

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Biochemie und Molekularbiologie II: Molekulare Zellbiologie

Direktorin: Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

Regulation der Interaktion von Adapterproteinen am intrazellulären C-Terminus von LRP1 in Hepatomazellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Sebastian Meisner
aus Hamburg

Hamburg 2010

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 2. März 2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. rer. nat. Hartwig Schmale

Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin: PD Dr. rer. nat. Evita Mohr

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. med. Franz Rinninger

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Der Lipoprotein-Stoffwechsel..... | 1 |
| 1.1.1 Exogener Lipoprotein-Stoffwechsel | 2 |
| 1.1.2 Endogener Lipoprotein-Stoffwechsel | 3 |
| 1.1.3 Reverser Cholesterol-Transport | 3 |
| 1.2 Die LDL-Rezeptor-Familie | 4 |
| 1.3 Das LDL-Rezeptor-Related Protein 1 (LRP1)..... | 9 |
| 1.3.1 Die β -Kette und die Intrazelluläre Domäne | 14 |
| 1.3.2 LRP1 und Atherosklerose – Die atheroprotektive Wirkung von ApoE..... | 17 |
| 1.4 LRP1 - Intrazelluläre Adapterproteine | 21 |
| 1.4.1 CED-6/GULP – Signalling in der Phagozytose | 25 |
| 1.4.2 Dab2 – Partner während der Endozytose | 30 |
| 1.4.3 JIP-1 – Das vielseitige Gerüst-Protein | 35 |
| 1.4.4 PKC α – Wegbereiter für Adapterproteine..... | 39 |
| 1.4.5 Shc – Signaltransduktion in Wachstum und Apoptose | 41 |
| 1.5 Ziel der Arbeit | 46 |
| 2 Material und Methoden | 47 |
| 2.1 Material | 47 |
| 2.1.1 Chemikalien | 47 |
| 2.1.2 Zelllinien | 48 |
| 2.1.3 Primäre Antikörper..... | 48 |
| 2.1.4 Sekundäre Antikörper | 49 |
| 2.1.5 Stimulanzen..... | 49 |
| 2.1.6 Geräte | 49 |
| 2.1.7 Gebrauchsmaterial..... | 50 |
| 2.2 Lösungen und Medien | 51 |
| 2.2.1 Lösungen | 51 |
| 2.2.2 Färbelösungen | 52 |
| 2.2.3 Medien..... | 53 |
| 2.3 Zellbiologische Methoden..... | 53 |
| 2.3.1 Zellkultur..... | 53 |
| 2.3.2 Stimulation | 53 |
| 2.3.3 Herstellung von Zell-Lysaten..... | 54 |
| 2.4 Proteinchemische Methoden | 54 |
| 2.4.1 Gewinnung von Chylomikronen | 54 |
| 2.4.2 Hydrolyse von Chylomikronen zu Chylomikronen-Remnants..... | 54 |
| 2.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford..... | 55 |
| 2.4.5 (Co-) Immun-Präzipitation..... | 55 |
| 2.4.4 GST-RAP-Pulldown..... | 57 |
| 2.4.6 Westernblot | 59 |
| 3 Ergebnisse | 60 |
| 3.1 Nachweis von LRP1 in HuH7-Zellen | 60 |
| 3.2 Nachweis der Adapterproteine in HuH7-Zellen..... | 61 |
| 3.3 Co-Immun-Präzipitation..... | 63 |
| 3.3.1 Vorversuche und Kontrollen zu den Immunpräzipitationen | 64 |
| 3.3.2 Co-Immun-Präzipitationen aus stimulierten HuH7-Zellen | 73 |
| 3.3.2.1 Stimulation mit PMA und Forskolin..... | 75 |

| | |
|---|------------|
| 3.3.2.2 Stimulation mit α_2 -Makroglobulin und Chylomikronen-Remnants..... | 76 |
| 3.3.2.3 Stimulation mit Lactoferrin und RAP | 78 |
| 3.3.2.4 Stimulation mit PDGF-BB | 79 |
| 3.4 GST-RAP-Pulldown..... | 80 |
| 4 Diskussion | 85 |
| 4.1 Nachweis von LRP1 und Adapterproteinen in HuH7-Zellen | 85 |
| 4.2 Co-Immun-Präzipitation..... | 86 |
| 4.2.1 Vorversuche und Kontrollen zu den Co-Immunpräzipitationen | 87 |
| 4.2.2 Co-Immun-Präzipitationen aus stimulierten HuH7-Zellen | 88 |
| 4.2.2.1 Stimulation mit PMA und Forskolin | 89 |
| 4.2.2.2 Stimulation mit α_2 -Makroglobulin und Chylomikronen-Remnants..... | 90 |
| 4.2.2.3 Stimulation mit Lactoferrin und RAP | 90 |
| 4.2.2.4 Stimulation mit PDGF-BB | 91 |
| 4.2.3 Kritische Betrachtung der Ergebnisse | 91 |
| 4.3 GST-RAP-Pulldown..... | 92 |
| 4.4 Ausblick | 93 |
| 5 Zusammenfassung | 95 |
| 6 Abkürzungsverzeichnis | 96 |
| 7 Literaturverzeichnis | 99 |
| 8 Anhang | 129 |
| Danksagung..... | 129 |
| Lebenslauf | 130 |
| Eidesstattliche Erklärung..... | 131 |

1 Einleitung

Die Endozytose und die Signaltransduktion stellen wichtige Funktionen des LDL-Receptor-Related Protein 1 (LRP1) in verschiedenen Geweben dar. So spielt LRP1 eine zentrale Rolle im postprandialen Lipid-Stoffwechsel, bei der Entstehung von Amyloid-Plaques im Rahmen der Alzheimer-Demenz, bei atherosklerotischen Gefäßerkrankungen sowie im immunologischen Kontext. Intrazelluläre Adapterproteine stellen dabei die Verbindung zu verschiedenen Signalwegen und zum Endozytose-Mechanismus her. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Bindungsverhalten verschiedener Adapterproteine in Abhängigkeit von LRP1-Liganden untersucht.

1.1 Der Lipoprotein-Stoffwechsel

Der Organismus ist für viele biologische Funktionen auf die Aufnahme und den Transport von Lipiden angewiesen. Für den Menschen sind sie wichtige Nahrungsbestandteile und erfüllen eine Vielzahl von Aufgaben. So sind sie als Triacylglycerine die energiereichsten Bestandteile der Nahrung und können als Reserve im dafür spezialisierten Fettgewebe gespeichert werden. Die Zellmembranen aller Gewebe sind auf eine Struktur aus Lipid-Doppelschichten angewiesen. Zudem spielen fettlösliche Vitamine sowie Cholesterol als essentieller Membranbaustein, als Basis für Steroidhormone und für Gallensäuren eine wichtige Rolle. Bis auf wenige essentielle Fettsäuren und fettlösliche Vitamine ist der Körper in der Lage alle benötigten Lipide selbst herzustellen.

Aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften können Lipide im wässrigen Milieu des Blutes nicht gelöst werden. Zum Transport über die Blutbahn werden daher kurzkettige Fettsäuren an Albumin gebunden, andere Lipide werden in Form von Lipoproteinen zusammengefasst. Es handelt sich dabei um globuläre Gebilde, die in ihrem Innern unpolare Lipide (Triglyceride, Cholesterolester und fettlösliche Vitamine) enthalten und nach außen von einer Hülle aus amphiphilen Lipiden (Phospholipide und Cholesterol) und Apolipoproteinen umgeben sind. Durch die polaren Kopfgruppen der Phospholipide bleiben die Lipoproteine im Blut löslich. Apolipoproteine sind eine Gruppe von Membranbausteinen, die zur Stabilität der Lipoproteinpartikel beitragen und spezifische Interaktionen mit Rezeptoren und anderen Proteinen erlauben. Es werden derzeit fünf Hauptklassen von Lipoproteinen unterschieden, die sich in ihrer Lipid- und Apolipoprotein-Zusammensetzung unterscheiden. Durch Ultrazentrifugation in einem Dichtegradienten lassen sich die Lipoproteine auftrennen. Chylomikronen, VLDL (engl. very low density lipoproteins) und in gewissem Maße auch

IDL (engl. intermediate density lipoproteins) gehören zur Gruppe der Triglycerid-reichen Lipoproteine mit einem Cholesterolgehalt von etwa 5% (Chylomikronen) und 38% (IDL). LDL (engl. low density lipoproteins) und HDL (engl. high density lipoproteins) stellen die Gruppe der Triglycerid-armen und Cholesterol-reichen Lipoproteine (Schwandt und Parhofer, 2007). Die einzelnen Lipoproteine tragen jeweils für sie charakteristische Apolipoproteine (s.u.).

1.1.1 Exogener Lipoprotein-Stoffwechsel

Die Lipidbestandteile der Nahrung werden nach dem Aufschluss durch die intestinalen Lipasen, insbesondere durch die Pankreas-Lipase, gemeinsam mit Gallensäuren zu Micellen zusammengesetzt, deren Bestandteile in die Mucosazellen, vor allem im Duodenum, aufgenommen werden. Dort erfolgt eine Re-Synthese der zuvor gespaltenen Triglyceride. Durch Vereinigung mit Cholesterol, langkettigen Fettsäuren und anderen Lipidbestandteilen sowie ApoB₄₈ und ApoA-I – ApoA-IV entstehen Chylomikronen, die an die intestinalen Lymphbahnen abgegeben werden und über den Ductus thoracicus in die Blutbahn gelangen (Hussain et al., 1996). Durch Bindung der endothelialen Lipoproteinlipase u.a. im Muskel- und Fettgewebe werden die Triglyceride der Chylomikronen hydrolysiert (Eisenberg et al., 1992). Dabei kommt es zu einer Übertragung von ApoA und Phospholipiden auf HDL-Partikel. Im Gegenzug erhalten die Chylomikronen-Remnants (engl. Reste) von HDL-Partikeln ApoE. Gemeinsam mit der Lipoproteinlipase dient ApoE der späteren rezeptorvermittelten Endozytose in die Leberzellen (Kowal et al., 1989). Diese Aufnahme der Chylomikronen-Remnants in die Leberzellen geschieht nach Bindung an Proteoglykane auf der Zelloberfläche, über den LDL-Rezeptor und über LRP1 (LDL-Receptor Related protein-1) (Mahley et al., 1999; Beisiegel et al., 1989 und 1991; Floren et al., 1981). Dort werden die Lipidkerne der Chylomikronen-Remnants auf dem lysosomalen Weg degradiert (Heeren et al., 1999 und 2001). ApoE, ApoC und die Lipoproteinlipase werden abgespalten und kehren an die Zelloberfläche zurück, von wo aus sie möglicherweise gemeinsam mit Cholesterol über ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A-1) wieder ausgeschleust werden (Vedhachalam et al., 2007; Heeren et al., 2006). Das ApoE aus diesem Kreislauf dient gemeinsam mit Cholesterol zur Anreicherung in HDL-Partikeln, die ihrerseits wieder Chylomikronen-Remnants mit ApoE versorgen können. Dies führt besonders postprandial stets zu einer ausreichenden ApoE-vermittelten Aufnahme der Chylomikronen-Remnants in die Leber (Heeren et al., 2003). Hierbei spielt der ApoE-Genotyp eine entscheidende Rolle. Liegt anstelle des normalen ApoE3-Genotyps ApoE4 homozygot vor, kann es zu Störungen im

ApoE-Recycling kommen, die auf vermehrter Aufnahme von ApoE4-tragenden Chylomikronen-Remnants bei gleichzeitig reduziertem Cholesterol-Efflux und HDL-abhängigem ApoE-Recycling beruhen (Heeren et al., 2004).

1.1.2 Endogener Lipoprotein-Stoffwechsel

Um Triglyceride und Cholesterol zur Energiegewinnung von der Leber zu peripheren Geweben zu transportieren, werden in der Leber VLDL-Partikel gebildet. Sie tragen die Apolipoproteine ApoB₁₀₀ und ApoC. Die Triglyceride der VLDL-Partikel werden wie auch bei Chylomikronen durch die Lipoproteinlipase hydrolytisch gespalten. Durch den Verlust von Fettsäuren entstehen zunächst als Übergangsform IDL- und darauf LDL-Partikel, die reich an Cholesterol sind. Sowohl IDL- als auch LDL-Partikel können in den Zielgeweben durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen werden (Schwandt und Parhofer, 2007).

1.1.3 Reverser Cholesterol-Transport

HDL-Partikel bilden eine Gruppe von Lipoproteinen., die im Vergleich zu anderen einen besonders hohen Protein- und Cholesterolanteil haben. Die charakteristischen Apolipoproteine sind ApoAI und II sowie ApoC und ApoE. Ihre Hauptfunktion besteht im Rücktransport von überschüssigem Cholesterol aus den peripheren Geweben zur Leber, wo es zu Gallensäuren umgewandelt und über die Galle ausgeschieden werden kann. Zunächst wird in der Leber und im Darm lipidarmes ApoAI gebildet, das in den peripheren Geweben über spezielle Transporter wie ABCA1 (s. o.) mit Cholesterol und Phospholipiden beladen wird (Pre- β -HDL-Partikel). Dies geschieht auch während der Hydrolyse Triglycerid-reicher Chylomikronen oder VLDL-Partikel (s. o.) Die LCAT (Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase) bewirkt durch Acylierung eine Umwandlung des Cholesterols zu Cholesterolestern, wodurch gleichzeitig der Gehalt an Phospholipiden abnimmt (HDL₃-Partikel). Durch rezeptorvermittelte Aufnahme von Cholesterol und Cholesterolestern in die Leber bleiben Pre- β -HDL-Partikel übrig, die erneut in den Kreislauf zurückgelangen (Schwandt und Parhofer, 2007).

HDL₃-Partikel können auch im Ganzen in Leberzellen aufgenommen werden, vermutlich über LRP1 oder SR-BI (Scavenger receptor class B member 1), einem Rezeptor, der selektiv Lipide aus Lipoproteinen aufnehmen kann. Im Zellinnern werden sie während des ApoE-Recyclings durch Interaktion mit ApoE-haltigen Cholesterolkomplexen zu HDL₂-Partikeln und dienen nach ihrer Sekretion als ApoE-Donatoren für Chylomikronen-Remnants und VLDL-Partikel (s. o.). HDL₂-Partikel können zudem extrazellulär durch die LCAT (s. o.) zu

großen HDL1-Partikeln verschmelzen (Heeren et al., 2006). Einen Überblick über den Lipoprotein-Stoffwechsel bietet Abbildung 1.

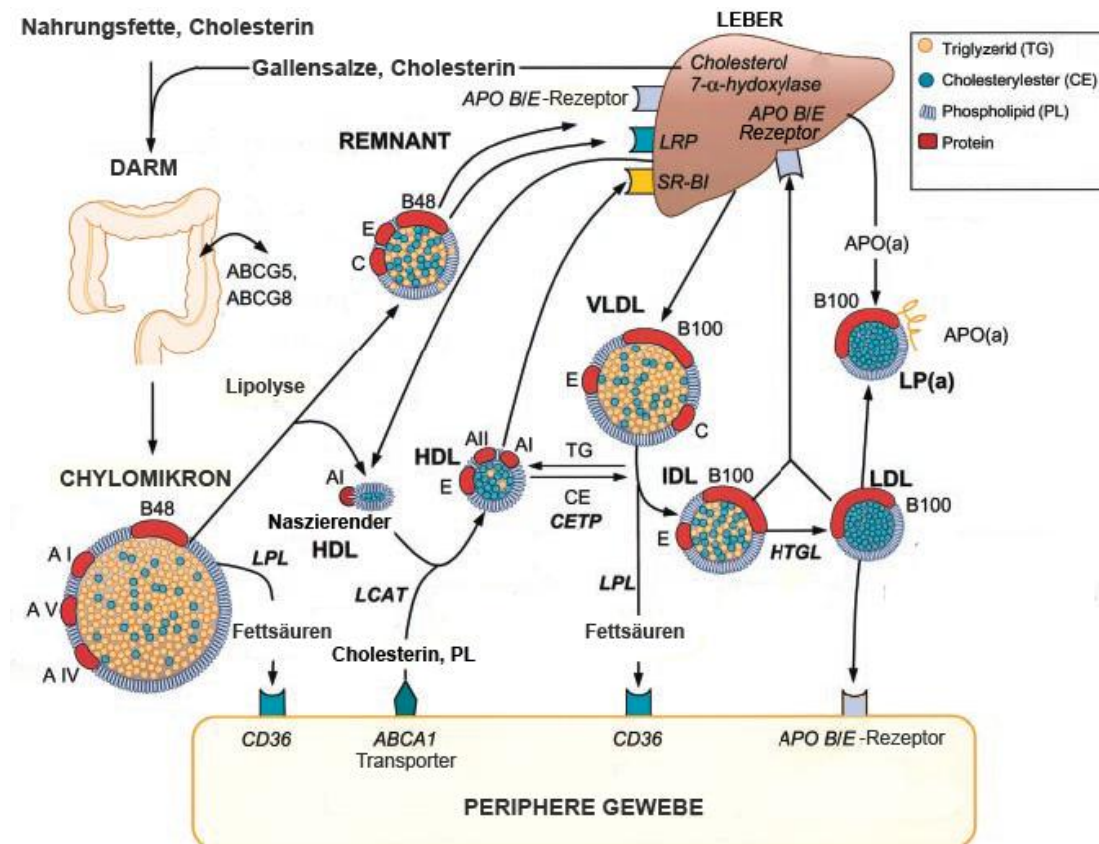


Abbildung 1: Übersicht über den Lipoprotein-Metabolismus (mod. nach Lusis et al., 2004)

Abkürzungen: ABCA/ABCG: ATP-Binding Cassette Transporter A/G; CD36: Differenziationscluster 36/Fettsäuretranslokase; HTGL: Hepatische Triglyzeridlipase; LCAT: Lecithin:Cholesterin-Acyltransferase; LPL: Lipoproteinlipase; SR: Scavenger Receptor. Weitere Erläuterungen im Text.

1.2 Die LDL-Rezeptor-Familie

Die Low-Density-Lipoprotein (LDL) Rezeptorfamilie besteht aus derzeit acht strukturell eng verwandten Transmembranproteinen, die an einer großen Zahl von biologischen Prozessen beteiligt sind. Dazu gehören die Regulation des Lipidstoffwechsels, der Schutz vor Atherosklerose, neuronale Entwicklung und der Transport von Nährstoffen und Vitaminen. Es soll hier ein orientierender Überblick über die Familienmitglieder, ihre Liganden und Funktionen gegeben werden. Auf die für diese Arbeit wichtigen Rezeptoren, insbesondere LRP1 wird später genau eingegangen.

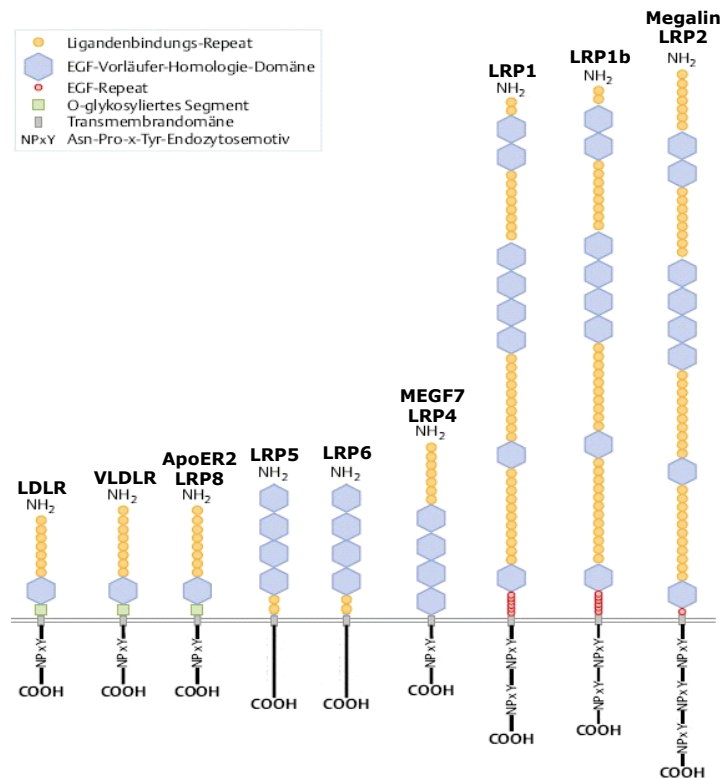


Abbildung 2: Die LDL-Rezeptor-Familie. (mod. nach May 2006, Schneider et al. 2003)

Die Mitglieder der LDL-Rezeptor-Familie weisen besonders im extrazellulären Abschnitt eine Reihe von strukturellen Gemeinsamkeiten auf. Bis auf LRP5 und LRP6 tragen alle mindestens ein NPxY-Motiv in der ICD. Weitere Informationen im Text.

LDL-Rezeptor

Der LDL-Rezeptor (LDLR), der Namensgeber der Familie, ist ein Glycoprotein an der Zelloberfläche. Er kontrolliert die Cholesteroll-Homöostase durch rezeptorvermittelte Aufnahme von Lipoproteinpartikeln. Dazu gehören die LDL-Partikel, die über das ApoB-100 an den LDL-Rezeptor binden (Brown und Goldstein, 1974), sowie β -VLDL- und bestimmte IDL- und HDL-Partikel, die über das ApoE erkannt und aufgenommen werden (Innerarity et al., 1979; Weisgraber et al., 1978).

Die Mehrheit der LDL-Rezeptoren ist in sog. Clathrin-coated Pits versammelt, elektronenmikroskopisch sichtbaren Schauplätzen der Endozytose (Anderson et al., 1978). Wie auch für LRP1 wurde für LDLR ein Recycling-Mechanismus beschrieben, durch den die einzelnen Rezeptoren mitsamt ihrer Liganden internalisiert werden und nach dessen Abgabe an Endosomen an die Zelloberfläche zurückkehren (Brown und Goldstein, 1986).

Es wurden ca. 1000 funktionshemmende Mutationen des LDLR-Gens beschrieben, die alle das Bild der familiären Hypercholesterolemie hervorrufen, eine der häufigsten angeborenen Stoffwechselstörungen des Menschen. Dieses Krankheitsbild manifestiert sich klinisch durch

erhöhte Konzentrationen von LDL-Partikeln und Cholesterol im Plasma. Der Anteil von heterozygoten Trägern beträgt etwa 1/500 der Gesamtbevölkerung. Diese Patienten unterliegen damit einem deutlich erhöhten Risiko, an Atherosklerose zu erkranken. Träger von zwei defekten Genkopien sterben zumeist in sehr frühem Alter an massiver Atherosklerose (Jeon und Blacklow, 2006; Goldstein et al., 2001; Hobbs et al., 1990).

Während derzeit angenommen wird, dass der LDL-Rezeptor ausschließlich für die Aufnahme von Lipoproteinpartikeln zuständig ist, kommen den anderen Familienmitgliedern weitere Funktionen, unter anderem in der Signaltransduktion zu (May et al., 2005; May und Herz, 2003; Herz, Gotthardt et al., 2000; Willnow et al., 1999).

LRP1

Das LDL-Rezeptor-Related Protein 1 (LRP1) wurde als zweites Mitglied der LDL-Rezeptorfamilie erkannt und gilt als eines der vielseitigsten. Es bindet mehr als dreißig verschiedene Liganden von Lipoproteinen über Protease- bzw. Protease-Inhibitor-Komplexen bis hin zu extrazellulären Matrix-Proteinen, Cytokinen und Viren. Darüber hinaus spielt LRP1 eine entscheidende Rolle in der Gefäßwand beim Schutz vor Atherosklerose und im erwachsenen Gehirn im Zusammenhang mit der Demenz vom Alzheimer-Typ (Herz und Strickland, 2001; Krieger und Herz, 1994). Da LRP1 das zentrale Protein in dieser Arbeit ist, wird hierauf im Kapitel „LRP1“ genau eingegangen.

ApoER2 (LRP8) und VLDL-Rezeptor

Zwei weitere Vertreter, der ApoE-Rezeptor 2 (ApoER2 oder LRP8) und der Very-Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor (VLDLR) wurden als Proteine der Signaltransduktion nach der Ausschüttung des Glycoproteins Reelin identifiziert. Reelin reguliert die Anordnung von Neuronen während der Gehirnentwicklung. Durch Versuche mit VLDLR- bzw. ApoER2-Knock-Out-Mäusen wurde deutlich, wie essenziell beide Rezeptoren für die Entwicklung bestimmter Gehirnareale sind. Wenn nur einer der beiden Rezeptoren fehlt, kommt es allenfalls zu diskreten bzw. zu keinen Veränderungen im Fettstoffwechsel. Bei gleichzeitigem Fehlen beider Rezeptoren jedoch kommt es zu einer schweren Gehirnentwicklungsstörung mit Verlust der normalen Schichtung der Großhirnrinde und des Hippocampus sowie einer Kleinhirndysplasie. Entsprechend ist der Phänotyp der Knock-Out-Tiere durch eine Ataxie (daher auch der Name Reelin, von engl. „to reel“ – taumeln, schwanken) und dadurch bedingte Ernährungsstörung mit frühzeitigem Tod gekennzeichnet (Trommsdorff, Gotthardt et al., 1999).

Megalin (LRP2)

Megalin, auch LRP2 genannt, ist der größte Vertreter der LDL-Rezeptorfamilie und wird im zentralen Nervensystem sowie in vielen resorptiven Epithelien exprimiert. Wie auch LRP1 ist Megalin ein multifunktionaler Rezeptor, der nicht nur eine große Anzahl an Liganden binden und aufnehmen kann, sondern auch über die Regulation der Verfügbarkeit von Liganden indirekt an der Signaltransduktion beteiligt ist. Als Beispiel soll hier die Regulation der extrazellulären Spiegel von Sonic Hedgehog (Shh) und Bone Morphogenetic Protein 4 (Bmp4) dienen. Shh, das von Bmp4 negativ reguliert wird, ist essentiell für die Entwicklung des Vorderhirns (Prosencephalon). Megalin internalisiert und degradiert Bmp4 und gewährleistet so die regelrechte Gehirnentwicklung (Spoelgen et al., 2005; Golden et al., 1999). Im Rahmen der Vitamin-Homöostase bindet Megalin das Glycoprotein Cubilin, das für die Aufnahme von Vitamin B12 und Vitamin D wichtig ist (Christensen et al., 2002). Im proximalen Tubulus der Niere ist Megalin an der Rückresorption von Vitamin D-bindendem Protein und kleineren Proteinen aus dem glomerulären Filtrat beteiligt. (Nykjaer et al., 1999).

MEGF7 (LRP4)

MEGF7 (multiple EGF-like domain), oder LRP4, wird der LDLR-Familie zugerechnet, da dieser Rezeptor in seinen EGF-Vorläuferdomänen und seinem intrazellulären Anteil mit einem NPxY-Motiv den Rezeptoren anderen Vertretern der Familie, wie auch LRP5/6 sehr ähnelt (May et al., 2007). Noch liegen die Funktionen des Rezeptors teilweise im Dunkeln, doch offensichtlich kommt auch MEGF/LRP4 eine Bedeutung während der Embryonalentwicklung zu. In Knock-Out-Mäusen fiel Polysyndaktylie, eine Fehlentwicklung der Gliedmaßen auf (Johnson et al., 2005). Bei Fehlen des Rezeptors kommt es zu einer abnormen Expression von Fibroblast Growth Factor (FGF), BMP, Shh und Proteinen der Wnt-Familie (Capdevila et al., 2001). Möglicherweise besteht ein Antagonismus zu LRP5/6, da MEGF/LRP4 von LRP5/6-mediierte Wnt-Signalwege inhibiert.

LRP5 und LRP6

LRP5 und LRP6 sind zwei eng verwandte Typ I Membranproteine, die jeweils etwa die doppelte Größe des LDL-Rezeptor haben. Ihre extrazellulären Domänen sind exakt wie ein Ausschnitt aus LRP1 aufgebaut. Ihre cytoplasmatischen Anteile enthalten jedoch kein NPxY-Motiv, wie die anderen Familienmitglieder, sondern unter anderem Di-Leucin (LL-) Motive

und ausgedehnte Serin- und Prolin-reiche Passagen, die als Bindestelle für Src-homology 3 (SH3) dienen (Brown et al., 1998; Hey et al., 1998).

LRP5 und LRP6 wurden als wichtige Teile des Wnt-Signalweges beschrieben (Bejsovec, 2000). Hierbei handelt es sich um einen zentralen Prozess in der Entwicklung, Zellproliferation und Tumor-Formierung. Wnts sind sekretierte Glycoproteine die an 7-Transmembran-Rezeptoren der “Frizzled“-Familie binden. In Abwesenheit von Wnt wird der Transkriptions-Co-Aktivatoren β -Catenin in einem Multiproteinkomplex phosphoryliert und für den Abbau in einem Proteasom-Komplex ubiquitiniert. In Anwesenheit von Wnt werden Frizzled und LRP5 bzw. LRP 6 als Co-Rezeptor aktiviert und der Abbau von β -Catenin gestoppt. β -Catenin kann daraufhin in den Zellkern einwandern und gemeinsam mit Transkriptions-Regulatoren Wnt-abhängige Expression anstoßen (Jiang et al., 2008; Cadigan und Liu 2005; He et al., 2004).

| Rezeptor | Liganden | Funktionen |
|----------------|---|---|
| LDL-Rezeptor | ApoB-100 (LDL), ApoE (β -VLDL) | Lipoprotein-/ Cholesterolaufnahme |
| VLDL-Rezeptor | ApoE, Reelin, Lipoproteinlipase (LpL), tissue factor pathway inhibitor | Regulation der neuronalen Migration während der Embryonalentwicklung, Regulation der Fettspeicherung? |
| ApoER2 / LRP8 | ApoE, Reelin | Regulation der neuronalen Migration während der Embryonalentwicklung, synaptische Transmission |
| MEGF7 / LRP4 | Unbekannt | Regulation der Gliedmaßen- und Zahnentwicklung, Modulation von Signaltransduktionswegen. |
| LRP1 | ApoE, Chylomikronen-Remnants, α 2-Makroglobulin, Amyloid- Precursor-Protein (APP), Protease/Protease-Inhibitor- Komplexe, Lipoproteinlipase (LpL), PDGF, TGF-beta, CTGF, t- PA, u-PA | Aufnahme von Lipoproteinen und Proteasen, Modulation der APP- Prozessierung, Modulation intrazellulärer Signaltransduktion, synaptische Transmission? |
| LRP1b | Synaptotagmin, Laminin- Rezeptorvorläufer | Regulation der Zellproliferation? |
| Megalin / LRP2 | ApoB, ApoE, ApoJ, ApoH, Albumin, Cubilin, Retinol- Binding-Protein (RBP), Vitamin- D-bindendes Protein, Sexualhormon-bindendes Globulin, Sonic Hedgehog (SHH) | Vitaminhomöostase, renotubuläre Reabsorption von Proteinen, Modulation von Signaltransduktion, Aufnahme von Sexualhormonen. |
| LRP5 LRP6 | Wnt | Co-Rezeptor der Frizzled-Familie Modulation des Wnt-Signallings |

Tabelle 1: Liganden und Funktionen der LDL-Rezeptor-Familie. (mod. Jiang et al. 2008, May 2006)

1.3 Das LDL-Receptor-Related Protein 1 (LRP1)

Allgemeines

Das LDL-Receptor-Related Protein 1 wurde zuerst als Zelloberflächenprotein mit einer auffallenden Sequenzhomologie zum LDL-Rezeptor und zum Vorläufer des Epidermal Growth Factor (EGF) beschrieben. Aufgrund der hohen Expression in der Leber und anderer gemeinsamer Eigenschaften wurde LRP1 als zweiter Vertreter der späteren LDL-Rezeptorfamilie zugeordnet (Herz et al., 1988). Synonym werden auch andere Namen gebraucht, vor allem in früheren Beschreibungen. Hier werden bereits verschiedene

Beteiligungen des Rezeptors deutlich: CD91 (Immunologischer Kontext), CED1 (Phagozytose-Studien an *C. elegans*), α_2 -Makroglobulin-Rezeptor (α_2 MR), TGF β -Rezeptor V (nach Liganden)

Struktur

LRP1 entsteht aus einem etwa 600 kDa großen Vorläuferprotein, das nach seiner Translation von einer Furin-Protease im *trans*-Golgi-Apparat geschnitten wird. An der korrekten Faltung ist das Rezeptor-Assoziierte Protein (RAP) als Chaperon beteiligt. Es entstehen eine 515 kDa große α - und eine 85 kDa große β -Kette, die nicht-kovalent verbunden werden, wobei die α -Kette später extrazellulär zu liegen kommt. Sie enthält vier verschieden große Ligandenbindungsdomänen (Cluster I – Cluster IV), die aus insgesamt 31 Cystein-reichen Ligandenbindungs-Repeats bestehen. Analog zum LDL-Rezeptor spricht man von LDL-Rezeptor Class A Domänen (LDLRA). Die Cluster I – IV enthalten 2, 8, 10 bzw. 11 dieser Domänen (Neels et al., 1999). Dazu enthält LRP1 mehrere Epidermal Growth Factor (EGF)-Vorläufer-Homologie-Domänen, die ihrerseits aus EGF-Repeats und β -Propeller-Domänen bestehen. Sie dienen als Pseudosubstrat für die Ligandenbindungsdomänen und tragen zur Trennung von Rezeptor und gebundenen Liganden in sauren intrazellulären Kompartimenten bei (Mikhailenko et al., 1999). Die β -Kette durchspannt die Plasmamembran mit einer Transmembrandomäne und enthält intrazellulär unter anderem zwei NPxY-Motive, wie sie auch bei anderen Mitgliedern der LDLR-Familie zu finden sind. Auf die intrazelluläre Domäne (ICD) wird im Folgenden näher eingegangen.

Vorkommen und Funktion

LRP1 wird ubiquitär exprimiert, besonders in Leber, zentralem Nervensystem (ZNS), Gefäßwand und Lunge. Durch Versuche mit Knock-Out-Mäusen wurde deutlich, dass LRP1 eine essentielle Bedeutung bei der Embryonalentwicklung zukommt. Homozygote LRP1-defiziente Tiere starben bereits am neunten Tag der Schwangerschaft (Herz et al., 1992). LRP1 kommt eine wichtige Funktion bei der gezielten ligandenvermittelten Aufnahme von Proteinen und Partikeln, wie Chylomikronen-Remnants, zu. Außerdem wirkt er als endozytotischer Scavenger-Rezeptor beim Abräumen von apoptotischem Zellmaterial sowie bei der Regulation von Phagozytose und Inflammation bei Phagozyten (Kiss et al., 2006; May et al., 2005; Gardai et al. 2005). Auch an verschiedenen ligandenvermittelten Signaltransduktionswegen ist LRP1 beteiligt. Beim Schutz von Zellen in der Gefäßwand (Boucher und Gotthardt, 2004; Loukinova et al., 2002) und der Modulation der

extrazellulären Matrix (Gaultier et al., 2006; Hu et al., 2006) ist LRP1 ebenso involviert wie an der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke (Yepes et al., 2003), der Modulation neuronaler Signale (Qiu et al., 2002) und an der Prozessierung von anderen Proteinen, wie z.B. dem β -Amyloid-Vorläuferprotein (APP) (Kounnas et al., 1995; Ulery et al., 2000). Zudem wird eine Beteiligung am Auf- und Abbau von Zellverbindungen bzw. an der Migration von Zellen diskutiert (Swertfeger et al., 2002; Zhu und Hui, 2003). Dies legt eine Bedeutung des Rezeptors bei malignem Wachstum bzw. Metastasierung nahe. Der Genabschnitt q13-14 auf Chromosom 12, wo das LRP1-Gen lokalisiert ist, stellt einen bekannten Hotspot für neoplastische Mutationen dar. Es konnte jedoch keine Beteiligung von LRP1 an chromosomalen Rearrangements bestätigt werden. Allerdings wurde der eng verwandte Rezeptor LRP1b als ein häufig deletiertes Gen in Tumoren der Mundschleimhaut (Nakagawa et al., 2006), des Ösophagus (Sonoda et al., 2004), des Urothels (Langbein et al., 2002) sowie im cervicalen Bereich des Uterus (Hirai et al. 2004) beschrieben. Auf einige Funktionen wird im Folgenden näher eingegangen.

Expressionsregulation und subzelluläre Verteilung von LRP1

Aufgrund seiner vielseitigen Funktionen unterliegt LRP1 nicht nur einem direkten und kurzfristigen Einfluß durch Liganden, Kinasen und intrazelluläre Adapterproteine, sondern auch einer langfristigen Kontrolle durch Expressionsregulation. Anhand von Studien in glatten Gefäßmuskelzellen wurde ein Mechanismus beschrieben, der LRP1 durch aggregierte LDL-Partikel und Cholesterolüberschuß in der Zelle hochreguliert (Llorente-Cortes et al., 2002). Diese Beobachtung beruht auf den Transkriptionsfaktoren „Sterol Regulatory Element Binding Proteins“ (SREBPs). Sie kontrollieren die zelluläre Lipid-Homöostase auf drei Ebenen: Transkription, proteolytische Spaltung von SREBP-Vorläufern und posttranslationelle Modifikation nativer SREBPs (Brown und Goldstein., 1997). Hier ist vor allem SREBP-2 von Interesse, das relativ spezifisch für Gene der Cholesterolsynthese ist und auf der Ebene der Vorläufer-Spaltung reguliert wird (Sato et al., 1996). Wird Cholesterol in der Zelle angereichert, verbleibt das cholesterolsensible „SREBP Cleavage-Activating Protein“ (SCAP) am endoplasmatischen Retikulum anstatt sich zum Golgi zu bewegen. So werden SREBPs nicht proteolytisch aktiviert, und die wenigen aktiven SREBPs bewirken eine nur niedrige Transkriptionsrate ihrer Zielgene (Brown et al., 2002; Nohturfft et al., 2000). Eines der Zielgene von SREBP-2 ist der LDL-Rezeptor, der direkt in der Cholesterol-Homöostase involviert ist und über ein „Sterol regulatorisches Element“ (SRE) positiv reguliert wird (Horton et al., 2002). Liegt also viel intrazelluläres Cholesterol vor, wird der

LDL-Rezeptor nur in geringem Maße exprimiert. LRP1 hingegen wird, wie oben beschrieben, bei hohen intrazellulären Cholesterolspiegeln vermehrt exprimiert. Diese Beobachtung beruht darauf, dass LRP1 von SREBP-2 herunterreguliert wird, indem es an SRE-1 innerhalb der ungewöhnlich langen 5'-untranslatierten Region des LRP1-Gens bindet.

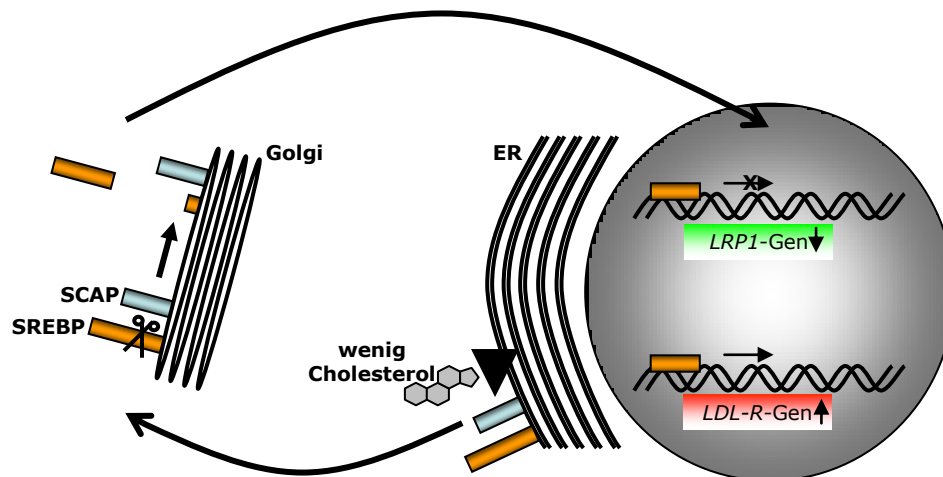


Abbildung 3: Expressionsregulation von LRP1 und dem LDL-Rezeptor (mit freundlicher Genehmigung von N. Schreiber, 2007)

Ein niedriger Cholesterolspiegel in der Zelle bewirkt eine vermehrte Expression des LDL-Rezeptors. Im Gegensatz wird die Expression von LRP1 gehemmt. Weitere Erläuterungen im Text.

Die Verfügbarkeit von LRP1 wird jedoch nicht nur über die Transkriptionsrate reguliert, sondern auch über eine flexible Verteilung innerhalb der Zelle. Unter basalen Bedingungen hingegen ist nur ein geringer Teil der LRP1-Menge an der Zellmembran zu finden. In Adipozyten konnte gezeigt werden, dass LRP1 auf die Stimulation der Zellen mit Insulin hin von intrazellulären Membranen an Caveolae der Zelloberfläche transloziert (Zhang et al., 2004). Ebenso verhält sich LRP1 in Hepatozyten, wobei sich jeweils nur die Lokalisation von LRP1 verändert. Die Transkription und damit der Gesamtspiegel bleiben unter Insulineinfluss unverändert (Laatsch et al., 2009).

Liganden und Bindungscluster

LRP1 verfügt über vier extrazelluläre Liganden-Bindungscluster und kann mehr als dreißig verschiedene Liganden binden. Dennoch besitzen die Cluster I-IV unterschiedliche Bindungsaffinitäten. Während die Liganden mit vergleichbarer Affinität an die Cluster II und IV binden, bleibt Cluster I offensichtlich unbesetzt. ApoE und RAP können zusätzlich an Cluster III binden. Das Chaperon RAP bindet glykosylierungsunabhängig auch nach der Fertigstellung des Rezeptors an die Cluster II, III und IV (Croy et al., 2003). Einmal

gebunden, stellt es einen starken Antagonisten für andere Liganden (außer ApoE und Lactoferrin) dar, der nicht kompetitiv verdrängt werden kann. Dabei überdeckt RAP für andere Liganden wichtige Bindungsstellen. Möglicherweise dient dies der Vorbeugung vor vorzeitiger Ligandenbindung während der Herstellung und des Transports des Moleküls. Wahrscheinlich kommt es durch die gleichzeitige Bindung von RAP an mehrere Cluster zu einer Konformationsänderung im LRP1-Molekül (Horn et al., 1997; Willnow et al., 1992). Auf diese Weise können auch Verbindungen von mehreren LRP1-Molekülen untereinander entstehen (Neels et al., 1999).

Auf die Liganden, die für diese Arbeit im Rahmen der Stimulationsversuche verwendet wurden (α_2 -Makroglobulin, Chylomikronen-Remnants (ApoE), Lactoferrin, RAP), wird im Ergebnisteil eingegangen.

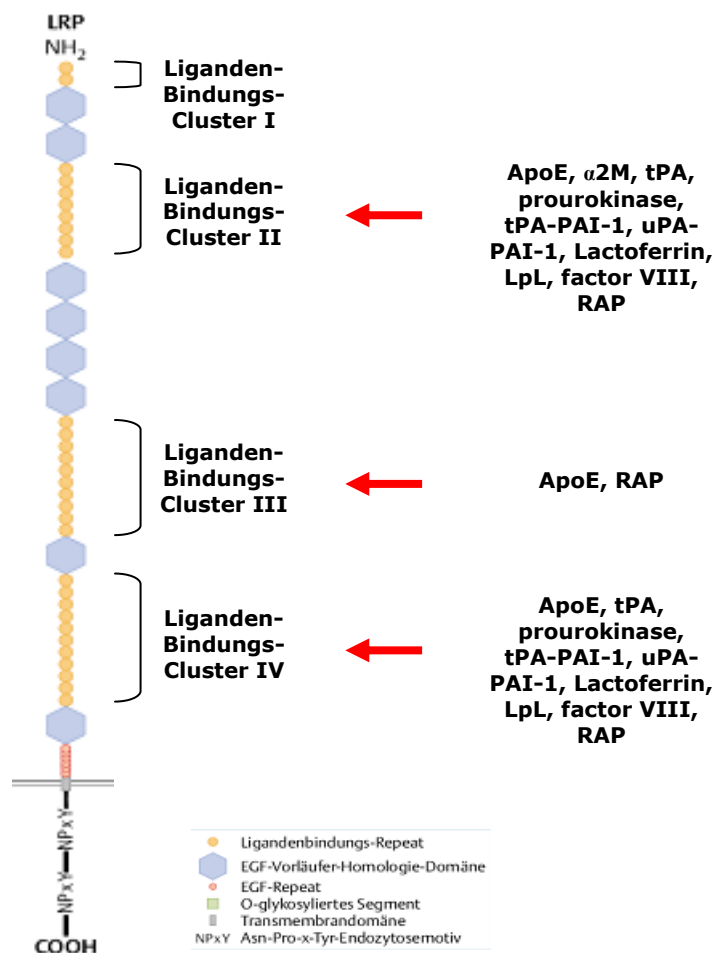


Abbildung 4: LRP1–Ligandenbindungscluster und Liganden (Auswahl) (nach May 2006)

1.3.1 Die β -Kette und die Intrazelluläre Domäne

Struktur und Motive

Während der Reifung wird das 600 kDa große LRP1-Vorläufermolekül in eine 515 kDa große α - und eine 85 kDa große, glycosylierte β -Kette geschnitten, die nicht-kovalent aneinander gebunden werden. Während sich die α -Kette später extrazellulär befindet, durchspannt die β -Kette die Zellmembran mit einer Transmembrandomäne und trägt auf ihrer cytoplasmatischen Seite die 100 Aminosäuren lange Intrazelluläre Domäne (ICD), die mehrere Signalling- und Internalisierungs-Motive enthält: Ein von der Zellmembran aus gesehen proximales und ein distales NPxY-Motiv, zwei LL-Motive und ein YxxØ-Motiv, das mit dem distalen NPxY-Motiv überlappt (siehe Abbildung 5). Das „x“ steht hier stellvertretend für unterschiedliche Aminosäuren, die in diesen Motiven in verschiedenen Proteinen und Spezies beschrieben wurden und deren Eigenschaft für die ordnungsgemäße Funktion weniger wichtig sind. Das „Ø“ steht stellvertretend für einen hydrophoben Aminosäure-Rest. YxxØ-Motive kommen in Endozytoserezeptoren vor. In den NPxY-Motiven zeigt sich wiederum die Verwandtschaft zu den anderen Rezeptoren aus der LDL-Rezeptorfamilie, die bis auf LRP5 und LRP6 alle mindestens ein solches Motiv in ihrem cytoplasmatischen Anteil tragen (May et al., 2007). Zudem finden sich NPxY-Motive bei anderen Zelloberflächen-Rezeptoren wie dem Amyloid-Vorläufer-Protein (APP), bei Integrin-Rezeptoren und bei Tyrosinkinase-gekoppelten EGF- und Insulinrezeptoren (Chen et al., 1989).

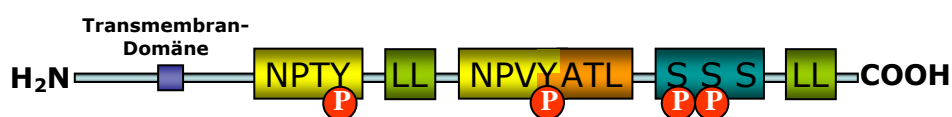


Abbildung 5: Die intrazelluläre C-terminale Domäne (ICD) von LRP1 (mit freundlicher Genehmigung von N.Schreiber, 2007)

Die LRP1-ICD enthält zwei NPxY-Motive, zwei Di-Leucin- (LL-) Motive, ein YxxØ-Motiv, das sich mit dem distalen NPxY-Motiv überschneidet, und ein SSS-Motiv. Die Tyrosinreste der NPxY-Motive sowie zwei Serinreste im SSS-Motiv können phosphoryliert vorliegen. Nähere Erläuterungen im Text.

NPTY ist die Sequenz des ersten (proximalen) NPxY-Motivs in der LRP1-ICD. Fehlt dieses Motiv in LRP1 Knock-In Tieren, die mit der RCME-Methode (Recombinase-Mediated Cassette Exchange) hergestellt wurden, kommt es noch vor der Geburt oder perinatal zum Fruchttod durch Lebersversagen (Roebroek et al., 2005). Es kann über Fe65, einem Protein mit Phosphotyrosin-Bindungsdomäne (PTB) das Amyloid Precursor Protein (APP) binden. Für

diese Bindung allerdings ist keine Phosphorylierung notwendig (Waldron et al., 2006). Es handelt sich hier um einen Prozess, der zur Entstehung der Alzheimerschen Demenz beitragen soll.

Auch das Adapterprotein Snx17 (Sorting Nexin 17) bindet ohne Tyrosin-Phosphorylierung an das proximale NPxY-Motiv. Es spielt eine wichtige Rolle im Rezeptor-Recycling von LRP1. Der hier enthaltene Tyrosinrest Tyr₂₉ kann indes auch phosphoryliert werden. Zuvor ist allerdings eine Tyrosin-Phosphorylierung im distalen NPxY-Motiv notwendig. Dies beruht möglicherweise auf einer Konformationsänderung rund um das proximale NPxY-Motiv herum, wodurch es einer Phosphorylierung erst zugänglich gemacht wird (Betts et al., 2008).

Die Sequenz des zweiten (distalen) NPxY-Motivs in der LRP1-ICD lautet **NPVY**. Es stellt eine wichtige Andockstelle für intrazelluläre Adapterproteine dar und ist – wie auch beim LDL-Rezeptor – essentiell für die Organisation der zu internalisierenden Rezeptoren in den sog. Clathrin-coated Pits (Chen et al., 1990). Die Entscheidung, welche Adapterproteine an dieses Motiv binden können, hängt maßgeblich von der Phosphorylierung des Tyrosinrests Tyr₆₃ ab. Hierauf soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

Am C-Terminus des LDL-Rezeptors gilt das NPxY-Motiv als wichtige Struktur für die schnelle Internalisierung in Clathrin-coated Pits (Chen et al., 1990). Im Falle von LRP1 sind das distale Di-Leucin- oder LL-Motiv, das distale NPxY-Motiv und das YxxØ-Motiv wichtige Strukturen in der Endozytose, wobei das YxxØ-Motiv als wichtigstes Endozytose-Motiv angesehen wird. Dabei wird es vom distalen LL-Motiv unterstützt (Bonifacino u. Traub 2003; Li et al., 2000). Die Sequenz des YxxØ-Motivs in der LRP1-ICD lautet **YATL**. Es steht im Zusammenhang mit AP-2, einem zentralen Protein im Rahmen der Internalisierung in Clathrin-coated Pits (Owen u. Evans, 1998; Ohno et al., 1995).

Das NPxY- und das YxxL-Motiv sind überlappend angeordnet und werden daher auch als NPxYxxL-Motiv beschrieben. Durch RMCE erzeugte Missense NPxYxxL-Knock-In-Mäuse, denen zudem der LDL-Rezeptor fehlte, zeigten nochmals erhöhte Mengen atherogener Substanzen im Blut wie triglyceridreiche Lipoproteine und t-PA im Vergleich zu reinen LDLR^{-/-}-Tieren und entsprechend ausgeprägtere atherosklerotische Gefäßveränderungen (Gordts et al., 2009).

Endozytose und Signaltransduktion

LRP1 spielt sowohl in der Endozytose als auch in der Modulation verschiedener zellulärer Signalwege eine Rolle. Nicht nur die erstaunliche Vielfalt der derzeit mehr als dreißig bekannten Liganden sprach zunächst für eine Funktion als reiner Endozytose-Rezeptor: LRP1 verfügt innerhalb der LDL-Rezeptorfamilie über die höchste Endozytose-Rate (Li et al., 2001). Nachdem eine Reihe von Adapterproteinen beschrieben wurden, die nicht zur Endozytose-Maschinerie gehörten, wurde erstmals in Erwägung gezogen, dass es sich um einen multifunktionalen Rezeptor handeln könnte (Trommsdorff et al., 1998). Gewissheit brachte der Nachweis von Adapterproteinen, die bereits in anderen Untersuchungen intrazellulären Signalwegen zugeordnet wurden (Gotthardt, Trommsdorff et al., 2000; Herz und Strickland, 2001). Zudem wurde eine direkte Beteiligung von LRP1 an Signalwegen des PDGF-Rezeptors (Proliferation von Gefäß-Endothelzellen und Entstehung atheromatöser Plaques, s.a. Kapitel LRP1 und Atherosklerose) (Boucher et al., 2002; Loukinova et al., 2002; Swertfeger et al., 2002) und des NMDA-Rezeptors beschrieben (Calcium-Signalling in neuronalen Zellen und Kontraktion glatter Muskelzellen) (Bacsikai et al., 2000; Nassar et al., 2002).

LRP1 ist also offenbar an vielfältigen Signalwegen beteiligt. Es ist jedoch derzeit noch nicht abschließend geklärt, wie genau das Zusammenspiel mit intrazellulären Adapterproteinen diese beiden Funktionen des Rezeptors reguliert.

LRP1 und cAMP– Phosphorylierung und Signaltransduktion

Zyklisches Adenosinmonophosphat (Adenosin-3',5'-monophosphat; cAMP) ist einer der wichtigsten Second Messenger der intrazellulären Signaltransduktion und ist an vielen verschiedenen Signalwegen beteiligt (Walsh et al., 1994). Gebildet wird cAMP aus Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) durch die Adenylatcyclase. Der hydrolytische Abbau zu Adenosin-5'-Monophosphat (AMP) wird von Phosphodiesterasen vollzogen.

Unter den beschriebenen Adapterproteinen von LRP1 findet sich ein stimulatorisches heterotrimäres G-Protein (G_{α_s}). Nach Stimulation mit klassischen LRP1-Liganden (Laktoferrin und Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) bzw. ApoE) zeigte sich intrazellulär ein signifikanter Anstieg von cAMP und PKA-Aktivität sowie eine gesteigerte Endozytoserate von LRP1 (Zhu et al., 2003; Li et al., 2000; Goretzki et al., 1998). Möglicherweise führt die Bindung bestimmter Liganden an LRP1 über G_{α_s} zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase und somit zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-

Spiegels. Über die Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA käme es so zu einer Phosphorylierung Serin-Resten in der LRP1-ICD (s. Abbildung 6) (Li et al., 2000).

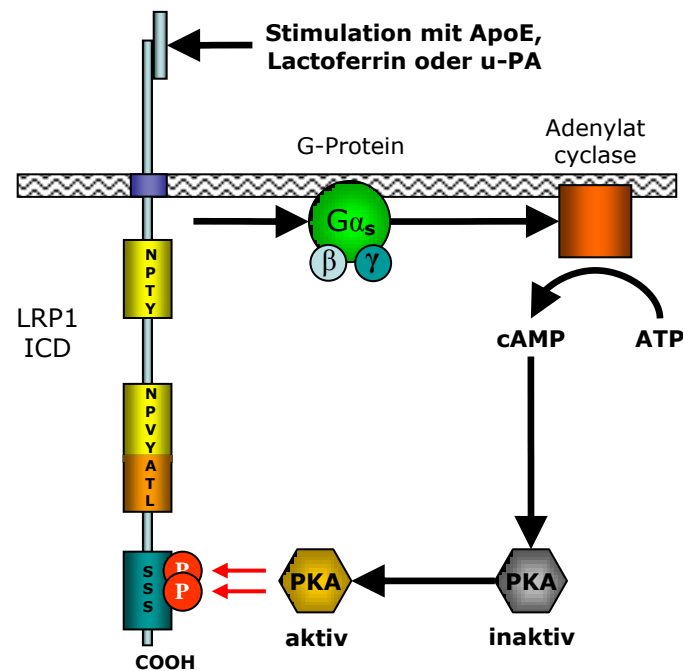


Abbildung 6: Einfluss von LRP1 auf den zellulären cAMP-Spiegel (nach Zhu et al. 2003, Li et al. 2000, Goretzki et al. 1998)

Die Stimulation von LRP1 mit ApoE, u-PA oder Lactoferrin führt über ein stimulatorisches G-Protein zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels. Dadurch wird die PKA (Proteinkinase A) aktiviert, die Serinreste der LRP1-ICD phosphorylieren kann. Nähere Erläuterungen im Text.

1.3.2 LRP1 und Atherosklerose – Die atheroprotektive Wirkung von ApoE

Die Entstehung von Gefäßwandverdickungen und Einengungen des Lumens durch atherosklerotische Plaques beruht auf mehreren begünstigenden Faktoren. Dazu gehören vor allem die Hypercholesterolämie, eine prothrombotische Gerinnungssituation, und verstärktes mitogenes Signalling aufgrund von oxidativem oder hämodynamischem Stress (Hypertonie). Auch Entzündungsreaktionen spielen hierbei eine Rolle. Auf Seiten der Gefäßwand haben Makrophagen, glatte Muskelzellen und das Endothel Anteil an der Reaktion. Regulierend wirken zwischen diesen beiden Parteien unter anderem VLDLR und LRP1 aus der LDLR-Familie (Herz und Hui., 2004).

Das Endothel sitzt als einschichtiger, lückenloser Belag von flachen, polygonalen Zellen der Basallamina auf und trennt den Intravasalraum (Lumen) von den tieferen Wandschichten. Die einzelnen Zellen sind durch Adhärenzkontakte sowie durch Tight-Junctions und Gap-

Junctions miteinander verbunden. Durch Risse im Endothel können Lipide, Cholesterol und Makrophagen aus dem Blut eindringen (Schwandt und Parhofer, 2007).

LRP1 ist auf endothelialen Zellen nicht so stark exprimiert wie VLDLR, doch binden beide TFPI (tissue factor pathway inhibitor), einen Inhibitor der Gerinnungsfaktoren VIIa und Xa (Hembrough et al., 2001).

Makrophagen gehören zur Familie der Leukozyten. Sie stellen eine große Gruppe oft gewebespezifischer Zellen dar, die alle aus Monozyten entwickeln, Partikel aller Art und Größe phagozytieren können und an der unspezifischen und spezifischen Immunabwehr mitwirken. Monozyten und aktivierte Makrophagen kommen in der gesunden Gefäßwand normalerweise nicht vor, spielen aber eine wichtige Rolle während der Entwicklung von Plaques. Sie wandern dann in die Gefäßwand ein, wenn es zu einer Verletzung des Endothels gekommen ist. Solche Verletzungen entstehen zum Beispiel durch hohe Blutdrücke, thrombotische Geschehen oder durch lokale Entzündungsreaktionen aufgrund einer Infektion oder einer Ansammlung von Cholesterol und oxidativen Nebenprodukten in der subendothelialen Schicht. Eine Hypercholesterolemie erhöht die Produktion von radikalem Sauerstoff und Stickstoff. Diese Radikale oxidieren und peroxidieren Proteine, Lipide und Lipoproteine. Oxidierte LDL, die sich in der Gefäßwand anreichern, stoßen die Apoptose von Zellen an und tragen dabei verstärkt zur Bildung von atherosklerotischen Veränderungen und Plaque-instabilität bei (Napoli et al., 2000, 2001 u. 2002; Schreyer et al., 2002; Boullier et al., 2001). Dabei beruht die Cholesterolanreicherung auf Proteoglycanen der Intima, die internalisierte LDL-Partikel und somit Cholesterol anhäufen (Pentikainen et al., 1996; Camejo et al., 1993). Die eingewanderten Makrophagen beginnen, die Lipidablagerungen zu phagozytieren. Dabei werden sie zu sogenannten Xanthomzellen oder Schaumzellen (schaumiges Aussehen im mikroskopischen Präparat). Neben dem Typ-A Scavenger-Rezeptor SR-A und dem Typ-B Scavenger-Rezeptor CD36 ist LRP1 maßgeblich an Funktionen von Makrophagen beteiligt. LRP1 vermittelt über das intrazelluläre Adapterprotein GULP die Aufnahme von LDL und apoptotischen Zellen und Trümmern (Llorente-Cortes et al., 2000; Su et al., 2002). Durch die Aufnahme von ApoE über LRP1 wird auch ein Teil des von Makrophagen ausgeschütteten ApoE-gebundenen Cholesterols wieder aufgenommen. Im Rahmen des reversen Cholesteroltransportes zurück zur Leber trägt die Ausschüttung von ApoE zur Vermeidung von Schaumzellbildung und Atherosklerose bei.

Glatte Muskelzellen, die ebenfalls an der Entstehung von Atherosklerose beteiligt sind, liegen für gewöhnlich, gemeinsam mit elastischen und kollagenen Fasern, zirkulär oder in flachen Spiralen angeordnet in der Tunica Media der Gefäßwand. Kommt es nun durch einen Intima-Einriss oder einen chronischen Entzündungszustand zu einem Kontakt zwischen glatten Muskelzellen und PDGF aus Thrombozyten, so beginnen die Muskelzellen zu proliferieren und in die Intima einzuwandern (Ross, 1993). Dabei überziehen sie bereits vorhandene Fettablagerungen mit einer fibrösen Gewebeschicht und schaffen so eine stabile Plaque.

LRP1 erfüllt eine Doppelrolle bei der Proliferation und der Migration von glatten Muskelzellen in der Gefäßwand. Einerseits hemmt LRP1 die uPA-abhängige Migration durch Bindung und Internalisierung von uPA und dem uPA-Plasminogen Aktivator Inhibitor-1-uPA-Rezeptor Komplex (Nykjaer et al., 1992). Andererseits hemmt LRP1 nach Bindung von ApoE auch die PDGF-abhängige Migration und Proliferation (Swertfeger et al., 2002). Zusätzlich kann LRP1 durch Bindung von uPA, tPA und PAI-1 Einfluss auf den Gefäßtonus nehmen kann (Nassar et al., 2002 u. 2004).

Die Rolle von LRP1 bei der Entstehung der Atherosklerose zeigt die Vielfältigkeit dieses Rezeptors. Fehlt ApoE, erfolgt das Signal zur Proliferation der glatten Muskelzelle. Wird ApoE gebunden, wird der Endozytoseweg beschritten, also die Internalisierung des Rezeptors mitsamt seinem Liganden. Dabei entscheidet sich, welche Adapterproteine an die ICD binden, und welche Signalkaskaden daraufhin ablaufen.

Ohne Bindung von ApoE fungieren LRP1 und der PDGF-Rezeptor- β als Co-Rezeptoren für die Signaltransduktion (Boucher et al., 2002; Loukinova et al., 2002). Die Src-Kinase phosphoryliert den Tyrosinrest im distalen NPxY-Motiv der ICD. Shc bindet mit seiner PTB-Domäne daran und aktiviert über GRB2 und SOS den Ras/RAF/MAPK Signalweg, der die Zelle zur Proliferation bringt (Barnes et al., 2001).

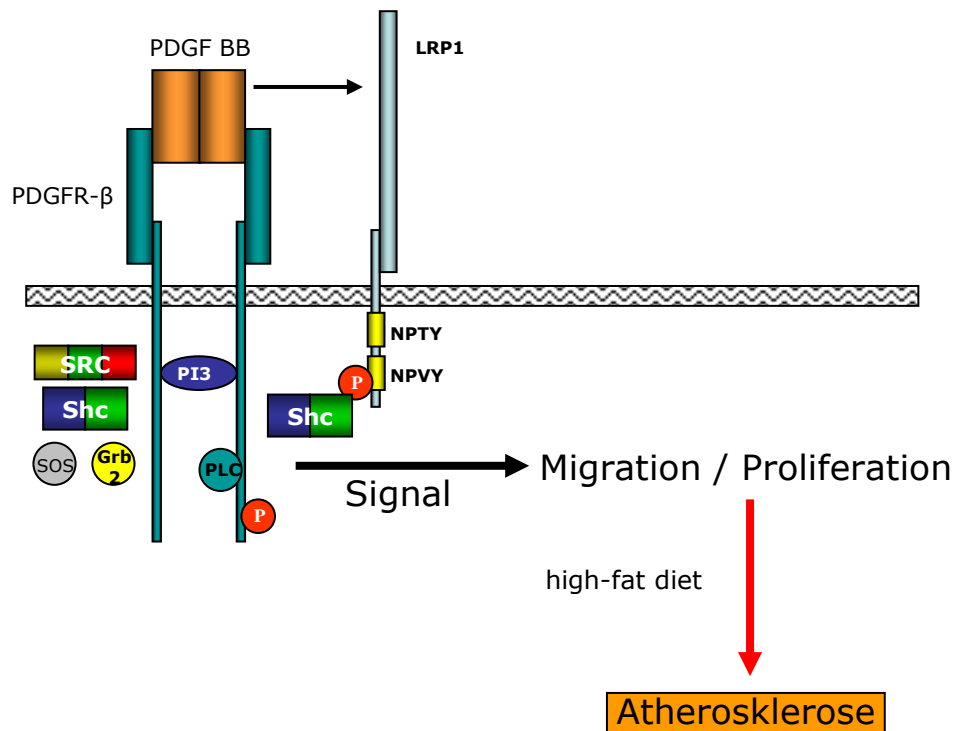


Abbildung 7a: LRP1 als Co-Rezeptor des PDGF-Rezeptor-β in der Atherosklerose (nach Boucher 2004)

Durch PDGF-BB kommt es zur Anregung der Zelle zur Migration bzw. Proliferation. In glatten Muskelzellen kommt es dadurch zur Entstehung von atherosklerotischen Plaques. Nähere Erläuterungen im Text.

Bindet ApoE an LRP1, wird die Phosphorylierung am distalen NPxY-Motiv unterbunden, und es können Dab2 und ARH (oder ähnliche PTB-Proteine) binden, zwei Adapterproteine, die mit Aktin und Myosin VI aus dem Endozytose-Apparat interagieren (Boucher et al., 2002; Mishra et al., 2002; Morris et al., 2002; He et al., 2002).

Im Rahmen der Internalisierung ist der LDL-Rezeptor auf funktionsfähiges ARH angewiesen. Kommt es durch eine autosomal rezessiv vererbte Mutation zu einem Funktionsverlust von ARH, kommt es klinisch zu einer Hypercholesterolämie, ganz ähnlich der familiären Hypercholesterolämie. Die Internalisierung von LRP1 bleibt unverändert, obwohl ARH auch zu den intrazellulären Adapterproteinen von LRP1 gehört (Maurer et al., 2006; Jones et al., 2003). Möglicherweise erfüllt PID1 eine vergleichbare Aufgabe für die Internalisierung von LRP1 wie ARH für den LDL-Rezeptor (persönliche Mitteilung von Britta Hoffzimmer, Arbeitsgruppe "Adapterproteine und Signaltransduktion von LRP1", Prof. Dr. Schmale).

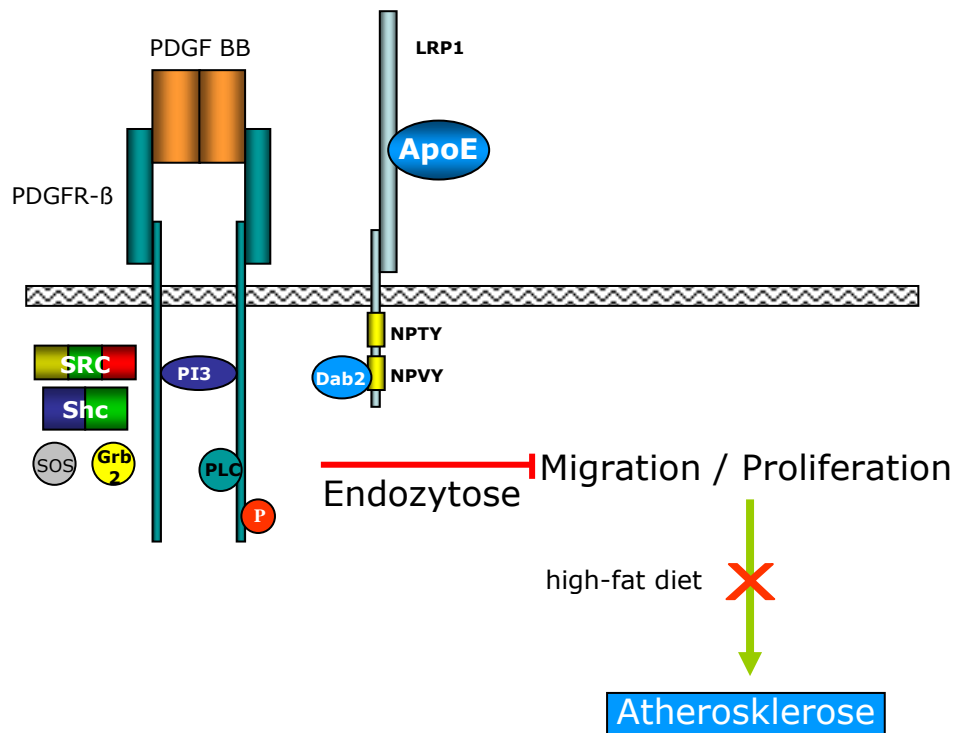


Abbildung 7b: LRP1 als Co-Rezeptor des PDGF-Rezeptor- β in der Atherosklerose (nach Boucher 2004)

Bindet ApoE an LRP1 kommt es zur Bindung von Dab2 an die ICD. Dies führt zu einer schnellen Internalisierung des Rezeptors und hemmt die Migration bzw. Proliferation. Auf diese Weise wirkt sich ApoE protektiv auf die Atherosklerose aus. Nähere Erläuterungen im Text.

In Experimenten mit LDLR-Knockoutmäusen, denen zusätzlich LRP1 in glatten Gefäßmuskelzellen durch einen gewebespezifischen Knockout fehlte, zeigten sich eine schwere Hyperplasie der Aorta und eine verstärkte Neigung zu atherosklerotischen Veränderungen. Immunhistochemisch konnte eine Überexpression des PDGF-Rezeptors und eine massiv gesteigerte Aktivität des PDGF-Signalweges nachgewiesen werden. Ohne LRP1 fehlt offensichtlich auch die Schutzfunktion von ApoE. Durch eine Behandlung mit dem PDGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor STI 571 (Gleevec, Novartis) traten die Veränderungen viel weniger stark auf. Dies legt nahe, dass der PDGF-Signalweg maßgeblich für Entstehung und Ausprägung der Atherosklerose ist (Boucher et al., 2003).

1.4 LRP1 - Intrazelluläre Adapterproteine

Ursprünglich wurde angenommen, dass die LDL-Rezeptorfamilie eine Gruppe von reinen Endozytose-Rezeptoren sei, die in einem Recycling-Kreislauf zwischen Cytosol, Lysosomen und der Zelloberfläche zirkuliert. Als bekannt wurde, dass DAB1 und Fe65 (zwei neuronale Adapterproteine, die im Zusammenhang mit der Neuronenentwicklung und der Alzheimerschen Demenz stehen) mit den zytoplasmatischen NPxY-Domänen von LDLR und

LRP1 reagieren, wurde deutlich, dass zusätzlich zur Endozytose weitere Rezeptorfunktionen bestehen könnten, zumal Dab1 und Fe65 keine bekannte Rolle in der Endozytose spielen (Trommsdorff et al., 1998). Die komplexen Krankheitsbilder, die unter Knock-Out Bedingungen einzelner Rezeptoren zu beobachten waren, ließen eine gestörte Endozytosefunktion als einzige Ursache unwahrscheinlich erscheinen. Zudem machten die beobachteten Interaktionen mit intrazellulären Adapterproteinen deutlich, dass für die diversen sich zeigenden Funktionen der Rezeptoren Verbindungen zu verschiedenen Signalwegen nötig waren.

In Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen von Gotthardt, Trommsdorff und Kollegen wurden folgende Adapterproteine von LRP1 beschrieben: Dab1, Dab2, JIP1, JIP2, GIPC1/SEMCAPI, PSD95 und CAPON. Sie alle tragen PTB-/PID- oder PDZ-Domänen, die Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen. Diese Ergebnisse erklärten die Rolle von LRP1 in der Regulation des JNK-Signalweges (JIP1, JIP2), in der Interaktion mit G-Protein-gekoppelten Signalwegen (GIPC1/SEMCAPI) und in der postsynaptischen Neurotransmission (PSD95) (Gotthardt, Trommsdorff et al., 2000).

Proteine, die eine SH2-Domäne tragen, können reversibel an phosphorylierte Tyrosinreste anderer Proteine binden (Cantley et al., 1991). Da viele intrazelluläre Signalproteine eine SH2-Domäne enthalten, kann deren Bindung bzw. Aktivierung an Rezeptoren anhängig von Tyrosin-Phosphorylierungen reguliert werden (Anderson et al., 1990). Das Adapterprotein Shc zum Beispiel enthält sowohl eine SH2- als auch eine PTB-Domäne als besonders zentrales Glied sowohl in der Vermittlung der Proliferation als auch der Apoptose (Kavanaugh et al., 1994; Songyang et al., 1994).

Bevor auf die für diese Arbeit bedeutsamen Adapterproteine genauer eingegangen wird, soll hier ein Überblick über die wichtigsten der derzeit rund dreißig bekannten intrazellulären LRP1-Adapterproteine gegeben werden.

| Intrazelluläres Adapterprotein | Funktion |
|--------------------------------|---|
| CED6 / GULP | <ul style="list-style-type: none"> • Teil der Phagozytose-Maschinerie • Evtl. Regulation des Cholesterol-Efflux |
| Dab1 | <ul style="list-style-type: none"> • Regulation verschiedener Tyrosinkinasen |
| Dab2 | <ul style="list-style-type: none"> • Teil der Endozytose-Maschinerie Zusammen mit Aktin und Myosin VI |
| Fe65 | <ul style="list-style-type: none"> • Verbindung zwischen LRP1 und APP |
| Gα _s | <ul style="list-style-type: none"> • Einfluß auf den intrazellulären cAMP-Spiegel |
| GIPC1 / SEMCAP1 | <ul style="list-style-type: none"> • Teil des Gα_s-Komplexes von Transmembran-Rezeptoren mit GAIP • Teil des Endozytose-Apparates zusammen mit Dab2 und Myosin-VI |
| JIP1 & JIP2 | <ul style="list-style-type: none"> • Gerüstprotein für den Transport entlang von Mikrotubuli • Kontrolle mitogener Faktoren |
| Mint2 & Mint3 | <ul style="list-style-type: none"> • Regulation der Prozessierung von APP |
| PKCα | <ul style="list-style-type: none"> • Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten in der LRP1-ICD |
| PSD95 | <ul style="list-style-type: none"> • Teil des Post-Synaptic-Density-Komplexes • Modulation der Leitfähigkeit von neuronalen Ionenkanälen über NMDA |
| Shc | <ul style="list-style-type: none"> • Verschiedene Funktionen während Proliferation und Apoptose |
| Shp2 | <ul style="list-style-type: none"> • Regulation während der Phagozytose |
| Snx17 | <ul style="list-style-type: none"> • Modulation von Endocytose und Endosomalen Kompartimenten • Funktion im LRP1-Recycling |

Tabelle 2: Intrazelluläre Adapterproteine von LRP1 (Auswahl)

Nähere Erläuterungen im Text.

Grundsätzlich können drei Hauptgruppen von LRP1-Adapterproteinen unterschieden werden:

1. Adapterproteine, die zum Binden auf einen phosphorylierten Tyrosinrest innerhalb des NPxY-Motivs angewiesen sind. (Shc, CED6/GULP)
2. Adapterproteine, die keine Phosphorylierung zur Bindung benötigen. (Fe65, Dab1/2)
3. Adapterproteine, die funktionale Komplexe mit LRP1 eingehen, ohne direkt mit der ICD verbunden zu sein. (PKCα)

Damit wird bereits bei der Phosphorylierung bzw. Nicht-Phosphorylierung der LRP1-ICD festgelegt, welche Adapterproteine binden können, und welche in diesem Moment von einer Interaktion ausgeschlossen sind.

Damit Adapterproteine, die wie Shc oder CED6/GULP eine Phosphotyrosin-bindende Domäne (PTB) tragen, an das distale NPxY-Motiv von LRP1 binden können, muss der Tyrosinrest dort phosphoryliert sein. Dies wird von der Tyrosinkinase Src gewährleistet (Barnes et al., 2001). Die von der PKA und der PKC α bewirkte Serin-/Threonin-Phosphorylierung wirkt sich hierbei fördernd und stabilisierend auf die Tyrosin-Phosphorylierung aus (s. Abbildung 11) (Ranganathan et al., 2004; Li et al., 2000). Näheres dazu findet sich in den folgenden Kapiteln.

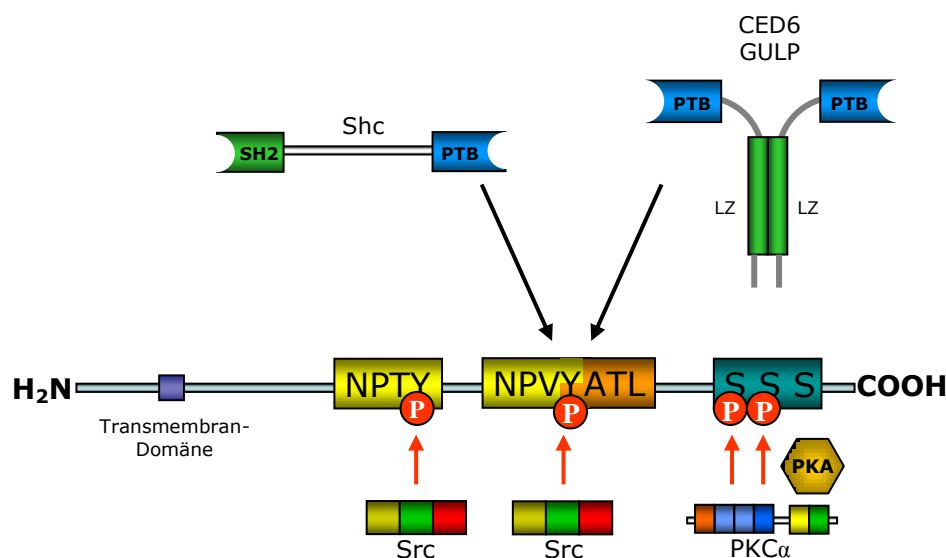


Abbildung 8: Die LRP1-ICD im phosphorylierten Zustand (nach Schreiber, 2007)

Die Adapterproteine Shc und CED6/GULP sind für ihre Bindung an LRP1 auf den phosphorylierten Tyrosinrest im distalen NPxY-Motiv angewiesen. Die Serin-/Threonin-Phosphorylierung wirkt sich stabilisierend aus. Weitere Erläuterungen im Text.

Andere Adapterproteine können nur mit den unphosphorylierten NPxY-Motiven von LRP1 interagieren. Dab1 bindet an dabei an das distale, während Fe65 an das proximale NPxY-Motiv bindet und eine Verbindung zum Amyloid-Precursor-Protein (APP) herstellt (s. Abbildung 12) (Waldron et al., 2006, Trommsdorff et al., 1998).

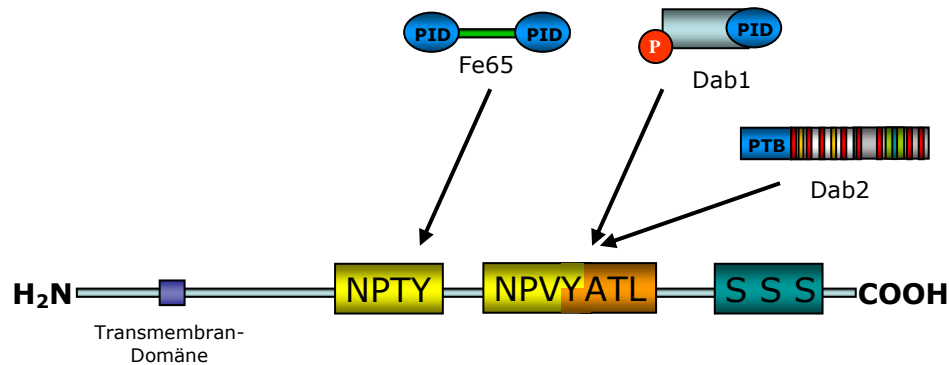


Abbildung 9: Die LRP1-ICD im unphosphorylierten Zustand (nach Schreiber 2007)

Die Adapterproteine Dab1 und Dab2 bevorzugen für Ihre Bindung an LRP1 das unphosphorylierte Tyrosin im distalen NPXY-Motiv. Fe65 bindet an den unphosphorylierten Tyrosinrest im proximalen NPXY-Motiv. Weitere Erläuterungen im Text.

Im Folgenden soll auf diejenigen Adapterproteine eingegangen werden, die in dieser Arbeit auf ihr Bindungsverhalten hin untersucht wurden.

1.4.1 CED-6/GULP – Signalling in der Phagozytose

Aufnahme und Abbau apoptotischer Zellen und Debris (Phagozytose) spielen eine zentrale Rolle während der Entwicklung, der Organbildung, der Immunantwort und der Wundheilung, bzw. in der Autoimmunität.

Erkennt ein Phagocyt eine apoptotische Zelle, werden anti-inflammatorische Cytokine ausgeschüttet. Zudem stellt Phosphatidylserin an der Oberfläche der apoptotischen Zelle ein Signal dar, das anti-immunogen und anti-inflammatorisch auf den Phagozyten wirkt (Fadok et al., 2001; Hoffmann et al., 2005). Im Gegensatz dazu fördert das Erkennen einer nekrotischen Zelle die inflammatorische Reaktion.

Die Aufnahme von abgestorbenen Zellen und sonstigem Debris geschieht, indem die apoptotische oder nekrotische Zelle von einem Phagocyten spezifisch erkannt und gebunden wird (über Rezeptoren wie LRP1/CD91, CD36, CD14, ABCA1, ABCA7, C1q-Rezeptor, Lektine, Integrine uva.) (Grimsley und Ravichandran, 2003).

Die Zellmembran des Phagocyten stülpt sich ein, und durch Signale über bestimmte Zelloberflächenrezeptoren und Adapterproteine wie LRP1 und CED6/GULP (siehe unten) wird Aktin hinzugezogen, sodass die apoptotische Zelle im Ganzen phagozytiert werden kann. Ist dies geschehen wird das aufgenommene Material zur endgültigen Degradation vorbereitet.

Für die Regulation der Phagozytose wird ein Gleichgewicht aus “iss-mich“- und “iss-mich-nicht“-Signalen an der Zelloberfläche postuliert. Calreticulin, eigentlich ein “iss-mich“-Signal, ist auch auf der Oberfläche gesunder Zellen exprimiert. Allerdings überwiegt zu diesem Zeitpunkt das “iss-mich-nicht“-Signal, das u.a. über CD47 vermittelt wird. Durch Bindung von CD47 an SIRP α wird über Shp1 und Shp2 die Endozytose-Maschinerie inhibiert (Kharitonov et al., 1997; Latour et al., 2001). Geht die Zelle in die Apoptose, kommt es zu einer Reduzierung und Umverteilung von CD47 an der Oberfläche. Dagegen nimmt die Menge an Calreticulin und Phosphatidylserin zu. Durch die Bindung von Calreticulin an LRP1 kommt es über CED6/GULP zur Aktivierung von CED10/Rac-1, einem Protein aus der Rho-Familie, das eine zentrale Rolle während der Phagozytose einnimmt. (Gardai et al., 2005).

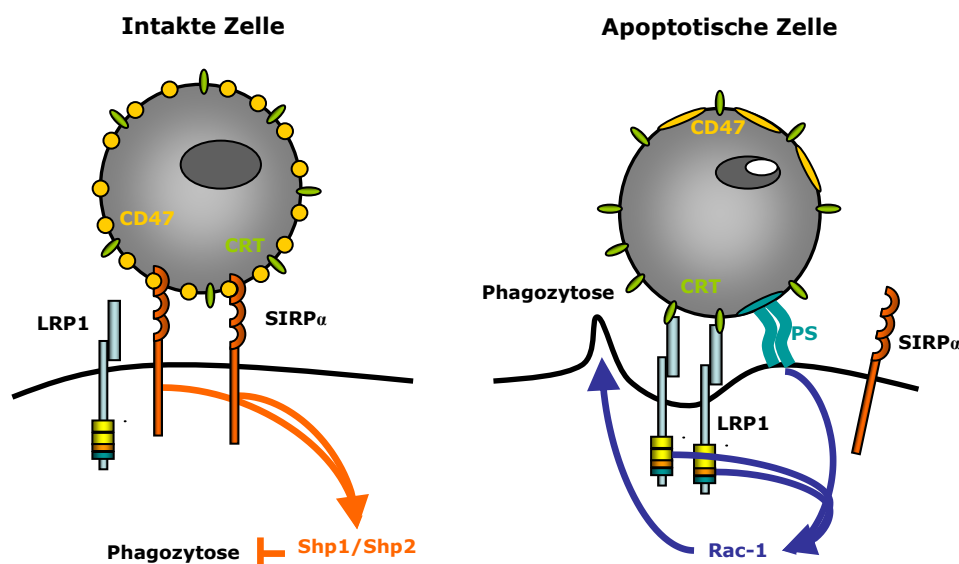


Abbildung 10: Erkennung intakter und apoptotischer Zellen (mod. nach Gardai et al. 2005)

Intakte Zellen exprimieren CD47 an Ihrer Oberfläche. SIRP α (Signal-Inhibitory-Regulatory-Protein α) an der Oberfläche von Phagozyten erkennt CD47 und hemmt via Shp1/Shp2 die Phagozytose (links). Apoptotische Zellen exprimieren vermehrt Calreticulin (CRT), Phosphatidylserin (PS) und weniger CD47. Calreticulin wird von LRP1 gebunden und aktiviert über Rac-1 die Phagozytose (rechts). Nähere Erläuterungen im Text.

Je nach dem, ob eine apoptotische Zelle, oder eine nekrotische Zelle aufgenommen werden soll, können ultrastrukturell zwei unterschiedliche Formen der Phagozytose beobachtet werden. Apoptotische Zellen werden eng von der Zellmembran des Phagozyten umfahren, so dass sich ein eng anliegendes Phagolysosom bildet (Krysko et al., 2006; Giles et al., 2000). Im Gegensatz dazu werden nekrotische Zellen in geräumigeren, flüssigkeitsgefüllten Blasen internalisiert, ähnlich Makropinosomen (Krysko et al., 2006; Gardai et al., 2005). Dennoch wird davon ausgegangen, dass apoptotische und nekrotische Zellen dasselbe Signalsystem zur

Aufnahme benutzen (Chung et al., 2000). Es ist jedoch zurzeit nicht bekannt, wie die Art der Aufnahme entsprechend ausgelöst wird.

Es existiert eine spezialisierte Maschinerie, die vor allem durch Studien in *Caenorhabditis elegans* beschrieben wurde. Dementsprechend wurden beteiligte und charakterisierte Proteine an der Zelloberfläche und im Zellinnern CED-1 bis CED-12 benannt. Vergleiche in Gendatenbanken ergaben, dass dieses System konserviert von Nematoden wie *C. elegans* bis hin zu Säugetieren besteht. So stellten sich bereits bekannte Säuger-Proteine als Orthologe zu CED-1 usw. heraus (siehe Tabelle 5)

| <i>C. elegans</i> (CED-x) | Ortholog in Säugetieren |
|---------------------------|-------------------------|
| CED-1 | LRP1 |
| CED-2 | CrkII |
| CED-3 | Caspase (?) |
| CED-5 | Dock180 |
| CED-6 | GULP |
| CED-7 | ABCA1 |
| CED-10 | RAC1 |
| CED-12 | ELMO |

Tabelle 3: Proteine der Phagozytose in *C. elegans* und Orthologe in Säugetieren.

Das Ortholog zu CED-6 in *C. elegans* ist GULP (Engulfment Protein) in Säugetieren. GULP ist ein intrazelluläres Adapterprotein von LRP1. Es setzt sich zusammen aus einer N-terminalen PTB-Domäne, einem anschließenden Leucin-Zipper und einer Prolin-reichen C-terminalen Region. Über den Leucin-Zipper können sich die aktiven GULP-Homodimere bilden (Su et al., 2000). Mit der PTB-Domäne kann GULP an das distale NPxY-Motiv der LRP1-ICD binden (Su et al., 2002). Diese Bindung ist abhängig von der Phosphorylierung des Tyrosinrestes durch die Src-Kinase. Zusätzlich hat auch die Serin-/Threonin-Phosphorylierung durch die PKCa (siehe auch dort) einen regulierenden Einfluss auf die Bindung (Ranganathan et al., 2004).

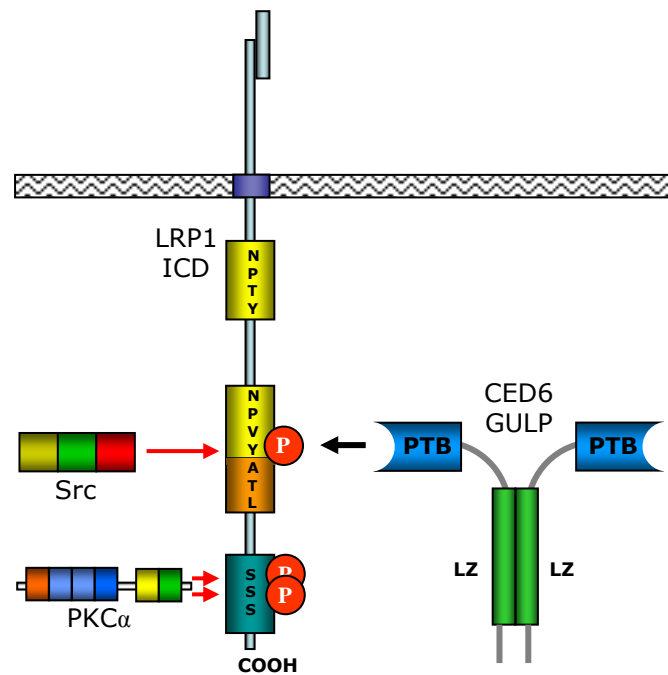


Abbildung 11: Interaktion von LRP1 und CED6/GULP (nach Kinchen und Ravichandran, 2007; Ranganathan et al., 2003; Su et al., 2001 und 2000)

Die Src-Kinase phosphoryliert den Tyrosinrest im distalen NPxY-Motiv der LRP1-ICD. Die Serin-/Threonin-Phosphorylierung durch die PKCα wirkt stabilisierend. CED6/GULP bindet an das phosphorylierte Tyrosin. Weitere Erläuterungen im Text.

CED-10 bzw. Rac1 aus der Rho-Familie stellt ein zentrales Protein während der Phagozytose von apoptotischen Zellen und Debris dar. Es werden zwei Wege beschrieben, die zur Aktivierung von Rac1 und damit zu einem Rearrangement von Aktin und schließlich zur Phagozytose des apoptotischen Materials führen (Kinchen et al., 2005). Ein Weg schließt CED-1, CED-6 und CED-7 ein, also LRP1, GULP und ABCA1 in Säugerzellen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in *C. elegans* zeigten, dass CED-1 und CED-6 vor allem in der Frühphase der Phagozytose noch vor dem Aktin-Rearrangement kolokalisieren und sich um die apoptotische Zelle herum sammeln. Dies legt eine Beteiligung an der Erkennung apoptotischer Zellen nahe, wobei Calreticulin an der Zelloberfläche als Ligand für CED-1 eine Rolle spielt (Gardai et al., 2005). Ein zweiter Weg führt über CED-2, CED-5 und CED-12 bzw. CrkII, Dock180 und ELMO in Säugerzellen, möglicherweise durch Bindung von Phosphatidylserine der apoptotischen Zelle an entsprechende Rezeptoren des Phagozyten. Dieser Weg wurde sowohl für die Phagozytose als auch für die Migration beschrieben (Conradt, 2001; Gumienny et al., 2001).

Da die Komponenten dieser Phagozytose-Maschinerie hochgradig konserviert sind, lassen sich die Ergebnisse aus den Studien in *C. elegans* möglicherweise auf entsprechende Prozesse in Säugetierzellen übertragen.

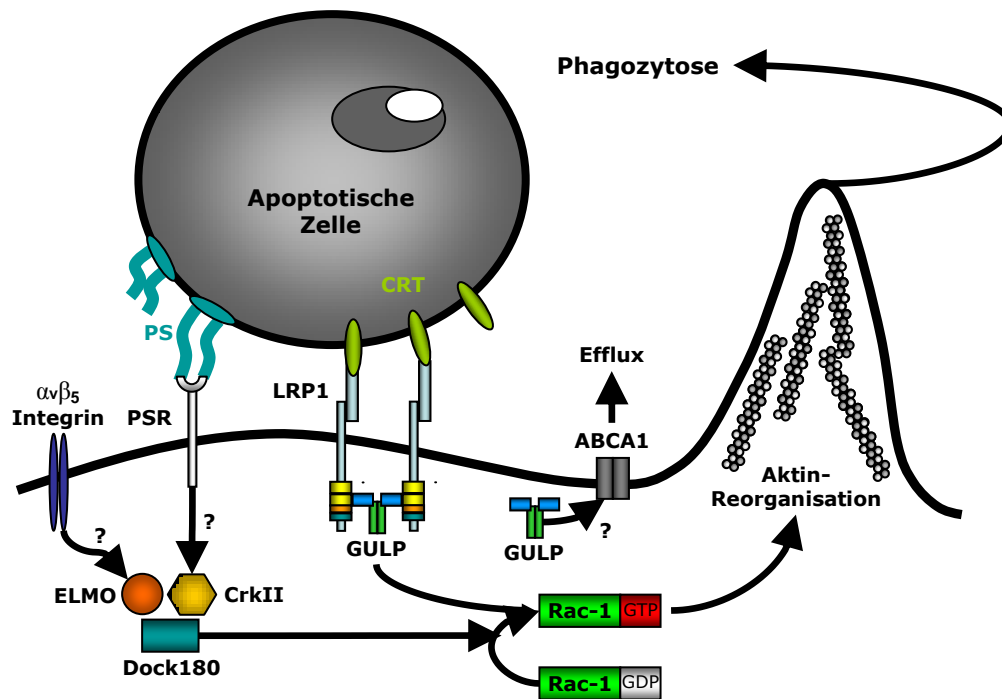


Abbildung 12: Wege zur Aktivierung der Phagozytose (mod. nach Kinchen und Ravichandran, 2007)

Anstelle der CED-Nomenklatur wurden die einzelnen Proteine entsprechend ihren Säugetier-Homologen bezeichnet. Abkürzungen: CRT: Calreticulin; PS: Phosphatidylserin; PSR: Phosphatidylserin-Rezeptor. Weitere Erläuterungen im Text.

ABCA1 (ATP-Binding Cassette Transporter A-1) ist ein wichtiger membranständiger Transporter, der den Efflux von Cholesterol und Phospholipiden aus der Zelle hin zu unlipidiertem ApoA1 ermöglicht um naszierende und prä-β-HDL bilden zu können. Damit reguliert ABCA1 sowohl den intrazellulären Cholesterol- als auch den Plasma-HDL-Spiegel. Besonders Hepatozyten, aber auch Makrophagen kommt eine wichtige Stellung in der Generierung von HDL zu (Basso et al., 2002). Defekte im ABCA1-Gen führen zu niedrigsten Plasma-HDL Spiegeln durch verminderten Cholesterol-Efflux und zur Akkumulation von Cholesterolestern in verschiedenen Geweben, vor allem auch in Makrophagen der Gefäßwand (Atherosklerose) (Christiansen-Weber et al., 2000; Orso et al., 2000; McNeish et al., 2000). Das klinische Bild ist die Tangier-Krankheit (Brousseau et al., 2000; Bodzioch et al., 1999; Lawn et al., 1999; Remaley et al., 1999; Rust et al., 1999).

Im Zusammenhang mit dem Phagozytose-Signalling über LRP1 und GULP kommt ABCA1 die Rolle der Entsorgung von phagozytiertem und degradiertem Material zu. So wird gewährleistet, dass in der Zelle zu jeder Zeit genügend Raum für neue Phagozytose-Aufgaben vorhanden ist. Daneben hat ABCA1 offensichtlich auch Anteil an der Erkennung apoptotischer Zellen.

Defekte in der Phagozytose von apoptotischen Zellen werden auch mit der Entstehung von Krankheiten in Verbindung gebracht. So werden Macrophagen mit verlangsamter bzw. reduzierter Aktivität in atherosklerotischen Plaques beschrieben (Schrijvers et al., 2005). Ebenso wurden bei Patienten mit Systemischem Lupus Erythematosus (SLE), einer Autoimmun-Erkrankung, Macrophagen mit Defekten in der Phagozytose beobachtet (Tas et al., 2006). Es wird sogar die These diskutiert, dass verzögerte Phagozytose von apoptotischen Zellen und Debris allgemein zu einer verstärkten Exposition von Autoantigenen und dadurch zu Autoimmunkrankheiten führt.

1.4.2 Dab2 – Partner während der Endozytose

Analog zur Phagozytose, die die Aufnahme von großen extrazellulären Partikeln wie z.B. Zellen oder Debris beschreibt, werden bei der Endozytose und der Pinozytose Moleküle bzw. Flüssigkeiten aufgenommen (Lodish et al., 2001). Die Zellmembran wird dabei nach innen gestülpt, abgeschnürt und in Form von Vesikeln (von Zellmembran umgebene Bläschen, in denen das aufgenommene Material eingeschlossen ist) in das Zellinnere gebracht, wo sie mit Endosomen und dem endo-lysosomalen Membransystem verschmelzen können. Die Endozytose ist wichtig für das Recycling von Membranlipiden und Proteinen und ist an der Regulierung der Rezeptordichte in der Zellmembran beteiligt. Diese Prozesse werden auch von Pathogenen und Toxinen genutzt, um ins Zellinnere zu gelangen.

Die Aufnahme von Material über Clathrin-coated Pits ist schon seit rund 40 Jahren bekannt und kann durch Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden. Die verschiedenen Endozytosekomplexe sammeln sich an der Plasmamembran, erkennen durch entsprechende Rezeptoren ein Cargo und werden tropfenförmig nach innen abgeschnürt. Die Vesikel verlieren bald darauf ihre Ummantelung und verschmelzen mit frühen Endosomen, denen sie ihren Inhalt übergeben. Seit einiger Zeit wird auch noch eine weitere Variante ohne Clathrin-Ummantelung beschrieben (Smythe et al., 2006; Soldati, 2006).

Der Ablauf der Endozytose kann grob in drei Abschnitte geteilt werden. Mithilfe von Echtzeit-Fluoreszenzmikroskopie bei Hefen unterscheidet man eine unbewegliche Phase, eine Phase der langsamen Bewegung und eine Phase der schnellen Bewegung. Dahinter verbirgt sich die Bildung des „Mantels“ aus Clathrin und dem Clathrin-Adapterprotein AP-2 an der Membran-Innenseite, die Rekrutierung von Aktin und Co-Faktoren und das Ablösen und Abtransportieren des Vesikels.

Clathrin und andere Proteine legen sich in dem Membranbereich an, der aufgenommen werden soll. In diesem Bereich liegen oftmals Rezeptoren samt Liganden, die entsprechende

Regulationsproteine für die Endozytose und die anschließende Weiterleitung notwendig machen. Aktin und seine Co-Faktoren wie Arp2/3, N-WASP (Kessels und Qualmann, 2002; Otsuki et al., 2003), Syndapin, Cortactin (Merrifield et al., 2005), Intersectin und andere Regulatoren werden rekrutiert. Die Zellmembran wird nach innen gestülpt, bis das neue Vesikel durch die GTPase Dynamin und anderen Proteinen abgeschnitten wird (Song und Schmid, 2003). Entlang der fertig ausgebildeten Aktin-Bahnen wird es dann zügig abtransportiert.

Die rezeptorvermittelte Endozytose und ihre Regulierung sind von großer Bedeutung für die gezielte Aufnahme bestimmter Substanzen. So werden z.B. LDLR und LRP1 nach Bindung von ApoE außerhalb und Dab2 innerhalb der Zelle schnell internalisiert. Dabei besteht eine Interaktion von Dab2 mit Mitgliedern der LDL-Rezeptorenfamilie (Dance et al., 2004; Morris et al., 2001) und mit Myosin VI, das zusammen mit Aktin Grundelemente der Endozytose-Maschine darstellt (s.u.). Obwohl Aktin für die Endozytose sehr wichtig ist, scheint es dennoch in einigen Fällen nicht zwingend erforderlich zu sein. Eine Hemmung von Aktin mit Latrunculin A bewirkte in einigen Zellen nur eine Einschränkung, nicht aber ein Ausbleiben der Endozytosefunktion (Fujimoto et al., 2000).

Dab2

Dab2 (Disabled-2) ist ein weit verbreiteter Verwandter von Dab1 (Disabled-1), einem Neuronen-spezifischen Protein, das an die intrazellulären Domänen von LDLR, LRP1 und APP bindet und an der Aktivierung von Signalwegen über die Tyrosinkinase Src, Fyn und Abl beteiligt ist (Trommsdorff et al., 1998).

Dab2 (auch DOC-2 genannt) wird als putativer Tumor-Suppressor beschrieben, der am Membranrezeptor-Turnover, an der Endozytose sowie an zellulären Signalwegen beteiligt ist. Es ist ein komplexes Protein, das wie Dab1 eine N-terminale PTB-Domäne und mehrere gut beschriebene Protein-Bindungsstellen trägt. Mit der PTB-Domäne kann Dab2 an eine Reihe von Zelloberflächen-Rezeptoren binden, die ein konserviertes NPxY-Motiv in ihrer intrazellulären Domäne tragen. Dazu zählen unter anderem Mitglieder der LDL-Rezeptor-Familie (LDLR, LRP1, ApoER2/LRP8), der Amyloid Precursor Protein Familie (APP, APLP1, APLP2) sowie SHIP (Morris et al., 2001). Dab2 bevorzugt wie Dab1 das unphosphorylierte Tyrosin innerhalb des, bei LRP1 distalen, NPxY-Motivs für die Bindung, im Gegensatz zu Adaptoren wie Shc und CED6/GULP, die hier für ihre Bindung Phosphotyrosin benötigen (Howell et al., 1999; Batzer et al., 1995). Zugleich kann Dab2

mithilfe der PTB-Domäne auch an Phosphoinositid-haltige Lipide binden, wie sie in der Zellmembran vorkommen (Mishra et al., 2002).

Dab2 enthält eine Reihe von DPF-Motiven, die als Bindungsstelle für AP-2 dienen. Im selben Bereich liegen Typ-I- und -II-Bindungsstellen für Clathrin. Bereits der Abschnitt von Dab2, der die PTB-Domäne, die DPF-Motive und die „Clathrin-Box“ enthält, bewirkt *in vitro* die Bildung von Clathrin-Coated Pits (Mishra et al., 2002).

Weiterhin trägt Dab2 fünf NPF-Motive, an die Eps15-Homology- (EH-) Domänen binden können, wie sie in einer Vielzahl von Endozytose-Proteinen vorkommen.

Dab2 kann mithilfe seiner C-terminalen Serin- und Prolin-reichen Region an den C-terminalen globulären Abschnitt von Myosin-VI binden (Inoue et al., 2002; Morris et al., 2002). So erfüllt Dab2 mit seinen zahlreichen Interaktionen die Voraussetzungen für eine Rolle als zentrales Adapterprotein während der Endozytose (Hasson et al., 2003).

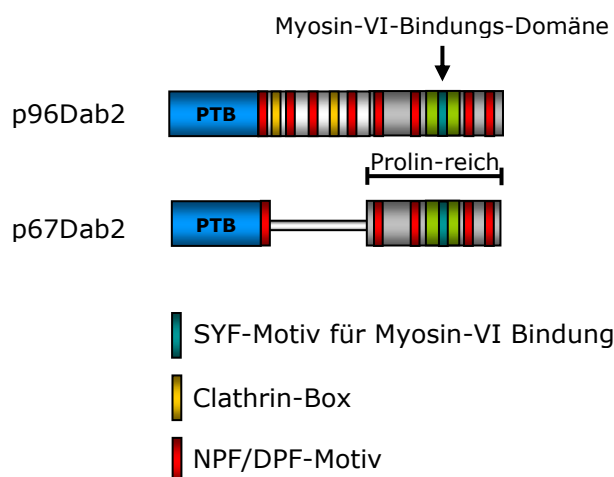


Abbildung 13: Das Adapterprotein Dab2 (mod. nach Hasson et al., 2003)

Dab2 liegt in mehreren Spleiß-Varianten vor, hier sind die beiden häufigsten mit wichtigen Bindungsstellen dargestellt. Der p67Dab2-Variante fehlen die Domänen für die Bindung von Clathrin und AP-2. Weitere Erläuterungen im Text.

Zudem zeigten Dab2-Knockout-Mäuse Anzeichen einer verminderten Endozytose-Funktion. In Nierenzellen des proximalen Tubulus war die Zahl der Clathrin-coated Pits verringert sowie die Aminosäure- und Vitaminaufnahme gestört. Dies wurde auf eine geringere Megalin-Endozytose-Rate zurückgeführt (Morris et al., 2002).

Myosin-VI in der Endozytose

Myosin-VI ist eines von derzeit etwa 18 bekannten Mitgliedern der großen Familie der Myosine. Allen gemein ist eine konservierte Domäne, die an F-Aktin-Mikrofilamente bindet

und unter hydrolytischer Spaltung von ATP eine Vorwärtsbewegung entlang des Filaments ermöglicht (Berg et al., 2001). Myosin-VI ist das derzeit einzige bekannte Familienmitglied, das sich entlang der Aktinfilamente im Sinne der Endozytose von der Zelloberfläche hin zum Zellinneren bewegt (Cramer, 2000; Wells et al., 1999).

Es werden zur Zeit drei Theorien über die Funktionen von Myosin-VI während der Endozytose diskutiert, die hier anhand einer durch Mikrovilli vergrößerten Oberfläche dargestellt werden: 1. Transport von ligandengebundenen Rezeptoren hin zu Endozytose-Zonen. Hierbei dient Myosin-VI der Verlagerung von Rezeptoren und Liganden in den Bereich der Clathrin-coated Pits am zwischen den Mikrovilli. 2. Beteiligung an der Formierung von Clathrin-haltigen Vesikeln. Beobachtungen in Zellen des proximalen Tubulus haben gezeigt, dass die Liganden vor ihrer Aufnahme in Clathrin-reichen Invaginationen angereichert werden. Während der Endozytose kommt es zu einer starken Präsenz von Myosin-VI direkt im Bereich des sogenannten "terminalen Netzes", einer dichten Struktur aus Aktin-Filamenten, die einerseits als Barriere dient, andererseits möglicherweise direkt an der Vesikelbildung beteiligt ist. 3. Transport von nicht Clathrin-haltigen Vesikeln durch das Aktin-Netz der Endozytose-Zonen hin zum frühen Endosom. Offensichtlich besteht ein Mechanismus, der den Transport der Vesikel durch dieses terminale Netz erleichtert. Myosin-VI kommt aufgrund seiner Laufrichtung entlang der Aktin-Filamente als wichtiges Glied der Transportkette in Frage, bis die Mikrotubuli für die weitere Verteilung der Vesikel im Zellinneren erreicht sind (Hasson et al., 2003).

Von diesen drei möglichen Funktionen von Myosin-VI erscheinen die Formierung von Clathrin-coated Pits sowie der Transport von nicht Clathrin-haltigen Vesikeln durch das Aktin-Netz am wahrscheinlichsten. Diese Annahme beruht auf Versuchen mit Spleißvarianten, die die Untersuchung der Funktion von Myosin-VI in separaten Endozytose-Kompartimenten ermöglichten (Aschenbrenner et al., 2003; Buss et al., 2001).

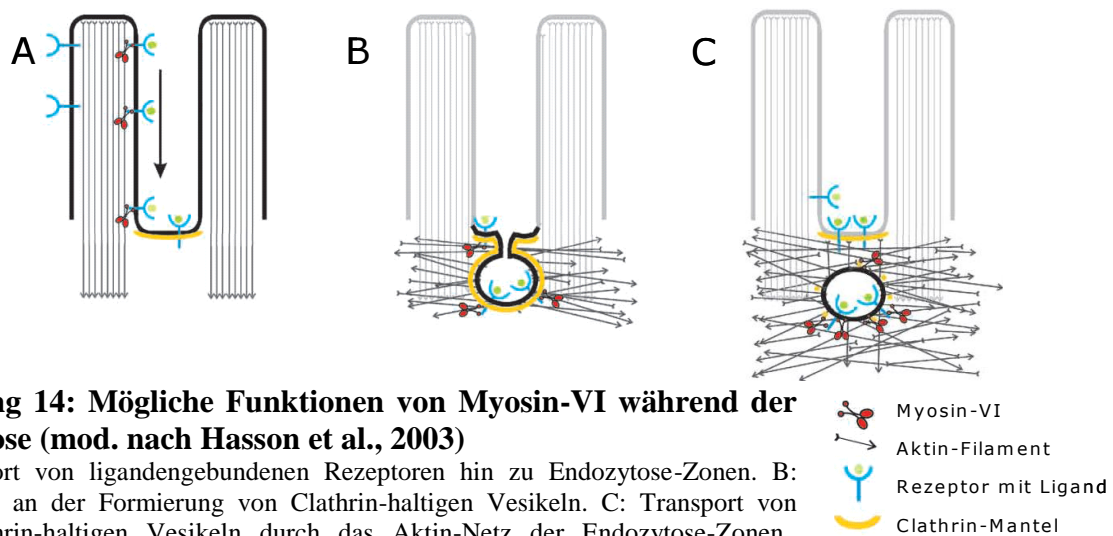


Abbildung 14: Mögliche Funktionen von Myosin-VI während der Endozytose (mod. nach Hasson et al., 2003)

A: Transport von ligandengebundenen Rezeptoren hin zu Endozytose-Zonen. B: Beteiligung an der Formierung von Clathrin-haltigen Vesikeln. C: Transport von nicht Clathrin-haltigen Vesikeln durch das Aktin-Netz der Endozytose-Zonen.. Weitere Informationen im Text.

LRP1 und Dab2

Der „Mantel“ an der Membran-Innenseite der Clathrin-coated Pits während der Endozytose wird aus Clathrin und dem Clathrin-Adapterprotein AP-2 gebildet. AP-2 besteht aus vier Untereinheiten: α , β_2 , μ_2 und σ_2 . Die α -Einheit (auch α -Adaptin genannt) rekrutiert eine Reihe von Proteinen, darunter Dab2 (p96-Variante), Amphiphysin, Eps15, auxillin, und AP180, die während der Ausbildung von Clathrin-coated Pits von Bedeutung sind (Owen et al., 1999; Traub et al., 1999). Über die β_2 -Einheit bindet AP-2 direkt an Clathrin (Gallusser et al., 1993). Die μ_2 -Einheit von AP-2 bindet an Yxx Φ - (Tyrosin-x-x-hydrophob-) Internalisierungsmotive (Owen u. Evans, 1998; Ohno et al., 1995). LRP1 trägt ein YATL-Motiv in seiner intrazellulären Domäne. Hierauf wird im Kapitel „Die β -Kette und die Intrazelluläre Domäne“ genauer eingegangen.

Nach Abspaltung von der Zellmembran und Fusion mit frühen Endosomen werden Clathrin und AP-2 abgespalten und kehren getrennt voneinander an die Zelloberfläche zurück (Schmid et al., 1997). Im Gegensatz dazu kann GIPC gebunden bleiben und ist eventuell für spätere Trafficking-Aufgaben notwendig (Hasson et al., 2003).

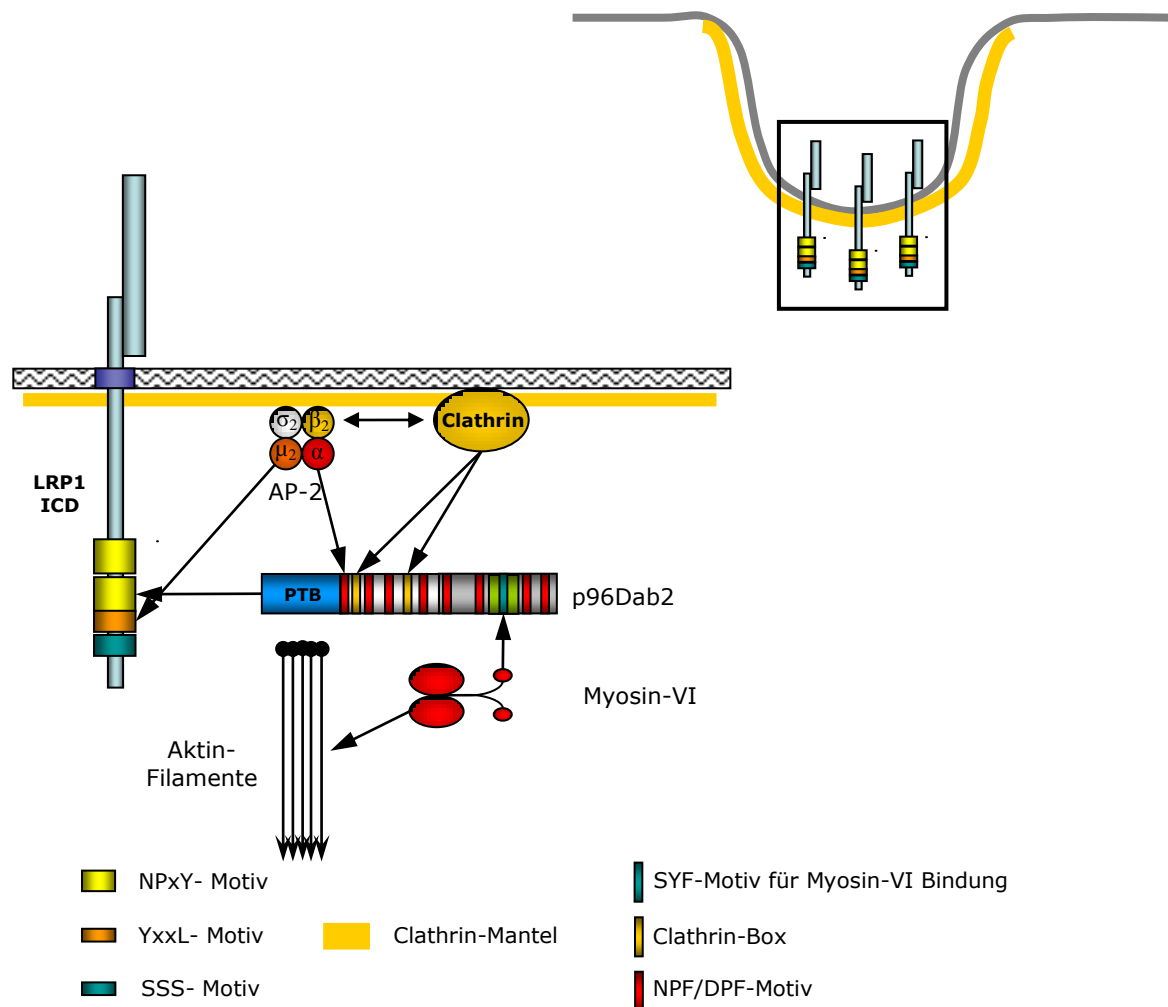


Abbildung 15: Interaktion von LRP1 und Dab2 in Clathrin-coated Pits

Es besteht ein komplexes Zusammenspiel von LRP1 und Dab2 im Bereich der Clathrin-coated Pits. Über AP-2 besteht eine Verbindung zwischen LRP1 und Clathrin; eine weitere Verbindung stellt Dab2 her. Myosin-VI steht für eine Verbindung zum Endozytose-Apparat.. Weitere Erläuterungen im Text.

1.4.3 JIP-1 – Das vielseitige Gerüst-Protein

Das c-Jun N-terminale Kinase (JNK) interagierende Protein 1 (JIP1) gehört wie auch JIP2, JIP3 und JIP4 zu einer Familie von Gerüst-Proteinen (scaffolding proteins), die N-terminal eine JNK-bindende Domäne (JBD) tragen (Dickens et al., 1997). Diese Domäne findet sich auch in anderen Proteinen, die mit JNK interagieren, so in MAPK-Kinasen und – Phosphatasen und in Substraten wie c-Jun (Sharrocks et al., 2000).

JIP1 trägt im C-Terminus eine SH3-Domäne (Src homology 3) und eine PTB-Domäne (Phospho-Tyrosin binding domain) für Protein-Protein-Interaktionen. Über die SH3-Domäne kann JIP1 Homodimere und Homo-Oligomere bilden (Kristensen et al., 2006). Das Zweite Familienmitglied JIP2 wurde aufgrund von Sequenzähnlichkeiten und der gleichen Domänen-

Struktur identifiziert und der Gruppe zugerechnet (Yasuda et al., 1999). Sowohl JIP1 als auch JIP2 gehören zu den intrazellulären Adapterproteinen von LRP1 (Gotthardt, Trommsdorff et al., 2000).

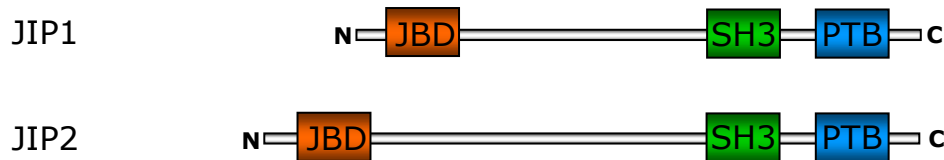


Abbildung 16: JIP1 und JIP2 (nach Whitmarsh, 2006)

Beide Proteine tragen je eine SH3- und eine PTB-Domäne und wurden als Adaptern von LRP1 beschrieben. Weitere Informationen im Text.

LRP1, JIP1 und Kinesin-1

Der Transport von Vesikeln oder Organellen muss oft lange Strecken zurücklegen. So gelangen beispielsweise Membranproteine für die Synapse eines Neurons vom Zellkörper erst nach bis zu einem Meter an ihr Ziel. Entlang der Axone entwickelte sich ein System von Mikrotubuli, an denen das Cargo von einer Vielzahl von Motorproteinen unter Verbrauch von ATP entlanggezogen wird. Zu nennen sind hier Kinesine und Dyneine, zwei Motorproteine mit unterschiedlichen Laufrichtungen entlang der Mikrotubuli. Kinesine bewegen sich meist in Richtung des Plus-Endes eines Mikrotubulus, während sich Dyneine zum Minus-Ende hin bewegen. Dies wird besonders anhand der oben als Beispiel angeführten Neuronen deutlich, wobei in den Axonen die Mikrotubuli mit dem Plus-Ende zu den Synapsen ausgerichtet sind. So übernehmen die Kinesine den anterograden, die Dyneine dagegen den retrograden Transport von Cargos (Hirokawa et al., 2004).

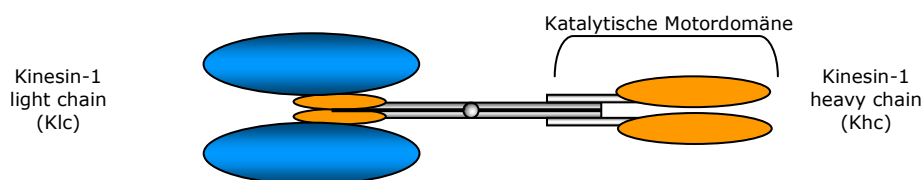


Abbildung 17: Kinesin-1 (nach Verhey und Rapoport, 2001)

Kinesin-1 besteht aus zwei leichten Ketten, die u.a. an JIP1 binden und zwei schweren Ketten, die an den Mikrotubulus binden. Weitere Informationen im Text.

JIP1 interagiert mit bestimmten Membranproteinen, so mit LRP1 (Gotthardt, Trommsdorff et al., 2000), mit APP (Taru et al., 2002) und mit ApoER2/LRP8 (Verhey et al., 2001). Als Gerüstprotein verbindet JIP1 über das Membranprotein (hier LRP1) das Vesikel mit der komplexen Transportmaschinerie, den Mikrotubuli im Inneren der Zelle. Zu diesem Komplex

zählt das Kinesin-1, bestehend aus zwei leichten Ketten (Klc), die u.a. an JIP1 binden und zwei schweren Ketten (Khc), die an den Mikrotubulus binden. (Kelkar et al., 2005; Verhey et al., 2001; Bowman et al., 2000). Inaktives Kinesin-1 liegt in einer zusammengefalteten Form vor, wobei möglicherweise C-terminale Domänen eine autoinhibitorische Wirkung auf die N-terminale Motordomäne haben. Die Bindung eines von rund dreißig beschriebenen Cargos über ein Membranprotein bewirkt das Aufklappen des Kinesin-1- Moleküls. Erst nach der Bindung von JIP1 an die leichten, und zusätzlich von FEZ1 (Faszikulation und Elongation Protein ζ 1) an die schweren Ketten, kann Kinesin-1 an einen Mikrotubulus binden und mit dem Transport beginnen (Blasius et al., 2007).

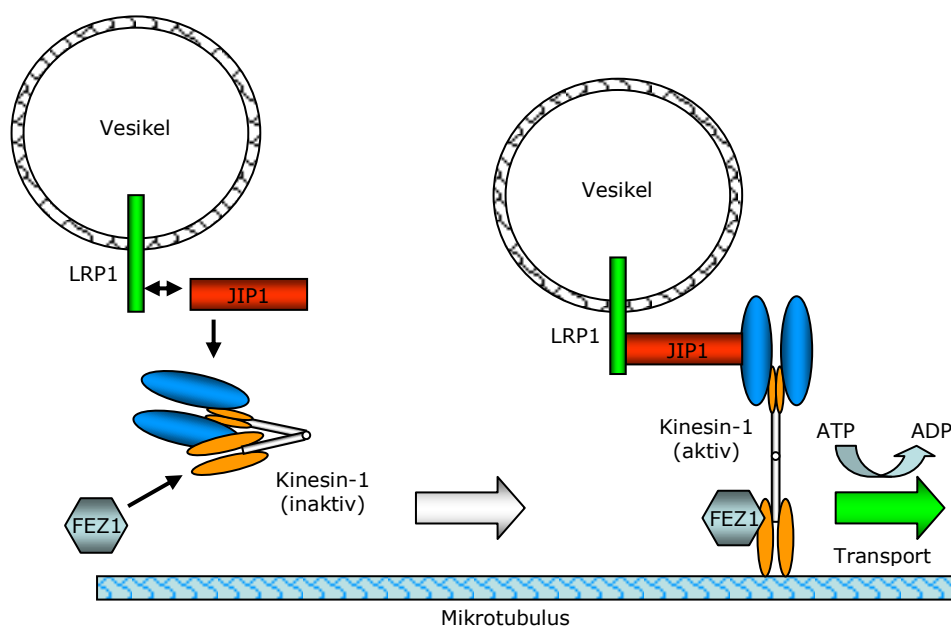


Abbildung 18: Interaktion von LRP1 und JIP1 während des Vesikeltransports

Die Bindung eines Cargos bewirkt die Aktivierung von Kinesin-1. Nach Bindung von JIP1 und FEZ1 beginnt der Transport. Weitere Informationen im Text.

JIP1, MAPK und JNK

Hinzu kommt eine direkte Interaktion von JIP1 mit Proteinen des JNK-Signalweges, darunter JNK selbst, MAPKK (mitogen activated protein kinase kinase) und MAPKKK (mitogen activated protein kinase kinase kinasen), z.B.: MLK, DLK (mixed lineage kinase, dual leucine zipper kinase) (Whitmarsh, 2006; Kelkar et al., 2005; Yasuda et al., 1999). MAPK-Signalwege (mitogen activated protein kinase) sind konservierte Kaskaden, die eine zentrale Rolle in zellulären Prozessen wie Wachstum, Differenzierung, Apoptose und Immunantwort spielen.

Liegt JIP1 im Überschuss vor, bindet es die JNK und bewirkt es eine verminderte Phosphorylierung ihrer nukleären Substrate wie c-Jun (Dickens et al., 1997). Zudem kann JIP1 auch selektiv JNK-spezifische MKPs, MKP7 und M3/6 (MAPK-Phosphatasen) rekrutieren und so zu einer Dephosphorylierung und Inaktivierung der JNK beitragen.

Andererseits ist JIP1 durch Bindung JNK-abhängiger MAPKKs, MAPKK7 und MLK auch in der Lage, die Aktivität JNK-abhängiger Signalwege zu verstärken. Wahrscheinlich spielen intrazelluläre JIP1-Level eine wichtige Rolle in der Regulation von JNK (Whitmarsh et al., 1998).

JIP1 und Diabetes

Verschiedene Studien legen eine Beteiligung des JNK-Signalweges bei diabetischen Stoffwechselstörungen nahe. So findet sich ein Zusammenhang zwischen einer Missense-Mutation im JIP1-Gen und einem Typ-II-Diabetes (Waeber et al., 2000). Außerdem kann JIP1 die Expression des GLUT2 Glucose-Transporters regulieren und durch Hemmung des JNK-Signallings die IL1-vermittelte β -Zell-Apoptose im Rahmen des Typ-I-Diabetes abschwächen (Allaman-Pillet et al., 2003; Haeflger et al., 2003; Bonny et al., 2001). Hinzu kommt, dass JIP1 für die Adipositas-induzierte JNK-Aktivierung in Fett- und Muskelzellen von Mäusen notwendig ist und so möglicherweise zur Entstehung von Adipositas und Insulin-Resistenz beiträgt (Jaeschke et al., 2004).

Möglicherweise stellen JIP1 und die anderen Proteine der JIP-Familie nicht nur schlichte Bindeglieder in Transportkomplexen dar, sondern regulieren diese Komplexe sowie mitogene Faktoren (Horiuchi et al., 2007). Durch die Beteiligung an der Genese von Diabetes und Adipositas stellt JIP1 einen möglichen Ansatz für die Therapie dieser verbreiteten Erkrankungen dar.

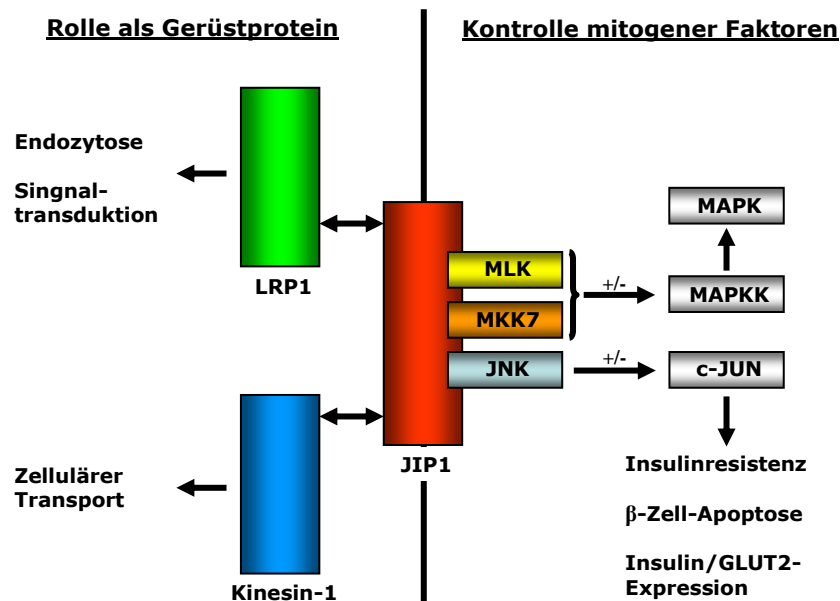


Abbildung 19: Funktionen von JIP1 als Gerüstprotein und in der Kontrolle mitogener Faktoren. (nach Whitmarsh, 2006)

JIP1 stellt sowohl einen essentiellen Bestandteil des intrazellulären Traffickings als auch einen Regulator mitogener Faktoren dar. Weitere Informationen im Text.

1.4.4 PKC α – Wegbereiter für Adapterproteine

Die Familie der Protein Kinase C (PKC) ist eine heterogene Gruppe von Phospholipid-abhängigen Kinasen, deren Mitglieder an der Regulation von Wachstum, Differenzierung und Genexpression beteiligt sind (Nishizuka, 1992; Hug et al., 1993). Es handelt sich um Serin-Threonin-Kinasen, die anhand ihrer Domänen-Zusammensetzung und ihrer regulatorischen Co-Faktoren in drei Gruppen zusammengefasst werden: “conventional“ (cPKC), “novel“ (nPKC) und “atypical“ (aPKC). In diesem Kapitel soll auf die PKC α und ihre Rolle im Zusammenspiel mit LRP1 eingegangen werden.

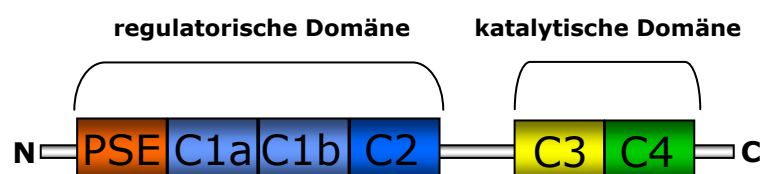


Abbildung 20: Schematischer Aufbau der Conventional Protein Kinase C (PKC α , PKC β I, β II u. PKC γ) (nach Parker et al. 2004, Poole et al., 2004)

Mitglieder der cPKC-Gruppe, und somit PKC α , werden in ihrer Aktivität durch die Second-Messenger Ca²⁺ und Diacylglycerin (DAG) reguliert. Dabei bindet die Kopfgruppe von

Phosphatidylserin Ca^{2+} -abhängig an die C2-Domäne, während DAG an die C1a- und C1b-Domänen bindet (Parker et al., 2004). Je nach Lokalisation der PKC α innerhalb der Zelle kommt sie mit verschiedenen Aktivatoren und Substraten in Kontakt. Dabei können Komplexe aus der PKC und einem spezifischen Substrat, sog. STICKs (Substrates that interact with C-Kinases), entstehen. Außerdem wird die Reifung und Aktivität der PKC α durch Phosphorylierung „eigener“ Serin-, Threonin- und Tyrosin-Resten beeinflusst (Newton, 2003).

Die ubiquitär vorkommende PKC α ist an verschiedensten Signal- und Regulationsmechanismen beteiligt, so an der Zellproliferation, an der Apoptose, Differenzierung und Motilität. Wie andere Mitglieder der cPKC-Familie vermittelt sie eine Vielzahl von Signalen, die zum Teil auf der Hydrolyse von Phospholipiden beruhen.

Die Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, Tyrosinkinase-Rezeptoren und nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen kann die Phospholipase C (PLC) stimulieren, die Diacylglycerin (DAG) bereitstellt. Komplexe aus inaktiver PKC und diesen membranständigen Rezeptoren werden RICKs (Receptors for inactive C-Kinases) genannt. So kann die PKC α spezifisch in zellulären Kompartimenten bzw. an der Zellmembran gesammelt und für eine mögliche Aktivierung bereitgehalten werden. Handelt es sich um Komplexe mit bereits aktivierter PKC, spricht man von RACKs (Receptors for activated C-Kinases) (Mochly-Rosen et al., 1998).

Die PKC α weist eine besondere Affinität zu Caveolae auf. Sie gelangt in inaktiver Form dorthin, um dort aktiviert zu werden. Außer der PKC α selbst, liegen in Caveolae C-KIPs (C-Kinase interagierende Proteine) vor, die an der Modulation der PKC α beteiligt sind (Mineo et al., 1998).

Über Inositoltrisphosphat (IP₃) wird intrazellulär Ca^{2+} freigesetzt, welches ebenfalls an der Regulierung der cPKC beteiligt ist. Demgegenüber sind die Mitglieder der nPKC-Familie nur für DAG empfindlich, während die aPKC weder durch DAG noch durch Ca^{2+} reguliert werden können. Diese Beobachtungen ergeben sich aus dem Vorhandensein oder Fehlen der jeweiligen regulatorischen Domänen (Newton, 1997).

LRP1 und PKC α

Lokalisation und Funktion von Rezeptor-Tyrosinkinasen und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind abhängig von Phosphorylierungen an ihren cytoplasmatischen Domänen. Offensichtlich spielt dies auch bei Endozytoserezeptoren wie LDLR und Endozytose-/Signalling-Rezeptoren wie LRP1 eine wichtige Rolle. Der Mechanismus erinnert an das

Insulin-Signalling. Dort wirkt sich die Serin-/Threonin-Phosphorylierung modulierend und stabilisierend auf die ebenfalls vorhandenen Tyrosin-Phosphorylierungen und damit auf die Aktivität der Insulinrezeptor-Substrat-Proteine aus. Die ICD von LRP1 wird an Serin-, Threonin- und Tyrosin-Resten phosphoryliert (Ranganathan et al., 2004; Loukinova et al., 2002; Li et al., 2001). Die Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten geschieht durch die PKC α und die PKA (Proteinkinase A), (s. Abb. 11). Das hat zur Folge, dass LRP1 an der Zelloberfläche verbleibt, während unphosphoryliertes LRP1 vermehrt internalisiert wird (Ranganathan et al., 2004). Die Tyrosin-Phosphorylierung innerhalb der ICD wird durch die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Src vermittelt (Loukinova et al., 2002; Barnes et al., 2001). Diese Phosphorylierung an Tyr63 ist Voraussetzung für die Bindung von Adapterproteinen wie Shc und CED6/GULP an das distale NPxY-Motiv. Hinzu kommt, dass Tyr63 auch Teil der Internalisationssequenz YxxL ist. Näheres hierzu in den entsprechenden Kapiteln.

Phorbolester wie PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) binden wie DAG an die C1a- und C1b-Domänen und führen zu einer Aktivierung der PKC α . Dies ist bei Untersuchungen der Phosphorylierungsaktivität der PKC α von Vorteil, da es sich um ein einfach zu handhabendes Stimulans handelt, das nicht in andere Signalwege eingreift (Mineo et al., 1998). Nach Aktivierung durch PMA konnte eine direkte Bindung der PKC α an LRP1 nachgewiesen werden (Ranganathan et al., 2004).

1.4.5 Shc – Signaltransduktion in Wachstum und Apoptose

Shc (Src homology containing) stellt ein zentrales Protein im Ras-Map-Kinase Signaltransduktionsweg dar. Identifiziert wurde Shc 1992, bei Hybrid-Screens auf SH2-Domänen (Src-Homology-2-Domain) in humanen cDNA-Datenbanken (Pelicci et al., 1992). Im Zuge dieser Untersuchungen wurden zwei ubiquitär exprimierte Isoformen, p52Shc und p46Shc, charakterisiert. Beiden gemein ist eine aminoterminal SH2-Domäne, gefolgt von einer Prolin-reichen Region (CH1) und einer carboxyterminalen PTB-Domäne (Phospho-Tyrosine-Binding Domain). Eine dritte Isoform, p66Shc, wurde 1996 beschrieben. Sie besitzt zusätzlich zur bekannten Struktur von p52Shc aminoterminal eine weitere Prolin-reiche Region (CH2) (Migliaccio et al., 1997).

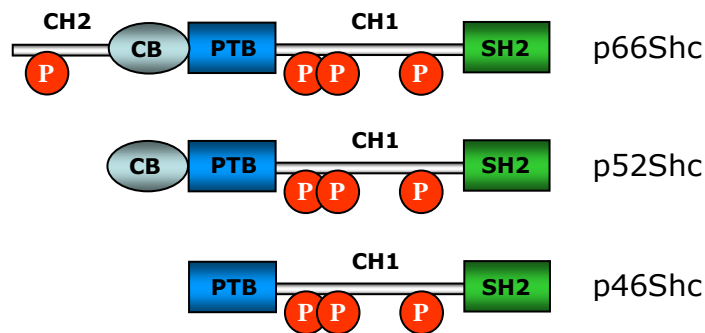


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Shc-Isoformen (nach Migliaccio et al., 2006)

Die CH1-Region enthält jeweils drei Tyrosinreste, die phosphoryliert werden können. Die CH2-Region von p66Shc enthält einen phosphorylierbaren Serinrest. Nähere Informationen im Text.

Shc und Shc-ähnliche Proteine finden sich in allen metazoischen Spezies von Nematoden bis hin zu Säugetieren. Allen gemein ist der modulare Grundaufbau nach dem Muster [N-PTB-SH2-C]. Er steht im Gegensatz zu Proteinen mit umgekehrter Anordnung der PTB- und SH2-Domänen, z.B. Tensin, ein Protein aus dem Cytoskelett. Im Laufe der Jahre seit der Erstbeschreibung von Shc wurden verschiedene, mehr oder weniger stark konservierte Sequenzabschnitte und Verwandtschaften mit Shc-Proteinen anderer Spezies beschrieben. Dennoch liegen die Bedeutung und die Eigenschaften der CH1-Region, womöglich als dritte interagierende Domäne, weitgehend im Dunkeln (Luzy et al., 2000).

p52/46Shc - Proliferation

Die hauptsächliche Rolle von p52/46Shc besteht in der Signaltransduktion von Tyrosinkinase stromaufwärts bzw. stromabwärts von Ras (Bonfini et al., 1996). P52/46Shc Proteine können schnell und effizient Tyrosin-phosphoryliert werden. Dies geschieht an drei Tyrosinresten innerhalb der CH1-Region (Y239/240 und Y317) und kann von allen derzeit bekannten Tyrosinkinase vollzogen werden. Dabei ist speziell der Tyrosinrest Y317 von Bedeutung. Die Reste Y239/240 tragen nicht vergleichbar stark zur Aktivierung der MAPK bei. Einmal phosphoryliert kann p52/46Shc Rezeptor-Tyrosinkinase mit dem SH2-tragenden Protein Grb2 verbinden (Gotoh et al., 1997; Lanfracone et al., 1995; Salcini et al., 1994). Dabei bindet die PTB- und/oder SH2-Domäne von p52/46Shc an Tyrosin-phosphorylierte Rezeptoren, während Grb2 mit seiner SH2-Domäne das Tyrosin-phosphorylierte p52/46Shc bindet. Grb2 wiederum ist in einem Komplex mit Sos verbunden, einem ubiquitär exprimierten Ras Nucleotid-Austauschfaktor. Die Rekrutierung des Grb2/Sos-Komplexes an die Zellmembran durch p52/46Shc trägt zur Aktivierung von Ras bei. Dabei wird inaktives Ras-GDP in aktives Ras-GTP umgewandelt, das daraufhin MAPK (Mitogen-Activated

Protein Kinase) aktivieren kann (Aronheim et al., 1994). Die Überexpression von p52/46Shc führt unter anderem zu einer Verstärkung des PDGF- (Platelet-derived Growth Factor) (Yokote et al., 1994), des EGF- (Epidermal Growth Factor) (Migliaccio et al., 1997; Salcini et al., 1994) und GM-CSF-Signallings (Granulocyte/Macrophage- Colony Stimulating Factor) (Lanfrancone et al., 1995) über den MAPK- und Fos-Signalweg. Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen, die auch in p52/46Shc^{-/-} Knockout-Zellen eine normale Ras-Aktivierung und eine, wenn auch geringere, MAPK-Aktivierung nachgewiesen werden konnten. Dies lässt darauf schließen, dass p52/46Shc als eine Art Verstärker im Rezeptor-Tyrosinkinasesignalling fungiert (Lai et al., 2000). Auf die Rolle von p52/46Shc wird im Kapitel „LRP1 und Atherosklerose“ genauer eingegangen.

p52/46Shc sind auch als Proto-Onkogen an der Entstehung von verschiedenen Tumoren beteiligt, z.B. Magenschleimhaut-Karzinom, Hepatozelluläres Karzinom (HCC) Chronisch-myeloische Leukämie (CML), Mamma-Karzinom oder Prostata-Karzinom. In Tumorzellen aus diesen Geweben sind diese beiden Isoformen überexprimiert (Yukimasa et al., 2005; Yoshida et al., 2004; Davol et al., 2003; Bonati et al., 2000) bzw. über-phosphoryliert (Lee et al., 2004; Saucier et al., 2004).

p66Shc - Apoptose

p66Shc, die dritte Isoform, steht im Zusammenhang mit Apoptose und Alterung durch oxidativen Stress. Sie entsteht durch die Nutzung eines alternativen Promotors innerhalb des Shc-Genlocus sowie durch alternatives Spleißen und enthält zusätzlich eine aminotermine Prolin-reiche Region. Dieser CH2 genannte Abschnitt enthält einen Serin-Rest, der phosphoryliert werden kann (Migliaccio et al., 1997). Im Gegensatz zu p52/46Shc hat p66Shc offenbar keinen aktivierenden Einfluss auf den Ras-Signalweg. Dagegen wird eine Rolle in Signalwegen diskutiert, die durch äußere Stressfaktoren aktiviert werden. Anlass hierfür bieten Beobachtungen, die eine Serinphosphorylierung in der CH2-Region von p66Shc unter Einfluss von UV-Strahlung oder oxidativem Stress durch H₂O₂ zeigen. Die CH2-Region beherbergt das Redox-Zentrum, eine Struktur, über die p66Shc mit Cytochrom C interagieren und H₂O₂ erzeugen kann (Giorgio et al., 2005). Dabei stellen drei negativ geladene Glutamatreste (E125, E132, E133) eine stabile Verbindung zum Cytochrom C her, während zwei aromatische Tryptophanreste (W134, W148) essentiell für den Elektronenaustausch mit dem reduzierten Cytochrom C sind. Entsprechende Konstellationen finden sich auch in anderen Redox-Enzymen, die mit Cytochrom C interagieren, z.B. bei der Cyclooxygenase IV (COX IV) oder bei der Hefe-Cytochrom-C-Peroxidase.

Tatsächlich sind p66Shc^{-/-} Fibroblasten resistent gegen H₂O₂-induzierte Apoptose. Wurde in ihnen dagegen p66Shc überexprimiert, fand sich eine erhöhte Empfindlichkeit gegen H₂O₂. Daraus ergab sich bereits früh die Vermutung, dass p66Shc Einfluss auf die Widerstandsfähigkeit und damit auf die Lebensdauer von Zellen hat (Sohal et al., 1996).

p66Shc unterliegt als Protein der zellulären Antwort auf äußeren Stress mehreren Regulationsschritten. Unter basalen Bedingungen liegt p66Shc in einer inaktiven Form vor und wird nach Eintreten von Stress im Bereich der CH2-Region Serin-phosphoryliert und dadurch aktiviert. Der mitochondriale Anteil der p66Shc-Population liegt unter basalen Bedingungen im Cytosol in einem multimeren Komplex mit mtHsp70 und Teilen des TIM-TOM-Importkomplexes vor. Gibt es einen Stimulus zur Apoptose, monomerisiert dieser Teil der p66Shc-Population und verlagert sich hin zu den Mitochondrien um dort zu wirken. Zudem werden transkriptionale Regulation und posttranslationale Modifikationen diskutiert, die ebenfalls den Spiegel von aktivem p66Shc regulieren könnten (Francia et al., 2004; Orsini et al., 2004).

p66Shc ist offenbar zugleich an mehreren Prozessen während des mitochondrialen Apoptoseweges beteiligt. So wird p66Shc für die Ausschüttung von Cytochrom C, für die Aktivierung von Caspasen und für die Ausschaltung des Membranpotentials der Mitochondrien benötigt. Ciclosporin A, ein Immunsuppressivum, hemmt die p66Shc-abhängige Induktion der H₂O₂-induzierten Apoptose (Orsini et al., 2004; Trinei et al., 2002).

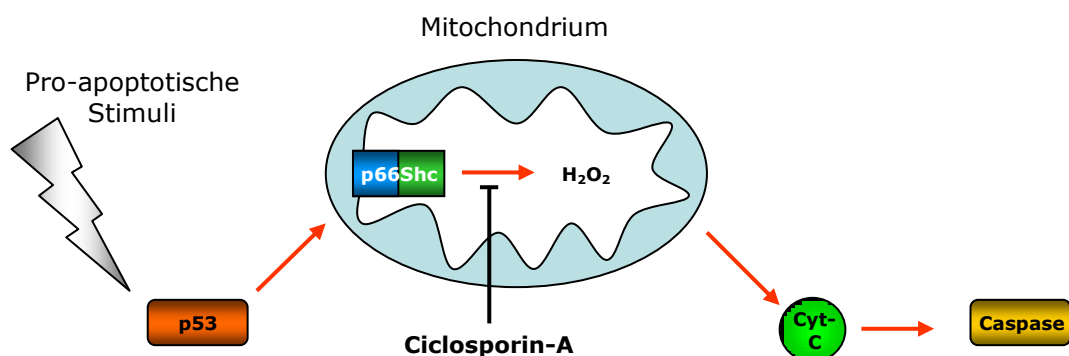


Abbildung 22: Putativer Mechanismus von p66Shc während der Apoptose (mod. nach Migliaccio et al., 2006)

p66Shc ist in die Vermittlung von pro-apoptischen Signalen eingebunden und wird zur Ausschüttung von Cytochrom-C sowie von H₂O₂ benötigt. Das Immunsuppressivum Ciclosporin-A hemmt die p66Shc-vermittelte Ausschüttung von H₂O₂. Nähere Informationen im Text.

Versuche mit p66Shc^{-/-} Knockout-Mäusen ergaben, dass Tiere, denen p66Shc fehlt, nicht nur länger leben, sondern auch weniger unter den Folgen einer Hoch-Fett-Diät leiden (Napoli et al., 2003).

LRP1 und Shc

Bevor Proteine der Shc-Familie an die ICD von LRP1 binden können, muss der Tyrosinrest Tyr63 im distalen NPxY-Motiv phosphoryliert werden. Dies geschieht unter anderem durch Src, eine Rezeptor-unabhängige Tyrosinkinase. Src wurde ursprünglich als transformierendes Protein eines onkogenen Retrovirus beschrieben (Martin, 1970 u. 2001). Es besteht aus einer aminoterminalen SH3-, einer SH2- und einer Kinase-Domäne, sowie einem kurzen carboxyterminalen Abschnitt, der eine Phosphorylierungsstelle an Tyr 527 trägt. Src ist in die Signaltransduktion vieler Zelloberflächenrezeptoren eingebunden, wie Integrine, G-Protein gekoppelte Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosinkinasen (Abram et al., 2000; Biscardi et al., 1999; Brown et al., 1996).

Shc bindet mit seiner PTB-Domäne an das phosphorylierte Tyr 63, ähnlich dem Adapterproteinen CED6/GULP.

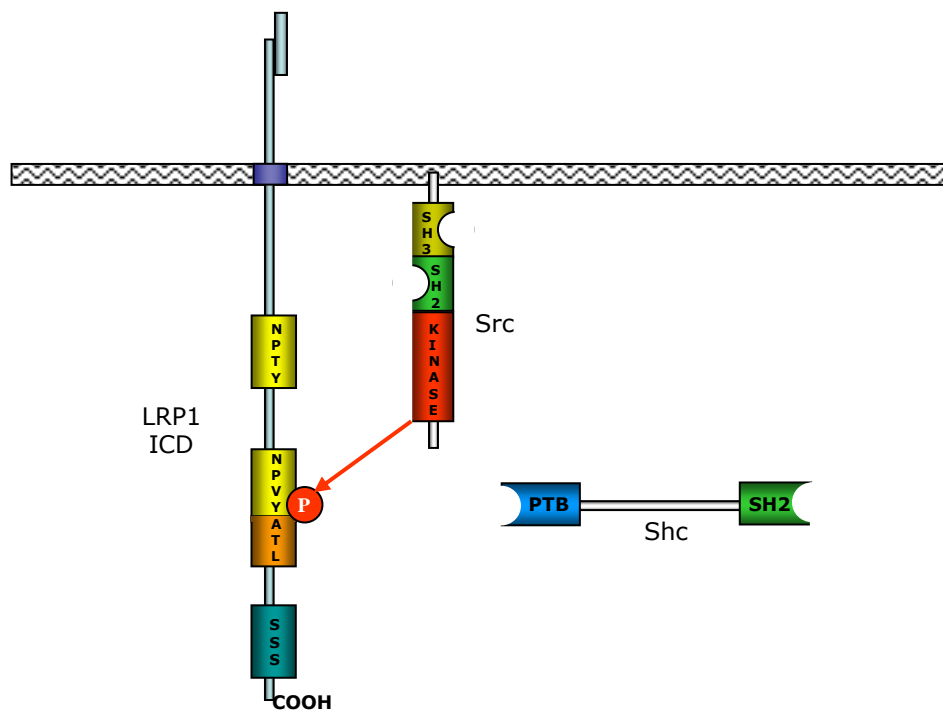


Abbildung 23a: Interaktion von LRP1 und Shc (nach Barnes, 2001)

Die Src-Kinase phosphoryliert den Tyrosinrest im distalen NPxY-Motiv der LRP1-ICD. Daraufhin kann Shc binden. Nähere Erläuterungen im Text.

Hat Shc an das phosphorylierte Tyr63 im distalen NPxY-Motiv gebunden, kann es selbst wie oben beschrieben zweifach Tyrosin-phosphoryliert werden. Auch hierfür wird eine

Beteiligung von Src diskutiert. Daraufhin kann der Grb2/SOS-Komplex an Shc binden und über die Signalkaskade von Ras, Raf und Mek die MAPK aktivieren (Barnes et al., 2001).

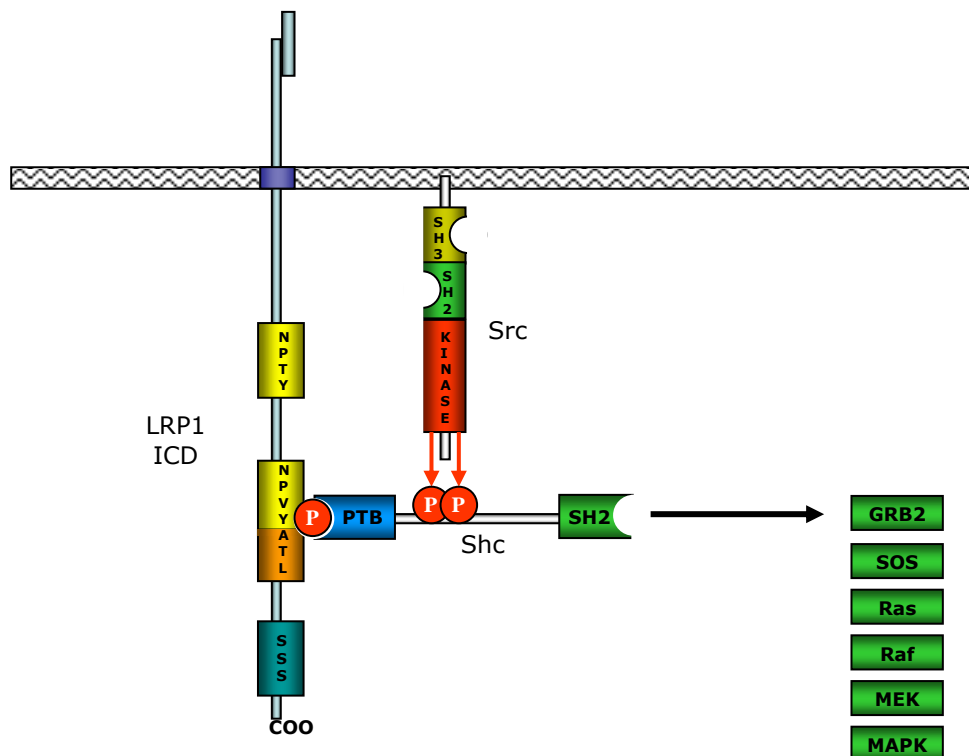


Abbildung 23b: Interaktion von LRP1 und Shc (nach Barnes, 2001)

Nach der Bindung an die LRP1-ICD wird Shc selbst von der Src-Kinase phosphoryliert und kann über Grb2 und SOS den mitogenen Ras/Raf/MAPK-Signalweg aktivieren. Nähere Erläuterungen im Text.

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der möglichen Doppelrolle von LRP1 im Rahmen der Endozytose und der Signaltransduktion im postprandialen Lipoprotein-Metabolismus. Hierzu sollte nach Stimulation mit LRP1-Liganden das Bindungsverhalten von intrazellulären Adapterproteinen aus verschiedenen Signalwegen an den C-Terminus untersucht werden. Als Modell hierfür sollten Hepatomazellen dienen. Mittels eines Co-Immun-Präzipitations-Verfahrens und eines GST-Pulldown-Verfahrens mit anschließendem Westernblot sollte eine stattfindende Bindung der Adapterproteine nachgewiesen werden. Dabei sollten sowohl Signalproteine aus dem Bereich der Endozytose als auch aus dem Bereich der Signaltransduktion untersucht werden. Ausgewählt wurden Adapterproteine, die in ersten Versuchen verlässlich nachgewiesen werden konnten und die einen medizinischen Bezug zulassen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

| | |
|---|--|
| Bradford Protein Assay | BioRad |
| BSA | Sigma |
| BSA, fatty acid free | Sigma |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | Merck |
| Ciprofloxazin | Bayer |
| ECL Plus Western Blotting Detection Kit | GE Healthcare |
| EDTA | Sigma |
| EGTA | Sigma |
| Essigsäure | Riedel-de Haën |
| Ethanol | Walter CMP |
| Glycin | Carl Roth |
| GST-RAP und GST Fusionsprotein | mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Wolfgang Hampe |
| HEPES | Sigma |
| Igepal CA-630 (NP40) | Sigma |
| Marker RPN 800, Rainbow | GE Healthcare |
| Methanol | Merck |
| Milchpulver | Töpfer Allgäu |
| Na ₂ CO ₃ | J. T. Baker |
| Na ₃ VO ₄ | ICN Biomedicals |
| NaCl | J. T. Baker |
| NaF | Merck |
| NaOH | Merck |
| Penicillin/Streptomycin | Gibco |
| Protease-Inhibitor-Cocktail | Roche |
| Protein-G Sepharose | Amersham |
| Salzsäure | Merck |
| SDS | Serva |

| | |
|---------------------------------|------------|
| SDS-PAGE MES Laufpuffer, NuPage | Invitrogen |
| Tris | Merck |
| Trypsin-EDTA 0,05% | Gibco |
| Tween-20 | Sigma |
| β -Glycerphosphat | Sigma |
| β -Mercaptoethanol | Serva |

2.1.2 Zelllinien

| | |
|-----------------------------|---------------------|
| HuH7 (Humane Hepatomzellen) | (Pugh et al., 1988) |
|-----------------------------|---------------------|

2.1.3 Primäre Antikörper

| | |
|---------------------------------|--|
| anti-CED6 | abcam (ab 2751) |
| anti-Dab1 | abcam (ab 7522) |
| anti-Fe65 | abcam (ab 5668) |
| anti-GIPC / SEMCAP (H-55) | Santa Cruz (sc-25556) |
| anti-G α s (K-20) | Santa Cruz (sc-823) |
| anti-JIP1 | abcam (ab 24449) |
| anti-LRP1 (515 kDa) Clone 8G1 | PROGEN (61065) |
| anti-LRP1 (85 kDa) "Dolly" | mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Jörg Heeren J. Heeren et al., JBC 2001 |
| anti-Mint3 | abcam (ab 3450) |
| anti-phospho-Serin | Chemicon (AB 1603) |
| anti-phospho-Threonin | Cell Signaling (9381) |
| anti-phospho-Tyrosin Clone 4G10 | Upstate (05-321) |
| anti-phospho-Tyrosin Clone PY20 | Biomol (SA-240) |
| anti-PKC α (C-20) | Santa Cruz (sc-208) |
| anti-RAP | mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Wolfgang Hampe |
| anti-Shc | Upstate (06-203) |
| anti- β -Aktin | Sigma (A 5441) |

2.1.4 Sekundäre Antikörper

| | |
|---|--|
| donkey- α -goat, peroxidase coupled | Jackson Immuno Research (705-035-147) |
| donkey- α -sheep, peroxidase coupled | Jackson Immuno Research (713-035-147) |
| goat- α -mouse, peroxidase coupled | Jackson Immuno Research (115-035-146) |
| goat- α -rabbit, peroxidase coupled | Jackson Immuno Research (111-035-144) |

2.1.5 Stimulanzen

| | |
|--------------------------------------|--|
| Chylomikronen-Remnants | mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Jörg Heeren u. Sandra Ehret |
| Forskolin | Sigma |
| Lactoferrin | Sigma |
| PDGF-BB | R&D Systems |
| PMA (Phorbol-12- Myristat-13-Acetat) | Calbiochem |
| RAP | mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Jörg Heeren u. Sandra Ehret |
| α 2-Makroglobulin | mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Jörg Heeren u. Sandra Ehret |

2.1.6 Geräte

| | |
|----------------------------|-------------------------|
| Analysenwaage | Sartorius |
| ELISA-Lesegerät | GE Healthcare |
| Entwickler X-OMAT 1000 | Kodak |
| Heizblock | Eppendorf |
| Laborabzug | Köttermann |
| Laborpipetten | Eppendorf/Abimed/Gilson |
| Magnetrührer | IKA Labortechnik |
| PAGE/Western-Blot Netzteil | Biorad |

| | |
|----------------------------|-------------------|
| PAGE/Western-Blot-Kammer | Invitrogen |
| pH-Messgerät MP-220 | Mettler Toledo |
| Pipettierhilfe | Accujet |
| Reine Werkbank | Heraeus |
| Reinstwasseranlage | Millipore |
| Roller Mixer SRT1 | Stuart Scientific |
| Rotor | Beckman |
| Schüttelinkubator | Infors |
| Sonifier | Branson |
| Tischzentrifuge | Eppendorf |
| Ultrazentrifuge TL 100 | Beckman |
| Wasserbad | GFL |
| Wasserstrahlpumpe | Brand |
| Wipp-Schüttler Duomax 1030 | Heidolph |
| Zellzähler CASYton | Schärfe System |

2.1.7 Gebrauchsmaterial

| | |
|-----------------------------------|------------------------|
| Röntgenfilm Super RX | Fujifilm |
| Eppendorf-Reaktionsgefäße | Eppendorf/Sarstedt |
| Falcon-Röhrchen | Falcon/Greiner |
| Nitrozellulosemembran | Schleicher und Schuell |
| Pipettenspitzen | Sarstedt |
| Zellkulturflaschen | Costar/Nunc |
| Filter-Papier | Whatman |
| Zellschaber | Nunc |
| 4-12% Bis-Tris Gele, NuPage Novex | Invitrogen |
| Spritzen | Braun |
| Kanülen | Braun |
| Serologische Pipetten | Falcon |
| ELISA-Platten, 96-Napf | Nunc |

2.2 Lösungen und Medien

2.2.1 Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Medien mit destilliertem Wasser angesetzt und der pH-Wert mit Salzsäure bzw. Natronlauge eingestellt.

| | | |
|----------------------------------|---|--------|
| Zell-Lysis-Puffer | 100 mM NaCl | pH 7,4 |
| (Co-Immunpräzipitation) | 2 mM EDTA | |
| | 2 mM EGTA | |
| | 50 mM HEPES | |
| | 1% Igepal (NP40) | |
| + Phosphatase-Inhibitoren | 50 mM NaF | |
| | 1 mM Na ₃ VO ₄ | |
| | 5 mM β-Glycerphosphat | |
| | 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail ad 10ml Pufferansatz. | |

| | | |
|----------------------------------|---|--------|
| Zell-Lysis-Puffer | 2,5 mM CaCl ₂ | pH 8,0 |
| (GST-Pulldown) | 120 mM NaCl | |
| | 50 mM Tris | |
| | 0,5% Igepal (NP40) | |
| + Phosphatase-Inhibitoren | 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail ad 10ml Pufferansatz. | |

| | | |
|------------------------|-------------------------|--|
| Blotting-Puffer | 56,2 g Glycin | |
| | 12,1 g Tris | |
| | 1 L Methanol | |
| | ad 5 L H ₂ O | |

| | | |
|--------------------------------------|----------------------|--------|
| Probenpuffer (5x) reduzierend | 62,5 mm Tris-HCL | Ph 6,8 |
| Laemmli | 2% SDS | |
| | 10% Glycerol | |
| | 5% 2-Mercaptoethanol | |
| | Bromphenoblau | |

| | | |
|-------------------------|----------------------------------|--------|
| Stripping-Puffer | 0,76 g Tris | pH 6,7 |
| | 2 g SDS | |
| | 780 µl β-Mercaptoethanol | |
| | ad 100 ml H ₂ O dest. | |

| | | |
|------------------------------------|----------------|--------|
| Tris-Puffer mit 1‰ Tween-20 | 150 mM NaCl | pH 7,0 |
| (TBS-T) | 25 mM Tris-HCl | |
| | 1‰ Tween-20 | |

| | | |
|--|--|------------|
| Phosphat-Puffer (PBS) | | Gibco |
| MES-Laufpuffer und reduzierendes Agens, NuPage | | Invitrogen |

2.2.2 Färbelösungen

| | | |
|------------------------------|---------------------------------|----------------|
| Coomassie Färbelösung | 2g Coomassie Brilliant Blue R | Serva |
| | 0.5g Coomassie Brilliant Blue G | Serva |
| | 200ml Essigsäure | Riedel-de Haën |
| | 500ml Methanol | Merck |
| | 300ml H ₂ O dest. | |

| | | |
|----------------------------|-----------------------------|----------------|
| Coomassie Entfärber | 25ml Essigsäure | Riedel-de Haën |
| | 300ml Methanol | Merck |
| | ad 1l H ₂ O dest | |

| | | |
|------------------|--------------|-------|
| Ponceau-S | Fertiglösung | Serva |
|------------------|--------------|-------|

2.2.3 Medien

| | | |
|-----------------------------|-----------------------------|-------|
| DMEM 4,5 g/l Glukose | DMEM 4,5 g/l Glukose | Gibco |
| Komplettmedium | 10% FCS | Gibco |
| | 10% Penicillin-Streptomycin | Gibco |

| | | |
|-----------------------------|----------------------|-------|
| DMEM 4,5 g/l Glukose | DMEM 4,5 g/l Glukose | Gibco |
| Hungermedium I | 10% LPDS | |

| | | |
|---------------------------|--------------------------|-------|
| DMEM 1 g/l Glukose | DMEM 1 g/l Glukose | Gibco |
| Hungermedium II | 0,5% fatty acid free BSA | |

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Zellkultur

HuH7 humane Hepatomazellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in 80 cm²-Zellkulturflaschen in Komplettmedium (Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) mit 4,5g/l Glukose, 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (PS)) kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das verbrauchte Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen etwa 10 Min. inkubiert, danach das Trypsin-EDTA mit 5 ml Komplettmedium inaktiviert. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und auf 2-4 neue Kulturflaschen verteilt. Zum Abschluss wurde das Kulturmedium auf 15 ml aufgefüllt.

2.3.2 Stimulation

HuH7-Zellen wurden für die Co-Immun-Präzipitation in einer Konzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml in je 10 ml in 10cm-Kulturschalen mit Komplettmedium ausgesetzt und nach dem Absetzen mit frischem Komplettmedium über Nacht inkubiert. Am darauf folgenden Tag

wurde das Kompletmedium abermals für 2 Stunden erneuert, bevor mit verschiedenen Substanzen im Kompletmedium stimuliert wurde. Die verwendeten Stimulationsbedingungen sind im Ergebnisteil aufgeführt. Alle Arbeiten mit lebenden Zellen wurden bei 37°C durchgeführt.

2.3.3 Herstellung von Zell-Lysaten

Nach der Stimulation wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit 1 ml Zell-Lysis-Puffer pro Kulturschale überdeckt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden gelöst, durch mehrmaliges Pipettieren homogenisiert und 10 Min. in Eppendorfgefäßen auf Eis inkubiert. Danach wurde das Lysat 10 Min. bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert, der klare Überstand abgenommen und zur Co-Immun-Präzipitation eingesetzt.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Gewinnung von Chylomikronen

In EDTA-Monovetten wurde Blut von ApoCII-defizienten Spendern abgenommen und zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde im ersten Schritt mit 60%iger Saccharose beschwert und vorsichtig unter 20 ml PBS geschichtet. Die Zentrifugenröhrchen mit den geschichteten Substanzen wurden im SW32 Rotor für zwei Stunden bei 28.000 rpm und 4°C zentrifugiert. In einem zweiten Schritt wurden die flotierten Chylomikronen abgenommen, in PBS resuspendiert, mit Saccharose beschwert und im SW40 Rotor für zwei Stunden bei 28.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Dieser zweite Schritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt, bevor die isolierten Chylomikronen in wenig Flüssigkeit aufgenommen und der Triglyceridgehalt bestimmt wurde.

2.4.2 Hydrolyse von Chylomikronen zu Chylomikronen-Remnants

Die Suspension aus Chylomikronen wurde mithilfe eines Triglycerid-Bestimmungskits (*TG Triglycerides GPO-PAP* (Roche)) und PBS auf eine Konzentration von 6 mg/ml in einem Gesamtvolumen von 10 ml eingestellt. Die Substratlösung wurde mit 10 ml FCS verdünnt und gemischt. Nach Zugabe von boviner LpL in einer Konzentration von 1 µg/ml und nochmaligem Mischen wurde der Ansatz 30 Min. bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation

wurden 4 ml 60%ige Saccharose zugegeben und das Gemisch insgesamt dreimal je eine Stunde bei 38.000 rpm und 4°C durch PBS hindurch zentrifugiert.

2.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bradfordlösung wurde im Verhältnis 1:5 mit H₂O dest. angesetzt. Als geometrische Eichreihe dienten BSA-Proben mit bekanntem Proteingehalt von 0,0625 – 2 mg/ml und eine proteinfreie Blindprobe im verwendeten Zell-Lysis-Puffer. Von jeder Probe (Eichreihe und Zell-Lysat) wurden 20 µl vorgelegt und mit 1 ml der verdünnten Bradfordlösung versetzt. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben 5-10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, und danach jeweils 300 µl in eine 96-Napfplatte pipettiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm an einem ELISA-Leser gemessen. Anhand der Extinktionswerte der Eichreihe kann mittels linearer Regression die Proteinkonzentration der unbekanntenen Proben bestimmt werden.

2.4.5 (Co-) Immun-Präzipitation

Die Immun-Präzipitation (IP), ist ein Verfahren um einzelne Proteine, die mit anderen Proteinen interagieren, aus einem Gemisch (z.B. Zellysat) zu isolieren. In dieser Arbeit kam das sog. Batch-Verfahren zum Einsatz. Dazu wird ein Antikörper gegen das gewünschte Protein zum Gemisch in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und beides gemeinsam unter Bewegung und Kühlung inkubiert. Dabei bilden sich Komplexe aus dem Antikörper und dem Protein. Als nächstes werden Sepharose-Beads (engl. Kügelchen) die an Protein-G gekoppelt sind, dazugegeben. Während einer weiteren Inkubationszeit bindet das Protein-G an den F_C-Teil der Antikörper, sodass sich ein Komplex aus Protein, Antikörper und den Sepharose-Beads bildet. Wird das Gemisch mit den enthaltenen Komplexen zentrifugiert, so wirken die Sepharose-Beads aufgrund ihrer spezifischen Dichte wie Gewichte, die das gewünschte Protein über die Antikörper vom Rest des Gemischs trennen und sich im Pellet am Grund des Zentrifugationsgefäßes niederschlagen. Nach Abnahme des Überstandes und mehrmaligem Waschen des Pellets mit einer Protease- und Phosphatase-haltigen Pufferlösung und anschließendem Abzentrifugieren, wird das Pellet in einem Probenpuffer aufgenommen, in dem sich das gewünschte Protein, Antikörper und Sepharose unter Erwärmung voneinander trennen. Durch Aufnahme in ein kleineres Volumen als das des zu Beginn eingesetzten Gemisches, kommt es zu einer Anreicherung des Proteins. Nach erneutem Abzentrifugieren der Sepharose befinden sich nur noch das Protein und der Antikörper in der Pufferlösung, die zur Untersuchung im Westernblot auf Elektrophorese-Gele aufgetragen werden kann.

Bei der Co- Immun-Präzipitation (Co-IP) wird angestrebt, über das Zielprotein auch dessen Bindungspartner anzureichern. Aus diesem Grund kommt die Co-IP in dieser Arbeit zur Anwendung. Als Membranrezeptor mit zahlreichen intrazellulären Adapterproteinen erschien LRP1 als geeignetes Protein, um mitsamt gebundener Adapterproteine aus dem Lysat von HuH7-Zellen isoliert zu werden.

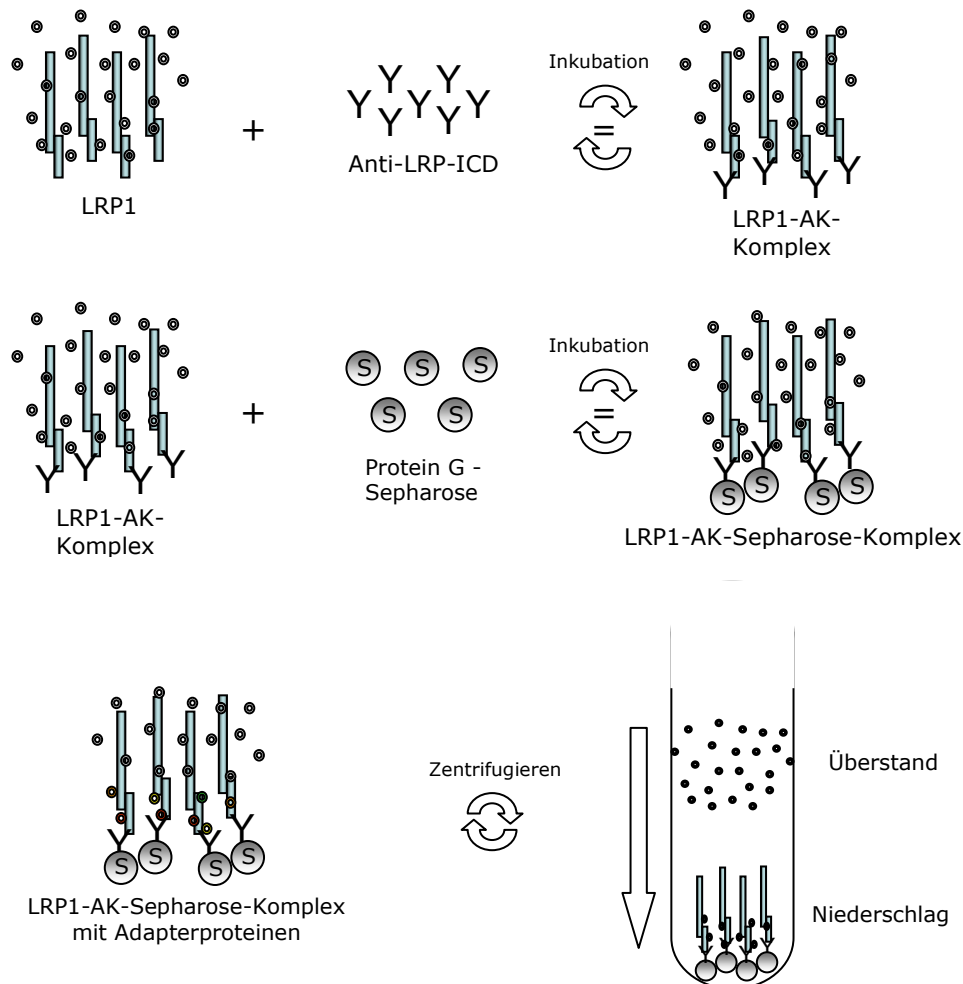


Abbildung 25: Co-Immuno-Präzipitation

Schematische und vereinfachte Darstellung. Nähere Erläuterungen im Text.

500 µl Zell-Lysat aus den verschiedenen Stimulationen wurden, nachdem sie anhand der Proteinbestimmung auf gleiche Mengen und Volumina eingestellt worden waren, mit dem anti-LRP1-ICD Antikörper im Verhältnis 1:100 versetzt und für 1,5 Std. bei 4 °C rollend vorinkubiert. 30 µl Protein-G Sepharose wurden dreimal mit Zell-Lysis-Puffer gewaschen, bei 2.500 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, mit dem vorinkubierten Lysat vereinigt und über Nacht bei 4 °C rollend inkubiert. Zudem wurden 100µl Lysat als Input für den Westernblot aufbewahrt. Am darauf folgenden Tag wurde die Sepharose mit den gebundenen

Proteinen bei 2.500 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und für den Westernblot aufbewahrt. Die Sepharose im Niederschlag wurde fünfmal mit Zell-Lysis-Puffer gewaschen und nach dem letzten Abzentrifugieren in 50 µl 2x-Probenpuffer (reduzierender Laemmli-Puffer) aufgenommen. 100 µl Input und Überstand wurden mit je 25 µl 5x-Probenpuffer versetzt.

2.4.4 GST-RAP-Pulldown

Zu dem Zellysat wird zunächst das GST-RAP-Fusionsprotein gegeben, wobei sich der RAP-Anteil in einem ersten Inkubationsschritt mit LRP1 aus dem Proteingemisch verbindet. In einem zweiten Schritt wird Glutathion hinzugefügt, das an Sepharose-Beads gebunden ist. So entsteht nach Inkubation über Nacht ein Komplex aus LRP1, dem GST-RAP-Fusionsprotein und den Glutathion-Sepharose-Beads in dem Proteingemisch. Dabei verbindet sich der GST-Anteil des Fusionsproteins mit dem Glutathion der Sepharose-Beads. Analog zur Co-Immunpräzipitation (s.o.) wird durch anschließende Zentrifugation der Komplex vom Rest des Gemischs getrennt und sammelt sich im Niederschlag am Boden des Zentrifugationsgefäßes. Nach Abnahme des Überstandes und mehrmaligem Waschen des Pellets mit einer Protease-haltigen Pufferlösung und anschließender Zentrifugation, wird das Pellet in einem Probenpuffer aufgenommen, in dem sich das gewünschte Protein (LRP1), GST-RAP und Sepharose unter Erwärmung voneinander trennen. Durch Aufnahme in ein kleineres Volumen als das des zu Beginn eingesetzten Gemisches, kommt es zu einer Anreicherung des Proteins. Nach erneutem Abzentrifugieren der Sepharose befinden sich nur noch das Protein (LRP1) und GST-RAP in der Pufferlösung, die nun zur Untersuchung im Westernblot auf Elektrophorese-Gele aufgetragen werden kann.

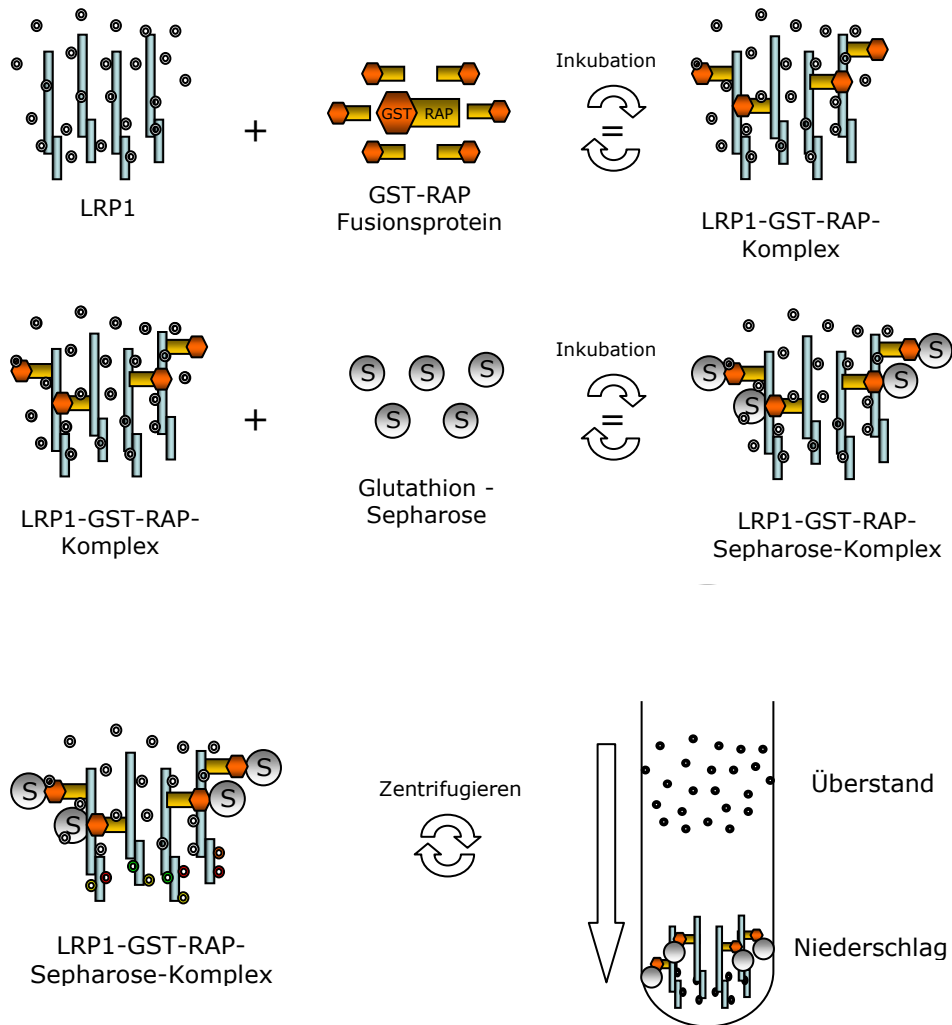


Abbildung 24: GST-RAP-Pulldown

Schematische und vereinfachte Darstellung. Nähere Erläuterungen im Text.

Hierzu wurde 1 ml Zell-Lysat im Verhältnis 1:100 mit dem GST-RAP Fusionsprotein bzw. der GST Kontrolle versetzt und für 1,5 Std. bei 4 °C rollend vorinkubiert. Derweil wurden 30 µl Glutathion-Sepharose dreimal mit Zell-Lysis-Puffer gewaschen, bei 2.500 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, mit dem vorinkubierten Lysat vereinigt und über Nacht bei 4 °C rollend inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die Glutathion-Sepharose mit den gebundenen Proteinen bei 2.500 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und für den Westernblot aufbewahrt. Die Sepharose im Niederschlag wurde fünfmal mit Zell-Lysis-Puffer gewaschen und nach dem letzten Abzentrifugieren in 50 µl 2x-Probenpuffer (reduzierender bzw. nicht-reduzierender Laemmli-Puffer) aufgenommen. 100 µl Input und Überstand wurden mit je 25 µl 5x-Probenpuffer versetzt.

2.4.6 Westernblot

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine (SDS-PAGE) wurden 4-12% Bis-Tris-Polyacrylamid-Gele verwendet. Die proteinhaltigen Proben wurden, mit reduzierendem Probenpuffer versetzt, 15 Min. bei 55 °C denaturiert, 1 Min. bei 2.500 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 110 Min. bei konstant 150 V in MES-Laufpuffer. Danach wurden die Proteine in einem Semi-Dry-Blot-Verfahren in Blotting-Puffer für 90 Min. bei konstant 350 mA auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Die Membran wurde mit Ponceau-S gefärbt, dokumentiert und mit TBS-T wieder entfärbt. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen 45 Min. bei Raumtemperatur mit TBS-T und 10% Magermilchpulver oder TBS-T und 5% BSA abgesättigt. Nach Abgießen der Milchpulverlösung wurden die Membranen zweimal 5 Min mit TBS-T gewaschen und anhand des Protein-Markers horizontal unterhalb der 75 kDa-Bande sowie zwischen 50 kDa und 35 kDa geschnitten. Anschließend wurde über Nacht mit dem primären Antikörper bei 4 °C rollend inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Membranen viermal 10 Min. mit TBS-T gewaschen. Dann wurde der peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper in TBS-T mit 5% Milchpulver angesetzt und die Membranen darin für 45 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Milchpulverlösung abgegossen und die Membranen abermals viermal 10 Min. mit TBS-T gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels Luminol-Lumineszenz-Reaktion nach Angaben des Herstellers. Die verschiedenen primären und sekundären Antikörper und deren Konzentrationen sind im Ergebnisteil aufgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von LRP1 in HuH7-Zellen

Zunächst sollte die HuH7-Zelllinie auf das Vorhandensein von LRP1 untersucht werden. Dabei wurden verschiedene LRP1-Antikörper auf ihr Ansprechverhalten, einzusetzende Konzentrationen und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hin im Western-Blot geprüft.

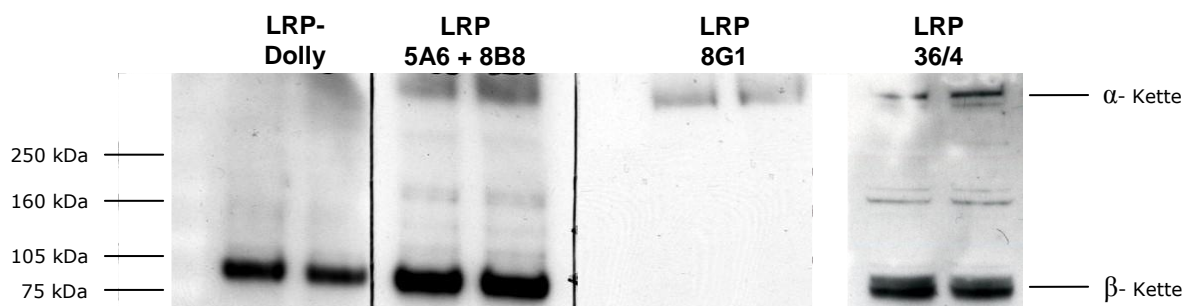


Abbildung 26: Nachweis von LRP1 in HuH7-Zellen

HuH7-Zellen inkubiert in DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS ohne Stimulans. Auftrag von jeweils gleichen Mengen an Protein. Westernblot mit Antikörpern s. Tabelle 4. Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 20 sek.

| Antikörper | Konzentration |
|-------------------------------|---------------|
| anti-LRP1 (85 kDa) "Dolly" | 1 : 1.000 |
| anti-LRP1 (85 kDa) Clone 36/4 | 1 : 1.000 |
| anti-LRP1 (85 kDa) Clone 5A6 | 1 : 500 |
| anti-LRP1 (85 kDa) Clone 8B8 | 1 : 500 |
| anti-LRP1 (515 kDa) Clone 8G1 | 1 : 500 |

Tabelle 4: Antikörper gegen LRP1

Die verwendeten Antikörper wurden in den angegebenen Konzentrationen entsprechend der im Methodenteil beschriebenen Verfahren eingesetzt. Nähere Erläuterungen im Text.

Die deutlichen Banden im Westernblot zeigen die Anwesenheit von LRP1 in HuH7-Zellen. Gut sind hier unter reduzierenden Bedingungen die voneinander getrennten α - und β -Untereinheiten von LRP1 (515 kDa resp. 85 kDa) zu sehen. Offensichtlich liegt in HuH7-Zellen nicht prozessiertes LRP1 vor, bzw. wird ein Teil der α - und β -Ketten unter reduzierenden Bedingungen nicht vollständig getrennt. So markieren die gegen die 85 kDa-Untereinheit gerichteten Antikörper 5A6/8B8 und 36/4 zum Teil auch intaktes LRP1.

3.2 Nachweis der Adapterproteine in HuH7-Zellen

Im Gesamt-Zellysat sollten verschiedene LRP1-Adapterproteine nachgewiesen werden. Hierbei fiel die Wahl auf fünf hepatische Vertreter mit unterschiedlichen intrazellulären Aufgaben, in die LRP1 involviert ist.

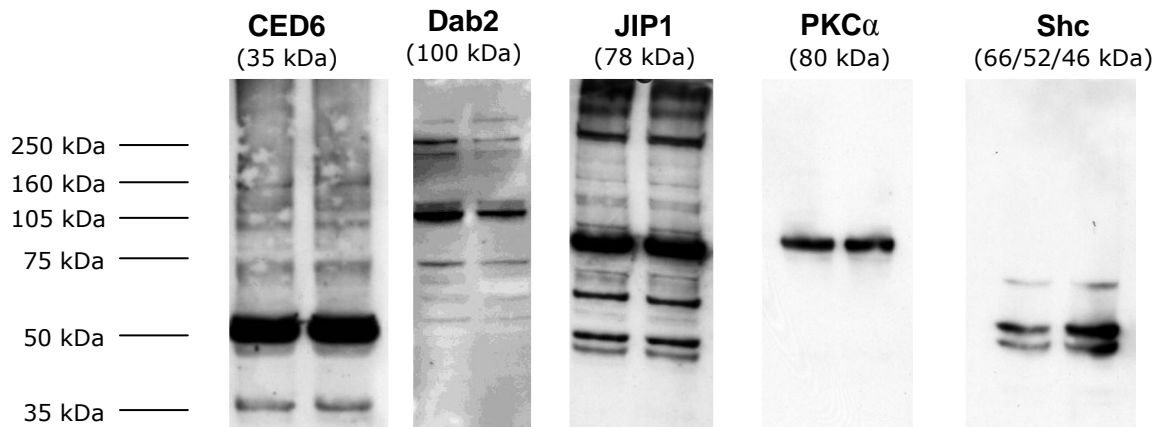


Abbildung 27: Nachweis von LRP1-Adapterproteinen in HuH7-Zellen

HuH7-Zellen inkubiert in DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS ohne Stimulans. Auftrag von jeweils gleichen Mengen an Protein. Westernblot mit Antikörpern s. Tabelle 5. Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 1 min.

| Antikörper | Konzentration |
|------------------|---------------|
| anti-CED6 | 1 : 1.000 |
| anti-Dab2 | 1 : 1.000 |
| anti-JIP1 | 1 : 400 |
| anti-PKCα (C-20) | 1 : 1.000 |
| anti-Shc | 1 : 1.000 |

Tabelle 5: Antikörper gegen intrazelluläre Adapterproteine von LRP1

Die verwendeten Antikörper wurden in den angegebenen Konzentrationen entsprechend der im Methodenteil beschriebenen Verfahren eingesetzt. Nähere Erläuterungen im Text.

Im Blot zeigt sich, dass die gesuchten Adapterproteine in HuH7-Zellen in ausreichender Menge vorhanden sind und sich die Banden im Bereich der erwarteten Größe befinden. Die Antikörper sind ausreichend spezifisch und unspezifische Signale, insbesondere im Falle von CED6 und JIP1 gut von den spezifischen Banden zu differenzieren. Die unspezifische

kräftige Bande bei ca. 50 kDa im CED6-Westernblot wird bereits durch den Hersteller des Primär-Antikörpers beschrieben.

Zusätzlich konnten drei weitere zytosolische Proteine in HuH7-Zellen nachgewiesen werden, die bereits als Adapterproteine von LRP1 beschrieben wurden. Für diese Proteine konnte jedoch in dieser Arbeit keine verlässliche Interaktion mit der LRP1-ICD nachgewiesen werden. Sie sind hier der Vollständigkeit halber aufgeführt.

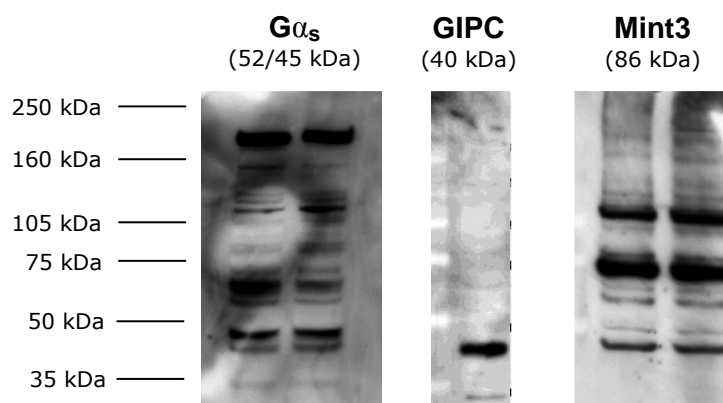


Abbildung 28: Nachweis weiterer LRP1-Adapterproteine in HuH7-Zellen.

HuH7-Zellen inkubiert in DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS ohne Stimulans. Auftrag von jeweils gleichen Mengen an Protein. Westernblot mit Antikörpern s. Tabelle 8. Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 1 min ($G\alpha_s$, GIPC) bzw. 10 min (Mint3).

| Antikörper | Konzentration |
|---------------------------|---------------|
| anti-GIPC / SEMCAP (H-55) | 1:500 |
| anti- $G\alpha_s$ (K-20) | 1:200 |
| anti-Mint3 | 1:500 |

Tabelle 6: Antikörper gegen intrazelluläre Adapterproteine von LRP1

Die verwendeten Antikörper wurden in den angegebenen Konzentrationen entsprechend der im Methodenteil beschriebenen Verfahren eingesetzt. Nähere Erläuterungen im Text.

Auch diese Adapterproteine liegen in HuH7-Zellen in ausreichender Menge vor. Im Falle von $G\alpha_s$ und Mint3 erscheinen die spezifischen Banden bei zu geringer Größe, was die Beurteilbarkeit einschränkt. Die Detektion gelang zudem nicht regelmäßig und wurde oft durch zusätzliche unspezifische Banden gestört.

In den folgenden Westernblots werden anhand der Proteingröße nur noch die spezifischen Zielbereiche dargestellt.

3.3 Co-Immun-Präzipitation

Zur Isolierung von LRP1 aus dem Zellysat wurde das Verfahren der Immun-Präzipitation angewandt. Später sollten auch verschiedene intrazelluläre Adapterproteine durch Co-Immun-Präzipitation angereichert und so ihr Bindungsverhalten unter unterschiedlichen Stimulationsbedingungen untersucht werden. Bereits zuvor wurde die Bindung einzelner Adapterproteine durch Co-IPs mit LRP1 verifiziert (Ranganathan et al., 2004; Barnes et al., 2001).

Als Voraussetzung für weitere Untersuchungen sollte das System der Immun-Präzipitation selbst überprüft werden. Dazu wurde LRP1 mithilfe eines geeigneten Antikörpers an Sepharose-Beads gebunden und nach Inkubation durch Zentrifugieren aus dem Gesamt-Zellysat isoliert. Der Niederschlag (Präzipitat), der Überstand und das Gesamt-Zellysat (Input) wurden in Laemmli-Puffer aufgenommen und zur Elektrophorese auf SDS-PAGE-Gele aufgetragen. Danach wurden die aufgetrennten Proteine in einem Western-Blot-Verfahren auf Nitrozellulose-Membranen übertragen. Zur Kontrolle wurden die Membranen mit Ponceau-Rot gefärbt und auf Lufteinschlüsse während des Blot-Vorgangs untersucht. Nach der Anfärbung folgte die Detektion mittels Luminol-Lumineszenz-Reaktion. Im Western-Blot wurden Überstand- (Ü-) und Präzipitat- (IP-) Lane auf eine mögliche Anreicherung hin untersucht. Zum Vergleich dienten die Input (I-) Lane mit dem Gesamt-Zellysat und ein standardisierter Proteingewichts-Marker (M).

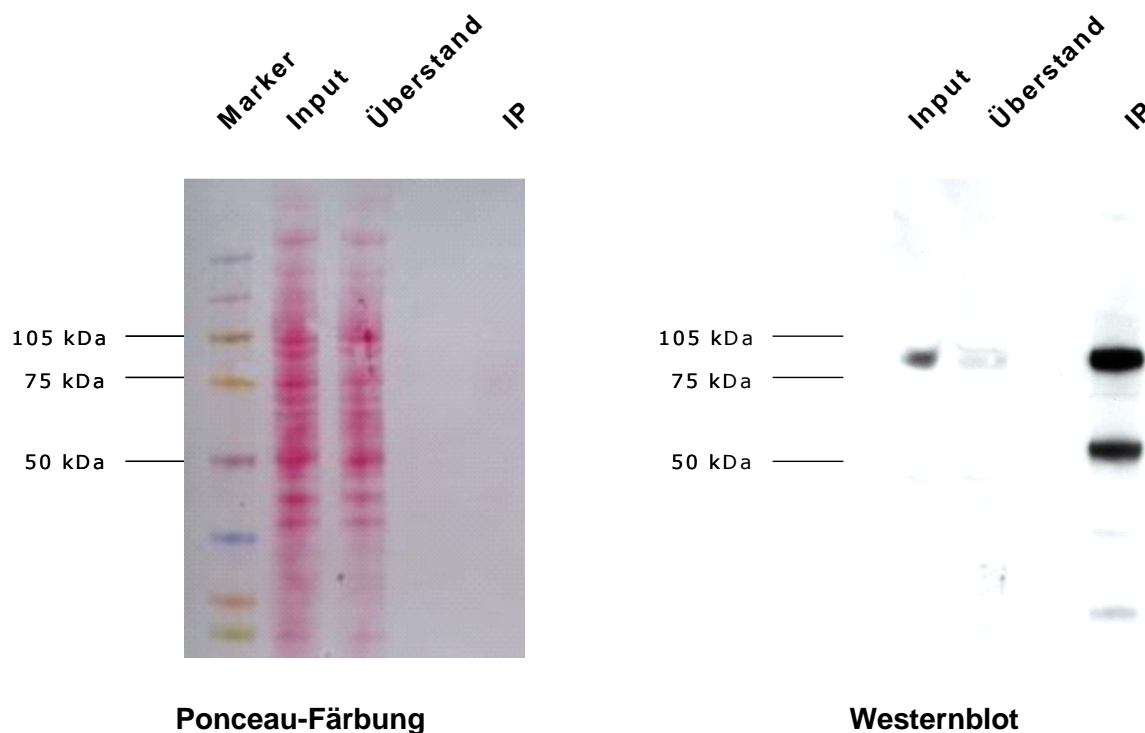


Abbildung 29: Immun-Präzipitation von LRP1, in der Ponceau-Färbung und im Westernblot.

HuH7-Zellen inkubiert in DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS ohne Stimulans. IP mit LRP1-Dolly Antikörper. Westernblot mit LRP1-Dolly Antikörper. Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 1 min.

In der Ponceau-Färbung ist von links nach rechts der Proteingewichts-Marker mit seinen farbigen Banden, und deutlich gefärbt die proteinreichen Lanes von Input und Überstand zu sehen. Die Präzipitat-Lane enthält dagegen nur den IP-Antikörper und das angereicherte Protein – in diesem Fall LRP1 und einige Adapterproteine - und erscheint daher relativ leer. Im Western-Blot ist dieselbe Membran nach der Luminol-Lumineszenz-Reaktion auf einem Röntgenfilm dargestellt. Von links nach rechts markiert der LRP-Dolly-Antikörper die 85 kDa-Untereinheit von LRP1 im Gesamtlisat, etwas schwächer im Überstand und entsprechend deutlich angereichert im Präzipitat. Die zweite Bande bei ca. 50 kDa stellt den IP-Antikörper dar. Es handelt sich hier ebenfalls um LRP-Dolly, der nach Reduktion durch den Laemmli-Puffer in seine Ketten aufgespalten vorliegt und vom anti-Sheep-Sekundärantikörper erkannt wird.

3.3.1 Vorversuche und Kontrollen zu den Immunpräzipitationen

Als Kontrolle wurden nach gleicher Vorbereitung Präzipitationen anstatt mit einem LRP1-Antikörper mit einem ungerichteten (IgG₀) Antikörper derselben Spezies und ganz ohne Antikörper durchgeführt.

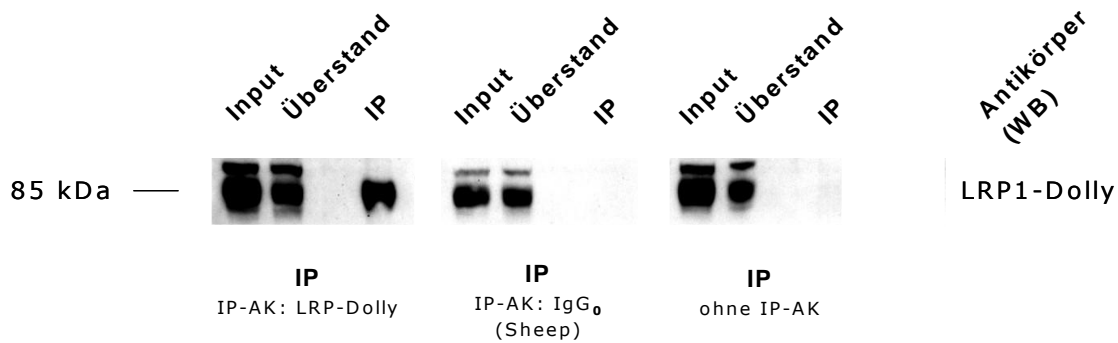


Abbildung 30: Leer-Kontrollen zu Immun-Präzipitationen

HuH7-Zellen inkubiert in DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS ohne Stimulans. IP mit LRP1-Dolly-AK bzw. Sheep-IgG₀-AK bzw. ohne IP-AK. Westernblot mit LRP1-Dolly-AK. Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 1 min.

Es zeigt sich von links nach rechts das Bild einer gelungenen Immun-Präzipitation mit dem LRP1-Dolly-Antikörper und deutlichem Signal in der IP-Lane. Die beiden Leer-Kontrollen zeigen dagegen erwartungsgemäß kein Signal in der IP-Lane, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der LRP1-Dolly-Antikörper für die Immun-Präzipitation notwendig und grundsätzlich geeignet ist.

Zum Vergleich mit LRP1-Dolly wurde auch der LRP1-5A6-Antikörper auf seine Eignung für die folgenden IPs hin untersucht. Dazu wurde er als IP-Antikörper eingesetzt und die LRP1-Anreicherung im Westernblot mit verschiedenen Antikörpern überprüft. Diese IPs sind hier der Vollständigkeit halber aufgeführt, da LRP1-Dolly bei weitem am häufigsten eingesetzt wurde.

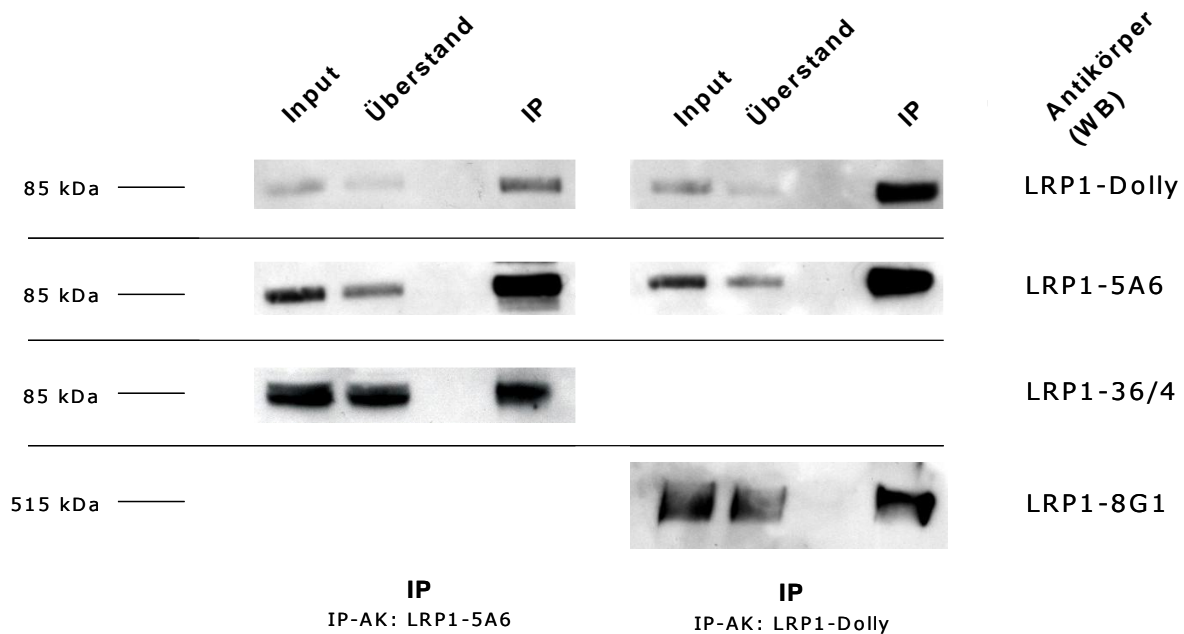


Abbildung 31: Weitere Immun-Präzipitationen von LRP1

HuH7-Zellen inkubiert in DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS ohne Stimulans. IP mit LRP1-5A6-AK bzw. LRP1-Dolly-AK. Antikörper und Konzentrationen siehe Tabelle 4. Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 1 min.

Die LRP1-5A6-IP zeigt in der direkten Kontrolle im Westernblot mit dem LRP1-5A6-Antikörper eine deutliche Anreicherung der LRP1-ICD im Präzipitat. Auch mit dem LRP1-Dolly- und LRP1-36/4-Antikörper lässt sich diese Anreicherung gut darstellen. Auch die LRP1-Dolly-IP lässt zusätzlich zum direkten Nachweis der Anreicherung mit dem LRP1-Dolly-Antikörper gut mit dem LRP1-5A6-Antikörper kontrollieren. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen ist auch eine Anreicherung der 515 kDa- α -Kette von LRP1 mit der LRP1-Dolly-IP nachzuweisen.

Um das Bindungsverhalten von Adapterproteinen an der intrazellulären Domäne von LRP1 zu untersuchen, sollte LRP1 (mitsamt der gebundenen Adapterproteine) wiederum mithilfe eines geeigneten Antikörpers an Sepharose-Beads gebunden und nach Inkubation durch Zentrifugieren aus dem Gesamt-Zellysat isoliert werden. Die Zellen waren zuvor in Kompletmedium kultiviert worden, um möglichst physiologische Bedingungen zu schaffen. Durch ständige Kühlung und Einsatz von Protease- und Phosphataseinhibitor-haltigen Puffern sollte eine mögliche Bindung von Adapterproteinen an die LRP1-ICD konserviert werden. Die Bindung wurde mit Antikörpern gegen das jeweilige Protein im Westernblot geprüft.

Zunächst sollte hier ein verlässliches System geschaffen werden, mit dessen Hilfe in den folgenden Stimulationsversuchen gearbeitet werden konnte.

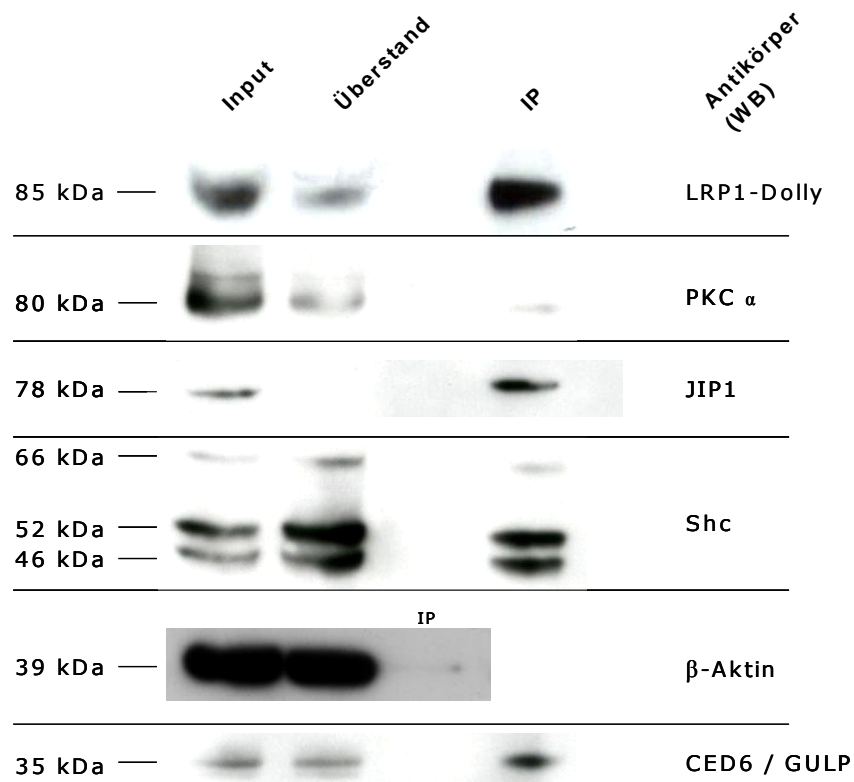


Abbildung 32: Co-Immuno-Präzipitation von LRP1 und Adapterproteinen

HuH7-Zellen inkubiert in DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS ohne Stimulans. Co-IP mit LRP1-Dolly-AK. Westernblot-Antikörper und Konzentration s. Tabelle 4 bzw. 5. Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 1 min.

Unter der Zellkultur mit Komplettmedium und ohne zusätzliche Stimulanzen zeigte sich eine deutliche Anreicherung der 85 kDa-Untereinheit von LRP1, gut an der kräftigen Bande in der IP-Lane im Vergleich zur schwächeren Bande im Überstand zu sehen. Somit ist die Grundvoraussetzung für die Co-Immuno-Präzipitation erfüllt. Mit LRP1 wurde auch, wenn auch in geringem Maße, die PKC α mit angereichert. Dagegen scheint JIP1 gänzlich aus dem Überstand heraus isoliert worden zu sein. Das Adapterprotein Shc liegt in drei Isoformen vor, von denen die 52 kDa- und die 46 kDa-Form stärker im Präzipitat nachzuweisen sind als die nur schwach sichtbare 66 kDa-Isoform. Auch CED6/GULP findet sich gut sichtbar angereichert im Präzipitat. Als Kontrolle wurde zusätzlich das Verhalten von β -Aktin im Westernblot kontrolliert (die Abbildung entstammt einer anderen LRP1-Dolly-Co-IP unter gleichen Bedingungen). Es fand sich jedoch keine signifikante Menge des Proteins im Präzipitat.

Für die Präzipitation von Dab2 kam LRP1-5A6 als IP-Antikörper sowie leicht abgeänderte Pufferbedingungen zum Einsatz.

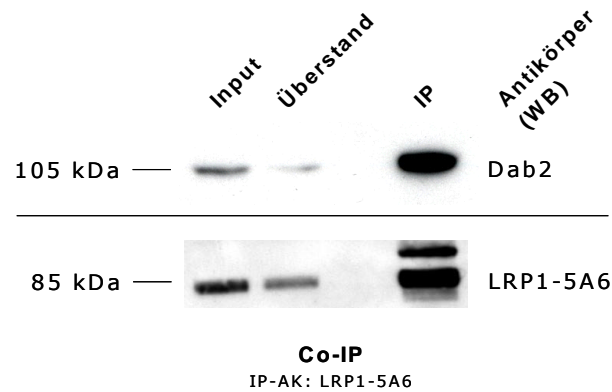


Abbildung 33: Co-Immuno-Präzipitation von LRP1 und Dab2

HuH7-Zellen inkubiert in DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS ohne Stimulans. Co-IP mit LRP1-5A6-AK. Westernblot-Antikörper s. Tabelle 4 bzw 5. Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 20 sek. (Dab2) bzw. 1 min (LRP1-5A6)

Das Adapterprotein Dab2 kann ebenfalls mit LRP1 co-präzipitiert werden. Allerdings sind dazu LRP1-5A6 als IP-Antikörper und eine nicht-reduzierende Form des Laemmli-Puffers notwendig. Es findet sich sowohl eine Anreicherung der LRP1-ICD als auch eine größere Menge an Dab2 im Präzipitat.

Die ebenfalls in HuH7-Zellen nachgewiesenen Adapterproteine GIPC, $G\alpha_s$ und Mint3 ließen sich nicht zuverlässig nachweisen und waren zudem im angewandten Co-IP-System nicht mit LRP1 präzipitierbar.

Zur Kontrolle wurden wiederum Leer-Kontrollen der Co-Immuno-Präzipitationen angefertigt. Dies sollte die Abhängigkeit der Präzipitation der Adapterproteine von der Präzipitation der LRP1-ICD zeigen. Dazu wurden die Zellen wieder im Komplettmedium kultiviert und zur Lyse Protease- und Phosphataseinhibitor-haltige Puffer zur Konservierung der Bindungen von Adapterproteinen an die LRP1-ICD eingesetzt.

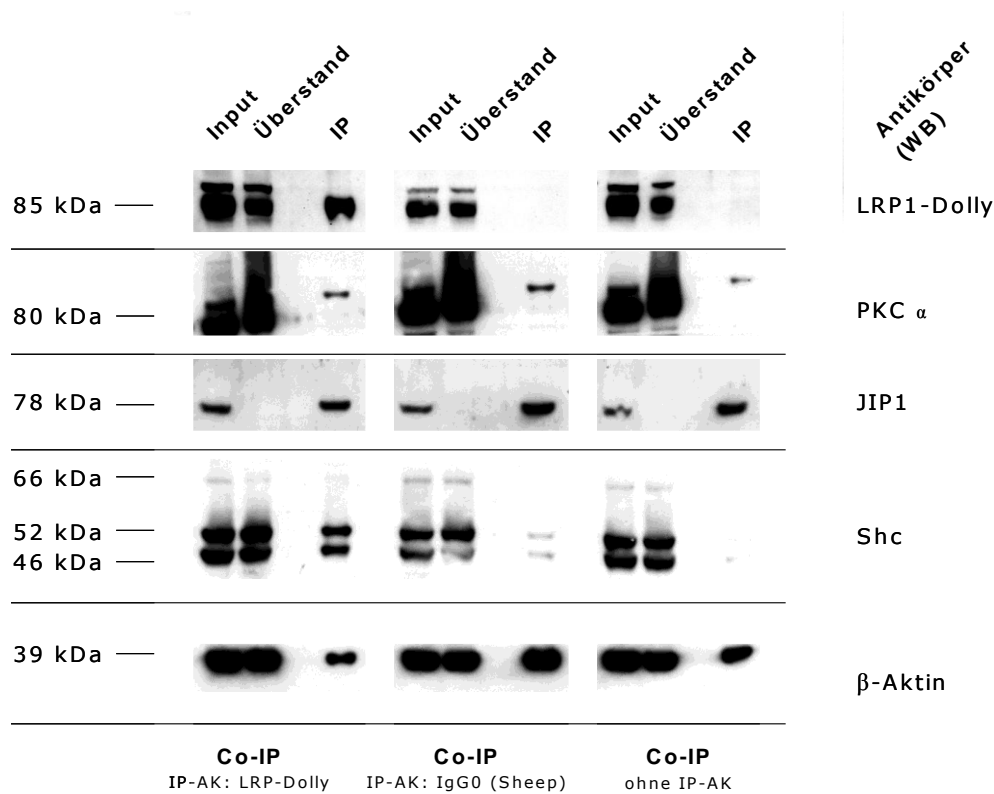


Abbildung 34: Leer-Kontrollen zur Co-Immuno-Präzipitation von Adapterproteinen

HuH7-Zellen inkubiert in DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS ohne Stimulans. Co-IP mit LRP1-Dolly-AK bzw. Sheep-IgG₀-AK bzw. ohne IP-AK. Westernblot-Antikörper s. Tabelle 4 bzw. 5. Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 1 min.

Die Präzipitation der LRP1-ICD mit dem LRP1-Dolly-Antikörper ist gelungen. Dagegen finden sich in den Präzipitaten der Leer-Kontrollen mit dem Schafs-IgG₀-Antikörper und ganz ohne IP-Antikörper keine Signale für LRP1. Die untersuchten Adapterproteine können folglich nur im Präzipitat der Co-IP mit dem LRP1-Dolly-Antikörper spezifisch gebunden haben. Unter den unstimulierten Bedingungen zeigt die PKC α weder in der eigentlichen Co-IP, noch in den Leer-Kontrollen eine Bindung. Das Signal in der IP-Lane liegt bei einem zu hohen Molekulargewicht und muss als unspezifisch betrachtet werden. Bei JIP1 liegt in allen IP-Lanes ein etwa gleich intensives Signal vor. Hier scheint eine von LRP1 unabhängige Bindung an andere Strukturen (z.B. Sepharose-Beads) während der IP vorzuliegen. Von Shc werden die kleineren beiden Isoformen (52 kDa und 46 kDa) deutlich im Präzipitat der Co-IP mit dem LRP1-Dolly-Antikörper sichtbar. Ein schwaches Signal findet sich auch im Präzipitat des IgG₀-Antikörpers, sowie der Kontrolle ohne IP-Antikörper. Das zur Kontrolle nachgewiesene β -Aktin zeigt sich in allen Präzipitaten. Möglicherweise liegt auch hier eine von LRP1 unabhängige Bindung an andere Strukturen während der IP vor.

Um die Bindung von Adapterproteinen an die LRP1-ICD zusätzlich zu verifizieren, wurden „umgekehrte“ Co-Immuno-Präzipitationen durchgeführt. Dazu wurde der IP-Antikörper gegen ein Adapterprotein gewählt und im Westernblot geprüft, ob sich auch LRP1 im Präzipitat angereichert hatte.

Zunächst sollte die wechselseitige Präzipitierbarkeit der LRP1-ICD und dem Adapterprotein Shc geprüft werden. Die Zellen waren zuvor im Komplettmedium kultiviert worden. Es wurden unter gleichen Bedingungen zwei IPs angefertigt, mit dem LRP1-Dolly-Antikörper bzw. dem anti-Shc-Antikörper. Die Präzipitate sollten dann jeweils auf eine mögliche Anreicherung von Shc und der LRP1-ICD untersucht werden.

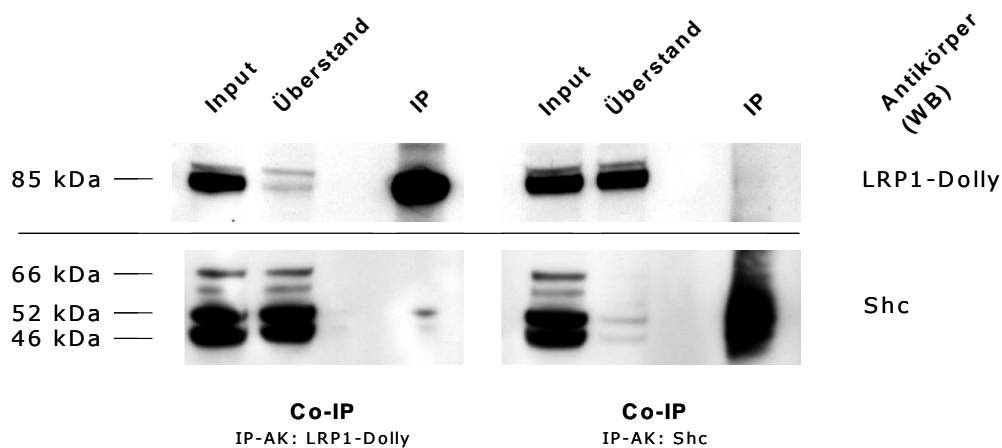


Abbildung 35: Co-Immuno-Präzipitation mit LRP1 und Shc

HuH7-Zellen inkubiert in DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS. Co-IP mit LRP1-Dolly-AK bzw. Shc-AK. Westernblot-Antikörper s. Tabelle 4 bzw. 5. Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 1 min.

Sowohl LRP1 als auch Shc lassen sich in den Kontrollen der Co-IPs nachweisen. Es zeigt sich jeweils eine deutliche Anreicherung im Präzipitat. Im Gegensatz zu Abb. 34 fand unter den gegebenen Bedingungen ohne Stimulanzen in diesem Versuch praktisch keine Bindung von Shc an die LRP1-ICD statt. So konnte auch über Shc als Co-IP-Antikörper kein LRP1 im Präzipitat angereichert werden.

In einer weiteren Kontroll-IP sollte versucht werden, LRP1 mithilfe von Dab2 zu co-präzipitieren. Die Zellen waren zuvor wieder im Komplettmedium kultiviert worden. Unter diesen Bedingungen konnte Dab2 durch LRP1 co-präzipitiert werden. Unter sonst gleichen Bedingungen wurden eine IP mit dem LRP1-5A6-Antikörper und eine IP mit dem anti-Dab2-

Antikörper durchgeführt und im Westernblot auf Signale für Dab2 resp. LRP1 im Präzipitat untersucht.

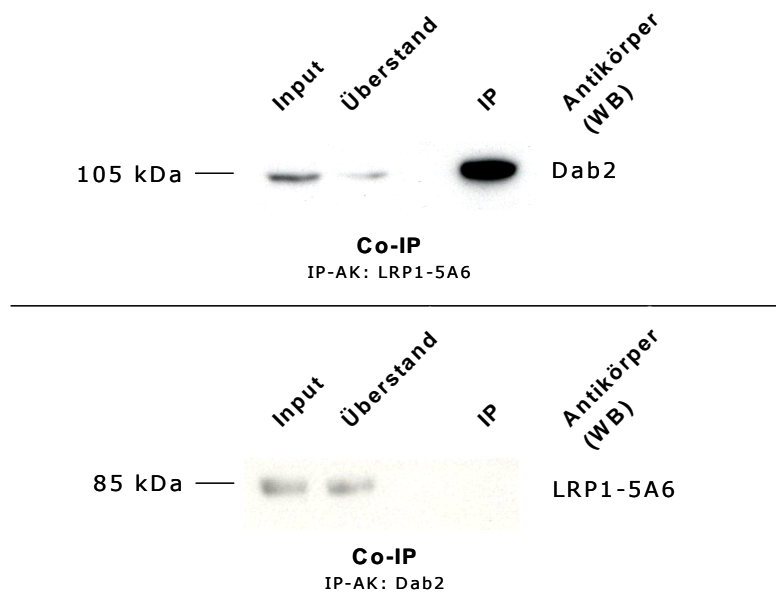


Abbildung 36: Co-Immuno-Präzipitation mit LRP1 und Dab2

HuH7-Zellen inkubiert in DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS. Co-IP mit LRP1-5A6-AK bzw. Dab2-AK. Westernblot-Antikörper s. Tabelle 4 bzw. 5. Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 1 min.

Hier zeigt sich erneut eine starke Anreicherung von Dab2 im Präzipitat von LRP1. Dagegen findet sich kein Signal für LRP1 in der Dab2-IP.

Auch eine mögliche Bindung von β -Aktin an die LRP1-ICD sollte überprüft werden. Dazu wurden wiederum zwei gleiche IPs von unstimulierten Zellen mit dem LRP1-5A6-Antikörper bzw. dem anti- β -Aktin-Antikörper angesetzt. Im Westernblot wurden die Präzipitate auf Signale von β -Aktin und der LRP1-ICD untersucht.

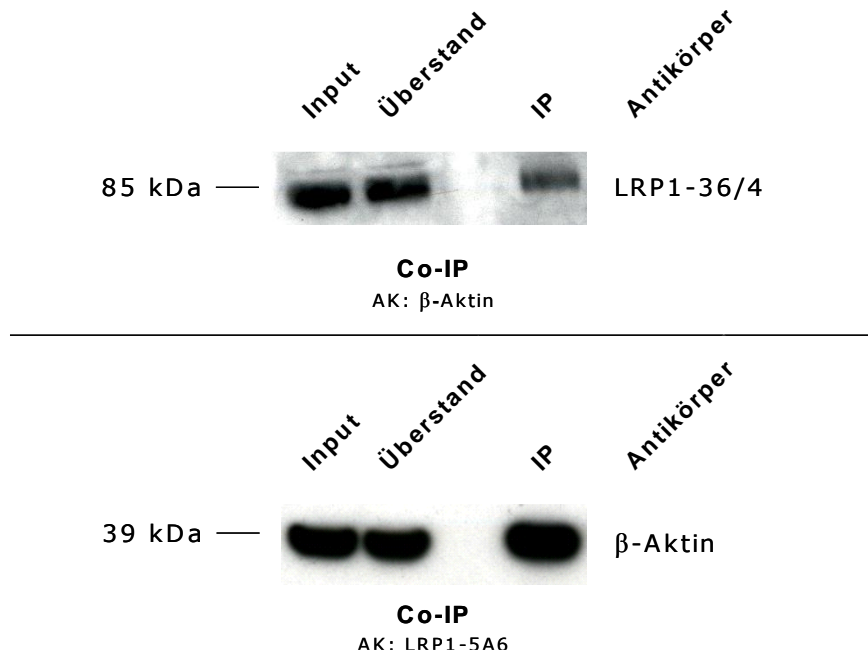


Abbildung 37: Co-Immuno-Präzipitation mit LRP1 und β -Aktin

HuH7-Zellen inkubiert in DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS. Co-IP mit β -Aktin-AK bzw. LRP1-5A6-AK. Westernblot -Antikörper s. Tabelle 4 bzw. 5. Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 1 min (LRP-36/4) bzw. 30 sek (β -Aktin).

Hier zeigt sich eine wechselseitige Präzipitierbarkeit. Im Westernblot findet sich im Präzipitat der β -Aktin-Co-IP ein deutliches Signal für LRP1. Analog findet sich wie auch in den Vorversuchen eine starke Anreicherung von β -Aktin im Präzipitat der LRP1-5A6-Co-IP. Aufgrund der offenbar von LRP1 unabhängigen Präzipitation (s. Abb. 34) muß dieses Ergebnis jedoch als unspezifisch gewertet werden.

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob in HuH7-Zellen auch unter unstimulierten Bedingungen eine Bindung zwischen β -Aktin und Dab2 besteht. Dazu wurden die Zellen im Komplettmedium kultiviert und zwei gleiche Co-IPs mit dem anti- β -Aktin-Antikörper bzw. dem anti-Dab2-Antikörper durchgeführt.

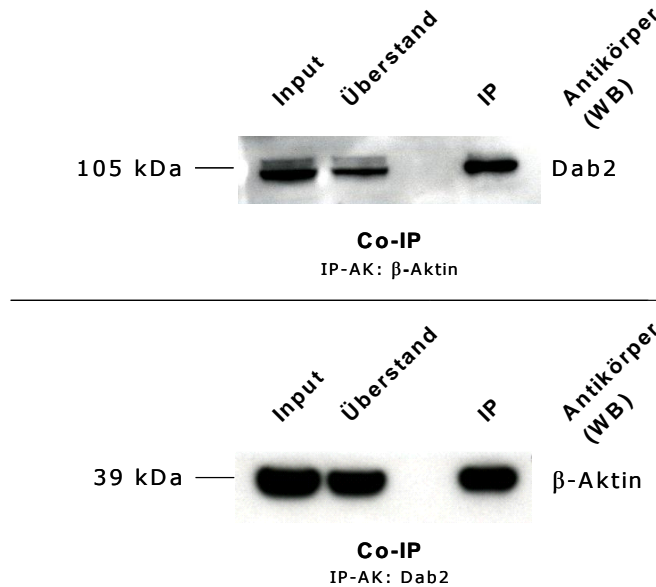


Abbildung 38: Co-Immuno-Präzipitation mit Dab2 und β -Aktin

HuH7-Zellen inkubiert in DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS. Co-IP mit Dab2-AK bzw. β -Aktin-AK. Westernblot-Antikörper s. Tabelle 5. Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 1 min (Dab2) bzw. 30 sek (β -Aktin).

In der β -Aktin-Co-IP wird Dab2 deutlich angereichert, im Vergleich zum Überstand ist das Signal in der IP-Lane kräftiger. Im umgekehrten Fall ist Dab2 in der Lage, β -Aktin zu präzipitieren. Entsprechend intensiv ist das Signal für β -Aktin in der IP-Lane.

Die Ergebnisse der Kontrollexperimente zeigen eine offensichtlich von LRP1 unabhängige, unspezifische Präzipitierbarkeit von JIP1 und β -Aktin. Daher werden diese Adapterproteine in den Ergebnissen der folgenden Co-IPs aus stimulierten HuH7-Zellen nicht mehr dargestellt. Die Präzipitation von PKC α , Shc und CED6/GULP war dagegen in zahlreichen Versuchen reproduzierbar.

3.3.2 Co-Immuno-Präzipitationen aus stimulierten HuH7-Zellen

Um geeignete Kontrollbedingungen zu schaffen, wurden zunächst drei unterschiedliche Medien ohne Stimulans getestet: Ein Hunger-Regime mit Lipoprotein-defizientem Serum (LPDS) und 1% Glucose und zwei Kompletmedium-Regime mit 4,5% Glucose und 10% fötalem Kälberserum (FCS), aus den die kultivierten Zellen jeweils in Pufferlösungen mit bzw. ohne Protease- und Phosphatase-Inhibitoren aufgenommen wurden. Das ausgewählte Regime sollte als Basis für die Stimulanzen und als Negativ-Kontrolle dienen.

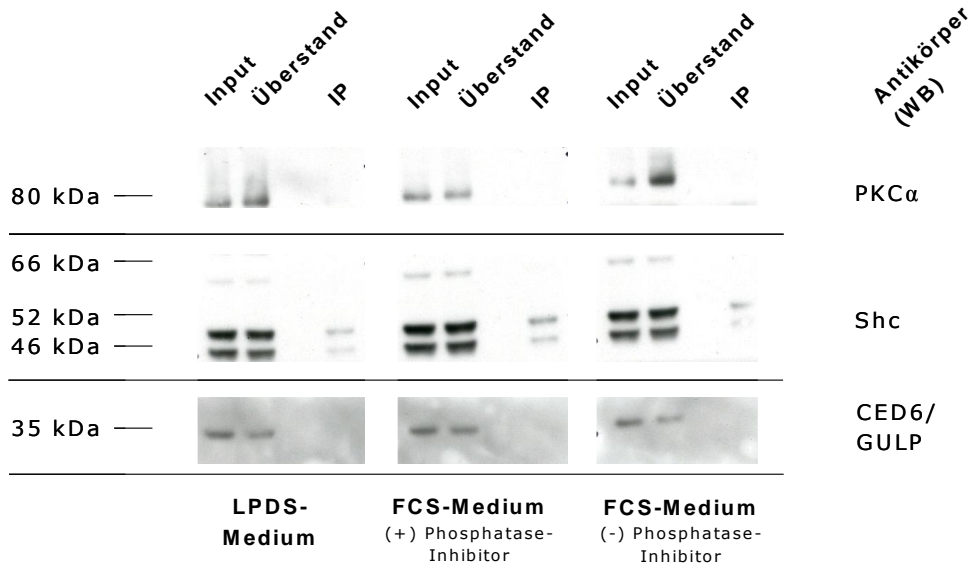


Abbildung 39: Co-Immuno-Präzipitation in unstimulierten HuH7-Zellen – LPDS vs. FCS

2×10^6 HuH7-Zellen inkubiert in LPDS-Medium mit 1% Glukose und 1% PS bzw. DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS über Nacht, dann Mediumwechsel für 2 Std. Aufnahme in Lysis-Puffer +/- Protease-/Phosphatase-Inhibitoren. Co-IP mit LRP1-Dolly-AK. Westernblot-Antikörper s. Tabelle 7. Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 1 min.

Im Westernblot zeigt sich unter keiner der gewählten Bedingungen eine deutliche Anreicherung der nachgewiesenen Adapterproteine. Unter der Inkubation im Komplettmedium mit anschließender Aufnahme der Zellen in Phosphatase-Inhibitor-haltigen Puffer ist ein stärkeres Signal für Shc zu sehen. Möglicherweise liegt dies an der besseren Konservierung der Bindung durch die zugesetzten Phosphatase-Inhibitoren.

Für die folgenden Versuche wurden das Komplettmedium-Regime (DMEM mit 4,5% Glukose, 10% FCS und 1% PS) zur Vorinkubation und die anschließende Aufnahme der Zellen in den Phosphatase-Inhibitor-haltigen Lysis-Puffer gewählt. Diese Kombination ermöglicht den Zellen eine annähernd physiologische Stoffwechsellage und verhindert die LRP1-Downregulation unter niedrigen intrazellulären Cholesterolsiegeln.

HuH7-Zellen wurden mit verschiedenen Substanzen stimuliert, um das Bindungsverhalten der intrazellulären Adapterproteine von LRP1 zu untersuchen. Zum Einsatz kamen sowohl physiologische Liganden von LRP1 (aktiviertes $\alpha 2$ -Makroglobulin, Chylomikronen-Remnants (ApoE), RAP, Lactoferrin) als auch Liganden von Co-Rezeptoren (PDGF-BB) sowie direkte Aktivatoren von intrazellulären Mechanismen (PMA (Phorbol-12- Myristat-13-Acetat), Forskolin).

| Stimulans | Konzentration |
|--------------------------------------|---------------|
| Chylomikronen-Remnants | 5 µg/ml |
| Forskolin | 10 µM |
| Lactoferrin | 10 µg/ml |
| PDGF-BB | 30 ng/ml |
| PMA (Phorbol-12- Myristat-13-Acetat) | 150 nM |
| RAP | 5 µg/ml |
| α ₂ -Makroglobulin | 5 µg/ml |

Tabelle 7: Stimulanzen (Konzentrationen)

Nähere Erläuterungen zu den einzelnen Substanzen im Text.

3.3.2.1 Stimulation mit PMA und Forskolin

Forskolin und PMA sind keine Liganden von LRP1, sondern greifen direkt in intrazelluläre Mechanismen ein. Forskolin aktiviert die Adenylatcyclase und erhöht so den intrazellulären cAMP-Spiegel. Dies führt über die Aktivierung der PKA zu einer Serin-Phosphorylierung der LRP1-ICD (s.a. Kapitel "LRP1 und cAMP")

Für die Stimulation der HuH7-Zellen mit Forskolin wurden eine Konzentration von 10µM und eine Stimulationsdauer von 20 min. gewählt.

Der Phorbol-ester PMA (Phorbol-12- Myristat-13-Acetat) aktiviert die PKCα und führt auf diesem Wege zu einer vermehrten Serin- und Threonin-Phosphorylierung der LRP1-ICD. Diese wirkt sich positiv auf die Tyrosin-Phosphorylierung innerhalb der NPxY-Motive aus, die für die Bindung bestimmter Adapterproteine wichtig sind (siehe auch Kapitel "LRP1 und PKCα").

Für die Stimulation der HuH7-Zellen mit PMA wurden eine Konzentration von 150 nM und eine Stimulationsdauer von 20 min. gewählt.

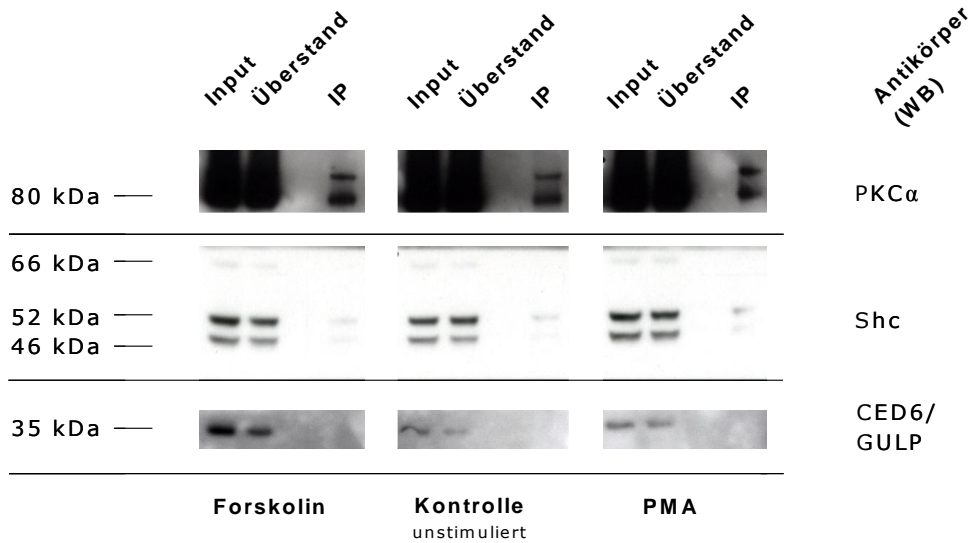


Abbildung 40: Co-Immun-Präzipitation nach Stimulation mit Forskolin und PMA

2×10^6 HuH7-Zellen inkubiert in DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS über Nacht, dann Mediumwechsel für 2 Std. und Stimulation mit 10 mM Forskolin bzw. mit 150 nM PMA für 20 min. Co-IP mit LRP1-Dolly-AK. Westernblot-Antikörper s. Tabelle 5. Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 1 min (PKC α , Shc) bzw für 5 min (CED6).

Im Westernblot zeigt sich sowohl in den IPs aus stimulierten Zellen als auch in der Kontroll-IP eine deutliche Anreicherung der PKC α im Präzipitat. Shc kann etwa gleich intensiv in allen Präzipitaten nachgewiesen werden. CED6/GULP wird nicht präzipitiert. Insgesamt gibt es kein eindeutiges Zeichen dafür, dass Forskolin oder PMA allein eine vermehrte Bindung der untersuchten Adapterproteine bewirken.

3.3.2.2 Stimulation mit α_2 -Makroglobulin und Chylomikronen-Remnants

α_2 -Makroglobulin ist ein homo-tetrameres Protein mit einer ausgeprägten Proteinase-Inhibitor-Aktivität. Entwicklungsgeschichtlich besteht ein Zusammenhang mit den Complement-Proteinen C3, C4 und C5 des Immunsystems (Sottrup-Jensen, 1989; Sottrup-Jensen et al., 1985). Zudem werden Bindungen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren beschrieben (Crookston et al., 1993). Um an LRP1 zu Binden, muß die C-terminale Receptor Binding Domain (RBD) von α_2 -Makroglobulin zugänglich gemacht werden. Dies geschieht durch „Aktivierung“ von α_2 -Makroglobulin, einer Konformationsänderung des Proteins im Rahmen einer Komplexbildung mit verschiedenen Proteasen. Die Bindung an LRP1 erfolgt nur in diesem „aktivierten“ Zustand und führt zur Internalisierung des Komplexes (Lutz, Nimpf et al., 2002). Dabei werden auch intrazelluläre Signalwege angeregt; so wurde beschrieben, dass sich die Bindung von α_2 -Makroglobulin an LRP1 hemmend auf die über

den Glutamat-Rezeptor NMDAR-1 vermittelte Calcium-Ausschüttung in Neuronen auswirkt (Qiu, Strickland et al., 2002).

Für die Stimulation der HuH7-Zellen mit aktiviertem α_2 -Makroglobulin wurden eine Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ und eine Stimulationsdauer von 20 min. gewählt.

Chylomikronen-Remnants gehören zur Familie der Lipoproteine und bestehen aus Triglyceriden und Cholesterolestern, die zum Transport im Blut von einer Hülle aus Phospholipiden und Apolipoproteinen (ApoB₄₈, ApoC und ApoE) umgeben sind. Sie entstehen aus Chylomikronen durch Lipolyse, indem Chylomikronen durch die endothelständige Lipoproteinlipase (LpL) hydrolysiert werden (s.a. Abschnitt Methoden). Über ApoE können Chylomikronen-Remnants an LRP1 (und LDLR) binden und internalisiert werden (Armand, 2007). Hierauf wird im Kapitel "Lipoprotein-Stoffwechsel" genauer eingegangen.

Für die Stimulation der HuH7-Zellen mit Chylomikronen-Remnants wurden eine Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ und eine Stimulationsdauer von 20 min. gewählt.

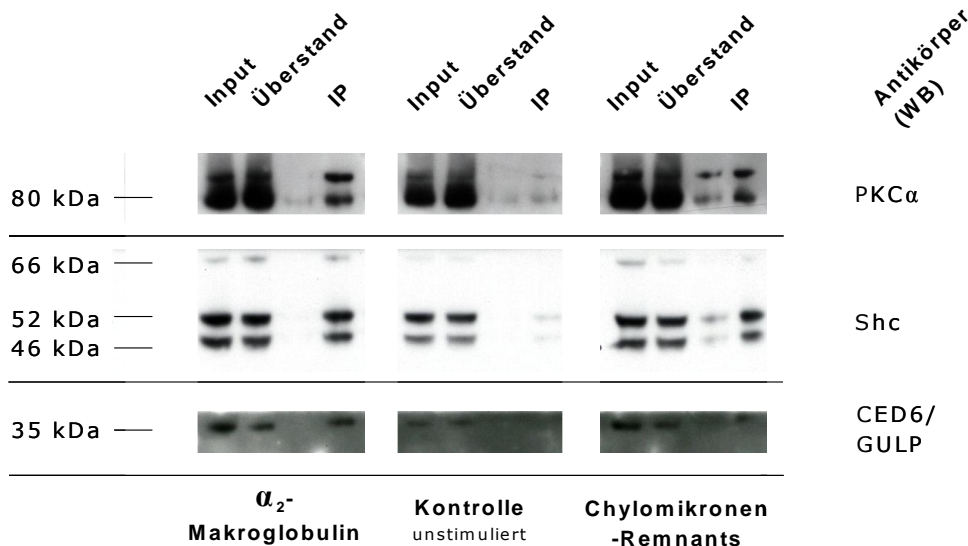


Abbildung 41: Co-Immuno-Präzipitation nach Stimulation mit aktiviertem α_2 -Makroglobulin und Chylomikronen-Remnants

2×10^6 HuH7-Zellen inkubiert in DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS über Nacht, dann Mediumwechsel für 2 Std. und Stimulation mit 5 $\mu\text{g/ml}$ α_2 -Makroglobulin bzw. mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Chylomikronen-Remnants für 20 Min. Co-IP mit LRP1-Dolly-AK. Westernblot Antikörper s. Tabelle 5. Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 1 min.

Nach Stimulation mit aktiviertem α_2 -Makroglobulin, einem direkten Liganden von LRP1, ist im Westernblot eine deutliche Anreicherung von PKC α , Shc und CED6/GULP im Vergleich

zur Kontrolle sichtbar. Im Falle von Shc werden besonders die beiden kleineren Isoformen (52 kDa und 46 kDa) angereichert. Nach Stimulation mit Chylomikronen-Remnants, die über das enthaltene ApoE an LRP1 binden, zeigt sich ein recht ähnliches Bild, wobei die Signale im Präzipitat etwas schwächer sind.

3.3.2.3 Stimulation mit Lactoferrin und RAP

Lacto(trans)ferrin ist ein eisenbindendes Glykoprotein aus der Transferrin-Familie. Es besteht aus einer einzelnen Polypeptid-Kette mit zwei globulären Domänen, die jeweils über eine Bindungsstelle für ein Eisen-Ion verfügen (Brock, 2002). Lactoferrin wurde zuerst als Protein aus Milch und Kolostrum (Vormilch, reich an Enzymen, Protein, Wachstumsfaktoren und Antikörpern) beschrieben und stellt einen Teil der ersten, unspezifischen Immunabwehr dar. Dazu spielt Lactoferrin eine Rolle während der Wundheilung (Migration von Fibroblasten) und im Knochenstoffwechsel (Proliferation von Osteoblasten) (Grey et al., 2004; Cornish et al., 2004). Die Bindung an LRP1 führt zur Internalisierung von Lactoferrin in Osteoblasten. Unabhängig davon bewirkt Lactoferrin auf noch ungeklärtem Wege eine Aktivierung der p42/44 MAPK (mitogen aktivierte Proteinkinase) bzw. ERK1/2 (extrazellulär regulierte Kinase 1/2) und MLC-Kinase (Myosin-Leichtketten-Kinase) (Grey et al., 2004).

Für die Stimulation der HuH7-Zellen mit Lactoferrin wurden eine Konzentration von 10 µg/ml und eine Stimulationsdauer von 20 min. gewählt.

RAP (Receptor Associated Protein) ist ein intrazelluläres Protein, das während der Synthese von LRP1 als Chaperon dient. Darüber hinaus bindet RAP auch nach Fertigstellung des Rezeptors glykosylierungsunabhängig an die Liganden-Bindungscluster II, III und IV und fungiert als starker Antagonist für andere LRP1-Liganden (außer ApoE und Lactoferrin) dar (Croy et al., 2003). Einmal gebunden, kann RAP von anderen Liganden nicht mehr aus der Bindung an LRP1 verdrängt werden (Neels et al., 1999).

Für die Stimulation der HuH7-Zellen mit RAP wurden eine Konzentration von 5 µg/ml und eine Stimulationsdauer von 20 min. gewählt.

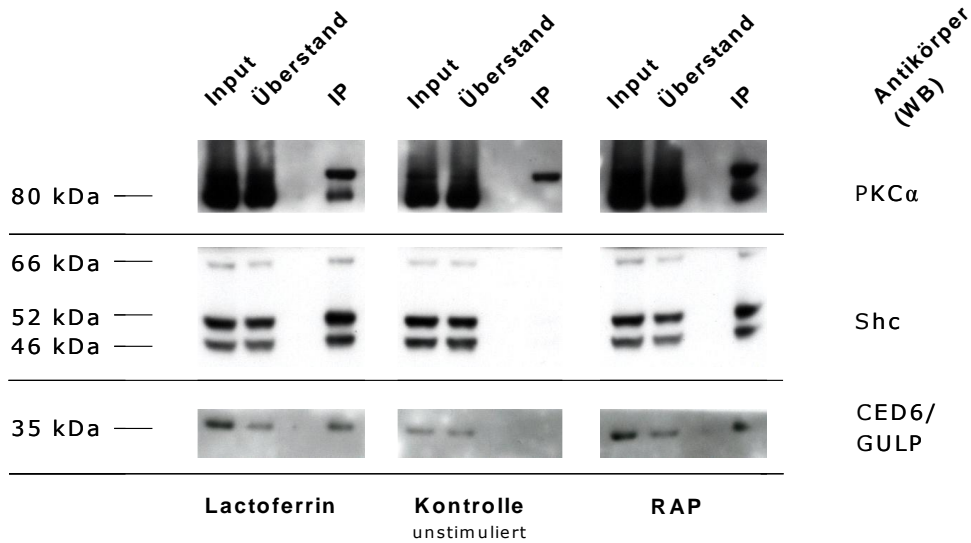


Abbildung 42: Co-Immuno-Präzipitation nach Stimulation mit Lactoferrin und RAP

2×10^6 HuH7-Zellen inkubiert in DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS über Nacht, dann Mediumwechsel für 2 Std. und Stimulation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Lactoferrin bzw. mit 5 $\mu\text{g/ml}$ RAP für 20 Min. Co-IP mit LRP1-Dolly-AK. Westernblot-Antikörper s. Tabelle 5. Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 1 min (PKC α , Shc) bzw. 5 min (CED6)

Durch Stimulation mit dem LRP1-Liganden Lactoferrin ist im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ein kräftiges Signal für PKC α und Shc, sowie ein etwas schwächeres Signal für CED6/GULP zu sehen. Die Stimulation mit RAP, einem weiteren direkten Liganden von LRP1, zeigt vergleichbare Resultate in der Anreicherung von PKC α , Shc und CED6/GULP.

3.3.2.4 Stimulation mit PDGF-BB

PDGF-BB ist kein Ligand von LRP1, sondern bewirkt durch Bindung an den PDGF-Rezeptor- β dessen Funktion als Co-Rezeptor für LRP1, zum Beispiel im Rahmen der Atherosklerose. Hierbei kommt es zu einer Tyrosin-Phosphorylierung innerhalb des distalen NPxY-Motivs der LRP1-ICD und zur Bindung von Shc, woraufhin die Proliferation der Zelle angeregt wird (Barnes et al., 2001). Hierauf wird genauer im Kapitel „LRP1 und Atherosklerose“ eingegangen.

Für die Stimulation der HuH7-Zellen mit PDGF-BB wurden eine Konzentration von 30 ng/ml und eine Stimulationsdauer von 20 min. gewählt.

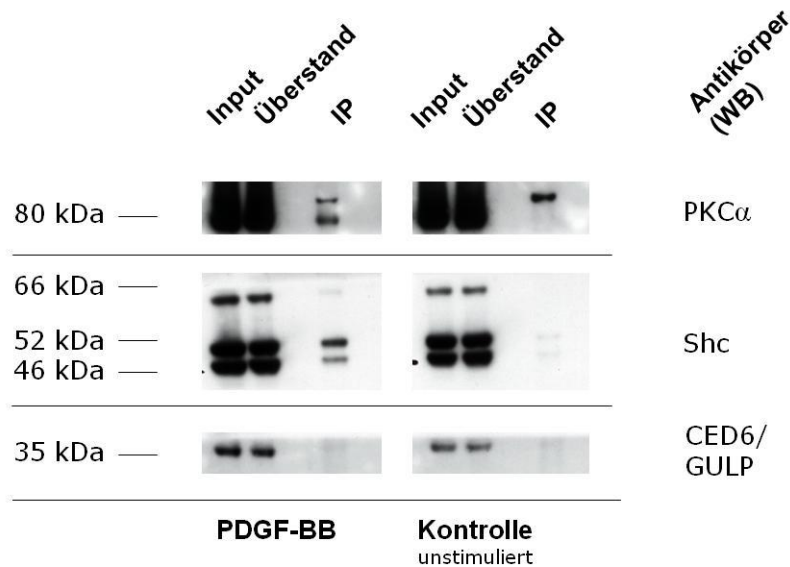


Abbildung 43: Co-Immun-Präzipitation nach Stimulation mit PDGF-BB

2×10^6 HuH7-Zellen inkubiert in DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS über Nacht, dann Mediumwechsel für 2 Std. und Stimulation mit 30 ng/ml PDGF-BB für 20 Min. Co-IP mit LRP1-Dolly-AK. Westernblot-Antikörper s. Tabelle 5. Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 1 min.

Durch Stimulation des PDGF-Rezeptors mit PDGF-BB wurde die Auswirkung als Co-Rezeptor auf LRP1 untersucht. Im Vergleich zur Kontrolle ist nach Stimulation deutlich die Präzipitation von PKC α und Shc zu sehen. Auch hier zeigt sich eine stärkere Anreicherung der 52 kDa und 46 kDa großen Shc-Isoformen. Nicht präzipitiert wurde CED6/GULP.

3.4 GST-RAP-Pulldown

Als Alternative zur Co-Immunpräzipitation kam im Rahmen dieser Arbeit das Prinzip des GST-RAP-Pulldowns zum Einsatz. Auch dieses Verfahren erlaubt eine Isolierung und Anreicherung eines gesuchten Proteins aus einem Proteingemisch. Anstelle eines Antikörpers gegen dieses Protein wird ein Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase (GST) und einem Molekül gebildet, das spezifisch an das gesuchte Protein bindet. Im Falle von LRP1 lag die Nutzung des Receptor-Associated-Protein (RAP) nahe, einem Liganden, der sowohl während der Synthese von LRP1 (als Chaperon) als auch nach dessen Fertigstellung an die Bindungscluster II, III und IV der α -Kette bindet. Danach kann RAP nicht mehr kompetitiv, zum Beispiel durch andere Liganden, aus dieser Bindung verdrängt werden.

Zunächst sollte das Pulldown-Verfahren selbst untersucht werden. Dazu wurde LRP1 mithilfe des GST-RAP-Fusionsproteins an Sepharose-Beads gebunden und durch Zentrifugation aus dem Gesamt-Zellysat isoliert. Analog zur Co-Immunpräzipitation wurden der Niederschlag,

der Überstand und zum Vergleich das Gesamt-Zellysat mit Laemmli-Probenpuffer versetzt, erhitzt und zur Elektrophorese auf SDS-PAGE-Gele aufgetragen. Zur Kontrolle wurde im Ansatz anstelle des GST-RAP-Fusionsproteins lediglich GST zugesetzt. Auf diese Weise sollte die Abhängigkeit einer LRP1-Anreicherung vom Vorhandensein von RAP überprüft werden. Nach der Auftrennung wurde das Protein im Westernblot-Verfahren auf Nitrozellulose-Membranen übertragen. Zum Ausschluss von Lufteinschlüssen während des Blots wurden die Membranen mit Ponceau-Rot gefärbt. Nach der Entfärbung erfolgte die anschließende Detektion durch Luminol-Lumineszenz-Reaktion. Im Western-Blot wurden Überstand- (Ü-) und Pulldown- (PD-) Lane auf eine mögliche Anreicherung hin untersucht. Zum Vergleich dienten die Input (I-) Lane mit dem Gesamt-Zellysat und ein standardisierter Proteingewichts-Marker (M).

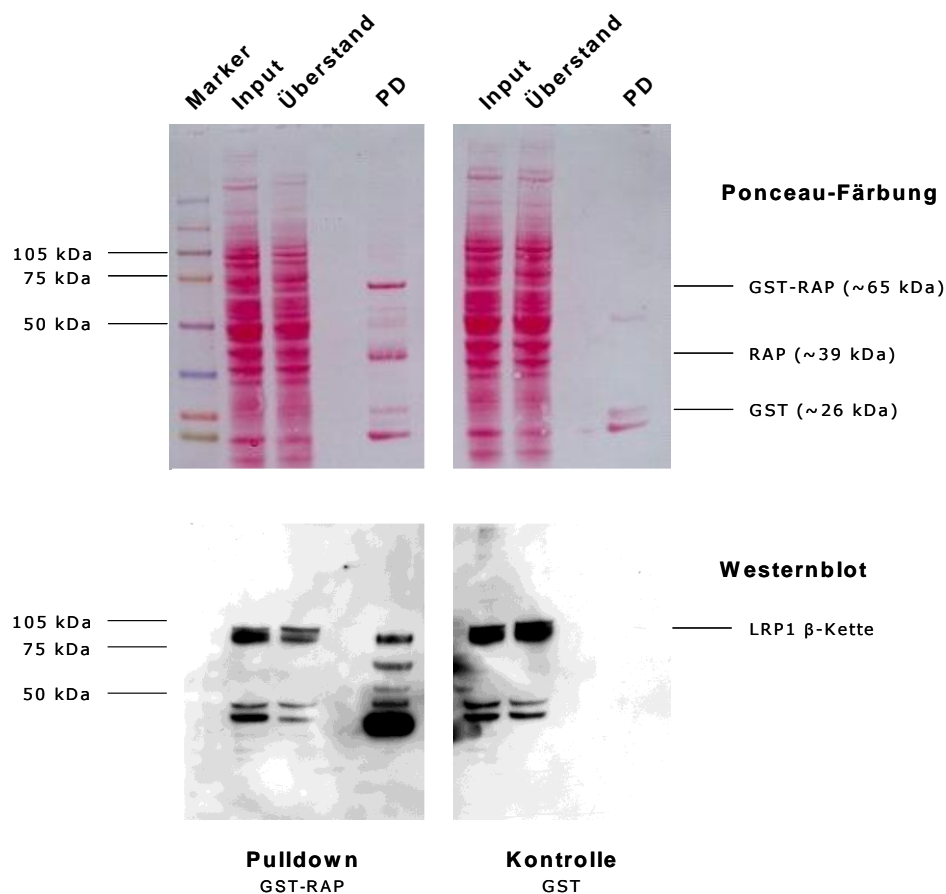


Abbildung 44: GST-RAP-Pull-down von LRP1 und GST-Kontrolle, oben nach Ponceau-Färbung, unten im Westernblot.

HuH7-Zellen inkubiert in DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS ohne Stimulans. Pulldown mit GST-RAP, Kontrolle mit GST. Färbung mit Ponceau-Rot bzw. Westernblot mit LRP1-Dolly-AK (85 kDa). Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 1 min.

Nach der Färbung der Membran mit Ponceau-Rot sind beim Pulldown wie in der Kontrolle die proteinreichen Lanes von Input (Gesamtlysat) und Überstand deutlich zu sehen. Die Pulldown- (PD-) Lane ist erwartungsgemäß fast leer, es finden sich beim Pulldown mit GST-

RAP nur die Banden, die aufgrund der zugesetzten Menge das Fusionsprotein bzw. seine einzelnen Komponenten repräsentieren. In der Kontrolle mit GST fehlen die RAP-Anteile und mit ihnen die entsprechenden Banden. Im Westernblot wurde LRP1 mithilfe des LRP1-Dolly-Antikörpers nachgewiesen. Im Pulldown ist im Vergleich zur Kontrolle neben einigen unspezifischen Banden ein kräftiges Signal für die 85 kDa-Untereinheit von LRP1 zusehen. So kann mit dem GST-RAP-Pulldown die β -Kette mitsamt der LRP1-ICD aus dem Gesamtlysats heraus isoliert und angereichert werden.

Um die Anreicherung von LRP1 zu verbessern wurde die Zusammensetzung der Zell-Lysis-Puffer und Wasch-Probenpuffer angepasst. Für eine bessere Bindung von RAP an LRP1 wurden die Lösungen mit 2,5 mM CaCl_2 versehen. EDTA und EGTA als Calcium-Chelatbildner wurden weggelassen. Näheres zur Zusammensetzung der verschiedenen Pufferlösungen siehe Kapitel „Material“. Um die Wirkung zu überprüfen, wurde je ein Pulldown mit bzw. ohne Calcium in der Pufferlösung angefertigt und im Westernblot auf eine Anreicherung von LRP1 hin untersucht.

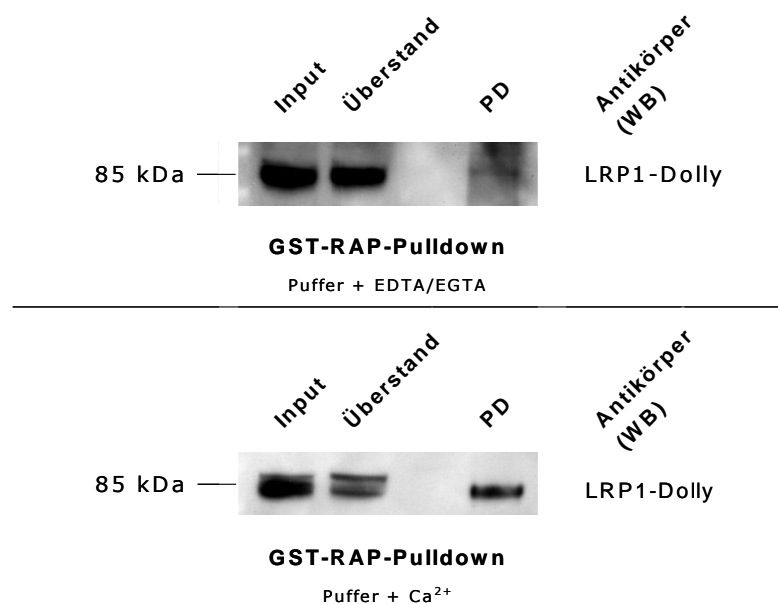


Abbildung 45: GST-RAP-Pulldown von LRP1 +/- Ca^{2+} in der Pufferlösung

HuH7-Zellen inkubiert in DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS. Pulldown mit GST-RAP. Westernblot mit LRP1-Dolly-AK (85 kDa). Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 1 min.

Im ersten Durchgang kam der unveränderte Zell-Lysis-Puffer aus dem Co-IP-Verfahren zum Einsatz. Er enthielt EDTA und EGTA und kein zugesetztes Calcium. Im Westernblot findet

sich eine schwache Bande für LRP1 in der Pulldown-Lane. Die entsprechenden Signale in Input und Überstand in annähernd gleich intensiv.

Im zweiten Durchgang, in dem die Zellen mit dem modifizierten, Ca^{2+} -haltigen Puffer lysiert wurden, ist eine deutlich bessere Anreicherung von LRP1 in der Pulldown-Lane und entsprechend ein vermindertes Signal im Überstand zu sehen. Offensichtlich ist diese Anreicherung nicht nur von der Anwesenheit, sondern auch von der Bindung von RAP an LRP1 abhängig. Im Folgenden wurde ausschließlich die Ca^{2+} -haltige Pufferlösung eingesetzt.

Um das Bindungsverhalten von intrazellulären Adapterproteinen mit der LRP1-ICD zu untersuchen, sollte mithilfe des GST-RAP-Pulldowns LRP1 mitsamt gebundener Adapterproteine aus dem Gesamt-Zellysat isoliert werden. Zur Kontrolle wurde wiederum ein separater Ansatz ausschließlich mit GST anstelle von GST-RAP ausgewertet. Dazu wurden HuH7-Zellen im Kompletmedium kultiviert, um möglichst physiologische Bedingungen zuschaffen. Die Lyse der Zellen und alle weiteren Arbeiten erfolgten unter Kühlung und mit Protease-haltiger Pufferlösung, um entstandene Bindungen zu konservieren. Die Anreicherung von LRP1 und den Adapterproteinen wurde mit entsprechenden Antikörpern im Westernblot untersucht. Das Vorkommen dieser Adapterproteine in HuH7-Zellen war bereits im Vorfeld bestätigt worden (s.o.).

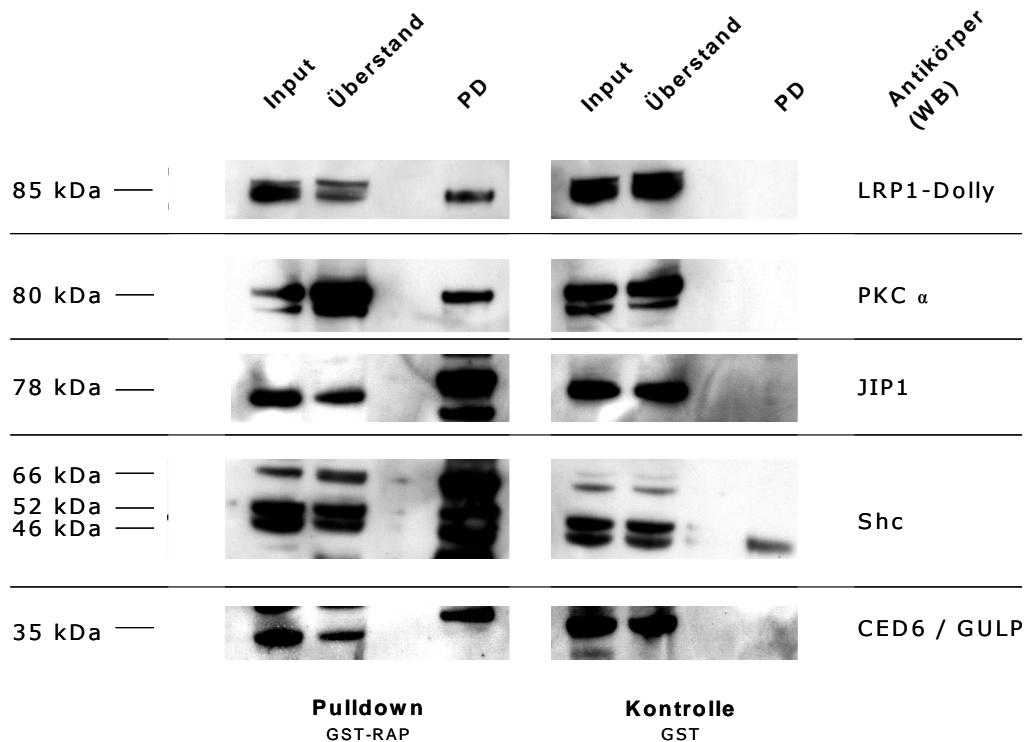


Abbildung 46: GST-RAP-Pullown von LRP1 und Adapterproteinen

HuH7-Zellen inkubiert in DMEM mit 4,5% Glukose und 10% FCS und 1% PS. Pulldown mit GST-RAP. Kontrolle mit GST. Westernblot Antikörper: s. Tabelle 6 bzw. 7. Detektion durch ECL-Lumineszenz-Reaktion. Exposition für 30 sek.

Im Westernblot ist gut sichtbar LRP1 durch den GST-RAP-Pulldown angereichert worden, in der GST-Kontrolle hingegen bleibt die Pulldown-Lane leer. Damit sind die Grundvoraussetzungen für die Beurteilung der Anreicherung von LRP1-Adapterproteinen gegeben. PKC α , JIP1, Shc und CED6/GULP sind deutlich in der Pulldown-Lane deutlich zu sehen, wobei bei JIP1 und Shc mehrere unspezifische Banden auftreten. Eine dieser Banden tritt im Falle von Shc auch in der GST-Kontrolle auf. Das Signal für angereichertes CED6/GULP im Pulldown liegt etwas über dem erwarteten Molekulargewicht.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde anhand der Hepatomzelllinie HuH7 untersucht, inwiefern sich die Stimulation mit verschiedenen LRP1-Liganden auf das Bindungsverhalten von intrazellulären Adapterproteinen an die intrazelluläre Domäne von LRP1 auswirkt. Zusätzlich wurde erforscht, ob sich die Funktionen von LRP1 in Endozytose und Signalwegen in der Bindung spezifischer Adapterproteine widerspiegeln.

Nach Stimulation der HuH7-Zellen mit α_2 -Makroglobulin, ApoE-haltigen Chylomikronen-Remnants, Lactoferrin und RAP, sowie mit PMA, Forskolin und PDGF-BB wurde mithilfe der Co-Immunpräzipitation LRP1 mitsamt gebundener Adaptern aus dem Zellysat angereichert. Der Einfluss der Liganden wurde mit semi-quantitativen Western-Blot Techniken untersucht. Als alternative Technik kam zusätzlich ein GST-RAP-Pulldown-Verfahren zum Einsatz.

4.1 Nachweis von LRP1 und Adapterproteinen in HuH7-Zellen

Der Nachweis von LRP1 in HuH7-Zellen als Voraussetzung für weitere Versuche gelang mit den Antikörpern „LRP1-8G1“ gegen die 515 kDa große α -Untereinheit sowie mit „LRP1-Dolly“, „LRP1-5A6/8B8“ und „LRP1-36/4“ gegen die 85 kDa große β -Untereinheit. Die entsprechenden Banden im Westernblot liegen im Bereich des zu erwartenden Molekulargewichtes und erscheinen intensiv, was auf einen ausreichenden Gehalt der Zellen an LRP1 schließen lässt (s. Abbildung 26). Zuvor war bereits die Expression von LRP1 in dieser Hepatomzelllinie beschrieben worden (Moore et al., 2003).

Die zu untersuchenden Adapterproteine wurden anhand ihrer Aufgaben im Zellinnern ausgewählt. Ihre Bindung an die LRP1-ICD wurde bereits zuvor in Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen beschrieben (Gotthardt, Trommsdorff et al., 2000). Um besser zu verstehen, wie LRP1 einerseits in die Endozytose und andererseits in verschiedene Signalkaskaden eingebunden ist, wurde angestrebt, einen breiten Überblick zu erlangen. Es wurden folgende Adaptern untersucht:

- CED6/GULP als zentrales Protein der Phagozytose und des Cholesterolefflux spielt gemeinsam mit LRP1 eine wichtige Rolle im immunologischen Kontext (Kinchen u. Ravichandran, 2007; Gardai et al. 2005)
- Dab2 vermittelt die Einbindung von LRP1 in Clathrin-coated Pits und stellt mit seinen zahlreichen Interaktionen einen wichtigen Teil der Rezeptor-vermittelten Endozytose

dar, z.B. im Rahmen der Atherosklerose-Entstehung (Dance et al., 2004; Hasson et al. 2003; Morris et al., 2001).

- JIP1 ist ein Gerüstprotein, das als Teil des intrazellulären Transportapparates das Bindeglied zwischen LRP1 und Kinesin-1 darstellt sowie an der Kontrolle mitogener Faktoren beteiligt ist (Blasius et al., 2007; Whitmarsh, 2006; Gotthardt, Trommsdorff et al., 2000).
- PKC α bildet in aktiviertem Zustand einen Komplex mit LRP1. Die Proteinkinase bewirkt eine Serin-/Threonin-Phosphorylierung innerhalb der LRP1-ICD und hat Einfluss auf das Bindungsverhalten anderer Adapterproteine. Bereits zuvor wurde PKC α in HuH7-Zellen im Zusammenhang mit der Phosphorylierung eines Kernproteins des Hepatitis B-Virus beschrieben (Kang et al., 2008).
- Shc liegt in drei Isoformen vor, die in Signalwege einerseits der Proliferation, andererseits der Apoptose eingebunden sind. Besondere Bedeutung kommt Shc im Rahmen der Atherosklerose-Entstehung zu. Shc wurde bereits in HuH7-Zellen in Verbindung mit Mechanismen der Tumorzellproliferation beschrieben (Carloni et al., 2004).

Im Westernblot stellen sich die Adapterproteine als Banden reproduzierbar deutlich und gut abgegrenzt dar, sodass von einer ausreichenden Menge und einer guten Nachweisbarkeit ausgegangen werden kann (s. Abbildung 27).

Im Rahmen der Vorversuche wurden auch die Adaptoren GIPC/SEMCAIP, G-Protein- α_s und Mint3 in ausreichender Konzentration HuH7-Zellen nachgewiesen (s. Abbildung 28). Allerdings gelangen die Präzipitation und die Darstellung der Proteine im Westernblot nicht zuverlässig und wurden zudem oft durch unspezifische Banden gestört. Daher wurden diese Proteine in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

4.2 Co-Immun-Präzipitation

In dieser Arbeit sollte ein zuverlässiges Präzipitations-Verfahren zum Einsatz kommen, das einerseits möglichst spezifisch für LRP1 bzw. die intrazelluläre Domäne ist, das andererseits möglichst wenig Einfluss auf die zu untersuchenden Interaktionen hat. Es sollte weder mit den zur Stimulation eingesetzten Liganden interferieren, noch die Bindung der Adapterproteine behindern, etwa durch Verlegung der Bindungsmotive der ICD. Für die Versuche wurden eine Co-Immun-Präzipitation und ein GST-RAP-Pulldown (s.u.) gewählt.

Das Verfahren der Co-Immun-Präzipitation wurde eingesetzt, um LRP1 mitsamt gebundener Adapterproteine aus dem Gesamt-Zellysate zu isolieren. Die Methode wurde in anderer Form bereits erfolgreich eingesetzt, um die Bindung von Shc an LRP1 in murinen Fibroblasten und HEK 293-T Zellen zu untersuchen (Barnes et al., 2003).

4.2.1 Vorversuche und Kontrollen zu den Co-Immunpräzipitationen

Als Antikörper für die Co-Immun-Präzipitation (Co-IP) fiel die Wahl auf „LRP1-Dolly“, einen polyklonalen Schaf-anti-Human-Antikörper, der freundlicherweise von der Arbeitsgruppe PD Dr. Heeren zur Verfügung gestellt wurde. (vgl. J. Heeren et al., JBC 2001) Er ist gegen eine C-terminale Sequenz der 85 kDa großen β -Kette gerichtet.

Um die Abhängigkeit einer Anreicherung von LRP1 von der IP zu beweisen, wurde der Versuchsaufbau jeweils mit einem Schafs-IgG₀-Antikörper und ganz ohne Antikörper kontrolliert. Erwartungsgemäß zeigte sich eine Anreicherung von LRP1 im Westernblot nur in jenem Ansatz, der mit „LRP1-Dolly“ als IP-Antikörper durchgeführt worden war. So konnte sichergestellt werden, dass eine mögliche Anreicherung nicht Folge unspezifischer Bindungen an andere Substanzen im Versuchsansatz war (s. Abbildung 30).

Da die Detektion im Westernblot ebenfalls mit „LRP1-Dolly“ und somit mit einem sekundären Esel-anti-Schaf-Antikörper erfolgen sollte, wurden die ersten Ergebnisse zusätzlich mit anderen zur Verfügung stehenden LRP1-Antikörpern aus anderen Spezies kontrolliert. So wurde deutlich, dass tatsächlich das LRP1-Protein und nicht nur „LRP1-Dolly“ als IP-Antikörper durch den sekundären Antikörper detektiert wurde (s. Abbildung 31).

Die HuH7-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 4,5 g/l Glucose und 10% fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert, um eine möglichst ausgeglichene Stoffwechsellage zu erreichen. Um die Bindung der Adaptoren an die LRP1-ICD zu konservieren, wurden die Zellen auf Eis geerntet, lysiert und die Co-IP bei 4°C durchgeführt. Zusätzlich wurde die zur Lyse eingesetzte Pufferlösung mit Protease- und Phosphataseinhibitoren versetzt, da CED6/GULP und Shc zur Bindung auf phosphoryliertes Tyrosin im distalen NPxY-Motiv angewiesen sind. Unter diesen Bedingungen ließen sich die Adapterproteine CED6/GULP, JIP1, PKC α und Shc zuverlässig präzipitieren und im Westernblot nachweisen (s. Abbildung 32). Offensichtlich besteht in der anabolen Stoffwechsellage durch das eingesetzte Medium bereits eine Bindung der Adaptoren an LRP1. Im Falle von Dab2 war eine Präzipitation mit „LRP1-Dolly“ als Co-IP-Antikörper nicht erfolgreich, weswegen hier „LRP1-5A6“ und ein

abgeänderter Laemmli-Probenpuffer erfolgreich zum Einsatz kamen (s. Abb. 33). Das zur Kontrolle nachgewiesene β -Aktin zeigte hier keine Anreicherung.

Um nachzuweisen, dass die Anreicherung der Adapterproteine von der Anwesenheit von LRP1 abhängig ist, wurden wiederum Kontrollansätze der Co-IP von Zellen im oben beschriebenen Komplettmedium mit ungerichtetem IgG₀-Antikörper und ganz ohne IP-Antikörper untersucht (s. Abb. 34). Bei dieser Versuchsreihe stellte sich heraus, dass die Anreicherung von JIP1 völlig unabhängig von Art und Anwesenheit eines Co-IP-Antikörpers geschah. Auch das zur Kontrolle untersuchte β -Aktin wurde in allen drei Ansätzen präzipitiert. Möglicherweise lagen hier unspezifische Bindungen an Strukturen während der Co-IP vor, z.B. an Sepharose-Beads. JIP1 und β -Aktin wurden daher aus den weiteren Experimenten ausgeschlossen. Weshalb die zuvor und später festgestellten Anreicherungen der PKC α hier nicht nachzuweisen waren, konnte nicht sicher festgestellt werden. Offenbar waren bestimmte Zellkulturbedingungen bedeutend für die Interaktion.

Es wurde zusätzlich überprüft, ob sich sicher und fraglich von LRP1 abhängige Präzipitationen auch umkehren lassen, ob also mit einem Co-IP-Antikörper gegen ein Adapterprotein auch LRP1 präzipitiert werden kann. Hierfür wurden die Interaktionen von LRP1 und Shc, Dab2 sowie β -Aktin ausgewählt. Die HuH7-Zellen wurden dazu wieder in DMEM-Medium mit 4,5 g/l Glucose und 10% FCS gehalten. Im Falle der Co-IP mit Shc konnte LRP1 nicht angereichert werden (s. Abbildung 35). Dies kann einerseits mechanisch in den Größenverhältnissen begründet liegen, in dem Sinne, daß eine Bindung zwischen dem ca. 60 kDa großen Shc und dem rund zehnmal größeren LRP1 nicht stabil genug ist. Jedoch verwundert es, dass nicht wenigstens die für die Bindung relevante 85 kDa große β -Kette im Präzipitat nachzuweisen war. Andererseits ist es möglich, dass das für die Bindung von Shc notwendige Tyrosin im distalen NPXY-Motiv nicht phosphoryliert vorlag, und die Bindung aus diesem Grund nicht zustandekam (Barnes et al., 2003). Eine weitere Möglichkeit ist, dass der Co-IP-Antikörper gegen Shc die bindende PTB-Domäne blockiert. Die Umkehr-Co-IP mit Dab2 zeigt ebenfalls keine Anreicherung von LRP1 (s. Abbildung 36). Die Ursachen hierfür können die gleichen sein wie auch im Falle der Co-IP mit Shc. Allein die fehlende Phosphorylierung kann nicht der Grund sein, da Dab2 für seine Bindung an die LRP1-ICD unphosphoryliertes Tyrosin bevorzugt (Howell et al., 1999; Batzer et al., 1995).

4.2.2 Co-Immun-Präzipitationen aus stimulierten HuH7-Zellen

An erster Stelle stand die Wahl des Kulturmediums, mit dem die HuH7-Zellen auf die Stimulation vorbereitet werden sollten. Zusätzlich sollte es als Referenz für die Ergebnisse

aus den stimulierten Zellen dienen. Ein Hunger-Regime mit Lipoprotein-defizientem Serum (LPDS) und 1 g/l Glucose sowie ein Komplettmedium-Regime mit fötalem Kälberserum (FCS) und 4,5 g/l Glucose mit bzw. ohne Phosphatase-Inhibitoren zeigten im direkten Vergleich der Co-IPs ohne zusätzliche Stimulanzien ein ähnliches Bild (s. Abb. 39). Shc zeigte im Komplettmedium-Ansatz mit Phosphatase-Inhibitoren ein geringfügig stärkeres Signal im Präzipitat, was sich mit der Abhängigkeit der Bindung vom Phospho-Tyrosin im distalen NPxY-Motiv von LRP1 erklären lässt. Da unter Cholesterol-Mangel die Expression von LRP1 vermittelt durch SREBPs herunterreguliert wird, erschien das cholesterolarme Hunger-Regime nicht geeignet (Llorente-Cortes et al., 2002). Hinzu kommt die Beobachtung, das LRP1 unter Insulinmangel von der Zelloberfläche ins Zellinnere verlagert wird (Laatsch et al., 2008; Zhang et al., 2004). Unter diesen Umständen wäre eine erfolgreiche Stimulation mit LRP1-Liganden wenig erfolgversprechend gewesen. Daher wurde das Komplettmedium-Regime gewählt, um ausreichende LRP1-Level und die Präsenz an der Zelloberfläche durch Cholesterol und Insulin aus dem FCS aufrechtzuerhalten. Die Zugabe von Phosphatase-Inhibitoren sollte auftretende Phosphorylierungen konservieren und so die Präzipitation von Adapterproteinen wie CED6/GULP und Shc erleichtern, die für ihre Bindung auf Phospho-Tyrosin im distalen NPxY-Motiv angewiesen sind.

4.2.2.1 Stimulation mit PMA und Forskolin

Die Stimulation mit PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) und Forskolin scheint sich nicht auf das Bindungsverhalten der untersuchten Adapterproteine auszuwirken (s. Abbildung 40). Ausschließlich PKC α war in den Präzipitaten ohne Unterschiede nachzuweisen. Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen in PAC1-Zellen (abgeleitet von der pulmonalen glatten Muskulatur der Ratte), in denen PMA zu einer verstärkten Bindung von PKC α an LRP1 führte (Ranganathan et al., 2004). Offensichtlich reicht die Aktivierung der Adenylatcyclase (durch Forskolin) sowie der PKC α (durch PMA) und die damit verbundene Serin-/Threonin-Phosphorylierung an der LRP1-ICD allein nicht aus, um eine Bindung von CED6/GULP oder Shc herbeizuführen. Unter Umständen spielen hier auch A-Kinase Anchoring Proteine (AKAP) eine Rolle, indem sie bestimmte Signalwege der PKC α an einen Ort binden und sie durch Kompartimentierung unabhängig von anderen Signalwegen ablaufen lassen (Faux et al., 1999). Möglicherweise hätten sich PMA und Forskolin gemeinsam mit LRP1-Liganden wie α_2 -Makroglobulin oder Chylomikronen-Remnants durch Unterstützung der Tyrosin-Phosphorylierung im distalen NPxY-Motiv verstärkend auf die Bindung von CED6/GULP

oder Shc ausgewirkt (Ranganathan et al., 2004; Loukinova et al., 2002; Li et al., 2001). Dies ist jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht worden.

4.2.2.2 Stimulation mit α_2 -Makroglobulin und Chylomikronen-Remnants

Die Stimulation mit (aktiviertem) α_2 -Makroglobulin führte zu einer deutlichen Präzipitation von CED6/GULP, PKC α und Shc. (s. Abbildung 41) Offensichtlich spricht α_2 -Makroglobulin sowohl die Signalfunktion (Shc, PKC α) als auch die Endozytose-Fähigkeit (CED6/GULP) von LRP1 an. Die Stimulation mit Chylomikronen-Remnants über ApoE zeigt ein ganz ähnliches Bild. Die hohe Konzentration von Chylomikronen-Remnants, wie sie im Blut nach einer fetthaltigen Mahlzeit auftritt, führt neben der Aktivierung der Partikelaufnahme offensichtlich auch zur Aktivierung von proliferativen Signalwegen (Shc). Möglicherweise wird hier über CED6/GULP und ABCA1 auch der Cholesterol-Efflux im Rahmen der intrazellulären Cholesterol-Homöostase angeregt.

Von den drei Shc-Isoformen wurden jeweils vor allem die beiden kleineren Isoformen (52 kDa und 46 kDa) gebunden, die im Zusammenhang mit der Zell-Proliferation stehen (Lai et al., 2000). Die Präzipitation von PKC α deutet auf deren Beteiligung an der Serin-/Threonin-Phosphorylierung an der LRP1-ICD hin. Dies ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass phosphoryliertes LRP1 länger an der Zelloberfläche verbleibt und so zur Bindung weiterer Liganden zur Verfügung steht (Ranganathan et al., 2004). Das deutliche Signal von CED6/GULP spricht für eine Aktivierung des Endozytose-Apparates, was im Falle der Chylomikronen-Remnants als klassische Endozytose-Liganden wahrscheinlich erscheint. Unter Umständen ist dies auch ein Hinweis auf die Verbindung von CED6/GULP zu ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A-1) und dessen Rolle in der HDL-Bildung und Cholesterol-Homöostase (Basso et al., 2002).

4.2.2.3 Stimulation mit Lactoferrin und RAP

Die Stimulation mit Lactoferrin bewirkte ebenfalls eine deutliche Präzipitation von CED6/GULP, PKC α und Shc. (s. Abbildung 42) Offensichtlich hat die Bindung von Lactoferrin, wie auch α_2 -Makroglobulin und Chylomikronen-Remnants (ApoE), Einfluss sowohl auf die Signalkomponente (Shc, PKC α) als auch auf die Endozytose-Aktivität (CED6/GULP) von LRP1. Möglicherweise wird die bisher ungeklärte Aktivierung der p42/44 MAPK durch Lactoferrin über die Bindung von Shc an die LRP1-ICD vermittelt (Grey et al., 2004).

Interessanterweise zeigte sich ein ganz ähnliches Bild auch nach der Stimulation mit RAP. Gewöhnlich wird RAP in erster Linie als Chaperon während der Reifung von LRP1 beschrieben, das zusätzlich eine Schutzfunktion gegen vorzeitige Bindung von Liganden an die α -Kette und mögliche Konformationsänderungen des Moleküls darstellt. Nach vollständig erfolgter Prozessierung von LRP1 kann RAP noch immer an drei der vier extrazellulären Liganden-Bindungscluster binden, stellt dort jedoch vor allem einen starken Antagonisten für andere LRP1-Liganden dar (Croy et al., 2003). Durch die deutliche Bindung aller untersuchten Adapterproteine liegt jedoch nahe, daß die Bindung von RAP einer aktivierten Ligandenbindung mit Beteiligung am Signal- und Endozytosegeschehen gleichkommt (s.a. Diskussion der GST-RAP-Pulldown Versuche).

4.2.2.4 Stimulation mit PDGF-BB

Mit der Stimulation der HuH7-Zellen mit PDGF-BB gelang der Nachweis der Funktion von LRP1 als Co-Rezeptor des PDGF-Rezeptors in dieser Zelllinie (Boucher et al., 2002; Loukinova et al., 2002). Im Westernblot ist deutlich die Präzipitation der Signalling-assoziierten Adapterproteine PKC α und Shc zu erkennen (s. Abbildung 43). So wäre nachvollziehbar, dass es nach der Bindung von PDGF-BB an den PDGF-Rezeptor zu einer Src-vermittelten Tyrosin-Phosphorylierung am distalen NPxY-Motiv der LRP1-ICD kommt. Daraufhin könnte Shc mit seiner PTB-Domäne an das Phosphotyrosin binden und über SOS und Grb2 den proliferativen Ras/RAF/MAPK-Signalweg aktivieren (Barnes et al., 2001).

Das Adapterprotein, die dem Endozytose-Apparat zugerechnet werden (CED6/GULP) wurde erwartungsgemäß nicht angereichert, da kein Ligand zur Bindung an LRP1 zum Medium gegeben wurde.

4.2.3 Kritische Betrachtung der Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Versuche zeigten in mehreren Durchgängen bisweilen variable Ergebnisse, so z.B. wechselnde Präzipitierbarkeit von Shc (s. Abb. 35). Unter Umständen kamen unterschiedliche Chargen von FCS zum Einsatz, die sich in Ihrer Zusammensetzung hinsichtlich kritischer Bestandteile wie Insulin und Cholesterol unterschieden und so die Stoffwechselsituation der HuH7-Zellen beeinflussten. Möglicherweise führte ein verminderter Insulingehalt des eingesetzten FCS zu einer reduzierten Präsenz von LRP1 an der Zelloberfläche (Laatsch et al., 2008). Eine andere Erklärung könnte eine verringerte LRP1-Expression infolge eines geringeren Cholesterolgehaltes des FCS und entsprechend niedriger intrazellulärer Cholesterolspiegel

sein (Llorente-Cortes et al., 2002). Um diesen Effekt zu vermeiden in für diese Versuche stets ein Kulturmedium mit FCS anstelle von LPDS zum Einsatz gekommen.

Obwohl die ausgewählten und in ihrem Bindungsverhalten untersuchten Adapterproteine mit Signaltransduktion und Endozytose bereits wichtige Funktionen von LRP1 widerspiegeln, fehlt zur besseren Beurteilbarkeit insbesondere der Endozytose die genaue Untersuchung von Dab2. Als zentrales Protein im Rahmen der Endozytose über Clathrin-coated Pits wären Erkenntnisse über das Bindungsverhalten nützlich gewesen. Im Zusammenhang mit der Rolle von LRP1 als Co-Rezeptor des PDGF-Rezeptors hätte sich so unter Umständen der Mechanismus zwischen mitogenen Signalen (Bindung von Shc nach Stimulation mit PDGF-BB) und Internalisierung (mögliche Bindung von Dab2 nach Stimulation mit ApoE-haltigen Chylomikronen-Remnants) außer in glatten Gefäßmuskelzellen (Boucher u. Gotthardt, 2004) auch in Hepatozyten nachweisen lassen können. Allerdings war für die Präzipitation von Dab2 der sonst für die Co-IPs eingesetzte LRP1-Dolly-Antikörper ungeeignet, weswegen der LRP1-5A6-Antikörper zum Einsatz kam. Zudem wären veränderte Zell-Lysis-Pufferbedingungen ohne Phosphatase-Inhibitoren zum Einsatz gekommen, um die Bindung von Dab2 an das unphosphorylierte Tyrosin im distalen NPxY-Motiv der LRP1-ICD zu erleichtern (Howell et al., 1999; Batzer et al., 1995). Insofern wäre die Vergleichbarkeit zu den anderen Präzipitationen eingeschränkt gewesen.

Um die Interaktion der Adapterproteine mit LRP1 genauer charakterisieren zu können, wäre Einsicht in den Zustand der Phosphorylierung der relevanten Serin-, Threonin- und Tyrosinreste der intrazellulären Domäne in Abhängigkeit vom Stimulans hilfreich. Die Darstellung dieser Phosphorylierungen im Westernblot gelang in dieser Arbeit nicht.

Das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte semi-quantitative Westernblot-Verfahren erlaubt lediglich eine orientierende Beurteilung des Bindungsverhaltens. Um die exakten Mengen der gebundenen Adapterproteine zu bestimmen, und um Aussagen zur Wirkung der einzelnen Stimulanzien treffen zu können, müsste eine quantitative Technik angewandt werden.

4.3 GST-RAP-Pulldown

Die Isolierung von LRP1 und gebundenen Adapterproteinen mithilfe des GST-RAP-Pulldowns wurde als Alternative zum Verfahren der Co-Immun-Präzipitation getestet (Goretzki und Müller, 1998). Ähnliche Versuche mit GST-Fusionsproteinen hatten bereits erfolgreich zur Charakterisierung der Adapterproteine Shc, Dab1 und Fe65 und ihrem Einfluss auf Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie beigetragen (Barnes et al., 2003; Gotthardt et al., 2000).

Nach Vorinkubation der HuH7-Zellen in Komplettmedium wurde der GST-RAP-Pulldown angewendet. Es ließen sich im Westernblot sowohl LRP1 als auch die Adapterproteine PKC α , JIP1, Shc und CED6/GULP deutlich angereichert nachweisen (s. Abbildung 49). Dies konnte durch Negativ-Kontrollen bestätigt werden, in denen anstelle des kompletten GST-RAP-Fusionsproteins nur GST zum Einsatz kam. Hier kam es zu keiner Anreicherung. Die Beobachtung, dass Ca²⁺ im Lysis-Puffer vorhanden sein muss, damit die Bindung von RAP und LRP1 zustandekommt, deckt sich mit früheren Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (s. Abbildung 48) (Petersen et al., 1996).

Grundsätzlich erscheint der Versuchsaufbau als geeignet für weitere Untersuchungen. Im Rahmen der Co-IP wurde mit dem anti-LRP1-„Dolly“-Antikörper die 85kDa große β -Kette gebunden, und so womöglich die Bindung von Adapterproteinen an die intrazelluläre Domäne behindert (s.o.) Da GST-RAP an die Bindungsdomänen der α -Kette bindet, war nicht von einer Blockade der ICD und ihrer Bindungs-Motive auszugehen. Gemeinsam mit LRP1 konnten CED6/GULP, JIP1, PKC α und Shc spezifisch gebunden werden. Insbesondere für die Untersuchung von JIP1 erscheint dieses Verfahren geeignet, da das Adapterprotein im Rahmen der Co-IPs offensichtlich ein unspezifisches Bindungsverhalten zeigte und daher nicht zu untersuchen war.

Allerdings stellt RAP als Chaperon des frühen und Ligand des reifen LRP1-Moleküls einen starken Antagonisten für andere Liganden dar (Croy et al., 2003). Es war anzunehmen, eine Stimulation und anschließende Untersuchung mithilfe des GST-RAP-Pulldowns würde jeweils zu einer Verdrängung des stimulierenden Liganden führen und so wahrscheinlich auch die Bindung von intrazellulären Adaptoren im Nachhinein beeinflussen. Zudem zeigten die Ergebnisse der Co-IPs aus Zellen, die mit RAP stimuliert worden waren, eine deutliche Bindung von CED6/GULP, PKC α und Shc an LRP1 (s. Abb. 44), so daß von RAP als einem aktivierenden Liganden ausgegangen werden muß. Somit ist eine Untersuchung von unstimuliertem LRP1 mit dem GST-RAP-Pulldown nicht möglich. In diesem Fall wurde von Stimulationsversuchen abgesehen und der Versuchsansatz nicht weiter verfolgt.

4.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit erlauben vielfältige weitere Ansätze zur Charakterisierung des Bindungsverhaltens der Adapterproteine und möglicher Funktionen von LRP1. Insbesondere der Einfluß prä- und postprandialer Stoffwechsellagen durch Glukagon bzw. Insulin könnte interessante Einblicke in den Metabolismus von Hepatozyten erlauben. Um die Ergebnisse

dieser Arbeit zu verifizieren und um mehr Erkenntnisse über die Funktionen von LRP1 in Endozytose und Signaltransduktion zu erlangen, wären folgende Untersuchungen denkbar:

- Versuche mit primären Hepatozyten. Eine Übertragung der Versuche auf primäre Hepatozyten, zum Beispiel aus Mäusen, wäre hilfreich, um die Effekte verschiedener Stimulanzien auf physiologisch unveränderte Zellen zu erforschen. Immortalisierte Zelllinien wie HuH7 verfügen oftmals über einen veränderten Metabolismus und Veränderungen in bestimmten Signalkaskaden, die nicht den physiologischen Eigenschaften der ursprünglichen Zellart entsprechen.
- Darstellung der Phosphorylierungen innerhalb und außerhalb der NPxY-Motive im Westernblot. Zusätzlich zur Beobachtung der Interaktion von Adapterproteinen und der LRP1-ICD würde die Darstellung des jeweiligen Phosphorylierungszustandes der relevanten Serin-, Threonin- und Tyrosinreste Aufschluss über die Begleitumstände der Interaktionen geben.
- Quantitative Untersuchungsverfahren. Um genaue Angaben über die Interaktion von Adaptoren und der LRP1-ICD unter dem Einfluss von LRP1-Liganden und anderen Stimulanzien zu erhalten, könnten quantitative Untersuchungen eingesetzt werden. Mit geeigneten Verfahren wie dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ließe sich die exakte Menge von LRP1 und gebundenen Adapterproteinen ermitteln. Auch eine Bestimmung der Anteile von phosphoryliertem und unphosphoryliertem LRP1 wäre so möglich.
- Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Interaktionen. Durch mehrere zeitlich versetzte Momentaufnahmen der Bindung von Adaptoren könnte eine bessere Vorstellung des Ablaufs von Bindung und Lösung der Adapterproteine vermittelt werden. Hier böte sich die Verbindung mit einem quantitativen Untersuchungsverfahren an (s.o.).
- Membranpräparationen von Hepatozyten könnten dazu beitragen, Unterschiede in den Interaktionen an der Zellmembran und im Zytosol darzustellen.
- Fluoreszenzmikroskopische Darstellung. Die Interaktion von Adaptoren und LRP1 ließe sich durch farbliche Markierung und Betrachtung unter dem konfokalen Mikroskop verifizieren. Für die Markierung kämen neben konventionellen Antikörpern auch fluoreszierende Nanoteilchen in Betracht.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe einer Co-Immun-Präzipitation sowie eines GST-RAP-Pulldown-Verfahrens das Bindungsverhalten von Adapterproteinen an der intrazellulären Domäne von LRP1 nach Stimulation mit LRP1-Liganden und direkten Aktivatoren in Hepatomzellen untersucht. Das Bindungsverhalten von β -Aktin und JIP1 als Vertreter der Endozytose bzw. des intrazellulären Traffickings stellte sich in der Co-Immun-Präzipitation als nicht spezifisch heraus und kann daher nicht bewertet werden.

Die eingesetzte Co-Immun-Präzipitation und Darstellung in semi-quantitativen Westernblots zeigten durch Stimulation mit PMA (Phorbol-12- Myristat-13-Acetat) oder Forskolin als direkte Aktivatoren intrazellulärer Proteinkinasen keine veränderte Bindung von Adaptern.

Entsprechend der Doppelrolle von LRP1 in Endozytose und Signaltransduktion konnten durch Stimulation mit den Endozytoseliganden α 2-Makroglobulin, ApoE-haltigen Chylomikronen-Remnants, Lactoferrin oder RAP sowohl eine Aktivierung der Endozytose durch Bindung von CED6/GULP, als auch eine Aktivierung von Signalwegen durch Bindung von Shc gezeigt werden. Zusätzlich kam es als Ausdruck verstärkter Phosphorylierungsaktivität an der LRP1-ICD zu einer Bindung der PKC α . Die Stimulation mit PDGF-BB als reinem Signalliganden bewirkte eine Bindung von Shc als Zeichen der Aktivierung intrazellulärer Signalwege und zeigt die Funktion von LRP1 als Co-Rezeptor des PDGF-Rezeptors in HuH7-Zellen. Auch hier zeigte sich die Bindung der PKC α im Sinne einer verstärkten Phosphorylierung der LRP1-ICD.

6 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| ABCA1 | ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1 |
| AK | Antikörper |
| ApoA ... E | Apolipoprotein A ... E |
| APP | β -Amyloid-Vorläufer-Protein (amyloid precursor protein) |
| ARH | Autosomal recessive hypercholesterolemia (LDLR adaptor protein) |
| α 2M | α 2-Makroglobulin |
| BSA | Rinderserumalbumin (bovine serum albumin) |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| cAMP | Zyklisches Adenosinmonophosphat |
| CED6 / GULP | CED6 / Engulfment protein |
| CM | Chylomikron |
| Co-IP | Co-Immunpräzipitation |
| CR | Chylomikronen-Remnant |
| CRT | Calreticulin |
| Dab1, Dab2 | Disabled homolog 1, Disabled homolog 2 |
| DMEM | Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglycoltetraessigsäure |
| Fe65 / APPB1 | Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 |
| FCS | Fötale Kälberserum (fetal calf serum) |
| G α _s | Stimulatorisches G-Protein α |
| GIPC / SEMCAP | GIPC PDZ domain containing family, member 1 |
| h | Stunden |
| HDL | Lipoprotein hoher Dichte (high density lipoprotein) |
| Hepes | (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure |
| ICD | Intrazelluläre Domäne (intracellular domain) |
| IDL | Lipoprotein mittlerer Dichte (intermediate density lipoprotein) |
| IP | Immunpräzipitation |

| | |
|------------------|---|
| JIP1, JIP2 | c-Jun N-terminal kinase interacting protein 1 / 2 |
| JNK | c-Jun N-terminal kinase |
| kDa | Kilodalton |
| LDL | Lipoprotein geringer Dichte (low density lipoprotein) |
| LDLR | LDL-Rezeptor |
| LPDS | Lipoprotein-defizientes Serum |
| LpL | Lipoprotein-Lipase |
| LRP1 | LDL receptor-related protein 1 |
| MAPK | Mitogen activated protein kinase |
| MES | 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure |
| min | Minuten |
| Mint2, Mint3 | Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 2 / 3 |
| o.g. | oben genannt |
| PBS | Phosphatpuffer (phosphate buffered saline) |
| PDE | Phosphodiesterase |
| PDGF | Platelet derived growth factor |
| PID | Phosphotyrosine interaction domain |
| PID1 | Phosphotyrosine interaction domain containing 1 |
| PIP ₃ | Phosphatidylinositoltrisphosphat |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC α | Proteinkinase C α |
| PMA | Phorbol-12- Myristat-13-Acetat |
| PTB | Phosphothirosin-Bindungsdomäne |
| PS | Penicillin/Streptomycin |
| PS | Phosphatidylserin |
| PSD95 | Post-synaptic density protein 95 |
| RAP | Receptor associated protein |
| RMCE | Recombinase-mediated cassette exchange |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute) |
| S. | Seite |
| s.a. | siehe auch |
| s.o. | siehe oben |
| s.u. | siehe unten |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate) |

| | |
|---------------|---|
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| sek. | Sekunden |
| SH2, SH3 | Src homology 2 domain, Src homology 3 domain |
| Shc | Src homology containing |
| Shp | Shatterproof 2 |
| SIRP α | signal-regulatory protein α |
| Snx17 | Sorting nexin 17 |
| sog. | sogenannt |
| SRE | Sterol regulatory element |
| SREBP | Sterol regulatory element binding protein |
| TBS | Trispuffer (Tris buffered saline) |
| TG | Triglyzerid |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan |
| usw. | und so weiter |
| vgl. | vergleiche |
| VLDL | Lipoprotein sehr geringer Dichte (very low density lipoprotein) |
| z.B. | zum Beispiel |

7 Literaturverzeichnis

Abram C.L., Courtneidge S.A. (2000). Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp Cell Res.*, 254(1):1-13.

Allaman-Pillet N., Størling J., Oberson A., Roduit R., Negri S., Sauser C., Nicod P., Beckmann J.S., Schorderet D.F., Mandrup-Poulsen T., Bonny C. (2003). Calcium- and proteasome-dependent degradation of the JNK scaffold protein islet-brain 1. *J Biol Chem.*, 278(49):48720-48726.

Anderson D., Koch C.A., Grey L., Ellis C., Moran M.F., Pawson T. (1990). Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors. *Science*, 250(4983):979-982.

Anderson R.G., Vasile E., Mello R.J., Brown M.S., Goldstein J.L. (1978). Immunocytochemical visualization of coated pits and vesicles in human fibroblasts: relation to low density lipoprotein receptor distribution. *Cell*, 15(3):919-933.

Armand M. (2007). Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*, 10(2):156-164

Aronheim A., Engelberg D., Li N., al-Alawi N., Schlessinger J., Karin M. (1994). Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell*, 78(6):949-961.

Aschenbrenner L., Lee T., Hasson T. (2003). Myo6 facilitates the translocation of endocytic vesicles from cell peripheries. *Mol Biol Cell.*, 14(7):2728-2743.

Bacsikai B.J., Xia M.Q., Strickland D.K., Rebeck G.W., Hyman B.T. (2000). The endocytic receptor protein LRP also mediates neuronal calcium signaling via N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97(21):11551-11556.

Baker E.N., Baker H.M. (2005). Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cell.Mol.Life Sci.*, 62: 2531-2539

Barnes H., Ackermann E.J., van der Geer P. (2003). v-Src induces Shc binding to tyrosine 63 in the cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein 1. *Oncogene*, 22(23):3589-3597.

Barnes H., Larsen B., Tyers M., van Der Geer P. (2001). Tyrosine-phosphorylated low density lipoprotein receptor-related protein 1 (Lrp1) associates with the adaptor protein SHC in SRC-transformed cells. *J Biol Chem.*, 276(22):19119-19125.

Basso F., Freeman L., Knapper C.L., Remaley A., Stonik J., Neufeld E.B., Tansey T., Amar M.J., Fruchart-Najib J., Duverger N., Santamarina-Fojo S., Brewer H.B. Jr. (2003). Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations. *J Lipid Res.*, 44(2):296-302.

Batzer A.G., Blaikie P., Nelson K., Schlessinger J., Margolis B. (1995). The phosphotyrosine interaction domain of Shc binds an LXNPXY motif on the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol.*, 15(8):4403-4409.

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

Beisiegel U., Weber W., Ihrke G., Herz J., and Stanley K. K. (1989). The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature*, 341(6238): 162-164

Bejsovec A. (2000). Wnt signaling: an embarrassment of receptors. *Curr Biol.*, 10(24):R919-922.

Berg J.S., Powell B.C., Cheney R.E. (2001) A millennial myosin census. *Mol Biol Cell.*, (4):780-794.

- Betts G.N., van der Geer P., Komives E.A. (2008). Structural and functional consequences of tyrosine phosphorylation in the LRP1 cytoplasmic domain. *J Biol Chem.*, 283(23):15656-15664.
- Biscardi J.S., Maa M.C., Tice D.A., Cox M.E., Leu T.H., Parsons S.J. (1999). c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem.*, 274(12):8335-8343.
- Blasius T.L., Cai D., Jih G.T., Toret C.P., Verhey K.J. (2007). Two binding partners cooperate to activate the molecular motor Kinesin-1. *J Cell Biol.*, 176(1):11-17.
- Bonati A., Carlo-Stella C., Lunghi P., Albertini R., Pinelli S., Migliaccio E., Sammarelli G., Savoldo B., Tabilio A., Dall'Aglio P.P., Pelicci P.G. (2000). Selective expression and constitutive phosphorylation of SHC proteins [corrected] in the CD34+ fraction of chronic myelogenous leukemias. *Cancer Res.*, 60(3):728-732.
- Bonfini L., Migliaccio E., Pelicci G., Lanfrancone L., Pelicci P.G. (1996). Not all Shc's roads lead to Ras. *Trends Biochem Sci.*, 21(7):257-261.
- Bonifacino J.S., Traub L.M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu.Rev.Biochem.*, 72: 395-447
- Bonny C., Oberson A., Steinmann M., Schorderet D.F., Nicod P., Waeber G. (2000). IB1 reduces cytokine-induced apoptosis of insulin-secreting cells. *J Biol Chem.*, 275(22):16466-16472.
- Boucher P., Gotthardt M. (2004). LRP and PDGF Signaling: A Pathway to Atherosclerosis. *Trends Cardiovasc.Med.*, 14(2): 55-60
- Boucher P., Gotthardt M., Li W.P., Anderson R.G., Herz J. (2003). LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science*, 300(5617):329-332.

- Boucher P., Liu P., Gotthardt M., Hiesberger T., Anderson R.G., Herz J. (2002). Platelet-derived growth factor mediates tyrosine phosphorylation of the cytoplasmic domain of the low Density lipoprotein receptor-related protein in caveolae. *J Biol Chem.*, 277(18):15507-15513.
- Boullier A., Hennuyer N., Tailleux A., Furman C., Duverger N., Caillaud J.M., Castro G., Fievet C., Fruchart J.C., Duriez P. (2001). Increased levels of high-density lipoprotein cholesterol are ineffective in inhibiting the development of immune responses to oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis in transgenic rabbits expressing human apolipoprotein (apo) A-I with severe hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)*, 100(3):343-355.
- Bowman A.B., Kamal A., Ritchings B.W., Philp A.V., McGrail M., Gindhart J.G., Goldstein L.S. (2000). Kinesin-dependent axonal transport is mediated by the sunday driver (SYD) protein. *Cell*, 103(4):583-594.
- Brock J.H. (2002). The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell Biol.*, 80(1):1-6.
- Brousseau M.E., Eberhart G.P., Dupuis J., Asztalos B.F., Goldkamp A.L., Schaefer E.J., Freeman M.W. (2000). Cellular cholesterol efflux in heterozygotes for tangier disease is markedly reduced and correlates with high density lipoprotein cholesterol concentration and particle size. *J Lipid Res.*, 41(7):1125-1135.
- Brown A.J., Sun L., Feramisco J.D., Brown M.S., Goldstein J.L. (2002). Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Mol Cell.*, 10(2):237-245.
- Brown M.S., Goldstein J.L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 89(3):331-340.
- Brown M.S., Goldstein J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232(4746):34-47.

- Brown M.T., Cooper J.A. (1996). Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta.*, 1287(2-3):121-149.
- Brown S.D., Twells R.C., Hey P.J., Cox R.D., Levy E.R., Soderman A.R., Metzker M.L., Caskey C.T., Todd J.A., Hess J.F. (1998). Isolation and characterization of LRP6, a novel member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Biochem Biophys Res Commun.*, 248(3):879-888.
- Brundert M., Heeren J., Bahar-Bayansar M., Ewert A., Moore K.J., Rinninger F. (2006). Selective uptake of HDL cholesteryl esters and cholesterol efflux from mouse peritoneal macrophages independent of SR-BI. *J Lipid Res.*, 47(11):2408-2421.
- Buss F., Arden S.D., Lindsay M., Luzio J.P., Kendrick-Jones J. (2001). Myosin VI isoform localized to clathrin-coated vesicles with a role in clathrin-mediated endocytosis. *EMBO J.*, 20(14):3676-3684.
- Cadigan K.M., Liu Y.I. (2006). Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci.*, 119(3):395-402.
- Camejo G., Fager G., Rosengren B., Hurt-Camejo E., Bondjers G. (1993). Binding of low density lipoproteins by proteoglycans synthesized by proliferating and quiescent human arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.*, 268(19):14131-14137.
- Cantley L.C., Auger K.R., Carpenter C., Duckworth B., Graziani A., Kapeller R., Soltoff S. (1991). Oncogenes and signal transduction. *Cell*, 64(2):281-302.
- Capdevila J., Izpisua Belmonte J.C. (2001). Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 17:87-132.
- Carloni V., Mazzocca A., Ravichandran K.S. (2004). Tetraspanin CD81 is linked to ERK/MAPKinase signaling by Shc in liver tumor cells. *Oncogene*, 23(8):1566-1574.

Chen W.J., Goldstein J.L., Brown M.S. (1990). NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.*, 265(6):3116-3123.

Chen Z.Z., Schwartz G.P., Zong L., Burke G.T., Chanley J.D., Katsoyannis P.G.(1988). Determinants of growth-promoting activity reside in the A-domain of insulin-like growth factor I. *Biochemistry*, 27(16):6105-6111.

Christensen E.I., Birn H. (2002). Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, Apr;3(4):256-266.

Christiansen-Weber T.A., Volland J.R., Wu Y., Ngo K., Roland B.L., Nguyen S., Peterson P.A., Fung-Leung W.P. (2000). Functional loss of ABCA1 in mice causes severe placental malformation, aberrant lipid distribution, and kidney glomerulonephritis as well as high-density lipoprotein cholesterol deficiency. *Am J Pathol.*, 157(3):1017-1029.

Chung S., Gumienny T.L., Hengartner M.O., Driscoll M. (2000). A common set of engulfment genes mediates removal of both apoptotic and necrotic cell corpses in *C. elegans*. *Nat Cell Biol.*, 12:931-937.

Conradt B. (2001). Cell engulfment, no sooner ced than done. *Dev Cell.*, 1(4):445-447.

Cornish J., Callon K.E., Naot D., Palmano K.P., Banovic T., Bava U., Watson M., Lin J.M., Tong P.C., Chen Q., Chan V.A., Reid H.E., Fazzalari N., Baker H.M., Baker E.N., Haggarty N.W., Grey A.B., Reid I.R. (2004). Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo. *Endocrinology*, 145(9):4366-4374.

Cramer L.P. (2000). Myosin VI: roles for a minus end-directed actin motor in cells. *J Cell Biol.*, 150(6):F121-126.

Crookston K.P., Webb D.J., Lamarre J., Gonias S.L. (1993). Binding of platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-beta 1 to alpha 2-macroglobulin in vitro and in vivo: comparison of receptor-recognized and non-recognized alpha 2-macroglobulin conformations. *Biochem J.*, 293 (Pt 2):443-450.

Croy J.E., Shin W.D., Knauer M.F., Knauer D.J., Komives E.A. (2003). All Three LDL Receptor Homology Regions of the LDL Receptor-Related Protein Bind Multiple Ligands. *Biochemistry*, 42: 13049-13057

Dance A.L., Miller M., Seragaki S., Aryal P., White B., Aschenbrenner L., Hasson T. (2004). Regulation of myosin-VI targeting to endocytic compartments. *Traffic*, 5(10):798-813.

Davol P.A., Bagdasaryan R., Elfenbein G.J., Maizel A.L., Frackelton A.R. Jr. (2003). Shc proteins are strong, independent prognostic markers for both node-negative and node-positive primary breast cancer. *Cancer Res.*, 63(20):6772-6783.

Dickens M., Rogers J.S., Cavanagh J., Raitano A., Xia Z., Halpern J.R., Greenberg M.E., Sawyers C.L., Davis R.J. (1997). A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science*, 277(5326):693-696.

Eisenberg S., Sehayek E., Olivecrona T., Vlodavsky I. (1992). Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. *J Clin Invest.*, 90(5):2013-2021.

Fadok V.A., Bratton D.L., Henson P.M. (2001). Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest.*, 108(7):957-962.

Faux M.C., Rollins E.N., Edwards A.S., Langeberg L.K., Newton A.C., Scott J.D. (1999). Mechanism of A-kinase-anchoring protein 79 (AKAP79) and protein kinase C interaction. *Biochem J.*, 343 Pt 2:443-452.

Floren C.H., Chait A. (1981). Uptake of chylomicron remnants by the native LDL receptor in human monocyte-derived macrophages. *Biochim Biophys Acta.*, 665(3):608-611.

Francia P., delli Gatti C., Bachschmid M., Martin-Padura I., Savoia C., Migliaccio E., Pelicci P.G., Schiavoni M., Lüscher T.F., Volpe M., Cosentino F. (2004). Deletion of p66shc gene protects against age-related endothelial dysfunction. *Circulation*, 110(18):2889-2895.

Fujimoto L.M., Roth R., Heuser J.E., Schmid S.L. (2000). Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *Traffic*, 1(2):161-171.

Gallusser A., Kirchhausen T. (1993). The beta 1 and beta 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components. *EMBO J.*, 12(13):5237-5244.

Gardai S.J., McPhillips K.A., Frasch S.C., Janssen W.J., Starefeldt A., Murphy-Ullrich J.E., Bratton D.L., Oldenborg P.A., Michalak M., Henson P.M. (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*, 123(2):321-334.

Gaultier A., Salicioni A.M., Arandjelovic S., Gonias S.L. (2006). Regulation of the Composition of the Extracellular Matrix by Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein-1. *J.Biol.Chem.*, 281(11): 7332-7340

Giles K.M., Hart S.P., Haslett C., Rossi A.G., Dransfield I. (2000). An appetite for apoptotic cells? Controversies and challenges. *Br J Haematol.*, 2109(1):1-12.

Giorgio M., Migliaccio E., Orsini F., Paolucci D., Moroni M., Contursi C., Pelliccia G., Luzi L., Minucci S., Marcaccio M., Pinton P., Rizzuto R., Bernardi P., Paolucci F., Pelicci P.G. (2005). Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell.*, 122(2):221-233.

Golden J.A., Bracilovic A., McFadden K.A., Beesley J.S., Rubenstein J.L., Grinspan J.B. (1999). Ectopic bone morphogenetic proteins 5 and 4 in the chicken forebrain lead to cyclopia and holoprosencephaly. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96(5):2439-2444.

Goldstein J.L., Brown M.S. (2001). Molecular medicine. The cholesterol quartet. *Science*, 292(5520):1310-1312.

Goldstein J.L., Brown M.S. (1974). 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(16):5153-5162.

Gordts P.L., Reekmans S., Lauwers A., Van Dongen A., Verbeek L., Roebroek A.J. (2009). Inactivation of the LRP1 intracellular NPxYxxL motif in LDLR-deficient mice enhances postprandial dyslipidemia and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 29(9):1258-1264.

Goretzki L., Müller B. (1998). Low-density-lipoprotein-receptor-related protein (LRP) interacts with a GTP-binding protein. *Biochem.J.*, 336: 381-386

Goretzki L., Müller B. (1997). Receptor-mediated endocytosis of urokinase-type plasminogen activator is regulated by cAMP-dependent protein kinase. *J.Cell Sci.*, 110: 1395-1402

Gotoh N., Toyoda M., Shibuya M. (1997). Tyrosine phosphorylation sites at amino acids 239 and 240 of Shc are involved in epidermal growth factor-induced mitogenic signaling that is distinct from Ras/mitogen-activated protein kinase activation. *Mol Cell Biol.*, 17(4):1824-1831.

Gotthardt M., Trommsdorff M., Nevitt M.F., Shelton J., Richardson J.A., Stockinger W., Nimpf J., Herz J. (2000). Interactions of the Low Density Lipoprotein Receptor Gene Family with Cytosolic Adaptor and Scaffold Proteins Suggest Diverse Biological Functions in Cellular Communication and Signal Transduction. *J.Biol.Chem.*, 275(33): 25616-25624

Grey A., Banovic T., Zhu Q., Watson M., Callon K., Palmano K., Ross J., Naot D., Reid I.R., Cornish J. (2004). The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is a mitogenic receptor for lactoferrin in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol.*, 18(9):2268-2278.

Grimsley C., Ravichandran K.S. (2003). Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol.*, 13(12):648-656.

Gumienny T.L., Brugnera E., Tosello-Tramont A.C., Kinchen J.M., Haney L.B., Nishiwaki K., Walk S.F., Nemergut M.E., Macara I.G., Francis R., Schedl T., Qin Y., Van Aelst L., Hengartner M.O., Ravichandran K.S. (2001). CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell*, 107(1):27-41.

Haefliger J.A., Tawadros T., Meylan L., Gurun S.L., Roehrich M.E., Martin D., Thorens B., Waeber G. (2003). The scaffold protein IB1/JIP-1 is a critical mediator of cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells. *J Cell Sci.*, 116(8):1463-1469.

Hasson T. (2003). Myosin VI: two distinct roles in endocytosis. *J Cell Sci.*, 116(Pt 17):3453-3461.

He G., Gupta S., Yi M., Michaely P., Hobbs H.H., Cohen J.C. (2002). ARH is a modular adaptor protein that interacts with the LDL receptor, clathrin, and AP-2. *J Biol Chem.*, 277(46):44044-44049.

He X., Semenov M., Tamai K., Zeng X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*, 131(8):1663-1677.

Heeren J., Grewal T., Laatsch A., Becker N., Rinninger F., Rye K.-A., Beisiegel U. (2004). Impaired Recycling of Apolipoprotein E4 Is Associated with Intracellular Cholesterol Accumulation. *J.Biol.Chem.*, 279(53): 55483–55492

- Heeren J., Grewal T., Laatsch A., Rottke D., Rinninger F., Enrich C., Beisiegel U. (2003). Recycling of Apoprotein E Is Associated with Cholesterol Efflux and High Density Lipoprotein Internalization. *J.Biol.Chem.*, 278(16): 14370-14378
- Heeren J., Weber W., Beisiegel U. (1999). Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. *J.Cell Sci.*, 112: 349-359
- Hembrough T.A., Ruiz J.F., Papathanassiou A.E., Green S.J., Strickland D.K. (2001). Tissue factor pathway inhibitor inhibits endothelial cell proliferation via association with the very low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.*, 276(15):12241-12248.
- Herz J., Hui D.Y. (2004). Lipoprotein receptors in the vascular wall. *Curr.Opin.Lipidol.*, 15: 175-181
- Herz J., Strickland D.K. (2001). LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J.Clin.Invest.*, 108(6): 779-784
- Herz J., Gotthardt M., Willnow T.E. (2000). Cellular signalling by lipoprotein receptors. *Curr Opin Lipidol.*, 11(2):161-166.
- Herz J., Clouthier D.E., Hammer R.E. (1992). LDLR-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell*, 71: 411-421
- Herz J., Hamann U., Rogne S., Myklebost O., Gausepohl H., Stanley K.K. (1988). 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(13):4119-4127.
- Hey P.J., Twells R.C., Phillips M.S., Yusuke Nakagawa, Brown S.D., Kawaguchi Y., Cox R., Guochun Xie, Dugan V., Hammond H., Metzker M.L., Todd J.A, Hess J.F. (1998). Cloning of a novel member of the low-density lipoprotein receptor family. *Gene*, 216(1):103-111.

Hirai Y., Utsugi K., Takeshima N., Kawamata Y., Furuta R., Kitagawa T., Kawaguchi T., Hasumi K., Noda T. (2004). Putative gene loci associated with carcinogenesis and metastasis of endocervical adenocarcinomas of uterus determined by conventional and array-based CGH. *Am J Obstet Gynecol.*, 191(4):1173-1182.

Hirokawa N., Takemura R. (2004). Molecular motors in neuronal development, intracellular transport and diseases. *Curr Opin Neurobiol.*, 14(5):564-573.

Hobbs H.H., Russell D.W., Brown M.S., Goldstein J.L. (1990). The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet.*, 24:133-170.

Hoffmann P.R., Kench J.A., Vondracek A., Kruk E., Daleke D.L., Jordan M., Marrack P., Henson P.M., Fadok V.A. (2005). Interaction between phosphatidylserine and the phosphatidylserine receptor inhibits immune responses in vivo. *J Immunol.*, 174(3):1393-1404.

Horiuchi D., Collins C.A., Bhat P., Barkus R.V., Diantonio A., Saxton W.M. (2007). Control of a kinesin-cargo linkage mechanism by JNK pathway kinases. *Curr Biol.*, 17(15):1313-1317.

Horn I.R., van den Berg B.M., van der Meijden P.Z., Pannekoek H., van Zonneveld A.J. (1997). Molecular analysis of ligand binding to the second cluster of complement-type repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein. Evidence for an allosteric component in receptor-associated protein-mediated inhibition of ligand binding. *J Biol Chem.*, 272(21):13608-13613.

Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S. (2002). SREBPs: transcriptional mediators of lipid homeostasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 67:491-498.

Howell B.W., Lanier L.M., Frank R., Gertler F.B., Cooper J.A. (1999). The disabled 1 phosphotyrosine-binding domain binds to the internalization signals of transmembrane glycoproteins and to phospholipids. *Mol Cell Biol.*, 19(7):5179-5188.

- Hu K., Yang J., Tanaka S., Gonias S.L., Mars W.M., Liu Y. (2006). Tissue-type Plasminogen Activator Acts as a Cytokine That Triggers Intracellular Signal Transduction and Induces Matrix Metalloproteinase-9 Gene Expression. *J.Biol.Chem.*, 281(4): 2120-2127
- Hug H., Sarre T.F. (1993). Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J.*, 291(2):329-343.
- Hussain M.M., Kancha R.K., Zhou Z., Luchoomun J., Zu H., Bakillah A. (1996). Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. *Biochim Biophys Acta.*, 1300(3):151-170
- Innerarity T.L., Pitas R.E., Mahley R.W. (1979). Binding of Arginine-rich (E) Apoprotein after Recombination with Phospholipid Vesicles to the Low Density Lipoprotein Receptors of Fibroblasts. *J.Biol.Chem.*, 254(10): 4186-4190
- Inoue A., Sato O., Homma K., Ikebe M. (2002). DOC-2/DAB2 is the binding partner of myosin VI. *Biochem Biophys Res Commun.*, 292(2):300-307.
- Ishigami M., Swertfeger D.K., Granholm N.A., Hui D.Y. (1998). Apolipoprotein E Inhibits Platelet-derived Growth Factor-induced Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Proliferation by Suppressing Signal Transduction and Preventing Cell Entry to G1 Phase. *J.Biol.Chem.*, 273(32): 20156-20161
- Jaeschke A., Czech M.P., Davis R.J. (2004). An essential role of the JIP1 scaffold protein for JNK activation in adipose tissue. *Genes Dev.*, 18(16):1976-1980.
- Jeon H., Meng W., Takagi J., Eck M.J., Springer T.A., Blacklow S.C. (2001). Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair. *Nat Struct Biol.*, 8(6):499-504.
- Jiang Y., Prunier C., Howe P.H. (2008). The inhibitory effects of Disabled-2 (Dab2) on Wnt signaling are mediated through Axin. *Oncogene*, 27(13):1865-1875.

- Johnson E.B., Hammer R.E., Herz J. (2005). Abnormal development of the apical ectodermal ridge and polysyndactyly in Megf7-deficient mice. *Hum Mol Genet.*, 14(22):3523-3538.
- Jones C., Hammer R.E., Li W.P., Cohen J.C., Hobbs H.H., Herz J. (2003). Normal sorting but defective endocytosis of the low density lipoprotein receptor in mice with autosomal recessive hypercholesterolemia. *J Biol Chem.*, 278(31):29024-29030.
- Kang H., Yu J., Jung G. (2008). Phosphorylation of hepatitis B virus core C-terminally truncated protein (Cp149) by PKC increases capsid assembly and stability. *Biochem J.*, 416(1):47-54.
- Kavanaugh W.M., Williams L.T. (1994). An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins. *Science*, 266(5192):1862-1265.
- Kelkar N., Standen C.L., Davis R.J. (2005). Role of the JIP4 scaffold protein in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Mol Cell Biol.*, 25(7):2733-2743.
- Kessels M.M., Qualmann B. (2002). Syndapins integrate N-WASP in receptor-mediated endocytosis. *EMBO J.*, 21(22):6083-6094.
- Kharitonov A., Chen Z., Sures I., Wang H., Schilling J., Ullrich A. (1997). A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors. *Nature*, 386(6621):181-186.
- Kinchen J.M., Ravichandran K.S. (2007). Journey to the grave: signaling events regulating removal of apoptotic cells. *J Cell Sci.*, 120(13):2143-2149.
- Kinchen J.M., Cabello J., Klingele D., Wong K., Feichtinger R., Schnabel H., Schnabel R., Hengartner M.O. (2005). Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in *C. elegans*. *Nature*, 434(7029):93-99.

Kiss R.S., Ma Z., Nakada-Tsukui K., Brugnera E., Vassiliou G., McBride H.M., Ravichandran K.S., Marcel Y.L. (2006). The Lipoprotein Receptor-related Protein-1 (LRP) Adapter Protein GULP Mediates Trafficking of the LRP Ligand Prosaposin, Leading to Sphingolipid and Free Cholesterol Accumulation in Late Endosomes and Impaired Efflux. *J Biol Chem.*, 281(17): 12081-12092

Kounnas M.Z., Moir R.D., Rebeck G.W., Bush A.I., Argraves W.S., Tanzi R.E., Hyman B.T., Strickland D.K. (1995). LDL Receptor-Related Protein, a Multifunctional ApoE Receptor, Binds Secreted β -Amyloid Precursor Protein and Mediates Its Degradation. *Cell*, 82(2): 331-340

Kowal R.C., Herz J., Goldstein J.L., Esser V., Brown M.S. (1989). Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 86(15):5810-5814.

Krieger M., Herz J. (1994). Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem.*, 63:601-637.

Kristensen O., Guenat S., Dar I., Allaman-Pillet N., Abderrahmani A., Ferdaoussi M., Roduit R., Maurer F., Beckmann J.S., Kastrup J.S., Gajhede M., Bonny C. (2006). A unique set of SH3-SH3 interactions controls IB1 homodimerization. *EMBO J.*, 25(4):785-797.

Krysko D.V., D'Herde K., Vandenabeele P. (2006). Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis*, 11(10):1709-1726.

Laatsch A., Merkel M., Talmud P.J., Grewal T., Beisiegel U., Heeren J. (2009). Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance. *Atherosclerosis*, 204(1):105-111.

Lai K.M., Pawson T. (2000). The ShcA phosphotyrosine docking protein sensitizes cardiovascular signaling in the mouse embryo. *Genes Dev.*, 14(9):1132-1145.

Lanfrancone L., Pelicci G., Brizzi M.F., Aronica M.G., Casciari C., Giuli S., Pegoraro L., Pawson T., Pelicci P.G., Aronica M.G. (1995). Overexpression of Shc proteins potentiates the proliferative response to the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and recruitment of Grb2/SoS and Grb2/p140 complexes to the beta receptor subunit. *Oncogene*, 10(5):907-917.

Langbein S., Szakacs O., Wilhelm M., Sukosd F., Weber S., Jauch A., Lopez Beltran A., Alken P., Kälble T., Kovacs G. (2002). Alteration of the LRP1B gene region is associated with high grade of urothelial cancer. *Lab Invest.*, 82(5):639-643.

Latour S., Tanaka H., Demeure C., Mateo V., Rubio M., Brown E.J., Maliszewski C., Lindberg F.P., Oldenborg A., Ullrich A., Despesse G., Sarfati M. (2001). Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein-alpha: down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. *J Immunol.*, 167(5):2547-2554.

Lawn R.M., Wade D.P., Garvin M.R., Wang X., Schwartz K., Porter J.G., Seilhamer J.J., Vaughan A.M., Oram J.F. (1999). The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest.*, 104(8):R25-31.

Lee M.S., Igawa T., Lin M.F. (2004). Tyrosine-317 of p52(Shc) mediates androgen-stimulated proliferation signals in human prostate cancer cells. *Oncogene*, 23(17):3048-3058.

Li, Y., von Kerkhof, P., Paz Marzolo, M., Strous, G.J., Bu, G. (2001). Identification of a Major Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase A Phosphorylation Site within the Cytoplasmic Tail of the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein: Implication for Receptor-Mediated Endocytosis. *Mol Cell Biol.*, 21(4): 1185-1195

Li Y., Paz Marzolo M., van Kerkhof P., Strous G.J., Bu G. (2000). The YXXL Motif, but Not the Two NPXY Motifs, Serves as the Dominant Endocytosis Signal for Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein. *J Biol Chem.*, 275(22): 17187-17194

Lillis A.P., Mikhailenko I., Strickland D.K. (2005). Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability. *J Thromb Haemost.*, 3: 1884-1893

Llorente-Cortés V., Royo T., Otero-Viñas M., Berrozpe M., Badimon L. (2007). Sterol regulatory element binding proteins downregulate LDL receptor-related protein (LRP1) expression and LRP1-mediated aggregated LDL uptake by human macrophages. *Cardiovasc Res.*, 2007 Jun 1;74(3):526-36.

Llorente-Cortés V., Costales P., Bernués J., Camino-Lopez S., Badimon L. (2006). Sterol Regulatory Element-binding Protein-2 Negatively Regulates Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Transcription. *J Mol Biol.*, 359: 950-960

Llorente-Cortés V., Otero-Viñas M., Sánchez S., Rodríguez C., Badimon L. (2002). Low-density lipoprotein upregulates low-density lipoprotein receptor-related protein expression in vascular smooth muscle cells: possible involvement of sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism. *Circulation*, 106(24):3104-3110.

Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.E. (2001). *Molekulare Zellbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 4. Auflage, 787.

Lou X., Yano H., Lee F., Chao M.V., Farquhar M.G. (2001). GIPC and GAIP Form a Complex with TrkA: A Putative Link between G Protein and Receptor Tyrosine Kinase Pathways. *Mol Biol Cell*, 12: 615-627

Loukinova E., Ranganathan S., Kuznetsov S., Gorlatova N., Migliorini M.M., Loukinov D., Ulery P.G., Mikhailenko I., Lawrence D.A., Strickland D.K. (2002). Platelet-derived Growth Factor (PDGF)-induced Tyrosine Phosphorylation of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP). *J Biol Chem.*, 277(18): 15499-15506

Lusis A.J., Fogelman A.M., Fonarow G.C. (2004). Genetic Basis of Atherosclerosis: Part I - New Genes and Pathways. *Circulation*, 110: 1868-1873

- Lutz C., Nimpf J., Jenny M., Boecklinger K., Enzinger C., Utermann G., Baier-Bitterlich G., Baier G. (2002). Evidence of functional modulation of the MEKK/JNK/cJun signaling cascade by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *J Biol Chem.*, 277(45):43143-43151.
- Luzi L., Confalonieri S., Di Fiore P.P., Pelicci P.G. (2000). Evolution of Shc functions from nematode to human. *Curr Opin Genet Dev.*, 10(6):668-674.
- MacArthur J.M., Bishop J.R., Stanford K.I., Wang L., Bansaoun A., Witztum J.L., Esko J.D. (2007). Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *J Clin Invest.*, 117(1): 153-164
- Mahley R.W., Huang Y., Rall S.C. (1999). Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): questions, quandaries and paradoxes. *J Lipid Res.*, 40(11): 1933-1949
- Martin G.S. (2001). The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2(6):467-475.
- Martin G.S. (1970). Rous sarcoma virus: a function required for the maintenance of the transformed state. *Nature*, 227(5262):1021-1023.
- Maurer M.E., Cooper J.A. (2006) The adaptor protein Dab2 sorts LDL receptors into coated pits independently of AP-2 and ARH. *J Cell Sci.*, 119(Pt 20):4235-4246.
- May P., Woldt E., Matz R.L., Boucher P. (2007). The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions. *Ann Med.*, 39(3):219-228.
- May P. (2006). Neue Funktionen von Lipoproteinrezeptoren. *Dtsch Med Wochenschr.*, 131: 1328-1331

- May P., Herz J., Bock H.H. (2005). Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling. *Cell Mol Life Sci.*, 62(19-20):2325-2338.
- May P., Rohlmann A., Bock H.B., Zurhove K., Marth J.D., Schomburg E.D., Noebels J.L., Beffert U., Sweatt J.D., Weeber E.J., Herz J. (2004). Neuronal LRP1 Functionally Associates with Postsynaptic Proteins and Is Required for Normal Motor Function in Mice. *Mol Cell Biol.*, 24(20): 8872-8883
- May P., Herz J. (2003). LDL receptor-related proteins in neurodevelopment. *Traffic*, 4(5):291-301.
- May P., Reddy Y.K., Herz J. (2002). Proteolytic Processing of Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Mediates Regulated Release of Its Intracellular Domain. *J Biol Chem.*, 277(21): 18736-18743
- McNeish J., Aiello R.J., Guyot D., Turi T., Gabel C., Aldinger C., Hoppe K.L., Roach M.L., Royer L.J., de Wet J., Broccardo C., Chimini G., Francone O.L. (2000). High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97(8):4245-4250.
- Merrifield C.J., Perrais D., Zenisek D. (2005). Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells. *Cell*, 121(4):593-606.
- Migliaccio E., Giorgio M., Pelicci P.G. (2006). Apoptosis and aging: role of p66Shc redox protein. *Antioxid Redox Signal*, 8(3-4):600-608.
- Migliaccio E., Mele S., Salcini A.E., Pelicci G., Lai K.M., Superti-Furga G., Pawson T., Di Fiore P.P., Lanfrancone L., Pelicci P.G. (1997). Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway. *EMBO J.*, 16(4):706-716.

Mikhailenko I., Battey F.D., Migliorini M., Ruiz J.F., Argraves K., Moayeri M., Strickland D.K. (2001). Recognition of α 2-Macroglobulin by the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Requires the Cooperation of Two Ligand Binding Cluster Regions. *J Biol Chem.*, 276(42): 39484-39491

Mikhailenko I., Considine W., Argraves K.M., Loukinov D., Hyman B.T., Strickland D.K. (1999). Functional domains of the very low density lipoprotein receptor: molecular analysis of ligand binding and acid-dependent ligand dissociation mechanisms. *J Cell Sci.*, 112: 3296-81

Mineo C., Ying Y.S., Chapline C., Jaken S., Anderson R.G. (1998). Targeting of protein kinase Calpha to caveolae. *J Cell Biol.*, 141(3):601-610.

Mishra S.K., Keyel P.A., Hawryluk M.J., Agostinelli N.R., Watkins S.C., Traub L.M. (2002). Disabled-2 exhibits the properties of a cargo-selective endocytic clathrin adaptor. *EMBO J.*, 21(18): 4914-4926

Misra U.K., Gawdi G., Pizzo S.V. (1992). Ligation of the 2-macroglobulin signalling receptor on macrophages induces protein phosphorylation and an increase in cytosolic pH. *Biochem J.*, 309: 151-158

Mochly-Rosen D., Gordon A.S. (1998). Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J.*, 12(1):35-42.

Moore P.L., Ong S., Harrison T.J. (2003). Squamous cell carcinoma antigen 1-mediated binding of hepatitis B virus to hepatocytes does not involve the hepatic serpin clearance system. *J Biol Chem.*, 278(47):46709-46717.

Morris S.M., Arden S.D., Roberts R.C., Kendrick-Jones J., Cooper J.A., Luzio J.P., Buss F. (2002). Myosin VI binds to and localises with Dab2, potentially linking receptor-mediated endocytosis and the actin cytoskeleton. *Traffic*, 3(5):331-341.

Morris S.M., Cooper J.A. (2001). Disabled-2 colocalizes with the LDLR in clathrin-coated pits and interacts with AP-2. *Traffic*, 2(2):111-123.

- Nakagawa T., Pimkhaokham A., Suzuki E., Omura K., Inazawa J., Imoto I. (2006). Genetic or epigenetic silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.*, 97(10):1070-1074.
- Napoli C., Martin-Padura I., de Nigris F., Giorgio M., Mansueto G., Somma P., Condorelli M., Sica G., De Rosa G., Pelicci P. (2003). Deletion of the p66Shc longevity gene reduces systemic and tissue oxidative stress, vascular cell apoptosis, and early atherogenesis in mice fed a high-fat diet. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100(4):2112-2116.
- Napoli C. (2002). Nitric oxide and atherosclerotic lesion progression: an overview. *J Card Surg.*, 17(4):355-362.
- Napoli C., de Nigris F., Palinski W. (2001). Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *J Cell Biochem.*, 82(4):674-682.
- Nassar T., Akkawi S., Shina A., Haj-Yehia A., Bdeir K., Tarshis M., Heyman S.N., Higazi A.A. (2004). In vitro and in vivo effects of tPA and PAI-1 on blood vessel tone. *Blood*, 103(3):897-902.
- Nassar T., Haj-Yehia A., Akkawi S., Kuo A., Bdeir K., Mazar A., Cines D.B., Higazi A.A. (2002). Binding of urokinase to low density lipoprotein-related receptor (LRP) regulates vascular smooth muscle cell contraction. *J Biol Chem.*, 277(43):40499-40504.
- Neels J.G., van den Berg B.M.M., Lookene A., Olivecrona G., Pannekoek H., van Zonneveld A.-J. (1999). The Second and Fourth Cluster of Class A Cysteine-rich Repeats of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Proteins Share Ligand-binding Properties. *J Biol Chem.*, 274(44): 31305-31311
- Newton A.C. (2003). Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J.*, 370(2):361-371.
- Newton A.C. (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol.*, 9(2):161-167.

- Nishizuka Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 258(5082):607-614.
- Nohturfft A., Yabe D., Goldstein J.L., Brown M.S., Espenshade P.J. (2000). Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell*, 102(3):315-323.
- Nykjaer A., Dragun D., Walther D., Vorum H., Jacobsen C., Herz J., Melsen F., Christensen E.I., Willnow T.E. (1999). An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell*, 96(4):507-515.
- Nykjaer A., Petersen C.M., Møller B., Jensen P.H., Moestrup S.K., Holtet T.L., Etzerodt M., Thøgersen H.C., Munch M., Andreasen P.A., et al. (1992). Purified alpha 2-macroglobulin receptor/LDL receptor-related protein binds urokinase plasminogen activator inhibitor type-1 complex. Evidence that the alpha 2-macroglobulin receptor mediates cellular degradation of urokinase receptor-bound complexes. *J Biol Chem*, 267(21):14543-14546.
- Ohno H., Stewart J., Fournier M.C., Bosshart H., Rhee I., Miyatake S., Saito T., Gallusser A., Kirchhausen T., Bonifacino J.S. (1995). Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science*, 269(5232):1872-1875.
- Orsini F., Migliaccio E., Moroni M., Contursi C., Raker V.A., Piccini D., Martin-Padura I., Pelliccia G., Trinei M., Bono M., Puri C., Tacchetti C., Ferrini M., Mannucci R., Nicoletti I., Lanfrancone L., Giorgio M., Pelicci P.G. (2004). The life span determinant p66Shc localizes to mitochondria where it associates with mitochondrial heat shock protein 70 and regulates trans-membrane potential. *J Biol Chem*, 279(24):25689-25695.
- Orsó E., Broccardo C., Kaminski W.E., Böttcher A., Liebisch G., Drobnik W., Götz A., Chambenoit O., Diederich W., Langmann T., Spruss T., Luciani M.F., Rothe G., Lackner K.J., Chimini G., Schmitz G. (2000). Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat Genet*, 24(2):192-196.

Otsuki M., Itoh T., Takenawa T. (2003). Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein is recruited to rafts and associates with endophilin A in response to epidermal growth factor. *J Biol Chem.*, 278(8):6461-6469.

Owen D.J., Vallis Y., Pearse B.M., McMahon H.T., Evans P.R. (2000) The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain. *EMBO J.*, 19(16):4216-4227.

Owen DJ., Evans P.R. (1998). A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. *Science*, 282(5392):1327-1332.

Parker P.J., Murray-Rust J. (2004). PKC at a glance. *J Cell Sci.*, 117(2):131-132.

Pelicci G., Lanfrancone L., Grignani F., McGlade J., Cavallo F., Forni G., Nicoletti I., Grignani F., Pawson T., Pelicci P.G. (1992). A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell.*, 70(1):93-104.

Pentikäinen M.O., Lehtonen E.M., Kovanen P.T. (1996). Aggregation and fusion of modified low density lipoprotein. *J Lipid Res.*, 37(12):2638-2649.

Petersen C.M., Ellgaard L., Nykjaer A., Vilhardt F., Vorum H., Thøgersen H.C., Nielsen M.S., Jacobsen C., Moestrup S.K., Gliemann J. (1996). The receptor-associated protein (RAP) binds calmodulin and is phosphorylated by calmodulin-dependent kinase II. *EMBO J.*, 15(16):4165-4173.

Pugh J.C., Yaginuma K., Koike K., Summers J. (1988). Duck hepatitis B virus (DHBV) particles produced by transient expression of DHBV DNA in a human hepatoma cell line are infectious in vitro. *J Virol.*, 62(9):3513-3516.

Qiu Z., Strickland D.K., Hyman B.T., Rebeck G.W. (2002). α 2-Macroglobulin Exposure Reduces Calcium Responses to N-Methyl-D-Aspartat via Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein in Cultured Hippocampal Neurons. *J Biol Chem.*, 277(17): 14458-14466

Ranganathan S., Liu C.X., Migliorini M.M., Von Arnim C.A., Peltan I.D., Mikhailenko I., Hyman B.T., Strickland D.K. (2004). Serine and threonine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein by protein kinase Calpha regulates endocytosis and association with adaptor molecules. *J Biol Chem.*, 279(39):40536-40544.

Remaley A.T., Rust S., Rosier M., Knapper C., Naudin L., Broccardo C., Peterson K.M., Koch C., Arnould I., Prades C., Duverger N., Funke H., Assman G., Dinger M., Dean M., Chimini G., Santamarina-Fojo S., Fredrickson D.S., Deneffe P., Brewer H.B. Jr. (1999). Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96(22):12685-12690.

Roebroek A.J.M., Reekmans S., Lauwers A., Feyaerts N., Smeijers L., Hartmann D. (2006). Mutant Lrp1 Knock-In Mice Generated by Recombinase-Mediated Cassette Exchange Reveal Differential Importance of the NPXY Motifs in the Intracellular Domain of LRP1 for Normal Fetal Development. *Mol Cell Biol.*, 26(2): 605-616

Ross R. (1993). Atherosclerosis: current understanding of mechanisms and future strategies in therapy. *Transplant Proc.*, 25(2):2041-2043.

Rust S., Rosier M., Funke H., Real J., Amoura Z., Piette J.C., Deleuze J.F., Brewer H.B., Duverger N., Denèfle P., Assmann G. (1999). Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet.*, 2(4):352-355.

Salcini A.E., McGlade J., Pelicci G., Nicoletti I., Pawson T., Pelicci P.G. (1994). Formation of Shc-Grb2 complexes is necessary to induce neoplastic transformation by overexpression of Shc proteins. *Oncogene*, 9(10):2827-2836.

Sato R., Inoue J., Kawabe Y., Kodama T., Takano T., Maeda M. (1996). Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem.*, 271(43):26461-26464.

Saucier C., Khoury H., Lai K.M., Peschard P., Dankort D., Naujokas M.A., Holash J., Yancopoulos G.D., Muller W.J., Pawson T., Park M. (2004). The Shc adaptor protein is critical for VEGF induction by Met/HGF and ErbB2 receptors and for early onset of tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101(8):2345-2350.

Schmid S.L. (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem.*, 66:511-548.

Schneider W.J., Nimpf J. (2003). LDL receptor relatives at the crossroad of endocytosis and signaling. *Cell Mol Life Sci.*, 60(5):892-903.

Schreyer S.A., Vick C., Lystig T.C., Mystkowski P., LeBoeuf R.C. (2002). LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 282(1):E207-214.

Schwandt P., Parhofer K.G. (2007). Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. Schattauer, Stuttgart, New York. 3. Auflage.
Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine 2-66
Atherosklerose – Struktur und Pathogenese 412-442

Schrijvers D.M., De Meyer G.R., Kockx M.M., Herman A.G., Martinet W. (2005). Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 25(6):1256-1261.

Sharrocks A.D., Yang S.H., Galanis A. (2000). Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends Biochem Sci.*, 25(9):448-453.

Smythe E., Ayscough K.R. (2006). Actin regulation in endocytosis. *J Cell Sci.*, 119(22):4589-4598.

Sohal R.S., Weindruch R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, 273(5271):59-63.

- Soldati T., Schliwa M. (2006). Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 7(12):897-908.
- Song B.D., Schmid S.L. (2003). A molecular motor or a regulator? Dynamin's in a class of its own. *Biochemistry.*, 42(6):1369-1376.
- Songyang Z., Shoelson S.E., McGlade J., Olivier P., Pawson T., Bustelo X.R., Barbacid M., Sabe H., Hanafusa H., Yi T., et al. (1994). Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol Cell Biol.*, 14(4):2777-2785.
- Sonoda I., Imoto I., Inoue J., Shibata T., Shimada Y., Chin K., Imamura M., Amagasa T., Gray J.W., Hirohashi S., Inazawa J. (2004). Frequent silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B (LRP1B) expression by genetic and epigenetic mechanisms in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.*, 64(11):3741-3747.
- Sottrup-Jensen L. (1989) Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J Biol Chem.*, 264(20):11539-11542.
- Sottrup-Jensen L., Stepanik T.M., Kristensen T., Lønblad P.B., Jones C.M., Wierzbicki D.M., Magnusson S., Domdey H., Wetsel R.A., Lundwall A., et al. (1985). Common evolutionary origin of alpha 2-macroglobulin and complement components C3 and C4. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 82(1):9-13.
- Spoelgen R., Hammes A., Anzenberger U., Zechner D., Andersen O.M., Jerchow B., Willnow T.E. (2005). LRP2/megalin is required for patterning of the ventral telencephalon. *Development*, 132(2):405-414.
- Su H.P., Nakada-Tsukui K., Tosello-Tramont A.C., Li Y., Bu G., Henson P.M., Ravichandran K.S. (2002). Interaction of CED-6/GULP, an adapter protein involved in engulfment of apoptotic cells with CED-1 and CD91/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *J Biol Chem.*, 277(14):11772-11779.

Su H.P., Brugnera E., Van Criekinge W., Smits E., Hengartner M., Bogaert T., Ravichandran K.S. (2000). Identification and characterization of a dimerization domain in CED-6, an adapter protein involved in engulfment of apoptotic cells. *J Biol Chem.*, 275(13):9542-9549.

Swertfeger, D.K., Bu, G., Hui, D.Y. (2002). Low-Density Lipoprotein Receptor-related Protein Mediates Apolipoprotein E Inhibition of Smooth Muscle Cell Migration. *J Biol Chem.*, 277(6): 4141-4146

Taru H., Kirino Y., Suzuki T. (2002). Differential roles of JIP scaffold proteins in the modulation of amyloid precursor protein metabolism. *J Biol Chem.*, 277(30):27567-27574.

Tas S.W., Quartier P., Botto M., Fossati-Jimack L. (2006). Macrophages from patients with SLE and rheumatoid arthritis have defective adhesion in vitro, while only SLE macrophages have impaired uptake of apoptotic cells. *Ann Rheum Dis.*, 65(2):216-221.

Taylor D.R., Hooper N.M. (2007). The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates the endocytosis of the cellular prion protein. *Biochem J.*, 402: 17-23

Traub L.M., Downs M.A., Westrich J.L., Fremont D.H. (1999). Crystal structure of the alpha appendage of AP-2 reveals a recruitment platform for clathrin-coat assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96(16):8907-8912.

Trinei M., Giorgio M., Cicalese A., Barozzi S., Ventura A., Migliaccio E., Milia E., Padura I.M., Raker V.A., Maccarana M., Petronilli V., Minucci S., Bernardi P., Lanfrancone L., Pelicci P.G. (2002). A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene*, 21(24):3872-3878.

Trommsdorff M., Gotthardt M., Hiesberger T., Shelton J., Stockinger W., Nimpf J., Hammer R.E., Richardson J.A., Herz J. (1999). Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell*, 97(6):689-701.

- Trommsdorff M., Borg J.-P., Margolis B., Herz J. (1998). Interactions of Cytosolic Adaptor Proteins with Neuronal Apolipoprotein E Receptors and the Amyloid Precursor Protein. *J.Biol.Chem.*, 273(50): 33556-33560
- Ulery P.G., Beers J., Mikhailenko I., Tanzi R.E., Rebeck G.W., Hyman B.T., Strickland D.K. (2000). Modulation of β -Amyloid Precursor Protein Processing by the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP). *J Biol Chem.*, 275(10): 7410-7415
- Vedhachalam C., Duong P.T., Nickel M., Nguyen D., Dhanasekaran P., Saito H., Rothblat G.H., Lund-Katz S., Phillips M.C. (2007). Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem.*, 282(34):25123-25130.
- Verhey K.J., Meyer D., Deehan R., Blenis J., Schnapp B.J., Rapoport T.A., Margolis B. (2001). Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J Cell Biol.*, 152(5):959-970.
- Verhey K.J., Rapoport T.A. (2001). Kinesin carries the signal. *Trends Biochem Sci.*, 26(9): 545-549
- Waeber G., Delplanque J., Bonny C., Mooser V., Steinmann M., Widmann C., Maillard A., Miklossy J., Dina C., Hani E.H., Vionnet N., Nicod P., Boutin P., Froguel P. (2000). The gene MAPK8IP1, encoding islet-brain-1, is a candidate for type 2 diabetes. *Nat Genet.*, 24(3):291-295.
- Waldron E., Jaeger S., Pietrzik C.U. (2006). Functional Role of the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein in Alzheimer's Disease. *Neurodegener Dis.*, 3: 233-238
- Weisgraber K.H., Innerarity T.L., Mahley R.W. (1978). Role of lysine residues of plasma lipoproteins in high affinity binding to cell surface receptors on human fibroblasts. *J Biol Chem.*, 253(24):9053-9062.

Wells A. (1999). EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol.*, 31(6):637-643.

Whitmarsh A.J. (2006). The JIP family of MAPK scaffold proteins. *Biochem Soc Trans.*, 34(5):828-832.

Whitmarsh A.J., Cavanagh J., Tournier C., Yasuda J., Davis R.J. (1998) A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science*, 281(5383):1671-1674.

Willnow T.E., Goldstein J.L., Orth K., Brown M.S., Herz J. (1992). Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *J Biol Chem.*, 267(36):26172-26178.

Yang T., Espenshade P.J., Wright M.E., Yabe D., Gong Y., Aebersold R., Goldstein J.L., Brown M.S. (2002). Crucial Step in Cholesterol Homeostasis: Sterols Promote Binding of SCAP to INSIG-1, a Membrane Protein that Facilitates Retention of SREBPs in ER. *Cell*, 110: 489-500

Yasuda J., Whitmarsh A.J., Cavanagh J., Sharma M., Davis R.J. (1999). The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol.*, 19(10):7245-7254.

Yokote K., Mori S., Hansen K., McGlade J., Pawson T., Heldin C.H., Claesson-Welsh L. (1994). Direct interaction between Shc and the platelet-derived growth factor beta-receptor. *J Biol Chem.*, 269(21):15337-15343.

Yoshida S., Masaki T., Feng H., Yuji J., Miyauchi Y., Funaki T, Yoshiji H., Matsumoto K., Uchida N., Watanabe S., Kurokohchi K., Kuriyama S. (2004). Enhanced expression of adaptor molecule p46 Shc in nuclei of hepatocellular carcinoma cells: study of LEC rats. *Int J Oncol.*, 25(4):1089-1096.

Yukimasa S., Masaki T., Yoshida S., Uchida N., Watanabe S., Usuki H., Yoshiji H., Maeta T., Ebara K., Nakatsu T., Kurokohchi K., Kuriyama S. (2005). Enhanced expression of p46 Shc in the nucleus and p52 Shc in the cytoplasm of human gastric cancer. *Int J Oncol.*, 26(4):905-911.

Zhang H., Links P.H., Ngsee J.K., Tran K., Cui Z., Ko K.W.S, Yao Z. (2004). Localization of Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 to Caveolae in 3T3-L1 Adipocytes in Response to Insulin Treatment. *J Biol Chem.*, 279(3): 2221-2230

Zhu Y., Hui D.Y. (2003). Apolipoprotein E Binding to Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein-1 Inhibits Cell Migration via Activation of cAMP-dependent Protein Kinase A. *J Biol Chem.*, 278(38): 36257-36263

8 Anhang

Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich besonders herzlich bei Herrn Prof. Dr. Hartwig Schmale und Frau Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel für die Überlassung des Themas und die stets interessierte und fürsorgliche Begleitung meiner Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt zudem Frau PD Dr. Evita Mohr und Herrn Prof. Dr. Franz Rinninger für die Begutachtung dieser Arbeit.

Meinen lieben Laborkollegen Anette Rosche und Niklas Schreiber bin ich dankbar für die vielen fabelhaften Stunden gemeinsam im Labor, vor allem Niklas für die sorgfältige und kritische Lektüre meiner Manuskripte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Jörg Heeren und Frau Sandra Ehret für die großzügige Versorgung mit den verschiedenen Stimulanzen sowie Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hampe für die GST- und GST-RAP-Fusionsproteine.

Schließlich bedanke ich mich bei Dr. Alexander Bartelt, Dr. Oliver Bruns, Dr. Alexander Laatsch sowie Dr. Lars Rellin für jeden guten Rat und alle wertvollen Vorschläge zu meinen Versuchen. Zuguterletzt geht mein Dank an die freundlichen Mitarbeiter des Instituts für die gemeinsame und schöne Zeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sebastian Meisner
 Geburtsdatum: 12. September 1981
 Geburtsort: Hamburg

Ausbildung

1988 - 1992 Grundschule Holtsee
 1992 - 1998 Gymnasium Jungmannschule Eckernförde
 1998 Viermonatiger Schüleraustausch, Besuch des Walter Murray Collegiate Institute in Saskatoon, SK. Canada
 1998 - 2001 Gymnasium Jungmannschule Eckernförde
 2001 Abitur
 2001 - 2002 Zivildienst auf der Kinderstation und im ambulanten Pflegedienst des Kreiskrankenhauses Eckernförde
 2002 - 2004 Medizinstudium an der Universität Hamburg – Vorklinischer Abschnitt und Physikum
 2004 - 2008 Medizinstudium an der Universität – Klinischer Abschnitt
 2008 - 2009 Praktisches Jahr in der Asklepios Klinik Hamburg-Harburg
 - Allgemein-, Gefäß- und Viszeralchirurgie (Prof. Dr. E.S. Debus)
 - Unfallchirurgie und Orthopädie (Prof. Dr. C.H. Flamme)
 - Thoraxchirurgie (Dr. C. Kugler)
 - Anästhesiologie und Intensivmedizin (Prof. Dr. T. Kerner)
 sowie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
 - I. Medizinische Klinik und Poliklinik – Gastroenterologie und Hepatologie (Prof. Dr. A.W. Lohse)
 - Universitäres Herzzentrum Hamburg - Klinik für Kardiologie und Angiologie (Prof. Dr. T. Meinertz)
 2009 Staatsexamen und Approbation als Arzt
 2007 - 2010 Promotion am Zentrum für Experimentelle Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II (Direktorin: Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel): Molekulare Zellbiologie, Arbeitsgruppe "Adapterproteine und Signaltransduktion von LRP1" bei Prof. Dr. Hartwig Schmale
 Thema: Regulation der Interaktion von Adapterproteinen am intrazellulären C-Terminus von LRP1 in Hepatomazellen

Berufstätigkeit

Seit Oktober 2009 Anstellung als Assistenzarzt in der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. A. W. Lohse)

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit ausdrücklich und an Eides statt durch meine eigene Unterschrift, 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.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich stimme einer Veröffentlichung zu.

Hamburg, den 20. 10. 2010

Sebastian Meisner.