

Lysosomen

Identifikation eines neuen Ca^{2+} -Signalmechanismus

MICHAEL SCHIEDER¹, KATRIN RÖTZER¹, ANDREA BRÜGGEMANN², NIELS FERTIG², MARTIN BIEL¹, CHRISTIAN WAHL-SCHOTT¹

¹INSTITUT PHARMAKOLOGIE FÜR NATURWISSENSCHAFTEN, ZENTRUM FÜR PHARMAFORSCHUNG DER LMU MÜNCHEN

²NANION TECHNOLOGIES GMBH, MÜNCHEN

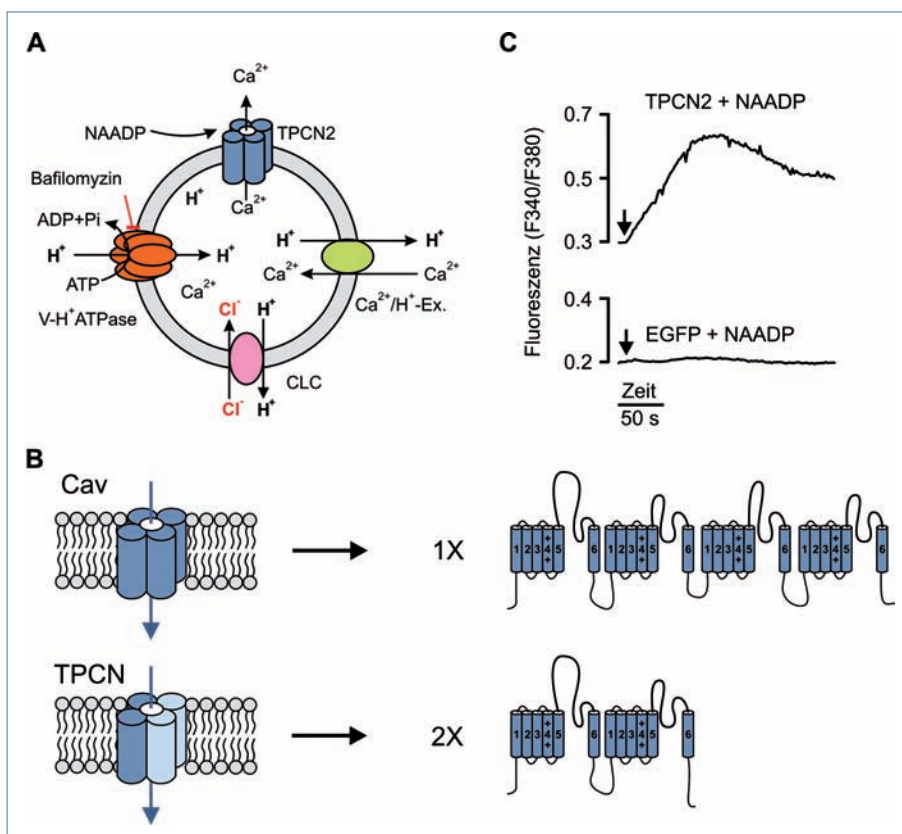
Seit Kurzem ist bekannt, dass Lysosomen als intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher fungieren und Ca^{2+} freisetzen können. Wir haben die Ionenkanäle, die für die Ca^{2+} -Freisetzung aus den Lysosomen verantwortlich sind, identifiziert und funktionell charakterisiert.

Recently it was discovered, that lysosomes are intracellular Ca^{2+} stores and that lysosomal Ca^{2+} is mobilized via a lysosome specific second messenger. We identified and functionally characterized the ion channels that mediate lysosomal Ca^{2+} release.

Die Ca^{2+} -Konzentration innerhalb einer Zelle ist 10.000-mal so niedrig wie die des extrazellulären Ca^{2+} . Steigt Ca^{2+} intrazellu-

lär an, werden zahlreiche Signalkaskaden aktiviert, die essenzielle zelluläre Vorgänge steuern. Diese sogenannten Ca^{2+} -Signale

sind fundamental für die Funktion jeder Zelle [1]. Sie steuern zahlreiche lebenswichtige Prozesse, wie die Kontraktion von Herz und Skelettmuskulatur, die Hormon- und Neurotransmittersekretion, die Zellteilung, die Zellmotilität und die Kontrolle der Immunantwort. Für die Generierung dieser Signale gibt es prinzipiell zwei Quellen. Ca^{2+} kann zum einen von extrazellulär über Ionenkanäle in der Plasmamembran in die Zelle einströmen. Zum anderen kann Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern wie das sarko/endoplasmatische Reticulum, die Kernmembran oder die Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt werden. Man weiß, dass Ca^{2+} über sekundäre Botenstoffe wie IP_3 (Inositol-1,4,5-trisphosphat), cADP-Ribose (cyclo-Adenosindiphosphoribose) oder Ca^{2+} selbst freigesetzt wird. Die Produktion dieser Botenstoffe wird durch Hormone oder Neuro-



◀ **Abb. 1:** Lysosomale Ca^{2+} -Freisetzung.

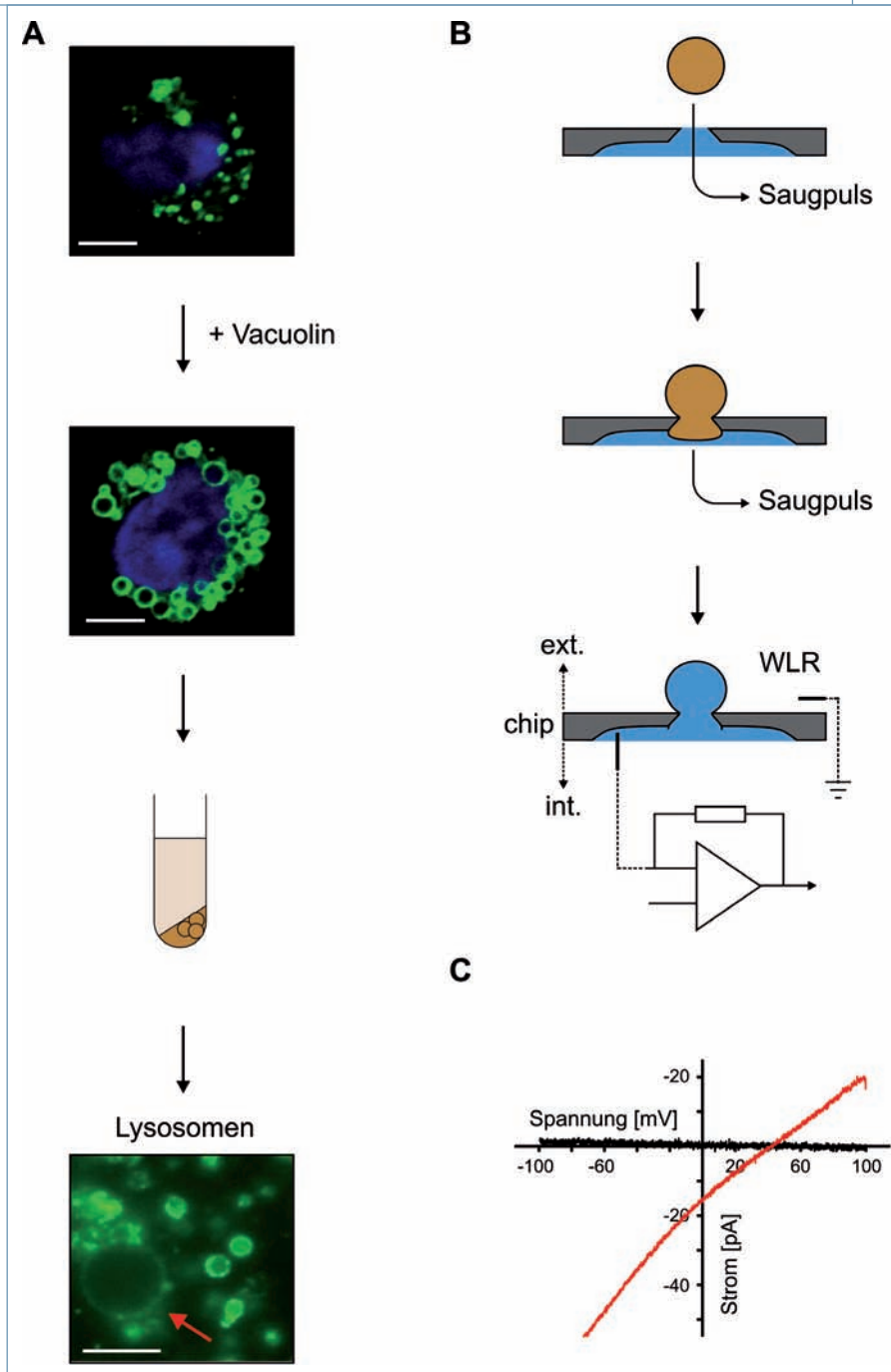
A, schematische Darstellung eines Lysosoms. Ionenkanäle, Transporter und ATPasen, die für die Regulation des luminalen pH und der Ca^{2+} -Freisetzung wichtig sind, sind angegeben. Aus Lysosomen freigesetztes Ca^{2+} wirkt sowohl direkt als auch indirekt über Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung. **B**, Struktureller Aufbau von spannungsgesteuerten Kationenkanälen. Die porentragende Einheit besteht aus vier gleichartigen Domänen. Bei spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen (Cavs) sind vier, bei *two-pore-loop*-Kanälen (TPCN) zwei dieser Domänen miteinander fusioniert. *Two-pore-loop*-Kanäle bilden Dimere. **C**, Applikation von 30 nM NAADP induziert eine Ca^{2+} -Freisetzung aus Lysosomen in TPCN2-überexprimierenden HEK293-Zellen (oben), aber nicht in Kontroll-HEK293-Zellen ohne Überexpression (unten). Die Pfeile markieren den Beginn der NAADP-Applikation. NAADP: Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotidphosphat; TPCN2: *two-pore-loop*-Kanal 2; CLC: Cl⁻-Kanal; Ca²⁺/H⁺-Ex.: Ca²⁺/H⁺-Austauscher; V-H⁺-ATPase: vesikuläre H⁺-ATPase; Bafilomycin: Inhibitor der V-H⁺-ATPase.

transmitter über Rezeptoren an der Zelloberfläche reguliert.

Seit einiger Zeit häufen sich die Hinweise darauf, dass es einen weiteren Ca^{2+} -Speicher in der Zelle gibt: die Lysosomen (**Abb. 1**). Diese kleinsten Organellen wurden bisher hauptsächlich im Kontext anderer Funktionen wie Abbau und vesikulären Transportvorgängen etc. gesehen. Interessanterweise hat sich herausgestellt, dass Lysosomen einen eigenen sekundären Botenstoff, das Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotidphosphat (NAADP), und einen eigenen Rezeptor für die NAADP-abhängige Ca^{2+} -Freisetzung haben [2]. Dieser Signaltransduktionsweg ist eine Besonderheit von Lysosomen. NAADP ist mit einem Wirkungsmaximum im nanomolaren Bereich der wirksamste unter den bisher untersuchten Ca^{2+} -freisetzenden sekundären Botenstoffen. Es gibt Hinweise darauf, dass aus Lysosomen freigesetztes Ca^{2+} die Sekretion von Hormonen, die Kontraktion glatter Muskelzellen und die Aktivität von Neuronen reguliert, also physiologisch von Bedeutung ist.

Identität der NAADP-abhängigen Kalziumkanäle in Lysosomen

Kürzlich gelang es uns und anderen, das molekulare Target zu identifizieren, das der NAADP-abhängigen Ca^{2+} -Freisetzung aus Lysosomen zugrunde liegt [3–5]. Wir konnten nachweisen, dass die *two-pore-loop*-Kanäle (TPCN) die lange gesuchten NAADP-Rezeptoren darstellen. Diese Proteine sind strukturell mit den spannungsgesteuerten Kationenkanälen verwandt. Bei allen spannungsgesteuerten Ionenkanälen ist die porentragende Einheit aus vier gleichartigen Domänen aufgebaut (**Abb. 1**). Jede dieser Domänen enthält eine Schleife (*pore loop*), die den Selektivitätsfilter des Kanals bildet. Bei *two-pore-loop*-Kanälen sind zwei dieser Domänen zu einem Grundbaustein fusioniert (**Abb. 1**). Diese strukturelle Besonderheit ist namensgebend für diese Kanäle. Durch Dimerisierung von zwei Grundbausteinen entsteht der vollständige *two-pore-loop*-Kanal. Die Familie der TPCN-Kanäle umfasst im Menschen und der Maus zwei Mitglieder (TPCN1 und TPCN2) [4, 5]. In einigen Vertebraten, wie z. B. dem Kaninchen, existiert ein dritter Vertreter dieser Genfamilie (TPCN3). Wir haben die TPCNs aus dem Gehirn der Maus kloniert und funktionell charakterisiert [5]. Mit Ca^{2+} -Imaging-Experimenten konnten wir nachweisen, dass TPCN2-Kanäle tatsächlich NAADP-abhängig Ca^{2+} aus dem Lysosom mobilisieren (**Abb. 1C**). Die Eigenschaften der

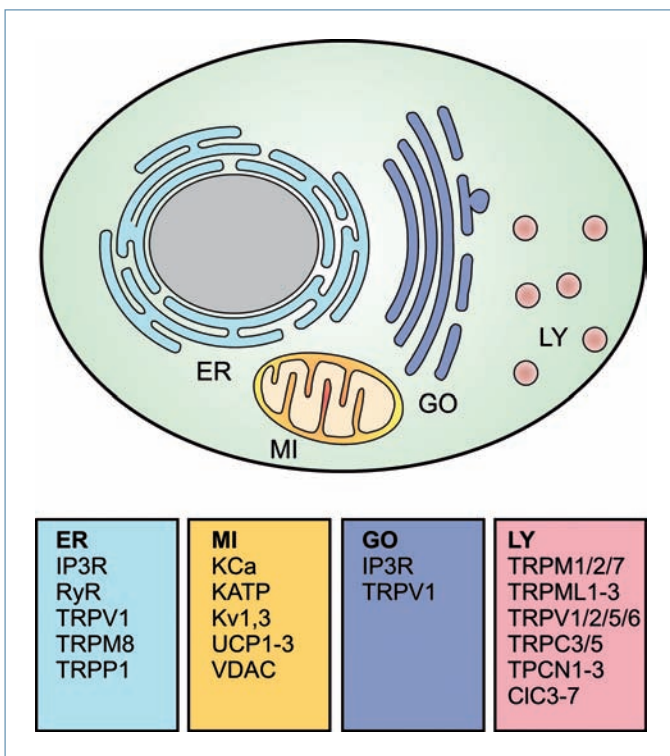


▲ **Abb. 2:** Patch-Clamp-Verfahren zur elektrophysiologischen Untersuchung einzelner nativer Lysosomen. **A**, HEK293-Zellen, die TPCN2-Ionenkanäle stabil überexprimieren vor und nach Behandlung mit Vacuolin-1. Vacuolin-1 vergrößert die Lysosomen. Nach Homogenisierung, biochemischer Aufreinigung und Präzipitation der Lysosomen mit Ca^{2+} erhält man hoch aufgereinigte isolierte Lysosomen. Grün: GFP-markierte TPCN2-Kanäle; blau: Kernfärbung. **B**, schematische Darstellung des planaren Patch-Clamp-Verfahrens. Der planare Glaschip ist in Dunkelgrau dargestellt; ext.: extralysosomale Lösung; intr.: intralysosomale Lösung. Unter dem Chip ist der Verstärker dargestellt. Die Lysosomen werden mithilfe eines Saugpulses auf den Chip gesaugt. Nach Ausbildung eines engen Kontakts zum Glaschip (Seal) wird die lysosomale Membran durch einen zweiten Saugpuls durchbrochen. Jetzt können elektrophysiologische Experimente in der *whole lysosome*-Konfiguration (WLR) durchgeführt werden. **C**, Ca^{2+} -Strom durch TPCN2-Kanäle in einem nativen Lysosom in Gegenwart von 60 nM NAADP (rote Stromspur). Schwarze Stromspur: NAADP-aktivierter Strom in einem Kontroll-Lysosom ohne Überexpression.

TPCN2-Kanäle stimmen sehr gut mit denen der nativen NAADP-Rezeptoren überein (**Abb. 1**, [4, 5]).

Diese Ca^{2+} -Imaging-Experimente sind wichtig für die Charakterisierung der Grundeigenschaften dieser Kanäle, sie betrachten

allerdings die Kanäle als *black box* und zeigen indirekt eine NAADP-abhängige Modulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Ein direkter Beweis, dass TPCN-Proteine tat-



◀ **Abb. 3:** Lokalisation von intrazellulären Ionenkanälen. ER: endoplasmatisches Reticulum; MI: Mitochondrien; GO: Golgi-Apparat; LY: Lysosomen. IP3R: IP3-Rezeptor; RyR: Ryanodinrezeptor, Kv: spannungsgesteuerte K⁺-Kanäle; KCa: Ca²⁺-aktivierte K⁺-Kanäle, KATP: ATP-aktivierte K⁺-Kanäle; VDAC: *voltage dependent anion channel*; UCP: *uncoupling protein*; TRP-Kanäle: *transient receptor potential*-Kanäle; CIC: Cl⁻-Kanäle.

sächlich auch Ionenkanäle sind, erfordert direkte elektrophysiologische Experimente an einzelnen Lysosomen. Leider sind Lysosomen intrazellulär lokalisiert und zudem extrem klein (0,3 bis ein Mikrometer Durchmesser). Daher haben wir zunächst eine neue Methode entwickelt, die elektrophysiologische Experimente an einzelnen Lysosomen ermöglicht (**Abb. 2**).

Die Analyse von Ionenströmen in einzelnen Lysosomen

Das Standardverfahren zur elektrophysiologischen Analyse von Ionenkanälen ist seit ihrer Entwicklung in den 1980er-Jahren die Patch-Clamp-Methode [6]. Allerdings können mit diesem Verfahren hauptsächlich Ionenkanäle in der Plasmamembran untersucht werden. Intrazelluläre und insbesondere lysosomale Ionenkanäle können mit der Patch-Clamp-Methode nicht oder nur sehr ineffizient analysiert werden [7]. Der Hauptfaktor, der die Charakterisierung intrazellulärer Ionenkanäle bisher erschwert hat, ist die geringe Stabilität intrazellulärer Membranen. Letztere sind im Gegensatz zur Plasmamembran ausgesprochen empfindlich und nicht stabil genug, den mechanischen Manipulationen standzuhalten, die normalerweise bei der Ausbildung eines engen Kontakts zwischen Glaselektrode und Membran bzw. bei der Ruptur der Zellmembran entstehen. Wir haben nun eine neue, sehr effiziente Metho-

de entwickelt, die diese technischen Probleme löst [8]. Diese Methode erlaubt es, direkt Ströme an einzelnen Lysosomen zu messen. Das Grundprinzip der Methode besteht darin, biochemisch isolierte Lysosomen auf einer Festphasenmatrix, einem planaren Glaschip (Porta-Patch, Nanion Technologies GmbH, München), zu immobilisieren (**Abb. 2**). Der Glaschip enthält eine Öffnung, die durch ihre Ausformung die Lysosomen bei elektrophysiologischen Experimenten mechanisch unterstützt und so verhindert, dass diese zerreißen. Mit dieser Technologie gelang es, Ionenflüsse in intakten Lysosomen direkt zu messen [8]. Lysosomen, die TPCN2-Kanäle exprimieren, nicht aber Kontroll-Lysosomen ohne Überexpression zeigen einen prominenten NAADP-aktivierbaren Ca²⁺-Strom (**Abb. 2**). Die Ca²⁺-Selektivität der Kanäle ist verblüffend hoch. TPCN-Kanäle haben eine 1.000-mal höhere Permeabilität für Ca²⁺ als für K⁺. Ein wesentlicher Vorteil eines direkten elektrophysiologischen Zugangs zu den lysosomalen Kanälen ist die Möglichkeit, direkte Struktur-Wirkungsanalysen durchführen zu können. Wir haben durch den Austausch einzelner Aminosäurereste den Selektivitätsfilter der TPCN-Kanäle gefunden. Dabei haben wir einen Aminosäurerest identifiziert (Glu643), der für diese hohe Ca²⁺-Selektivität von TPCN2 verantwortlich ist. Mutiert man diesen Rest zu Alanin, verliert der Kanal seine hohe Ca²⁺-Selektivität.

Unsere Methode ist auch zur Analyse von anderen lysosomalen Ionenkanälen geeignet. Erste Ergebnisse zeigen, dass damit auch endogene Chloridströme in nativen Lysosomen gemessen werden können [8]. Wir gehen davon aus, dass die planare Patch-Clamp-Methode auch zur Charakterisierung von Ionenkanälen in anderen intrazellulären Organellen und Kompartimenten wie Kernmembranen oder dem sarkoplasmatischen Reticulum (**Abb. 3**) geeignet ist.

Danksagung

Dieses Projekt ist als Kooperation zwischen dem Institut Pharmakologie für Naturwissenschaften der LMU und der Firma Nanion Technologies GmbH entstanden und wird durch die Bayerische Forschungstiftung als Forschungsverbund unterstützt. ■

Literatur

- [1] Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11–21
- [2] Galione A, Petersen OH (2005) The NAADP receptor: new receptors or new regulation? *Mol Interv* 5:73–79
- [3] Brailoiu E, Churamani D, Cai X et al. (2009) Essential requirement for two-pore channel 1 in NAADP-mediated calcium signaling. *J Cell Biol* 186:201–209
- [4] Calcraft PJ, Ruas M, Pan Z et al. (2009) NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature* 459:596–600
- [5] Zong X, Schieder M, Cuny H et al. (2009) The two-pore channel TPCN2 mediates NAADP-dependent Ca²⁺-release from lysosomal stores. *Pflügers Arch* 458:891–899
- [6] Hamill OP, Marty A, Neher E et al. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391:85–100
- [7] Dong XP, Cheng X, Mills E et al. (2008) The type IV mucopolysaccharide-associated protein TRPML1 is an endolysosomal iron release channel. *Nature* 455:992–996
- [8] Schieder M, Roetzer K, Brueggemann A et al. (2010) Characterization of two pore channel 2 (TPCN2)-mediated Ca²⁺ currents in isolated lysosomes. *J Biol Chem* 285:21219–21222



Martin Biel, Andrea Brüggemann, Christian Wahl, Katrin Rötzer und Michael Schieder (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Christian Wahl-Schott
Institut Pharmakologie für Naturwissenschaften
Zentrum für Pharmaforschung der LMU München
Butenandtstraße 7
D- 81377 München
Tel.: 089-2180-777654
Fax: 089-2180-77326
christian.wahl@cup.uni-muenchen.de