivesikuläre Endosomen bezeichnet. Durch Fusion der multivesikulären Endosomen mit der Plasmamembran werden diese als Exosomen nach extrazellulär freigesetzt (Lakkaraju und Rodriguez-Boulan 2008, Schorey und Bhatnagar 2008, van Niel et al. 2006).

Exosomen enthalten u.a. Proteine aus Membrantransport und -fusion (Flotillin, Annexine, Rab GTPasen) und aus der MVB-Biogenese (TSG101, Alix). Anreicherung von Lipiden wie Cholesterin, Ceramid, Sphingolipiden, Glycerophospholipiden und langen, gesättigten Fettsäureketten wurde ebenfalls beobachtet (Wubbolts et al. 2003, Subra et al. 2007, Trajkovic et al. 2008).

## 1.5 Ziele der Arbeit

Das Gesamtprojekt umfasst das cholesterinabhängige Verhalten von Flotillin als Teilaspekt im Hinblick auf die exosomale Cholesterinabgabe bei der Niemann-Pick-C-Erkrankung (Strauss et al. 2010).

Die Akkumulation von Cholesterin in MVBs (Möbius et al. 2003) führte zu der Hypothese, dass Cholesterin in Interaktion mit Flotillin in das MVB gebracht und so über Exosomen abgegeben werden könnte.

In der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Flotillin-2-positiven, cholesterinhaltigen Exosomen abhängig vom intrazellulären Cholesterinspiegel ist: Cholesterinreduktion durch Simvastatin oder intrazelluläre Cholesterinakkumulation durch U18666A oder Hinzugabe freien Cholesterins, führte zu reduzierter bzw. vermehrter Bildung von Flotillin-2-positiven und Cholesterinhaltigen Exosomen.

Weiterhin war gezeigt worden, dass für die Bildung dieser cholesterinhaltigen Exosomen Flotillin-2 benötigt wird. SiRNA-knockdown von Flotillin-2 in Oli-neu-Zellen führte zu einem wesentlich geringeren Gehalt an Cholesterin in den Exosomen behandelte Zellen gegenüber Kontrollzellen mit Flotillin-2 (Strauss et al. 2010).

Exosomale Cholesterinfreisetzung spielt ebenfalls eine Rolle bei der Niemann-Pick-Krankheit Typ C (NPC). Hier ist die intrazelluläre Cholesterinhomöostase durch Funktionsverlust des NPC1- oder NPC2-Proteins gestört.

In Oli-neu-Zellen führte eine durch siRNA reduzierte Proteinkonzentration von NPC1 zu einer Zunahme der Exosomenfreisetzung, die ebenfalls in Patientenfibroblasten von NPC-Patienten beobachtet wurde. Ein pharmakologisches Modell der NPC, bei der Cholesterin in späten Endosomen durch Gabe von U18666A akkumuliert, zeigte dieselbe Induktion der Exosomenfreisetzung, sowie eine gesteigerte Rate von exosomaler Cholesterinabgabe der Zelle. Daraus wurde abgeleitet, dass Exosomen eine Rolle bei der Cholesterinhomöostase der Zelle und bei pathologischen Veränderungen derselben spielen könnten (Strauss et al. 2010). Thema dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle von Flotillin bei der exosomalen Freisetzung von Cholesterin. Dazu untersuchten wir die subzelluläre Lokalisation von Flotillin in Abhängigkeit von Cholesterin. Kokubo et al. (2003) hatten bei der Untersuchung von Lipid-Rafts bereits festgestellt, dass Flotillin und Cholesterin in Cholesterin- und Sphingolipid-reichen Membranmikrodomänen kolokalisieren, und Roitbak et al. (2005), dass Flotillin-2 Cholesterin zur Plasmamembran rekrutieren kann.

Dabei sollte sowohl die subzelluläre Lokalisation von Flotillin bei sich ändernden Cholesterinverhältnissen analysiert, als auch die Rolle der CRAC-Domänen auf die Verteilung von Flotillin untersucht werden.



# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsgüter

Alle Chemikalien in dieser Arbeit sind (sofern nicht anders ausgewiesen) von folgenden Unternehmen bezogen: AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) oder Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland). Von der Invitrogen GmbH (Darmstadt, Deutschland) oder der PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) wurden die Medien, Zusätze, Antibiotika und Seren für die Zellkultur bezogen. Die in der Zellkultur, in der molekularbiologischen und biochemischen Analyse benutzten Verbrauchsgüter sind von der Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland), der Greiner Bio-One GmbH (Frickenhäusen, Deutschland) oder von Falcon (Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankreich) erworben.

#### 2.1.2 Zelllinien

In Tabelle 2.1 sind die verwendeten Zelllinien angegeben.

#### 2.1.3 Antikörper

Über Dianova (Hamburg, Deutschland), Invitrogen GmbH (Darmstadt, Deutschland) oder GE Healthcare (München, Deutschland) wurden die sekundären Fluorophor- und die konjugierten Horse Radish-Perioxidase (HRP)-Antikörper bezogen.

Tabelle 2.1: Verwendete Zelllinien

Name	Ursprung	bezogen von
Oli-neu (Jung et al. 1995)	Vorläuferzellen von Oligodendrozyten der Maus	J. Trotter, Universität Mainz, Deutschland
DH5 <sub>α</sub>	Escherichia coli	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland

In Tabelle 2.2 sind die verwendeten Primärantikörper angegeben.

Tabelle 2.2: Primärantikörper

Ziel	Wirtstier	Gebrauchsform	bezogen von
γ-Adaptin	Maus	WB (1:5000)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Calnexin	Kaninchen	WB (1:2000)	Stressgen Bioreag, Victoria, Kanada
Flotillin-1	Maus	WB (1:1000), IF (1:100)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Flotillin-2	Maus	WB (1:1000), IF (1:100)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
GFP	Kaninchen	WB (1:1000)	Abcam plc, Cambridge, UK
LAMP-1	Ratte	IF (1:50)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

## 2.1.4 Oligonukleotide

### 2.1.4.1 Plasmide

#### Bereits publizierte Plasmide

In Tabelle 2.3 sind die aus anderen Laboren verwendeten Plasmide angegeben.

Tabelle 2.3: Publizierte Plasmide

Plasmid	bezogen von
Flotillin-1-GFP	L. Rajendran, MPI für molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden, Deutschland
Flotillin-2-GFP	L. Rajendran, MPI für molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden, Deutschland
Flotillin-2-RFP	L. Rajendran, MPI für molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden, Deutschland
GFP-rab7	M. Zerial, MPI für molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden, Deutschland
GFP-rab11	M. Zerial, MPI für molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden, Deutschland

## Selbsthergestellte Plasmide

Die *cholesterol-recognition/interaction-amino acid* (CRAC) -Domänen von Flotillin-2 wurden einzeln oder beide gleichzeitig durch *site-directed Mutagenesis* verändert. Dies geschah, entsprechend dem Protokoll des Herstellers (Quick Change Site-Directed Mutagenesis, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland), durch Einführung der Aminosäuremutationen Y124G und/oder Y163G.

## 2.1.5 Modifikatoren der Cholesterin-Homöostase in der Zelle

In Bezug auf Cholesterin wurde die Homöostase der Zelle mit den in Tabelle 2.4 genannten Modifikatoren verändert.

Tabelle 2.4: Modifikatoren

Verbindung	Wirkung	bezogen von
Cholesterin in Alkohol	Laden von freiem Cholesterin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Cholesterin/methyl- $\beta$ -cyclodextrin Komplex	Laden von freiem Cholesterin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
CP-113.818	Hemmung der Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT)	Pfizer Inc., New York, NY, USA
Methyl- $\beta$ -cyclodextrin	Komplexierung von Membrancholesterin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Mevalonat	Aufrechterhaltung der Geranylisierung/Farnesylierung	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Simvastatin	Hemmung der HMG-CoA-Reduktase	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
U18666A	Trapping von Cholesterin im späten Endosom	Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA

## 2.1.6 Lösungen und Puffer

### 2.1.6.1 Phosphatpuffer in Kochsalzlösung (PBS)

Analog zu Sambrook und Russell (2001) wurde das PBS hergestellt.

10× <b>PBS</b>	
80.0 g	NaCl
2.0 g	KCl
14.4 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (or 18.5g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O)
2.4 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Das 10× PBS wurde zehnfach mit zweifach destilliertem H<sub>2</sub>O verdünnt, um dann 1× PBS zu erhalten. Der pH-Wert wurde dabei auf einen Wert zwischen 7.2 – 7.4 eingestellt.

### 2.1.6.2 CHAPS-Lysepuffer

1× <b>Lysepuffer (1l)</b>	
10 g	(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat) (CHAPS), ( $\cong$ 1 %)
6.1 g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), ( $\cong$ 50 mM)
1.5 g	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), ( $\cong$ 5 mM)

Der pH-Wert wurde hier auf 8 eingestellt.

### 2.1.6.3 Ladepuffer für Proteine

4× <b>Ladepuffer</b>	
10 %	Glycerol
50 mM	Tris-HCl
2 mM	EDTA
2 %	SDS
144 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol
0.05%	Bromphenolblau

Der pH-Wert wurde hier auf 6.8 eingestellt.

## 2.1.7 Medien und Seren

### Kommerzielle Medien

Die in dieser Arbeit verwendeten, kommerziellen Medien, Seren und Lösungen sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.

Tabelle 2.5: Medien und Lösungen

Lösung/Medium	bezogen von
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
GlutaMAX <sup>TM</sup> -I Zusatz	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hanks' Balanced Salt Solution	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pferdeserum (HS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Insulin-Transferrin-Selenium – A Zusatz 100×	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Lipoprotein freies Serum (LPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Opti-MEM + GlutaMAX <sup>TM</sup> -I	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Phosphatpuffer in Kochsalzlösung (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) 100×	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland

### SATO-Medium

Für die Kultivierung der Oli-neu Zelllinie wurde das SATO-Medium benutzt, dessen Bestandteile hier aufgeführt werden. Die Herstellung von serumfreien SATO-Medium erforderte das Weglassen des Pferdeserums.

SATO Medium (100 ml)	
1 ml	Insulin-Transferrin-Selenium-A Zusatz ITS-A, 100×
1 ml	Putrescin-Dihydrochlorid, stock 10 mM in DMEM
10 µl	Progesteron, stock 2 mM in Ethanol
10 µl	Triiodthyronin (Calbiochem/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 5 mM stock in Ethanol
13 µl	L-Thyroxin (Calbiochem/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 4 mM stock in 0.26 N NaOH, 25 % Ethanol
1 ml	GlutaMAX <sup>TM</sup> -I Zusatz, 200 mM
1 ml	Penicillin/Streptomycin, 5000 U/5000 µg
5 ml	Pferdeserum

in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4.5 g/l Glukose

## Kommerzielle Kits

In Tabelle 2.6 sind die in dieser Arbeit verwendeten, kommerziellen Kits aufgeführt.

Tabelle 2.6: Kits

<b>Kit</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller</b>
Nucleobond Xtra Midi Kit	DNA Isolation	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit	Punktmutation	Agilent Technologies, Waldbronn Deutschland

### 2.1.8 Software

Für diese Arbeit wurde die in 2.7 aufgeführte Software verwendet.

Tabelle 2.7: Software

<b>Software</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller/Ursprung</b>
GraphPad Prism 5	Biostatistik und -darstellung	<a href="http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm">http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm</a>
ImageJ	Bildbearbeitung und -analyse	<a href="http://rsweb.nih.gov/ij/">http://rsweb.nih.gov/ij/</a>
LateX	Textverarbeitungsprogramm	<a href="http://www.tug.org/mactex/">http://www.tug.org/mactex/</a>
Leica Confocal Software 2.61	Zugang zu Konfokalbildern	Leica Microsystems, Mannheim, Deutschland
Meta Imaging Series 6.1	Bildbearbeitung und -analyse	Universal Imaging Corp., Downington, USA
MS Office Excel 2003	Kalkulationstabellen	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologie

#### 2.2.1.1 Site-Directed Mutagenesis

Mit Hilfe des Stratagene QuickChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kits (siehe Tabelle 2.6) konnten Punktmutationen in das Flotillin-2 Gen eingeführt werden. Dies wurde dem Protokoll des Herstellers entsprechend durchgeführt.

### 2.2.1.2 E. Coli-Transformation

Der E. Coli-Stamm *Subcloning Efficiency DH5 $\alpha$*  (Tabelle 2.1) wurde zur Vervielfältigung der Plasmid-DNA-Konstrukte genutzt. Für die Transformation wurden 50  $\mu\text{l}$  der Zellen für 5 min auf Eis aufgetaut. Danach wurden 100 ng des gewünschten Plasmids den Zellen hinzugefügt. Dann wurde die Suspension durchmischt und für weitere 20 min auf Eis inkubiert, worauf ein Hitzeschock von 42 °C für 42 s folgte. Nach einer Erholungsphase von 2 min auf Eis, wurde die Suspension nach einer Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  LB Medium (25 g LB in 1l H<sub>2</sub>O, autoklaviert) für 1h bei 37 °C in einem Schüttel-Inkubator untergebracht. Um einzelne Transformanden zu selektieren, wurde die Kultur auf LB-Agarplatten (LB-Agar 40 g pro 1l H<sub>2</sub>O, autoklaviert) ausgebreitet und mit entsprechenden Antibiotika (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin oder 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Kanamycin) bei 37 °C für 12–20h inkubiert.

### 2.2.1.3 Isolation von Plasmid-DNA aus E. Coli

Eine einzelne Kolonie wurde, um die Plasmid-DNA zu vervielfältigen, von der LB-Agarplatte mit einer autoklavierten Pipettierspitze aufgenommen und dann in 200 ml mit Antibiotikum versetztes LB-Medium gegeben. Die Bakterien wurden dann für 10–16h bei 37 °C unter konstantem Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden 10 min bei 3000 Umdrehungen/min und 4 °C zentrifugiert und lysiert. Die Plasmid-DNA wurde mit dem Nucleobond Xtra Midi Kit (siehe Tabelle 2.6) entsprechend dem Protokoll des Herstellers isoliert und aufgereinigt. In der Folge wurde die DNA erneut in autoklaviertem, zweifach destilliertem H<sub>2</sub>O aufgelöst.

### 2.2.1.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationen der DNA wurden, unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Tegge 1975), auf die bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $A_{260}$ ) gemessenen optischen Dichten bestimmt. Die Proben wurden hierbei hundertfach mit H<sub>2</sub>O verdünnt, wobei der Absorptionsgrad bei 260 nm in Küvetten (UVette, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit dem BioPhotometer plus (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) abgelesen wurde. Die Berechnung der Konzentration erfolgte anhand dieser Formel:

$$\boxed{\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g}/\text{ml}] = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g}/\text{ml}}$$

## 2.2.2 Kryokonservierung der Zellen

### Einfrieren der Zellen

Um die Zellen über längere Zeit konservieren zu können, wurden sie auf Petrischalen von 10 cm Durchmesser oder in Zellkulturflaschen von 75cm<sup>2</sup> kultiviert. Bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 80% wurden die Zellen gewaschen oder trypsinisiert, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben. Daraufhin wurde die Zellsuspension bei 900 G für 5 min zentrifugiert und das entstandene Pellet in 0,5 ml DMEM resuspendiert. Anschließend wurden weitere 0,5 ml von zweifachem *Freezing Medium* (40 % Fetales Kälberserum, 20 % DMSO in DMEM) hinzugefügt, das Ganze vorsichtig gemischt und in einem *Nalgene<sup>®</sup> Sterile Cryogenic Vial* (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark) mit Hilfe eines *Nalgene<sup>®</sup> Cryo 1°C Freezing Container* (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark) in einem -80°C Tiefkühlgerät langsam eingefroren (-1°C/min). Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

### Auftauen der Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und in frisches, vorgewärmtes Wachstumsmedium (10 ml) überführt und bei 900 G für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in vorgewärmtem Wachstumsmedium resuspendiert und dann wahlweise auf einer Petrischale von 10 cm Durchmesser oder in Zellkulturflaschen von 75cm<sup>2</sup> ausplattiert. Falls erforderlich wurden die Behältnisse zuvor mit PLL beschichtet.

## 2.2.3 Kultivierung der Zellen

Allgemeine Wachstumsbedingungen für die Zellen waren 37°C Umgebungstemperatur und 7,5% CO<sub>2</sub>-Gehalt in angefeuchteten Inkubatoren.

### Zelllinie: Oli-neu

Oli-neu ist eine Zelllinie von immortalisierten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (erhalten von J. Trotter, Universität Mainz, Deutschland), die entsprechend einem bestimmten Protokoll kultiviert wurde (Fitzner et al. 2006). Die Petrischalen wurden für das Wachstum der Zelle mit Poly-L-lysine (PLL, 30 mg/l) für 30 min



beschichtet. Sobald die Zellen einen konfluierenden Rasen von 70-80 % gebildet hatten, wurden sie im Verhältnis 1 zu 6 alle 2-4 Tage passagiert. Hierfür wurden sie mit dem Medium ihrer Kultur abgewaschen und damit in Suspension gebracht. Für die Experimente wurden die Zellen bis zur 30. Passage benutzt.

### 2.2.3.1 Modifikation der Cholesterin-Homöostase in der Zelle

Die Experimente wurden mit Oli-neu-Zellen durchgeführt, die für Western-Blot-Experimente auf Plastikpetrischalen von 6 cm Durchmesser oder für Immunofluoreszenz-Experimente auf Deckgläschen plattiert wurden. Die verwendeten Substanzen sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

#### Depletion von Cholesterin

Für die akute Depletion von Cholesterin wurden die Zellen dreimalig mit PBS gewaschen und danach 2 h mit Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (1 mM) in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS; siehe auch Tabelle 2.5) inkubiert. Kontroll-Zellen wurden ausschließlich mit HBSS behandelt. Nach 2 h wurden die Zellen für die Immunocytochemie fixiert.

Ein anderer Ansatz sah vor, die endogene Cholesterin-Biosynthese der Zelle durch Simvastatin zu hemmen. Simvastatin inhibiert die HMG-CoA-Reduktase, die HMG-CoA zu Mevalonat reduziert. Hierfür wurden die Zellen ebenfalls dreimalig mit PBS gewaschen um dann mit serum (HS)-freiem SATO-Medium, das mit 1 % lipoproteinfreiem Serum (LPS; siehe Tabelle 2.5) versetzt war, für 24 h vorinkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit Simvastatin (4  $\mu$ M, in HS-freiem SATO, 1 % LPS) für 48 h (für die Immunofluoreszenz) inkubiert. Das Wachstumsmedium wurde zusätzlich mit 50  $\mu$ M L-Mevalonat versehen, um Geranylierung und Farnesylierung trotz Anwesenheit von Simvastatin zu gewährleisten. Zum Vergleich wurden Kontroll-Zellen ausschließlich mit serumfreiem SATO-Medium, 1 % LPS und 50  $\mu$ M L-Mevalonat ohne Simvastatin behandelt.

#### Laden der Zellen mit freiem Cholesterin

Zunächst wurden die Oli-neu Zellen dreimalig mit PBS gewaschen. Darauf wurden die Zellen 4 h lang in serumfreiem SATO-Medium depletiert und dann für weitere 4 h in serumfreien SATO-Medium inkubiert, das mit freiem Choleste-

rin in einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  versehen war. Die Zugabe erfolgte als Cholesterin/Methyl- $\beta$ -cyclodextrin-Komplex, der mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cholesterin in Ethanol gesättigt war (Gesamtkonzentration von Ethanol 0,1 %). Die Zellen der Kontrolle wurden mit 0,1 % Ethanol in serumfreiem SATO-Medium behandelt. Die Zellen wurden für Immunofluoreszenzuntersuchungen nach der Inkubationszeit auf den Deckgläschen fixiert.

### **Hemmung der ACAT**

Der Inhibitor CP-113.818 wurde hierzu in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  in serumfreiem SATO-Medium für 24 h verwendet, um die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) zu hemmen (CP-113.818 in DMSO gelöst, Konzentration von DMSO 0,05 %).

### **Inhibierung des intrazellulären Cholesterintransports durch U18666A**

Ein weitverbreitetes Modell, um den Pathomechanismus der NPC zu imitieren, haben Liscum und Faust (1989) mit der Anwendung der Substanz U18666A (3 $\beta$ -(2-Diethyl-aminoethoxy)androst-5-en-17-one) gefunden. Es scheint in bisher ungeklärter Weise – entweder direkt oder sekundär durch Membranveränderung – die NPC-Proteine zu blockieren, die zusammen für den Cholesterinexport aus dem späten Endosom/Lysosom verantwortlich sind (Cenedella 2009).

So konnte durch Zugabe von U18666A eine Behinderung des Transportes von freiem Cholesterin vom späten Endosom/Lysosom zum endoplasmatischen Retikulum und zum Golgi-Apparat erwirkt werden. Dafür wurde SATO, mit U18666A in einer Konzentration von 1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  versetzt, für 12 h zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden, um sie im Western Blot nach Veränderungen der Flotillin-Expression zu untersuchen, für weitere 4 h in serumfreiem SATO, welches wieder mit 1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  U18666A versetzt war, inkubiert, nachdem die Zellen dreimalig mit PBS gewaschen worden waren. Für immunocytochemische Untersuchungen wurden die Zellen für 24 h mit U18666A in einer Konzentration von 1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in SATO behandelt.

### 2.2.3.2 Beeinflussung des Zytoskeletts

Die Oli-neu-Zellen wurden wahlweise mit 16,7  $\mu\text{M}$  Nocodazol oder mit 2  $\mu\text{M}$  Latrunculin A für 30 min vorinkubiert. Anschließend wurden in Anwesenheit dieser Stoffe die Zellen mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cholesterol (in Form eines Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Komplexes, der mit in Ethanol gelöstem Cholesterin gesättigt war) für 4 h behandelt, um etwaige cholesterinabhängige Bewegungen zu provozieren. Die Zellen wurden fixiert und für Untersuchungen mittels Immunofluoreszenz auf endogenes Flotillin-1 gefärbt.

### 2.2.3.3 Plasmidtransfektion

Zur Transfektion der Zellen mit DNA wurde das *Mirus Bio TransIT<sup>®</sup>-LT1 Transfection Reagent* (Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA) benutzt. Die transfezierten Zellen wurden bei einer Konfluenz von 60 % gemäß dem Protokoll des Herstellers transfeziert.

Tabelle 2.8: Transfektionsansätze

	12-well Platte	Schale 6 cm	Schale 10 cm
<b>Opti-MEM</b>	50 $\mu\text{l}$	300 $\mu\text{l}$	600 $\mu\text{l}$
<b>TransIT</b>	1,5 $\mu\text{l}$	9 $\mu\text{l}$	18 $\mu\text{l}$
<b>Plasmid DNA</b>	0,5 $\mu\text{g}$	3 $\mu\text{g}$	6 $\mu\text{g}$

## 2.2.4 Protein- und Lipidbiochemie

### 2.2.4.1 Zelllysate

Die Zellen einer 6 cm Schale wurden in 100  $\mu\text{l}$  CHAPS-Lysepuffer (siehe Abschnitt 2.1.6.2) gekratzt, 10 min auf Eis lysiert und bei 5000 G und 4°C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit 35  $\mu\text{l}$  in Proteinprobenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C inkubiert.

### 2.2.4.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde vor dem Beladen der Polyacrylamidgele gemessen, um sie mit gleichen Mengen an Protein beladen zu können.

Zur Bestimmung wurde der *Pierce BCA Protein Assay* verwendet (Thermo Fisher Scientific In., Rockford, IL, USA), die Absorption sowohl für die Protein-Standards, wie auch die Proben, bei einer Wellenlänge von 526 nm dem Hersteller-Protokoll entsprechend gemessen. Die Konzentration berechnet sich entsprechend dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Tegge 1975) wie folgt:

$$A = \epsilon \times l \times c$$

A = gemessene Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge

$\epsilon$  = molarer Absorptionskoeffizient

l = Länge des Pfades

c = Konzentration des Analyten

### 2.2.4.3 SDS-Page

Die *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) wurde verwendet, um die Proteine entsprechend ihres molekularen Gewichts im elektrischen Feld aufzutrennen. Hierzu wurde das *Bio-Rad Mini-PROTEAN 3 electrophoresis system* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) benutzt. Die Gelelektrophorese fand nach Auftragen gleicher Proteinmengen und des Proteinmarkers *PageRuler<sup>®</sup> Plus Prestained Protein Ladder* (Fermentas, Sankt Leon-Rot, Deutschland) für 90 min bei 100 V in Tris-Glycinpuffer statt.

<b>stacking</b>	<b>gel</b>
4 %	Acrylamid/bis-acrylamid-Lösung (29:1)
125 mM	Tris-HCl pH 6.8
0,1 %	SDS
0,05 %	Ammoniumpersulfat (APS)
0,005 %	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

<b>resolving</b>	<b>gel (10-12 %)</b>
10-12 %	Acrylamid/bis-acrylamid-Lösung (29:1)
325 mM	Tris-HCl pH 6.8
0,1 %	SDS
0,05 %	Ammoniumpersulfat (APS)
0,005 %	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

#### 2.2.4.4 Western Blot

Um die Proteine nach der Auftrennung durch das Elektrophoreseprinzip zu identifizieren und zu quantifizieren, wurde das Verfahren des Western Blottings von Towbin et al. (1979) angewendet. Dies geschah dem Herstellerprotokoll entsprechend unter Verwendung des *Bio-Rad Mini-Protein Systems*. Hierbei wurden mit Hilfe eines Transferpuffers (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol), bei 100 V für eine Stunde, die Proteine vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine Transfermembran (*Whatman<sup>®</sup> Protran Nitrocellulose Transfer Membrane*, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) überführt. Die Transfermembran wurde dann zunächst, um unspezifische Immunglobulinbindungen zu verhindern, bei Raumtemperatur für 30 min in einem Gemisch aus 4 % fettfreier Trockenmilch (Sigma Aldrich Chemie, GmbH, München, Deutschland) und PBST (0,1 % Tween-20 in PBS) inkubiert. Erst dann wurde der primäre Antikörper in PBST (Verdünnung entsprechend Tabelle 2.2) auf die Membran gegeben und für 8-12 h bei 4 °C inkubiert und dreimal je 10 min in reinem PBST bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde der zweite, an Horse-Radish-Peroxidase (HRP) gebundene Antikörper auf die Membran gebracht und für 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal mit PBST für je 10 min gewaschen.

Die Visualisierung der durch diese Antikörper gebundenen Proteine erfolgte mit Hilfe des *Pierce ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) und auf Röntgenfilmen (CL-XPosure<sup>™</sup> Film, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) wurde die Intensität der Banden mit ImageJ ausgewertet, nachdem die Bilder mit einem handelsüblichen Scanner eingescannt worden waren.

### 2.2.5 Immunzytochemie

#### 2.2.5.1 Färbung mittels Immunfluoreszenz

Alle Arbeitsschritte fanden bei Raumtemperatur statt. Einmalig wurden die auf den mit PLL beschichteten Deckgläschen gewachsenen Oli-neu-Zellen mit PBS gewaschen und anschließend 15 min in Paraformalaldehyd fixiert (PFA, 4 %, in PBS, pH 7,4). Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen permeabilisiert ((v/v)Triton X 100, 0,1 %ig, für 1 min), wieder dreimalig mit PBS gewaschen und, um unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern, für

30 min in 100 %ige *blocking solution* inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den Primärantikörpern in 10 %iger *blocking solution* für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde der fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper in einer 10 %igen *blocking solution* lichtgeschützt für weitere 45 min mit den Zellen inkubiert. Die Zellen wurden dreimal in PBS gewaschen, bevor sie mit Mowiol-Lösung auf einen Objektträger aufgebracht und über Nacht getrocknet wurden.

<b>blocking</b>	<b>solution (100 %)</b>
2 %	BSA
2 %	Pferdeserum
0,1 %	Gelatine
0,1 %	Saponin
0,02 %	Biotin

### **Herstellung von Mowiol-Lösung**

Die *Mowiol Mounting Solution* wurde hergestellt, indem 2,4 g Mowiol (Calbiochem/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 6 g Glycerol mit 6 ml H<sub>2</sub>O gemischt und 2 h Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert wurden. Daraufhin wurden 12 ml 0,2 M Tris/HCl (pH 8,5) hinzugegeben und für 10 min bei 50 °C inkubiert. Zur Klarheit der Lösung trug weiteres Zentrifugieren mit 5000 G für 5 min bei. Zur Lösung wurde DABCO Anti-Fading Reagenz in einer Konzentration von 24 mg/ml hinzugegeben.

#### **2.2.5.2 Färbung mit Filipin**

Der Filipin-Farbstoff (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) bindet freies Cholesterin in Zellen. Unter konstantem Schütteln, lichtgeschützt und bei 37 °C wurde ein frisches, vorher eingefrorenes Filipin-Aliquot (Konzentration 12,5 mg/ml) für 1 h erwärmt. Zur weiteren Verwendung wurde die Lösung dann 1:50 mit PBS verdünnt (finale Konzentration 25 µg/ml). Die Zellen, zuvor PFA-fixiert und Triton-permeabilisiert, wurden mit dieser Filipin-Lösung für 15-20 min inkubiert, darauf dreimalig mit PBS und dann mit zweifach destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen und auf die Objektträger aufgebracht, bevor sie bei 4 °C lichtgeschützt gelagert wurden.

### 2.2.6 Mikroskopie

Die Bilder wurden mit einem  $63\times$  Ölimmersionsobjektiv eines *Leica TCS SP2 AOB*S Konfokal Laser Scanning Setup (Leica Microsystems, Mannheim, Deutschland) aufgenommen.

### 2.2.7 Bildbearbeitung und statistische Auswertung

#### Untersuchung der subzellulären Protein-Lokalisation anhand von Immunfluoreszenz-Aufnahmen

Grundlage der Bearbeitung der Konfokalbilder war, dass alle Bilder mit identischen Aufnahmeparametern gemacht wurden. Diese Bilder wurden mit Metamorph (Meta Imaging Series 6.1 Software, siehe Tabelle 2.7) analysiert. Die Verteilung von Flotillin-2 innerhalb der Zellen wurde quantifiziert, indem die Zelloberfläche der einzelnen Zelle von Hand in dem Programm eingerahmt und die Intensität der Fluoreszenz der Zelloberfläche, als auch die des Zellinneren gemessen wurde. Dabei wurde das Verhältnis der zellinneren Fluoreszenz gegenüber der Gesamtfluoreszenz (Oberfläche + Zellinneres) gebildet und als Maß für vesikuläres, nicht Plasmamembran-assoziiertes Protein jeder Zelle definiert.

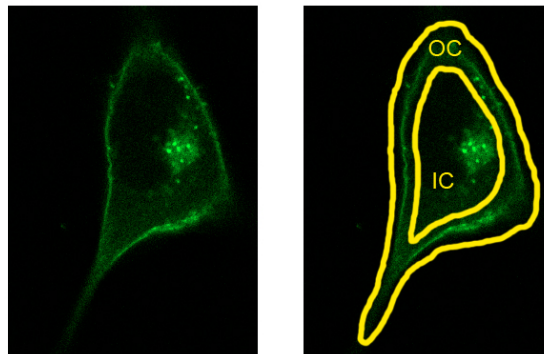


Abbildung 2.1: **Quantifizierung der Verteilung** Die Verteilung von Flotillin-2 wurde quantifiziert, indem die Fluoreszenzintensität des Flotillins im Zellinneren (IC) bezogen auf die Intensität der gesamten Zelle berechnet wurde.

**Statistische Auswertung**

Es wurde Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland), zur statistischen Auswertung benutzt. Dabei wurde MS Office Excel 2003 benutzt, um deskriptive Statistiken, mittlere Mess- und Standardfehler (SEM) zu berechnen. Der parametrische Student's t-Test (kurz: t-Test) wurde benutzt um zwei unabhängige Probenreihen, normalverteilt und mit gleicher Varianz, zu vergleichen. Der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test wurde für nicht normalverteilte bzw. für Datenreihen ungleicher Varianz verwendet. Ein  $p$ -Wert kleiner als 0,05 bei den erhobenen Daten wurde als signifikant betrachtet.



# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Die Verteilung von Flotillin in der Zelle

Flotillin kann Cholesterin zur Plasmamembran und zu intrazellulären Membranen rekrutieren, wo es mit Cholesterin kolokalisiert (Kokubo et al. 2003, Roitbak et al. 2005). Wir untersuchten deshalb zunächst, ob die Verteilung von Flotillin in der Zelle durch Cholesterin reguliert ist.

#### 3.1.1 Subzelluläre Lokalisation und Verteilung von Flotillin

Oli-neu-Zellen wurden zunächst mit einem gegen Flotillin-2 gerichteten Antikörper immunfluoreszenzgefärbt, um die Verteilung von endogenem Flotillin in der Zelle zu bestimmen. Dabei zeigte sich in den konfokalmikroskopischen Aufnahmen, dass Flotillin-2 vorwiegend in vesikulären Strukturen und nur zu einem geringeren Ausmaß an der PM lokalisiert war.

Um die vesikulären Kompartimente genauer zu charakterisieren, wurden Oli-neu-Zellen mit verschiedenen GFP-gekoppelten rab-GTPasen transfiziert, die als Marker für unterschiedliche endosomale Kompartimente dienen:

- GFP-rab7, LAMP-1 und Lysotracker für das späte Endosom/Lysosom
- GFP-rab5 für das frühe Endosom
- GFP-rab4 als Marker für das Recycling Endosom

Es zeigte sich eine Kollokalisierung von endogenem Flotillin-2 mit folgenden Markern: GFP-rab7, LAMP-1 und Lysotracker, außerdem mit GFP-rab5 und GFP-rab4 (Ergebnisse nicht gezeigt; Strauss et al. 2010). Daraus ist zu schließen, dass sich Flotillin-2 in allen untersuchten endozytotischen Subkompartimenten findet.

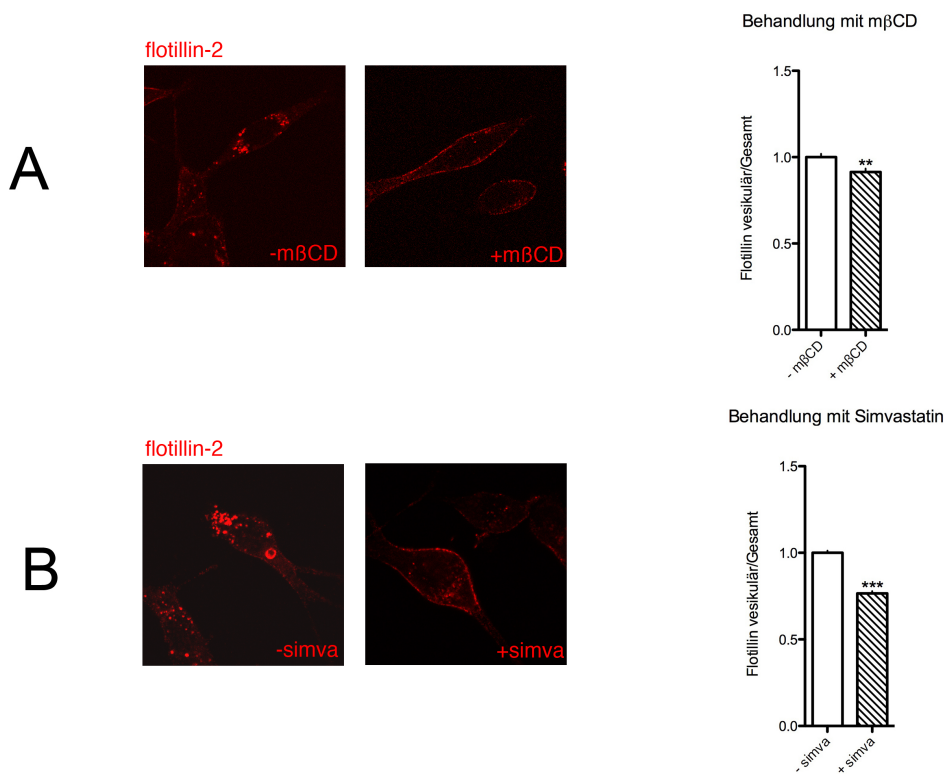
### 3.1.2 Depletion von Cholesterin führt zu einer Umverteilung von Flotillin hin zur Plasmamembran

In der Folge gingen wir der Frage nach, inwieweit die intrazelluläre Verteilung Flotillins von Cholesterin abhängt. So untersuchten wir zunächst, was mit der Verteilung von Flotillin-2 bei akuter Cholesterin-Depletion passieren würde. In einem ersten Ansatz wurden die Oli-neu-Zellen mit 1 mM Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M $\beta$ CD) in HBSS für 2 h behandelt. Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin kann aus der PM Cholesterin entziehen und bildet damit wasserlösliche Komplexe. Die konfokalmikroskopische Auswertung der Immunfluoreszenzbilder ergab hierbei eine geringe, aber signifikante Umverteilung Flotillins von endosomalen Kompartimenten weg und zur Plasmamembran hin (siehe Abbildung 3.1 A; 8,6% Abnahme von endosomalem Flotillin, SEM = 0,02, n = 220 Zellen, p = 0,002, Student's t-Test; 2 unabhängige Experimente).

Ein zweiter Versuchsansatz zur Depletion von gesamtzellulärem Cholesterin wurde durch Hemmung der  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylglutaryl-Coenzym-A- (HMG-CoA) Reduktase erreicht. Dieses Enzym katalysiert den Schritt, bei dem HMG-CoA zu Mevalonat reduziert wird. Hierbei handelt es sich um die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion in der Synthese von Cholesterin. Im Gegensatz zur Behandlung mit M $\beta$ CD wurde dabei nicht nur in der PM, sondern auch intrazellulär die Cholesterinkonzentration reduziert. Die HMG-CoA-Reduktase kann man mit Vertretern aus der Klasse der Statine hemmen. L-Mevalonat ist notwendig für die Geranylisierung und Farnesylierung zahlreicher Proteine und seine Entstehung wird ebenfalls durch Statinbehandlung inhibiert. Um Cholesterin-unabhängige Effekte durch verminderte Geranylisierung und Farnesylierung zu verhindern, wurde den Zellen L-Mevalonat in einer Konzentration von 50  $\mu$ M zugeführt, die keinen Einfluss auf die De-novo-Synthese von Cholesterin hat.

Die Oli-neu-Zellen wurden mit 4  $\mu$ M Simvastatin in SATO-Medium (1% LPS) für 48 h inkubiert, das ebenfalls 50  $\mu$ M L-Mevalonat enthielt. Hier ergab sich ein ähnliches Bild wie beim ersten Ansatz: die Hemmung des Schlüsselenzyms der Cho-

lesterinbiosynthese führte zu einer stärkeren Flotillin-2-Präsenz an der Plasmamembran im Vergleich zu unbehandelten Zellen (ebenfalls Abbildung 3.1 B; 23,4% Abnahme von endosomalem Flotillin-2, SEM = 0,013, n = 175 Zellen,  $p < 0,0001$ , Student's t-Test, 2 unabhängige Experimente. Um die vergleichenden Balkendiagramme erstellen zu können, wurden jeweils die intrazellulären Signalstärken des vesikulären Anteils von Flotillin-2, als auch die Gesamtsignalstärke der Zelle für Flotillin-2 gemessen und daraus das Verhältnis Flotillin-2 vesikulär/Gesamt bestimmt.)



**Abbildung 3.1: Flotillin-2 wird durch Depletion von Cholesterin in die PM umverteilt:** Den Oli-neu-Zellen wurde auf zwei Arten Cholesterin entzogen. **A:** Für die akute Depletion wurde 1 mM Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M $\beta$ CD) für 2 h zu den Zellen gegeben. **B:** Zellen wurden mit 4  $\mu$ M Simvastatin und 50  $\mu$ M L-Mevalonat für 48 h inkubiert. **A** und **B:** Nach der Fixierung der Zellen wurden diese für endogenes Flotillin-2 (rot) angefärbt. Die Intensität wurde mit Hilfe identischer Aufnahmeeinstellungen des Konfokalmikroskops gemessen. Für beide Ansätze behandelter Zellen ergab sich eine vermehrte Präsenz von Flotillin-2 an der Plasmamembran. Mittelwerte +SEM aus zwei unabhängigen Experimenten, Student's t-Test.  $p < 0,005$  entspricht \*\*,  $p < 0,0005$  entspricht \*\*\*.

### 3.1.3 Zufuhr von freiem Cholesterin führt zu einer endosomalen Akkumulation von Flotillin

Unsere Erkenntnis, dass Cholesterin-Depletion eine Umverteilung von Flotillin-2 zur Plasmamembran bedingt, führte nun zu der Frage, ob umgekehrt eine Erhöhung des Cholesterinspiegels zur Umverteilung von der PM in endosomale Kompartimente führen kann. In den folgenden Versuchen sollte dies untersucht werden, indem die Zellen zunächst 4 h in serumfreiem SATO vorinkubiert und dann mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cholesterin (in Form eines Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Komplexes, der mit in Ethanol gelöstem Cholesterin gesättigt war) für weitere 4 h behandelt wurden. Mikroskopisch wurde zunächst anhand ihrer augenscheinlich normalen Morphologie festgestellt, dass diese Behandlung keinerlei zytotoxische Effekte auf die Zellen hatte. Die erfolgreiche Aufnahme von Cholesterin in die Zellen konnte mit Hilfe einer Filipin-Färbung nachgewiesen werden. Die Filipinfärbung zeigte bei Cholesterin-behandelten Zellen das aufgenommene und intrazellulär akkumulierte Cholesterin, wohingegen sich bei unbehandelten Zellen eine gleichmäßig verteilte und schwächere Filipinfärbung zeigte. Diese intrazellulären, Filipin-positiven Aggregate wurden durch Ko-Färbung mit verschiedenen endosomalen Markern genauer charakterisiert. Dabei fand sich Kollokalisierung mit GFP-rab7 als Marker später Endosomen, mit LAMP-1 als Lysosomenmarker und EGFP-CD63 als Marker für MVBs. Filipin-positive Kompartimente kollokalisieren dabei partiell mit Flotillin-2, rab7, LAMP-1 und CD-63, was darauf hindeutet, dass Flotillin-2 und Cholesterin möglicherweise zusammen transportiert werden (siehe Abbildung 3.2; Ergebnisse nicht gezeigt, Strauss et al. 2010).

Anschließend wurde die Verteilung von Flotillin-2 nach Cholesterinladung quantifiziert, wobei sich eine Umverteilung von 13,6% in Richtung intrazellulärer Kompartimente gegenüber der PM ergab (siehe Abbildung 3.2; Flotillin-2: 13,6% Erhöhung, SEM = 0,028, n = 171 Zellen, p = 0,0003, Student's t-Test, vier unabhängige Experimente; für Flotillin-1 ähnliche Effekte, Ergebnisse nicht gezeigt. Um die vergleichenden Balkendiagramme erstellen zu können, wurde die vesikuläre Fluoreszenzintensität von Flotillin-2, als auch die Gesamtfluoreszenzintensität der Zelle für Flotillin-2 gemessen und daraus das Verhältnis von vesikulärem Flotillin zu Gesamtflotillin bestimmt.)

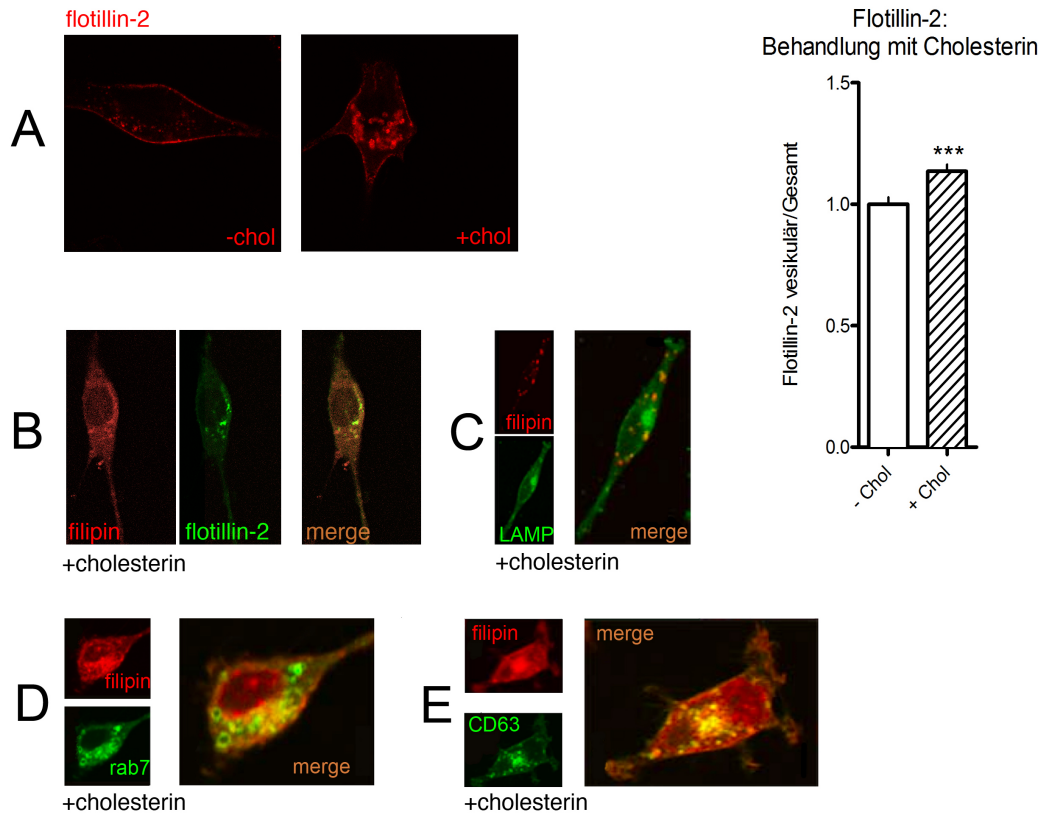


Abbildung 3.2: **Zufuhr von Cholesterin führt zur intrazellulären Umverteilung von Flotillin**: **A**: Oli-neu-Zellen wurden 4 h in serumfreiem SATO depletiert und anschließend für 4 h mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cholesterin (als Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Komplex) behandelt (+chol) oder als Kontrolle nicht behandelt (-chol). Nach der Fixierung der Zellen wurden diese für endogenes Flotillin-2 (rot) immungefärbt. Die Fluoreszenzintensität wurde mit Hilfe identischer Aufnahmeeinstellungen des Konfokalmikroskops gemessen. Flotillin-2 akkumuliert unter Behandlung mit Cholesterin in endosomalen Kompartimenten. Mittelwerte  $\pm$ SEM aus vier unabhängigen Experimenten, Student's t-Test.  $p < 0,0005$  entspricht \*\*\*. **B – E**: Subzelluläre Lokalisierung von Cholesterin und Flotillin nach exogener Zufuhr von Cholesterin; Filipinfärbung für Flotillin (rot); **B**: endogenes Flotillin-2 (grün); **C**: endogenes LAMP-1 (grün) für das späte Endosom/Lysosom; **D**: exogenes rab7-GFP (grün) und **E**: EGFP-CD63 (grün).

Der Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von Flotillin wurde in Abhängigkeit einer Akkumulation von Cholesterin in spezifischen intrazellulären Kompartimenten, zum einen in späten Endosomen, zum anderen im ER untersucht.

Das amphipathische U18666A (3- $\beta$ -[(2-diethyl-amino)ethoxy]androst-5-en-17-one) verhindert den Transport von Cholesterin aus späten Endosomen in das ER und an die Plasmamembran, was zu einer Akkumulation in den späten Endosomen und Lysosomen führt (Liscum und Faust 1989). Die Zellen wurden mit 1,5  $\mu\text{g/ml}$  U18666A für 16 h inkubiert, was zu einer vesikulären Akkumulation von Flotillin-2 führte (siehe Abbildung 3.3 A; 7,02% Erhöhung, S.E. = 0,02, n = 69, p = 0,022, Student's t-Test, 2 unabhängige Experimente).

Der zweite Ansatz beinhaltete die Hemmung der Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT). Die ACAT ist ein Enzym, welches im ER die Veresterung von Cholesterin mit Fettsäuren zu wasserunlöslichen Cholesterinestern katalysiert. Als Resultat der Hemmung ergibt sich eine Anreicherung von Cholesterin im ER. CP-113.818 ist ein solcher Inhibitor der ACAT. In diesem zweiten Ansatz inkubierten wir die Oli-neu-Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  CP-113.818 für 24 h, was zu einer 21%-igen Erhöhung von vesikulärem Flotillin-2 versus PM-gebundenem Flotillin-2 führte (siehe Abbildung 3.3 B; 21,8% Erhöhung, SEM = 0,025, n = 213 Zellen, p < 0,0001, Student's t-Test, vier unabhängige Experimente. Für Flotillin-1 ähnliche Effekte, Ergebnisse nicht gezeigt. Um die vergleichenden Balkendiagramme erstellen zu können, wurden je die Signalstärken der vesikulären Flotillin-2-Fluoreszenz, als auch die Gesamtfluoreszenzintensität der Zelle für Flotillin-2 gemessen und daraus das Verhältnis Flotillin-2 vesikulär versus Gesamt bestimmt.)

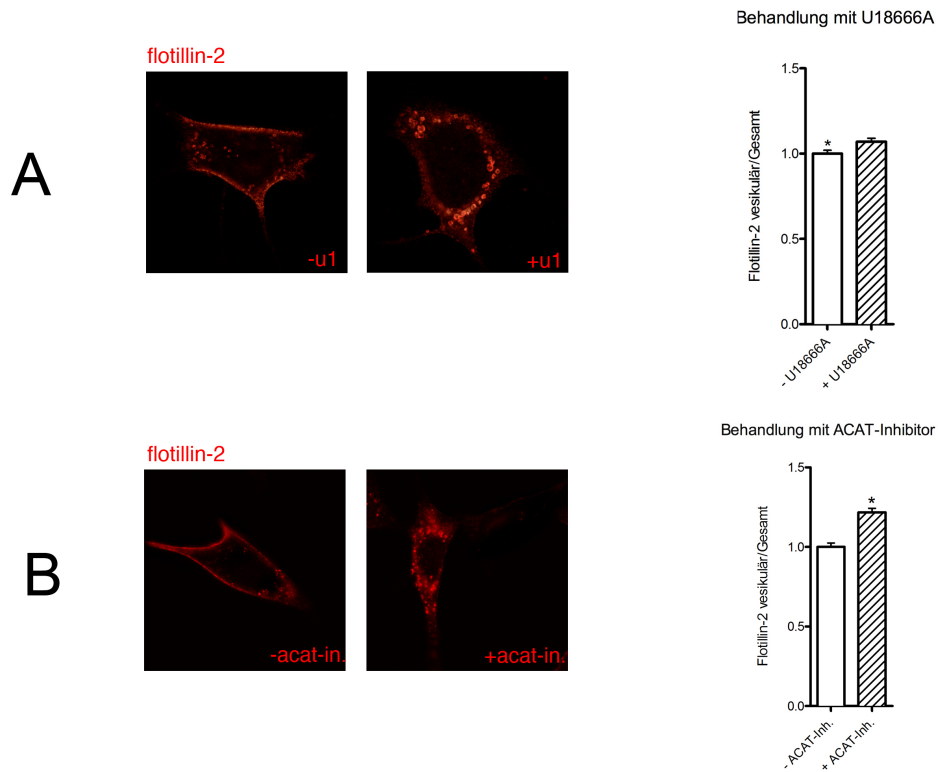


Abbildung 3.3: **Cholesterinakkumulation führt zur Umverteilung von Flotillin in endosomale Kompartimente:** **A:** Behandlung von Oli-neu-Zellen mit  $1,5 \mu\text{g/ml}$  U18666A für 16 h. **B:** Behandlung von Oli-neu-Zellen mit  $10 \mu\text{M}$  des ACAT-Inhibitors CP-113.818 für 24 h. **A** und **B:** Nach der Fixierung der behandelten Zellen und der Kontrolle, wurden diese gegen endogenes Flotillin-2 (rot) immungefärbt. Die Intensität wurde mit Hilfe identischer Aufnahmeeinstellungen des Konfokalmikroskops gemessen. Mittelwerte  $\pm$ SEM aus vier unabhängigen Experimenten, Student's t-Test.  $p < 0,05$  entspricht \*,  $p < 0,0005$  entspricht \*\*\*.

### 3.1.4 Einfluss der putativen *Cholesterol Recognition/Interaction Domäne* auf die Cholesterin-abhängige Umverteilung von Flotillin

Flotillin-2 enthält zwei putative CRAC-Motive ((L/V-(X))(1-5)-Y-(X)(1-5)-R/K), die eine Rolle bei der Cholesterin-Interaktion spielen könnten. Wir untersuchten deshalb den Einfluss dieser Motive auf die Cholesterin-abhängige Lokalisation von Flotillin.

Es war zuvor in einem anderen Protein, dem *Peripheral Type Benzodiazepine Receptor* (PBR), gezeigt worden, dass die CRAC-Domäne funktionell relevant für das Binden von Cholesterin ist. Die Mutation eines Tyrosin-Restes der CRAC-Domäne dieses Proteins führte zu einer verringerten Aufnahme und Translokation von Cholesterin in die Mitochondrien (Li et al. 2001, Jamin et al. 2005).

Wir führten deshalb Punktmutationen in eine bzw. beide Tyrosine der putativen CRAC-Motive des Flotillins ein. Es handelte sich bei den beiden Stellen um die Aminosäuresequenzen 120-127 (VEQIYQDR) und 157-169 (VYDKVDYLSSLGK) in Flotillin-2-GFP. Es entstanden somit drei Mutanten: Flotillin-2-GFP Y124G, Flotillin-2-GFP Y163G und Flotillin-2-GFP Y124G/Y163G. Oli-neu-Zellen wurden mit den jeweiligen Flotillin-2-GFP-Konstrukten transfiziert und die subzelluläre Verteilung untersucht. Es ergab sich, im Vergleich zum Wildtyp Flotillin-2-GFP, hierbei das Bild einer verstärkten Präsenz aller mutierten Flotillin-2-Varianten an der Plasmamembran; am deutlichsten zu sehen im Falle des an zwei Stellen mutierten Flotillin-2-GFP Y124G/Y163G. Die mutierten Flotilline verhielten sich gewissermaßen so, als wäre kein oder nur wenig Cholesterin vorhanden, da die entscheidende Interaktionsstelle ausgeschaltet war (siehe Abbildung 3.4; 51%-ige Reduktion im Verhältnis vesikuläres/totalem Flotillin-2, S.E. = 0,05,  $p < 0,0001$ , Student's t-Test. Um die vergleichenden Balkendiagramme erstellen zu können, wurden je die vesikuläre Signalstärke von Flotillin-2, als auch die Gesamtsignalstärke der Zelle für Flotillin-2 gemessen und daraus das Verhältnis Flotillin-2 vesikulär/Gesamtzellulär bestimmt.)

Daraus lässt sich schließen, dass die CRAC-Domänen für eine cholesterinabhängige Verteilung hin zu intrazellulären Kompartimenten eine wichtige Rolle spielen.



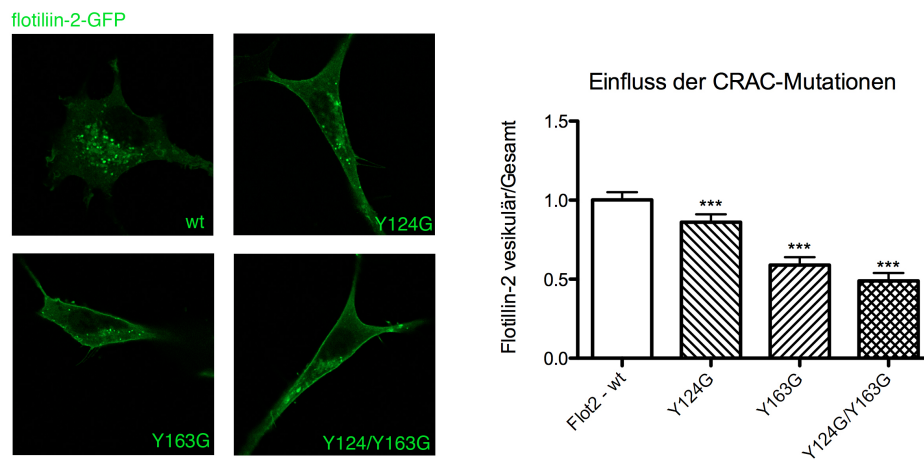


Abbildung 3.4: **Die CRAC-Domänen beeinflussen die subzelluläre Lokalisation von Flotillin:** Oli-neu-Zellen wurden mit flot2-GFP Wildtyp (wt), flot2-GFP mit einer (Y124G / Y163G) oder mit beiden Mutationen (Y124G/Y163G) in den angenommenen CRAC-Domänen transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert. Die Intensität wurde mit Hilfe identischer Aufnahmeeinstellungen des Konfokalmikroskops gemessen. Mittelwerte +SEM aus drei unabhängigen Experimenten, Student's t-Test.  $p < 0,0005$  entspricht \*\*\*.

### 3.1.5 Cholesterin-abhängige Umverteilung in Abhängigkeit vom zytoskelettalen System

Es stellte sich die Frage, inwieweit die beobachtete Cholesterin-abhängige Umverteilungen abhängig von Mikrotubuli oder Aktinfilamenten ist. Nocodazol führt zur Depolymerisation von Mikrotubuli. Latrunculin bindet die Aktinmonomere und stört damit deren Polymerisation. Die Oli-neu-Zellen wurden wahlweise mit  $16,7 \mu\text{M}$  Nocodazol oder  $2 \mu\text{M}$  Latrunculin für 30 min vorinkubiert und dann in Anwesenheit dieser Substanzen für 4 h mit  $50 \mu\text{g/ml}$  Cholesterin (in Form eines Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Komplexes, der mit in Ethanol gelöstem Cholesterin gesättigt war) behandelt. Die Zellen wurden nach Fixierung mit einem Antikörper gegen endogenes Flotillin-1 gefärbt, konfokalmikroskopisch analysiert und die intrazellulären Verteilungen quantifiziert.

Es fand sich kein signifikanter Unterschied im Verhältnis von vesikulärem Flotillin-

1 zu Gesamt-Flotillin-1 nach Cholesterinbehandlung, wenn die Zellen mit Nocodazol oder mit Latrunculin behandelt waren. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine Cholesterin-abhängige Umverteilung in endosomale Kompartimente in Zellen, die nicht mit Nocodazol oder Latrunculin behandelt worden waren.

Daraus lässt sich schließen, dass die beobachtete, Cholesterin-abhängige Umverteilung abhängig von der Intaktheit des Zytoskeletts ist (siehe Abbildung 3.5; für + Cholesterin: 16,5% mehr vesikulär, Student's t-Test,  $p < 0,0005$ ; für + Latrunculin mit + Cholesterin: 2,5% weniger vesikulär,  $n = 89$  Zellen, Student's t-Test, kein signifikanter Unterschied mit  $p = 0,99$ ; für Nocodazol mit + Cholesterin: 7% weniger vesikulär,  $n = 95$  Zellen, Student's t-Test, kein signifikanter Unterschied mit  $p = 0,17$ . Um die vergleichenden Balkendiagramme erstellen zu können, wurde die intrazelluläre Fluoreszenzintensität des vesikulären Anteils von Flotillin-1, als auch die Gesamtfluoreszenzintensität der Zelle für Flotillin-1 gemessen und daraus das Verhältnis Flotillin-1 vesikulär/Gesamt bestimmt.)

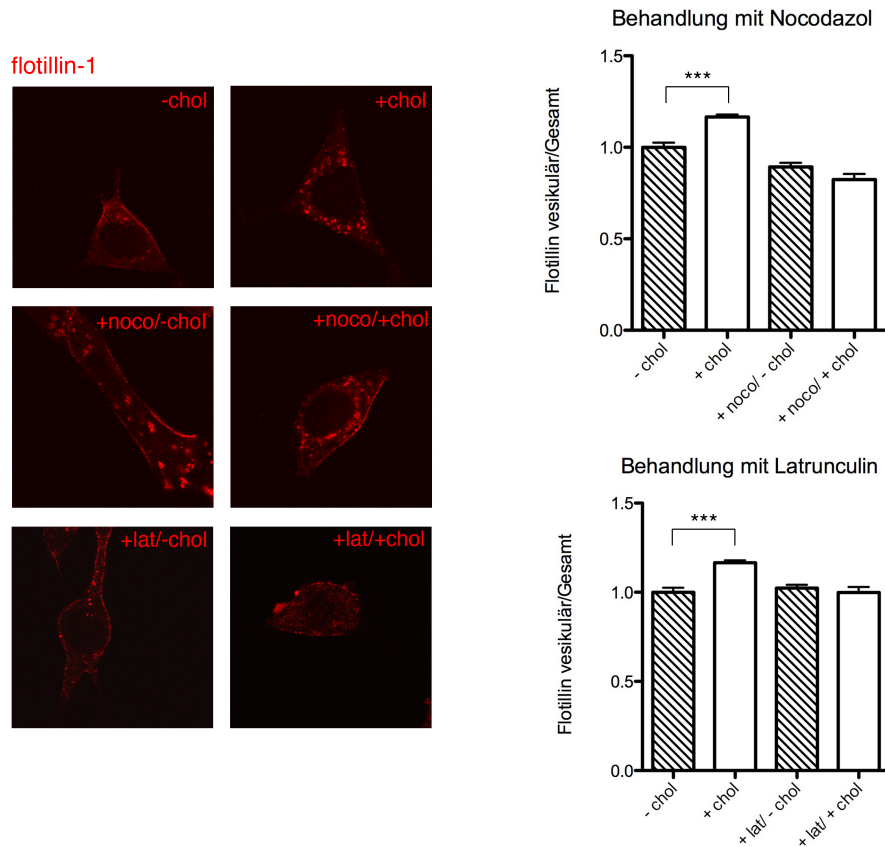


Abbildung 3.5: **Die Cholesterin-abhängige Umverteilung benötigt ein intaktes Zytoskelett:** Oli-neu-Zellen wurden mit  $16,7 \mu\text{M}$  (1:500) Nocodazol (+noco) oder mit  $2 \mu\text{M/m}$  Latrunculin A (+lat) für 30 min, anschließend in Anwesenheit dieser Substanzen für 4 h mit  $50 \mu\text{g/ml}$  Cholesterol (+chol) (in Form eines Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Komplexes) behandelt. Die oberste Bildreihe zeigt die Kontrolle ohne Polymerisationshemmer. Nach der Fixierung der Zellen wurden diese gegen endogenes Flotillin-1 (rot) gefärbt. Die Intensität wurde mit Hilfe identischer Aufnahmeeinstellungen des Konfokalmikroskops gemessen. Mittelwerte  $\pm$ SEM aus drei unabhängigen Experimenten, Student's t-Test.  $p < 0,0005$  entspricht \*\*\*.

## 3.2 Der Einfluss von Cholesterin auf die Expressionsrate von Flotillin

Es stellte sich die Frage, ob Flotillin einen Einfluss auf die Cholesterin-Homöostase haben kann und seine Expression daher durch Cholesterin beeinflusst ist. Einige Proteine erfahren eine Modulation ihrer Expression in Abhängigkeit vom intrazellulären Cholesterinspiegel. Von Caveolin, welches in seinen funktionellen und molekular-topologischen Eigenschaften dem Flotillin sehr ähnlich ist, ist bekannt, dass es in seiner Expression durch Cholesterin reguliert wird (Garver et al. 1997). Wir quantifizierten deshalb die zellulären Flotillinkonzentrationen in Abhängigkeit vom Cholesteringehalt der Zelle.

### 3.2.1 Depletion von Cholesterin hat keinen Effekt auf die Expression Flotillins

Zur Depletion wurde Oli-neu-Zellen mit 1 mM Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (über 2 h) akut das PM-Cholesterin entzogen. In einem zweiten Ansatz wurde die HMG-CoA-Reduktase mit 4  $\mu$ M Simvastatin unter Hinzugabe von 50  $\mu$ M L-Mevalonat über 48 h gehemmt. Die Zellen aller Ansätze wurden anschließend lysiert und die Zelllysate durch Western blotting auf ihren Gehalt an Flotillin gegenüber unbehandelten Kontrollen verglichen. Dazu wurden die jeweiligen Verhältnisse Flotillin zu Calnexin als interne Ladekontrolle gebildet.

Hierbei zeichneten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression Flotillins ab (siehe Abbildung 3.6 A und B; Mittelwerte  $\pm$ SEM aus 5 unabhängigen Experimenten, Student's t-Test. Unterschiede nicht signifikant).

### 3.2.2 Erhöhung der zellulären Cholesterinkonzentration hat keinen Effekt auf die Expression Flotillins

Oli-neu-Zellen wurden über 20 h mit freiem Cholesterin in einer endgültigen Konzentration von 50  $\mu$ g/ml beladen (als Methyl- $\beta$ -cyclodextrin-Komplex, gesättigt mit in Ethanol gelöstem Cholesterin). In einem zweiten Ansatz wurde eine Behandlung mit 1,5  $\mu$ g/ml U18666A über Nacht in den Oli-neu Zellen durchgeführt, um Cholesterin intrazellulär in späten Endosomen zu akkumulieren. Die Zellen

wurden nach 20 bzw. 16 Stunden lysiert und die Zelllysate durch Western blotting auf ihren Gehalt an Flotillin gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (die Kontrolle für das Cholesterin-Loading war Ethanol in einer identischen Konzentration) verglichen. Dazu wurde das Verhältnis Flotillin zu Calnexin als interne Ladekontrolle gebildet.

Wie bei dem Depletionsversuch zuvor, zeigten sich auch hier keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Flotillin unter Einfluss von Cholesterin (siehe Abbildung 3.6 C und D; Mittelwerte  $\pm$ SEM aus 3 unabhängigen Experimenten, Student's t-Test. Unterschiede nicht signifikant).

Die Expression von Flotillin wird demnach unter den verwendeten Versuchsbedingungen nicht von Cholesterin beeinflusst.

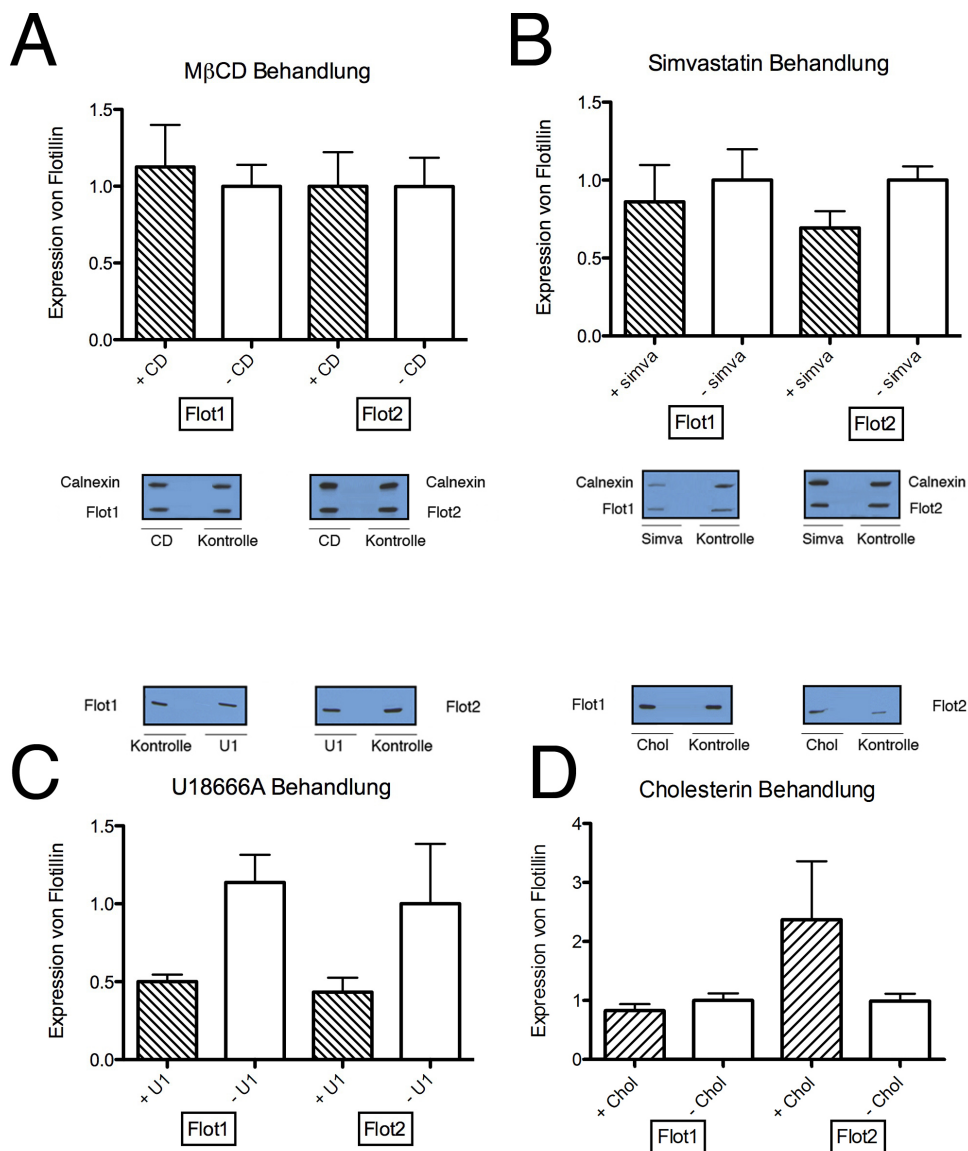


Abbildung 3.6: **Die Expressionsrate von Flotillin zeigt keine Abhängigkeit von Cholesterin:** **A:** 1 mM Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin über 2 h wurde zur akuten Depletion von Cholesterin verwendet. **B:** 4  $\mu$ M Simvastatin unter Hinzugabe von 50  $\mu$ M L-Mevalonat über 48 h wurde verwendet, um die intrazelluläre Cholesterinsynthese zu hemmen. **C:** 1,5  $\mu$ g/ml U18666A über Nacht wurde verwendet, um eine intrazelluläre Akkumulation von Cholesterin in Lysosomen zu erreichen. **D:** 50  $\mu$ g/ml freies Cholesterin für 20 h wurde benutzt, um die intrazelluläre Konzentration von Cholesterin zu erhöhen. **A, B, C** und **D:** Im Anschluss wurden die Zellen mit CHAPS-Puffer lysiert und dann mit Hilfe von Western Blots auf ihren relativen Gehalt an Flotillin (mit Calnexin als interner Kontrolle) untersucht. Dazu wurden die jeweiligen Verhältnisse Flotillin zu Calnexin gebildet und gegenüber unbehandelten Kontrollen verglichen. Mittelwerte  $\pm$ SEM aus 8 unabhängigen Experimenten, Student's t-Test. Kein signifikanter Unterschied.

### 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Verteilung von Flotillin zwischen der PM und intrazellulären Kompartimenten ist abhängig von Cholesterin. Eine niedrige zelluläre Cholesterinkonzentration führt zu vermehrter Präsenz Flotillins an der PM. Das Laden der Zelle mit Cholesterin führt zur Anreicherung von Flotillin und Cholesterin in endosomalen Vesikeln. Bei den Cholesterin-abhängigen Umverteilungsversuchen zeigte sich zudem, dass die Umverteilungen von Flotillin von einem intakten Tubulin- und Aktin-Zytoskelett abhängen. Eine quantitative Analyse des Flotillin-Expressionsniveaus hat ergeben, dass Flotillin – transkriptionell oder posttranskriptionell – nicht von der zellulären Cholesterinkonzentration abhängig ist.

#### 3.3.1 Publikation der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben Eingang in folgende Publikation gefunden:

EXOSOME SECRETION AMELIORATES LYSOSOMAL STORAGE OF  
CHOLESTEROL IN NIEMANN-PICK TYPE C DISEASE

Katrin Strauss, Cornelia Goebel, Heiko Runz, Wiebke Möbius, Sievert Weiss,  
Ivo Feussner, Mikael Simons, und Anja Schneider.

Journal of Biological Chemistry 285(34): 26279-26288 (2010)

# Kapitel 4

## Diskussion

### Verteilung von Flotillin ist abhängig vom Cholesterinspiegel

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die subzelluläre Lokalisation von Flotillin in Abhängigkeit von Cholesterin zu untersuchen, nachdem wir zeigen konnten, dass Cholesterin unter pathologischen Bedingungen über Exosomen aus Zellen transportiert werden kann, worüber Zellen möglicherweise ihren Cholesteringehalt regulieren können. Unklar war, wie Cholesterin in Exosomen angereichert werden kann. Flotillin ist ein membranassoziiertes, zytosolisches Protein, das mit Cholesterin-reichen Membranmikrodomänen kolokalisiert und exosomal angereichert ist. Dies führte zur Vermutung, dass Flotillin eine Rolle beim Transport von Cholesterin in Exosomen spielen könnte. Flotillin findet sich sowohl assoziiert an die Plasmamembran, als auch angereichert an endosomalen Membranen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Flotillin an allen endosomalen Kompartimenten, einschließlich frühen und späten Endosomen, vorkommt, wo es partiell mit Cholesterin kolokalisiert. Hohe zelluläre Cholesterinspiegel führen zu einer Umverteilung von Flotillin von der Plasmamembran hin zu endosomalen Kompartimenten. Ein umgekehrter Effekt wurde nach Reduktion der zellulären Cholesterinkonzentration beobachtet. Wir konnten nachweisen, dass die Cholesterin-abhängige Umverteilung ein aktiver Transportprozess ist, der die Intaktheit sowohl des Aktin- als auch des Tubulin-Zytoskeletts erfordert. Wir konnten zudem zeigen, dass die Rekrutierung von Flotillin hin zu endosomalen



Kompartimenten abhängig vom Vorhandensein einer Konsensussequenz für die Cholesterininteraktion/-bindung ist. Diese Daten deuten darauf hin, dass Flotillin und Cholesterin gemeinsam in der Zelle transportiert werden. Dazu passt, dass eine Reduktion der zellulären Flotillinkonzentration zu einer deutlichen und signifikanten Reduktion der exosomalen Cholesterinfreisetzung führte (Strauss et al. 2010). Wir untersuchten daher die Hypothese, dass Flotillin eine Rolle bei der Cholesterinhomöostase der Zelle spielen könnte, indem auch das Expressionsniveau des Proteins in Abhängigkeit vom Cholesterinspiegel reguliert wird. Eine ähnliche Regulation ist beispielsweise für Caveolin beschrieben (Bist et al. 1997). Für Flotillin konnten wir allerdings keine signifikante Veränderung auf Proteinebene weder nach Erhöhung noch nach Reduktion der zellulären Cholesterinspiegel finden. Dabei ist kritisch zu bemerken, dass die Zeit zwischen Manipulation der Cholesterinspiegel und Bestimmung der Flotillinkonzentration mit 2 bis 48 Stunden, je nach experimenteller Bedingung, möglicherweise zu kurz ist, um eine Veränderung zu detektieren, die auf einer erhöhten Proteinexpression beruht.

Es ist von überlebenswichtiger Bedeutung für die Zelle, Einfluss auf ihren Cholesterinhaushalt nehmen und diesen bedarfsorientiert regulieren zu können. Zur Regulierung bedient sich die Zelle dabei eines ausgeklügelten Endprodukt-Feedbackmechanismus. Dieser kann sowohl transkriptionell, als auch posttranskriptionell seine Wirkung entfalten. Dabei stehen zwei membrangebundene Proteine im Vordergrund: die HMG-CoA-Reduktase (geschwindigkeitsbestimmendes, ER-ansässiges Enzym) und das Protein Scap. Beiden gemein ist eine polytope Intramembrandomäne, die *sterol sensing domain*, an die verschiedene Sterole (Cholesterin, Lanosterol und Oxysterole) binden können. Sterolbindung an diese Domäne bewirkt ein Binden von Scap und der HMG-CoA-Reduktase an Insig. Im Falle der HMG-CoA-Reduktase bewirkt die durch Lanosterol induzierte Bindung an Insig via gp78 die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau der Reduktase. So kann die Reduktase kein endogenes Cholesterin synthetisieren und zu hohe intrazelluläre Cholesterinspiegel werden vermieden (Goldstein et al. 2006).

Im Falle von Scap bewirkt Insig die Bindung an das ER. Bindet kein Cholesterin an Scap, entlässt Insig einen Komplex aus Scap und einem *sterol regulatory element binding protein* (SREBP) in Richtung Golgi-Apparat, wo aus dem SREBP der Transkriptionsfaktor entsteht. Dieser regt mit Bindung an die *sterol regulatory elements* (SRE) die Expression von über 30 verschiedenen Proteinen an. Zu

diesen Proteinen gehören u.a. der LDL-Rezeptor oder die HMG-CoA-Reduktase, die bei niedrigen Cholesterinspiegeln expremiert werden (Goldstein et al. 2006). Bist et al. (1997) zeigten, dass auch die Caveolinexpression zum Teil cholesterinabhängig reguliert ist. Caveolin ist funktionell und strukturell Flotillin ähnlich. Flotillin scheint potentiell ähnliche Funktionen wie Caveolin für den intrazellulären Verbleib und damit den Haushalt von Cholesterin haben zu können (Ikonen und Parton 2000). Funktionelle Eigenschaften, wie die Membranassoziation, die frühe Oligomerbildung, die hohe Affinität zu bestimmten Lipiden, die laterale Membranorganisation, die daraus folgende Formation von Membranamikrodomänen und wiederum daraus resultierende endozytotische Fähigkeiten, scheinen beiden gemein zu sein (Bauer und Pelkmans 2006). Grundlage ähnlicher Funktion könnte die Ähnlichkeit topologischer Eigenschaften sein: Caveolin bildet eine *hairpin*-ähnliche Struktur mit zentralem hydrophoben Bereich, die in die Membran ragt, diese aber nicht durchzieht und C- und N-Terminus des Proteins ins Zytosol richtet. Diese Eigenschaft wird der SPFH-Domäne Flotillins ebenfalls zugeschrieben. Beide Proteine weisen CRAC-Konsensussequenzen auf (Li und Papadopoulos 1998, Roitbak et al. 2005). Caveolin bindet Cholesterin in einem 1 zu 1 Verhältnis (Epanand et al. 2005). Die Konzentration von Caveolin-mRNA in humanen Hautfibroblasten kann durch LDL-Cholesterin-Aufnahme erhöht werden. Bei der Analyse des für Caveolin codierenden Gen-Abschnitts fand man drei potentielle SRE, von denen sich zwei funktionell bedeutsam für die erhöhte Transkriptionsrate nach vermehrter Endozytose von LDL-Cholesterin zeigten. Interessanterweise führte eine Hemmung des Abbaus von SREBP zu einer verminderten Konzentration von Caveolin-mRNA (Bist et al. 1997).

Zusammenfassend deuten unsere Ergebnisse auf eine mögliche Rolle von Flotillin beim Transport von Cholesterin in Exosomen hin, worüber die zelluläre Cholesterinhomöostase zumindest moduliert werden kann (Strauss et al. 2010). Neumann-Giesen et al. (2007) haben gezeigt, dass Flotillin-2, welches nach EGF-Stimulation am Tyrosin 163 durch eine Src-Kinase phosphoryliert ist, vermehrt in endosomalen Strukturen lokalisiert, während die Behandlung von Zellen mit dem Src-Kinase-Inhibitor PP2 die Umverteilung von der Plasmamembran in endosomale Kompartimente inhibierte.

Das wirft die Frage auf, ob die von uns beobachtete Umverteilung nach Mutation der CRAC-Domänen nicht darauf zurückzuführen ist, dass aufgrund der Muta-

tion an den betreffenden Stellen keine Aktivierung von Flotillin-2 durch Phosphorylierung ebendort stattfinden konnte. Gegen diesen alternativen Erklärungsversuch spricht, dass auch die Mutation der zweiten CRAC-Domäne, die cholesterinabhängige Umverteilung hin zu endosomalen Kompartimenten inhibiert. Um direkt einen phosphorylierungsabhängigen Effekt von Tyr163 auf die cholesterinabhängige Lokalisation von Flotillin auszuschließen, behandelten wir Zellen mit den beiden Src-Kinase-Inhibitoren PP2 oder Genistein. In unseren Versuchen sahen wir, dass diese Behandlung die cholesterinabhängige Umverteilung von Flotillin-2 von der Plasmamembran hin zu endosomalen Kompartimenten nicht veränderte (Daten nicht gezeigt).

Daraus schließen wir, dass die Interaktion Flotillins mit Cholesterin über die CRAC-Domänen unabhängig von der Phosphorylierung am Tyrosinrest 163 eine wesentliche Voraussetzung für die Cholesterin-abhängige Umverteilung von Flotillin ist. Kritisch zu bemerken ist allerdings, dass wir die Flotillin-Cholesterin Interaktion/Bindung nicht experimentell nachgewiesen haben, ebenso wie wir den Einfluss der mutierten CRAC-Domänen auf diese Bindung nicht direkt bestimmt haben. Ein indirekter Hinweis kommt aus nicht-publizierten Arbeiten von K. Strauss, die zeigen konnte, dass Flotillin mit mutierten CRAC-Motiven weniger in der detergenzresistenten Membranfraktion flotiert, nachdem die entsprechend transfizierten Zellen in 1% 4°C kaltem Triton resuspendiert und auf einen diskontinuierlichen Optiprepgradienten aufgetragen und für 16 Stunden ultrazentrifugiert wurden. Dabei finden sich Proteine, die mit Cholesterin-reichen Membranmikrodomänen interagieren, in detergenzresistenten Fraktionen (London und Brown 2000). Alle Kombinationen von CRAC-mutiertem Flotillin fanden sich im Gegensatz zum Wildtyp-Flotillin signifikant weniger in dieser detergenzresistenten Fraktion. Ein direkter Nachweis der CRAC-abhängigen Flotillin-Cholesterin-Bindung ist schwierig, wäre experimentell aber eventuell über ein Photoaffinitätsmarkierungsverfahren von Proteinen mit radioaktivem Photo-Cholesterin möglich, wie von Thiele et al. (2000) beschrieben.

Wir hatten gezeigt, dass die Flotillin-abhängige Cholesterinabgabe via Exosomen durch intrazelluläre Cholesterinspiegel moduliert wird. Exosomen entstehen durch Invagination der spät-endosomalen Membran, was zur Akkumulation von intraluminalen Vesikeln in diesen Kompartimenten führt. Durch anschließende Fusion mit der Plasmamembran werden diese intraluminalen Vesikel als Exoso-

men freigesetzt. Die Mutation von NPC bewirkt einen spät-endosomalen Transportblock von Cholesterin, der mit einer erhöhten exosomalen Cholesterinfreisetzung einhergeht (Strauss et al. 2010).

Phillips et al. (2008) zeigten hierzu passend in *Drosophila melanogaster* mit NPC-Mutationen progrediente Akkumulation von multilamellären und multivesikulären Körpern. Auch Liao et al. (2007) beobachteten elektronenmikroskopisch in NPC1(-/-)-Mäusen, dass sich, einhergehend mit der Cholesterinanreicherung, vermehrt multivesikuläre Strukturen in den Purkinje-Zellen der Mäuse ausbilden.

Der Mechanismus, dass Zellen toxische oder überschüssige Substanzen über Exosomen abgeben können und die Proteinzusammensetzung dieser Exosomen vom Zelltyp abhängt, macht Exosomen zu einem geeigneten Kandidaten für die Entwicklung diagnostischer Biomarker (Schorey und Bhatnagar 2008). Hierzu seien die Beispiele des Blasenkarzinoms oder des nephrogenen Diabetes insipidus genannt (Pisitkun et al. 2004, Pisitkun et al. 2006).

Auch durch die von uns gewonnenen Erkenntnisse könnte den Exosomen in der Diagnostik der NPC eine Bedeutung als Biomarker im Blut oder Urin zukommen, da es für die NPC – anders als für andere Speichererkrankungen – keine Screeningtests gibt, was häufig dazu führt, dass die Erkrankung erst mit einer Latenz von Jahren diagnostiziert wird. Für die Entwicklung eines solchen exosomalen Biomarkers kann die Bestimmung der exosomalen Cholesterinkonzentration in Frage kommen.

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit beleuchten wir die subzelluläre Lokalisation von Flotillin unter Einfluss von Cholesterin. Wir zeigen, dass die zelluläre Lokalisation abhängig vom Cholesterinniveau der Zelle ist. Eine Cholesterindepletion bringt Flotillin in die Plasmamembran, sowie umgekehrt eine Überversorgung mit Cholesterin Flotillin in cholesterinhaltige, endosomale Strukturen führt. Dabei ist die Umverteilung abhängig von der Integrität des Zytoskeletts. Außerdem zeigt die vorliegende Arbeit, dass die Umverteilung von Flotillin von der Plasmamembran hin zu endosomalen, intrazellulären Kompartimenten abhängig vom Vorhandensein von zwei putativen Cholesterinbindungs-/Interaktionsdomänen ist.

Aus den gewonnenen Daten ergeben sich weiterhin Hinweise, dass Cholesterin an Flotillin gebunden in das späte Endosomen transportiert wird. In weiterführenden Versuchen unserer Gruppe zeigte sich, dass die exosomale Freisetzung von Cholesterin bei ansteigenden zellulären Cholesterinkonzentrationen erhöht wird und dass die exosomale Cholesterinfreisetzung von Flotillin abhängig ist. Die Daten deuten auf eine mögliche Rolle von Flotillin und Exosomen bei der zellulären Cholesterinhomöostase hin.

# Literaturverzeichnis

- ALPY, F., STOECKEL, M. E., DIERICH, A., ESCOLA, J. M., WENDLING, C., CHENARD, M. P., VANIER, M. T., GRUENBERG, J., TOMASETTO, C. AND RIO, M. C. (2001): The steroidogenic acute regulatory protein homolog MLN64, a late endosomal cholesterol-binding protein. *J Biol Chem* 276 [No. 6] 4261–9.
- BABUKE, T. AND TIKKANEN, R. (2007): Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins. *Eur J Cell Biol* 86 [No. 9] 525–32.
- BARED, S. M., BUECHLER, C., BOETTCHER, A., DAYOUB, R., SIGRUENER, A., GRANDL, M., RUDOLPH, C., DADA, A. AND SCHMITZ, G. (2004): Association of ABCA1 with syntaxin 13 and flotillin-1 and enhanced phagocytosis in tangier cells. *Mol Biol Cell* 15 [No. 12] 5399–407.
- BAUER, M. AND PELKMANS, L. (2006): A new paradigm for membrane-organizing and -shaping scaffolds. *FEBS Lett* 580 [No. 23] 5559–64.
- BAUMANN, C. A., RIBON, V., KANZAKI, M., THURMOND, D. C., MORRA, S., SHIGEMATSU, S., BICKEL, P. E., PESSIN, J. E. AND SALTIEL, A. R. (2000): CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* 407 [No. 6801] 202–7.
- BICKEL, P. E., SCHERER, P. E., SCHNITZER, J. E., OH, P., LISANTI, M. P. AND LODISH, H. F. (1997): Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem* 272 [No. 21] 13793–802.
- BIST, A., FIELDING, P. E. AND FIELDING, C. J. (1997): Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription

in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [No. 20] 10693–8.

BLOCH, K. (1952): Biological synthesis of cholesterol. *Harvey Lect* 48 68–88.

BORNER, G. H. H., SHERRIER, D. J., WEIMAR, T., MICHAELSON, L. V., HAWKINS, N. D., MACASKILL, A., NAPIER, J. A., BEALE, M. H., LILLEY, K. S. AND DUPREE, P. (2005): Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol* 137 [No. 1] 104–16.

BROWN, M. S. AND GOLDSTEIN, J. L. (1986): A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232 [No. 4746] 34–47.

BROWN, M. S., HO, Y. K. AND GOLDSTEIN, J. L. (1980): The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *J Biol Chem* 255 [No. 19] 9344–52.

CENEDELLA, R. J. (2009): Cholesterol synthesis inhibitor U18666A and the role of sterol metabolism and trafficking in numerous pathophysiological processes. *Lipids* 44 [No. 6] 477–87.

CHO, Y. J., CHEMA, D., MOSKOW, J. J., CHO, M., SCHROEDER, W. T., OVERBEEK, P., BUCHBERG, A. M. AND DUVIC, M. (1995): Epidermal surface antigen (MS17S1) is highly conserved between mouse and human. *Genomics* 27 [No. 2] 251–8.

COHEN, A. W., HNASKO, R., SCHUBERT, W. AND LISANTI, M. P. (2004): Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev* 84 [No. 4] 1341–79.

DE GASSART, A., GEMINARD, C., FEVRIER, B., RAPOSO, G. AND VIDAL, M. (2003): Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* 102 [No. 13] 4336–44.

DIETZEN, D. J., HASTINGS, W. R. AND LUBLIN, D. M. (1995): Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem* 270 [No. 12] 6838–42.

- EDGAR, A. J. AND POLAK, J. M. (2001): Flotillin-1: gene structure: cDNA cloning from human lung and the identification of alternative polyadenylation signals. *Int J Biochem Cell Biol* 33 [No. 1] 53–64.
- EPAND, R. M., SAYER, B. G. AND EPAND, R. F. (2005): Caveolin scaffolding region and cholesterol-rich domains in membranes. *J Mol Biol* 345 [No. 2] 339–50.
- FITZNER, D., SCHNEIDER, A., KIPPERT, A., MÖBIUS, W., WILLIG, K. I., HELL, S. W., BUNT, G., GAUS, K. AND SIMONS, M. (2006): Myelin basic protein-dependent plasma membrane reorganization in the formation of myelin. *EMBO J* 25 [No. 21] 5037–48.
- GALBIATI, F., VOLONTE, D., GOLTZ, J. S., STEELE, Z., SEN, J., JURCSAK, J., STEIN, D., STEVENS, L. AND LISANTI, M. P. (1998): Identification, sequence and developmental expression of invertebrate flotillins from *Drosophila melanogaster*. *Gene* 210 [No. 2] 229–37.
- GARVER, W. S., ERICKSON, R. P., WILSON, J. M., COLTON, T. L., HOSAIN, G. S., KOZLOSKI, M. A. AND HEIDENREICH, R. A. (1997): Altered expression of caveolin-1 and increased cholesterol in detergent insoluble membrane fractions from liver in mice with Niemann-Pick disease type C. *Biochim Biophys Acta* 1361 [No. 3] 272–80.
- GKANTIRAGAS, I., BRÜGGER, B., STÜVEN, E., KALOYANOVA, D., LI, X. Y., LÖHR, K., LOTTSPEICH, F., WIELAND, F. T. AND HELMS, J. B. (2001): Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex. *Mol Biol Cell* 12 [No. 6] 1819–33.
- GLEBOV, O. O., BRIGHT, N. A. AND NICHOLS, B. J. (2006): Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 8 [No. 1] 46–54.
- GOLDSTEIN, J. L., DEBOSE-BOYD, R. A. AND BROWN, M. S. (2006): Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124 [No. 1] 35–46.
- GOULD, R. G., TAYLOR, C. B., HAGERMAN, J. S., WARNER, I. AND CAMPBELL, D. J. (1953): Cholesterol metabolism. I. Effect of dietary cholesterol



on the synthesis of cholesterol in dog tissue in vitro. *J Biol Chem* 201 [No. 2] 519–28.

HAUET, T., YAO, Z.-X., BOSE, H. S., WALL, C. T., HAN, Z., LI, W., HALES, D. B., MILLER, W. L., CULTY, M. AND PAPADOPOULOS, V. (2005): Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into leydig cell mitochondria. *Mol Endocrinol* 19 [No. 2] 540–54.

HAZARIKA, P., DHAM, N., PATEL, P., CHO, M., WEIDNER, D., GOLDSMITH, L. AND DUVIC, M. (1999): Flotillin 2 is distinct from epidermal surface antigen (ESA) and is associated with filopodia formation. *J Cell Biochem* 75 [No. 1] 147–59.

HAZARIKA, P., MCCARTY, M. F., PRIETO, V. G., GEORGE, S., BABU, D., KOUL, D., BAR-ELI, M. AND DUVIC, M. (2004): Up-regulation of Flotillin-2 is associated with melanoma progression and modulates expression of the thrombin receptor protease activated receptor 1. *Cancer Res* 64 [No. 20] 7361–9.

HEINO, S., LUSA, S., SOMERHARJU, P., EHNHOLM, C., OLKKONEN, V. M. AND IKONEN, E. (2000): Dissecting the role of the golgi complex and lipid rafts in biosynthetic transport of cholesterol to the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [No. 15] 8375–80.

IKONEN, E. AND PARTON, R. G. (2000): Caveolins and cellular cholesterol balance. *Traffic* 1 [No. 3] 212–7.

JAMIN, N., NEUMANN, J.-M., OSTUNI, M. A., VU, T. K. N., YAO, Z.-X., MURAIL, S., ROBERT, J.-C., GIATZAKIS, C., PAPADOPOULOS, V. AND LACAPÈRE, J.-J. (2005): Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Mol Endocrinol* 19 [No. 3] 588–94.

JUNG, M., KRÄMER, E., GRZENKOWSKI, M., TANG, K., BLAKEMORE, W., AGUZZI, A., KHAZAIE, K., CHLICHIA, K., VON BLANKENFELD, G. AND KETTENMANN, H. (1995): Lines of murine oligodendroglial precursor cells

- immortalized by an activated neu tyrosine kinase show distinct degrees of interaction with axons in vitro and in vivo. *Eur J Neurosci* 7 [No. 6] 1245–65.
- JUREVICS, H. AND MORELL, P. (1995): Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into brain. *J Neurochem* 64 [No. 2] 895–901.
- KANDT, R. S., EMERSON, R. G., SINGER, H. S., VALLE, D. L. AND MOSER, H. W. (1982): Cataplexy in variant forms of Niemann-Pick disease. *Ann Neurol* 12 [No. 3] 284–8.
- KARTEN, B., VANCE, D. E., CAMPENOT, R. B. AND VANCE, J. E. (2002): Cholesterol accumulates in cell bodies, but is decreased in distal axons, of Niemann-Pick C1-deficient neurons. *J Neurochem* 83 [No. 5] 1154–63.
- KIMURA, A., BAUMANN, C. A., CHIANG, S. H. AND SALTIEL, A. R. (2001): The sorbin homology domain: a motif for the targeting of proteins to lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [No. 16] 9098–103.
- KIOKA, N., UEDA, K. AND AMACHI, T. (2002): Vinexin, CAP/ponsin, Arg-BP2: a novel adaptor protein family regulating cytoskeletal organization and signal transduction. *Cell Struct Funct* 27 [No. 1] 1–7.
- KLUCKEN, J., BÜCHLER, C., ORSÓ, E., KAMINSKI, W. E., PORSCH-OZCÜRÜMEZ, M., LIEBISCH, G., KAPINSKY, M., DIEDERICH, W., DROBNIK, W., DEAN, M., ALLIKMETS, R. AND SCHMITZ, G. (2000): ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [No. 2] 817–22.
- KOKUBO, H., HELMS, J. B., OHNO-IWASHITA, Y., SHIMADA, Y., HORIKOSHI, Y. AND YAMAGUCHI, H. (2003): Ultrastructural localization of flotillin-1 to cholesterol-rich membrane microdomains, rafts, in rat brain tissue. *Brain Res* 965 [No. 1-2] 83–90.
- KOKUBO, H., LEMERE, C. A. AND YAMAGUCHI, H. (2000): Localization of flotillins in human brain and their accumulation with the progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurosci Lett* 290 [No. 2] 93–6.

- LAKKARAJU, A. AND RODRIGUEZ-BOULAN, E. (2008): Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol* 18 [No. 5] 199–209.
- LANGHORST, M. F., REUTER, A. AND STUERMER, C. A. O. (2005): Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cell Mol Life Sci* 62 [No. 19-20] 2228–40.
- LANGUI, D., GIRARDOT, N., EL HACHIMI, K. H., ALLINQUANT, B., BLANCHARD, V., PRADIER, L. AND DUYNCKAERTS, C. (2004): Subcellular topography of neuronal Abeta peptide in APPxPS1 transgenic mice. *Am J Pathol* 165 [No. 5] 1465–77.
- LIAO, G., YAO, Y., LIU, J., YU, Z., CHEUNG, S., XIE, A., LIANG, X. AND BI, X. (2007): Cholesterol accumulation is associated with lysosomal dysfunction and autophagic stress in Npc1  $-/-$  mouse brain. *Am J Pathol* 171 [No. 3] 962–75.
- LI, H. AND PAPADOPOULOS, V. (1998): Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology* 139 [No. 12] 4991–7.
- LI, H., YAO, Z., DEGENHARDT, B., TEPER, G. AND PAPADOPOULOS, V. (2001): Cholesterol binding at the cholesterol recognition/interaction amino acid consensus (CRAC) of the peripheral-type benzodiazepine receptor and inhibition of steroidogenesis by an HIV TAT-CRAC peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [No. 3] 1267–72.
- LIN, S., LU, X., CHANG, C. C. Y. AND CHANG, T.-Y. (2003): Human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase expressed in chinese hamster ovary cells: membrane topology and active site location. *Mol Biol Cell* 14 [No. 6] 2447–60.
- LISCUM, L. AND DAHL, N. K. (1992): Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res* 33 [No. 9] 1239–54.

- LISCUM, L. AND FAUST, J. R. (1989): The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one. *J Biol Chem* 264 [No. 20] 11796–806.
- LIU, J., DEYOUNG, S. M., ZHANG, M., DOLD, L. H. AND SALTIEL, A. R. (2005): The stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C domain of flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 280 [No. 16] 16125–34.
- LONDON, E. AND BROWN, D. A. (2000): Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim Biophys Acta* 1508 [No. 1-2] 182–95.
- MÁLAGA-TRILLO, E., LAESSING, U., LANG, D. M., MEYER, A. AND STURMER, C. A. O. (2002): Evolution of duplicated reggie genes in zebrafish and goldfish. *J Mol Evol* 54 [No. 2] 235–45.
- MESMIN, B. AND MAXFIELD, F. R. (2009): Intracellular sterol dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1791 [No. 7] 636–45.
- MÖBIUS, W., VAN DONSELAAR, E., OHNO-IWASHITA, Y., SHIMADA, Y., HEIJNEN, H. F. G., SLOT, J. W. AND GEUZE, H. J. (2003): Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic* 4 [No. 4] 222–31.
- MONIER, S., PARTON, R. G., VOGEL, F., BEHLKE, J., HENSKE, A. AND KURZCHALIA, T. V. (1995): VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* 6 [No. 7] 911–27.
- MORROW, I. C. AND PARTON, R. G. (2005): Flotillins and the PHB domain protein family: rafts, worms and anaesthetics. *Traffic* 6 [No. 9] 725–40.
- MORROW, I. C., REA, S., MARTIN, S., PRIOR, I. A., PROHASKA, R., HANCOCK, J. F., JAMES, D. E. AND PARTON, R. G. (2002): Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation. *J Biol Chem* 277 [No. 50] 48834–41.

- MULYA, A., LEE, J.-Y., GEBRE, A. K., THOMAS, M. J., COLVIN, P. L. AND PARKS, J. S. (2007): Minimal lipidation of pre-beta HDL by ABCA1 results in reduced ability to interact with ABCA1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 [No. 8] 1828–36.
- MURCIA, M., FARÁLDO-GÓMEZ, J. D., MAXFIELD, F. R. AND ROUX, B. (2006): Modeling the structure of the StART domains of MLN64 and StAR proteins in complex with cholesterol. *J Lipid Res* 47 [No. 12] 2614–30.
- NEUMANN-GIESEN, C., FALKENBACH, B., BEICHT, P., CLAASEN, S., LÜERS, G., STUERMER, C. A. O., HERZOG, V. AND TIKKANEN, R. (2004): Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *Biochem J* 378 [No. Pt 2] 509–18.
- NEUMANN-GIESEN, C., FERNOW, I., AMADDII, M. AND TIKKANEN, R. (2007): Role of EGF-induced tyrosine phosphorylation of reggie-1/flotillin-2 in cell spreading and signaling to the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 120 [No. Pt 3] 395–406.
- NOHTURFFT, A., YABE, D., GOLDSTEIN, J. L., BROWN, M. S. AND ESPENSHADE, P. J. (2000): Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell* 102 [No. 3] 315–23.
- OKAMOTO, T., SCHLEGEL, A., SCHERER, P. E. AND LISANTI, M. P. (1998): Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing preassembled signaling complexes at the plasma membrane. *J Biol Chem* 273 [No. 10] 5419–22.
- PANDUR, P. D., DIRKSEN, M.-L., MOORE, K. B. AND MOODY, S. A. (2004): *Xenopus* flotillin1, a novel gene highly expressed in the dorsal nervous system. *Dev Dyn* 231 [No. 4] 881–7.
- PENTCHEV, P. G., COMLY, M. E., KRUTH, H. S., VANIER, M. T., WENGER, D. A., PATEL, S. AND BRADY, R. O. (1985): A defect in cholesterol esterification in Niemann-Pick disease (type C) patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 [No. 23] 8247–51.
- PHILLIPS, S. E., WOODRUFF, 3RD, E. A., LIANG, P., PATTEN, M. AND BROADIE, K. (2008): Neuronal loss of *Drosophila* NPC1a causes cholesterol

- aggregation and age-progressive neurodegeneration. *J Neurosci* 28 [No. 26] 6569–82.
- PISITKUN, T., JOHNSTONE, R. AND KNEPPER, M. A. (2006): Discovery of urinary biomarkers. *Mol Cell Proteomics* 5 [No. 10] 1760–71.
- PISITKUN, T., SHEN, R.-F. AND KNEPPER, M. A. (2004): Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 [No. 36] 13368–73.
- PRINZ, W. A. (2007): Non-vesicular sterol transport in cells. *Prog Lipid Res* 46 [No. 6] 297–314.
- RADHAKRISHNAN, A., SUN, L.-P., KWON, H. J., BROWN, M. S. AND GOLDSTEIN, J. L. (2004): Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol Cell* 15 [No. 2] 259–68.
- RAJENDRAN, L., MASILAMANI, M., SOLOMON, S., TIKKANEN, R., STUERMER, C. A. O., PLATTNER, H. AND ILLGES, H. (2003): Asymmetric localization of flotillins/reggies in preassembled platforms confers inherent polarity to hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 [No. 14] 8241–6.
- REID, P. C., SAKASHITA, N., SUGII, S., OHNO-IWASHITA, Y., SHIMADA, Y., HICKEY, W. F. AND CHANG, T.-Y. (2004): A novel cholesterol stain reveals early neuronal cholesterol accumulation in the Niemann-Pick type C1 mouse brain. *J Lipid Res* 45 [No. 3] 582–91.
- REUTER, A., BINKLE, U., STUERMER, C. A. O. AND PLATTNER, H. (2004): PrPc and reggies/flotillins are contained in and released via lipid-rich vesicles in Jurkat T cells. *Cell Mol Life Sci* 61 [No. 16] 2092–9.
- ROITBAK, T., SURVILADZE, Z., TIKKANEN, R. AND WANDINGER-NESS, A. (2005): A polycystin multiprotein complex constitutes a cholesterol-containing signalling microdomain in human kidney epithelia. *Biochem J* 392 [No. Pt 1] 29–38.
- ROTHER, T. AND MÜLLER, H. W. (1991): Uptake of endoneurial lipoprotein into Schwann cells and sensory neurons is mediated by low density lipoprotein

- receptors and stimulated after axonal injury. *J Neurochem* 57 [No. 6] 2016–25.
- SAMBROOK, J. AND RUSSELL, D. (2001): *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, 2001,.
- SCHNEIDER, A., RAJENDRAN, L., HONSHO, M., GRALLE, M., DONNERT, G., WOUTERS, F., HELL, S. W. AND SIMONS, M. (2008): Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons. *J Neurosci* 28 [No. 11] 2874–82.
- SCHOREY, J. S. AND BHATNAGAR, S. (2008): Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic* 9 [No. 6] 871–81.
- SCHROEDER, W. T., STEWART-GALETKA, S., MANDAVILLI, S., PARRY, D. A., GOLDSMITH, L. AND DUVIC, M. (1994): Cloning and characterization of a novel epidermal cell surface antigen (ESA). *J Biol Chem* 269 [No. 31] 19983–91.
- SCHULTE, T., PASCHKE, K. A., LAESSING, U., LOTTSPEICH, F. AND STUERMER, C. A. (1997): Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development* 124 [No. 2] 577–87.
- SEVER, N., SONG, B.-L., YABE, D., GOLDSTEIN, J. L., BROWN, M. S. AND DEBOSE-BOYD, R. A. (2003): Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol. *J Biol Chem* 278 [No. 52] 52479–90.
- SKIBA, P. J., ZHA, X., MAXFIELD, F. R., SCHISSEL, S. L. AND TABAS, I. (1996): The distal pathway of lipoprotein-induced cholesterol esterification, but not sphingomyelinase-induced cholesterol esterification, is energy-dependent. *J Biol Chem* 271 [No. 23] 13392–400.
- SLAUGHTER, N., LAUX, I., TU, X., WHITELEGGE, J., ZHU, X., EFFROS, R., BICKEL, P. AND NEL, A. (2003): The flotillins are integral membrane proteins in lipid rafts that contain TCR-associated signaling components: implications for T-cell activation. *Clin Immunol* 108 [No. 2] 138–51.

- SOKOL, J., BLANCHETTE-MACKIE, J., KRUTH, H. S., DWYER, N. K., AMENDE, L. M., BUTLER, J. D., ROBINSON, E., PATEL, S., BRADY, R. O. AND COMLY, M. E. (1988): Type C Niemann-Pick disease. Lysosomal accumulation and defective intracellular mobilization of low density lipoprotein cholesterol. *J Biol Chem* 263 [No. 7] 3411–7.
- SONG, B.-L., SEVER, N. AND DEBOSE-BOYD, R. A. (2005): Gp78, a membrane-anchored ubiquitin ligase, associates with Insig-1 and couples sterol-regulated ubiquitination to degradation of HMG CoA reductase. *Mol Cell* 19 [No. 6] 829–40.
- SPADY, D. K. AND DIETSCHY, J. M. (1983): Sterol synthesis in vivo in 18 tissues of the squirrel monkey, guinea pig, rabbit, hamster, and rat. *J Lipid Res* 24 [No. 3] 303–15.
- SPECTOR, A. A., MATHUR, S. N. AND KADUCE, T. L. (1979): Role of acyl-coenzyme A: cholesterol o-acyltransferase in cholesterol metabolism. *Prog Lipid Res* 18 [No. 1] 31–53.
- STRAUSS, K., GOEBEL, C., RUNZ, H., MÖBIUS, W., WEISS, S., FEUSSNER, I., SIMONS, M. AND SCHNEIDER, A. (2010): Exosome secretion ameliorates lysosomal storage of cholesterol in Niemann-Pick type C disease. *J Biol Chem* 285 [No. 34] 26279–88.
- STUERMER, C. A., LANG, D. M., KIRSCH, F., WIECHERS, M., DEININGER, S. O. AND PLATTNER, H. (2001): Glycosylphosphatidyl inositol-anchored proteins and fyn kinase assemble in noncaveolar plasma membrane microdomains defined by reggie-1 and -2. *Mol Biol Cell* 12 [No. 10] 3031–45.
- STUERMER, C. A. O., LANGHORST, M. F., WIECHERS, M. F., LEGLER, D. F., VON HANWEHR, S. H., GUSE, A. H. AND PLATTNER, H. (2004): PrPc capping in T cells promotes its association with the lipid raft proteins reggie-1 and reggie-2 and leads to signal transduction. *FASEB J* 18 [No. 14] 1731–3.
- SUBRA, C., LAULAGNIER, K., PERRET, B. AND RECORD, M. (2007): Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* 89 [No. 2] 205–12.



- SUGII, S., REID, P. C., OHGAMI, N., DU, H. AND CHANG, T.-Y. (2003): Distinct endosomal compartments in early trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol. *J Biol Chem* 278 [No. 29] 27180–9.
- TAVERNARAKIS, N., DRISCOLL, M. AND KYRPIDES, N. C. (1999): The SPFH domain: implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends Biochem Sci* 24 [No. 11] 425–7.
- TEGGE, G. (1975): Lehninger, A. L.: Biochemie (nach der amerikanischen Originalausgabe Biochemistry – The Molecular Basis of Cell Structure and Function übersetzt). Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 1975.
- THÉRY, C., AMIGORENA, S., RAPOSO, G. AND CLAYTON, A. (2006): Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3 Unit 3.22.
- THIELE, C., HANNAH, M. J., FAHRENHOLZ, F. AND HUTTNER, W. B. (2000): Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol* 2 [No. 1] 42–9.
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T. AND GORDON, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 [No. 9] 4350–4.
- TRAJKOVIC, K., HSU, C., CHIANTIA, S., RAJENDRAN, L., WENZEL, D., WIELAND, F., SCHWILLE, P., BRÜGGER, B. AND SIMONS, M. (2008): Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319 [No. 5867] 1244–7.
- URBANI, L. AND SIMONI, R. D. (1990): Cholesterol and vesicular stomatitis virus G protein take separate routes from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *J Biol Chem* 265 [No. 4] 1919–23.
- VANCE, J. E., HAYASHI, H. AND KARTEN, B. (2005): Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Semin Cell Dev Biol* 16 [No. 2] 193–212.
- VANIER, M. T. (1999): Lipid changes in Niemann-Pick disease type C brain: personal experience and review of the literature. *Neurochem Res* 24 [No. 4] 481–9.

- VANIER, M. T. (2010): Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis* 5 16.
- VAN NIEL, G., PORTO-CARREIRO, I., SIMOES, S. AND RAPOSO, G. (2006): Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem* 140 [No. 1] 13-21.
- VOLONTE, D., GALBIATI, F., LI, S., NISHIYAMA, K., OKAMOTO, T. AND LISANTI, M. P. (1999): Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo. Characterization and epitope-mapping of a novel flotillin-1 monoclonal antibody probe. *J Biol Chem* 274 [No. 18] 12702-9.
- VON PHILIPSBORN, A. C., FERRER-VAQUER, A., RIVERA-MILLA, E., STURMER, C. A. O. AND MÁLAGA-TRILLO, E. (2005): Restricted expression of reggie genes and proteins during early zebrafish development. *J Comp Neurol* 482 [No. 3] 257-72.
- WAKASUGI, K., NAKANO, T., KITATSUJI, C. AND MORISHIMA, I. (2004): Human neuroglobin interacts with flotillin-1, a lipid raft microdomain-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun* 318 [No. 2] 453-60.
- WANG, N., LAN, D., CHEN, W., MATSUURA, F. AND TALL, A. R. (2004): ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 [No. 26] 9774-9.
- WOJTANIK, K. M. AND LISCUM, L. (2003): The transport of low density lipoprotein-derived cholesterol to the plasma membrane is defective in NPC1 cells. *J Biol Chem* 278 [No. 17] 14850-6.
- WUBBOLTS, R., LECKIE, R. S., VEENHUIZEN, P. T. M., SCHWARZMANN, G., MÖBIUS, W., HOERNSCHEMEYER, J., SLOT, J.-W., GEUZE, H. J. AND STOORVOGEL, W. (2003): Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 278 [No. 13] 10963-72.
- YAMAUCHI, Y., CHANG, C. C. Y., HAYASHI, M., ABE-DOHMAE, S., REID, P. C., CHANG, T.-Y. AND YOKOYAMA, S. (2004): Intracellular cholesterol

mobilization involved in the ABCA1/apolipoprotein-mediated assembly of high density lipoprotein in fibroblasts. *J Lipid Res* 45 [No. 10] 1943–51.

YANCEY, P. G., DE LA LLERA-MOYA, M., SWARNAKAR, S., MONZO, P., KLEIN, S. M., CONNELLY, M. A., JOHNSON, W. J., WILLIAMS, D. L. AND ROTHBLAT, G. H. (2000): High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI. *J Biol Chem* 275 [No. 47] 36596–604.

YANG, T., ESPENSHADE, P. J., WRIGHT, M. E., YABE, D., GONG, Y., AEBERSOLD, R., GOLDSTEIN, J. L. AND BROWN, M. S. (2002): Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110 [No. 4] 489–500.

ZHANG, M., LIU, P., DWYER, N. K., CHRISTENSON, L. K., FUJIMOTO, T., MARTINEZ, F., COMLY, M., HANOVER, J. A., BLANCHETTE-MACKIE, E. J. AND STRAUSS, 3RD, J. F. (2002): MLN64 mediates mobilization of lysosomal cholesterol to steroidogenic mitochondria. *J Biol Chem* 277 [No. 36] 33300–10.