

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
Kernklinik und Poliklinik
Direktor: Prof. Heiner Greten
des
Universitätsklinikums Hamburg - Eppendorf

**Einfluß einer Überexpression von Rab5 und Annexin VI auf die
Endozytose von Low-density-Lipoproteinen (LDL) und Transferrin in
transfizierten Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Patrick Linsel-Nitschke

aus Siegen

Hamburg 2000

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 21.12.2000

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
Der Universität Hamburg

Sprecher: Frau Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

Referent: Prof. Dr. F. Rinninger

Korreferent: Prof. Dr. H. Greten

Inhaltsverzeichnis

Einleitung

Rezeptor vermittelte Endozytose	5
- Bindung und Internalisierung von Liganden.....	5
- Intrazelluläre Transportwege endozytierter Liganden.....	8
- Endosomale Kompartimente.....	9
- Rezeptor vermittelte Endozytose des Transferrins.....	11
- Rezeptor vermittelte Endozytose der Low-Density-Lipoproteine (LDL).....	12
Rab-Proteine und ihre Rolle im Vesikeltransport.....	14
- Rab5.....	15
Die Annexine.....	19
- Annexin VI.....	21
Stoffwechsel der Lipoproteine.....	23
- Der LDL-Rezeptor.....	25
- Andere Rezeptoren der LDL-Rezeptor-Familie.....	27
Zielsetzung.....	29

Material und Methoden

- Präparation von LDL aus humanem Serum.....	30
- Radioaktive Markierung von LDL.....	31
- Radioaktive Markierung von Transferrin.....	31
- Zellkultur.....	32
- Rekombinante DNA.....	32
- Transfektion.....	35
- Selektionierung von stabil transfizierten HUH7-Zellklonen.....	35
- Proteinbestimmung.....	36
- Immunoblot-Analyse der transfizierten Zellen.....	36
- Immunfluoreszenz der transfizierten Zellen.....	37
- Antikörper für Immunfluoreszenz / Immunoblotting.....	38
- Bestimmung der Aufnahme von ^{125}I -LDL.....	38
- Bestimmung des Abbaus von ^{125}I -LDL.....	39
- Bestimmung der Aufnahme von ^{125}I -Transferrin.....	40

- Liste der verwendeten Geräte und Materialien..... 41

Ergebnisse

- LDL-Aufnahme von CHO- und HUH7-Zellen nach Präinkubation mit LPDS..... 43
- Überexpression von Rab5 und Annexin VI durch transiente Transfektion von CHO-Zellen..... 44
- Bestimmung der Transfektionsrate durch Immunfluoreszenz..... 46
- LDL-Aufnahme in transfizierten CHO- und HUH7-Zellen..... 48
- LDL-Aufnahme der CHO-Zellen nach Kotransfektion von Annexin VI und Rab5 mit dem LDL-Rezeptor..... 49
- Charakterisierung von Rab5 oder Annexin VI überexprimierenden, stabil transfizierten HUH7-Zelllinien..... 51
- Immunfluoreszenz des Zellklones 7.10 (Rab5)..... 54
- Transferrinaufnahme und Transferrin-Recycling der Klone 2.8 und 7.10....55
- ¹²⁵I-LDL-Aufnahme und Abbau der Klone 2.8 und 7.10.....58

Diskussion

Experimentelles System

- Präinkubation mit LPDS stimuliert die ¹²⁵I-LDL Aufnahme in CHO- und HUH7-Zellen..... 60

Transiente Transfektionen

- Überexpression von Rab5/ Annexin VI in CHO- und HUH7-Zellen durch transiente Transfektionen..... 61
- Alleinige Überexpression von Rab5 oder Annexin VI in CHO- oder HUH7-Zellen zeigt keinen Effekt auf die ¹²⁵I-LDL-Aufnahme..... 63
- Überexpression des LDL-Rezeptors in CHO-Zellen bewirkt eine Stimulation der LDL-Aufnahme.....63
- Kotransfektion von Rab5/ Annexin VI und dem LDL-Rezeptor bewirkt eine zusätzliche Stimulation der LDL-Aufnahme..... 64

Stabil transfizierte Zellklone.....	66
- Gesteigerte ¹²⁵ I-Transferrinaufnahme in stabil mit Rab5 oder Annexin VI transfizierten Zellen.....	67
- Gesteigerter Abbau von ¹²⁵ I-LDL in stabil mit Rab5 oder Annexin VI transfizierten Zellen.....	69
Vergleichende Betrachtung Rab5 und Annexin VI.....	70
<u>Zusammenfassung</u>	73
<u>Literaturverzeichnis</u>	74
<u>Danksagung</u>	87
<u>Lebenslauf</u>	88
<u>Erklärung</u>	89

Einleitung

Rezeptor vermittelte Endozytose

Eukaryote Zellen besitzen zur Aufnahme extrazellulärer Makromoleküle eine Reihe verschiedener Mechanismen, die unter dem Begriff der Endozytose zusammengefaßt werden. Neben der Rezeptor vermittelten Endozytose existieren Aufnahmemechanismen wie Pinozytose und Phagozytose, welche spezialisierten Zellen wie beispielsweise Makrophagen vorbehalten sind. Der Mechanismus der Endozytose erlaubt Makromolekülen, die nicht über andere Transportmechanismen wie z.B. Ionenkanäle oder Diffusion durch die Lipidphase der Zellmembran aufgenommen werden, in das Zellinnere zu gelangen. Eine Vielfalt von Rezeptor-Ligand-Komplexen wird durch Rezeptor-vermittelte Endozytose über die sogenannten „coated-pits“ in die Zelle aufgenommen. Zu solchen Liganden gehören Transportproteine des Plasmas, wie z.B. die Low-Density-Lipoproteine (LDL), Transferrin , Transcobalamin, einige Peptidhormone wie z.B. der epidermale Wachstumsfaktor, sowie Asialoglykoproteine und lysosomale Enzyme. Auch Viren und Toxine machen sich die Rezeptor vermittelte Endozytose zunutze um in das Zellinnere zu gelangen.

Bindung und Internalisierung von Liganden

In vielen Fällen erfolgt die Bindung der Liganden in spezialisierten Bereichen der Zellmembran, den sogenannten „coated pits“. Coated-pits wurden erstmalig 1964 auf Moskito-Eizellen beschrieben (Roth and Porter 1964). Einige Membranproteine und Rezeptoren finden sich in den coated-pits in hoher Konzentration und erlauben so eine effiziente Aufnahme der Liganden. Ein klassisches Beispiel hierfür ist der LDL-Rezeptor (Anderson et al. 1982). Coated-pits sind ca. 150 nm große Einstülpungen der Zelloberfläche (Willingham et al. 1981). Bei humanen Fibroblasten bestehen ca. 2% der Zelloberfläche aus Coated-pits (Anderson et al. 1977). Einige Rezeptoren, wie zum Beispiel der LDL-Rezeptor, finden sich in den Coated-pits stark

konzentriert (Anderson et al. 1982). Andere Rezeptoren, beispielsweise der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor, bilden nach der Ligandenbindung Dimere und induzieren somit die Bildung von neuen Coated-pits (Dunn et al 1984; Hopkins et al. 1985).

Das wichtigste Strukturelement der Coated-pits ist das sogenannte Clathrin-Triskelion, welches eine Dreibein-ähnliche Struktur ausbildet, die sich aus drei leichten Ketten (35 kD) und drei schweren Ketten (180kD) zusammensetzt. Die Clathrin-Triskelien setzen sich zu hexagonalen Polyedern zusammen und bilden ein Gitterwerk an der Plasmamembran (Brodsky 1988). Eine wichtige Funktion kommt den sogenannten Adaptor-Proteinen (Adaptinen) zu, durch welche die Bindung des Clathrins an die Plasmamembran vermittelt wird (Pearse 1988). Aus der großen Gruppe der Adaptine assoziiert das Adaptor Protein2 (AP2) spezifisch mit den Coated-pits (Ahle et al. 1988). Offenbar lagert sich das N-terminale Ende der schweren Ketten des Clathrin an die β - oder β' -Untereinheit des AP2 an, welches zwischen Clathrin und Plasmamembran zu liegen kommt (Ahle und Ungewickell 1989).

Die Konzentration vieler Rezeptoren in den Coated-pits ist die Folge von Reaktionen zwischen intrazytoplasmatischen Erkennungssequenzen („Internalisierungs-Signalen“) der Rezeptoren mit den Adaptorproteinen (Kirchhausen 1993). Beim LDL-Rezeptor bindet beispielsweise eine tyrosinhaltige Tetrapeptidsequenz (NPXY) der intrazytoplasmatischen Domäne an das AP2 (Chen et al. 1990). Ein interessantes klinisches Beispiel bietet ein von Goldstein und Brown beschriebener Patient („Patient J.D.“): Bei der sogenannten JD-Mutation kommt es zu einem Aminosäureaustausch in der NPXY-Region des LDL-Rezeptor, resultierend in einem Defekt der Rezeptor vermittelten Endozytose des LDL und dem Krankheitsbild der familiären Hypercholesterinämie (Goldstein et al.1985). Auch für andere Rezeptoren wurden Internalisationssignale beschrieben, die der zuvor erwähnten NPXY-Sequenz des LDL-Rezeptors ähneln. So wurde für den Transferrinrezeptor eine ebenfalls tyrosinhaltige Tetrapeptidsequenz YXRF identifiziert, welche für die Konzentration in Coated-pits erforderlich ist (Jing et al.1990). Für die Bindung an die Adaptor-Proteine ist offenbar die Ausbildung einer schleifenartigen Sekundärstruktur (β -Drehung) erforderlich, was über den aromatischen

Tyrosinrest vieler Internalisierungssequenzen vermittelt wird (Mukherjee et al.1997). Neben den tyrosinhaltigen Internalisierungssequenzen existieren weitere Mechanismen für die gezielte Bindung der Rezeptoren an der Zellmembran. So wurden für mehrere Rezeptoren Di-Leucin- und Lysin-determinierte Internalisierungssignale beschrieben (Letourneur und Klausner 1992; Itin et al. 1995).

Der eigentliche Mechanismus der Coated-pit-Abschnürung, bei dem die Enden der Coated-pits miteinander fusionieren müssen, ist jedoch nach wie vor nicht genau verstanden. Bekannt ist jedoch, daß dieses ein ATP-abhängiger Prozeß ist, denn in ATP-depletierten Zellen kommt es zwar zu einer Invagination der Coated-pits, die eigentliche Abschnürung („budding“) unterbleibt jedoch (Schmid et al. 1990). Studiert man die Abschnürung der Coated-pits in vitro, so ist für diesen Vorgang neben ATP die Zugabe von Calcium und Cytosol notwendig. Unter den cytosolischen Faktoren kommt dem Dynamin, einer 100kDa großen GTPase, eine wichtige Bedeutung für die Abschnürung zu. Dynamin legt sich wie eine Kette um den Hals der eingestülpten Plasmamembran (Takei et al.1995; Hinshaw und Schmid 1995) und ermöglicht in einem GTP-abhängigen Prozeß das Abschnüren des Coated-pits, wodurch ein sogenanntes „clathrin-coated-vesicle“ entsteht (Takei et al.1995; Hinshaw und Schmid 1995). Damit die Abschnürung vollzogen wird, muß das Dynamin zunächst unter GTP-Verbrauch in seine aktive Konformation überführt werden. Neben cytosolischen Faktoren scheint auch das Cytoskelllet an der Abknospung der Coated-pits und Bildung der Coated-vesicles beteiligt zu sein. Damit die entstehenden Vesikel von der Plasmamembran aktiv fortbewegt werden können, bildet sich auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran ein Netzwerk verschiedener cytoskellletaler Proteine. Das Bindeglied zwischen den Aktinfilamenten des Cytoskelllets und der Plasmamembran stellt offenbar das Protein Spectrin dar (Beck 1996). Spektrin seinerseits ist mittels eines weiteren Proteins, dem Ankyrin, mit verschiedenen Membranproteinen der Plasmamembran verankert und über das sogenannte Protein 4.1 mit den Aktinfilamenten verbunden (Byers und Branton 1985). Verschiedene experimentelle Beispiele zeigen, daß eine Ausschaltung einzelner Proteine dieses Systems die Endozytose von für die

Zellfunktion notwendigen Makromolekülen verhindern kann. Beispielsweise wurde die temperatursensitive Drosophila-Shibire-Mutante, die nach Temperaturerhöhung paralytisch, als defektes Dynamin-Protein identifiziert (Urrutia et al. 1997).

Intrazelluläre Transportwege endozytierter Liganden

Nachdem die Rezeptoren und Liganden mit den Clathrin-coated-vesicles in das Zellinnere gelangt sind, wird die Clathrinhülle der Vesikel durch ein 70kDa-großes, ATP-abhängiges Enzym („uncoating enzyme“) entfernt (Rothman und Schmid 1986). Von hier an existieren für die einzelnen Rezeptoren und Liganden in Abhängigkeit von ihrer Struktur und Funktion verschiedene intrazelluläre Transportmöglichkeiten. Einige Liganden bleiben mit ihren Rezeptoren assoziiert und werden gemeinsam mit dem Rezeptor wieder zur Zelloberfläche zurückgebracht („Recycling“). Das klassische Beispiel für diesen Weg stellt der Zyklus des Transferrins dar (Dautry-Varsat et al. 1983). Andere Liganden trennen sich hingegen von ihrem Rezeptor. Während der Rezeptor zur Zelloberfläche zurückgelangt, gelangt der Ligand über Zwischenschritte in die Lysosomen, wo der enzymatische Abbau stattfindet. Klassisches Beispiel für diesen Weg ist der LDL-Rezeptor (Brown et al. 1983). Während die meisten Rezeptoren einem Recycling zurück zur Zelloberfläche unterliegen, gibt es auch den Fall, daß die Rezeptoren nach der Endozytose in die Degradation gelangen. Beispiel hierfür ist der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF-Rezeptor) (Herbst et al. 1994). Ein wieder anderer Weg findet sich bei der sogenannten Transzytose, für die der Immunglobulin A -Rezeptor (IgA-Rezeptor) ein Beispiel darstellt (Hunziker et al. 1994; Mostov et al. 1994). IgA wird gemeinsam mit dem Rezeptor an der basolateralen Oberfläche von Hepatozyten aufgenommen und auf der apikalen Seite in die Gallenflüssigkeit abgegeben. Innerhalb der Zelle wird der Rezeptor zwar durch eine Protease modifiziert, bleibt jedoch an das IgA gebunden und wird gemeinsam mit diesem ausgeschieden.

Endosomale Kompartimente

Auf den jeweiligen Transportwegen durchlaufen Rezeptoren und Liganden unterschiedliche endosomale Kompartimente. Der gesamte Prozeß der intrazellulären Sortierung („sorting“) von Rezeptoren und Liganden ist außerordentlich dynamisch. Die Identifizierung und Nomenklatur der endosomalen Strukturen gestaltet sich wegen der Kurzlebigkeit der Strukturen und dem ständigen Austausch zwischen den einzelnen Kompartimenten schwierig. Anhand von jeweils charakteristischen Markern, das heißt Liganden, Rezeptoren und mit den Endosomen assoziierten Proteinen, gelingt jedoch eine Differenzierung (Übersicht: Mukherjee 1997).

Nach verschiedenen Kriterien lassen sich die endosomalen Kompartimente zunächst grob in frühe und späte Endosomen unterteilen. Zu den frühen Endosomen zählen zunächst einmal die endosomalen Kompartimente, die auf der Wegstrecke des Rezeptor-Recyclings liegen. Darüberhinaus müssen internalisierte Makromoleküle die frühen Endosomen teilweise passieren, um das Kompartiment der späten Endosomen zu erreichen. Späte Endosomen sind Organellen, die am Abbau von Makromolekülen beteiligt sind. Somit finden sich in den späten Endosomen keine Rezeptoren, die einem Recycling unterliegen, wie z.B. der Transferrinrezeptor, jedoch Makromoleküle, die nach ihrer Aufnahme in der Zelle abgebaut werden, wie z.B. LDL oder α_2 -Makroglobulin. Nach den späten Endosomen gelangen zum Abbau bestimmte Liganden zu den Lysosomen, in denen der weitere Abbau oder auch die Speicherung von unverdaulichem Material stattfindet.

Das System der frühen Endosomen läßt sich in mindestens zwei weitere Untereinheiten aufteilen. In den sogenannten „sorting“-Endosomen finden sich sowohl Transferrin, als Beispiel für ein zu rezyklierendes Molekül, als auch LDL, welches den Weg des Abbaus („Degradation“) beschreitet. Von den Sorting-Endosomen kann das sogenannte Recycling-Kompartiment unterschieden werden. Im Recycling-Kompartiment finden sich Recycling-Moleküle, wie zum Beispiel Transferrin, jedoch keine Moleküle, die einer Degradation unterliegen (Yamashiro et al. 1989). Auch nach morphologischen Gesichtspunkten unterscheiden sich das Sorting- und Recycling-Kompartiment der frühen Endosomen voneinander. Sorting-Endosomen haben eine

überwiegend vesikuläre Struktur von ca. 250-400 nm Durchmesser. Von dem vesikulärem Hauptanteil des Sorting-Endosoms gehen tubuläre Ausläufer von ca. 50-60 nm Durchmesser und bis zu 4µm Länge in die Peripherie (Geuze et al.1983; Gruenberg et al.1989; Marsh et al. 1986). Der Hauptanteil des Volumens befindet sich im Sorting-Endosom demnach im zentralen, vesikulären Anteil . Demgegenüber besteht das Recycling-Kompartiment überwiegend aus tubulären Strukturen, die in ihrem Durchmesser den tubulären Ausläufern des Sorting Endosom stark ähnlich sind (Yamashiro et al.1989). Es liegt daher der Gedanke nahe, daß die Tubuli des Recycling-Kompartimentes aus Abschnürungen der tubulären Ausläufer der Sorting-Endosomen entstehen. Die Tubuli des Recycling-Kompartiments besitzen zahlreiche Quervernetzungen und lassen sich bereits lichtmikroskopisch von den Sorting-Endosomen unterscheiden (Dunn et al.1989; Ghosh et al. 1994). Als weiteres Kriterium lassen sich Sorting- und Recycling-Endosomen mittels des unterschiedlichen pH-Wertes voneinander abgrenzen. Die Ansäuerung der Endosomen erfolgt durch eine ATP-abhängige Protonenpumpe und ermöglicht die Dissoziation vieler Rezeptoren von ihren Liganden (Nelson 1987). Die Abspaltung der Liganden von ihren Rezeptoren erfolgt möglicherweise durch eine Konformationsänderung der Rezeptoren bei niedrigen pH-Werten, wie am Beispiel des EGF-Rezeptors gezeigt werden konnte (Maxfield et al. 1984). In CHO-Zellen besitzen die Sorting-Endosomen einen pH-Wert von 5,9-6,0, während der pH-Wert der Recycling-Endosomen bei 6,4-6,5 liegt (Presley et al.1993; Yamashiro et al. 1984 und 1987).

Späte Endosomen werden häufig als Organellen definiert, in welchen kein Transferrin oder andere Recycling-Moleküle gefunden werden können, die jedoch den Kationen-abhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (CI-MPR) beinhalten (Mukherjee1997). Der CI-MPR transportiert lysosomale Hydrolasen aus dem Trans-Golgi-Netzwerk zu den späten Endosomen und folgt einem komplexen Zyklus (Kornfeld et al. 1989 und 1992). Eine wichtige Eigenschaft des CI-MPR ist, daß er nicht in Lysosomen aufgenommen wird und daher als Unterscheidungsmerkmal zwischen späten Endosomen und Lysosomen herangezogen werden kann. Als weiterer charakteristischer Marker der späten Endosomen und Lysosomen gelten die Lysosomen-assoziierten-

Membranproteine (LAMPs) (Kornfeld et al. 1989 und 1992). Mittels der charakteristischen Verteilung der beiden letztgenannten Proteine konnten späte Endosomen auf experimentelle Weise als LAMP- und CI-MPR-positive Strukturen identifiziert werden, während die Lysosomen keinen CI-MPR enthalten. Die späten Endosomen ähneln in ihrer Größe den Sorting-Endosomen, elektronenmikroskopisch weisen sie jedoch eine unterschiedliche Morphologie auf. Die Oberfläche der späten Endosomen weist zahlreiche Invaginationen der Membran auf, was den späten Endosomen eine gekammerte, „multivesikuläre“ Struktur verleiht (Van Deurs et al. 1993). In der Literatur findet sich daher vielfach auch der Begriff „Multi-vesicular-bodies“ (MVBs) für späte Endosomen. Der pH-Wert der späten Endosomen liegt in CHO-Zellen unter 6,0 (Yamashiro and Maxfield 1987).

Die letzte Station auf dem Weg der Degradation bilden die Lysosomen. Der pH-Wert der Lysosomen liegt noch unterhalb des pH-Wertes der späten Endosomen bei einem pH von 5,0-5,5. Die Lysosomen sind somit saure, hydrolasereiche Partikel, in denen der endgültige Abbau von internalisierten Makromolekülen stattfindet. In der Elektronenmikroskopie erscheinen die Lysosomen als elektronendichte Strukturen, die von einer einzigen Membran begrenzt werden, weshalb auch der Begriff „dense-bodies“ verwandt wurde. Nach verschiedenen Autoren entsprechen jedoch die Lysosomen nicht zwingend den „dense-bodies“ und sind von ihrer Morphologie her recht heterogen (Kornfeld and Mellman 1989; Holtzman 1989).

Rezeptor vermittelte Endozytose des Transferrins

Der Transport von Eisen in die Körperzellen wird durch das System von Transferrin und seinem Rezeptor vermittelt. Zweiwertiges Eisen wird im Blut an Transferrin, ein Serum-Glykoprotein mit jeweils zwei Bindungsstellen für Eisenionen, gebunden. Transferrin bindet sodann an seinen Rezeptor und kann in den Prozeß der Endozytose eintreten. Der Transferrinrezeptor ist ein dimerisches Glykoprotein von 180kDa Größe und besteht aus zwei identischen, über Disulfid-Brücken verbundenen 90kDa Untereinheiten (Schneider et al. 1982). Wie bereits erwähnt, dient der Transferrinrezeptor als

klassisches Beispiel für das Recycling von Rezeptor und Ligand. Bei der Ansäuerung in den Sorting-Endosomen dissoziiert das Eisen vom Transferrin, der Rezeptor bleibt jedoch mit dem Apotransferrin verbunden. Nachdem Rezeptor und Ligand über die Recycling-Endosomen wieder zur Zelloberfläche zurück gelangt sind, zerfällt bei neutralem pH-Wert der Komplex von Transferrin und seinem Rezeptor, so daß der Transferrin-Rezeptor erneut einen eisenbeladenen Liganden aufnehmen kann (Octave et al.1983). Rezeptor vermittelte Endozytose und Recycling des Transferrin sind ein sehr schnell ablaufender Vorgang. Die Menge des Transferrin in den Sortierenden Endosomen erreicht bereits nach drei bis fünf Minuten ein Plateau, wie durch quantitative Fluoreszenz-Mikroskopie ermittelt wurde (Dunn et al. 1989; Ghosh et al. 1994). Durch sogenannte „Pulse-Chase“-Experimente wurde in den selben Studien auch die Verweildauer des Transferrins in den Sortierenden Endosomen mit ungefähr zwei bis drei Minuten bestimmt. Offenbar stellt sich also ein rasches Gleichgewicht zwischen den Transferrinmolekülen, die in die Sorting-Endosomen aufgenommen werden, und solchen, die nach Abgabe des Eisens in die Recycling-Endosomen übertreten, ein (Mukherjee 1997). Den effektiven Rücktransport des Rezeptor-gebundenen Transferrins zurück zur Zelloberfläche gewährleisten die Recycling-Endosomen. Die Transferrinrezeptoren verlassen das Kompartiment der Recycling-Endosomen über die Plasmamembran mit einer Halbwertszeit von ungefähr 10 Minuten (McGraw und Maxfield 1990). Durch diesen vergleichsweise behäbigen Schritt sind die Recycling-Endosomen die Hauptlokalisation intrazellulären Transferrins und seines Rezeptors. Eine intrazelluläre Transferrin-Passage dauert im Mittel ca. 16 Minuten. Jeder Transferrin Rezeptor kann während seiner Lebensdauer ca. 300 mal rezykliert werden (Omary et Trowbridge 1981).

Rezeptor vermittelte Endozytose des LDL

Eines der am besten charakterisierten Systeme der Rezeptor vermittelten Endozytose ist die Aufnahme von Low-Density-Lipoproteinen (LDL) über den LDL-Rezeptor (LDL-R) (Brown und Goldstein 1986). Der LDL-R kommt auf fast

allen Zellen des menschlichen Körpers vor und spielt eine wesentliche Rolle für die zelluläre Cholesterin-Homeostase und die Regulation des Plasmacholesterinspiegels. Verschiedene Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen führen zu funktionsuntüchtigen LDL-Rezeptoren und dem Krankheitsbild der familiären Hypercholesterinämie (Brown und Goldstein 1974; Goldstein und Brown 1975). Bei dieser autosomal dominant vererbten Erkrankung kommt es zu extrem erhöhten LDL-Cholesterinspiegeln und vorzeitiger Atherosklerose.

Auf den Stoffwechsel der Lipoproteine und die Struktur des LDL-Rezeptors soll weiter unten noch näher eingegangen werden.

Die Rezeptor vermittelte Endozytose des LDL wurde von Goldstein und Brown zunächst an humanen Fibroblasten in der Zellkultur studiert, konnte später jedoch auch in einer Vielzahl von anderen Geweben und Zelltypen beschrieben werden. In humanen Fibroblasten finden sich zwischen 50 – 80% der LDL-Rezeptoren in den Coated-pits lokalisiert, die wiederum nur ca. 2% der Zelloberfläche ausmachen (Goldstein et al. 1979). Diese Anreicherung der Rezeptoren in den coated pits erlaubt eine effektive Internalisierung des LDL. Nach dem Entfernen der Clathrin-Hülle verschmelzen die den Rezeptor-Ligand Komplex enthaltenden Vesikel rasch zu den sortierenden Endosomen. In vitro erfolgt durch zahlreiche Vesikelfusionen ein rascher Anstieg des endozytierten LDL, wobei nach ca. 10 Minuten ein Plateau erreicht wird (Ghosh et al. 1994). Anders als beim Komplex von Transferrin und Transferrin-Rezeptor, bei dem durch die Ansäuerung in den sortierenden Endosomen nur das Eisenmolekül abgegeben wird, dissoziiert das LDL von seinem Rezeptor und akkumuliert im vesikulären Anteil des Endosoms (Maxfield und Yamashiro 1991). Die LDL-Rezeptoren finden sich demhingegen vor allen in den tubulären Ausläufern der sortierenden Endosomen lokalisiert (Geuze et al. 1987). Nach Ablösung der tubulären Ausläufer werden die LDL-Rezeptoren über die Recycling Endosomen wieder zur Zelloberfläche zurück transportiert, von wo sie den Prozeß der Endozytose erneut durchlaufen können. Die vom Rezeptor abgespaltenen LDL-Partikel werden vom vesikulären Anteil der sortierenden Endosomen aus der Degradation in den Lysosomen zugeführt. Für diesen Weg der LDL-Partikel von den sortierenden Endosomen zu den späten Endosomen existieren verschiedene Theorien, von denen sich in den letzten

Jahren das sogenannte „Reifungsmodell“ etabliert hat. Demnach reifen die sortierenden Endosomen durch einige Modifikationen zu den späten Endosomen (Dunn and Maxfield 1992). Die Reifung zum späten Endosom beginnt mit einer Konformationsänderung der sortierenden Endosomen hin zu kugelförmigen Vesikeln (Gruenberg et al. 1989). Diese werden in der Literatur zum Teil nach ihrer Funktion als Endosomale-Carrier-Vesikel (ECV), oder, da sich elektronenmikroskopisch im Inneren dieser Partikel eine vesikuläre Binnenstruktur zeigt, auch als „multi-vesicular-bodies“ (MVBs) bezeichnet (Hopkins 1983; Dunn et al. 1986). Später konnte gezeigt werden, daß es sich bei diesen internen Vesikeln um zwiebelschalenartige Membraninvaginationen handelt (van Deurs et al. 1993). Die aus den sortierenden Endosomen entstandenen Partikel bewegen sich mit den enthaltenen LDL-Partikeln aus der Peripherie der Zelle entlang cytoskellatler Microtubuli in die perinukleäre Region im Zentrum der Zelle (Gruenberg et al. 1989). Die Entstehung dieser perinukleär angereicherten späten Endosomen geht mit einer weiteren Ansäuerung des inneren Milieus und einer Änderung der Membranzusammensetzung einher (Aniento et al. 1996).

In der perinukleären Region erfolgt schließlich durch Fusion der späten Endosomen mit den Lysosomen der endgültige Abbau (Degradation) des endozytierten LDL. In den Lysosomen wird die Proteinkomponente der LDL zu freien Aminosäuren degradiert, wohingegen die Cholesterinester durch die lysosomale saure Lipase zu freiem Cholesterin hydrolysiert werden. Durch noch nicht vollständig geklärte Transportmechanismen, diskutiert werden Sterol-Trägerproteine, kann das freie Cholesterin aus den Lysosomen in das Cytoplasma transportiert werden (Tabas 1995; Lange and Steck 1996).

Rab-Proteine und ihre Rolle im Vesikeltransport

In jeder tierischen Zelle findet ein ständiger Austausch von Membranbestandteilen zwischen der Plasmamembran und intrazellulären Membranen sowie zwischen den intrazellulären Membranen untereinander statt. Um die Integrität der Zellorganellen aufrecht zu erhalten, benötigt jede Zelle einen Apparat, der die Entstehung von Transportvesikeln und das

Verschmelzen der Vesikel mit den entsprechenden Zielmembranen steuert. Evolutionär haben sich in eukaryotischen Zellen zwei ineinandergreifende Systeme entwickelt, welche den Vesikeltransport und die Membranfusionen innerhalb der Zelle kontrollieren. Auf der einen Seite ist dies ein System von integralen Membranproteinen, den sogenannten SNAREs (Soluble NSF-attachment protein receptors). Die SNAREs vermitteln über den cytosolischen Faktor NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) spezifisch die Abtrennung von vesikulären Membranbestandteilen aus einer Donormembran (v-SNARE) und nachfolgend die Bindung an eine Akzeptormembran (t-SNARE) (Rothmann 1994).

Das zweite System wird aus den Rab-Proteinen, einer Familie von GTPasen mit geringem Molekulargewicht, gebildet. Die Rab Proteine steuern die Interaktion von v-SNAREs und t-SNAREs, also den Austausch zwischen Membranbestandteilen verschiedener Kompartimente. Mitglieder der Rab-Proteinfamilie sind bei jedem Transportvorgang innerhalb des vesikulären Transports beteiligt, sie weisen darüberhinaus Spezifität für einzelne Zellkompartimente oder Transportwege auf (Mukherjee et al. 1997; Pfeffer 1994). Rab Proteine wurden erstmalig in Hefezellen beschrieben (Salminen 1987; Gallwitz 1983). In tierischen Zellen sind bisher mehr als 30 Mitglieder der Rab-Familie identifiziert worden. Darüberhinaus existieren von einzelnen Rab-Proteinen verschiedene Isoformen. Einige der Rab-Proteine sind spezifisch für einzelne Zelltypen und regulieren Transportvorgänge, die nicht in allen tierischen Zellen stattfinden.

Rab5

Rab5 ist eine 28kDa GTPase, die aufgrund ihrer Lokalisation in den frühen Endosomen als ein Markerprotein für diese Zellorganellen gilt (Chavrier et al. 1990). 1991 berichteten Gorvel und Mitarbeiter (Gorvel et al. 1991), daß die homotype Fusion von frühen Endosomen in einem in-vitro-Assay das Vorhandensein von Rab5 voraussetzt. Später zeigten Zellkulturexperimente , daß die Überexpression von Rab5 sowohl die Rezeptor-vermittelte Endozytose von Transferrin als auch die „ fluid-phase“ -Endozytose von

Meerrettichperoxidase (HRP) stimuliert (Bucci et al.1992). Die Überexpression einer Rab5-Mutante, welche kein GTP binden kann (rab5ile133), inhibierte dagegen die Endozytose der beiden vorgenannten Liganden. Von der selben Gruppe konnte 1994 gezeigt werden (Stenmark et al. 1994), daß die Überexpression einer weiteren Rab5-Mutante (Rab5Q79L) ,welche in vivo fast ausschließlich in der GTP-gebundenen Form vorliegt, die Endozytose von Transferrin noch stärker als der Rab5-Wildtyp stimuliert, bei gleichzeitiger Inhibition des Transferrin-Recyclings. In den mit der Rab5Q79L Mutante transfizierten Zellen fanden sich darüber hinaus deutliche morphologische Veränderungen. So kam es zur Formation von abnorm vergrößerten, vakuolenartigen frühen Endosomen. Gegenteilige Effekte ließen sich mit der ausschließlich GDP bindenden Mutante Rab5S34N erzielen. Die Überexpression dieser Mutante führte zu einer Inhibition der Transferrin-Aufnahme sowie morphologisch zu verkleinerten frühen Endosomen. Aus diesen Daten wurde gefolgert, daß die GTP-gebundene Form des Rab5 für die Membranfusion benötigt wird, und die anschließende Hydrolyse, also der Austausch von GTP zu GDP, das Protein inaktiviert. In einem in-vitro-Assay konnte 1996 gezeigt werden, daß einerseits ein Nukleotidaustausch von GTP zu GDP auch ohne Membranfusion stattfindet, andererseits jedoch das Vorhandensein von Rab5-GTP Voraussetzung für die Fusion der frühen Endosomen ist (Rybin1996). Die genaue Funktion des Nukleotidaustausch für die Funktion des Rab5 ist bis heute noch nicht genau verstanden.

Die Abbildung 1 zeigt in schematisierter Form die Funktion des Rab5 im Vesikeltransport.

Rab5 lagert sich an einen Vesikel aus dem Donorkompartiment an und bewegt sich mit diesem zum entsprechenden Zielkompartiment, wo das Andocken an die Zielmembran und nachfolgend die Membranfusion stattfindet. Daran anschließend findet ein Recycling statt, durch welches das Rab5-Protein über das Cytosol wieder zum Donorkompartiment zurücktransportiert wird. Innerhalb des Cytosols liegt Rab5 jeweils in der GDP-gebundenen Form vor . Ein Austausch von GDP zu GTP im Cytosol wird durch den Rab-GDP-dissociation-inhibitor (GDI) verhindert (Ullrich et al. 1994).

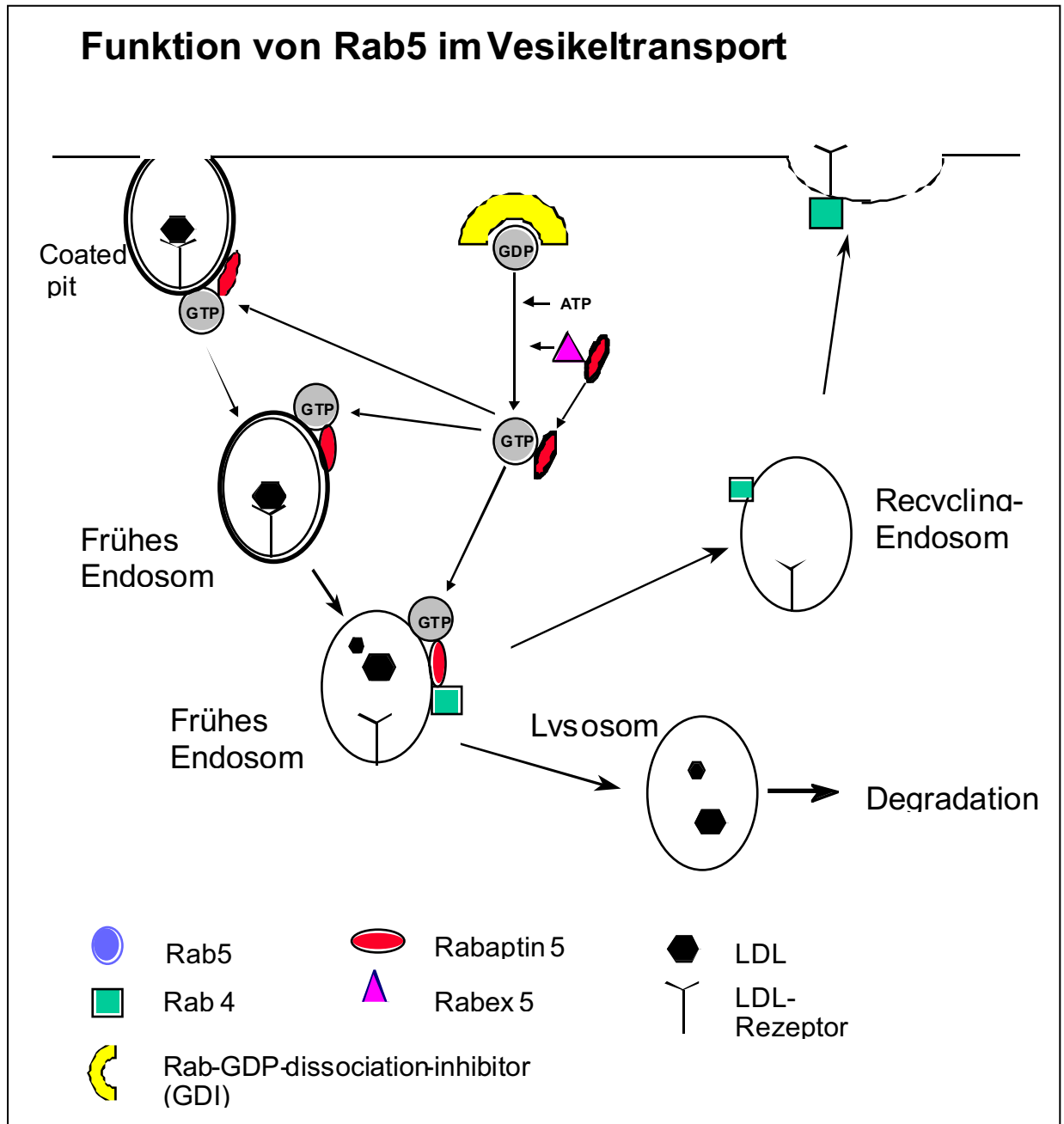


Abbildung 1: Schematische Darstellung zur Funktion von Rab5 im Vesikeltransport

Um an Membranen zu binden werden die Rab-Proteine über Cysteinreste am carboxyterminalen Ende kovalent mit zwei Isoprenylgruppen verbunden. Dieser

Schritt wird durch das Enzym Rab-Geranylgeranyltransferase (GGTase) katalysiert. (Mukherjee et al.1997). Die Isoprenylierung verankert die Rab-Proteine mit den Membranen der zellulären Organellen (Pfeffer 1994). Ein

weiteres Protein, das Rab-escort-protein (REP), bindet die nicht isoprenylierten Rab-Proteine und führt sie der GGTase zu (Shen 1996).

Bevor Rab-GDP an die Donormembran binden kann, dissoziiert der Komplex zwischen Rab-GDI und Rab-GDP. Rab-GDP bindet an die Membran und nach kurzer Zeit findet ein Austausch von GDP gegen GTP statt (Ullrich et al. 1994; Soldati et al. 1994). Der Nukleotidaustausch ist möglicherweise keine Voraussetzung für die Membranbindung, sondern „aktiviert“ das Rab-Protein indem er die erneute Komplexierung und Inaktivierung durch Rab-GDI verhindert (Novick und Zerial 1997). Die Dissoziation des Rab-GDI-Komplexes und der Nukleotidaustausch werden offenbar durch zwei verschiedene Faktoren katalysiert. So wurde für die endosomal lokalisierten Rab-Proteine (Rab5, Rab7, Rab9) ein „GDI-displacement-factor“ (GDF) beschrieben mit der Funktion, den Rab-GDI-Komplex aufzulösen. Dieser GDI-displacement-factor katalysiert jedoch nicht den Nukleotidaustausch (Dirac-Svejstrup 1997). Der Nukleotidaustausch von GDP zu GTP wird für Rab5 durch einen Guanin-Nucleotide Exchange Factor (GEF) oder Rabex5 genanntes Protein katalysiert (Horiuchi et al. 1997). GEF/Rabex5 ist ein 60kDa großes Protein, das im Zytosol an Rabaptin5 gekoppelt ist (Horiuchi et al.1997). Rabaptin5 wiederum wurde als ein Effektorprotein von Rab5 beschrieben (Stenmark 1995). Rabaptin5 reagiert nur mit GTP-gebundenem Rab5, findet sich hauptsächlich im Zytosol, kolokalisiert jedoch auch mit Rab5 an den frühen Endosomen ,den clathrin-coated-vesicles und der Plasmamembran . Rabaptin5 wird sowohl für die Fusion von frühen Endosomen untereinander als auch für die Fusion von frühen Endosomen und Clathrin-coated-vesicles benötigt (Stenmark 1995). Es stabilisiert Rab5 in seiner GTP-gebundenen Form, indem es die Hydrolyse hinabreguliert (Rybin 1996). Durch die Kopplung von Rabex5 und Rabaptin5 im Cytosol wird somit erreicht, daß mit dem Nukleotidaustausch durch Rabex5 gleichzeitig der Effektor Rabaptin5 gebunden wird, der das Rab5 in seiner „aktiven“ GTP-Form stabilisiert. Interessanterweise fand sich auf dem Rabaptin5-Molekül neben einer Bindungsstelle für Rab5 eine zweite Bindungsstelle für Rab4 (Vitale et al.1998). Rab4 steuert den Transport von den frühen Endosomen zu den Recycling-Endosomen (Van der Sluijs et al.

1992). Somit werden durch das Rabaptin5 möglicherweise der Import und Export von Liganden aus den frühen Endosomen gekoppelt.

In den letzten Jahren wurde die Bedeutung von Phosphatidylnol(PI)3-kinasen für eine Vielzahl von Vorgängen im intrazellulären Membranverkehr sowie für Mechanismen der Endozytose beschrieben (Herman et al. 1990; Schu et al. 1993; Gould et al. 1994; Kanai et al. 1993; Okada et al. 1994). Die Funktion der PI3-Kinasen läßt sich durch Wortmannin, einen Pilzmetabolit, blockieren (Yano et al. 1993). So konnte durch Blockierung der PI3-Kinase-Aktivität durch Wortmannin *in vitro* die Fusion von frühen Endosomen und in Zellkulturexperimenten die Endozytose von Transferrin und Meerrettichperoxidase inhibiert werden (Li 1995). Interessanterweise zeigte sich dieser Effekt nicht in Zellen, welche die Rab5-GTP-Mutante Q79L überexprimierten. Die Autoren folgerten daher, daß Phosphatidylinositolphosphate in der Endosomenmembran, deren Bildung durch die PI3-Kinase katalysiert wird, eine Schlüsselfunktion für den Nukleotidaustausch des Rab5 haben. Zu dieser Hypothese passt die kürzlich beschriebene Beobachtung (Simonsen et al. 1998), daß die Bindung des Early-Endosomal-Antigen1 (EEA1) an die Membran von frühen Endosomen das Vorhandensein von Phosphatidylinositol3-phosphat, eines PI3-Kinaseproduktes, voraussetzt. EEA1 bindet an Rab5-GTP und wird für die Fusion von frühen Endosomen *in vitro* benötigt. EEA1 wird daher neben Rabaptin5 als ein weiterer Effektor des Rab5 angesehen. Da EEA1 im Gegensatz zu Rabaptin5 ausschließlich in der Membran der frühen Endosomen gefunden wurde, könnte EEA1 die Funktion eines Wegweisers spielen, welcher dafür sorgt, daß der Membranverkehr nur in eine Richtung, also von den coated pits über die clathrin-coated vesicles zu den frühen Endosomen, abläuft.

Die Annexine

Als Annexine wird eine umfangreiche Gruppe von Proteinen bezeichnet, deren gemeinsame Eigenschaft die Calcium-abhängige Bindung von Phospholipiden darstellt. Neben der Phospholipidbindung weisen die

Annexine gemeinsame charakteristische Strukturmerkmale auf. Bei allen Mitgliedern der Proteinfamilie finden sich konservierte Sequenzen aus 70 Aminosäuren, die als „Annexin-repeat“ oder „core“-Domänen bezeichnet werden (Gerke and Moss 1997). Jede Core-Domäne besteht aus je 5 α -Helices (A-E) mit potentiellen Calcium-Bindungsstellen in den sogenannten „loops“ zwischen den Helices A und B, bzw. D und E. Die Core-Domänen liegen bei den einzelnen Annexinen in vierfacher oder achtfacher Wiederholung vor.

Diese gemeinsamen Struktureigenschaften haben zur Identifizierung einer großen Anzahl von Annexin-Genen und Proteinen bei Säugetieren, Insekten, Nematoden und Pflanzen geführt. Im Gegensatz zu der gut definierten Struktur der einzelnen Annexine gibt es bisher sehr widersprüchliche Erkenntnisse über die Lokalisation und Funktion der einzelnen Mitglieder der Proteinfamilie. Die Beteiligung von Annexinen wird für so unterschiedliche Prozesse wie Membranverkehr, Zellproliferation, Interaktion zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix, Entzündungshemmung, Blutgerinnung und Ionenleitung postuliert. (Übersichtsartikel: Gerke und Moss 1997) Die Heterogenität der möglichen Annexin-Funktionen spiegelt sich in einer verwirrenden Vielzahl von Bezeichnungen für die einzelnen Proteine wieder, wie z.B. Lipocortine, Calcimedine, Anchorine oder antikoagulatorische Proteine. Inzwischen wird für alle diese Proteine die Bezeichnung Annexin, ergänzt mit einer Ordnungsnummer, verwendet (Crompton et al.1988).

Für verschiedene Annexine wird eine Rolle bei Vorgängen der Endozytose vermutet. So dient Annexin I offenbar als Substrat für eine Tyrosinkinase, und wird bei Aufnahme des EGF-Rezeptors in die frühen Endosomen phosphoryliert. Diese Phosphorylierung dient offenbar als Signal für die Ausbildung einer internen Vesikulierung in den frühen Endosomen, wodurch die bereits erwähnten Multi-Vesicular-Bodies (MVBs) entstehen (Futter et al. 1993).

Auch Annexin II übt eine Funktion im System der frühen Endosomen aus. Annexin II findet sich in bestimmten Bereichen der Plasmamembran und in den vesikulären und tubulären Anteilen der Sorting-Endosomen bei verschiedenen Zelltypen stark angereichert (Harder et al. 1997; Harder et al.

1993). Die Transfektion einer dominant-negativen Annexin II Mutante in MDCK-Zellen führte zu einer Mißlokalisierung von Transferrin-Rezeptor-positiven frühen Endosomen. Hieraus folgerten die Autoren, daß in polarisierten Epithelzellen Annexin II an der Steuerung der Lokalisation von frühen Endosomen in der Peripherie der Zelle beteiligt ist. Vermutlich wird diese Funktion über Interaktion mit dem Cytoskelet vermittelt .(Harder et al. 1993).

AnnexinVI

Als einziges der bisher beschriebenen Annexine weist das 68kDa-große AnnexinVI-Protein durch eine Genduplikation acht Core-Domänen auf. AnnexinVI besteht also aus zwei nahezu identischen Proteinhälften, und ist somit in der Lage mit Hilfe dieser beiden Core-Domänen Calcium-abhängig Kontakte über zwei Membranen hinweg zu vermitteln (Liemann und Huber 1997).

AnnexinVI konnte in einer Vielzahl von eukaryoten Zellen nachgewiesen werden, so unter anderem in Hepatozyten (Weinman et al. 1994; Tagoe et al.1994), Lymphozyten (Clark et al. 1991), Makrophagen (Desjardins et al. 1994) und einer Lymphom-Zelllinie (Tressler et al. 1993). Die genaue intrazelluläre Lokalisation und Funktion von AnnexinVI ist noch unklar. Eine Reihe biochemischer und morphologischer Analysen identifizierten AnnexinVI an der Plasmamembran sowie in endo- und exozytischen Kompartimenten (Gerke und Moss 1997). Die Anreicherung von AnnexinVI in Plasmamembranen und Endosomen aus Rattenleberhomogenaten (Jaeckle et al. 1994; Tagoe et al. 1994) sowie die Kolokalisation mit dem endosomalen Membranprotein Rab5 (Ortega et al.1998) deuten auf eine Rolle von Annexin VI bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose in Leberzellen hin. Diese Vermutung wird durch die Beobachtungen unterstützt, daß Annexin VI die Abschnürung („budding“) von Coated -pits an der Plasmamembran stimuliert (Lin et al. 1992). In einem in-vitro-Assay konnte von den Autoren gezeigt werden, daß das Budding inhibiert wurde, wenn neben Calcium und ATP Annexin VI-freies Cytosol zugegeben wurde. Wurde zu diesem Ansatz erneut Annexin VI hinzugefügt, konnte die Inhibition wieder rückgängig gemacht werden.

Ferner ist bekannt, daß Annexin VI mit Spectrin (Watanabe et al. 1994; Kamal et al. 1998) und Dynamin (Turpin et al. 1998) interagieren kann. Diesen beiden Proteinen wird ebenfalls eine Bedeutung bei der Abschnürung der Coated-pits von der Plasmamembran zugeschrieben. Spectrin ist dabei als Teil des an der Plasmamembran verankerten Spectrin-Actin Cytoskeletts an der Freisetzung von Clathrin aus den Clathrin-Coated Pits beteiligt. Offenbar stellt die durch Annexin VI vermittelte Rekrutierung des Spectrins an der Plasmamembran eine Voraussetzung für die Abschnürung der Coated-pits und den Transport von Liganden zu den Lysosomen dar, wie in Zellkulturexperimenten am Beispiel des LDL gezeigt werden konnte (Kamal et al. 1998). Die Funktion des Annexin VI besteht möglicherweise in der Aktivierung einer Cystein-Protease, die den Clathrinmantel der Coated-pits vom Spectrin ablöst, über das die Coated-pits mit der Zellmembran verbunden werden. Durch Zugabe von ALLN (N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal), einem Cystein-Protease-Inhibitor, konnte im Zellkulturexperiment das Abschnüren der Coated-pits und somit auch die Endozytose des LDL blockiert werden. Interessanterweise bildeten die mit ALLN behandelten Zellen nach einer gewissen Zeit kompensatorisch eine große Anzahl von Coated-pits, deren Anzahl etwa zwei- bis dreifach höher als bei den unbehandelten Zellen lag. Das über diese kompensatorisch entstandenen Coated-pits internalisierte LDL wanderte jedoch nicht zum Zellzentrum und wurde auch nicht degradiert. Die Autoren postulierten daher die Existenz eines Subtyps von Coated-pits, bei dem die Abschnürung und die Bildung von frühen Endosomen Spectrin- bzw. Annexin VI-unabhängig erfolgt. Die Tatsache, daß das von diesen Coated-pits aufgenommene LDL nicht zu den Lysosomen gelangt, deutet darauf hin, daß Annexin VI neben einer Funktion bei der Abschnürung auch für die richtige Lokalisation der entstehenden frühen Endosomen eine Rolle spielt. Smythe und Mitarbeiter machten ferner die Beobachtung, daß die Rezeptor-vermittelte Endozytose in A 431-Zellen, einer Plattenepithelkarzinom-Zelllinie, die kein endogenes Annexin VI exprimiert, ungehindert abläuft (Smythe et al. 1994). Die Expression von Annexin VI in diesen Zellen mittels Transfektion zeigte keinen Einfluß auf den Ablauf und die Rate der Endozytose von LDL. Die Autoren vermuteten daher, daß die Funktion des Annexin VI für die Rezeptor-vermittelte Endozytose nur für

bestimmte Zelltypen erforderlich ist. Tatsächlich findet sich Spectrin nicht in allen Bereichen der Plasmamembran, insbesondere scheint Spectrin im apikalen Kompartiment von polarisierten Epithelzellen, zu denen auch die erwähnten A 431-Zellen zählen, nicht vorhanden zu sein (Kamal et al. 1998). Möglicherweise läuft also die Endozytose über die Coated-Pits bei solchen Zelltypen von Vorneherein Spectrin- bzw. Annexin VI-unabhängig ab.

Als ein weiteres mit Annexin VI interagierendes Protein stellt das Dynamin eine GTPase dar, die für das Abschnüren der Coated-Pits essentiell ist (Hinshaw et al. 1995). Die genaue Wirkungsweise der Interaktion von Annexin VI mit Dynamin, sowie die hierfür verantwortlichen Proteinregionen des Annexin VI-Molekül sind bisher nicht identifiziert worden. Neben Spectrin und Dynamin sind in jüngster Zeit noch weitere Interaktionspartner des Annexin VI beschrieben worden (Gerke and Moss 1997). Zu ihnen zählen einige Mitglieder der sogenannten S-100 Proteinfamilie sowie Actin, ein wichtiges Strukturprotein des Cytoskeletts. Die funktionelle Bedeutung diese Interaktionen ist jedoch noch ungeklärt und Gegenstand der Forschung.

Stoffwechsel der Lipoproteine

Säugetierorganismen nehmen Energie in Form von Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden mit der Nahrung auf. Nach der Aufnahme über den Darm werden die Nahrungsbestandteile über das Blut zu den einzelnen Organen transportiert. Aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften können Lipide nur in Assoziation mit Apolipoproteinen als sogenannte Lipoproteine im Blut transportiert werden. Den amphiphilen Apolipoproteinen kommt eine große Bedeutung bei der Regulation des Lipidstoffwechsels zu. Als spezifische Liganden für membranständige Oberflächenrezeptoren sind sie an der Vermittlung der zellulären Bindung und Aufnahme von Lipoproteinen entscheidend beteiligt. Darüberhinaus spielen sie eine Rolle als Strukturgerüst der Lipoproteine oder können die Aktivitäten der am Lipidstoffwechsel beteiligten Enzyme modulieren.

Evolutionär ist ein System aus verschiedenen Lipoproteinen und Rezeptoren entstanden. Dadurch können die verschiedenen Aufgaben der Lipide im Organismus, wie beispielsweise Energietransport und Speicherung, Synthese von Gallensäuren, Membranbestandteilen und Steroidhormonen, gewährleistet werden. Störungen des Lipoproteinstoffwechsels spielen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Atherosklerose, da sie eine der Haupttodesursachen in der westlichen Welt darstellt.

Lipoproteine sind große sphärische Partikel, die aus einer polaren Hülle aus Phospholipiden, freiem Cholesterin und Apolipoproteinen bestehen, welche den hydrophoben Kern aus Triglyzeriden und Cholesterinestern umsäumt. Die Lipoproteine im menschlichen Blut können nach ihren Eigenschaften in 5 verschiedene Klassen eingeteilt werden, die sich in hinsichtlich der Dichte, Größe, elektrischen Ladung, sowie der Zusammenstellung der Lipide und Apolipoproteine unterscheiden (Gotto et al., 1986). Ausgehend von den bis zu 1200nm großen, triglyzeridreichen Chylomikronen werden die Lipoproteine nach absteigender Größe und zunehmender Dichte als VLDL (Very-Low-Density-Lipoproteine), IDL (Intermediate-Density-Lipoproteine), LDL und schließlich HDL (High-Density-Lipoproteine) bezeichnet. Die Low-Density-Lipoproteine (LDL) stellen unter normalen Bedingungen die größte Lipoproteinfraktion im menschlichen Serum dar.

Im sogenannten endogenen Stoffwechselweg der Lipoproteine werden von der Leber zunächst die triglyzeridreichen VLDL in den Blutkreislauf abgegeben. Intravaskulär werden in den VLDL durch das Enzym Lipoproteinlipase (LpL), welches an den Endothelzellen der Kapillaren im Muskel und Fettgewebe gebunden ist, sowie durch die hepatische Lipase, die auf der Oberfläche der Hepatozyten lokalisiert ist, hydrolytisch Triglyzeride gespalten (Eisenberg et al. 1992; Rubinstein et al. 1985). Durch die Hydrolyse der Triglyzeride entstehen die cholesterinreichen LDL-Partikel. Während dieser hydrolytischen Kaskade werden sämtliche Apolipoproteine bis auf das ApoB100 abgegeben. Apolipoprotein B100 stellt das wesentliche Strukturprotein der LDL-Partikel dar und ist darüberhinaus Ligand für den LDL-Rezeptor.

Die Rezeptor-vermittelte Endozytose des LDL über den LDL-Rezeptor spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Lipidstoffwechsels. Bei dem lysosomalen Abbau endozytierter LDL-Partikel entsteht freies Cholesterin. Durch eine erhöhte intrazelluläre Cholesterinkonzentration wird die Expression des LDL-Rezeptors (Dawson et al. 1988) sowie die Expression der beiden Schlüsselenzyme der zelleigenen Cholesterinsynthese, Hydroxy-methyl-glutaryl CoA Reductase und Hydroxy-methyl-glutaryl CoA Synthase, vermindert (Goldstein and Brown 1990). Dieser Regulationsmechanismus wird über sogenannte „sterol-responsive-elements“ (SREs), die an einen Transkriptionsfaktor (SP1) der entsprechenden Gene binden, vermittelt. Ein solcher Regelkreis hat die Funktion, die Zelle vor toxischen intrazellulären Konzentrationen an freiem Cholesterin zu schützen. Auf der anderen Seite bewirkt eine verminderte Expression des LDL-Rezeptors einen Anstieg des Serumcholesterins.

Der LDL-Rezeptor

Die Pionierarbeiten von Brown und Goldstein führten zur Identifizierung und Charakterisierung des LDL-Rezeptors. Für diese Arbeiten wurde 1985 der Nobel-Preis verliehen.

Der LDL-R ist ein 839 Aminosäuren großes transmembranöses Glykoprotein das fünf charakteristische Proteindomänen besitzt:

1. Das N-terminale Ende des Rezeptors besteht aus einem cysteinreichem Bindungs-Motiv von ca. 40 Aminosäuren, das sieben Mal wiederholt wird. Dieses existiert homolog bei einigen Komplementfaktoren, weshalb es auch als „complement-type-repeat“ bezeichnet wird (Stanley et al. 1985). Die Funktion der „Complement-type-repeats“ besteht in der hochaffinen Bindung der Apolipoproteine B100 und E. Die negative Ladung der Cysteinreste in den Complement-type-repeats korrespondiert mit Clustern positiv geladener Lysin- und Argininreste auf den Apolipoproteinen B100 (Hospattankar et al., 1986) und E (Rall et al. 1982; Weisgraber et al. 1983). Durch gezielte Mutagenese konnte ermittelt werden, daß die Repeats 3-7 für die Bindung des

Apolipoprotein B100 verantwortlich sind, während die Bindung von ApoE über den Repeat 5 vermittelt wird (Esser et al.1988; Russell et al.1989).

2. An jedes Cluster der Bindungsmotive schließt sich eine cysteinreiche Domäne an, die Homologie zum Vorläuferprotein des Epidermal Growth-Factor (EGF) aufweist (Gray et al. 1983), diese Domänen werden daher als „EGF-Repeats“ bezeichnet. Sie werden durch Verbindungsregionen voneinander getrennt und alternieren zum Teil mit weiteren Bindungsdomänen. Diese Verbindungs- oder „Spacerregionen“ enthalten jeweils fünf Wiederholungen der Konsensussequenz Tyr-Trp-Thr-Asp (YWTD). Die gesamte Domäne wird für die intrazelluläre, säureabhängige Dissoziation von Rezeptor und Ligand benötigt.
3. Die dritte Domäne liegt extrazellulär direkt vor dem Transmembransegment des Rezeptors. Sie enthält 18 Serin- oder Threoninreste, die in O-Stellung glykosiliert sind. Die Funktion dieser Domäne ist noch unklar.
4. Die vierte Domäne wird durch ein hydrophobes Transmembransegment gebildet.
5. C-terminal folgt die intrazelluläre Domäne . Sie beinhaltet die bereits oben erwähnte Sequenz Asp-Pro-Val-Tyr (NPXY), die als Internalisierungsmotiv für die Lokalisierung des Rezeptors in den Coated-pits und das Recycling erforderlich ist (Chen et al. 1990).

Der LDL-Rezeptor wird als 120kDa Vorläuferprotein synthetisiert und innerhalb des Golgi-Apparates zum funktionsfähigen Rezeptor von 160kDa modifiziert (Cummings et al. 1983; Schneider et al.1982).

Unterschiedliche Exons codieren für die verschiedenen Domänen des Rezeptors (Hobbs et al. 1990). So codieren beispielsweise für die cysteinreichen Ligandenbindungsdomänen die Exons 2-6, während für die transmembranösen und cytoplasmatischen Domänen die Exons 16 und 17 codieren. Auf Grund der genomischen Organisation des LDL-R wird vermutet, daß der funktionsfähige Rezeptor im Laufe der Evolution durch sogenanntes „Exon-shuffling“, also dem Verschieben bzw. Verrutschen von Exons, herausgebildet hat. Zahlreiche Mutationen des LDL-R sind charakterisiert worden, die vielfach im Krankheitsbild der familiären Hypercholesterinämie

(FH) resultieren, weshalb die Genetik des LDL-Rezeptors eine große klinische Bedeutung hat.

Das Ligandenspektrum des LDL-R umfaßt neben den ausschließlich ApoB100 enthaltenden LDL-Partikeln die ApoB100 und ApoE enthaltenden VLDL und IDL, sowie die ApoE enthaltenden Chylomikronen, bzw. Chylomikronen-Remnants (Jaeckle et al., 1992; Choi and Cooper, 1993).

In den letzten Jahren ist eine ganze Reihe von Rezeptoren identifiziert worden, die eine enge strukturelle Verwandtschaft zum LDL-Rezeptor aufweisen. Man spricht daher inzwischen von der LDL-Rezeptor Familie. Alle Mitglieder der Familie sind aus den gleichen Domänen wie der LDL-Rezeptor aufgebaut, unterscheiden sich jedoch untereinander beispielsweise in der Anzahl der Complement-type-repeats, der EGF-repeats oder das Fehlen einzelner Domänen.

Das Ligandenspektrum und die Gewebsverteilung der einzelnen Rezeptoren differiert erheblich vom LDL-Rezeptor. Die Rezeptoren der LDL-Rezeptor Familie sind teilweise nicht mehr nur Lipoprotein-Rezeptoren sondern multifunktionelle Rezeptoren mit einem breiten Ligandenspektrum und vielfach noch nicht verstandenen Funktionen (Wilnow et al.1999). Einige Rezeptoren sollen hier kurz erwähnt werden:

LRP (LDL-receptor-related- protein)

LRP ist ein multifunktionaler endozytotischer Rezeptor, der in einer Vielzahl von Geweben exprimiert wird. Nachgewiesen wurde LRP unter anderem im Leberparenchym (Herz et al.1988), auf Fibroblasten und Makrophagen (Moestrup et al. 1992), in Neuronen (Wolf et al.1988), sowie den Syncytiotrophoblasten der Placenta (Jensen et al. 1988).

Nach der Synthese des 600kDa Vorläuferproteins wird dieses im Golgi-Apparat enzymatisch in zwei Untereinheiten von 85kDa und 515kDa gespalten (Herz et al.1990). Das 85kDa-Fragment enthält die cytoplasmatische Domäne und die Transmembrandomäne und ist mit dem 515kD-Fragment, das extrazellulär prozessiert wird, nicht -kovalent assoziiert. Die Funktion dieser Spaltung ist noch unklar. LRP besitzt 31 der für die Ligandenbindung verantwortlichen

Complement-type-repeats, enthält jedoch im Gegensatz zum LDL-R nicht die dritte Domäne der in O-Stellung glykosilierten Aminosäuren, sondern an Stelle dessen 6 EGF-Repeats.

LRP wurde etwa zeitgleich sowohl als potentieller Chylomicronen-Remnant Rezeptor (Herz et al.1988) als auch als α 2-Makroglobulin-Rezeptor identifiziert (Kristensen et al. 1990; Strickland et al. 1990). Neben diesen beiden Liganden sind inzwischen eine Vielzahl weiterer Liganden identifiziert worden, darunter verschiedene Proteasen des Gerinnungssystems. Auf dem Gebiet des Lipoproteinstoffwechsels wurde LRP als Rezeptor für ApoE (Beisiegel et al.1989), mit ApoE angereicherten VLDL (Kowal et al. 1989), Lipoproteinlipase (Beisiegel et al. 1991), sowie hepatischer Lipase (Shafi et al. 1994) beschrieben.

Gp 330/ megalin

Mit ca. 600kDa ist es das größte Protein der Familie (Saito et al. 1994). Megalin weist ein dem LRP ähnliches Ligandenspektrum auf, differiert jedoch hinsichtlich der Gewebeexpression. Gewebe mit hoher Megalin-Expression sind die proximalen Tubuli der Niere, die Plazenta , sowie die Ependymzellen des Gehirns (Lundgren et al. 1997). Megalin-defiziente Knock-out-Mäuse weisen eine schwere Vorderhirn-Entwicklungsstörung auf (Wilnow et al. 1996). Da Megalin im Gehirn exprimiert wird und außerdem ApoB100-haltige Lipoproteine binden kann, wird eine Rolle in der Cholesterinversorgung des Gehirns während der embryonalen Entwicklung diskutiert.

VLDL-Rezeptor

Dieses Protein zeigt strukturell die größte Homologie mit dem LDL-Rezeptor. Es wurde erstmals 1992 aus dem Kaninchenherz kloniert (Takahashi et al. 1992). Im Vergleich zum LDL-R zeichnet sich der VLDL-Rezeptor durch eine zusätzliche Ligandenbindungsdomäne aus und enthält somit acht Wiederholungen der Cysteinreichen 40-Aminosäuresequenz am N-

terminalen Ende. Der VLDL-Rezeptor wird beim Menschen vor allem im Herzen, in der Muskulatur und im Fettgewebe exprimiert (Gafvels et al.1993). In diesen Geweben wird Energie vor allem aus freien Fettsäuren gewonnen, die aus triglyzeridreichen Lipoproteinen bereitgestellt werden. Es wird vermutet, daß der VLDL-Rezeptor in vivo vor allem zur Beschaffung und Speicherung von freien Fettsäuren, vermittelt über die Bindung von triglyzeridreichen Lipoproteinen an den Rezeptor, benötigt wird (Yamamoto et al. 1995).

Zielsetzung

Die beiden Proteine Rab5 und Annexin VI weisen hinsichtlich Ihrer Lokalisation und vermuteten Funktion eine Reihe von Gemeinsamkeiten auf. In der folgenden Arbeit sollen Versuche vorgestellt werden, in denen die Funktion der beiden Proteine auf die Endozytose vergleichend untersucht wurde. Hierzu wurden CHO-Zellen und eine Hepatoma-Zelllinie (HUH7) mit AnnexinVI und Rab5 transfiziert . Mit Hilfe von radioaktiv markierten Liganden wurden die Auswirkungen auf die Aufnahme und das Recycling von Transferrin, sowie die Aufnahme und Degradation von LDL durch die transfizierten Zellen bestimmt. Während für Rab5 bereits eine Stimulation der Aufnahme und des Recyclings von Transferrin in der Literatur beschrieben wurde (Bucci et al., 1992), ist der Effekt einer AnnexinVI Überexpression auf die Endozytose dieser Liganden noch nicht bekannt. Ferner sollte untersucht werden, ob die aus der Literatur bekannte Stimulation der Endozytose von Transferrin durch Überexpression von Rab5 auch für die Endozytose von LDL gezeigt werden kann.

Präparation von LDL aus humanem Serum

Blut von freiwilligen, gesunden Spendern wurde in handelsüblichen Serumröhrchen abgenommen. Auf 1000ml Blut wurden 250 μ l Benzamidine hinzugefügt und das Blut wurde 45 Minuten bei Raumtemperatur in Glasröhrchen zur Gerinnung stehen gelassen. Anschließend wurden die Glasröhrchen für 30 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, so daß das Serum als Überstand abpipetiert werden konnte. Durch Überschichten des Serums mit Kaliumbromidlösung (27.75 g KBr auf 100ml Serum) wurde das Serum von der Eigendichte (1,006 g/ml) auf eine Dichte von 1,025 g/ml eingestellt. Als nächster Schritt erfolgte die Zentrifugation in einer Ultrazentrifuge für 20 Stunden bei 38.000rpm und 4°C Temperatur.

Nach dem ersten Ultrazentrifugationsschritt wurden die Zentrifugenröhrchen auf Eis gestellt und die im Überstand befindlichen VLDL und IDL-Lipoproteine mittels einer Pipette abgenommen und verworfen. Die im Boden des Röhrchens befindlichen LDL- und HDL-Lipoproteine wurden gesammelt, in einen Dialyseschlauch überführt und über Nacht dialysiert. Die so gewonnen Lipoproteine wurden von einer Dichte von 1.025 ausgehend durch erneutes Überschichten mit Kaliumbromidlösung (36,932g/1000 ml Serum) auf eine Dichte von 1,050 g/ml eingestellt. Erneut erfolgte sodann eine Ultrazentrifugation bei 38.000rpm und 4°C für 20 Stunden. Als Ergebnis dieser Zentrifugation sammelte sich das LDL im Überstand und konnte abgenommen werden, während die im Bodensatz befindliche HDL-Fraktion verworfen wurden. Die abgenommene LDL-Fraktion mit einer Dichte von 1,050 mg/l wurde zur Aufreinigung erneut dialysiert und anschließend einer weiteren Ultrazentrifugation bei einer Dichte von 1,050 mg/l zugeführt. Das so gewonnene LDL wurde in Plastikröhrchen überführt und bis zu seiner Verwendung bei 4°C auf Eis gelagert.

Radioaktive Markierung von LDL

Die radioaktive Markierung der gewonnenen Lipoproteine wurde nach der Jodmonochlorid-Methode vorgenommen (McFarlane 1958). Dazu wurden 5mg der gewonnenen LDL mit PBS-Puffer auf ein Volumen von 1ml gebracht und mit 800 μ l Glycinpuffer versetzt. Auf 200 μ l des Glycinpuffers wurden dann 6 μ l Natrium 125 Jodid (22,2Mbq) hinzugefügt und dieses Gemisch der Lipoproteinlösung zugegeben. Nach der Zugabe von 40 μ l Jodchlorid-Lösung erfolgte die Reaktion für zwei Minuten bei Raumtemperatur. Das freie 125 -Jod bzw. 125 -DiJodid wurde durch Gelfiltration mit Hilfe einer PD10 Säule abgetrennt. Dazu wurde die mit PBS-Puffer äquilibrierte Säule mit 2ml der iodierten Lipoproteinlösung beladen und mit 1ml PBS-Puffer gewaschen. Die markierten Lipoproteine wurden mit 2ml PBS-Puffer eluiert.

Vor der Verwendung für die Zellkultur-Experimente wurden jeweils der Proteingehalt der markierten LDL bestimmt (Methode modifiziert nach Lowry, siehe unten), der bei den verschiedenen Präparationen zwischen 2,0 – 3,5 mg/ml lag. Die gemessene Radioaktivität pro μ g Protein lag bei etwa 1×10^5 counts per minute (cpm).

Radioaktive Markierung von Transferrin

Kommerziell erworbenes Transferrin (Sigma) wurde in PBS-Puffer auf eine Konzentration von 1mg/ml gelöst. Iodobead[®]-Kugeln wurden in PBS-gewaschen und bei Raumtemperatur kurz angetrocknet. Anschließend wurden die Iodobead[®]-Kugeln zur Transferrinlösung gegeben. Zu den Iodobead-Kugeln und der Transferrinlösung wurden dann 6 μ l Natrium 125 Jodid (22,2Mbq) hinzugefügt und das Gemisch 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde die Mischung auf eine mit PBS äquilibrierte PD10-Säule gegeben und zweimal eluiert. Die Proteinkonzentration der gewonnenen 125 I-Transferrin / PBS Lösung lag schließlich zwischen 0,5 und 0.75 mg/ml. Die spezifische Radioaktivität pro μ g Transferrin lag bei etwa 80.000 counts per minute (cpm).

Zellkultur

Sämtliche Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden bei 37°C aufgetaut, in 12ml Röhren mit je 10ml Medium überführt und anschließend 5min bei 500xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1ml frischem Medium aufgenommen und in 225ml Zellkulturflaschen überführt, die bereits 12ml Medium enthielten. Nach ca. 48 Stunden waren die Zellen konfluent gewachsen.

Zum Zwecke der Transfektion und Inkubation mit radioaktiven Liganden wurden die Zellen nach 48 Stunden zunächst dreimal mit je 10ml PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 5ml Trypsin/EDTA Lösung zugegeben und die Zellkulturflasche so lange geschwenkt, bis sich die Zellen sichtbar vom Boden der Zellkulturflasche lösten. Die suspendierten Zellen wurden dann sofort zum Stop der Trypsin-Reaktion in ein 50ml-Röhrchen (Falcon) mit 45ml Medium überführt und bei 500xg für 5min zentrifugiert. Nach erneutem, zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer in einem entsprechendem Volumen von frischem Medium resuspendiert, so daß sich eine Konzentration von 1×10^5 Zellen pro Milliliter Medium ergab. Auf eine Sechs-Schalen Platte wurden nun pro Platte 2ml Zellsuspension aufgetragen. Nach ca. 24 Stunden waren die Zellen zwischen 70-100% konfluent gewachsen, so daß die Transfektion mit den gewünschten Expressionsvektoren erfolgen konnte.

Rekombinante DNA

Die für die Transfektion verwendeten Expressionsvektoren wurden von verschiedenen Wissenschaftlern zur Verfügung gestellt oder kommerziell erworben und sollen hier kurz vorgestellt werden:

Rab5:

Expressionsvektor hum rab5 myc pFROG (Zur Verfügung gestellt von Prof. T. Jentsch, Hamburg). Literatur: (Stenmark et al., 1994)

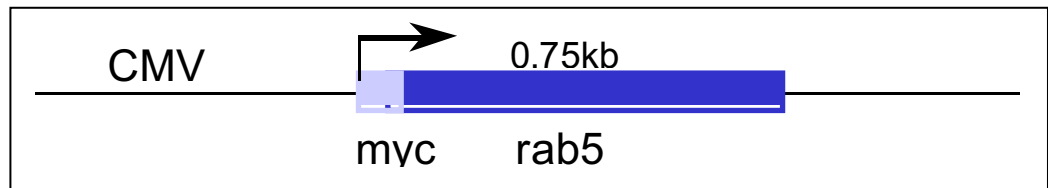


Abbildung 2: Expressionsvektor hum rab5 myc pFROG

Der Expressionsvektor erhält die 0,75 kb lange Sequenz des humanen Rab5-Genes. An die für den N-Terminus des Rab5-Genes codierende Region wurde die DNA-Sequenz für ein myc-Protein angefügt. Das Genprodukt von hum rab5 myc pFROG ist somit ein Fusionsprotein aus dem humanen Rab5 Protein und einem myc-Protein, dem sogenannten „myc-tag“. Das myc-Protein erleichtert die Detektierbarkeit des rekombinanten Proteins z.B. in Immunfluoreszenz oder Westernblot durch entsprechende, gegen das myc-Protein gerichtete Antikörper.

Die Gensequenz für Rab5+myc-Protein wurde in den kommerziell erhältlichen Expressionsvektor pFROG (Invitrogen) als sogenanntes „insert“ eingefügt. Der Rab5-Sequenz vorgeschaltet befindet sich ein Cytomegalievirus (CMV)-Promoter, der eine hohe Replikationsrate sicherstellen soll. Ferner enthält pFROG Resistenzgene für Ampicillin und Neomycin, die eine Selektionierung von transfizierten Bakterien oder Zellen auf Antibiotika-haltigen Nährböden oder Medien erlaubt.

AnnexinVI:

Die Klonierung der AnnexinVI-Expressionsvektoren erfolgte durch Dr. T. Grewal (Hamburg). Hierzu wurde die cDNA für Ratten-AnnexinVI aus einer Genbank isoliert und nach mehreren Subklonierungen in den kommerziell erhältlichen Expressionsvektor pcDNA 3.1 (Invitrogen) inseriert (Grewal et al., in the press). An die 2,2 Kilobasen lange Sequenz des Ratten-AnnexinVI Genes wurden darüberhinaus, wie bereits für den Rab5-Expressionsvektor beschrieben, an

das C-terminale Ende Sequenzen für myc- bzw. his-Proteine angefügt, so daß drei verschiedene Expressionsvektoren für Annexin VI entstanden.

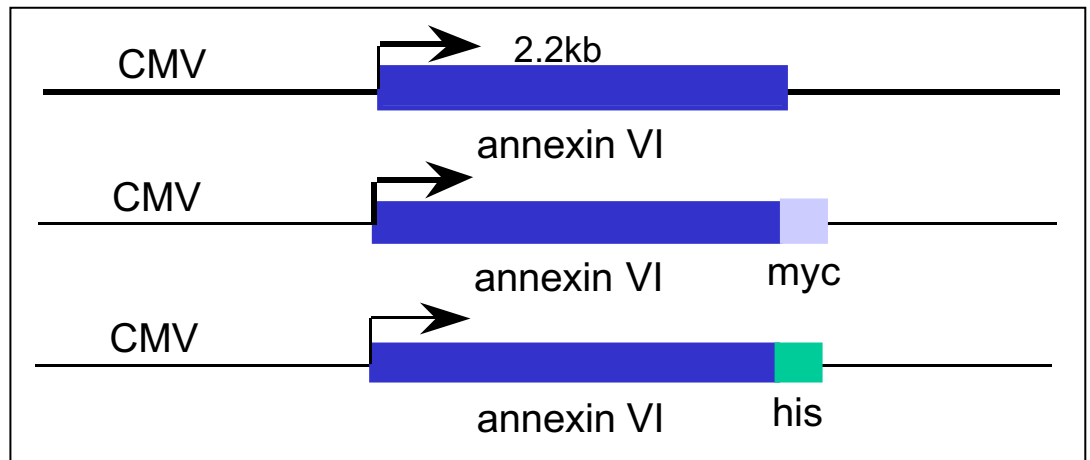


Abbildung 3: Expressionsvektoren für Annexin VI.

Dem AnnexinVI-Gen vorgeschaltet findet sich wiederum ein CMV-Promoter, auch der Vektor pcDNA 3.1 enthält Resistenzgene für die Antibiotika Neomycin, Zeocyn und Ampicillin.

LDL-Rezeptor: Der Expressionsvektor pCMVhLDLR enthält die 2,7 Kilobasen lange Sequenz des humanen LDL-Rezeptors. Der Vektor wurde von Dr. F. Schnieders (Berlin) zur Verfügung gestellt .

Transferrin-Rezeptor: Der Vektor pcD-TFR enthält als „insert“ die Sequenz des humanen Transferrin-Rezeptors (4kb), eingefügt in den kommerziell erhältlichen Vektor pcD (Invitrogen). PcD-TFR wurde zur Verfügung gestellt von Prof. T. Jentsch (Hamburg) und ist in der Literatur beschrieben (Ruddle et al., 1984).

β-Galactosidase: Der Expressionsvektor pCMVSPORT-βgal wurde kommerziell bei Gibco-BRL erworben.

Transfektion

Für die Transfektion der ausplattierten Zellen wurde pro Ansatz für eine Zellzahl von jeweils $2-3 \times 10^5$ Zellen $1 \mu\text{g}$ der entsprechenden DNA mit $6 \mu\text{l}$ Liposomen (Transfektionsreagenz FUGENE[®]) vermischt. Für die Kotransfektionen mit zwei verschiedenen Expressionsvektoren wurden analog hierzu jeweils $0,5 \mu\text{g}$ pro DNA eingesetzt, so daß sich ein gleiches Verhältnis DNA/ FUGENE[®] ergab. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden sodann unter sterilen Bedingungen $94 \mu\text{l}$ Zellkulturmedium ohne Zusatz von Serum mit $6 \mu\text{l}$ der Liposomen (FUGENE[®]-Transfektionsreagenz) in einem Eppendorf-Röhrchen vermischt. Dieser Ansatz blieb zunächst fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen, anschließend wurde tropfenweise $6 \mu\text{g}$ der in doppelt destilliertem Wasser (Aqua bidest) gelösten DNA zugegeben. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Gesamtmenge vorsichtig und tropfenweise mit einer Pipette zu den zu transfizierenden Zellen gegeben.

Selektionierung von stabil transfizierten HUH7-Zellklonen

Die Expressionsvektoren für Rab5 und Annexin VI enthielten jeweils Neomycin-Resistenzgene, welche die Selektionierung von transfizierten Zellen in Antibiotika-haltigem Zellkulturmedium erlauben.

HUH7-Zellen wurden wie oben beschrieben transfiziert und auf Petrischalen in DMEM-Zellkulturmedium, das 10% FCS und 1mg/ml Neomycin enthielt, inkubiert. Alle 24 Stunden erfolgte ein Wechsel des Mediums. Nach ca. zwei Wochen fanden sich auf den Petrischalen zwischen 50 – 200 Foci von Neomycin-resistenten Zellen. Diese Zell-Foci wurden einzeln mit einer Pipette aspiriert und in Sechsllochplatten getrennt voneinander ausplattiert. Einige der so gewonnenen Klone wiesen gute Wachstumseigenschaften auf und wurden schließlich im Western-Blot auf die Überexpression der transfizierten Proteine hin untersucht.

Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden jeweils nach den Zellkulturexperimenten zur Korrektur der gemessenen Radioaktivität auf counts per minute (cpm) pro mg

Zellprotein durchgeführt. Dies diente zur Vergleichbarkeit der gemessenen Werte bei unterschiedlicher Zellzahl pro Ansatz. Ferner wurde der Proteinanteil der präparierten Lipoproteine auf diese Art bestimmt. Zur Proteinkorrektur wurde ein modifiziertes Verfahren nach Lowry (Lowry et al. 1951) angewandt.

Hierzu wurden zunächst folgende Lösungen angesetzt:

- Lösung A: 3% Natriumcarbonat, 0,15N in NaOH
- Lösung B: 2% Natriumtartrat
- Lösung C: 1% Kupfersulfatlösung
- Folin-Reagenz nach Lowry (Merck) 1:3 mit Aqua bidest verdünnt

Jede zu bestimmende Probe wurde mit Aqua bidest auf ein Volumen von 400 μ l verdünnt. Parallel wurde aus einer BSA-Lösung (BSA: Bovines-Serum-Albumin) eine Verdünnungsreihe mit definierter Proteinkonzentration mit einem Endvolumen von ebenfalls 400 μ l hergestellt. Eine Lösung nach Lowry wurde hergestellt (9,7ml Lösung A + 0,15ml Lösung B + 0,15ml Lösung C) und jeweils ein Milliliter zu jeder Probe zugegeben. Nach 10 Minuten wurden zu jeder Probe 125 μ l Folin-Reagenz zugefügt und auf einem Handrüttler (Vortex) gut durchmischt. 30 Minuten nach Zugabe der Folin-Reagenz erfolgte am Photometer die Messung der Absorption bei 750nm. Mit Hilfe des Albuminstandards wurde dann per Dreisatzrechnung die jeweilige Proteinkonzentration für die einzelnen Proben ermittelt.

Immunoblot-Analyse der transfizierten Zellen

Zum Nachweis der Transfektionen wurden die jeweiligen Zellen 24 Stunden nach der Transfektion in 1% Triton, 50mM Tris-Puffer und 80mM NaCl solubilisiert. Jeweils 50 μ g des jeweiligen Proteinextraktes wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen, die elektrophoretische Auftrennung erfolgte unter reduzierten Bedingungen bei 40 mA über 4 Stunden (Laemmli 1970). Im Anschluß an die Auftrennung wurden die Proteine durch Elektroblotting bei 250mA über Nacht auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Proteinbanden auf der Nitrozellulosemembran wurden nun zunächst in einer Ponceau – Protein- Färbung dargestellt. Die Nitrozellulose wurde dann

entsprechend der geplanten Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern in Streifen geschnitten, beschriftet und erneut entfärbt. Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Nitrozellulose-Streifen zunächst für eine Stunde in einem sogenannten Blocking-Puffer gewaschen, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 für zwei Stunden. Vor der Inkubation mit den entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern (HRP: Meerrettichperoxidase) erfolgte ein erneuter Waschschrift. Abschließend wurden die Banden mit dem ECL-System (Amersham) nach den Anleitungen des Herstellers dargestellt.

Immunfluoreszenz der transfizierten Zellen

1×10^5 Zellen wurden in 12-Schalen-Platten auf Chamberslides (Nunc), speziellen Objektträgern für die Immunfluoreszenz, ausplattiert. Die Transfektion der Zellen erfolgte wie oben beschrieben. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen zwei mal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen, die Chamberslides entnommen und bei Raumtemperatur für 30 Minuten in PBS, welches 4% Paraformaldehyd enthielt, fixiert. Nach der Fixierung wurde erneut vier mal mit PBS-Puffer gewaschen und im Anschluß erfolgte ein Waschschrift mit PBS, welches 0,5% Glycin und 0,05% Saponin enthielt. Vor der Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte für 15 Minuten die Inkubation in einer sogenannten Blocklösung, bestehend aus PBS mit 10% Esel-Serum, 1% BSA und 0,5% Glycin. Die Primärantikörper gegen Rab5 oder Annexin VI wurden in Block-Lösung auf 1:1000 verdünnt und die Zellen für 60 Minuten bei 37°C mit den Primärantikörpern inkubiert. Nach erneuten Waschschriften erfolgte für 45 Minuten die Inkubation mit Sekundärantikörpern. Als Sekundärantikörper wurden Cy3- oder Cy2-Konjugierte, gegen die jeweilige Spezies des Primärantikörpers gerichtete F(ab')₂ Immunglobulin-Fragmente verwendet, die in polarisiertem Licht fluoreszieren. Zuletzt erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne durch Inkubation in 100ml PBS-Puffer + 6µl des Farbstoffs DAPI (2,6-Diaminophenolindol, 1mM) für 3 Minuten, gefolgt von

mehrmaligem Waschen in PBS. Vor der Mikroskopie erfolgte das Eindeckeln der Chamberslides mit Hilfe von 2µl Mowiol®.

Antikörper für Immunfluoreszenz/ Immunoblotting

- Schaf- Anti- Annexin VI, polyklonal (Abimed, Darmstadt)
- Kaninchen- Anti- Annexin VI, polyklonal (Biodesign)
- Kaninchen- Anti- Annexin VI, polyklonal (zur Verfügung gestellt von Prof. C. Enrich)
- Maus – Anti- Myc, monoklonal (Dianova)
- Maus – Anti –His, monoklonal (Dianova)
- Kaninchen –Anti- LDLR, polyklonal (zur Verfügung gestellt von Dr. J. Herz)
- Cy3-konjugierte Esel- Anti- Schaf- F(ab')₂ –Immunglobulin- Fragmente (Dianova)
- Cy3-konjugierte Esel- Anti- Maus- F(ab')₂ –Immunglobulin Fragmente (Dianova)
- HRP- (Meerrettichperoxidase) gekoppelte Ziege- Anti- Kaninchen- F(ab')₂ - Immunglobulin- Fragmente (Dianova)
- HRP- gekoppelte- Kaninchen- Anti- Schaf- F(ab')₂- Fragmente (Dianova)
- HRP- gekoppelte- Kaninchen- Anti- Maus - F(ab')₂- Fragmente (Dianova)

Bestimmung der Aufnahme von ¹²⁵I-LDL

Im Anschluß an die Transfektion wurden die Zellen über Nacht bei 37°C und 5%CO₂ im Brutschrank inkubiert. Vor dem Aufnahme-Essay wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten bei 37°C in Serum-freien Zellkulturmedium ,welches 1% BSA enthielt, vorinkubiert.

Die Zellen wurden dann auf Eis gebracht und bei 4°C wurden pro Schale einer Sechs-Schalen-Platte 4-5µg ¹²⁵Iod-markiertes LDL zugegeben. Um die unspezifische Aufnahme des radioaktiven LDL zu bestimmen, wurde zu einem Teil der Ansätze ein 50facher Überschuß von nicht radioaktiv markiertem, „kalten“ LDL hinzugegeben. Die Zellen wurden dann vom Eis heruntergenommen und für verschieden lange Zeiten im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen drei mal kurz hintereinander mit 4°C-kaltem PBS-Puffer sowie einmal für drei Minuten mit PBS, das 20 U/ml Heparin enthielt, gewaschen. Abschließend wurden die Zellen durch Zusatz von 1 ml 0,1M Natronlauge lysiert. Das Zelllysat wurde nach 30 Minuten Schwenken in ein Zählröhrchen überführt und die zellassoziierte Radioaktivität im Gamma-Counter bestimmt. Nach der Bestimmung der Radioaktivität wurde von jeder Probe ein Aliquot von 100µl für die Proteinbestimmung entnommen.

Bestimmung des Abbaus von ^{125}I -LDL

Die Zellen wurden wie oben beschrieben wiederum mit ^{125}I -LDL inkubiert. Vor Beenden der Inkubation und Lyse der Zellen wurden 100µl des Inkubationsmediums abgenommen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 150µl 10% Triton X-100 wurde der Ansatz auf Eis gestellt. Nach 15 Minuten erfolgte die Zugabe von je 300µl eiskalter, 3-molarer Trichloressigsäure (TCA). Zur Bindung von freiem ^{125}I wurden ferner 150 µl Silbernitratlösung pro Ansatz zugegeben. Die Proben wurden für zehn Sekunden auf einem Schüttler (Vortex) durchmischt und erneut für 10 Minuten auf Eis gestellt. Im Anschluß wurden alle Proben für fünf Minuten bei 13000 Umdrehungen zentrifugiert. Durch das TCA-präzipitierte Material bildete sich ein Pellet, welches verworfen wurde. Der Überstand wurde in ein Zählröhrchen überführt und die Radioaktivität im Gamma-Zähler bestimmt.

Bestimmung der Aufnahme von ^{125}I -Transferrin

Zur Bestimmung der Transferrin Aufnahme wurde in analoger Weise wie bei der Bestimmung der ^{125}I -LDL Aufnahme verfahren. Pro Schale wurden jeweils 2-3 µg ^{125}I -markiertes Transferrin zum Inkubationsmedium gegeben. Auch hier wurde jeweils zu jedem dritten Ansatz eine 50-fach höhere Menge an kaltem Transferrin zur Bestimmung der spezifischen Aufnahme zugefügt. Die

Inkubation mit ^{125}I -Transferrin und die Waschschrirte zum Beenden der Inkubation erfolgten jeweils auf Eis (4°C Celsius).

Bestimmung des Recyclings von ^{125}I -Transferrin

Die transfizierten Zellen wurden wie oben beschrieben für 60 Minuten mit ^{125}I -markiertem Transferrin inkubiert (37°C). Erneut wurde zu jeder dritten Probe ein 50-facher Überschuß von unmarkiertem Transferrin zugefügt. Nach der Inkubation wurden die Zellen auf Eis gestellt, das ^{125}I -Transferrin Medium wurde entfernt und die Zellen viermal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden dann erneut bei 37°C mit serumfreien Zellkulturmedium, welches 1% BSA enthielt, im Brutschrank inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation wurden 100µl Medium abgenommen und die in das Medium freigesetzte Radioaktivität, entsprechend dem rezykliertem ^{125}I -Transferrin, bestimmt.

Verwendete Geräte und Materialien:

Größere Geräte:

- Gammacounter (Packard)
- Laborzentrifuge (Eppendorf)
- Zellkulturzentrifuge (Heraeus)
- Ultrazentrifuge (Sorvall)
- Fluoreszenzmikroskop (Leitz)
- Spektralphotometer (Perkin-Elmer)
- Zellkultur-Brutschrank
- Sterile Werkbank (Hood)

LDL-Präparation:

- Kaliumbromid (Sigma)
- Benzamidine (Sigma)
- Serumröhrchen zur Blutentnahme
- Rotoren für Ultrazentrifuge (50.2-TI/60-TI; 50-TI), sowie Spacer
- „Quick-seal“-Ultrazentrifugenröhrchen sowie Schweiß- und Schneidegerät
- Dialysepuffer (10 ×) 450 g NaCl, 61g TRIS, 28g EDTA auf 5l Aqua bidest (pH=8,6)

Radioaktive Markierung von LDL und Transferrin:

- Na ^{125}I -Jodid (Amersham)

- Glycinpuffer (1M Glycin, mit 1M NaOH auf pH 10 eingestellt)
- PBS-Puffer (Potassium Buffer Saline) (GIBCO)
- Jodmonochloridlösung (3.3mM JCl, 2M NaCl in 0.1 N HCl)
- PD 10 Gelchromatographie Säule, Sephadex G25 (Pharmacia)
- Holo-Transferrin, Eisen-gesättigt (Sigma)
- Iodobead®-Kugeln (Pierce)

Zellkultur:

- Nutrient Mixture F-12 (GIBCO)
- DMEM – Zellkulturmedium (GIBCO)
- 10% fetales Kälberserum (FCS), (GIBCO)
- 1x Glutaminlösung (GIBCO)
- 50ml Reagenzgefäß (FALCON)
- 225ml Zellkulturflasche (NUNC)
- PBS-Puffer (GIBCO)
- Trypsin/EDTA-Lösung (GIBCO)
- 50ml Reagenzgefäß (FALCON)
- Zellkultur-Zentrifuge (HETTLICH)
- Zellkultur-Mikroskop (Leitz)
- Neugebauer-Zählkammer
- Sechslloch-Zellkulturplatten („six-wells“) (NUNC)
- 12-Loch-Zellkulturplatten („12-wells“) (NUNC)

Transfektion:

- FUGENE 6 Transfection-Reagent (Boehringer-Mannheim)
- Eppendorf-Röhrchen (Greiner)
- Expressiovektoren und Zellen wie oben beschrieben

Proteinbestimmung:

- Natriumcarbonat (Sigma)
- Natriumtartrat (Sigma)
- Kupfersulfatlösung 1% (Sigma)
- Folin- Phenol Reagenz nach Lowry (Merck)
- Albuminstandard, reinst (BSA) (Sigma)

Western-Blotting:

- Triton X-100 1% (Sigma)
- Calciumchlorid (Merck)
- Trenngel: Acrylamidlösung: (Roth $Y\% \times 4 = Xg$), 0,4g Bisacrylamid (Serva) /100ml Aqua, Untergelpuffer (1,7M Tris-HCl, pH 9,18 mit 18%iger HCl)
Temedlösung (0,6 ml Tetramethylenendiamin (Sigma)/ 100 ml Aqua)
AP-Lösung (200 mg Ammoniumpersulphat/ 100 ml Aqua)
- Sammelgel: 5ml Acrylamidlösung (12g Acrylamid, 0,8g Bisacrylamid/ 100ml Aqua)
5ml Obergelpuffer (0,2M Tris-HCl mit 1N Schwefelsäure auf pH 6,14)

2ml AP-Lösung: 8ml Aqua bidest; 20 μ l unverdünntes Temed.

- Unterer Elektrodenpuffer: (0,42M Tris-HCl mit 18%iger HCl auf pH 9,5 eingestellt)
- Oberer Elektrodenpuffer: (0,04 M Borsäure, 0,04 M Tris-HCl; 0,1% SDS ,
- β -Mercaptoethanol (Serva)
- SDS-Lösung (10% Natriumdodecylsulfat in 50mM Tris-HCl)
- Proteinstandard broad molecular weight (BIORAD)
- Protran-Nitrocellulose-Membranen (Schleicher und Schüll)
- ECL-Proteindetektionssystem (Amersham)
- Coomassie-Lösung (0,1% Coomassie in Methanol/Eisessig/Aqua bidest 50: 10: 40)
- Entfärberlösung (Methanol/Eisessig/Aqua bidest 50: 10: 40)
- Poinceau 0,2% in 3% Trichloressigsäure (Serva)
- Blotting-Kammer (Biorad)
- ElektrobloTTingpuffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM Glycin, 20% Methanol)
- Blocking-Puffer: 5% BSA in Waschpuffer A
- Waschpuffer A (10mM Tris-HCl, 86mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH7,4)
- Waschpuffer B (10mM Tris-HCl, 86mM NaCl, 0,1% Tween ,0,3mM SDS,
- Elektrophoresekammer

Immunfluoreszenz

- Chamberslides (NUNC)
- Paraformaldehyd-Lösung (Sigma)
- Saponin
- DAPI (2,6- Diaminophenolindol, Hoechst)
- Deckgläser
- Mowiol (Calbiochem)
- Eselserum (Dianova)
- Antikörper (siehe oben)

Ergebnisse

LDL-Aufnahme von CHO und HUH7-Zellen nach Präinkubation mit LPDS

Dieses Experiment diente zur Charakterisierung des experimentellen Systems, bevor Experimente zur LDL-Aufnahme mit den transfizierten Zellen unternommen wurden. Insbesondere sollte überprüft werden, ob die Rezeptor-vermittelte Endozytose des LDL in den verwendeten Zelllinien durch Präinkubation mit LPDS stimulierbar ist.

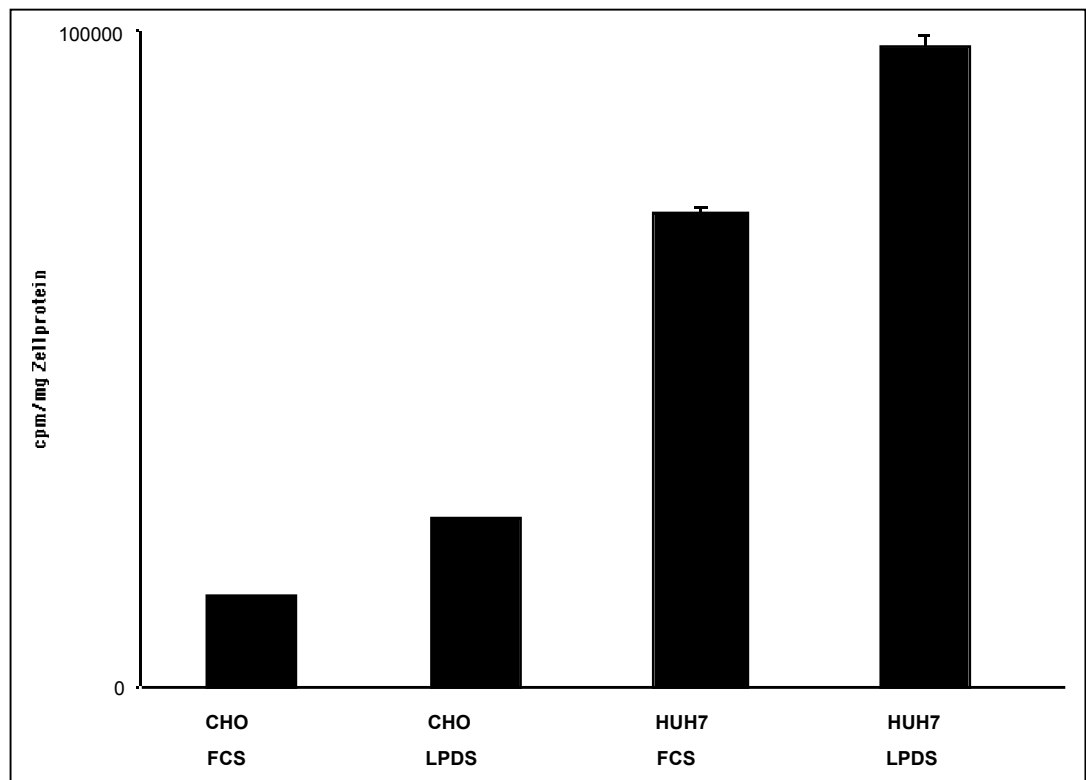


Abbildung 4: ¹²⁵I-LDL-Aufnahme von CHO- und HUH7-Zellen nach 60 Minuten Inkubation mit ¹²⁵I-LDL (10^6 cpm pro Schale) in Abhängigkeit von der Präinkubation mit Foetalem Kälberserum (FCS) oder Lipoprotein-depletiertem Serum (LPDS). Jeder Wert symbolisiert den Mittelwert von vier Werten innerhalb des selben Experimentes. Nach Bestimmung der zellassoziierten Radioaktivität erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit eine Proteinbestimmung und die Korrektur auf cpm/mg Zellprotein.

Jeweils 10^5 Chinese-Hamster Ovary (CHO)- oder Hepatoma (HUH7) -Zellen wurden pro Vertiefung einer Sechslöchplatte ausplattiert und entweder mit Zellkulturmedium, welches 10% Foetales Kälberserum (FCS) enthielt, oder mit

Zellkulturmedium, dem anstelle von FCS 10% Lipoprotein-depletieretes Serum (LPDS) zugegeben wurden, für 24 Stunden inkubiert. Hinsichtlich des Wachstumsverhaltens und der Morphologie zeigten die mit LPDS inkubierten Zellen keine Auffälligkeiten gegenüber den mit FCS inkubierten Zellen. Nach 24 Stunden Präinkubation wurde dann die Aufnahme von ^{125}I -LDL bestimmt, wie unter Methoden beschrieben. Wie die Abbildung 4 zeigt, liegt die LDL-Aufnahmerate der HUH7-Zellen unabhängig vom verwendeten Serum 3-4 mal höher als die LDL-Aufnahme der CHO-Zellen. Durch Präinkubation mit LPDS wurde die Aufnahme von ^{125}I -LDL bei beiden Zelltypen deutlich stimuliert. So zeigte sich für die CHO-Zellen eine Stimulation von ca. 80% gegenüber nur ca. 25% für die HUH7-Zellen.

Überexpression von Rab5 und Annexin6 durch transiente Transfektion von CHO-Zellen

Um die Auswirkung einer Überexpression von Rab5 und AnnexinVI auf die Aufnahme von LDL zu studieren, wurden CHO-Zellen mittels liposomalen Partikeln mit den entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert. Zur Kontrolle der Transfektionen wurden von den transfizierten Zellen Zellextrakte hergestellt. Im Western-Blot wurde kontrolliert, ob nach der Transfektion die jeweiligen Genprodukte von den Zellen exprimiert wurden.

Bei der Klonierung des Expressionsvektors hum rab5 myc pFROG wurde hinter der für das humane Rab5-Protein kodierenden Sequenz am N-Terminus ein sogenannter „myc-tag“ eingefügt. Das Genprodukt dieses Vektors ist somit ein Fusionsprotein aus dem humanen Rab5 und dem myc-Protein. Das myc-Protein stellt somit ein kurzes, an das Rab5-Protein angehängtes Polypeptid dar, welches nach bisherigen Erkenntnissen die Funktion des Rab-Proteins nicht beeinträchtigt (Stenmark et al., 1994). Der Vorteil des „myc-tags“ liegt in einer besseren Nachweisbarkeit durch hochspezifische, gegen das „myc-tag“ gerichtete Antikörper.

Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse eines Western-Blots der mit Rab5 transfizierten CHO-Zellen.

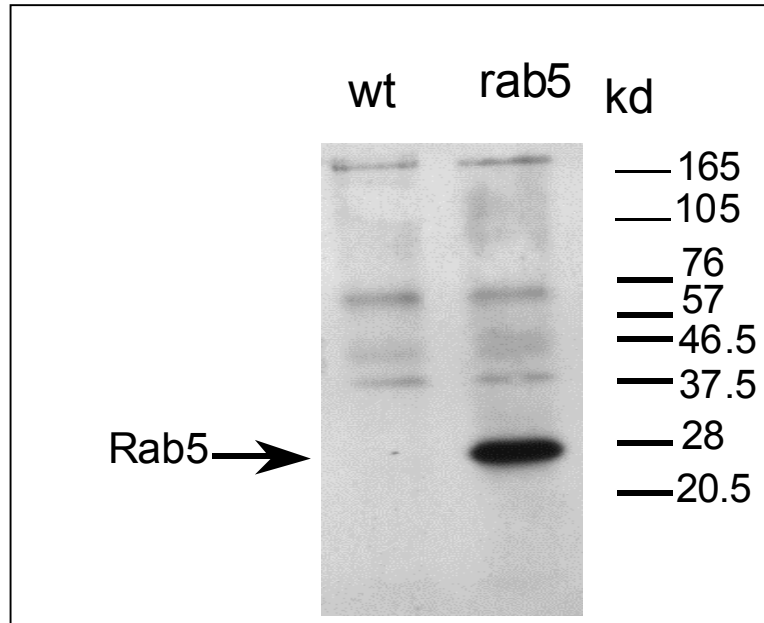


Abbildung 5: Immuno-Blot Analyse von untransfizierten (wt) und mit hum rab5 myc pFROG transfizierten CHO-Zellen (rab5). Primärantikörper: anti-myc (Maus, monoklonal) Verdünnung 1:1000. Größenangabe in kDa.

Bei den als Wildtyp bezeichneten, untransfizierten Zellen ließ sich weder mit einem Antikörper gegen Rab5 selbst, noch mit einem Anti-myc-Antikörper eine erkennbare Proteinbande detektieren.

Der Zellextrakt der mit hum rab5 myc pFROG transfizierten Zellen, welche 24 Stunden nach Transfektion solubilisiert wurden, zeigte hingegen eine mit dem Anti-myc Antikörper anfärbbare, kräftige Proteinbande im Bereich von 28 kDa, der erwarteten Molekülgröße.

In analoger Weise zu den mit Rab5 transfizierten CHO-Zellen, wurden die mit den verschiedenen AnnexinVI Expressionsvektoren transfizierten CHO-Zellen im Western-Blot untersucht. Ähnlich wie bei hum rab5 myc pFROG, dem Expressionsvektor für Rab5, wurden von Dr. Grewal zwei Expressionsvektoren für AnnexinVI kloniert, welche das AnnexinVI-Gen der Ratte und ein „myc“- bzw. ein „his“-Protein am C-terminalen Ende des AnnexinVI exprimieren (pcDNA anx6 myc; bzw pcDNA anx6 his). Für die Zellkulturexperimente wurde jedoch der

Expressionsvektor pcDNA anx6 verwendet, welcher für Ratten AnnexinVI kodiert, jedoch kein his- oder myc-Protein bildet.

Abbildung 6 zeigt eine Western-Blot Analyse von mit den drei verschiedenen AnnexinVI-Expressionsvektoren transfizierten CHO-Zellen.

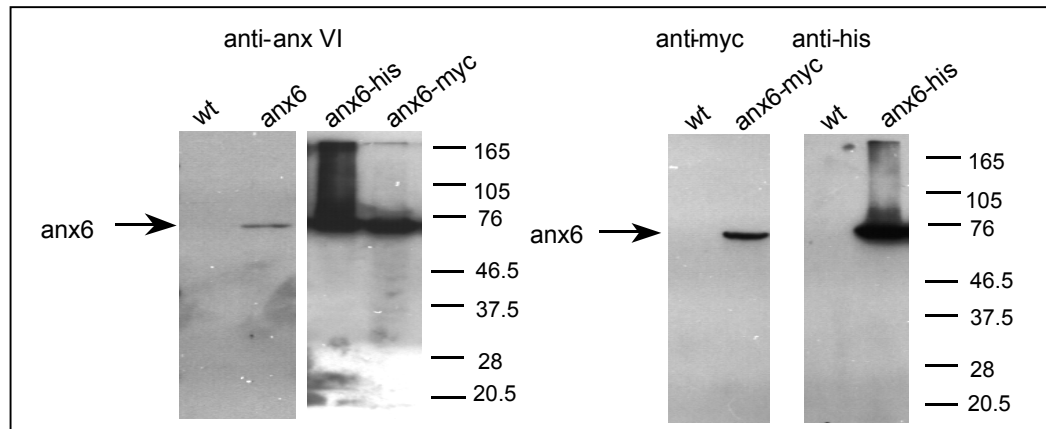


Abbildung 6: Immuno-Blot Analyse von untransfizierten (wt) und mit Annexin VI-Expressionsvektoren (pc DNA anx6; pc DNA anx6 myc; pc DNA anx6 his) transfizierten CHO-Zellen, 24h nach Transfektion. Primärantikörper: Anti-AnnexinVI (Schaf, polyklonal) Verdünnung 1:500 ; Anti-myc (Maus, monoklonal); anti-his (Maus, monoklonal). Verdünnung jeweils 1:1000. Größenangaben in kDa.

Nach Inkubation mit einem gegen AnnexinVI der Ratte gerichteten Antikörper ließ sich bei den untransfizierten CHO-Zellen keine Bande im Bereich von 68kDa erkennen. Möglicherweise ist die endogene Expression von AnnexinVI in den CHO-Zellen zu gering, oder der gegen das AnnexinVI der Ratte gerichtete Antikörper erkennt das von den Zellen gebildete Protein nicht. In den mit den verschiedenen AnnexinVI-Expressionsvektoren transfizierten Zellen findet sich dahingegen eine deutlich sichtbare Bande im Bereich von 68kDa, der erwarteten Molekülgröße. Parallel hierzu ließ sich auch nach Transfektion mit den anx6-his bzw. anx6-myc enthaltenden Plasmiden mit den jeweiligen Antikörpern eine AnnexinVI-Expression nachweisen.

Bestimmung der Transfektionsrate durch Immunfluoreszenz

In Abhängigkeit von verschiedenen Versuchsbedingungen, wie z.B. Verhältnis DNA zu Liposomen, Konfluenzrate der Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion,

verwendeter Zelltyp, ist davon auszugehen, daß jeweils nur eine Minderheit der mit dem Transfektionsreagenz behandelten Zellen tatsächlich transfiziert wird und die entsprechenden Genprodukte exprimiert. Um die tatsächliche Transfektionsrate zu überprüfen, wurden repräsentativ CHO-Zellen, die mit dem Expressionsvektor für AnnexinVI (pcDNAanx6) transfiziert wurden, in der Immunfluoreszenz untersucht. Abb. 7 zeigt die Immunfluoreszenz von transient transfizierten CHO-Zellen 24-Stunden nach Transfektion.

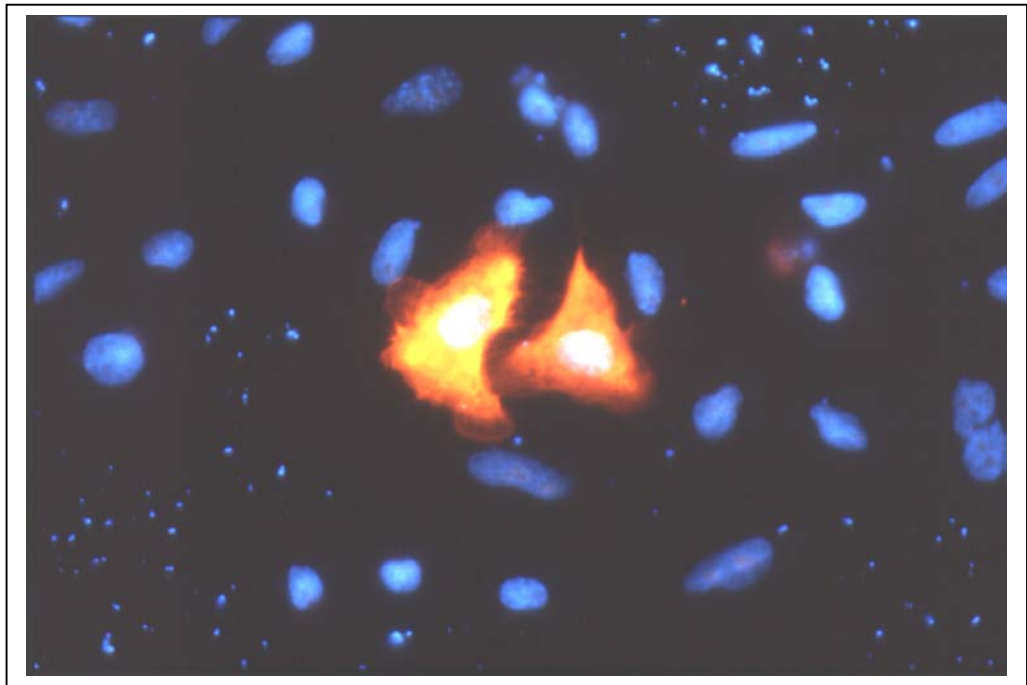


Abbildung7: Immunfluoreszenz von transient mit pcDNAanx6 transfizierten CHO-Zellen 24h nach Transfektion. Primärantikörper: anti-AnnexinVI (Schaf, polyklonal, 1:500), 2. Antikörper: Anti-Schaf F(ab')₂ – Immunglobulin- Fragmente, Cy3-konjugiert (Esel, 1:1000). Kernfärbung mit DAPI.

Die Zellkerne aller Zellen stellten sich durch die Gegenfärbung blau dar, der Antikörper gegen AnnexinVI lieferte ein rötliches Signal im Zytoplasma der tatsächlich transfizierten Zellen. Abbildung 6 stellt eine repräsentative Aufnahme aus einer Serie von mehreren Immunfluoreszenzmarkierungen dar.

Nur bei zwei Zellen innerhalb des Blickfeldes, bzw. der Abbildung fanden sich mit dem Antikörper gegen AnnexinVI eine Anfärbung von Cytoplasma und Plasmamembran, während jedoch auf der Abbildung insgesamt 23 blau gefärbte Zellkerne sichtbar sind. Es konnte somit angenommen werden, daß die

tatsächliche Transfektionsrate der CHO-Zellen nur bei etwa 10% aller Zellen eines Ansatzes liegt.

LDL-Aufnahme in transfizierten CHO- und HUH7-Zellen

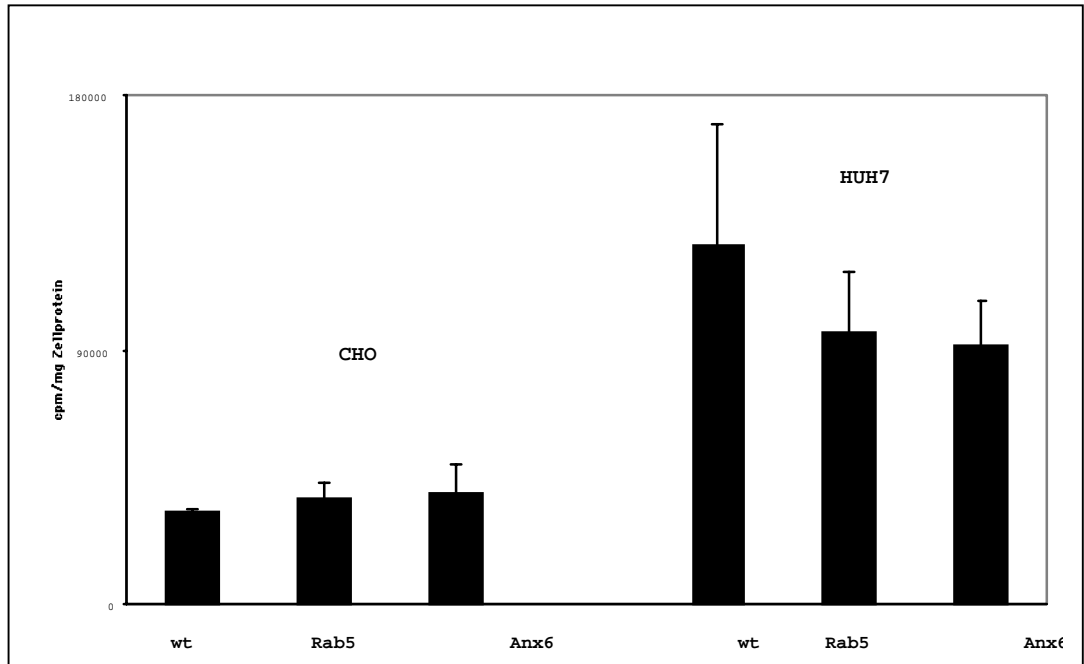


Abbildung 8 : Zellassoziertes ^{125}I – LDL der transfizierten CHO- und HUH7-Zellen nach 60 min. Inkubation. pcDNA = Zellen transfiziert mit dem Vektor pcDNA 3.1 (ohne Insert) als Kontrolle; Rab5 = hum rab5 myc pFROG; anx6 = pcDNA anx6. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von drei Werten eines repräsentativen Experimentes.

Nachdem in den zuvor geschilderten Experimenten gezeigt werden konnte, daß durch Transfektion der kultivierten Zellen eine Überexpression von Rab5 und AnnexinVI erzielt werden konnte, sollte nun die Auswirkung der Transfektionen auf die Aufnahme von radioaktiv markiertem LDL untersucht werden. Zu diesem Zwecke wurden erneut CHO und HUH7 Zellen transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion mit ^{125}I – LDL inkubiert. Abbildung 8 zeigt das zellassozierte ^{125}I – LDL der mit den unterschiedlichen Expressionsvektoren transfizierten Zellen. Als Kontrolle gegenüber den mit Rab5 und Annexin6 transfizierten Zellen dienten jeweils Zellen, welche alleine mit dem Expressionsvektor pcDNA 3.1 ohne „Insert“, das heißt ohne eine in den Vektor inkloniertes DNA-Fragment transfiziert wurden.

Betrachtet man nun das zellassoziierte ^{125}I – LDL der mit Rab5 und AnnexinVI transfizierten CHO-Zellen, so ließ sich nach der Transfektion kein signifikanter Unterschied gegenüber den Kontrollzellen (pcDNA) feststellen. Unabhängig von der Transfektion lag die LDL-Aufnahme der HUH7-Zellen, wie schon zuvor gezeigt, deutlich über der LDL-Aufnahme der CHO-Zellen.

Bei den transfizierten HUH7-Zellen zeigte sich hinsichtlich der LDL-Aufnahme der mit Rab5 und AnnexinVI transfizierten Zellen keine Stimulation gegenüber den Kontrollzellen.

LDL-Aufnahme der CHO-Zellen nach Kotransfektion von AnnexinVI und Rab5 mit dem LDL-Rezeptor

Da eine alleinige Überexpression von Rab5 und AnnexinVI in den zuvor geschilderten Experimenten keinen Effekt auf die Aufnahme von LDL zeigte, wurde in den Folgeexperimenten zu Kotransfektionen mit dem LDL-Rezeptor übergegangen. Die Kotransfektionen wurden ausschließlich in CHO-Zellen durchgeführt.

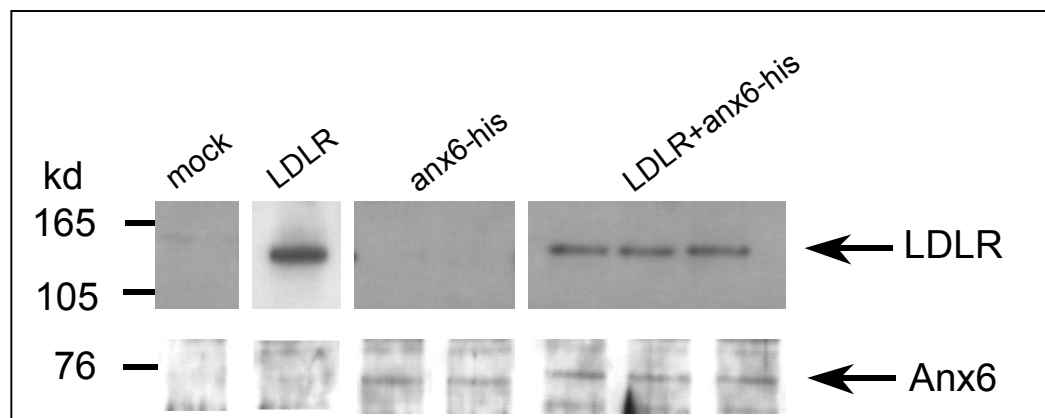


Abbildung 9: Immuno-Blot Analyse von untransfizierten CHO-Zellen (mock), sowie 24h nach Transfektion mit dem LDL-Rezeptor (pCMVhLDLR), AnnexinVI (pcDNAanx6), sowie Kotransfektion mit beiden Plasmiden. Primärantikörper: anti-human LDL-Rezeptor (Kaninchen, 1:1000), anti-his (Maus, 1:1000).

Abbildung 9 zeigt eine Western-Blot Analyse nach Kotransfektion von AnnexinVI mit dem LDL-Rezeptor. Nach der Transfektion mit dem Expressionsvektor pCMVhLDLR konnte mit einem gegen den LDL-Rezeptor gerichteten Antikörper eine deutliche Bande in der Größenordnung von 160 kDa identifiziert werden. Bei den Kontrollzellen fand sich nur ein sehr schwaches Signal im Größenbereich von 160 kDa, was darauf hindeutet, daß die endogene Expression des LDL-Rezeptors in den CHO-Wildtypzellen nur sehr schwach ist.

Zur Kotransfektion mit AnnexinVI wurden bei der Transfektion gleiche Mengen (0,5 µg) der Expressionsvektoren für AnnexinVI und dem LDL-Rezeptor mit der liposomalen Transfektionsreagenz (FUGENE®) eingesetzt. Wie die Abbildung 9 zeigt, fand sich auch nach Verwendung zweier verschiedener Plasmide zur Transfektion eine Überexpression beider Proteine (AnnexinVI und LDL-Rezeptor).

Nach dem Nachweis der Überexpression wurden die kotransfizierten CHO-Zellen hinsichtlich ihrer LDL-Aufnahme untersucht

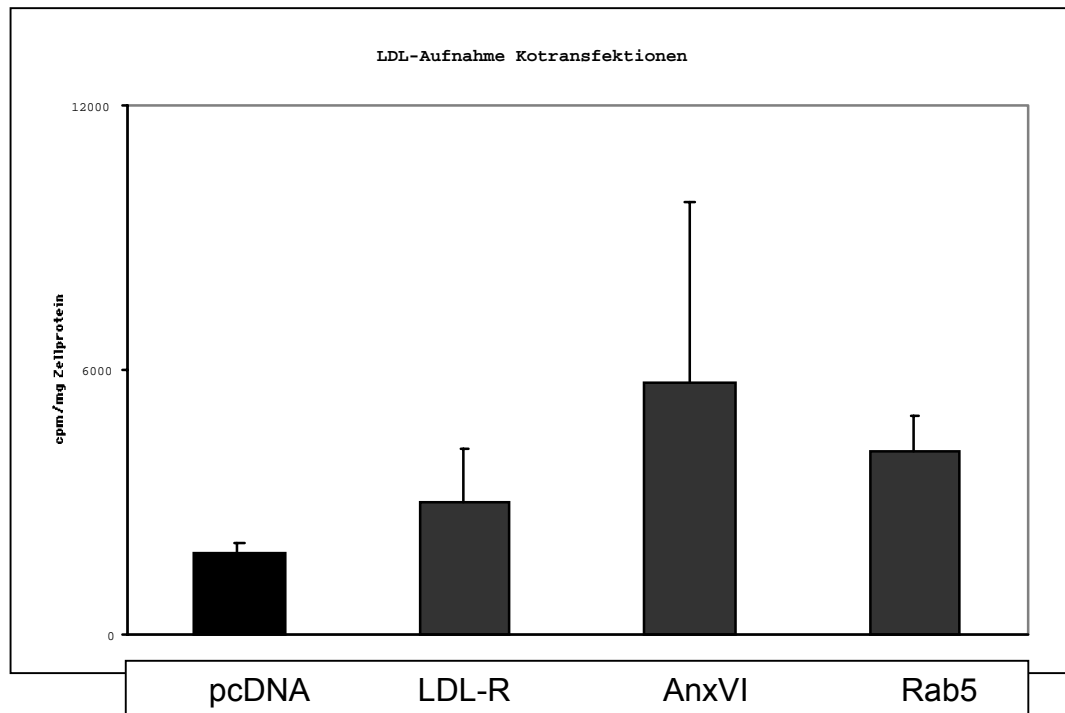


Abbildung 10 : Zellossoziiertes 125 I-LDL der transfizierten CHO-Zellen nach 60min Inkubation bei 37°C. Kontrolle = mit pcDNA 3.1 (Vektor ohne Insert) transfizierte Zellen. Nach Proteinbestimmung wurde auf cpm/ng Zellprotein korrigiert. Gezeigt werden die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten.

PcDNA= Vektor pcDNA 3.1 ohne insert ; LDL-R = Transfektion mit LDL-Rezeptor + β -gal; AnxVI = Annexin VI + LDL-Rezeptor; Rab5 = Rab5 + LDL-Rezeptor

Als Kontrolle dienten erneut Zellen, die mit dem Expressionsvektor pcDNA 3.1 ohne eingefügtes DNA-Fragment transfiziert wurden. Bei den mit dem humanen LDL-Rezeptor transfizierten Zellen wurde wiederum mit einem für β -Galactosidase kodierenden Expressionsvektor (SPORT- β -gal) kotransfiziert, wobei davon ausgegangen wurde, daß β -Galactosidase als „neutrales“ Protein keinen Einfluß auf die Endozytose von Liganden, bzw. die Funktion des LDL-Rezeptors nimmt.

CHO-Zellen, die mit dem humanen LDL-Rezeptor transfiziert wurden, zeigten eine um ca. 65% höhere Aufnahme von ^{125}I – LDL als die Kontrollzellen. Durch die Transfektion mit dem LDL-Rezeptor wurde also hinsichtlich der LDL-Aufnahme ein ähnlicher Effekt erzielt wie durch Präinkubation mit LPDS (Abb. 4). Wurde nun statt β -Galactosidase zusätzlich zum LDL-Rezeptor mit Rab5 transfiziert, zeigte sich eine weitere Stimulation der LDL-Aufnahme von zusätzlichen 30% gegenüber den LDL-Rezeptor+ β -Galactosidase transfizierten Zellen.

Ebenso zeigte die Kotransfektion von AnnexinVI mit dem LDL-Rezeptor einen deutlichen Einfluß auf die Aufnahme von LDL. Hier kam es zu einer Stimulation der LDL-Aufnahme von ca. 90% gegenüber den LDL-Rezeptor+ β -Galactosidase transfizierten Zellen.

Anders als bei der alleinigen Transfektion mit Rab5 und AnnexinVI (Abb.8) zeigte sich also unter den Bedingungen der Kotransfektion mit dem LDL-Rezeptor eine meßbare Stimulation der LDL-Aufnahme durch die Überexpression von Rab5 und AnnexinVI.

Charakterisierung von Rab5 oder AnnexinVI überexprimierenden, stabil transfizierten HUH7-Zelllinien

Um die Funktion von Rab5 und AnnexinVI weiter zu analysieren, wurden mittels Selektionierung über Antibiotika-Resistenz stabil transfizierte Zelllinien isoliert, welche Rab5 (Zellklon 7.10), bzw. AnnexinVI (Zellklon 2.8) überexprimierten.

Die Transfektion des Klones 7.10 erfolgte mit dem Expressionsvektor hum rab5 myc pFROG. Dieses Plasmid enthält neben der Sequenz für Rab5 mit einem

angehängten „myc“-Protein auch ein Neomycin-Resistenzgen, welches die Selektionierung ermöglichte.

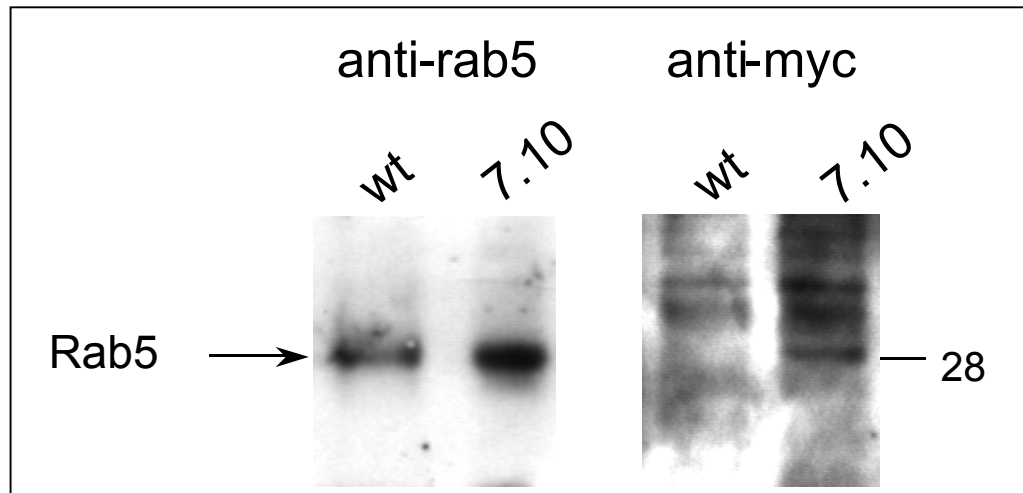


Abbildung 11: Immunoblot-Analyse des Rab5-überexprimierenden Zellklones 7.10. Kontrolle: untransfizierte HUH7-Zellen (wt). Primärantikörper: Anti-myc 1:1000 (Maus, monoklonal). Größenangaben in Kilo-Dalton.

Die Transfektion des Klones 7.10 erfolgte mit dem Expressionsvektor hum rab5 myc pFROG. Dieses Plasmid enthält neben der Sequenz für Rab5 mit einem angehängten „myc“-Protein auch ein Neomycin-Resistenzgen, welches die Selektionierung ermöglichte.

Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse der Western-Blot Analyse des Rab5-überexprimierenden Zellklones 7.10 im Vergleich mit HUH7-Wildtypzellen. Im Gegensatz zur Western-Blot Analyse der CHO-Zellen, ließ sich in den untransfizierten HUH7 Zellen mit dem gegen Rab5 gerichteten Antikörper eine deutliche endogene Expression detektieren, wie die kräftige Bande im Bereich von 28 kDa zeigt. Der stabil mit Rab5 transfizierte Zellklon 7.10, welcher ein Fusionsprotein von Rab5 und einem angehängten myc-Protein exprimiert, zeigt mit dem Anti-Rab5-Antikörper ebenfalls eine deutliche Bande im Bereich von 28 kDa, die noch etwas deutlicher als bei den untransfizierten Kontrollzellen erscheint. Erwartungsgemäß fand sich mit einem gegen das „myc“-Protein gerichteten Antikörper bei den untransfizierten Zellen kein Signal. Das Lysat des Klons 7.10 zeigte dahingegen eine kräftige 28 kDa-Bande, die mit dem Anti-myc-

Antikörper angefärbt werden konnte. Es kann daher gefolgert werden, daß der Klon 7.10 tatsächlich das vom Expressionsvektor hum rab5 myc pFROG kodierte Protein exprimiert.

Die Transfektion des Annexin VI überexprimierenden Klones 2.8 erfolgte mit dem Plasmid pcDNAanx6, welches für das Ratten-Annexin VI kodiert. Auch dieser Expressionsvektor enthält ein Neomycin-Resistenzgen, über welches die Selektionierung der transfizierten Zellen ermöglicht wurde. Da das in den transfizierten Zellen exprimierte Annexin VI kein angehängtes Protein besitzt, welches wie z.B. das myc-Protein beim Klon 7.10 den Antikörper-Nachweis erleichtert, erfolgte die Analyse mit drei verschiedenen Antikörper, die gegen verschiedene Domänen des AnnexinVI-Proteins gerichtet sind.

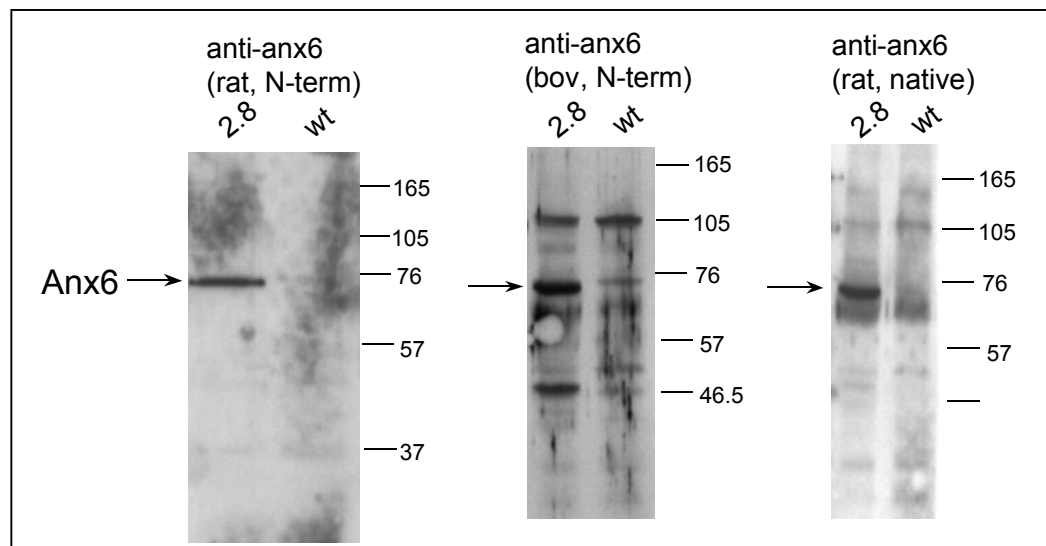


Abbildung 12: Immunoblot-Analyse des AnnexinVI-überexprimierenden Zellklones 2.8. Kontrolle: untransfizierte HUH7-Zellen (wt). Primärantikörper Links: Schaf-anti-Ratten-AnnexinVI (Abimed, Darmstadt; polyklonal), Verdünnung 1:500. Mitte: Kaninchen-anti-Rinder-AnnexinVI (Rind) (Biodesign, polyklonal) 1:1000. Rechts: Kaninchen-anti-Ratten-AnnexinVI (Prof. C. Enrich, Barcelona, polyklonal) 1:1000.

Wie aus Abb. 12 ersichtlich wird, erkannte der gegen die N-terminale Domäne des Rinder-Annexin VI gerichtete Antikörper (mittlerer Streifen) sowohl das in den transfizierten Zellen gebildete Ratten-AnnexinVI, das sich als kräftige 68 kDa Bande darstellt, als auch das endogene, humane AnnexinVI der untransfizierten HUH7-Zellen, wie durch die vergleichsweise schwächere Bande im selben Größenbereich ersichtlich wird.

Mit dem gegen den N-Terminus des Ratten-AnnexinVI (linker Streifen), bzw. dem gegen das gesamte, native Ratten-AnnexinVI gerichteten Antikörper (rechter Streifen) wurde jeweils nur das von den transfizierten Zellen gebildete, rekombinante Protein erkannt, wie sich durch kräftige Banden zeigt.

Immunfluoreszenz des Zellklones 7.10 (Rab5)

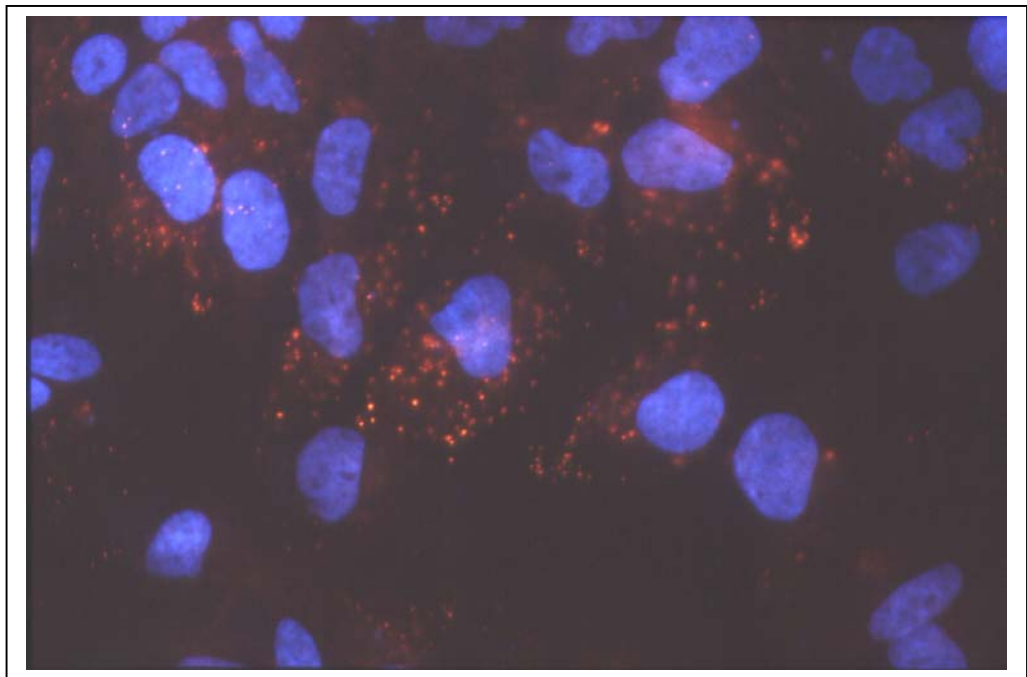


Abbildung 13: Immunfluoreszenz des Zellklons 7.10. 1×10^5 Zellen wurden auf chamber-slides (Nunc) kultiviert. Nach 24h erfolgte die Fixation. Primärantikörper: Maus-anti-myc, monoklonal, Verdünnung 1:1000. Sekundärantikörper: Cy3- konjugierte Esel- anti-Maus F(ab)₂-Fragmente, Verdünnung 1:500.

Neben der Western-Blot Analyse erfolgte der Nachweis der Überexpression auch mittels Immunfluoreszenz. Die Immunfluoreszenz ermöglichte darüberhinaus Aufschlüsse über die intrazelluläre Lokalisation der von den transfizierten Zellen gebildeten Proteine. Ferner konnte so untersucht werden, ob durch die Überexpression von Rab5 oder AnnexinVI morphologische Veränderungen der Zellen auftraten.

Abb. 13 zeigt die Aufnahme einer Immunfluoreszenzmikroskopie des Rab5 überexprimierenden Klonen 7.10 unter Verwendung eines Anti-myc Antikörpers. Mit dem gegen das „myc-tag“ des rekombinanten Rab5-Proteins gerichteten Antikörper zeigte sich in der Immunfluoreszenz eine punktförmige Färbung des Zytoplasmas, bevorzugt in den peripheren Anteilen der Zelle. Plasmamembran und Zellkern wurden nicht angefärbt..

Bezüglich der Morphologie der Zellen fanden sich bei der Immunfluoreszenzmikroskopie des Klonen 7.10 keine lichtmikroskopisch sichtbaren Unterschiede gegenüber HUH7-Wildtypzellen.

Von den Zellen des AnnexinVI-Klonen 2.8 konnte leider keine Immunfluoreszenz durchgeführt werden, da die kultivierten Zellen nach mehreren Wochen in Kultur das Wachstum einstellten und abstarben.

Transferrinaufnahme und Transferrin-Recycling der Klone 2.8 und 7.10

Aus der Literatur ist eine Stimulation der Aufnahme und des Recyclings von Transferrin durch Überexpression von Rab5 bekannt (Stenmark et al. 1994). Die Experimente zur Transferrin-Aufnahme und zum Transferrin-Recycling der stabil transfizierten Klone dienten zur Bestätigung der Literaturangaben, und somit zur Überprüfung des experimentellen Systems. Abbildung 14 zeigt die Transferrinaufnahme der stabil transfizierten HUH7-Zellklone nach 60-minütiger Inkubation mit ^{125}I – Transferrin.

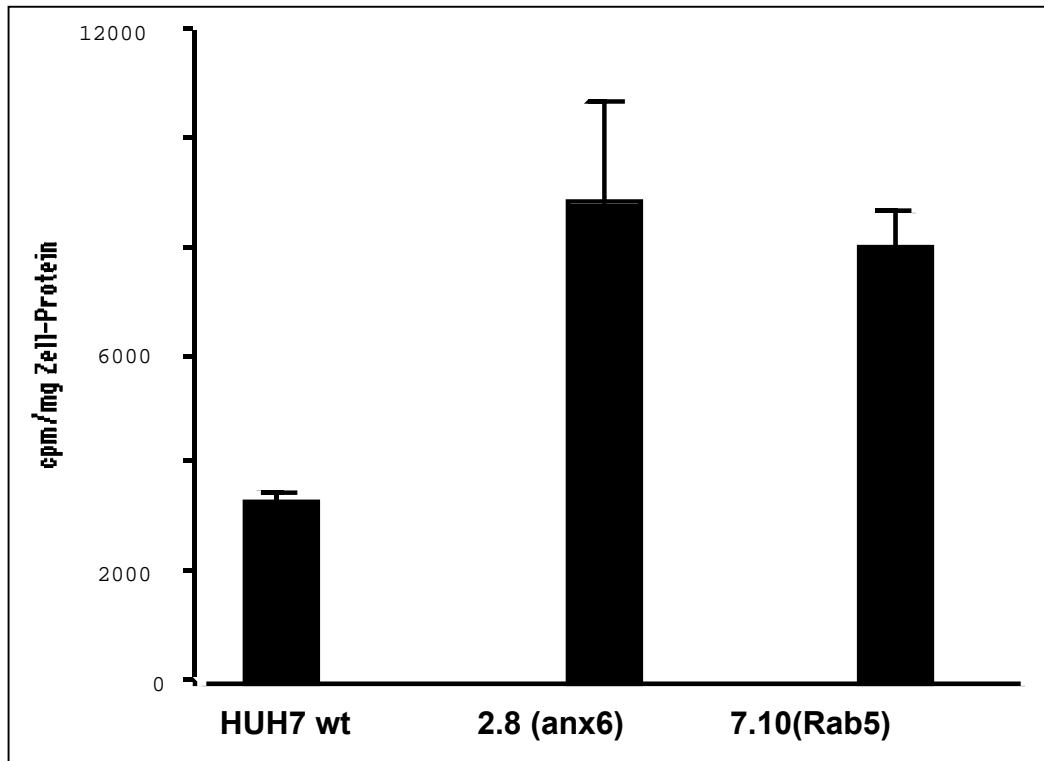


Abbildung 14: Zellossoziiertes ^{125}I nach 60 Minuten Inkubation mit ^{125}I – Transferrin (37°C). Nach Lysierung der Zellen mit 0.1N NaOH wurde die Zellossoziierte Radioaktivität bestimmt und nach Proteinbestimmung in cpm/mg Zellprotein korrigiert. Jede Säule repräsentiert den Mittelwert einer Doppelbestimmung eines repräsentativen Experimentes. Wt = HUH7-Wildtyp; 7.10 = HUH7-Zellen, stabil transfiziert mit hum rab5 myc pFROG; 2.8 = HUH7-Zellen, stabil transfiziert mit pcDNAanx6.

Aus der Literatur ist eine Stimulation der Aufnahme und des Recyclings von Transferrin durch Überexpression von Rab5 bekannt (Stenmark et al. 1994). Die Experimente zur Transferrin-Aufnahme und zum Transferrin-Recycling der stabil transfizierten Klone dienten zur Bestätigung der Literaturangaben, und somit zur Überprüfung des experimentellen Systems. Abbildung 14 zeigt die Transferrinaufnahme der stabil transfizierten HUH7-Zellklone nach 60-minütiger Inkubation mit ^{125}I – Transferrin. Die Transferrinaufnahme des mit Rab5 transfizierten Klones lag im Durchschnitt um ca. 140% höher als die Aufnahmerate von HUH7-Wildtypzellen. Für den mit Annexin VI transfizierten Zellklon 2.8 fand sich gegenüber dem Wildtyp eine um ca. 160% erhöhte Transferrinaufnahme.

Ebenso wie die Aufnahme von ^{125}I – Transferrin wurde auch das Recycling der Liganden in den stabil transfizierten Zellen untersucht.

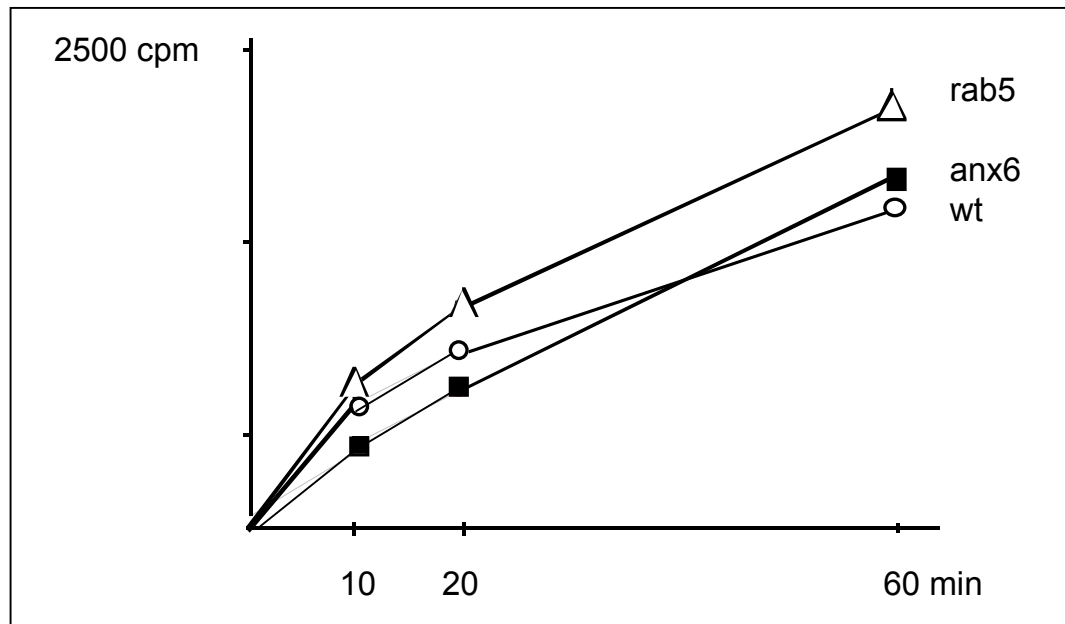


Abbildung 15: Recycling von ^{125}I – Transferrin in stabil transfizierten HUH7-Zellklonen. Nach 60 Minuten Inkubation mit ^{125}I – Transferrin wurde das Medium entfernt und die Zellen bei 4°C dreimal mit eiskaltem PBS-Puffer + 200 I.E. Heparin/ml gewaschen. Anschließend wurden die Zellen erneut bei 37°C mit Ham's F-12 Zellkulturmedium inkubiert und in das Medium freigesetztes ^{125}I – Transferrin wurde zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Wt=untransfizierte HUH7-Zellen, Anx6 = Klon 2.8, Rab5 = Klon 7.10. Gezeigt sind die Mittelwerte von je drei Bestimmungen innerhalb eines repräsentativen Experimentes.

Wie zuvor in der Literatur beschrieben, stimulierte die Überexpression von Rab 5 auch in dem hier verwendeten experimentellem System das Recycling von Transferrin. Nach 60 Minuten fand sich im Medium des Klons 7.10 (Rab5) ca. 20% mehr freigesetztes ^{125}I – Transferrin als im Medium der HUH7-Wildtypzellen. Auch bei den übrigen untersuchten Zeitpunkten lag die Recycling-Rate des Rab5-Klones höher als bei den Wildtypzellen.

Der Effekt einer AnnexinVI-Überexpression auf das Transferrin-Recycling fiel weniger deutlich aus. Zum Zeitpunkt 60 Minuten lag das in das Medium freigesetzte, recycelte ^{125}I – Transferrin des AnnexinVI-Zellklones 2.8 nur etwa 5-10% höher als beim HUH7-Wildtyp. Zum Zeitpunkt 10 Minuten und 20 Minuten

lag das Recycling der Wildtyp-Zellen höher als bei den AnnexinVI-transfizierten Zellen. Somit war keine eindeutige Stimulation des Transferrin-Recyclings durch die Überexpression von AnnexinVI zu beobachten.

¹²⁵I – LDL-Aufnahme und Abbau der stabil transfizierten Zellklone

Nachdem in CHO-Zellen nach Kotransfektion von Rab5 und AnnexinVI mit dem LDL-Rezeptor eine vermehrte LDL-Aufnahme gezeigt werden konnte, sollte vergleichend die LDL-Aufnahme und Degradation in den stabil mit Rab5 und AnnexinVI transfizierten Zelllinien untersucht werden. Anders als bei den Versuchen zur LDL-Aufnahme der CHO-Zellen wurden Inkubationszeiten von 24 Stunden gewählt. Dies geschah, da nach 60 Minuten noch keine nennenswerte Degradation von ¹²⁵I-LDL detektierbar war, so daß eine längere Inkubationsdauer gewählt werden mußte.

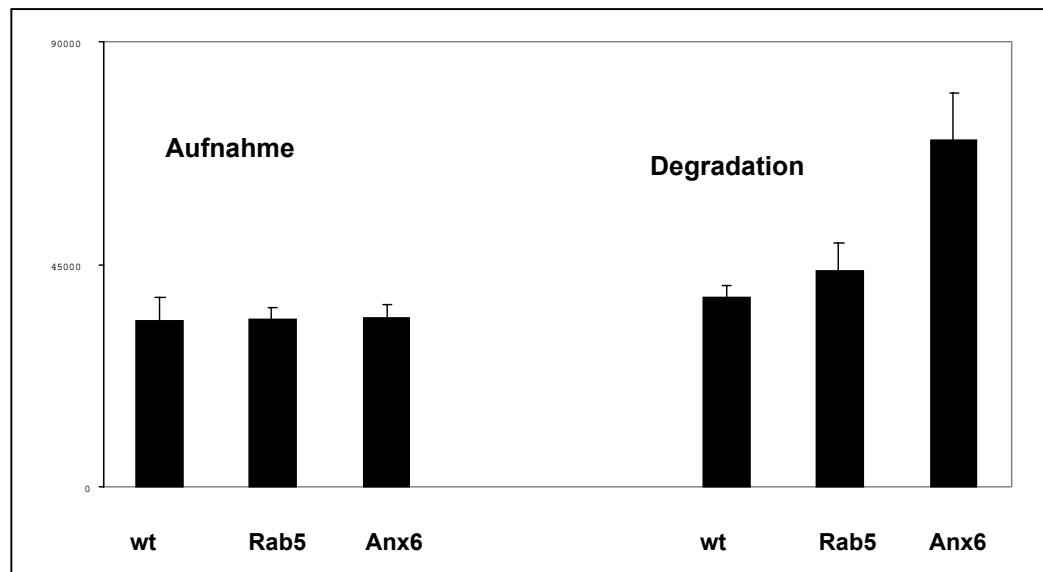


Abbildung 16: ¹²⁵I – LDL-Aufnahme und Abbau der stabil transfizierten Zellklone 7.10 (Rab5) und 2.8 (Anx6) nach 24 Stunden Inkubation. Als Kontrolle dienten untransfizierte HUH7-Zellen (wt). Angaben in cpm/mg Zell-Protein. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von jeweils drei Werten innerhalb eines repräsentativen Experimentes.

Die Abbildung 16 zeigt auf der linken Seite die ¹²⁵I – LDL-Aufnahme nach 24-stündiger Inkubation mit radioaktivem markiertem LDL. Überraschenderweise lag das zellassoziierte ¹²⁵I – LDL des Rab5-Zellklones 7.10 nach 24 Stunden nicht

signifikant höher als die LDL-Aufnahme der HUH7-Wildtypzellen. Anders als bei der Überexpression von Rab5 zusammen mit dem LDL-Rezeptor in CHO-Zellen und 60-minütiger Inkubation (Abb. 10), zeigte sich bei dem stabil mit Rab5 transfizierten Klon keine gesteigerte LDL-Aufnahme nach 24 Stunden.

Ebenso konnte auch für den AnnexinVI-Klon 2.8 nach 24 Stunden kein signifikanter, stimulatorischer Effekt auf die LDL-Aufnahme gezeigt werden. Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, lag das zellassoziierte ^{125}I – LDL der Wildtyp HUH7-Zellen sowie der transfizierten Zellklone in der gleichen Größenordnung.

Ergänzend zur LDL-Aufnahme wurde in den stabil transfizierten Zellen auch der Abbau von ^{125}I – LDL untersucht. Abbildung 16 zeigt auf der rechten Seite die Ergebnisse der ^{125}I – LDL-Degradation aus dem selben Experiment wie die linker Hand gezeigte ^{125}I – LDL-Aufnahme. Zur Bestimmung der Degradation wurde vor Lyse der Zellen und Bestimmung der zellassoziierten Radioaktivität pro Ansatz 100 μl des Inkubationsmedium entnommen und nach Zugabe von Silbernitrat zur Bindung von freiem Jod-125 die mit Trichloressigsäure (TCA) präzipitierbare Radioaktivität bestimmt (siehe Methoden).

Gegenüber den HUH7-Wildtypzellen zeigte der Rab5-Klon 7.10 eine deutlich gesteigerte Degradation von ^{125}I – LDL, die etwa zweimal so hoch wie beim Wildtyp lag. Auch für den AnnexinVI-Klon 2.8. fand sich eine gegenüber den Wildtypzellen um etwa 20% gesteigerte Degradation. Bemerkenswerterweise fand sich also bei beiden Klonen nach 24 Stunden eine gegenüber dem Wildtyp gesteigerte Degradation von ^{125}I -LDL, obwohl hinsichtlich der LDL-Aufnahme keine Stimulation nachgewiesen werden konnte.

Diskussion

Präinkubation mit LPDS stimuliert die ^{125}I -LDL Aufnahme in CHO und HUH7 Zellen

Bevor Experimente mit transfizierten Zellen begonnen wurden, sollten zu Beginn der Arbeit zunächst die zur Verfügung stehenden Zelltypen hinsichtlich der LDL-Aufnahme und endogenen LDL-Rezeptor Aktivität untersucht werden.

CHO-Zellen (Chinese-Hamster-Ovary-Zellen) weisen große Ähnlichkeit mit Fibroblasten auf, in denen viele der klassischen Essays zur Rezeptor-vermittelten Endozytose über den LDL-Rezeptor etabliert worden sind. Dagegen handelt es sich bei den HUH7-Zellen um eine humane Hepatoma-Zelllinie, also um immortalisierte Hepatozyten. Da die Leber der Hauptexpressionsort des LDL-Rezeptors ist, kann eine größere Zahl an LDL-Rezeptoren und eine höhere LDL-Aufnahme als bei den CHO-Zellen erwartet werden. Wie in Abb.4 ersichtlich ist, lag entsprechend den Erwartungen die LDL-Aufnahme der HUH7-Zellen um den Faktor 5 höher als jene der CHO-Zellen.

Im selben Experiment sollte zudem ermittelt werden, inwiefern sich die endogene LDL-Rezeptoraktivität bei den beiden Zelltypen stimulieren läßt. Zu diesem Zwecke wurde die Hälfte der verwendeten Zellen 24 Stunden vor Beginn des Aufnahmeexperimentes mit ^{125}I -LDL mit Lipoprotein-depletiertem Serum (LPDS) inkubiert, wohingegen die andere Hälfte der Zellen mit fetalem Kälberserum (FCS), welches normale Konzentrationen der Serum Lipoproteine enthält, inkubiert wurde.

Durch einen relativen Mangel an intrazellulärem Cholesterin kommt es bei den mit LPDS inkubierten Zellen zu einer kompensatorischen Hochregulation des LDL-Rezeptors. Dieser Effekt wird über Sterol-responsive-elements (SREs) vermittelt (Goldstein and Brown 1990). Durch die höhere Zahl von LDL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche der mit LPDS präinkubierten Zellen ist somit bei diesen Zellen eine höhere Aufnahme des ^{125}I -LDL zu erwarten. Tatsächlich konnte diese Erwartung bestätigt werden, denn es zeigte sich, daß von den mit LPDS praeinkubierten CHO-Zellen etwa 50% mehr ^{125}I -LDL aufgenommen wurde, wohingegen die Stimulation bei den HUH7-Zellen nur ca. 25% betrug.

Dieses Experiment war aus mehreren Gründen eine wichtige Voraussetzung für die Folgeexperimente, in denen der Effekt einer Rab5 bzw. Annexin VI Überexpression studiert werden sollte. Zum einen konnte in diesem ersten Experiment das Funktionieren des Aufnahmeassays erprobt werden, zum Anderen konnte aber auch gezeigt werden, daß die basale ¹²⁵I-LDL Aufnahme in diesem System durch Änderungen der Versuchsbedingungen stimuliert werden kann.

Überexpression von Rab5 und Annexin VI in CHO-Zellen und HUH7-Zellen durch transiente Transfektionen

Der nächste experimentelle Schritt war die Überexpression der in dieser Arbeit untersuchten Proteine Rab5 und Annexin VI mit dem Ziel, die Auswirkungen auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose zu studieren. Für mit Rab5 transfizierte Zellen wurde in der Literatur eine Stimulation der Rezeptor-vermittelten Endozytose und des Recyclings von Transferrin, sowie eine Stimulation der sogenannten fluid-phase Endozytose von Meerrettichperoxidase beschrieben (Bucci et al. 1992, Stenmark et al. 1994). Am Beispiel des LDL und seines Rezeptors sollte nun in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich die für Rab5 und Transferrin publizierten Ergebnisse auch auf ein weiteres Rezeptor-Ligand System übertragen lassen. Darüberhinaus sollte der Effekt einer Annexin VI Überexpression vergleichend zu Rab5 untersucht werden, um Rückschlüsse auf mögliche Funktionen der beiden Proteine auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose zu gewinnen. Die Rezeptor-vermittelte Endozytose des LDL schien hierbei von besonderem Interesse, da der intrazelluläre Transport von Lipoproteinen große physiologische und pathophysiologische Relevanz besitzt. Es wurde zunächst ein relativ einfaches experimentelles Vorgehen gewählt, indem die kultivierten Zellen jeweils transient mit den Rab5- bzw. Annexin VI-Expressionsvektor enthaltenden Liposomen transfiziert wurden. Die Transfektion erfolgte 24 Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen zu einem Zeitpunkt an dem die Zellen etwa zu 70% konfluent auf den Sechs-Schalen-Platten gewachsen waren. Es konnte somit angenommen werden, daß sich noch ausreichend Zellen in Teilung befanden und die Expressionsvektoren bei der

Replikation in ihr Genom integrieren konnten. Der Erfolg der Transfektion wurde zunächst im Western-Blot untersucht.

Hierbei fanden sich sowohl für die Rab5- als auch AnnexinVI transfizierten CHO-Zellen jeweils deutliche Banden der rekombinanten Proteine (Rab5-myc, AnnexinVI-myc, AnnexinVI-his) sowie für das Ratten-Annexin VI. Über das endogene Expressionsniveau von Rab5 kann keine Aussage getroffen werden, da der im gezeigten Western-Blot verwendete, gegen das myc-Protein verwendete Antikörper nur das in den transfizierten Zellen gebildete Fusionsprotein erkennen kann. Mit einem polyklonalen, gegen AnnexinVI gerichteten Antikörper aus dem Schaf, der auch das humane AnnexinVI erkennt (Grewal et al., in the press) ließ sich im Western-Blot kein endogenes AnnexinVI der CHO-Zellen nachweisen. Es kann daher angenommen werden, daß die Konzentration von endogenem AnnexinVI unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

Obwohl im Western-Blot der transfizierten Zellen jeweils deutliche Banden für rekombinantes Rab5 oder AnnexinVI nachweisbar waren, mußte davon ausgegangen werden, daß mittels der liposomalen Transfektion jeweils nur ein geringer Prozentsatz der behandelten Zellen tatsächlich transfiziert wurde. Um dieses zu kontrollieren, wurde eine Immunfluoreszenz von transient mit Rab5 transfizierten CHO-Zellen durchgeführt (Abb.7). Tatsächlich zeigte sich lediglich eine Transfektionsrate von ca. 10%. Ob also dieser Prozentsatz an Rab5 oder AnnexinVI überexprimierenden Zellen ausreichen würde, um im Aufnahmeassay funktionelle Effekte zu sehen, blieb abzuwarten.

Ein weiteres Problem des experimentellen Ansatzes lag in den unterschiedlichen Eigenschaften der von den transfizierten Zellen gebildeten Proteine. So handelt es sich beim Genprodukt von pcDNAanx6 um das AnnexinVI-Protein der Ratte, welches allerdings eine hohe Homologie zum humanen AnnexinVI aufweist (Morgan et al. 1997). Der Expressionsvektor hum rab5 myc pFROG wiederum enthält die Gensequenz des humanen Rab5-Proteins, die transfizierten Zellen exprimieren jedoch ein Fusionsprotein von Rab5 und einem myc-Protein, so daß auch hier hinterfragt werden muß, ob die Funktion dieses rekombinanten Proteins mit dem endogenen Rab5 gleichzusetzen ist.

Alleinige Überexpression von Rab5 oder AnnexinVI in CHO- oder HUH7-Zellen zeigt keinen Effekt auf die ¹²⁵I-LDL Aufnahme

Als erstes funktionelles Experiment wurden die die ¹²⁵I-LDL Aufnahme der transient mit Rab5 oder Annexin VI transfizierten CHO- und HUH7-Zellen im Vergleich mit Wildtypzellen bestimmt. Eine Stimulation der LDL-Aufnahme konnte in den transfizierten Zellen nicht beobachtet werden. Im Gegenteil, während bei den CHO-Zellen die LDL-Aufnahme zwischen den Kontrollzellen und den transfizierten Zellen kaum Unterschiede aufwies, lag die LDL-Aufnahme der HUH7-Wildtypzellen höher als bei den transfizierten HUH7-Zellen.

Nach den aus der Literatur bekannten Daten lag der erwartete Effekt einer Rab5 Überexpression in einer Stimulation der Rezeptor vermittelten Endozytose. Es mußte daher analysiert werden, weshalb es in dem geschilderten Experiment nicht gelang, die Aufnahme von LDL in die transfizierten Zellen zu stimulieren. Möglicherweise war die Transfektionseffizienz zu gering um einen entsprechenden Effekt im Experiment zu beobachten. Eine zusätzliche Möglichkeit bestand in einer zu niedrigen endogenen Expression des LDL-Rezeptors in den CHO-Zellen, so daß die LDL-Aufnahme bei im Überschuß vorhandenem LDL bereits gesättigt war und durch die Transfektion nicht weiter stimuliert werden konnte.

Überexpression des LDL-Rezeptors in CHO-Zellen bewirkt eine Stimulation der LDL-Aufnahme

Es wurde daher ein neuer experimenteller Ansatz gewählt, indem zunächst durch Überexpression des LDL-Rezeptors versucht wurde, die Aufnahme des LDL in die CHO-Zellen zu steigern. Somit sollte auch überprüft werden, ob das System der transienten Transfektionen überhaupt funktionierte, bzw. ob im gewählten System die Endozytose des LDL durch Transfektionen beeinflußt werden konnte. Wie die Western-Blot Analyse der verwendeten Zellen zeigt (Abb.9), ließ sich in den untransfizierten Zellen nur eine schwache Bande für den endogenen LDL-Rezeptor detektieren. Nach Transfektion mit dem Vektor pCMVhLDLR, der für

den humanen LDL-Rezeptor codiert, fand sich dagegen eine wesentlich kräftigere Bande im Bereich von 160 kDa.

Tatsächlich lag die ^{125}I -LDL Aufnahme der LDL-Rezeptor transfizierten Zellen nach 30 Minuten um etwa das Doppelte über den untransfizierten Zellen. Somit wurde durch die Transfektion quantitativ eine ähnliche Steigerung erzielt wie durch Präinkubation mit LPDS. Diese erfolgreiche Stimulation zeigte, daß das System der Transfektionen trotz einer niedrigen Transfektionseffizienz funktionierte. Wieso eine Überexpression von Rab5 nicht in der erwarteten Stimulation der Endozytose resultierte, blieb jedoch weiter unklar.

Kotransfektion von Rab5 und dem LDL-Rezeptor in CHO-Zellen bewirkt eine zusätzliche Stimulation der LDL-Aufnahme

In den folgenden Experimenten wurde daher zu Kotransfektionen von Rab5 und dem LDL-Rezeptor übergegangen.

Auch in den bereits zitierten Arbeiten von Bucci und Stenmark (Bucci et al. 1992; Stenmark et al. 1994) ,die erstmalig eine Rab5 vermittelte Stimulation der Endozytose beschrieben, wurden Kotransfektionen von Rab5 und dem Transferrin-Rezeptor durchgeführt. Da nicht sicher war, ob sich die kotransfizierten Plasmide gegenseitig in ihrer Transfektion beeinflussen können, wurden erneut Western-Blot Analysen durchgeführt. Abbildung 9 zeigt repräsentativ hierfür einen Western-Blot von AnnexinVI- und LDL-Rezeptor-kotransfizierten Zellen. Auch unter den Bedingungen der Kotransfektion konnten beide Proteine im Western-Blot detektiert werden, während bei den Kontrollen jeweils keine oder nur sehr schwache Banden für den LDL-Rezeptor und AnnexinVI sichtbar waren. Um bei den Kotransfektionen ein jeweils gleiches Verhältnis zwischen DNA und Liposomen zu erzielen, wurde bei den als Vergleich in den Aufnahmeassays benötigten, LDL-Rezeptor-transfizierten Zellen als zweite DNA eine gleiche Menge eines für β -Galactosidase kodierenden Vektors (pCMVSPORT β -gal) hinzugefügt. Es wurde davon ausgegangen, daß das Genprodukt β -Galactosidase als „neutrales“, also nicht in die Endozytose oder den LDL-Metabolismus involviertes Protein, keinen Einfluß auf die Funktion von Rab5 oder Annexin VI hat.

Erfreulicherweise konnte unter den so gewählten Versuchsbedingungen die in der Literatur beschriebene Stimulation der Rezeptor vermittelten Endozytose auch für die Endozytose von LDL reproduziert werden. Nach 30 Minuten Inkubation lag die LDL-Aufnahme der Rab5/LDL-Rezeptor transfizierten CHO-Zellen um etwa 40% über den LDL-Rezeptor/ β -Gal transfizierten Zellen.

Die Hypothese, daß erst eine ausreichend große Menge an LDL-Rezeptoren auf den CHO-Zellen vorhanden sein muß, damit eine Stimulation der LDL-Aufnahme durch Rab5-Überexpression sichtbar wird, schien somit bestätigt.

Während für Rab5 eine Stimulation der Rezeptor-vermittelten Endozytose aus der Literatur bekannt ist, existieren zur Funktion des Annexin VI bei der Rezeptor vermittelten Endozytose widersprüchliche Daten. Ein Zusammenhang mit der Endozytose scheint jedoch wahrscheinlich. Kamal und Mitarbeiter konnten zeigen, daß für das Abschnüren der Coated-pits und den endosomalen Transport des LDL zu den Lysosomen die Annexin VI-vermittelte Rekrutierung von Spektrin an der Plasmamembran erforderlich ist (Kamal et al. 1998). Smythe und Mitarbeiter sahen demgegenüber in einer Zelllinie ohne endogenes Annexin VI (A 431-Zellen) einen ungehinderten Ablauf der Rezeptor-vermittelten Endozytose (Smythe et al. 1994). Es kann daher zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht sicher festgestellt werden, ob die Funktion des Annexin VI für die Rezeptor vermittelte Endozytose essentiell ist, oder ob beispielsweise in bestimmten Zellen oder Geweben andere Proteine dessen Funktion kompensatorisch übernehmen können (Gerke und Moss 1997). Da sich Annexin VI in endosomalen Kompartimenten und Plasmamembranen von Hepatozyten angereichert findet (Jaeckle et al. 1994; Tagoe et al. 1994), und in der Leber quantitativ gesehen der größte Anteil der Endozytose von LDL stattfindet, könnte eine Regulation der Rezeptor vermittelten Endozytose des LDL durch Annexin VI von physiologischer Bedeutung sein.

Vergleichend mit den Rab5 transfizierten Zellen wurden daher in allen Experimenten AnnexinVI transfizierte Zellen mituntersucht. Wie bereits beschrieben zeigte die alleinige Überexpression von Annexin VI in CHO-Zellen keinen Einfluß auf die LDL-Aufnahme. Bemerkenswerterweise konnte jedoch nach Kotransfektion von Annexin VI mit dem LDL-Rezeptor ein ähnlicher Effekt wie in den Rab5+LDL-Rezeptor transfizierten Zellen festgestellt werden. In den

Aufnahmeexperimenten mit radioaktiv markiertem LDL zeigte sich nach 30 Minuten Inkubation ähnlich wie für Rab5 eine um 40% gesteigerte LDL-Aufnahme der Annexin VI+LDL-R transfizierten CHO-Zellen gegenüber den LDL-R+ β -Gal transfizierten Kontrollzellen. Somit scheint die Überexpression von Annexin VI bei ausreichender Anzahl von LDL-Rezeptoren einen die Endozytose quantitativ regulierenden Einfluß zu haben.

Stabil transfizierte Zellklone

Um die mit den kotransfizierten CHO-Zellen beobachteten Effekte einer Rab5- bzw. Annexin VI-Überexpression eingehender zu analysieren wurden stabil mit Rab5 und AnnexinVI transfizierte Zelllinien hergestellt. Stabil transfiziert bedeutete, daß die Expressionsvektoren in das Genom der Zellen integriert wurden und bei der Zellteilung mit dem übrigen Genom repliziert werden. Da in den Expressionsvektoren hum rab5 pFROG und pcDNA anx6 jeweils ein Neomycin-Resistenzgen enthalten war, konnten die stabil transfizierten Zellen in Neomycin-haltigem Zellkulturmedium selektioniert werden. Nach den verschiedenen Passagen wurden jeweils resistenten Klone isoliert und vermehrt, bis schließlich mehrere Rab5- und AnnexinVI- überexprimierende Zellklone zur Verfügung standen. Unter diesen Zellklonen wiesen der mit 7.10 bezeichnete, Rab5 transfizierte Zellklon, sowie ein als 2.8 bezeichneter, Annexin VI transfizierter Klon gute Wachstumseigenschaften auf, so daß diese beiden Klone für weitere Untersuchungen verwendet wurden.

Zunächst wurden die isolierten Klone im Western-Blot auf die Expression von Rab5 und Annexin VI untersucht.

Mit einem gegen humanes Rab5 gerichteten, monoklonalen Antikörper konnte sowohl in den HUH7-Wildtypzellen als auch im Rab5 transfizierten Klon 7.10 Rab5 detektiert werden. Durch den gegen das Myc-Protein gerichteten Antikörper, welcher nur das rekombinante Protein der transfizierten Zellen erkennt, wurde im Western-Blot des Klons 7.10 eine deutliche Proteinbande in der selben Größenordnung wie das endogene Rab5 markiert. Eine endogene Expression von Annexin VI ließ sich in den HUH7-Wiltypzellen erneut nicht nachweisen, wohingegen beim Klon 2.8 mit drei verschiedenen Antikörpern eine

68 kDa Bande detektiert wurde. Es konnte somit gefolgert werden, daß die stabil transfizierten Klone tatsächlich die entsprechenden Genprodukte exprimieren.

Zusätzlich zu den Western-Blot Analysen wurde mit Zellen des Klons 7.10 (Rab5) eine Immunfluoreszenz durchgeführt. Mit dem gegen das Myc-Protein gerichteten Antikörper färbten sich punktförmige kleine Strukturen in der Peripherie des Zytoplasmas an. Nachdem Rab5 größtenteils in frühen Endosomen lokalisiert ist, konnte angenommen werden, daß es sich bei den winzigen, punktförmigen Strukturen um frühe Endosomen handelt.

Als ein Problem bei der Arbeit mit den stabil transfizierten Zellklonen erwies sich im Nachhinein die begrenzte Lebensdauer der isolierten Klone. Beide Klone stellten nach einer gewissen Anzahl von Passagen das Wachstum ein und starben ab. Vom Annexin-Klon 2.8 konnte aus diesem Grunde keine Immunfluoreszenz mehr durchgeführt werden.

Gesteigerte ¹²⁵I-Transferrinaufnahme in stabil mit Rab5 oder Annexin VI transfizierten HUH7-Zellen

Nachdem durch Rab5-Überexpression in CHO-Zellen eine Stimulation der Endozytose von LDL gezeigt werden konnte, sollten die erzielte Stimulation zur Überprüfung der experimentellen Daten auch am Beispiel eines anderen Rezeptor-Ligand-Systems nachvollzogen werden.

Die Rab5-vermittelte Stimulation der Rezeptor-vermittelten Endozytose wurde in der Literatur zunächst am Beispiel des Transferrins beschrieben (Bucci et al. 1992; Stenmark et al. 1994). Die Autoren konnten zeigen, daß nicht nur die Aufnahme von Transferrin, sondern auch das Recycling von Transferrin und seinem Rezeptor durch Überexpression von Rab5 stimuliert wurde. Die experimentelle Vorgehensweise von Bucci und Stenmark unterscheidet sich in einigen Punkten von den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen. Bucci und Stenmark wählten als experimentelles System eine Rab5-Transfektion von BHK (Baby-Hamster Kidney)- und HeLa-Zellen mittels eines Vaccinia-Virus. Ferner wählten die genannten Autoren für ihre Aufnahmeassays zunächst eine 60-minütige Inkubation mit ¹²⁵I-Transferrin bei 4°C. Bei dieser Inkubation bei 4°C erfolgt zunächst eine Sättigung aller Transferrinrezeptoren an der Zelloberfläche.

Anschließend wurden das Medium mit den radioaktiv-markierten Transferrin entfernt und die auf den Zellen gebundene Radioaktivität bestimmt. Zur Bestimmung der Transferrinaufnahme erfolgte nun eine Inkubation für verschiedene Zeiträume zwischen 30 Sekunden und 60 Minuten. Die zu diesen Zeitpunkten in die Zellen aufgenommene Radioaktivität wurde dann in Prozent der zum Zeitpunkt 0 gebundenen Radioaktivität angegeben. Die von Bucci und Stenmark gewählte Methode zur Bestimmung der Transferrin-Aufnahme und des Recyclings ist wesentlich genauer und erlaubt die Bestimmung einzelner Transferrin-Zyklen. Im Gegensatz dazu erfolgte in den hier vorgestellten Versuchen keine Verbindung bei 4°C, weshalb das aufgenommene bzw. rezyklierte Transferrin auch nicht in Prozent des zum Zeitpunkt 0 Minuten gebundenen Transferrin angegeben werden kann. Es wurde somit in dieser Arbeit, in der die Inkubation mit ¹²⁵I-Transferrin bei 37°C erfolgte und nach 60 Min. die Zellen lysiert wurden, eher ein Summationseffekt bestimmt, so daß die gezeigten Ergebnisse nicht direkt mit den Arbeiten von Bucci und Stenmark vergleichbar sind.

Dennoch konnte die von diesen Autoren erstmalig beschriebene Stimulation der Endozytose und des Recyclings von Transferrin durch Rab5-Überexpression auch in dem hier gewählten experimentellen System mit dem Zellklon 7.10 nachvollzogen werden (Abb.14 und 15). So lag die Transferrinaufnahme des Rab5-Klones 7.10 nach 60-minütiger Inkubation um 140% über den HUH7-Wildtypzellen. Auch hinsichtlich des Transferrin-Recyclings fand sich zu den Zeitpunkten 10, 20 und 60 Minuten eine Stimulation gegenüber dem Wildtyp.

Parallel mit dem Rab5 transfizierten Zellklon 7.10 wurde auch der Annexin VI überexprimierende Zellklon 2.8 auf seine Transferrinaufnahme und das Recycling hin untersucht. Gegenüber den HUH7-Wildtypzellen fand sich nach 60 Minuten eine um ca. 160% gesteigerte Transferrinaufnahme, in einer ähnlichen Größenordnung wie beim Rab5-Klon 7.10. Eine Stimulation des Transferrin-Recyclings konnte dagegen für den AnnexinVI-Klon 2.8 zu den verschiedenen gemessenen Zeitpunkten nicht nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Transferrin-Aufnahme konnte also wie schon bei den Versuchen zur LDL-Aufnahme in Annexin VI + LDL-Rezeptor kotransfizierten CHO-Zellen eine Stimulation der Rezeptor vermittelten Endozytose gezeigt werden. Unklar

bleibt, wieso lediglich die Transferrin-Aufnahme, nicht auch daß Recycling stimuliert werden konnte. Folgt man der Hypothese, daß Annexin VI vor allem an der Abknospung („budding“) der coated pits beteiligt ist, so könnte die vermehrte Aufnahme von Transferrin und LDL Folge eines vermehrten Umsatz der Coated-pits sein. Etwa weil durch vermehrte Abknospung und Bildung von Coated-vesicles vermehrt neue Coated-pits auf der Zelloberfläche gebildet werden, wodurch mehr Liganden gebunden werden können.

Gesteigerter Abbau von ^{125}I -LDL in stabil mit Rab5 oder Annexin VI transfizierten Zellklonen

In weiteren Versuchen sollte geprüft werden, ob die mit den Rab5+LDL-Rezeptor kotransfizierten CHO-Zellen gezeigte Stimulation der LDL-Aufnahme auch in den stabil mit Rab5 transfizierten Zellklonen nachweisbar ist. Darüber hinaus sollte neben dem Effekt der Rab5-Überexpression auf die LDL-Aufnahme auch ein möglicher Effekt auf den Abbau der endozytierten Lipoproteine untersucht werden.

Im Gegensatz zu den Experimenten mit den kotransfizierten CHO-Zellen wurden für die Experimente zur LDL-Aufnahme der HUH7-Klone ein Inkubationszeitraum von 24 Stunden gewählt. Dies geschah, da parallel zur Aufnahme im selben Experiment der Abbau mitbestimmt wurde. Da in vorläufigen Experimenten nach 60 Minuten kein nennenswerter Abbau von ^{125}I -LDL meßbar war, wurden längere Inkubationszeiten gewählt.

Überraschenderweise und im Gegensatz zu den vorher geschilderten Beobachtungen lag nach 24 Stunden Inkubation die LDL-Aufnahme des Rab5 überexprimierenden Klones niedriger als die LDL-Aufnahme der HUH7-Wildtypzellen. Demgegenüber fand sich bei der Bestimmung des Abbaus ein umgekehrtes Verhältnis, denn hier fand sich im Medium des Rab5-Klones etwa doppelt so viel degradiertes Material wie bei den Wildtypzellen.

Gleichzeitig mit dem Klon 7.10 wurde auch die LDL-Aufnahme und Degradation des Annexin VI-Klones 2.8 untersucht. Auch beim Klon 2.8 zeigte sich ein ähnliches Ergebnis: Die LDL-Aufnahme der transfizierten Zellen lag nach 24 Stunden nicht höher als der Wildtyp, die Degradation von LDL war jedoch in den

Annexin VI überexprimierenden Zellen gesteigert, wenngleich jedoch nicht so ausgeprägt wie beim Rab5-Klon.

Nachdem in den kotransfizierten CHO-Zellen nach 60 Minuten eine Stimulation der LDL-Aufnahme durch Überexpression von Rab5 und Annexin VI gesehen wurde und die Transferrinaufnahme der Klone 7.10. und 2.8 gegenüber den HUH7-Wildtypzellen deutlich gesteigert war, stellt sich somit die Frage, warum nach 24 Stunden keine Stimulation der LDL-Aufnahme durch die stabil transfizierten Klone zu beobachten war. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen liegt in der Downregulation der LDL-Rezeptoren in den Rab5/Annexin VI transfizierten Klonen über die Dauer des Experimentes von 24 Stunden. Wie die Versuche mit den CHO-Zellen vermuten lassen, ist die LDL-Aufnahme der transfizierten Zellen in den ersten Stunden der Inkubation möglicherweise deutlich erhöht. Kann nicht das gesamte endozytierte LDL sofort lysosomal degradiert werden, könnte es zu einem Anstieg der intrazellulären Cholesterinkonzentration kommen. Da hohe intrazelluläre Cholesterinkonzentrationen für die Zelle toxisch sind, würde im Gegenzug über die bereits erwähnten Sterol Responsive Elements (SREs) die Expression des LDL-Rezeptors hinabreguliert, wodurch dann weniger LDL aufgenommen würde, als zu Anfang des Experiments beobachtet.

Für die Annahme, daß die mit Rab5 und Annexin VI stabil transfizierten Klone insgesamt über den Zeitraum von 24 Stunden mehr LDL aufgenommen haben, spricht die gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöhte Degradation.

Vergleichende Betrachtung Rab5 und Annexin VI

In den zuvor geschilderten Experimenten konnte für die beiden Proteine Rab5 und Annexin VI unabhängig voneinander ein stimulatorischer Effekt auf die Aufnahme von LDL in transient transfizierten Zellen, sowie in stabil transfizierten Zellen eine gesteigerte Transferrinaufnahme und ein vermehrter Abbau von LDL gezeigt werden. Für beide Proteine ist eine Kollokalisierung in frühen Endosomen von primären Hepatozyten der Rattenleber beschrieben worden (Ortega et al.

1998). Ferner vermutet man für beide Proteine Funktionen bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose verschiedener Liganden (Bucci et al. 1992; Stenmark et al. 1994; Lin et al. 1992; Kamal et al. 1998).

Für Rab5 sind in den vergangenen Jahren mehr als 20 cytosolische Proteine als spezifische Interaktionspartner gefunden worden (Nielsen et al. 1999). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird für Rab5 eine zentrale Funktion für die Steuerung des Membranverkehrs im Kompartiment der frühen Endosomen angenommen. Dieses beinhaltet die Regulation der Fusion von frühen Endosomen, den Export zu den Recycling-Endosomen und die Regulation der Fusion mit den Clathrin-coated-vesicles. Darüberhinaus konnte vor kurzem auch die Regulation der Wanderung von frühen Endosomen entlang der Microtubuli des Skelettsystems in Richtung des perinukleären Kompartimentes als eine weitere Rab5 Funktion demonstriert werden (Nielsen et al. 1999).

Die Erkenntnisse über die Lokalisation und Funktion von Annexin VI sind gegenüber Rab5 vergleichsweise lückenhafter und teilweise kontrovers. Mehrere Arbeiten weisen auf eine Funktion von Annexin VI für das Abschnüren von Clathrin-coated-pits hin (Lin et al. 1992; Turpin et al. 1998; Kamal et al. 1998). Darüberhinaus scheint Annexin VI neben einer Mitwirkung beim Abschnüren der Coated-pits eine wichtige Rolle für die richtige Lokalisation der so entstehenden Endosomen zu haben (Kamal et al. 1998). Da eine Reihe von weiteren Interaktionspartnern beschrieben wurde, deren funktionelle Bedeutung noch unklar ist, können auch für Annexin VI weitere Funktionen bei der Endozytose vermutet werden.

Die beiden in dieser Arbeit untersuchten Proteine Rab5 und Annexin VI besitzen als gemeinsame Eigenschaften demnach die Lokalisation in frühen Endosomen bestimmter Zelltypen sowie eine Beteiligung an der Rezeptor-vermittelten Endozytose. Hinsichtlich ihrer Struktur, Genetik und bisher bekannten Interaktionspartnern sind sie vollkommen unterschiedlich. Die geschilderten Experimente zeigen einen quantitativen Einfluß auf die Endozytose von Transferrin und LDL. Da es sich jedoch lediglich um die Beschreibung von Effekten innerhalb eines experimentellen Systems handelt, können aus den beschriebenen Experimenten keine neuen Rückschlüsse auf die Funktionsweise der beiden Proteine gezogen werden. Es kann also nur darüber spekuliert

werden, wie die geschilderte Stimulation der Endozytose durch Überexpression von Rab5 oder Annexin VI zustande kommt.

Nach den bisherigen Erkenntnissen aus der Literatur könnten die beiden Proteine an Schritten der Endozytose beteiligt sein, die nach ihrer Lokalisation und dem zeitlichen Ablauf dicht aufeinander folgen. Annexin VI wäre demnach an der Abschnürung des Clathrin-coated-pit und der richtigen Lokalisation des entstehenden frühen Endosoms beteiligt, woraufhin Rab5 seine Funktion übernimmt und für die Fusion der entstandenen frühen Endosomen, die Stabilität ihrer Membranen oder auch den Weitertransport Richtung Recycling- oder späte Endosomen sorgt. Bildlich formuliert könnten die beiden Proteine als Eskorte der entsprechenden Organellen somit Hand in Hand arbeiten.

Ebenso wie über den genauen Mechanismus der beobachteten Phänomene, kann auch über die physiologische Relevanz der gezeigten Beobachtungen nur spekuliert werden. Eine gesteigerte Aufnahme und Degradation von LDL durch Überexpression von Rab5 oder AnnexinVI könnte in vivo einen Effekt auf den Lipidstoffwechsel haben. Vielleicht existieren gar Mutationen der beiden Proteine, die in bestimmten Krankheitsbildern, z.B. Fettstoffwechselstörungen, resultieren. Weitere Untersuchungen, insbesondere Tiermodelle, könnten zur Klärung dieser Fragen beitragen.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte vergleichend die Rolle der endosomalen Proteine Rab5 und Annexin VI auf die Aufnahme sowie den Abbau beziehungsweise das Recycling von LDL und Transferrin untersucht werden. Zu diesem Zwecke wurden CHO-Zellen und HUH7-Zellen mit Expressionsvektoren für Rab5 oder AnnexinVI transfiziert. In den transfizierten Zellen konnte mittels Western-Blot und Immunfluoreszenz-Mikroskopie eine Überexpression der jeweiligen Proteine nachgewiesen werden. Nach dem Nachweis der Überexpression erfolgten Experimente zur Aufnahme der radioaktiv-markierten Liganden in die transfizierten Zellen, wobei untransfizierte CHO- bzw. HUH7- Zellen als Kontrollen dienten. In den zunächst durchgeführten Experimenten konnte durch eine alleinige Überexpression von Rab5 oder AnnexinVI in transient transfizierten CHO-Zellen kein Einfluß auf die Aufnahme von LDL gezeigt werden. Wurden die CHO-Zellen jedoch neben Rab5 oder AnnexinVI zusätzlich mit dem LDL-Rezeptor transfiziert, zeigte sich in den kotransfizierten Zellen eine deutliche Steigerung der LDL-Aufnahme. Ferner wurden Versuche mit stabil mit AnnexinVI oder Rab5 transfizierten HUH7-Zellklonen durchgeführt, die mittels Antibiotika-Resistenz wurden. In den stabil transfizierten Zellen konnte eine Stimulation der Aufnahme und des Recyclings von Transferrin nachgewiesen werden, womit aus der Literatur bekannte Ergebnisse bestätigt wurden. Der intrazelluläre Abbau von radioaktiv markiertem LDL fand sich in den Rab5- bzw. AnnexinVI-Zellklonen gegenüber HUH7-Wildtypzellen ebenfalls gesteigert. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse weisen somit auf eine physiologische Bedeutung von Rab5 und AnnexinVI für die Aufnahme und den intrazellulären Transport von LDL-Cholesterin in eukaryoten Zellen hin.

Literaturverzeichnis:

Ahle, S., A. Mann, U. Eichelsbacher and E. Ungewickell. Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane. *EMBO J.*7: 919-929, 1988.

Anderson,R.G.W., M.S. Brown und J.L. Goldstein. Role of the coated endocytotic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* 10: 351-364, 1977

Anderson,R.G.W., M.S. Brown, U. Beisiegel und J.L. Goldstein. Surface distribution and recycling of the low density lipoprotein receptor is visualized with antireceptor antibodies. *J Cell Biol* 93: 525-531, 1982

Aniento, F., F. Gu, R.G. Parton and j. Gruenberg. An endosomal β -COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes. *J. Cell. Biol.*133: 29-41, 1996.

Beck, K.A., W.J. Nelson. The spectrin-based membrane skeleton as a membrane protein-sorting machine. *Am J Physiol.* 270: C 1263-1270, 1996.

Beisiegel, U., W.Weber, G. Ihrke, J. Herz and K.K. Stanley. The LDL-receptor-related protein (LRP) is an apolipoprotein E binding protein. *Nature* 341: 162-164, 1989.

Beisiegel, U., W. Weber and G. Bengtsson-Olivecrona. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low-density lipoprotein receptor-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* : 88, 8342-8346, 1991.

Brown, M.S. and J.L. Goldstein. Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man. *Science*185: 61-63, 1974.

Brown, M.S. and J.L. Goldstein. Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implication for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.*52: 223-261, 1983.

Brown, M.S. and J.L. Goldstein. A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*232: 34-47, 1986.

Brodsky, F.M. Living with Clathrin. Ist role in intracellular membrane traffic. *Science*242: 1396-1402, 1988

Bucci, C., R.G. Parton , I.H. Mather, H. Stunnenberg, K.Simmons, B. Hoflack and M. Zerial. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70: 715-728, 1992.

Byers, T.J., D. Branton. Visualization of the protein associations in the erythrocyte membrane skeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* 18: 6153-6157, 1985.

Chavrier, P., R.G. Parton, H.P. Hauri, K. Simons, and M. Zerial. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 62: 317-329, 1990.

Chen, W.J., J.L. Goldstein and M.S. Brown. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated-pit mediated internalisation of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* 265: 31116-31123, 1990.

Choi, S.Y. and A.D. Cooper. A comparison of the roles of the low density lipoprotein receptor and the LDL-Receptor related protein/ α 2-macroglobulin receptor in chylomicron remnant removal in the mouse in vivo. *J Biol Chem.* 268: 15804-15811, 1993.

Clark, D.M., S.E. Moss, N.A. Wright, M.J. Crumpton. Expression of annexin VI (p68, 67 kDa-callectrin) in normal human tissues: evidence for developmental regulation in B- and T-lymphocytes. *Histochemistry* 96: 405-412, 1991.

Crompton, M.R., S.E. Moss, M.J. Crumpton. Diversity in the lipocortin/ calpactin family. *Cell* 55: 1-3, 1988.

Cummings, R.D., S. Kornfeld, W.J. Schneider, K.K. Hobgood, H. Tolleshaug, M.S. Brown and J.L. Goldstein. Biosynthesis of the N- and O- linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 258: 15261-15273, 1983.

Dautry-Varsat, A., A. Chiechanover and H.F. Lodish. Uptake and the recycling of transferrin during receptor mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2258-2262, 1983.

Davis, C.G., J.L. Goldstein, R.G.W. Anderson, T.C. Sudhoff, D.W. Russell and M.S. Brown. Acid-dependant ligand dissociation and recycling of LDL-receptor mediated by growth-factor homology region. *Nature* 326: 760-756, 1987.

Davis, C.G., M.A. Lehmann, D.W. Russell, R.G. Anderson, M.S. Brown, J.L. Goldstein. The J.D. mutation in familial hypercholesterolemia: amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL-receptors. *Cell* 45: 15-24, 1986.

Dawson, P.A., S.L. Hofmann, D.R. van der Westhuyzen, T.C. Suedhof, M.S. Brown and J.L. Goldstein. Sterol-dependent depression of low density lipoprotein receptor promoter mediated by 16-base pair sequence adjacent to binding site for transcriptional factor Sp1. *J Biol. Chem.* 263: 3372-3379, 1988.

De Duve, C. (1966) Lysosomes. In: *Ciba Foundation Symposium*, edited by A.V.S. de Reuck and M.P. Cameron. Churchill, London. p. 411-412.

Desjardins, M., J.E. Celis, G. van Meer, H. Dieplinger, A. Jahraus, G. Griffiths, L.A. Huber. Molecular characterization of phagosomes. *J Biol. Chem.* 269: 32194-32200, 1994.

Di Paola, M., F.R. Maxfield. Conformational changes in the receptors for epidermal growth factor and asialoglycoproteins induced by the mildly acidic pH found in endocytic vesicles. *J. Biol Chem* 259: 9163-9171, 1984.

Dirac-Svejstrup, A.B., T. Sumizawa, S.R. Pfeffer. Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal rab GTPases from Rab-GDI. *EMBO J.* 16: 465-472, 1997.

Dunn, W.A., T.P. Connolly, A.L. Hubbard. Receptor mediated endocytosis of epidermal growth factor by rat hepatocytes: receptor pathway. *J Cell Biol* 102: 24-36, 1986.

Dunn, K.W., T.E. Mc Graw, and F.R. Maxfield. Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. *J. Cell Biol.* 109: 3303-3314, 1989.

Dunn, W.A. and A.L. Hubbard. Receptor mediated endocytosis of epidermal growth factor by hepatocytes in the perfused rat liver: ligand and receptor dynamics. *J. Cell Biol.* 98: 2148-2159, 1984.

Dunn, K.W., and F.R. Maxfield. Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes by maturation of sorting endosomes. *J Cell Biol.* 117: 301-310, 1992.

Dunn, K.W., T.E. Mc Graw, and F.R. Maxfield. Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. *J. Cell Biol.* 109: 3303-3314, 1989.

Eisenberg, S., E. Sehayek, T. Olivecrona and I. Vlodavsky. Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. *J. Clin. Invest.* 90: 2013-2021, 1992.

Esser, V., L.E. Limbird, M.S. Brown, J.L. Goldstein, D.W. Russell. Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 263: 13282-13290, 1988.

Futter, C.E., S. Felder, J. Schlessinger, A. Ullrich and C.R. Hopkins. Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor. *J. Cell Biol.* 120: 77-83, 1993.

Gafvels, M.E., L.G. Paavola, C.O. Boyd, P.M. Nolan, F. Wittmaack, A. Chawla, M.A. Lazar, M. Bucan, B.O. Angelin and J.F. Strauss. Cloning of a complementary deoxyribonucleic acid encoding the murine homologue of the very low density lipoprotein/ apoproteinE receptor: expression pattern and assignment of the gene to mouse chromosome 19 (published erratum

appears in *Endocrinology* 1995 Feb: 136(2): 795). *Endocrinology* 135: 387-394. (1993)

Gallwitz, D., C. Donath, and C. Sander. A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-has/bas protooncogene product. *Nature* 306: 704-707, 1983.

Gerke, V., and S.E. Moss. Annexins and membrane dynamics. *Biochem. Biophys. Acta* 1357: 129-154, 1997.

Geuze, H.J., J.W. Slot, G.J.A.M. Strous, H.F. Lodish, and A.L. Schwartz. Intracellular site of asialoglycoprotein receptor ligand uncoupling: double immunoelectron microscopy during receptor mediated endocytosis. *Cell* 32: 277-287, 1983.

Geuze, H.J., J.W. Slot, A.L. Schwartz. Membranes of sorting organelles display lateral heterogeneity in receptor distribution. *J Cell Biol* 104: 1715-1723, 1987.

Ghosh, R.N., D.L. Gelman, and F.R. Maxfield. Quantification of low-density-lipoprotein and transferrin endocytic sorting in Hep2-cells using confocal microscopy. *J. Cell Sci.* 107: 2177-2189, 1994.

Goldstein, J.L. and M.S. Brown. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* 249: 5153-5162, 1974.

Goldstein, J.L., Anderson R.G., M.S. Brown. Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 279: 679-685, 1979.

Goldstein, J.L., M.S. Brown, R.G.W. Anderson, D.W. Russell and W.J. Schneider. Receptor mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL-Receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1: 1-39, 1985.

Goldstein, J.L. and M.S. Brown. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343: 425-428, 1990.

Gorvel, J.P., P. Chavrier, M. Zerial, and J. Gruenberg. Rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* 64: 915-925. 1991.

Gotto, A.M.J., H.J. Pownall and R.J. Havel. Introduction to the plasma lipoproteins. *Method. Enzymol.* 128: 3-41, 1986.

Gray, A., T.J. Dull, A. Ullrich. Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128.000-molecular weight protein precursor. *Nature* 303: 722-725, 1983.

- Gruenberg, J., G. Griffiths and K.E. Howell.** Characterization of the early endosome and putative endosomal carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J. Cell Biol.*108: 1301-1316, 1989.
- Gould, G.W., T.J. Jess, G.C. Andrews, J.J. Herbst, R.J. Plevin, E.M. Bibbs.** Evidence for a role of phosphatidylinol 3-kinase in the regulation of glucose transport in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 269: 26622-26625, 1994.
- Harder, T. and V. Gerke.** The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin IIp11(2) complex. *J. Cell Biol.*123: 1119-1132, 1993.
- Harder, T., R. Kellner, R.G. Parton, J. Gruenberg.** Specific release of membrane bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol. *Mol Biol Cell* 8: 533-545, 1997.
- Herbst, J.J., L.K. Opresko, B.J. Walsh, D.A. Lauffenburger and H.S. Wiley.** Regulation of postendocytic trafficking of the epidermal growth factor receptor through endosomal retention. *J. Biol. Chem*269: 12865-12873, 1994.
- Herman, P.K., S.D. Emr.** Characterization of VSP34, a gene required for vacuolar protein sorting and vacuole segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Bio* 10: 6742-6754, 1990.
- Herz, J., U. Hamann, S. Rogne, O. Myklebost, H. Gausepohl and K.K. Stanley.** Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J.* 7: 4119-41127, 1988.
- Herz, J., R.C. Kowal, J.L. Goldstein and M.S. Brown.** Proteolytic processing of the 600kD low density lipoprotein receptor related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. *EMBO J.* 9: 1769-1776, 1990.
- Heuser, J., and L. Evans.** Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts, *J. Cell Biol.* 84: 560-578: 1980.
- Hinshaw, J.E., and S.L. Schmid.** Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* 374: 190-192, 1995.
- Hobbs, H.H., M.S. Brown and J.L. Goldstein.** Molecular genetics of the LDL-receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum. Mut.* 1: 445-466, 1992.
- Holtzman, E.** Lysosomes. New York: Plenum, 1989.
- Hopkins, C.R.** Intracellular routing of transferrin and transferrin receptors in epidermoid carcinoma A 431 cells. *Cell*35: 321-330. 1983.

Hopkins, C.R., A. Gibson, M. Shipman, and K. Miller. Movement of internalized ligand-receptor complexes along a continuous endosomal reticulum. *Nature* 346: 335-339, 1990.

Hopkins, C.R., K. Miller and J.M. Beardmore. Receptor mediated endocytosis of Transferrin and epidermal growth factor receptors: a comparison of constitutive and ligand induced uptake. *J. Cell Sci. Supplement*3, 173-186, 1985.

Horiuchi, H., R. Lippe, H.M., McBride, M. Rubino, P. Woodman, H. Stenmark, V. Rybin, M. Wilm, K. Ashman, M. Mann, and M. Zerial. A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell* 90: 1149-1159, 1997.

Hospattankar, A.V., S.W. Law, K. Lackner and H.B. Brewer. Identification of low density lipoprotein binding domains of human apolipoprotein B-100: a proposed consensus LDL receptor- binding domain of apolipoprotein B. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 139: 1078-1085, 1986.

Hunziker, W., C. Fumey, S. Honing and L.C. Kamel. Trafficking of immunoglobulin receptors in epithelial cells: signals and cellular factors. *Cell Biol. Int.*18: 321-325, 1994.

Iacopetta, B.J., and E.H. Morgan.The kinetics of transferrin endocytosis and iron uptake from transferrin in rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.* 258: 9108-9115, 1983.

Itin, C., F. Kappeler, A.D. Linstedt and H.P. Hauri. A novel endocytosis signal related to the KKXX ER-retrieval signal. *EMBO J.*14: 2250-2256, 1995.

Jaeckle, S., F. Rinninger, J. Greeve, H. Greten and E. Windler. Regulation of the hepatic removal of chylomicron remnants and beta-very low density lipoproteins in the rat. *J. Lipid Res.* 33: 419-429, 1992.

Jaeckle, S., U. Beisiegel, F. Rinninger, F. Buck, A. Grigoleit, A. Block, I. Groger, H. Greten and E. Windler. Annexin VI, a marker protein of hepatocytic endosomes. *J. Biol. Chem.*269: 1026-1032, 1994.

Jensen, P.H., S.K. Moestrup, L. Sottrup-Jensen, C.M. Petersen and J. Gliemann. Receptors for α 2-macroglobulin- and pregnancy zone protein-proteinase complexes in the human placental syncytiotrophoblast. *Placenta* 9: 463-477, 1988.

Jing, S.Q., T. Spencer, K. Miller, C. Hopkins and I.S. Trowbridge. Role of the human transferrin receptor cytoplasmic domain in endocytosis: localization of a specific signal sequence for internalisation. *J. Cell Biol.*110: 283-294, 1990.

- Kamal, A., Y. Ying and R.G.W. Anderson.** Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes. *J. Cell. Biol.*142: 937-947, 1998.
- Kanai, F., Y. Nishioka, H. Hayashi, S. Karnohara, M. Todaka, Y. Ebina.** Direct demonstration of insulin-induced GLUT4 translocation to the surface of intact cells by insertion of a c-myc epitope into an exofacial GLUT4 domain. *J Biol Chem* 268: 14523-14526, 1993.
- Kirchhausen, T.** Coated pits and coated vesicles- sorting it all out. *Curr Opin. Struct. Biol.*3: 182-188, 1993.
- Kornfeld, S.** Structure and function of the mannose-6-phosphat/ insulin-like-growth factorII receptors. *Annu Rev Biochem.* 61: 307-330, 1992.
- Kornfeld, S., and I.Mellman.** The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol.* 5: 483-525, 1989.
- Kowal, R.C., J. Herz, J.L. Goldstein, V. Esser and M.S. Brown.** Low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) mediates uptake of cholesteryl esters derived from apolipoprotein E enriched lipoproteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86; 5810-5814, 1989.
- Kristensen, T., S.K. Moestrup, J. Gliemann, L. Bendtsen, O. Sand and L. Sottrup-Jensen.** Evidence that the newly cloned low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is the α 2-macroglobulin receptor. *Febs. Lett.* 276: 151-155, 1990.
- Kuhn, L.C., A. Mc Clelland, F.H. Ruddle.** Gene transfer, expression and molecular cloning of the human transferrin receptor gene. *Cell* 37: 95-103, 1984.
- Lange, Y. and T.L. Steck.** The role of intracellular cholesterol transport in cholesterol homeostasis. *Trends Cell Biol.*6: 205-208, 1996
- Letourneur, F. and R.D.A. Klausner.** A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell*69: 1143-1157, 1992.
- Li,G.** Evidence for phosphatidylinositol3-kinase as a regulator of endocytosis via activation of Rab5.*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 10202-10211, 1995.
- Liemann, S., V. Gerke.** Three dimensional structure of annexins. *Cell Mol Life Sci* 53: 516-521, 1997.
- Lin, H.C., T.C. Suedhoff and R.G.W. Anderson.** Annexin VI is required for budding of clathrin coated pits. *Cell* 70: 283-291, 1992.

- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L.Farr and R.J. Randall.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*193: 165-175, 1951.
- Lundgren, S., T. Carling, G. Hjaelm, C. Juhlin, J. Rastad, U. Pihlgren, L. Rask, G. Akerstroem and P. Hellman.** Tissue distribution of gp330 /megalin, a putative Ca(2+)-sensing protein. *J. Histochem. Cytochem.*45: 383-392, 1997.
- Marsh, M., G. Griffiths, G.E. Dean, I. Mellman and A. Helenius.** Three dimensional structure of endosomes in BHK-21 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2899-2903, 1986.
- Maxfield, F.R.** Measurements of vacuolar pH and cytoplasmic calcium in living cells using fluorescence microscopy. *Methods Enzymol.*173: 745-770, 1989.
- Maxfield, F.R., Yamashiro, D.J.** Endosome acidification and the pathway of receptor mediated endocytosis. *Adv Exp Med Biol* 225: 189-198, 1987.
- Mayor, S., J.F. Presley, and F.R. Maxfield.** Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *J. Cell Biol.* 121: 1257-1269, 1993.
- Mc Farlane, A.S.** Efficient trace labelling of proteins with iodine. *Nature* 57, 1958.
- Mc Graw, T.E. and F.R. Maxfield.** Human transferrin receptor internalization is partially dependant upon an aromatic amino acid on the cytoplasmic domain. *Cell. Regul.*1: 369-377, 1990.
- Moestrup, S.K., J. Gliemann, G. Pallesen.** Distribution of the alpha2-macroglobulin receptor/ low density lipoprotein receptor related protein in human tissues. *Cell Tissue Res* 269: 375-382, 1992.
- Morgan, R.O., and M. Fernandez.**Annexin gene structures and molecular evolutionary genetics.*Cell. Mol. Life Sci.* 53: 508-515, 1997.
- Morris, S.A., S. Ahle, E. Ungewickell.** Clathrin-coated vesicles. *Curr Opin Cell Biol* 4: 684-690, 1989.
- Mostov, K.E.** Transepithelial transport of immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.*12: 63-84, 1994.
- Mukherjee, S., R.N. Ghosh, and F.R. Maxfield.** Endocytosis. *Physiol Rev* 77: 759-803, 1997.
- Nelson ,N.** The vacuolar proton ATP-ase of eucaryotic cells. *Bioessays* 7: 251-254, 1987.

- Nielsen, E., F. Severin, J.M. Backer, A.A. Hyman and M. Zerial.** Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nature Cell Biol.*1: 376-382, 1999.
- Novick, P., and M. Zerial.** The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9:496-504, 1997.
- Octave, J.N., Y.J. Schneider, A.Truat and R.R. Crichton.** Iron uptake and utilization by mammalian cells. I: Cellular uptake of transferrin and iron. *Trends in Biochem. Sci.*8: 217-220, 1983.
- Okada, T., Y. Kawano, T. Sakakibara, O. Hazeki, M. Ui.** Essential role of phosphatidylinol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. *J Biol Chem* 269: 3568-3573, 1994.
- Omary, M.B. and I.S. Trowbridge.** Biosynthesis of the human transferrin receptor in cultured cells. *J. Biol. Chem.*256: 12888-12892, 1981.
- Ortega, D., A. Pol, M. Biermer, S. Jaeckle and C. Enrich.** Annexin VI defines an apical early recycling endocytic compartment in rat liver hepatocytes. *J. Cell Sci.*111: 261-269, 1998.
- Pearse, B.M.** Receptors compete for adaptors found in plasma membrane coated pits. *EMBO J.*7: 3331-3336, 1988.
- Pfeffer, S.R..** Rab GTPases: master regulators of membrane trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.*6: 522-526, 1994.
- Presley, J.F., S. Mayor, K.W. Dunn, L.S. Johnson , T.E. Mc Graw and F.R. Maxfield.** The End2 mutation in CHO cells slows the rate of exit of transferrin receptors from the recycling compartment but bulk membrane recycling is unaffected. *J. Cell Biol.*122: 1231-1241, 1993.
- Rall, S.C., K.H. Weisgraber and R.W. Mahley.** Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 257: 4171-4177, 1982.
- Robinson, M.S.** The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr Opin. Cell Biol.*6: 538-544, 1994.
- Rothman, J.E..** Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*372: 55-63, 1994.
- Roth T.F. and K.R. Porter.** Yolk protein uptake in the oocyte of *Aedes aegyptii* L.J. *Cell Biol.* 20: 313-322, 1964.
- Rothmann, J.E. and S.L. Smid.** Enzymatic recycling of Clathrin from coated vesicles. *Cell* 46:5-9,1986.

- Rothmann, J.E.** Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* ,372: 55-63, 1994.
- Russel, D.W., M.S. Brown and J.L. Goldstein.** Different combinations of cysteine rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins. *J. Biol. Chem.* 264: 21682-21690, 1989.
- Rubinstein, A., J.C. Bibson, J.R.J. Paterniti, G. Kakis, A. Little, H.N. Ginsberg and W.V. Brown.** Effect of heparin-induced lipolysis on the distribution of apolipoprotein E among lipoprotein subclasses. Studies with patients deficient in hepatic triglycerid lipase and lipoprotein lipase. *J. Clin. Invest.* 75: 710-721, 1985.
- Rybin, V., O. Ullrich, M. Rubino, K. Alexandrov, I. Simon, M.C. Seabra, R. Goody, and M. Zerial.** GTPase activity of rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion. *Nature* 383: 266-269, 1996.
- Saito, A., S. Pietromonaco, A.K. Loo and M.G. Farquhar.** Complete cloning and sequencing of gp330/"megalin", a distinctive member of the low-density lipoprotein receptor gene family. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA:* 91: 9725-9729, 1994.
- Salminen, A. and P.J. Novick.** A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell* 49: 527-538, 1987.
- Schmid, S.L., and L.L. Carter.** ATP is required for receptor mediated endocytosis in intact cells. *J. Cell Biol.* 111: 2307-2318, 1990.
- Schneider, W.J., U. Beisiegel, J.L. Goldstein and M.S. Brown.** Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164.000 molecular weight. *J. Biol. Chem.* 257: 2664-2673, 1982.
- Schu, P.V.K., K. Takegawa, M.J. Fry, J.H. Stack, M.D. Waterfield, and S.D. EMR.** Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* 260: 88-91, 1993.
- Shafi, S., S.E. Brady, A. Bensadoun and R.J. Havel.** Role of hepatic lipase in the uptake and processing of chylomicron remnants in the liver. *J. Lipid Res.* 35: 709-720, 1994.
- Shen, F, Seabra M.C.** Mechanisms of digeranylgeranylation of Rab proteins. *J. Biol. Chem.* 271: 3692-3698, 1996.
- Simonsen, A., R. Lippe, S. Christoforidis, J.M. Gaullier, A. Brech, J. Callaghan, B.H. Toh, C. Murphy, M. Zerial, and H. Stenmark.** EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* 394: 494-498, 1998.

Smythe, E., P.D. Smith, S.M. Jacob, J. Theobald and S.E. Moss. Endocytosis occurs independently of Annexin VI in human A 431 cells. *J. Cell. Biol.* 124: 301-306, 1994.

Soldati, T., A.D. Shapiro, A.B. Dirac-Svejstrup, S.R. Pfeffer. Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange. *Nature* 369: 157-160, 1994.

Stanley, K.K., H.P. Kocher, J.P. Luzio, P. Jackson, J. Tschopp. The sequence and topology of human complement component C9. *EMBO J* 4: 375-382, 1985.

Stenmark, H., R.G. Parton, O. Steele-Mortimre, A. Lutcke, J. Gruenberg and M. Zerial. Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membran fusion in endocytosis. *EMBO J.* 13: 1287-1296, 1994.

Stenmark, H., G. Vitale, O. Ullrich, and M. Zerial. Rabaptin5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell* 83: 423-432, 1995.

Stoorvogel, W., G.J. Strous, H.J. Geuze, V. Oorschot, and A. Schwartz. Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* 65: 417-427, 1991.

Stow J.L. Regulation of vesicular transport by GTP-binding proteins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 4: 421-425, 1995.

Strickland, D.K., J.D. Ashcom, S. Williams, W.H. Burgess, M. Migliorini and W.S. Argraves. Sequence identity between the α 2-macroglobulin receptor and low-density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J. Biol. Chem.* 265: 17401-17404, 1990.

Tabas, I. The stimulation of the cholesterol esterification pathway by atherogenic lipoproteins in macrophages. *Curr. Opin. Lipidol.* 6: 260-268, 1995.

Tagoe, C.E., C.M. Boustead, S.J. Higgins and H.J. Walker. Characterization and immunolocalisation of rat liver annexin VI. *Biochem. Biophys. Acta* 1192: 272-280, 1994.

Takahashi, S., Y. Kawarabayasi, T. Nakai, J. Sakai and T. Yamamoto. Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor like protein with distinct ligand specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9252-9256, 1992.

Takei, K., P.S. McPherson, S.L. Schmid and P. De Camilli. Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP γ S in nerve terminals. *Nature* 374: 186-190, 1995.

Turpin, E., F. Russo-Marie, T. Dubois, C. de Paillerets, A. Alfsen and M. Bomsel. In adrenocortical tissue, annexins ii and VI are attached to clathrin

coated vesicles in a calcium-independent manner. *Biochem. Biophys. Acta* 1402: 115-130, 1998.

Tressler, R.J., T. Yeatman, G.L. Nicolson Extracellular annexin VI expression is associated with divalent cation dependent endothelial cell adhesion of metastatic RAW117 large-cell lymphoma cells. *Exp Cell Res* 215(2): 395-400, 1994.

Tycko B. and F.R. Maxfield. Rapid *acidification* of endocytotic vesicles containing alpha-2-macroglobulin *Cell* 28:643-651, 1982.

Ullrich, O., H. Horiuchi, C. Bucci, M. Zerial. Membrane association of rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature* 368: 157-160, 1994.

Urrutia, R., J.R. Henley , T. Cook and M.A. McNiven. The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*94: 377-384, 1997.

Van der Sluijs, P., M. Hull, P. Webster, P. Male, B.Goud and I. Mellman. The small GTP-binding protein Rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* 70: 729-740, 1992.

Van Deurs, B., P.K. Holm, L. Kayser, K. Sandvig and S.H. Hansen. Multivesicular bodies in Hep-2 cells are maturing endosomes. *Eur. J. Cell Biol.*61: 208-224, 1993.

Vitale, G., V. Rybin, S. Christoforidis, P.Ö. Thornquist, M. McCaffrey, H. Stenmark and M. Zerial. Distinct Rab-binding domains mediate the interaction of Rabaptin5 with GTP-bound Rab4 and Rab5. *EMBO J.* 17: 1941-1951, 1998.

Watanabe, T., M. Inui, B.Y. Chen, M. Iga and K. Sobue. Annexin VI-binding proteins in brain. Interaction of Annexin VI with a membrane skeletal protein, calpectrin (brain spectrin or foldrin). *J. Biol. Chem.*269: 17656-17662, 1994.

Weinman, J.S., J.M. Feinberg, D.P. Rainteau, B.D. Gaspera, S.J. Weinman. Annexins in rat enterocyte and hepatocyte, an immunogold electron-microscope study. *Cell Tissue Res* 278: 389-397, 1994.

Weisgraber, K.H., T.L. Innerarity, K.J. Harder, R.W. Mahley, R.W. Milne, Y.L. Marcel and J.T. Sparrow. The receptor binding domain of human apolipoprotein E. *J. Biol.Chem.*258: 12348-12351, 1983.

Willingham, M.C., I.H. Pastan, G.G. Sahagian, G.W. Jourdian and E.F. Neufeld. Morphologic study of the internalization of a lysozymal enzyme by the mannose-6-phosphate receptor in CHO-cells. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 78: 6967-6971, 1981.

- Willnow, T.E.**.. The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipoprotein metabolism. *J Mol Med* 77: 306-315, 1999.
- Willnow, T., J. Hilpert, S.A. Armstrong, A. Rohlmann, R.E. Hammer, D.K. Burns and J. Herz.** Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 93: 8460-8464, 1996.
- Wolf, B.B., M.B. Lopes, S.R. Vandenberg and S.L. Gonias.** Characterization and immunohistochemical localisation of the human α 2-macroglobulin receptor (low- density lipoprotein receptor- related protein) in human brain. *Am. J. Pathol.* 141: 37-42, 1992.
- Yamamoto, T., A. Hoshino, S. Takahashi, Y. Karawabayasi, H. Iijima and J. Sakai.** The role of the very low density lipoprotein receptor in the metabolism of plasma lipoproteins containing ApoE. *Ann. NY Acad. Sci.* 748: 217-224.
- Yamashiro, D.J. and F.R. Maxfield.** Acidification of morphologically distinct endosomes in mutant and wild-type Chinese hamster ovary cells. *J. Cell Biol.*105: 2713-2721, 1987.
- Yamashiro, D.J., L.A. Borden and F.R. Maxfield.** Kinetics of α 2-macroglobulin endocytosis and degradation in mutant and wild-type Chinese hamster ovary cells. *J. Cell. Physiol.*139: 377-382, 1989.
- Yamashiro, D.J., B. Tycko, S.R. Fluss, and F.R. Maxfield.** Segregation of transferrin to a mildly acidic (ph 6,5) para Golgi-compartment in the recycling pathway. *Cell* 37: 789-800, 1984.

Danksagung

Zunächst möchte ich Frau Prof. Beisiegel und Herrn Prof. Jäckle für die Vergabe des Themas und ihre Unterstützung bei der Durchführung dieser Dissertation und meiner sich anschließenden klinischen Tätigkeit danken.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Grewal und Herrn Walter Tauscher für die exzellente Betreuung und Anleitung.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Beisiegel für die herzliche Aufnahme und Hilfe bei Fragen.

Meinen Eltern und nicht zuletzt Anke Diemert danke ich für ihre Geduld und moralische Unterstützung, ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Patrick Linsel-Nitschke

Geboren am 3. April 1971 in Siegen

Familienstand: ledig

Konfession: evangelisch

Schulbildung:

1977-1981 Emil v. Behring-Schule, Marburg

1981-1986 Gymnasium Phillipinum, Marburg

1986 – 1990 Christianeum, Hamburg

Zivildienst:

1990 – 1991 Kirchengemeinde Hamburg-Nienstedten

Studium:

1991 Beginn des Medizinstudiums, Medizinische Universität zu Lübeck

1993 Ärztliche Vorprüfung

1992 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

1997 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

1997 –1998 Praktisches Jahr am Allgemeinen Krankenhaus Wien und am Universitätsklinikum Lübeck

1998 Ärztliche Prüfung

Dissertation:

Beginn im Mai 1998 im Labor von Prof. S. Jäckle, Medizinische Kern - und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg - Eppendorf

Ärztliche Tätigkeit:

Oktober 1998 bis März 1998 als Arzt im Praktikum, Medizinische Kern- und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg -Eppendorf

Seit April 2000 wissenschaftlicher Mitarbeiter, Medizinische Kern - und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg - Eppendorf

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

.....