

**Die Regulation des intrazellulären**  
***low density lipoprotein receptor-related protein 1*-Transports**  
**durch Adapterproteine**

**Dissertation**

zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Britta Hoffzimmer**

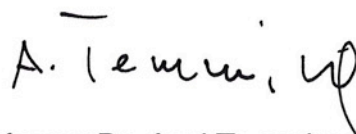
aus Frechen

**Hamburg**

**2011**

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Priv.-Doz. Dr. J. HEEREN  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Priv.-Doz. Dr. D. WARNECKE  
Tag der Disputation: 08. Juli 2011

Hamburg, den 24. Juni 2011

A handwritten signature in black ink, reading "A. Temming" with a stylized flourish at the end.

Professor Dr. Axel Temming  
Leiter des Fachbereichs Biologie

## Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis.....                                                                     | 4         |
| Zusammenfassung.....                                                                           | 11        |
| <b>1. Einleitung.....</b>                                                                      | <b>14</b> |
| 1.1 <i>Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1</i> (LRP1).....                      | 15        |
| 1.1.1 Die Entdeckung von LRP1.....                                                             | 15        |
| 1.1.2 Die extrazelluläre und intrazelluläre Struktur des multifunktionalen LRP1.....           | 16        |
| 1.1.3 Reifung und Sortierung von LRP1.....                                                     | 20        |
| 1.1.4 Endozytose und <i>Recycling</i> von LRP1.....                                            | 23        |
| 1.1.5 Physiologische Bedeutung von LRP1.....                                                   | 24        |
| 1.1.5.1 LRP1 als endozytischer Rezeptor.....                                                   | 25        |
| 1.1.5.2 LRP1 als Signaltransduktionsrezeptor.....                                              | 27        |
| 1.2 Adapterproteine.....                                                                       | 28        |
| 1.2.1 Die PTB ( <i>phosphotyrosine binding</i> )-Domäne.....                                   | 28        |
| 1.2.2 Regulation der Funktion von Lipoproteinrezeptoren durch PTB-Adapterproteine....          | 30        |
| 1.2.3 Das PTB-Adapterprotein PID1 ( <i>phosphotyrosine interaction domain-containing 1</i> ).. | 32        |
| 1.3 Zielsetzung.....                                                                           | 34        |
| <b>2. Material und Methoden.....</b>                                                           | <b>37</b> |
| 2.1 Material.....                                                                              | 37        |
| 2.2 Methoden.....                                                                              | 44        |
| 2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....                                                       | 44        |
| 2.2.1.1 Datenbankrecherche.....                                                                | 44        |
| 2.2.1.2 Klonierung.....                                                                        | 44        |
| 2.2.1.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....                                                 | 44        |
| 2.2.1.2.2 Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Plasmiden.....                              | 45        |
| 2.2.1.2.3 DNA-Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmiden aus Agarosegelen.....               | 45        |

|                                                                                                |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.1.2.4 Ligation.....                                                                        | 45        |
| 2.2.1.3 Transformation kompetenter E. coli.....                                                | 46        |
| 2.2.1.4 DNA-Minipräparation mit Säulenreinigung.....                                           | 46        |
| 2.2.1.5 Messung der Konzentration von DNA und RNA.....                                         | 47        |
| 2.2.1.6 RNA-Aufreinigung und quantitative <i>real-time</i> PCR.....                            | 47        |
| 2.2.2 Zellkulturtechniken.....                                                                 | 47        |
| 2.2.2.1 Kultivierung von Zelllinien.....                                                       | 47        |
| 2.2.2.2 Transfektion.....                                                                      | 48        |
| 2.2.2.3 Herstellung stabiler <i>Knock-down</i> Zelllinien mittels lentiviralem Gentransfer.... | 48        |
| 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden.....                                                        | 51        |
| 2.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten.....                                                       | 51        |
| 2.2.3.2 Messung der Proteinkonzentration.....                                                  | 51        |
| 2.2.3.3 Herstellung von GST-Fusionsproteinen.....                                              | 52        |
| 2.2.3.4 Verdau von GST-Fusionsproteinen mittels der PreScission-Protease.....                  | 54        |
| 2.2.3.5 Phosphorylierung mittels der v-Src-Kinase.....                                         | 54        |
| 2.2.3.6 GST-Pull-down.....                                                                     | 54        |
| 2.2.3.7 Immunpräzipitation.....                                                                | 55        |
| 2.2.3.8 Biotinylierung von Membranproteinen.....                                               | 57        |
| 2.2.3.9 SDS-PAGE und Western Blot.....                                                         | 57        |
| 2.2.3.10 Generierung eines PID1-Peptid-Antikörpers.....                                        | 58        |
| 2.2.4 Zellbiologische Methoden.....                                                            | 59        |
| 2.2.4.1 Indirekte Immunfluoreszenz.....                                                        | 59        |
| 2.2.4.2 Aufnahme- und Abbaustudien von <sup>125</sup> I-markierten Liganden.....               | 60        |
| 2.2.4.3 Zelloberflächen-Fluoreszenz- <i>Quenching-Recycling</i> -Experiment.....               | 61        |
| <b>3. Ergebnisse.....</b>                                                                      | <b>63</b> |
| 3.1 Die Interaktion von LRP1 mit dem Adapterprotein PID1.....                                  | 63        |
| 3.1.1 PID1 bindet an das distale NPXY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1.....           | 64        |



|                                                                                                                                                                         |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.1.2 Tyrosin-Phosphorylierung des distalen NPxY-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 hemmt die Interaktion mit PID1.....                                         | 68         |
| 3.1.3 Die Gewinnung eines PID1-spezifischen Antikörpers als Werkzeug zur Analyse der LRP1/PID1-Interaktion <i>in vivo</i> .....                                         | 74         |
| 3.1.4 LRP1 interagiert mit PID1 in HEK 293T-Zellen.....                                                                                                                 | 76         |
| 3.1.5 LRP1 interagiert mit PID1 in primären Hepatozyten.....                                                                                                            | 80         |
| 3.2 Lentiviral-vermittelte RNA-Interferenz gegen PID1 und ARH in HUH7-Zellen.....                                                                                       | 81         |
| 3.3 Die Rolle der PTB-Adapterproteine PID1 und ARH bei der Regulation des intrazellulären LRP1-Transports.....                                                          | 83         |
| 3.3.1 Knock-down von PID1 führt zu einer veränderten zellulären Lokalisation von LRP1 in HUH7-Zellen.....                                                               | 83         |
| 3.3.2 Analyse der Adapterprotein-vermittelten Regulation des intrazellulären LRP1 Transports in HUH7-Zellen mittels Kolokalisierungsstudien.....                        | 86         |
| 3.3.3 Die zelluläre Lokalisation von PID1 in HeLa-Zellen.....                                                                                                           | 110        |
| 3.4 Die Beeinflussung der Expression der Lipoproteinrezeptoren LRP1 und LDLR in PID1- und ARH-defizienten HUH7-Zellen.....                                              | 115        |
| 3.5 Die Rolle der PTB-Adapterproteine PID1 und ARH in der LRP1- und LDL-Rezeptor-vermittelten Endozytose in HUH7-Zellen.....                                            | 117        |
| <b>4. Diskussion.....</b>                                                                                                                                               | <b>124</b> |
| 4.1 Die Phosphotyrosin-unabhängige Bindung von PID1 an das distale NPxY-Motiv von LRP1 liefert Hinweise auf die physiologische Bedeutung der LRP1/PID1-Interaktion..... | 124        |
| 4.2 Regulation der LRP1/PID1-Interaktion durch Phosphorylierung.....                                                                                                    | 128        |
| 4.3 PID1 als PTB-Adapterprotein der Sortierungsmaschinerie von LRP1.....                                                                                                | 130        |
| 4.4 Der Einfluss der LRP1/PID1-interaktion auf die Funktion von LRP1 als Lipoproteinrezeptor.....                                                                       | 135        |
| Abbildungsverzeichnis.....                                                                                                                                              | 137        |
| Literaturverzeichnis.....                                                                                                                                               | 139        |
| Danksagung.....                                                                                                                                                         | 151        |

## Abkürzungsverzeichnis

Dieses Verzeichnis umfasst die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Abkürzungen.

### Allgemeine Abkürzungen

|          |                 |
|----------|-----------------|
| Abb.     | Abbildung       |
| $\alpha$ | Alpha           |
| bzw.     | beziehungsweise |
| $\beta$  | Beta            |
| $\gamma$ | Gamma           |
| $\Delta$ | Delta           |
| d.h.     | das heißt       |
| et al.   | et alia         |
| s.       | siehe           |
| s.o.     | siehe oben      |
| s.u.     | siehe unten     |
| vgl.     | vergleiche      |
| z.B.     | zum Beispiel    |

### Abkürzungen für Einheiten

|                    |                          |
|--------------------|--------------------------|
| $^{\circ}\text{C}$ | Grad Celsius             |
| cpm                | <i>counts per minute</i> |
| g                  | Gramm                    |
| <i>g</i>           | Erdbeschleunigung        |
| h                  | Stunde                   |
| kDa                | Kilodalton               |
| l                  | Liter                    |
| mA                 | Milliampere              |
| min                | Minuten                  |
| ml                 | Milliliter               |

|     |                                        |
|-----|----------------------------------------|
| mM  | Millimolar                             |
| µg  | Mikrogramm                             |
| µl  | Mikroliter                             |
| µm  | Mikrometer                             |
| ng  | Nanogramm                              |
| nm  | Nanometer                              |
| pH  | <i>pondus bzw. potentia Hydrogenii</i> |
| rpm | <i>revolutions per minute</i>          |
| sec | Sekunden                               |
| V   | Volt                                   |

### Fachsprachliche Abkürzungen

|                  |                                                 |
|------------------|-------------------------------------------------|
| A                | Adenin                                          |
| α                | anti                                            |
| Aβ               | <i>amyloid-β</i>                                |
| α <sub>2</sub> M | α <sub>2</sub> -Makroglobulin                   |
| AP1B             | <i>adaptor protein 1B</i>                       |
| AP2              | <i>adaptor protein 2</i>                        |
| APP              | <i>amyloid precursor protein</i>                |
| ApoB48           | Apolipoprotein B48                              |
| ApoB100          | Apolipoprotein B100                             |
| ApoE             | Apolipoprotein E                                |
| ApoER2           | <i>ApoE receptor 2</i>                          |
| ARH              | <i>autosomal recessive hypercholesterolemia</i> |
| AS               | Aminosäure                                      |
| ATP              | Adenosintriphosphat                             |
| BSA              | <i>bovine serum albumin</i>                     |
| β-VLDL           | <i>beta-migrating VLDL</i>                      |
| C                | Cytosin                                         |

|                 |                                                      |
|-----------------|------------------------------------------------------|
| cDNA            | <i>complementary DNA</i>                             |
| CGN             | cis-Golgi Netzwerk                                   |
| CM              | Chylomikronen                                        |
| CO <sub>2</sub> | Kohlenstoffdioxid                                    |
| CR              | Chylomikronen-Remnants                               |
| CR              | <i>complement-type repeats</i>                       |
| Dab             | <i>Disabled</i>                                      |
| Dab1 und 2      | <i>Disabled 1 und 2</i>                              |
| DAPI            | <i>4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride</i> |
| D-MEM           | Dulbecco's Modified Eagle Medium                     |
| DMSO            | Dimethylsulfoxid                                     |
| DNA             | <i>deoxyribonucleic acid</i>                         |
| DTT             | Dithiothreitol                                       |
| EDTA            | <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>               |
| EEA1            | <i>early endosome antigen 1</i>                      |
| EGF             | <i>epidermal growth factor</i>                       |
| eGFP            | <i>enhanced green fluorescent protein</i>            |
| ELISA           | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>             |
| ER              | Endoplasmatisches Retikulum                          |
| FVIII           | <i>factor VIII</i>                                   |
| FXI             | <i>factor XI</i>                                     |
| FACS            | <i>fluorescence activated cell sorting</i>           |
| FCS             | <i>fetal calf serum</i>                              |
| Flag            | DYKDDDDK                                             |
| G               | Guanin                                               |
| GLUT4           | <i>glucose transporter type 4</i>                    |
| GST             | Glutathion-S-Transferase                             |
| GTP             | Guanosintriphosphat                                  |
| H               | human                                                |

|                               |                                                                |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| HCL                           | Salzsäure                                                      |
| HDL                           | <i>high density lipoprotein</i>                                |
| HEK 293T                      | <i>human embryonic kidney cells 293T</i>                       |
| HeLa                          | humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms von Henrietta Lacks |
| HEPES                         | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure          |
| H <sub>2</sub> O              | Wasser                                                         |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid                                             |
| HRP                           | <i>horseradish peroxidase</i>                                  |
| HUH7                          | humane Hepatomazelllinie                                       |
| I                             | <i>Input</i>                                                   |
| <sup>125</sup> I              | <sup>125</sup> Iod, radioaktives Isotop                        |
| IF                            | Immunfluoreszenz                                               |
| IP                            | Immunpräzipitation                                             |
| IR                            | <i>insulin receptor</i>                                        |
| IRS                           | <i>insulin receptor substrate</i>                              |
| IRS-1                         | <i>insulin receptor substrate-1</i>                            |
| IZD                           | intrazelluläre Domäne                                          |
| LB                            | <i>lysogeny broth</i>                                          |
| LDL                           | <i>low density lipoprotein</i>                                 |
| LDLR                          | <i>LDL receptor</i>                                            |
| LDLRAP1                       | <i>LDL receptor adaptor protein 1 (ARH)</i>                    |
| LIMP-2                        | <i>lysosomal integral membrane protein-2</i>                   |
| LL                            | Dileucin                                                       |
| LpL                           | <i>lipoprotein lipase</i>                                      |
| LRP                           | <i>LDL receptor-related protein</i>                            |
| LRP1, 2, ...                  | <i>LDL receptor-related protein 1, 2,...</i>                   |
| LRP1-CT                       | LRP1-Carboxy-Terminus                                          |
| M                             | Maus                                                           |
| MAPK                          | <i>mitogen-activated protein kinase</i>                        |

|                   |                                                        |
|-------------------|--------------------------------------------------------|
| MEF               | <i>mouse embryonic fibroblasts</i>                     |
| MgCl <sub>2</sub> | Magnesiumchlorid                                       |
| mRNA              | <i>messenger RNA</i>                                   |
| N1                | proximales NPxY-Motiv (Mutation: NPTY→AATA)            |
| N2                | distales NPxY-Motiv (Mutation: NPVY→AAVA)              |
| N1/2              | N1 + N2                                                |
| NaCl              | Natriumchlorid                                         |
| NaOH              | Natronlauge                                            |
| NPxY              | Asparagin-Prolin-x-Tyrosin, (x = beliebige AS)         |
| NxxY              | Asparagin-x-x-Tyrosin, (x = beliebige AS)              |
| PAI-1             | <i>plasminogen activator inhibitor 1</i>               |
| PBS               | <i>phosphate buffered saline</i>                       |
| PCR               | <i>polymerase chain reaction</i>                       |
| PD                | <i>Pull-down</i>                                       |
| PDGF              | <i>platelet derived growth factor</i>                  |
| PGS               | PBS, Glycin, Saponin                                   |
| PH                | <i>pleckstrin homology domain</i>                      |
| PID1              | <i>phosphotyrosine interaction domain-containing 1</i> |
| PKA               | Proteinkinase A                                        |
| PKC               | Proteinkinase C                                        |
| PTB               | <i>phosphotyrosine binding domain</i>                  |
| Rab               | <i>Ras-related in brain</i>                            |
| Rab6 und 11       | <i>Ras-related in brain 6 und 11</i>                   |
| RAP               | <i>receptor associated protein</i>                     |
| Rev               | <i>Regulator of expression of virion proteins</i>      |
| RNA               | <i>ribonucleic acid</i>                                |
| RRE               | <i>Rev response element</i>                            |
| SDS               | <i>sodium dodecyl sulfate</i>                          |
| SDS-PAGE          | <i>SDS polyacrylamide gel electrophoresis</i>          |

|                |                                                       |
|----------------|-------------------------------------------------------|
| SH2            | <i>src-homology 2 domain</i>                          |
| Shc            | <i>(SH2 domain containing) transforming protein 1</i> |
| shRNA          | <i>short hairpin RNA</i>                              |
| siRNA          | <i>small interfering RNA</i>                          |
| SNX17          | <i>Sorting Nexin 17</i>                               |
| T              | Thymin                                                |
| TBS            | <i>Tris buffered saline</i>                           |
| TFPI           | <i>tissue factor pathway inhibitor</i>                |
| TfR            | Transferrinrezeptor                                   |
| TfR2           | Transferrinrezeptor 2                                 |
| TGN            | trans-Golgi Netzwerk                                  |
| T <sub>M</sub> | Schmelztemperatur                                     |
| tPA            | <i>tissue-type plasminogen activator</i>              |
| Tris           | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                       |
| Ü              | Überstand                                             |
| uPA            | <i>urokinase plasminogen activator</i>                |
| VLDL           | <i>very low density lipoproteins</i>                  |
| VLDLR          | <i>VLDL receptor</i>                                  |
| v-Src          | <i>viral sarcoma</i>                                  |
| VSV G          | <i>vesicular stomatitis virus G</i>                   |
| WB             | Western Blot                                          |
| WT             | Wildtyp                                               |
| YWTD           | Tyrosin-Tryptophan-Threonin-Asparaginsäure            |
| YxxL           | Tyrosin-x-x-Leucin (x = beliebige AS)                 |
| Yxxφ           | Tyrosin-x-x-φ (x = beliebige AS, φ = hydrophobe AS)   |

**Abkürzungen für Aminosäuren**

|    |                |
|----|----------------|
| A  | Alanin         |
| D  | Asparaginsäure |
| E  | Glutaminsäure  |
| F  | Phenylalanin   |
| H  | Histidin       |
| I  | Isoleucin      |
| K  | Lysin          |
| L  | Leucin         |
| M  | Methionin      |
| N  | Asparagin      |
| P  | Prolin         |
| Q  | Glutamin       |
| pY | Phosphotyrosin |
| R  | Arginin        |
| S  | Serin          |
| T  | Threonin       |
| V  | Valin          |
| W  | Tryptophan     |
| Y  | Tyrosin        |



## Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung des Adapterproteins PID1 (*phosphotyrosine interaction domain-containing 1*) für die Sortierung und die Funktion des Lipoproteinrezeptors LRP1 (*Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1*) untersucht werden. Die intrazelluläre Domäne (IZD) von LRP1 weist zwei NPxY-Motive (Asparagin-Prolin-x-Tyrosin, (x = beliebige AS)) und ein YxxL-Motiv (Tyrosin-x-x-Leucin (x = beliebige AS)) auf, die sowohl den intrazellulären Transport von LRP1 als auch dessen Beteiligung an Signaltransduktionsprozessen vermitteln, indem diese Tyrosin-enthaltenden Motive in Abhängigkeit ihres Phosphorylierungsstatus eine Interaktion mit vielen Adapterproteinen ermöglichen. Der Phosphorylierungsstatus der Tyrosin-enthaltenden Motive wird dabei durch den jeweiligen gebundenen Liganden beeinflusst, was darauf hindeutet, dass die Multifunktionalität von LRP1 durch Phosphorylierung reguliert wird. Es konnte gezeigt werden, dass viele intrazelluläre Proteine, die an die phosphorylierten NPxY-Motive der intrazellulären Domäne von LRP1 binden, in Signaltransduktionsprozesse involviert sind, während an die nicht-phosphorylierten NPxY-Motive viele Proteine binden, die in den intrazellulären LRP1-Transport involviert sind, wie AP2 (*adaptor protein 2*), Clathrin und SNX17 (*Sorting Nexin 17*). Jedoch ist die Funktion vieler Proteine, die mit der intrazellulären Domäne von LRP1 interagieren, nicht bekannt. Das PTB-Adapterprotein PID1 wurde 2007 von Caratù et al. als Interaktionspartner von LRP1 identifiziert und wird wie LRP1 verstärkt in der Leber exprimiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Interaktion von LRP1 mit dem PTB (*phosphotyrosine binding*)-Adapterprotein PID1 analysiert, um Hinweise auf die Funktion von PID1 für das multifunktionale LRP1 auch hinsichtlich der Expression von PID1 in anderen Geweben und Organen zu erhalten. Dabei konnte in verschiedenen Experimenten mittels GST (Glutathion-S-Transferase)-Pull-down, Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass das PTB-Adapterprotein PID1 mit dem distalen NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 interagiert. Zusätzlich konnte mithilfe von rekombinant aufgereinigten LRP1-IZD-Mutanten und PID1 in GST-Pull-down-Experimenten *in vitro* gezeigt werden, dass bei der LRP1/PID1-Interaktion sowohl das Asparagin als auch der aromatische Ring des Tyrosins des distalen NPxY-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 eine essentielle Rolle spielt, was die hohe Spezifität von PTB-Domänen für NPxY-Motive

bestätigt. Zusätzlich ist das Leucin des YxxL-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1, das das distale NPxY-Motiv carboxyterminal überlappt und mit diesem ein NPxYxxL-Doppelmotiv bildet, in die Interaktion mit PID1 involviert. Die LRP1/PID1-Interaktion wird folglich durch das distale NPxYxxL-Doppelmotiv der intrazellulären Domäne von LRP1 vermittelt, was eine fehlende Interaktion mit dem proximalen NPxY-Motiv erklären würde. Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine v-Src-Kinase-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung des distalen NPxYxxL-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 die Interaktion mit PID1 inhibierte. PID1 gehört somit zu den Phosphotyrosin-unabhängigen Dab (Disabled)-ähnlichen PTB-Adapterproteinen. Zusätzlich stellte sich PID1 als spezifisches Adapterprotein von LRP1 heraus, da PID1 nicht mit dem LDL-Rezeptor (LDLR = *low density lipoprotein receptor*) interagiert.

Aufgrund der Phosphotyrosin-unabhängigen Bindung von PID1 an LRP1 und aufgrund des Fehlens bekannter funktioneller Domänen in PID1, die den Aufbau eines Signalkomplexes ermöglichen, wurde in dieser Arbeit eine mögliche Funktion des Adapterproteins PID1 in der Regulation des intrazellulären LRP1-Transports in Hepatozyten untersucht. Das PTB-Adapterprotein ARH (*autosomal recessive hypercholesterolemia*), das in Hepatozyten die LDL-Rezeptor-vermittelte Aufnahme reguliert, wurde zur Kontrolle parallel analysiert. Die Funktion von PID1 und ARH wurde dabei nach Ausschalten der beiden Adapterproteine mittels lentiviral-vermittelter RNA-Interferenz in HUH7-Zellen (humane Hepatomazelllinie) analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Abwesenheit von PID1 im Gegensatz zu einem Fehlen von ARH in HUH7-Zellen zu einer veränderten zellulären Lokalisation von LRP1 führt. In Leberzellen ist LRP1 überwiegend in einem juxtanukleären Kompartiment lokalisiert. In der vorliegenden Arbeit konnte aufgrund von Koloalisation mit Markern für frühe und *Recycling*-Endosomen wie EEA1 (*early endosome antigen 1*) und Rab11 (*Ras-related in brain 11*) gezeigt werden, dass dieses Kompartiment ein endozytisches *Recycling*-Kompartiment ist, in das LRP1 sowohl nach der Biosynthese als auch nach der Endozytose transportiert wird und das somit als ein intrazellulärer „LRP1-Pool“ fungiert. Ein Ausschalten von PID1 in HUH7-Zellen führt nun dazu, dass LRP1 nicht mehr in diesem Kompartiment konzentriert lokalisiert ist, sondern in Vesikeln, die im gesamten Zytoplasma verteilt sind. Die Analyse der LRP1-positiven Vesikel in PID1-defizienten Zellen zeigte, dass LRP1 auch in Abwesenheit von PID1 an die Plasmamembran transportiert wird und dort endozytisch aktiv ist. Die Abwesenheit von PID1 in HUH7-Zellen könnte folglich zu einer nicht-polarisierten Verteilung von LRP1 am

*Recycling*-Kompartiment aufgrund einer fehlenden Interaktion mit PID1 führen. Zusätzlich kolokalisieren in PID1-defizienten Zellen mehr LRP1-positive Vesikel mit dem Golgi-Marker Rab6. Diese Daten und die Beobachtung, dass PID1 in HeLa-Zellen am meisten mit dem Golgi-Marker Rab6 (*Ras-related in brain 6*) und dem *Recycling*-Endosom-Marker Rab11 kolokalisierte, führten zu der Vermutung, dass PID1 möglicherweise an mehreren Kompartimenten zwischen dem Golgi-Apparat und der Plasmamembran den intrazellulären Transport von LRP1 reguliert.

Eine Fehlsortierung von LRP1 in Abwesenheit von PID1 könnte mit einem Funktionsverlust von LRP1 als endozytischer Rezeptor in Hepatozyten assoziiert sein, was in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Zum einen ist eine Herunterregulation von PID1 in HUH7-Zellen mit einer verringerten LRP1-Expression assoziiert, die ebenfalls auf eine Fehlsortierung von LRP1 zurückzuführen sein könnte. Zum anderen kann in den PID1-defizienten HUH7-Zellen eine kompensatorische Hochregulation und eine verstärkte Zelloberflächen-Lokalisation des LDL-Rezeptors beobachtet werden, was ebenfalls für einen Funktionsverlust von LRP1 als Lipoproteinrezeptor spricht. Die Untersuchung der LRP1-vermittelten Endozytose zeigte zusätzlich, dass in den PID1-defizienten HUH7-Zellen nach Inhibition des LDL-Rezeptors die Aufnahme von ApoE (Apolipoprotein E)-enthaltenden Lipoproteinen reduziert ist. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit ein Einfluss eines PID1-*Knock-downs* auf das *Recycling* von LRP1 in HUH7-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass das *Recycling* von LRP1 unbeeinflusst ist, jedoch ist in den PID1-defizienten HUH7-Zellen LRP1 verstärkt an der Plasmamembran lokalisiert, was ebenfalls auf eine nicht-polarisierte Verteilung von LRP1 in Abwesenheit von PID1 hindeutet.

In dieser zellbiologischen Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass eine fehlende Interaktion von PID1 mit dem distalen NPxYxxL-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 zu einer veränderten intrazellulären LRP1-Lokalisation führt. Diese Fehlsortierung ist mit einem Funktionsverlust von LRP1 als Lipoproteinrezeptor in Hepatozyten assoziiert.

## 1. Einleitung

LRP1 (*Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1*) interagiert mit mehr als 30 nicht-verwandten Liganden wie Apolipoprotein E (ApoE)-enthaltende Lipoproteine, Lipasen, Proteasen, Protease-Inhibitor-Komplexe, Matrixproteine, Wachstumsfaktoren, Hormone, bakterielle Toxine und Viruspartikeln (Review: Lillis et al. 2008). LRP1 fungiert nicht nur wie der LDL-Rezeptor (LDLR: *low density lipoprotein receptor*) als ein klassischer endozytierender Rezeptor (Goldstein und Brown 1977 und 1985, Mahley und Innerarity 1983), sondern ist auch als Rezeptor in Signaltransduktionsprozesse involviert, was eine Beteiligung des multifunktionalen LRP1 in vielen (patho-)physiologischen Prozessen wie dem Lipidstoffwechsel, der Atherosklerose oder Alzheimer impliziert (Lillis, Mikhailenko und Strickland 2005, May, Herz und Bock 2005, Strickland und Ranganathan 2003). Dabei gewährleisten sowohl die extrazelluläre Struktur als auch die intrazelluläre Domäne (IZD) von LRP1 dessen Multifunktionalität. Die intrazelluläre Domäne von LRP1 weist mehrere Tyrosin-enthaltende Motive auf, die in Abhängigkeit ihres Phosphorylierungsstatus, der durch den jeweiligen gebundenen Liganden beeinflusst wird (Boucher et al. 2002), Interaktionsstellen für viele verschiedene, teils Gewebe-spezifische intrazelluläre Adapterproteine bieten, die die Multifunktionalität von LRP1 gewährleisten (Barnes, Ackermann und van der Geer 2003, Betts, van der Geer und Komives 2008, Boucher und Gotthardt 2004, Loukinova et al. 2002, Ranganathan et al. 2004, Trommsdorff et al. 1998, Zhang et al. 2008). Zusätzlich wird durch die Interaktion der Tyrosin-enthaltenden Motive mit Adapterproteinen der intrazelluläre Transport von LRP1 nach der Biosynthese und während Endozytose, d.h. die Sortierung, die Internalisierung und das *Recycling* des Rezeptors, reguliert (Donoso et al. 2009, Marzolo et al. 2003). Viele der Adapterproteine, die in diese Prozesse involviert sind, sind nicht bekannt, daher befasst sich diese Arbeit mit dem Adapterprotein PID1 (*phosphotyrosine interaction domain-containing 1*), das 2007 von Caratù et al. als Interaktionspartner von LRP1 identifiziert wurde.

## **1.1 Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1)**

### **1.1.1 Die Entdeckung von LRP1**

Im Jahre 1988 wurde von Herz et al. ein 600 kDa großes hepatisches Zelloberflächenprotein identifiziert, das eine auffallende Sequenzhomologie zum LDL-Rezeptor und dem Vorläufer des *Epidermal Growth Factor* (EGF) zeigte. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit, einer hohen Expression in der Leber und der gemeinsamen Eigenschaft, Calcium zu binden, wurde das Protein als LDLR-Related Protein (LRP) bezeichnet und in die LDL-Rezeptor Familie eingeordnet. Aufgrund der Entdeckung weiterer sehr ähnlicher Rezeptoren setzte sich dann schließlich die Bezeichnung LRP1 für den ursprünglich als „LRP“ beschriebenen Rezeptor durch, der in immunologischen Kontexten auch CD91 (*cluster of differentiation 91*) genannt wird. Schnell stellte sich heraus, dass LRP1 ApoE binden kann (Beisiegel et al. 1989), was auf eine mögliche Funktion von LRP1 im Lipoproteinstoffwechsel als Chylomikronen-Remnants-Rezeptor hinwies. Schon in den frühen 1980ern wurde vermutet, dass der LDL-Rezeptor vermutlich nicht der einzige Rezeptor ist, der mit ApoE interagiert. Diese Hypothese bestand aufgrund der Beobachtung, dass Patienten und Tiere mit einem defekten LDL-Rezeptor zwar eine erhöhte Konzentration von Apolipoprotein B100 (ApoB100)-enthaltenden Lipoproteinen geringer Dichte (LDL) im Plasma aufweisen, aber keine Veränderung in den Plasmaspiegeln ApoE-enthaltender Lipoproteine wie Chylomikronen-Remnants, High Density Lipoprotein (HDL) und  $\beta$ -VLDL (*beta-migrating Very Low Density Lipoprotein*) zeigen (Brown und Goldstein 1983, Kita et al. 1982, Rubinsztein et al. 1990). Bereits 1982 konnte gezeigt werden, dass der Proteinase-Inhibitor  $\alpha_2$ -Makroglobulin ( $\alpha_2$ M) nach Bildung eines Komplexes mit einer Protease zur Regulation von deren Aktivität im Plasma schnell durch einen hepatischen Rezeptor aufgenommen werden muss (Fuchs, Shifman und Pizzo 1982). Diese und andere Studien lieferten Beweise für die Existenz eines Rezeptors, der die Aufnahme von  $\alpha_2$ -Makroglobulin-Komplexen vermittelt. Schließlich konnten zwei Gruppen den Rezeptor mittels Affinitätschromatographie isolieren (Ashcom et al. 1990, Moestrup und Gliemann 1989). Sequenzanalysen zeigten dann sehr schnell, dass es sich bei diesem Rezeptor ebenfalls um LRP1 handelt (Kristensen et al. 1990, Strickland et al. 1990), was implizierte, dass LRP1 mehr als einen Liganden bindet. Tatsächlich ist mittlerweile bekannt, dass LRP1 mit mehr als 30 Liganden interagiert und in vielen verschiedenen Geweben und

Organen exprimiert wird, was dessen Beteiligung an vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen impliziert. Dabei fungiert LRP1 nicht wie ursprünglich angenommen ausschließlich als ein endozytierender Rezeptor, sondern auch als Signaltransduktionsrezeptor (Herz und Strickland 2001, Lillis et al. 2008). Das humane LRP1 Gen ist auf Chromosom 12 im Bereich q13-14 lokalisiert (Myklebost et al. 1989), während sich das murine auf Chromosom 15 befindet (Hilliker, Van Leuven und Van den Berghe 1992). Interessanterweise ist die Deletion des LRP1 Gens in Mäusen letal, was zum einen zusätzlich auf eine wichtige Rolle von LRP1 während der Entwicklung hindeutet (Herz, Clouthier und Hammer 1992), zum anderen aber auch weiterhin auf die Multifunktionalität von LRP1 hinweist, die sich auch in der Struktur von LRP1 widerspiegelt.

### 1.1.2 Die extrazelluläre und intrazelluläre Struktur des multifunktionalen LRP1

Die LDL-Rezeptor Familie besteht aus einer Gruppe von sieben nah-verwandeten Typ-I Transmembranrezeptoren, dazu gehören der LDL-Rezeptor, der VLDL-Rezeptor (VLDLR), der ApoE Rezeptor 2 (ApoER2/ LRP8), der *multiple epidermal growth factor-like domains 7* (MEGF7), LRP1, LRP1B und Megalin (LRP2/ Glykoprotein 330), während andere Mitglieder der Familie wie LRP5, LRP6 und SorLA (LRP11) eher entfernt verwandt sind. Strukturell weisen die meisten Mitglieder der LDL-Rezeptor Familie wie auch LRP1 charakteristische Domänen auf: der aminoterminal, extrazelluläre Bereich enthält eine oder mehrere Ligandenbindungsdomänen, an die jeweils eine EGF-Vorläufer-Homologiedomäne angrenzt, während der carboxyterminale Teil eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne aufweist (Review: Lillis et al. 2008).

Alle Mitglieder der LDL-Rezeptor Familie enthalten Cluster aus zwei oder mehr *complement-type repeats* (CR). Diese CR sind zum einen reich an Cystein-Resten, die an der Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken beteiligt sind, zum anderen enthalten sie Cluster negativ geladener Aminosäurereste, die in der Ligandenbindung involviert sind. Seitdem bekannt ist, dass an diese CR die meisten Liganden binden, werden sie als Ligandenbindungsstellen bezeichnet (vgl. Abb.1) (Esser et al. 1988, Goldstein et al. 1985, Hobbs et al. 1986, Lillis et al. 2008, Yamamoto et al. 1984). Die NMR-Spektroskopie lieferte erste Einblicke in die Struktur dieser CR und zeigte, dass die erste Ligandenbindungsstelle des LDL-Rezeptors (CR1) eine  $\beta$ -Haarnadelstruktur gefolgt von einer Reihe  $\beta$ -Schleifen aufweist (Daly et al. 1995). Kurze Zeit

später zeigte die Kristallstruktur der Ligandenbindungsstelle CR5 des LDL-Rezeptors, dass dieses Modul einen „Käfig“ um ein Calcium-Ion herum bildet, das die Struktur der Ligandenbindungsstelle stabilisiert (Fass et al. 1997). Seither wurden viele zusätzliche Strukturen der Ligandenbindungsstellen von verschiedenen Mitgliedern der LDL-Rezeptor Familie aufgeklärt. Interessanterweise zeigte die X-Ray-Struktur eines Komplexes zwischen CR3 und CR4 des LDL-Rezeptors und der dritten Domäne (D3) von RAP (*receptor associated protein*), das aus drei topologisch-ähnlichen Domänen (D1-D3) besteht, dass RAP-D3 als Interaktionsstellen zwei Lysine an den Positionen 256 und 270 für CR3 und CR4 des LDL-Rezeptors aufweist. Dagegen weisen die CR des LDL-Rezeptors jeweils als Bindungsstelle drei saure Aminosäuren (AS) und eine aromatische Aminosäure auf (CR3: D<sub>108</sub>, D<sub>110</sub>, D<sub>112</sub> und F<sub>105</sub>, CR4: D<sub>147</sub>, D<sub>149</sub>, D<sub>151</sub> und W<sub>144</sub>; D = Asparaginsäure, F = Phenylalanin und W = Tryptophan), wobei die sauren Aminosäuren eine azidische Tasche für den Lysin-Rest bilden, während die aromatische Aminosäure den aliphatischen Teil des Lysins verpackt. Zusätzlich sind alle vier Aminosäurereste in der Koordination des Calcium-Ions beteiligt, weshalb deren Position in der Struktur fixiert ist (Fisher, Beglova und Blacklow 2006). RAP bindet somit wie auch viele andere Liganden über basische Aminosäuren an die Ligandenbindungsstellen der Mitglieder der LDL-Rezeptor Familie (Migliorini et al. 2003, Nielsen et al. 1996, Rodenburg et al. 1998, Stefansson et al. 1998).

Zusätzlich grenzt an den Ligandenbindungsdomänen aller Mitglieder der LDL-Rezeptor Familie eine Domäne, die dem EGF-Vorläufer homolog ist (Russel et al. 1984). In dieser EGF-Vorläufer-Homologiedomäne werden zwei Cystein-reiche EGF-Motive von einem dritten durch eine Spacerregion getrennt, die mehrere Wiederholungen der Sequenz Tyrosin-Tryptophan-Threonin-Asparaginsäure (YWTD) aufweist (vgl. Abb.1). Die Kristallstruktur der YWTD-Domäne des LDL-Rezeptors zeigte dabei, dass diese Domäne eine sechsblättrige  $\beta$ -Propellerstruktur bildet, die dicht an das C-terminale EGF-Motiv angrenzt (Springer 1998, Jeon et al. 2001). Die Deletion dieser Domäne im LDL-Rezeptor sowie auch im VLDL-Rezeptor resultierte in einer fehlenden Ligandendissoziation vom Rezeptor im sauren Milieu der Endosomen (Davis et al. 1987, Mikhailenko et al. 1999). Die Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des LDL-Rezeptors bei pH 5.3 zeigte weiterhin, dass das saure Milieu zu einer Konformationsänderung des Rezeptors führt, in der die  $\beta$ -Propeller-Domäne

Calcium-abhängig mit den Ligandenbindungsstellen *CR4* und *CR5* interagieren kann und somit als „alternativer Ligand“ die Dissoziation der Liganden fördert (Rudenko et al. 2002).

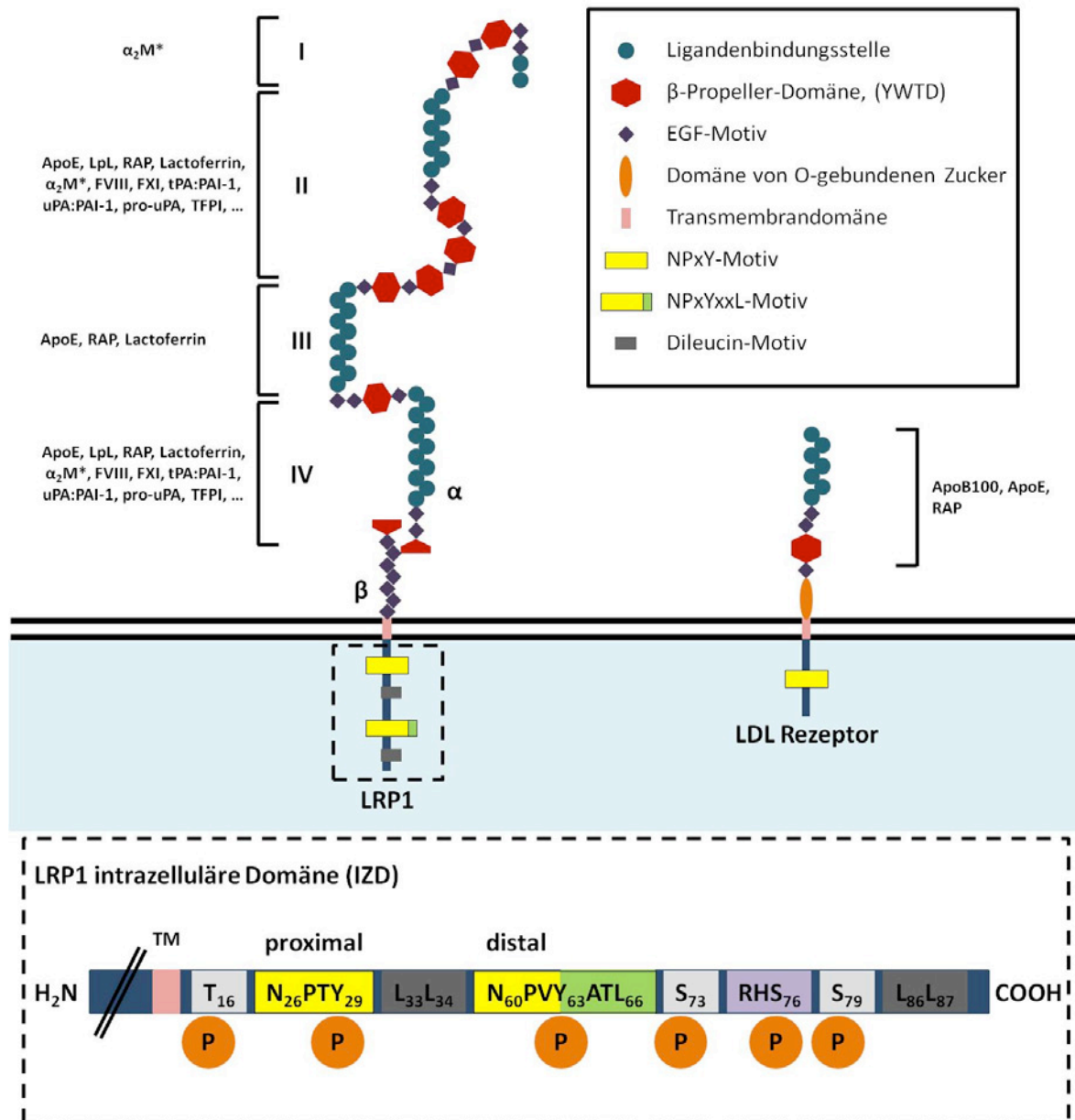


Abbildung 1: **Extra- und intrazelluläre Struktur von LRP1 und des LDL-Rezeptors.** Dargestellt sind zum einen die Ligandenbindungscluster der extrazellulären Domäne von LRP1 und des LDL-Rezeptors, die jeweils aus einer Ligandenbindungsdomäne und einer EGF-Vorläufer-Homologiedomäne bestehen, zum anderen sind interagierende Liganden gezeigt. Zusätzlich ist die intrazelluläre Domäne von LRP1 und des LDL-Rezeptors mit ihren Motiven gezeigt. Der untere Kasten stellt dazu alle Positionen der Motive sowie Phosphorylierungsstellen der intrazellulären Domäne von LRP1 dar. FVIII = *factor VIII*, FXI = *factor XI*, TFPI = *tissue factor pathway inhibitor*, tPA = *tissue-type plasminogen activator*, uPA= *urokinase plasminogen activator*, PAI-1 = *plasminogen activator inhibitor 1*. Adaptiert nach Lillis et al. 2008.



Im Gegensatz zum LDL-Rezeptor, der nur an wenige Liganden wie ApoE und ApoB100 bindet (Goldstein et al. 1985, Mahley und Innerarity 1983), interagiert LRP1 mit mehr als 30 verschiedenen Liganden (*Review*: Lillis et al. 2008). Das erhebt die Frage, wie gewährleistet wird, dass LRP1 alle diese Liganden erkennt und mit hoher Affinität bindet. LRP1 enthält zum einen vier Cluster (Cluster I – IV), in denen die Ligandenbindungsstellen lokalisiert sind, wobei jedes Cluster eine unterschiedliche Anzahl von Ligandenbindungsstellen (2, 8, 10, 11, vom N-Terminus aus betrachtet, vgl. Abb. 1) aufweist und somit viele Interaktionsstellen für Liganden bietet. Dabei zeigen Interaktionsstudien, dass die meisten Liganden an das Cluster II und IV binden (Neels et al. 1999, Willnow, Orth und Herz 1994), wobei Lactoferrin, ApoE und RAP an die Cluster II, III und IV binden (Bu und Rennke 1996, Croy et al. 2003) (Abb. 1). Zum anderen sind die Ligandenbindungsdomänen durch die flexiblen  $\beta$ -Propeller-Domänen verbunden, wodurch auch hinsichtlich ihrer variierenden Größe zusätzlich konformelle Freiheit besteht, die eine Interaktion mit vielen unterschiedlichen Liganden ermöglichen kann (Beglova, North und Backlow 2001, Dolmer und Gettins 2006, Simonovic et al. 2001). Im Gegensatz dazu binden die Liganden im LDL-Rezeptor nur an eine Ligandenbindungsdomäne, die aus sieben etwa 40 Aminosäuren langen Ligandenbindungsstellen besteht (Abb. 1) (Catterall et al. 1987, Esser et al. 1988, Goldstein et al. 1985, Hobbs et al. 1986).

Im Gegensatz zu der 50 Aminosäuren langen intrazellulären Domäne des LDL-Rezeptor, die nur wenige Motive wie ein NPxY-Motiv (NPxY = Asparagin-Prolin-x-Tyrosin, x = beliebige AS) enthält, weist die 100 Aminosäuren lange intrazelluläre Domäne von LRP1 ebenfalls mehrere Motive wie zwei NPxY-Motive (N<sub>26</sub>PTY<sub>29</sub> und N<sub>60</sub>PVY<sub>63</sub>), ein Yxx $\phi$ -Motiv (Tyrosin-x-x- $\phi$ , x = beliebige AS,  $\phi$  = hydrophobe AS, hier: Leucin, Y<sub>63</sub>ATL<sub>66</sub>), zwei Dileucin-Motive (LL<sub>43, 44</sub> und LL<sub>86, 87</sub>) und ein Proteinkinase A (PKA)-Motiv (RHS<sub>76</sub>) auf. Zusätzlich überlappen sich das distale NPxY-Motiv (N<sub>60</sub>PVY<sub>63</sub>) und das YxxL-Motiv und bilden ein NPxYxxL-Motiv, in dem der phosphorylierbare Tyrosin-Rest geteilt wird. Neben den Tyrosin-Phosphorylierungsstellen der NPxY-Motive weist die intrazelluläre Domäne von LRP1 verschiedene Threonin- und Serin-Phosphorylierungsstellen auf (Abb. 1). Der Phosphorylierungsstatus der intrazellulären Domäne von LRP1, der in Abhängigkeit des jeweiligen gebundenen Liganden beeinflusst wird (Boucher et al. 2002), bestimmt nun die Interaktion mit spezifischen Gerüst- und Adapterproteinen und gewährleistet somit die Multifunktionalität von LRP1 als Endozytose-

oder Signaltransduktionsrezeptor (Barnes, Ackermann und van der Geer 2003, Betts, van der Geer und Komives 2008, Boucher und Gotthardt 2004, Loukinova et al. 2002, Ranganathan et al. 2004, Trommsdorff et al. 1998, Zhang et al. 2008).

### **1.1.3 Reifung und Sortierung von LRP1**

Nach der Synthese von LRP1 als 600 kDa glykosyliertes Vorläuferprotein interagiert LRP1 im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) mit dem dort residenten, löslichen RAP (Herz et al. 1991), wobei an der Bindung von RAP an LRP1 zwei Lysine an den Position 256 und 270 der RAP-D3-Domäne beteiligt sind (Migliorini et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Calcium-Ionen, als auch die intramolekularen Disulfidbrücken zu der richtigen Faltung von LRP1 beitragen. Als Chaperon ist RAP nun zum einen in der Bildung der in 1.1.2 beschriebenen intramolekularen Disulfidbrücken beteiligt (Bu und Rennke 1996, Obermoeller et al. 1998). Zum anderen verhindert RAP die Interaktion von LRP1 mit seinen Liganden, die ebenfalls in das ER translatiert werden (Willnow et al. 1995 und 1996\_2), und folglich die Bildung von großen unlöslichen LRP1/ Ligand-Komplexen, die die Funktion des ER beeinflussen könnten, was sowohl eine reduzierte Biosynthese als auch eine verringerte Sekretion von Proteinen bedeuten würde (Herz 2006). LRP1 wird nun im Komplex mit RAP vom ER zum Golgi-Apparat transportiert, wo RAP infolge des niedrigeren pH im Golgi-Apparat von LRP1 dissoziiert (Willnow et al. 1996\_2, Bu et al. 1995) und aufgrund des HNEL-Signals im C-Terminus von RAP zurück zum ER transportiert wird (Abb. 2) (Bu et al. 1995). Die Dissoziation soll dabei unter anderem auf eine Protonierung von Histidin-Resten in der D3-Domäne von RAP unter sauren Bedingungen zurückzuführen sein (Fisher, Beglova und Blacklow 2006, Lee et al. 2006, Obermoeller et al. 1997). Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine Inaktivierung des proximalen NPxY-Motivs (NPxY1) die Reifung von LRP1 beeinflusst und zu einem proteasomalen Abbau des „unreifen“ LRP1 führt, so dass LRP1 letztendlich in wesentlich geringeren Mengen die Zelloberfläche erreicht. Dieses Motiv könnte demnach zum einen für einen schnellen Transport von LRP1 aus dem ER zum Golgi-Apparat und zum anderen folglich zu einer schnellen Reifung von LRP1 im Golgi-Apparat beitragen (Reekmans et al. 2010).

Etwa vier Stunden nach der Biosynthese von LRP1 sind die N-gebundenen Kohlenhydrate in die reife Endoglycosidase H-resistente, Neuraminidase-sensitive Form umgewandelt. Zur

gleichen Zeit wird LRP1 im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) an einer RHRR-Sequenz durch Furin posttranslational proteolytisch gespalten. LRP1 besteht nun aus einer 515 kDa  $\alpha$ -Kette, die die extrazellulären Ligandenbindungscluster aufweist, und einer nicht-kovalent assoziierten 85 kDa  $\beta$ -Kette, die aus einem kleinen extrazellulären Teil, der Transmembrandomäne und der intrazellulären Domäne besteht (Abb. 1) (Herz et al. 1990, Ko et al. 1998, Reekmans et al. 2010, Willnow et al. 1996\_1). Das „reife“ LRP1 kann nun zur Ausübung einer seiner Funktionen an die Zellmembran transportiert werden, dabei wird LRP1 in polarisierten Zellen basolateral sortiert (Donoso et al. 2009, Marzolo et al. 2003).

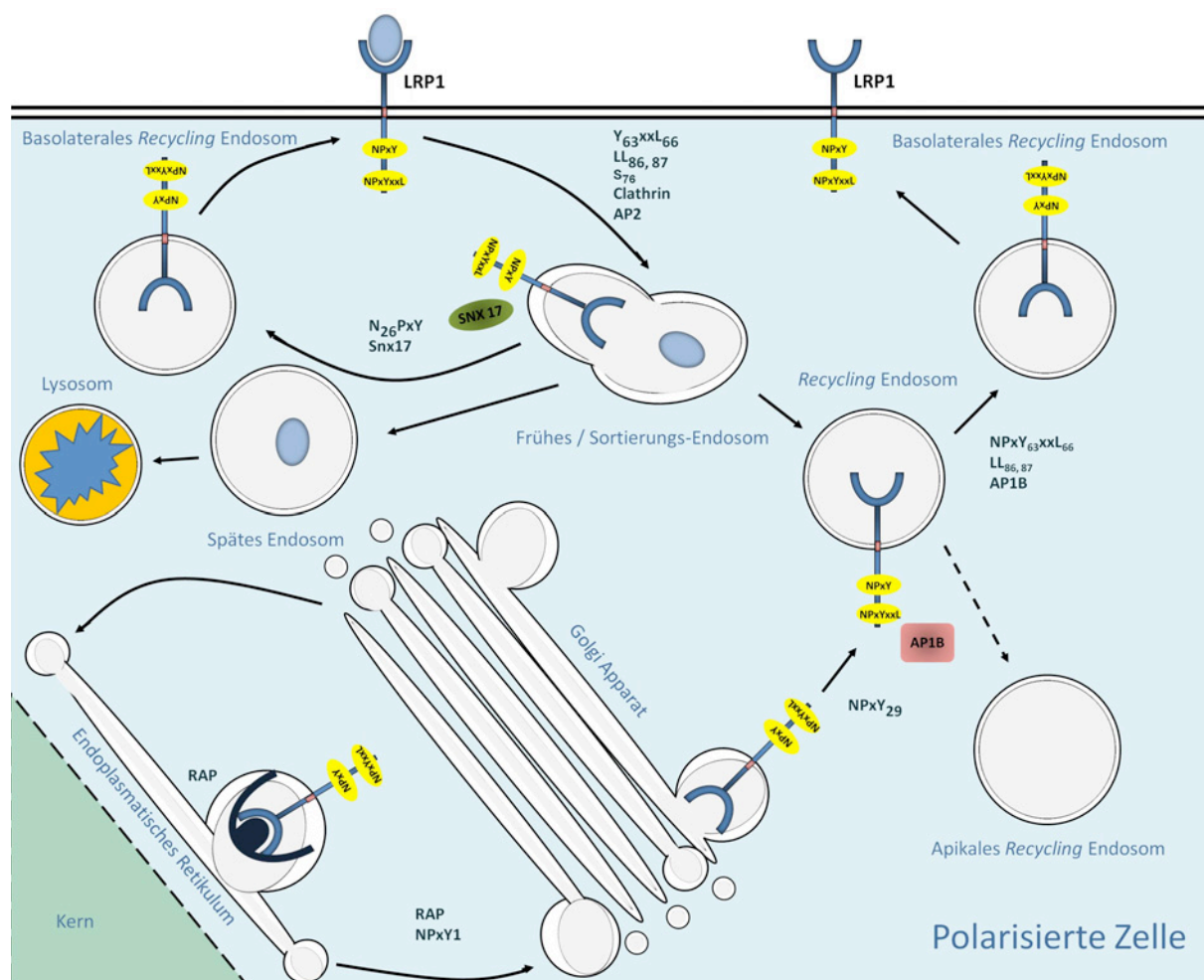


Abbildung 2: **Reifung und intrazellulärer Transport von LRP1 in polarisierten Zellen.** Dargestellt sind sowohl die Sortierungssignale der intrazellulären Domäne von LRP1 als auch bekannte Adapterproteine, die den weiteren LRP1-Transport an den biosynthetischen und endosomalen Kompartimenten beeinflussen.

Die Sortierung von Proteinen nach der Biosynthese an die apikale oder basolaterale Membran erfolgt ebenfalls am TGN (Fuller et al. 1985, Griffiths und Simons 1986, Rindler et al. 1984). Dabei können Membranproteine, die endozytisch aktiv sind, zusätzlich über ein

*Recycling*-Endosom sortiert werden (Matter und Mellmann 1994, Mostov und Cardone 1995, Odorizzi und Towbridge 1997). Dieser Transportweg konnte bisher allerdings besser für basolaterale Membranproteine dokumentiert werden. LRP1 sowie auch beispielsweise der Transferrinrezeptor (TfR) werden über eine solches „endosomales Zwischenkompartiment“ an die basolaterale Membran sortiert, der LDL-Rezeptor dagegen nicht, was zeigt, dass das *Recycling*-Endosom beim Transport mancher Membranproteine nach der Biosynthese eine obligatorische Station ist (Ang et al. 2004, Cancino et al. 2007, Donoso et al. 2009, Gravotta et al. 2007, Lock und Stow 2005, Marzolo et al. 2003). Während in apikalen Membranproteinen die Sortierungssignale sowohl in der extrazellulären oder Transmembran- als auch zytosolischen Domäne lokalisiert sind (Marzolo et al. 2003, Rodriguez-Boulan und Gonzalez 1999), enthalten basolaterale Membranproteine die Sortierungssignale ausschließlich in ihren zytoplasmatischen Domänen und sind häufig Tyrosin-enhaltende Motive wie NPxY und Yxx $\phi$  oder Di-hydrophobe Motive wie LL oder IL (IL = Isoleucin und Leucin) (Aroeti und Mostov 1994, Casanova, Apodaca und Mostov 1991, Deora et al. 2004, Le Gall et al. 1997, Odorizzi und Towbridge 1997). Zusätzlich enthalten viele basolaterale Membranproteine unterdrückte apikale Sortierungssignale, die in Erscheinung treten, sobald die basolateralen deletiert werden (Rodriguez-Boulan, Kreitzer und Musch 2005).

Mutagenesestudien mit LRP1-Minirezeptoren zeigen nun, dass die Tyrosine Y<sub>29</sub> und Y<sub>63</sub> der intrazellulären Domäne von LRP1 eine essentielle Bedeutung bei der Sortierung von LRP1 vom TGN zur basolateralen Membran in polarisierten Epithelzellen haben (Marzolo et al. 2003, Donoso et al. 2009). Dabei soll LRP1 zunächst via Interaktion des proximalen NPxY-Motivs mit einem unbekannten Adapterprotein am TGN in basolaterale Vesikel sortiert und in diesen das *Recycling*-Endosom erreichen (Abb. 2), da ein Austausch von Tyrosin gegen Alanin an Position 29 (Y<sub>29</sub>A) in einem direkten Transport zur apikalen Membran resultierte (Marzolo et al. 2003, Donoso et al. 2009). In dem *Recycling*-Endosom soll LRP1 nun vermittelt über das Tyrosin an Position 63 (Y<sub>63</sub>) des Yxx $\phi$ -Motivs und über das Dileucin-Motiv LL<sub>88, 87</sub> die apikale Transzytose umgehen und an die basolaterale Membran transportiert bzw. *recycelt* werden (Abb. 2), da eine Mutation dieser Motive eine nicht-polarisierte Verteilung von LRP1 zur Folge hatte (Marzolo et al. 2003, Donoso et al. 2009). Dabei soll das Adapterprotein AP1B (*adaptor protein* 1B) via Interaktion mit dem Yxx $\phi$ -Motiv an der

Sortierung vom *Recycling*-Endosom an die basolaterale Membran partizipieren (Marzolo et al. 2003, Donoso et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass Insulin zu einer Translokation von LRP1 an die Zellmembran führt (Laatsch et al. 2009). Andere Daten zeigen weiterhin, dass LRP1 in primären Hepatozyten von ApoE-Knockout ( $\text{ApoE}^{-/-}$ ), LRP1-N2-Knock-in ( $\text{LRP1}^{\text{N2/N2}}$ ) Mäusen in Anwesenheit von Insulin hauptsächlich eine juxtanukleäre Verteilung aufweist. Die Deletion des distalen NPxY-Motivs in LRP1 führt folglich dazu, dass eine Translokation von LRP1 an die Plasmamembran durch Insulin nicht mehr effizient induziert werden kann. Zusätzlich zeigt eine zelluläre Fraktionierung von MEF (*mouse embryonic fibroblasts*), die LRP1-N2 exprimieren, dass LRP1 aufgrund der Deletion des distalen NPxY-Motivs im Gegensatz zum LRP1-Wildtyp weniger in endosomalen Fraktionen, dafür aber mehr in den Fraktionen des Golgi-Apparates oder des *Recycling*-Kompartiments lokalisiert ist (Gordts et al., unveröffentlichte Daten). Das distale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 könnte demnach ebenfalls eine wichtige Rolle bei der richtigen Sortierung des Rezeptors an die Plasmamembran am *Recycling*-Endosom einnehmen (Abb. 2).

#### 1.1.4 Endozytose und *Recycling* von LRP1

LRP1 ist wie die meisten Mitglieder der LDL-Rezeptor Familie in einem Prozess involviert, der als Rezeptor-vermittelte Endozytose bezeichnet wird. Dabei werden nach der Bindung von Liganden an ihren Rezeptor, die Ligand-Rezeptor-Komplexe via des AP2 (*adaptor protein 2*), das sowohl die Rezeptoren als auch Clathrin rekrutiert, in einem Bereich der Plasmamembran in Clathrin-umhüllten Vertiefungen (*clathrin coated pits*) konzentriert. Sobald sich die Clathrin-umhüllten Vesikel mit der Hilfe der GTPase Dynamin von der Plasmamembran abgeschnürt haben, verlieren sie ihre Clathrin-Hülle und fusionieren mit azidischen Endosomen. Im sauren Milieu der Endosomen dissoziieren die meisten Liganden von ihrem Rezeptor und können dem lysosomalen Abbau zugeführt werden, während der Rezeptor *recycelt* wird und an die Zelloberfläche zurückkehrt (Abb. 2). Interessanterweise konnte zudem gezeigt werden, dass auch bestimmte Komponenten von Liganden *recycelt* werden können. Beispielsweise zeigt sich bei der LRP1-vermittelten Aufnahme von ApoE-enthaltenden Triglycerid-reichen Lipoproteinen wie Chylomikronen-Remnants, die aufgrund der Lipolyse mit der Lipoprotein-Lipase (LpL) assoziiert sind, dass sowohl ApoE als auch die LpL *recycelt* werden (Heeren et al. 2001).

Die endozytische Sortieremaschinerie teilt mit der basolateralen einige gemeinsame Elemente wie das NPxY-Motiv, das Yxx $\phi$ -Motiv oder das Dileucin-Motiv (Hunziker und Fumey 1994, Matter und Mellman 1994, Matter, Yamamoto und Mellman 1994, Rodriguez-Boulan, Kreitze und Musch 2005), was eine Kooperation zwischen dem TGN und den endosomalen Kompartimenten in der polarisierten Sortierung von Proteinen impliziert (Rodriguez-Boulan, Kreitze und Musch 2005). Während beim LDL-Rezeptor das FxNPxY-Motiv ein essentielles Internalisierungssignal für die Clathrin-vermittelte Endozytose ist (Chen, Goldstein und Brown 1990, He et al. 2002, Maurer und Cooper 2006, Mishra et al. 2005, Mishra, Watkins und Traub 2002), soll bei LRP1 das Yxx $\phi$ -Motiv eine zentrale Rolle bei der Endozytose einnehmen (Abb. 2) (Li et al. 2000). Kürzlich konnte zusätzlich gezeigt werden, dass sowohl AP2 als auch Clathrin nur an das nicht-phosphorylierte Yxx $\phi$ -Motiv binden (Guttman et al. 2009). Zusätzlich soll das distale Dileucin-Motiv LL<sub>86, 87</sub> und eine PKA-vermittelte Phosphorylierung des Serins an Position 76 die Endozytose beeinflussen (Abb. 2) (Li et al. 2000, Li et al. 2001\_1). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass LRP1 im Gegensatz zum LDL-Rezeptor und VLDL-Rezeptor eine wesentlich höhere Internalisierungsrate aufweist (Li et al. 2001\_2).

Nach der Internalisierung kann LRP1 nun zum einen über das Asparagin an Position 26 (N<sub>26</sub>A) des proximalen NPxY-Motivs via Interaktion mit dem Adapterprotein SNX17 (*Sorting Nexin* 17) schnell basolateral *recycled* werden (Abb. 2) (van Kerkhof et al. 2005, Marzolo et al. 2003) oder über das *Recycling*-Endosom erneut basolateral sortiert werden sowie apikal transzytiert werden (Abb. 2, vgl. 1.1.3) (Donoso et al. 2009, Marzolo et al. 2003). SNX17 gehört zu einer Proteinfamilie, die in Sortierungsprozesse involviert ist (Worby und Dixon 2002), und interagiert mit der intrazellulären Domäne vieler Mitglieder der LDL-Rezeptor-Familie wie auch mit dem LDL-Rezeptor (Stockinger et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass das NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne des LDL-Rezeptors nicht nur ein Internalisierungsmotiv ist, sondern auch am TGN und an den *Recycling*-Endosomen als ein Sortierungssignal fungiert (Matter et al. 1993).

### 1.1.5 Physiologische Bedeutung von LRP1

Das multifunktionelle LRP1 interagiert mit einer großen Anzahl nicht-verwandter Liganden und wird ubiquitär exprimiert, was dessen Beteiligung in vielen (patho-)physiologischen

Prozessen impliziert (*Review: Lillis et al. 2008*). Im Folgenden wird zum einen die Funktion von LRP1 als Endozytoserezeptor als Beispiel in der Leber beschrieben und zum anderen einige Funktionen von LRP1 in Signaltransduktionprozessen.

#### **1.1.5.1 LRP1 als endozytierender Rezeptor**

LRP1 wird in der Leber, d.h. in den Hepatozyten sowie auch in den dort residenten Makrophagen (Kupffer Zellen) verstärkt exprimiert und spielt dort als endozytisch aktiver Rezeptor eine essentielle Rolle in der Aufnahme von Plasmaproteinen wie Proteinase-Inhibitor-Komplexe, aktivierte Gerinnungsfaktoren oder ApoE-enhaltende Lipoproteine wie Chylomikronen-Remnants (*Review: Lillis et al. 2008*).

Chylomikronen (CM) sind Lipoproteine, die Triglyceride vom Darm zu den Geweben transportieren. Dazu werden im Darm Nahrungslipide, Cholesterin und fettlösliche Vitamine in die CM verpackt und werden nun in die Lymphbahnen absorbiert, wo sie über den Ductus Thoracicus in den Blutkreislauf gelangen. In den peripheren Blutgefäßen, vor allem im Muskel- und Fettgewebe, hydrolysiert die von den Endothelzellen exprimierte LpL auf der Zelloberfläche den überwiegenden Teil der Triglyceride. Die freien Fettsäuren und die fettlöslichen Vitamine werden von dem Gewebe aufgenommen, dabei entstehen Chylomikronen-Remnants (CR). In diesen CR sind nun Cholesterinester angereichert, unter anderem enthalten sie das Apolipoprotein B48 (ApoB48), das im Dünndarm exprimiert und eine Komponente der CM ist, ApoE, das durch HDL übertragen wurde, und die LpL, die während der Hydrolyse auf die CR übertragen wird. Nach der ApoE-abhängigen Aufnahme der CR in die Leber, kann die Leber überschüssige Lipide als VLDL, die Triglyceride, Phospholipide und Cholesterin zu anderen Geweben transportieren, in das Blut sezernieren. VLDL sind wie CM ein Substrat der LpL. Die entstehenden VLDL-Remnants, die zum einen ApoB100 enthalten, das in der Leber exprimiert wird, und zum anderen ebenfalls wie die CR durch HDL übertragenes ApoE aufweisen, können nun von der Leber aufgenommen werden oder zu LDL hydrolysiert werden (Beisiegel 1998, Cooper 1997, Lillis et al. 2008, Stein und Stein 2003). Der LDL-Rezeptor spielt im Lipoproteinstoffwechsel eine essentielle Rolle in der Aufnahme von Lipoproteinen, die ApoE enthalten wie CR oder ApoB100 enthalten wie das Cholesterin-reiche LDL (Goldstein et al. 1985, Mahley und Innerarity 1983).

Wie bereits erwähnt, stand jedoch schon vor der Entdeckung von LRP1 fest, dass der LDL-Rezeptor nicht der einzige Rezeptor ist, der an der Aufnahme ApoE-enthaltender Lipoproteine in die Leber involviert ist, da ein Defekt des LDL-Rezeptors zwar eine erhöhte Plasmakonzentration ApoB100-enthaltender Lipoproteine zur Folge hat, aber zu keiner Veränderung in den Plasmaspiegeln ApoE-enthaltender Lipoproteine führt (Brown und Goldstein 1983, Kita et al. 1982, Rubinsztein et al. 1990). Die Vermutung, dass LRP1 in den postprandialen Lipoproteinstoffwechsel involviert ist, kam zu einem durch die Beobachtung auf, dass CR durch ApoE vermittelt in die Leber aufgenommen werden (Mahley et al. 1989), und zum anderen, dass LRP1 mit ApoE interagiert (Beisiegel et al. 1989). Weitere *in vitro* Experimente zeigten, dass LRP1 sowohl mit der LpL als auch mit der hepatischen Lipase (HL) interagiert und dass die Interaktion die Aufnahme ApoE-enthaltender Lipoproteine wie CR und  $\beta$ -VLDL fördert (Beisiegel, Weber, Bengtsson-Olivecrona 1991, Krapp et al. 1996, Nykjaer et al. 1993). Erste *in vivo* Daten zeigten, dass eine adenovirale Überexpression von RAP in LDL-Rezeptor *Knock-out* Mäusen ( $LDLR^{-/-}$ ) zu einem zehnfach erhöhten Cholesterin- und Triglyceridspiegel im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen führt, die nur RAP überexprimieren (Willnow et al. 1994). Zusätzlich konnten mit RAP *Knock-out* Mäusen konsistente Daten geliefert werden (Willnow et al. 1995). Diese Beobachtungen bestätigten zunächst indirekt, dass LRP1 der RAP-sensitive Rezeptor sein könnte, der die Aufnahme ApoE-enthaltender Lipoproteine vermittelt. Letztendlich konnte eine Beteiligung von LRP1 im postprandialen Lipoproteinstoffwechsel in semi-konditionalen Doppel-*Knock-out* Mäusen bestätigt werden, die LDL-Rezeptor-defizient sind und zusätzlich einen hepatischen *Knock-out* von LRP1 aufweisen (Rohlmann et al. 1998). Diese Mäuse weisen im Gegensatz zu Mäusen, die nur einen hepatischen *Knock-out* von LRP1 aufweisen, einen zweifach höheren Cholesterin- und Triglyceridspiegel auf. Interessanterweise zeigen jedoch die Mäuse, die nur einen hepatischen *Knock-out* von LRP1 aufweisen, eine zweifach höhere LDL-Rezeptor-Expression, was eine kompensatorische Hochregulation des LDL-Rezeptors impliziert und folglich auch eine Beteiligung von LRP1 im Lipoproteinstoffwechsel zeigt. In weiteren *in vivo* Experimenten konnte bestätigt werden, dass LRP1 nur die Aufnahme von postprandialen ApoB48-enthaltenden Lipoproteinen vermitteln kann, nicht aber von ApoB100-enthaltenden Lipoproteinen (Véniant et al. 1998). LRP1 ist folglich wie der LDL-Rezeptor an der Aufnahme ApoE-enthaltender Lipoproteine beteiligt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch



Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) die Aufnahme Triglycerid-reicher Lipoproteine vermitteln (MacArthur et al. 2007, Mahley und Huang 2007). Eine Deletion von LRP1 in der Leber führt zu einer erhöhten Plasmakonzentration vieler Moleküle, die mit der Entwicklung von Atherosklerose assoziiert sind (Espirito Santo et al. 2004), was die essentielle Bedeutung von LRP1 als endozytierender Rezeptor in der Leber zeigt.

#### 1.1.5.2 LRP1 als Signaltransduktionsrezeptor

LRP1 zeigt neben seiner Funktion als Endozytoserezeptor eine Beteiligung in vielen Signaltransduktionsprozessen in verschiedenen Geweben und Organen. Erste Hinweise auf die Multifunktionalität von LRP1 wurden dabei durch die Identifizierung zahlreicher zytoplasmatischer Interaktionspartner der intrazellulären Domäne von LRP1 geliefert, die nicht in den Endozytoseprozess involviert sind (Gotthardt et al. 2000).

Beispielsweise moduliert LRP1 den PDGF (*platelet derived growth factor*)-Signalweg (Boucher et al. 2003, Muratoglu et al. 2010). PDGF ist ein wichtiger Regulator der Zellmigration und Proliferation (Andrae, Gallini und Betsholtz 2008) und induziert die Bildung eines Signalkomplexes zwischen dem PDGF-Rezeptor- $\beta$  (PDGFR $\beta$ ) und LRP1 (Boucher et al. 2003, Newton et al. 2005, Muratoglu et al. 2010), der zu einer Tyrosin-Phosphorylierung der NPxY-Motive der intrazellulären Domäne von LRP1 führt (Boucher et al. 2002, Loukinova et al. 2002). Das Adapterprotein Shc (*Src homology 2 domain containing*) *transforming protein 1*) bindet nun an das phosphorylierte distale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 (Loukinova et al. 2002), was zu einer Aktivierung des MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*)-Signalwegs und in der Folge zur Proliferation der Zelle führt (Muratoglu et al. 2010). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass LRP1 mit dem PDGF-Rezeptor in endosomalen Kompartimenten interagiert und dort dessen Funktion moduliert (Muratoglu et al. 2010). Eine Deletion des LRP1-Gens führt in glatten Muskelzellen der Blutgefäßwand zu einer Überexpression des PDGF-Rezeptors, was in einer gesteigerten Proliferation dieser Zellen resultiert und in der Folge mit der Entwicklung von Atherosklerose assoziiert ist (Boucher et al. 2003). Es gibt verschiedene Hypothesen, wie LRP1 den PDGF-Signalweg moduliert. Dabei könnte auch die Bindung anderer Liganden wie ApoE oder  $\alpha_2$ M eine Rolle spielen, die die Phosphorylierung der intrazellulären Domäne von LRP1 verhindern (Boucher et al. 2002).

In Neuronen spielt LRP1 als Korezeptor in der Prozessierung von APP (*amyloid precursor protein*) zu A $\beta$  (*amyloid- $\beta$* ), das mit der Entwicklung der Alzheimer-Erkrankung assoziiert ist, eine essentielle Rolle (Kounnas et al. 1995, Knauer, Orlando und Glabe 1996, Pietrzik et al. 2002, Ulery et al. 2000). Das Adapterprotein FE65 interagiert dazu sowohl mit dem distalen NPxY-Motiv von LRP1 als auch mit dem NPxY-Motiv von APP und bildet eine Brücke zwischen beiden Rezeptoren (Pietrzik et al. 2004). Wie LRP1 die Produktion von A $\beta$  erhöht, ist nicht genau bekannt. Jedoch wird vermutet, dass LRP1 den intrazellulären Transport von APP beeinflusst und dass nach Internalisierung des trimeren Komplexes in den Endosomen die Proteolyse von APP stattfindet und A $\beta$  schließlich sezerniert wird (Kounnas et al. 1995, Knauer, Orlando und Glabe 1996, Pietrzik et al. 2002, Ulery et al. 2000). Die durch LRP1 beeinflusste Generierung von A $\beta$  kann unterschiedlich moduliert werden. Zum einen kann die intrazelluläre Domäne von APP, welche durch die proteolytische Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase freigesetzt wird, mit FE65 und der Histonacetyltransferase Tip60 einen Komplex bilden (Cao und Sudhof 2001) und die Genexpression von LRP1 unterdrücken (Liu et al. 2007). Zum anderen soll LRP1 auch direkt die Aufnahme von A $\beta$  vermitteln können (Deane et al. 2004). Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt, dass das Adapterprotein Dab1 (*Disabled 1*) mit Fe65 um die Bindung an APP konkurriert. Die Interaktion von Dab1 und APP soll dabei die Bildung des APP/LRP1-Komplexes verhindern, was eine verringerte APP-Prozessierung zur Folge hat (Kwon et al. 2010).

LRP1 ist beispielsweise auch in Entzündungsprozesse involviert. Es konnte gezeigt werden, dass LPS (*lipopolysaccharide*) die proteolytische Prozessierung der intrazellulären Domäne von LRP1 durch die  $\gamma$ -Sekretase induziert. Die intrazelluläre Domäne von LRP1 wird nun in der Folge von der Plasmamembran in den Kern transloziert und unterdrückt dort die Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen (May, Reddy und Herz 2002, Zurhove et al. 2008).

## **1.2 Adapterproteine**

### **1.2.1 Die PTB (*phosphotyrosine binding*)-Domäne**

Adapterproteine spielen eine essentielle Rolle in der Regulation der Funktion von Lipoproteinrezeptoren. Da diese Rezeptoren in ihren intrazellulären Domänen Tyrosin-

enthaltende Motive wie das NPxY- oder Yxx $\Phi$ -Motiv aufweisen, spielen zum einen Adapterproteine mit einer SH2- (*src-homology 2*) Domäne eine Rolle, die Phosphotyrosine im Zusammenhang mit den Aminosäuren binden, die sich carboxyterminal des Phosphotyrosins befinden (van der Geer und Pawson 1995), zum anderen Adapterproteine mit einer PTB (phosphotyrosine binding)-Domäne. PTB-Adapterproteine partizipieren an vielen physiologischen Prozessen wie neuronale Entwicklung, Immunantworten und Zellwachstum und sind in Krankheiten wie Hypercholesterinämie, Diabetes und Alzheimer involviert. PTB-Domänen binden mit hoher Affinität an Peptide, die ein NPxY-Motiv aufweisen. Aufgrund von strukturellen Unterschieden der PTB-Domäne benötigen manche PTB-Domänen für eine affine Bindung an ihren Peptidliganden zusätzlich eine Phosphorylierung des Tyrosins des NPxY-Motivs. PTB-Domänen werden daher in Phosphotyrosin-abhängige Adapterproteine, zu denen die sich in ihrer Größe unterscheidenden Shc- und IRS (*insulin receptor substrate*)-ähnlichen PTB-Domänen gehören, und in Phosphotyrosin-unabhängige Adapterproteine eingeteilt, zu denen die Dab-ähnlichen PTB-Domänen zählen. Zusätzlich weisen PTB-Domänen, neben den Proteinbindungsstellen, Interaktionsstellen für Kopfgruppen von sauren Phospholipiden auf, was ihre Membran-nahe Lokalisation und ihre Interaktion mit vielen Transmembranproteinen erklärt (Review: Uhlik et al. 2005). Die 3D-Struktur der PTB-Domäne von Shc zeigte (Zhou et al. 1995), dass die Konformation der PTB-Domäne Ähnlichkeit mit der PH (*pleckstrin homology*)-Domäne aufweist, die mit Phosphatidylinositolen interagiert, wobei die beiden Domänen bezüglich der primären Aminosäuresequenz eher wenig konserviert sind. Dabei teilen alle PTB-Domänen diese PH-Domäne-Grundfaltungsstruktur, bei der sieben antiparallele  $\beta$ -Stränge zwei orthogonale  $\beta$ -Faltblätter bilden, die carboxyterminal durch eine  $\alpha$ -Helix bedeckt sind. Alle PTB-Domänen weisen als Interaktionsstellen eine „Peptidbindungstasche“, die durch den  $\beta$ 5-Strang und die carboxyterminale  $\alpha$ -Helix gebildet wird, und eine aminoterminal basische Phospholipid-Bindungsdomäne auf. Obwohl alle PTB-Domänen gemeinsame Elemente aufweisen, gibt es dennoch signifikante strukturelle Unterschiede. Die PTB-Peptidliganden binden jedoch an die Peptidbindungsdomäne als ein antiparalleles Pseudo- $\beta$ -Faltblatt und treten dabei in Kontakt mit dem  $\beta$ 5-Strang und der  $\alpha$ -Helix, dabei bildet das Peptid selbst eine  $\beta$ -Schleife in Richtung seines distalen Endes. An der Peptidbindung der Phosphotyrosin-abhängigen PTB-

Domänen sind basische Aminosäuren wie Arginin und Lysin involviert, während die Peptidbindung der Phosphotyrosin-unabhängigen PTB-Domänen eher über hydrophobe Bindungen und Wasserstoffbrückenbindungen stattfindet (*Review*: Uhlik et al. 2005).

### 1.2.2 Regulation der Funktion von Lipoproteinrezeptoren durch PTB-Adapterproteine

Die Mitglieder der LDL-Rezeptor Familie sind in viele physiologische Prozesse wie Lipid- und Vitamin-Homöostase, zelluläre Migration und neuronale Entwicklung involviert. Lipoproteinrezeptoren bewältigen diese Funktionen, indem sie entweder als endozytierende Rezeptoren fungieren oder als Signaltransduktionsrezeptoren intrazelluläre Signalkaskaden induzieren. Dabei spielt das NPxY-Motiv, das in den intrazellulären Domänen aller Lipoproteinrezeptoren enthalten ist, eine essentielle Rolle, da es die Interaktion mit verschiedenen PTB-Adapterproteinen erlaubt. Die PTB-Adapterproteine koppeln die Rezeptoren entweder an die intrazelluläre Endozytosemaschinerie und regulieren somit den intrazellulären Transport oder helfen beim Aufbau von Signalkomplexen (*Review*: Stolt und Bock 2006).

Beispielsweise vermittelt der LDL-Rezeptor als klassischer endozytierender Rezeptor die Aufnahme von LDL. Eine fehlende Funktionsfähigkeit des LDL-Rezeptors führt zu einem stark erhöhten Plasmacholesterinspiegel und liegt der Erkrankung der familiären Hypercholesterinämie zugrunde (Brown und Goldstein 1977 und 1983). Das PTB-Adapterprotein ARH (*autosomal recessiv hypercholesterolemia*), das auch als LDLRAP1 (*LDL receptor adaptor protein 1*) bezeichnet wird, interagiert mit dem nicht-phosphorylierten NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne des LDL-Rezeptors und reguliert in Hepatozyten und Lymphozyten die Clathrin-vermittelte Endozytose des LDL-Rezeptors (Mishra, Watkins und Traub 2002, Jones et al. 2003). Mutationen im ARH Gen verursachen die Erkrankung der autosomal rezessiven Hypercholesterinämie, nach der das LDLRAP1 benannt wurde, was zeigt, dass diese PTB-Adapterproteine auch in pathophysiologische Prozesse involviert sind. In Fibroblasten koppelt dagegen das PTB-Adapterprotein Dab2 den LDL-Rezeptor an die intrazelluläre Endozytosemaschinerie (Maurer und Cooper 2006). Diese Beispiele zeigen zusätzlich, dass die Funktion der Rezeptoren durch Gewebe-spezifische Expression der PTB-Adapterproteine gewährleistet wird. Die PTB-Adapterproteine sind jedoch häufig nicht spezifisch für einen Rezeptor, da sowohl ARH als auch Dab2 mit weiteren Mitgliedern der

LDL-Rezeptor Familie wie LRP1 interagieren (Nagai et al. 2003, Stolt und Bock 2006, Uhlik et al. 2005, Zhang et al. 2008).

Das PTB-Adapterprotein Dab1, das ebenfalls an viele Mitglieder der LDL-Rezeptor Familie wie LDLR, LRP1 (Trommsdorff et al. 1998), Megalin, VLDLR und ApoER2 (Gotthardt et al. 2000, Oleinikov, Zhao und Makker 2000) bindet, hat beispielsweise in der neuronalen Entwicklung eine essentielle Bedeutung und ist dort in Signaltransduktionsprozesse involviert. Dab1 interagiert mit dem nicht-phosphorylierten NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne des VLDL-Rezeptors oder des ApoE-Rezeptors 2. Eine Bindung des sezernierten Glykoproteins Reelin an den VLDL-Rezeptor oder den ApoE-Rezeptor 2 induziert eine Tyrosin-Phosphorylierung von Dab1, was in der Folge zum Aufbau eines Signalkomplexes führt und somit zu einer Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade, die das Migrationsverhalten von Nervenzellen während der Gehirnentwicklung beeinflussen (D'Arcangelo et al. 1999, Hiesberger et al. 1999, Howell et al. 1997, Sheldon et al. 1997, Stolt und Bock 2006).

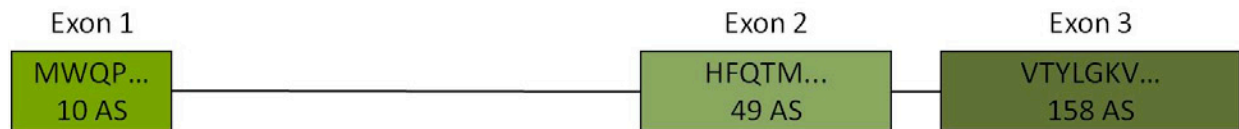
Es gibt viele weitere Adapterproteine, die Phosphotyrosin-unabhängig mit den NPxY-Motiven der intrazellulären Domänen der Mitglieder der LDL-Rezeptor Familie interagieren wie JIP (*JNK- interacting protein*), CED-6, X11, CAPON und ICAP, während andere Phosphotyrosin-abhängig binden (*Review*: Uhlik et al. 2005). Es werden jedoch immer mehr Hinweise geliefert, dass die Funktionsweise jener Mitglieder der LDL-Rezeptor Familie, die multifunktionell sind, durch Phosphorylierung reguliert wird. Guttman et al. konnten 2009 zeigen, dass viele zytoplasmatische Proteine, die an die phosphorylierte intrazelluläre Domäne von LRP1 binden, in Signaltransduktionsprozesse involviert sind. Beispielsweise bindet das Adapterprotein Shc, wie in 1.1.5.2 beschrieben, an das phosphorylierte distale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 und involviert den Rezeptor in Signaltransduktionsprozesse. Zusätzlich scheinen die Adapterproteine durch Phosphorylierung reguliert zu werden. Ein Beispiel ist das Adapterprotein Dab1, das wie oben beschrieben im Tyrosin-phosphorylierten Zustand in Signaltransduktionsprozesse involviert ist. Wie in 1.1.5.2 beschrieben, konnten Kwon et al. 2010 zeigen, dass Dab1 mit Fe65 um die Bindung an LRP1 konkurriert. Interessanterweise konnten sie zusätzlich zeigen, dass Dab1 an LRP1, APP und Fe65 bindet und dabei nicht phosphoryliert ist. Die Regulation

durch Phosphorylierung scheint demnach eine Art „molekularer Schalter“ zu sein, der die Multifunktionalität von LRP1 gewährleisten könnte.

### 1.2.3 Das PTB-Adapterprotein PID1 (*phosphotyrosine interaction domain-containing 1*)

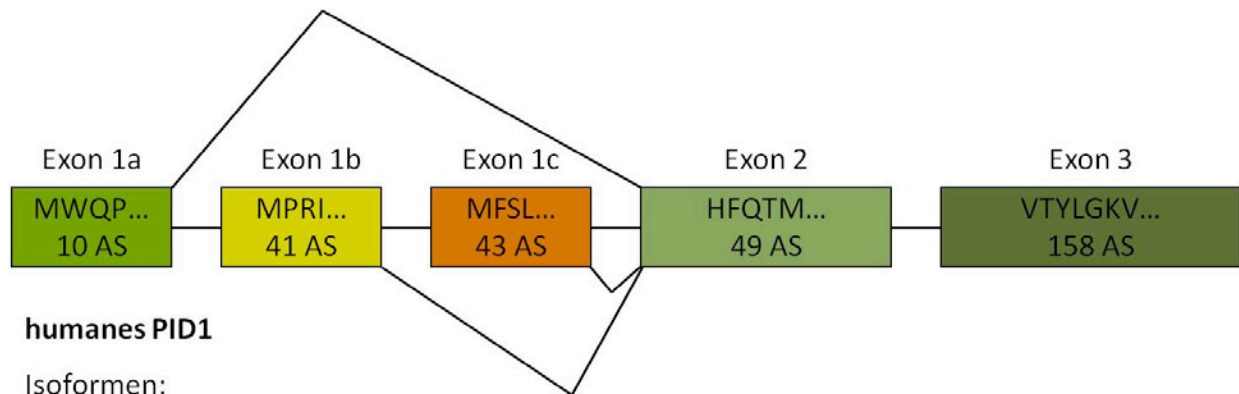
PID1 (*phosphotyrosine interaction domain-containing 1*) wurde 2007 in einem Screeningprojekt zur Identifikation von Bindungspartnern von PTB-Adapterproteinen als ein Interaktionspartner von LRP1 identifiziert (Caratù et al. 2007). Caratù et al. konnten zum einen die LRP1/PID1-Interaktion mittels eines GST (Glutathion-S-Transferase)-*Pull-downs* bestätigen, zum anderen fanden sie mittels Koimmunpräzipitation LRP1 und PID1 in einem trimeren Komplex mit Cubilin. Eine andere Bezeichnung für PID1 ist daher, neben NYGGF4, PCL11 (*PTB-containing, Cubilin and LRP1 interacting protein 1*). Die Datenbankrecherche ergab, dass das humane PID1 drei Isoformen MWQP, MPRI und MFSL aufweist, wobei die Isoformen nach den ersten Aminosäuren der Proteine benannt sind. Wie Abbildung 3 darstellt, weist das humane PID1 Gen, das sich auf dem Chromosom 2 (2q 36.3) befindet, drei Exons auf. Die Isoformen unterscheiden sich dabei nur im ersten Exon und weisen ein Molekulargewicht von ca. 25-30 kDa auf. Das murine PID1 Gen ist auf Chromosom 1 (1 C5; 1) lokalisiert, jedoch gibt es in der Maus nur die MWQP-Isoform (vgl. Abb. 3). Das murine PID1 und die humane PID1-Isoform MWQP sind allerdings sehr stark konserviert, was auf eine wichtige physiologische Bedeutung dieses Proteins hindeutet. Die PTB-Domäne von PID1 wird von dem Exon 3 codiert, weitere funktionelle Domänen konnten nicht gefunden werden. Interessanterweise ist der nächste Verwandte von PID1 das LDLRAP1 ARH. PID1 wird wie LRP1 verstärkt in der Leber und im Gehirn exprimiert (Weinås, Å. K., unveröffentlichte Daten).

Die physiologische Bedeutung der LRP1/PID1-Interaktion ist nicht bekannt, allerdings ist die Expression von PID1 wie auch die von LRP1 in Patienten, die an Alzheimer erkrankt sind, herunterreguliert, was darauf hindeutet, dass auch PID1 wie LRP1 an der Entwicklung von Alzheimer beteiligt sein könnte (Kajiwara et al. 2010).



**murines PID1** (*phosphotyrosine interaction domain containing 1*)

„MWQP“ : 1 + 2 + 3 (651 bp)



**humanes PID1**

Isoformen:

„MWQP“ : 1a + 2 + 3 (651 bp)

„MPRI“ : 1b + 2 + 3 (744 bp)

„MFSL“ : 1c + 2 + 3 (750 bp)

Abbildung 3: **Isoformen des humanen und murinen PID1.**

In der Literatur wird zusätzlich eine Funktion von PID1 in der Entwicklung von Insulin-Resistenz unabhängig von LRP1 beschrieben. Wang et al. fanden 2006, dass die humane PID1-Isoform MFSL im Fettgewebe von Übergewichtigen im Vergleich zu Normalgewichtigen verstärkt exprimiert wird. Außerdem konnte beobachtet werden, dass 3T3-L1-Präadipozyten nach Überexpression von PID1 stärker proliferieren, während die Adipozyten-Differenzierung unbeeinflusst schien. Aufgrund dieser Beobachtungen und des Vorhandenseins einer PTB-Domäne wurde eine Funktion von PID1 als Signalmolekül im Zellwachstum vermutet. Zur Analyse der Bedeutung von PID1 als Kandidatengen der Adipositas untersuchte die gleiche Gruppe den Glukose-Transport und fand, dass nach Überexpression von PID1 in 3T3-L1-Adipozyten und Skelettmyoblasten, zum einen die Insulin-induzierte Glukose-Aufnahme verringert ist, zum anderen, dass die Translokation des Glukose-Transporter GLUT4 (*glucose transporter type 4*) an die Plasmamembran in Anwesenheit von Insulin nicht mehr effizient induziert werden kann. Die Überexpression von PID1 in 3T3-L1-Adipozyten und Skelettmyoblasten führte zusätzlich zu einer verringerten

Insulin-induzierten Phosphorylierung von IRS-1 und von Akt, während die Phosphorylierung des Insulinrezeptors (IR) und von Komponenten des MAPK-Signalwegs wie ERK 1/ 2 (*extracellular-signal regulated kinase 1/ 2*), p38 und JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) unbeeinflusst blieb. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Hypothese aufgestellt, dass PID1 via seiner PTB-Domäne an den Tyrosin-phosphorylierten IR bindet und somit das PTB-Adapterprotein IRS-1 von dem IR verdrängt und in der Folge Akt nicht mehr Serin-phosphoryliert wird, was mit einem verringerten Glukose-Transport einhergeht (Zhang et al. 2009, Wu et al. 2011). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ein Knock-down von PID1 die Glukose-Aufnahme in 3T3-L1-Adipozyten erhöht (Zhang et al. 2010). Eine weitere Studie zeigte, dass PID1 während der Differenzierung von 3T3-L1-Adipozyten hochreguliert wird. Zusätzlich können freie Fettsäuren und TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ) die Expression von PID1 weiterhin hochregulieren, während IL-6 (*interleukin-6*), *Leptin* und *Resistin* einen inhibierenden Effekt auf die Expression von PID1 haben (Zhao et al. 2010\_2). Die letzten Studien dieser Gruppe vermuten, dass eine Funktionsstörung der Mitochondrien nach Überexpression von PID1 in 3T3-L1-Adipozyten für die Entwicklung der Insulin-Resistenz verantwortlich sein könnte (Zhao et al. 2010\_1, Zhang et al. 2010).

### 1.3 Zielsetzung

Die NPxY-Motive der intrazellulären Domäne von LRP1 vermitteln sowohl dessen intrazellulären Transport als auch dessen Beteiligung an Signaltransduktionsprozessen (Boucher et al. 2002, Donoso et al. 2009, Gordts et al., unveröffentlichte Daten, Loukinova et al. 2002, Marzolo et al. 2003, Reekmans et al. 2010, Stolt und Bock 2006). Diese Tyrosin-haltigen Motive sind in Abhängigkeit ihres Phosphorylierungsstatus Interaktionsstellen für unterschiedliche PTB-Adapterproteine (Guttman et al. 2009).

Das Adapterprotein PID1 wurde 2007 von Caratù et al. als Interaktionspartner von LRP1 identifiziert. Allerdings war bisher weder bekannt, mit welchen der beiden NPxY-Motive der intrazellulären Domäne von LRP1 das PTB-Adapterprotein PID1 interagiert, noch welchen Einfluss eine Tyrosin-Phosphorylierung der NPxY-Motive der intrazellulären Domäne von LRP1 auf die LRP1/PID1-Interaktion hat. Dabei sollte die Analyse der Interaktion Hinweise auf die Bedeutung von PID1 für das multifunktionale LRP1 liefern. Die LRP1/PID1-Interaktion sollte durch *Pull-down* Experimente und Immunpräzipitation *in vitro* und *in vivo* untersucht



werden. Zusätzlich sollte die Interaktion von PID1 mit dem LDL-Rezeptor untersucht, um Hinweise auf die Spezifität von PID1 und somit weitere Hinweise auf die physiologische Bedeutung von PID1 zu erhalten. Sowohl zur Analyse der LRP1/PID1-Interaktion *in vivo* als auch zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von PID1 sollte ein PID1-spezifischer Antikörper generiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte außerdem die physiologische Bedeutung der LRP1/PID1-Interaktion in Hepatozyten untersucht werden. LRP1 fungiert in der Leber als ein endozytierender Rezeptor und vermittelt wie der LDL-Rezeptor die Aufnahme von ApoE-enthaltenden Lipoproteinen. Daher sollte die Funktion von PID1 und als Kontrolle von ARH bei der Regulation des intrazellulären LRP1-Transports, d.h. die Sortierung, die Internalisierung und das *Recycling* des Rezeptors, analysiert werden. Das PTB-Adapterprotein ARH, das in Hepatozyten den LDL-Rezeptor mit der Endozytosemaschinerie verbindet, interagiert ebenfalls mit LRP1, jedoch vermittelt ARH hier vermutlich nicht direkt die Internalisierung von LRP1 (Jones et al. 2003), weshalb eine andere Funktion von ARH bei der Regulation des intrazellulären LRP1-Transports folglich nicht ausgeschlossen werden kann. Dabei sollte die Funktion von PID1 und ARH nach Herunterregulation der PTB-Adapterproteine mittels lentiviraler RNA-Interferenz in der humanen Hepatomazelllinie HUH7 untersucht werden und entsprechende Zellen generiert werden. In diesen Zelllinien sollte zunächst die zelluläre Lokalisation von LRP1 mittels verschiedener zellulärer Markerproteine in Immunfluoreszenzanalysen untersucht werden, um Hinweise auf einen Einfluss von PID1 und ARH auf die Regulation des intrazellulären LRP1-Transports zu erhalten.

Ein Funktionsverlust von LRP1 geht mit einer kompensatorischen Hochregulation des LDL-Rezeptors einher (Rohlmann et al. 1998). Die Abwesenheit des Adapterproteins PID1 könnte folglich ebenso mit einem Funktionsverlust von LRP1 assoziiert sein, daher sollte in den PID1- und ARH-defizienten HUH7-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen die Expression von LRP1 und des LDL-Rezeptors untersucht werden. Zusätzlich können die resultierenden Daten ein besseres Verständnis für einen möglichen Einfluss von PID1 auf die LRP1-vermittelte Endozytose liefern, der zuletzt untersucht werden sollte. Eine mögliche Funktion von PID1 in der LRP1-vermittelten Endozytose sollte dabei mittels radioaktiv-markierten Lipoproteinen

analysiert werden. Zusätzlich sollte auch ein Einfluss von PID1 auf das *Recycling* von LRP1 in einem Zelloberflächen-Fluoreszenz-*Quenching-Recycling*-Experiment mittels einer FACS-Analyse gemessen werden.

## 2. Material und Methoden

Dieses Kapitel beschreibt die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Methoden. Dazu werden zunächst verwendete spezielle Materialien aufgelistet.

### 2.1 Material

#### Antikörper

| Primäre Antikörper        |                                                                                           | Herkunft                | Artikelnr. | Verdünnung |            |         |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------|------------|------------|---------|
|                           |                                                                                           |                         |            | WB         | IP         | IF      |
| $\alpha$ -ApoE            | Ziege polyklonal Anti-Apolipoprotein E                                                    | Chemicon                | AB947      | 1:2.000    |            |         |
| $\alpha$ - $\beta$ -Aktin | Maus monoklonal Anti- $\beta$ -Aktin (AC-15)                                              | Sigma Aldrich           | A5441      | 1:50.000   |            |         |
| $\alpha$ -EEA1            | Kaninchen polyklonal Anti-EEA1                                                            | Abcam                   | ab2900     |            |            | 1:250   |
| $\alpha$ -FLAG            | Kaninchen polyklonal Anti-Flag                                                            | Sigma Aldrich           | F7425      | 1:300      |            |         |
| $\alpha$ -FLAG-M2         | Maus monoklonal Anti-Flag-M2                                                              | Sigma Aldrich           | F3165      |            |            | 1:100   |
| $\alpha$ -FLAG-M2-Agarose | Maus monoklonal <i>Ezview Red</i> Anti-Flag-M2<br><i>Affinity Gel</i>                     | Sigma Aldrich           | F2426      |            | 40 $\mu$ l |         |
| $\alpha$ -GM130           | Kaninchen monoklonal Anti-GM130 (EP892Y)                                                  | Abcam                   | ab52649    |            |            | 1:100   |
| $\alpha$ -H-LDLR          | Huhn polyklonal Anti-human-LDLR (nicht reduziert)                                         | Progen                  | 61049      | 1:250      |            |         |
| $\alpha$ -LDLR            | Kaninchen monoklonal Anti-LDLR (EP1553Y)                                                  | Epitomics               | # 1956-1   | 1:2.000    |            |         |
| $\alpha$ -M-LDLR          | Ziege polyklonal Anti-Maus-LDLR                                                           | R&D Systems             | AF2255     | 1:1.000    |            |         |
| $\alpha$ -LIMP-2          | Kaninchen polyklonal Anti-LIMP-2                                                          | Saftig, P., Kiel        |            |            |            | 1:1.000 |
| $\alpha$ -LRP1-Dolly      | Schaf polyklonal Anti-LRP1 (85 kDa $\alpha$ -Kette, IZD)                                  | Heeren, J., Hamburg     |            | 1:500      | 1:25       | 1:100   |
| $\alpha$ -LRP1-377        | Kaninchen polyklonal Anti-LRP1-377 (85 kDa $\alpha$ -Kette + 515 kDa $\beta$ -Kette)      | Herz, J., Dallas        |            | 1:1.000    |            |         |
| $\alpha$ -LRP1-5A6        | Maus monoklonal Anti-LRP1-5A6<br>(85 kDa $\alpha$ -Kette, extrazellulär, nicht reduziert) | Santa Cruz              | sc-57351   | 1:100      |            |         |
| $\alpha$ -LRP1-8G1        | Maus monoklonal Anti-LRP1-8G1 (515 kDa $\beta$ -Kette)                                    | Progen                  | 61065      |            |            | 1:50    |
| $\alpha$ -LRP1-11H4       | Maus monoklonal Anti-LRP1-11H4 (85 kDa $\alpha$ -Kette)                                   | Gordts, P., Leuven      |            | 1:1.000    |            |         |
| $\alpha$ -PDI             | Kaninchen polyklonal Anti-PDI (H-160)                                                     | Santa Cruz              | sc-20132   |            |            | 1:50    |
| $\alpha$ -PID1            | Kaninchen polyklonal Anti-Peptid-PID1                                                     | vgl. 2.2.3.10 und 3.1.3 |            | 1:1.000    |            |         |
| $\alpha$ -pY-4G10         | Maus monoklonal Anti-Phosphotyrosin-4G10                                                  | Upstate                 | 05-321     | 1:1.000    |            |         |
| $\alpha$ -Rab6            | Kaninchen polyklonal Anti-Rab6 (C-19)                                                     | Santa Cruz              | sc-310     |            |            | 1:100   |
| $\alpha$ -Rab11           | Kaninchen polyklonal Anti-Rab11                                                           | Cell Signaling          | # 3539     |            |            | 1:50    |
| $\alpha$ -SR-B1           | Kaninchen polyklonal Anti-SR-B1                                                           | Rinninger, F., Hamburg  |            | 1:2.000    |            |         |
| $\alpha$ -TfR2            | Kaninchen polyklonal Anti-TfR2                                                            | Abcam                   | ab80194    |            |            | 1:100   |
| $\alpha$ -TGN46           | Schaf polyklonal Anti-human-TGN46                                                         | AbD Serotec             | AHP500     |            |            | 1:75    |

$\alpha$  = Anti, Flag = DYKDDDDK (D = Asparaginsäure, K = Lysin, Y = Tyrosin), GST = Glutathion-S-Transferase, H = human, IF = Immunfluoreszenz, IP = Immunpräzipitation, IZD = intrazelluläre Domäne, M = Maus, pY = Phosphotyrosin, WB = Western Blot.

| Sekundäre Antikörper     | Herkunft               | Artikelnr.  | Verdünnung |                                       |
|--------------------------|------------------------|-------------|------------|---------------------------------------|
|                          |                        |             | WB         | IF                                    |
| Esel-Anti-Kaninchen-Cy2  | Jackson ImmunoResearch | 711-226-152 |            | 1:150                                 |
| Esel-Anti-Kaninchen-Cy3  |                        | 711-166-152 |            | 1:500                                 |
| Esel-Anti-Maus-Cy2       |                        | 715-226-151 |            | 1:100                                 |
| Esel-Anti-Maus-Cy3       |                        | 715-166-151 |            | 1:500                                 |
| Esel-Anti-Schaf-Cy2      |                        | 713-226-147 |            | Dolly 1:500,<br>$\alpha$ -TGN46 1:150 |
| Esel-Anti-Schaf-Cy3      |                        | 713-166-147 |            | 1:500                                 |
| Esel-Anti-Huhn-POX       |                        | 703-035-155 | 1:10.000   |                                       |
| Esel-Anti-Schaf-POX      |                        | 713-035-147 |            |                                       |
| Maus-Anti-Ziege-POX      |                        | 205-035-108 |            |                                       |
| Ziege-Anti-Kaninchen-POX |                        | 111-035-144 |            |                                       |
| Ziege-Anti-Maus-POX      |                        | 115-035-146 |            |                                       |

Cy2/Cy3 = Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper, POX = Peroxidase-gekoppelte Antikörper

Die Antikörper wurden entweder bei den angegebenen Firmen gekauft oder wie angegeben von J. Heeren aus Hamburg, J. Herz aus Dallas, P. Gordts aus Leuven, F. Rinninger aus Hamburg und P. Saftig aus Kiel freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

### Bakterienstämme

E. coli One Shot TOP10 competent cells, Invitrogen

E. coli BL21-CodonPlus competent cells, Stratagene

## DNA-Konstrukte

| DNA-Konstrukte                                      | Vektortyp                                                         | Expression                                                                            | Verwendung                                                                                                              | Resistenz  | Herkunft             |                        |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|----------------------|------------------------|
| pCMV-Tag2B-M-PID1                                   | eukaryotischer Expressionsvektor                                  | Flag-PID1-Fusionsprotein                                                              | IF, IP (HEK 293T)                                                                                                       | Kanamycin  | s. 2.2.1.2           |                        |
| pEGFP-N1-H-LRP1-WT                                  |                                                                   | LRP1-eGFP-Fusionsprotein                                                              | IF (HEK 293T)                                                                                                           |            | Laatsch et al. 2004  |                        |
| pEGFP-N1-H-LRP1-N <sub>26</sub> A                   |                                                                   |                                                                                       |                                                                                                                         |            | Schmale, H., Hamburg |                        |
| pEGFP-N1-H-LRP1-N <sub>60</sub> A                   |                                                                   |                                                                                       |                                                                                                                         |            | Schmale, H., Hamburg |                        |
| pEGFP-N1-M-PID1                                     |                                                                   | PID1-eGFP-Fusionsprotein                                                              | IF (HeLa)                                                                                                               |            | Liße, J., Hamburg    |                        |
| pGex-6P-3                                           | prokaryotischer Expressionsvektor                                 | GST-Kontrollprotein                                                                   | GST-Pull-down <i>in vitro</i>                                                                                           | Ampicillin | GE Healthcare        |                        |
| pGex-6P-3-H-LRP1-IZD-WT                             |                                                                   | GST-LRP1-IZD-Fusionsprotein                                                           |                                                                                                                         |            |                      | Kubick, N., Hamburg    |
| pGex-6P-3-M-LRP1-IZD-WT                             |                                                                   |                                                                                       |                                                                                                                         |            |                      | Gordts, P., Leuven     |
| pGex-6P-3-M-LRP1-IZD-N1                             |                                                                   |                                                                                       |                                                                                                                         |            |                      |                        |
| pGex-6P-3-M-LRP1-IZD-N2                             |                                                                   |                                                                                       |                                                                                                                         |            |                      |                        |
| pGex-6P-3-M-LRP1-IZD-N1/2                           |                                                                   |                                                                                       |                                                                                                                         |            |                      |                        |
| pGex-6P-3-M-LRP1-IZD-N <sub>60</sub> A              |                                                                   |                                                                                       |                                                                                                                         |            |                      |                        |
| pGex-6P-3-M-LRP1-IZD-Y <sub>63</sub> A              |                                                                   |                                                                                       |                                                                                                                         |            |                      |                        |
| pGex-6P-3-M-LRP1-IZD-Y <sub>63</sub> E              |                                                                   |                                                                                       |                                                                                                                         |            |                      |                        |
| pGex-6P-3-M-LRP1-IZD-Y <sub>63</sub> F              |                                                                   |                                                                                       |                                                                                                                         |            |                      |                        |
| pGex-6P-3-M-LRP1-IZD-L <sub>66</sub> A              |                                                                   |                                                                                       |                                                                                                                         |            |                      |                        |
| pGex-6P-3-M-LRP1-IZD-S <sub>76</sub> A              |                                                                   |                                                                                       |                                                                                                                         |            |                      |                        |
| pGex-6P-3-M-LRP1-IZD-S <sub>76</sub> D              |                                                                   |                                                                                       |                                                                                                                         |            |                      |                        |
| pGex-6P-2-H-PID1-MFSL                               |                                                                   | GST-PID1-Fusionsprotein                                                               |                                                                                                                         |            |                      | Weinås, Å. K., Hamburg |
| pGex-6P-2-H-PID1-MPRI                               |                                                                   |                                                                                       |                                                                                                                         |            |                      |                        |
| pGex-6P-2-H-PID1-MWQP                               |                                                                   |                                                                                       |                                                                                                                         |            |                      |                        |
| pGex-6P-1-M-PID1-MWQP                               |                                                                   | GST-Pull-down <i>in vitro</i> ,<br>GST-Pull-down <i>in vivo</i> (primäre Hepatozyten) |                                                                                                                         | s. 2.2.1.2 |                      |                        |
| pLHCx-LRP1-CT                                       | eukaryotischer Expressionsvektor                                  | LRP1-Carboxy-Terminus                                                                 | IP (HEK 293T)                                                                                                           |            | Pietrzik, C., Mainz  |                        |
| pLKO.1-puro_shRNA Plasmid DNA SHDNAC-002            | eukaryotischer Expressionsvektor (lentiviraler Transfervektor)    | sh Kontrolle                                                                          | Produktion lentiviraler Viruspartikel (Verpackungszelllinie HEK 293T);<br>Lentiviral-vermittelte RNA-Interferenz (HUH7) |            | Laatsch, A., Hamburg |                        |
| pLKO.1-puro_shRNA Plasmid DNA SHDNAC-TRCN0000123236 |                                                                   | sh PID1                                                                               |                                                                                                                         |            | Sigma Aldrich        |                        |
| pLKO.1-puro_shRNA Plasmid DNA SHDNAC-TRCN0000063463 |                                                                   | sh ARH                                                                                |                                                                                                                         |            | Sigma Aldrich        |                        |
| pMDL g/pRRE                                         | eukaryotischer Expressionsvektor (lentiviraler Verpackungsvektor) | virales GAG/POL                                                                       |                                                                                                                         |            | Laatsch, A., Hamburg |                        |
| pMD2.G VSV G                                        | eukaryotischer Expressionsvektor (lentiviraler Hüllproteinvektor) | virales VSV G                                                                         |                                                                                                                         |            |                      |                        |
| pRSV Rev                                            | eukaryotischer Expressionsvektor (lentiviraler Verpackungsvektor) | virales Rev                                                                           |                                                                                                                         |            |                      |                        |

HEK 293T = *human embryonic kidney cells* 293T, HeLa = humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms von Henrietta Lacks, HUH7 = humane Hepatomazelllinie, N1 = proximales NPxY-Motiv (Mutation: NPTY→AATA), N2 = distales NPxY-Motiv (Mutation: NPVY→AAVA), N1/2 = N1 + N2, sh RNA = *short hairpin* RNA, VSV G = *vesicular stomatitis virus* G

Die DNA-Konstrukte wurden entweder kloniert (s. 2.2.1.2), bei den angegebenen Firmen gekauft oder wie angegeben von P. Gordts aus Leuven, N. Kubick aus Hamburg, A. Laatsch aus Hamburg, Liße, J. aus Hamburg, C. Pietrzik aus Mainz, H. Schmale aus Hamburg und Å. K. Weinås aus Hamburg freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

## Enzyme

FastDigest EcoRI, Fermentas

FastDigest Sall, Fermentas

SRC, Invitrogen (Artikelnr. P3044)

PreScission Protease, GE Healthcare

Phusion Hot Start DNA Polymerase, Finnzymes

T4 Ligase, New England BioLabs

## Eukaryotische Zellen

| Zelllinie       |                                                                                                                                 | Verwendung                                                |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>HEK 293T</b> | Derivat von HEK ( <i>human embryonic kidney</i> ) 293 Zellen, die das SV40 <i>large T Antigen</i> exprimieren, Pear et al. 1993 | IF, IP, Verpackungszelllinie                              |
| <b>HeLa</b>     | humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms von Henrietta Lacks                                                                  | IF                                                        |
| <b>HUH7</b>     | humane Hepatomazelllinie, Nakabayashi et al. 1982                                                                               | Aufnahme-und Abbau-Experimente, IF, <i>Recycling</i> , WB |

Die in dieser Arbeit verwendeten Lysate von primären Hepatozyten wurden von J. Heeren aus Hamburg (hepatischer LRP1-*Knock-out*) und von P. Gordts aus Leuven (LRP1-N2-*Knock-in*) zur Verfügung gestellt.

**Kits**

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems

NucleoSpin Extract II, Macherey und Nagel

NucleoSpin Plasmid, Macherey und Nagel

NucleoSpin RNA II, Macherey und Nagel

Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit, Thermo Scientific

**Primer**

mPID1\_for 5'-GTAGAATTCATGTGGCAGCCGGCTACTGAG-3'

mPID1\_rev 5'-GTGGTCGACTCAGCCATCATCAGATTCCAATTC-3'

**Puffer**Beadpuffer:

20 mM Tris-HCl (pH 7.4)

50 % Glycerol

Blotpuffer:

12,1 g Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)

56,2 g Glycin

1 l Methanol

ad 5 l H<sub>2</sub>O

Homogenisierungspuffer:

20 mM Tris-HCL (pH 7.4)

2 mM MgCl<sub>2</sub> (Magnesiumchlorid)

0,25 M Saccharose

ad 500 ml H<sub>2</sub>O

Phosphatase- und Protease-Inhibitor-Zelllysepuffer:

50 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)

100 mM NaCl (Natriumchlorid)

50 mM NaF (Natriumfluorid)

2 mM EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

2 mM EGTA (*ethylene glycol tetraacetic acid*)

5 mM  $\beta$ -Glycerophosphat

1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (Natriumvanadat)

1 % Triton

Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail (Roche) (1 Tablette/ 10 ml)

PreScission-Proteasepuffer (pH 7.0):

50 ml Tris-HCl

150 ml NaCl

1 mM EDTA

1 mM DTT (Dithiothreitol)

Kinasepuffer:

50 mM HEPES (pH 7.5)

10 mM  $\text{MgCl}_2$

10 % Glycerol

2,5 mM DTT

0,01 % Triton

(5 mM ATP (Adenosintriphosphat))

TBS (pH 7.4):

50 mM Tris HCl

150 mM NaCl

pH 7.4



TBST (pH 7.6):

50 mM Tris HCl

150 mM NaCl

0,1 % Tween 20

**Sonstige**

Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare

Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers RPN800E, GE Healthcare

Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories

Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail, Roche

Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) + GlutaMax™ I, GIBCO, Invitrogen

FuGENE HD Transfection Reagent, Roche

Glutathione Sepharose 4B, GE Healthcare

NuPage LDS Sample Buffer Agent (4x), Invitrogen

NuPage MES SDS Running Buffer (20x), Invitrogen

NuPage Sample Reducing Agent (10x), Invitrogen

NuPage 4-12 % Bis- Tris Gel (1.0 mm, 10 well & 15 well), Invitrogen

Penicillin/ Streptomycin, GIBCO

Protease Inhibitor Cocktail Kit, Thermo Scientific (Artikelnr. 78410)

Protran Nitrocellulose Transfer Membran (300 mm x 3 m, Pore Size 0,45 µm), Whatman

Protein G Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare

TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x), Applied Biosystems

TRIzol, Invitrogen

## TaqMan-Sonden

H-ApoE (Assay ID Hs00171168\_m1), Context-Sequenz: CCAGGAAGTGGGCGCTGATGGAC

H-ARH = hLDLRAP1 (Assay ID Hs00296701\_m1), Context-Sequenz: AGCGGAAGATGGCACAGGCTGTTAC

H-LRP1 (Assay ID Hs00233899\_m1); Context-Sequenz: CAGTCTGCACCACGTGGAACAGATG

H-LDLR (Assay ID Hs00181192\_m1); Context-Sequenz: CTCACCAAGCTCTGGGCGACGTTGC

H-PID1 (Assay ID Hs00952182\_m1); Context-Sequenz: CTCACAGTGGCTGCAAGGTTACCTA

H-TBP (Assay ID Hs00270322\_m1); Context-Sequenz: AGCAGGTAACACAGGAAGGTGAAGA

Alle Sonden wurden bei Applied Biosystems erworben.

## 2.2 Methoden

In diesem Teil des Kapitels werden die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Methoden beschrieben.

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Datenbankrecherche

Alle Datenbank-Recherchen wurden auf [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) durchgeführt.

#### 2.2.1.2 Klonierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das murine PID1 aus einer Mausleber-cDNA amplifiziert und in den prokaryotischen GST-Expressionsvektor pGex-6P-1 und den eukaryotischen Flag-Expressionsvektor pCMV-Tag2B kloniert.

##### 2.2.1.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der Reaktionsansatz zur Amplifikation des murinen PID1 enthielt als DNA-Template 2,5 µl eines 50 µl Mausleber-cDNA-Ansatzes, der aus 1 µg RNA umgeschrieben wurde, 400 µM dNTPs (Desoxy-Nukleosidtriphosphate), 500 nM jeden *Primers*, 3 % DMSO und 0,5 units Phusion Hot Start Polymerase (Finnzymes, NEB) in 25 µl einfach konzentrierten Phusion HF Puffer. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Dazu

wurde nach den Angaben des Herstellers der Polymerase folgendes PCR-Programm gewählt: Eine initiale Denaturierung von 30 sec bei 98 °C, 35 Zyklen bestehend aus einem Denaturierungsschritt von 10 sec bei 98 °C, einem *Annealing* von 30 sec bei 62 °C und einer Synthesephase von 30 sec bei 72 °C und eine finale Synthesephase von 8 min bei 72 °C, anschließend wurde die Reaktion auf 4 °C gekühlt. Die *Annealing*-Temperatur richtet sich dabei nach der Schmelztemperatur ( $T_M$ ) der *Primer*, die aus deren GC-Gehalt mittels der Formel  $T_M = 4 \times (\text{Anzahl G bzw. C}) + 2 \times (\text{A bzw. T})$  berechnet wurde, wobei die eingefügten Restriktionsschnittstellen der *Primer* nicht berücksichtigt wurden.

#### **2.2.1.2.2 Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Plasmiden**

Zur Klonierung des murinen PID1 in die Vektoren pGex-6P-1 und pCMV-Tag2B wurden das PCR-Produkt (vgl. 2.2.1.2.1) bzw. die Vektoren mittels der Restriktionsendonukleasen EcoRI und Sall enzymatisch geschnitten. Dazu enthielt ein 20 µl Reaktionsansatz 16 µl PCR-Produkt bzw. 2 µg Plasmid-DNA, 2 µl 10x Fast Digest Puffer, jeweils 1 µl FastDigest EcoRI und Sall (Fermentas) und H<sub>2</sub>O (ad 20 µl). Der Verdau des PCR-Produkts erfolgte 30 min bei 37 °C, der der Vektoren dagegen 10 min bei 37 °C.

#### **2.2.1.2.3 DNA-Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmiden aus Agarosegelen**

Nach dem Restriktionsverdau wurden das PCR-Produkt und die Vektoren zur Aufreinigung in einem Ethidiumbromid-enthaltenden 1 %igen Agarosegel bei einer Spannung von 80 Volt ca. 60 min aufgetrennt und anschließend die entsprechenden Banden auf dem UV-Tisch aus dem Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung des PCR-Produkts und der Vektoren aus dem Gel erfolgte mithilfe des NucleoSpin Extract Kits (Macherey und Nagel) entsprechend den Herstellerangaben. Dabei wurden sowohl das PCR-Produkt als auch die Vektoren in 20 µl Elutionspuffer eluiert.

#### **2.2.1.2.4 Ligation**

Bei der Ligation werden die zueinander komplementären Restriktionsschnittstellen des PCR-Produkts und des Vektors durch die T4-Ligase miteinander verknüpft. Für den optimalen Verlauf der Ligation sollte das zu inserierende PCR-Produkt in einem molaren Überschuß gegenüber der Vektor-DNA vorliegen. Daher enthielt ein 50 µl Ligationsansatz 20 µl PCR-

Produkt, 5 µl Vektor (vgl. 2.2.1.2.3), 5 µl 10x T4-Ligase Puffer, 6 *units* T4-Ligase (NEB) und H<sub>2</sub>O (ad 50 µl). Die Ligationsreaktion erfolgte schließlich 4 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Ligationsansatz in Bakterien transformiert und amplifiziert (vgl. 2.2.1.3 und 2.2.1.4). Die DNA-Sequenzierung des in die Vektoren inserierten PCR-Produkts wurde von der Firma Eurofins MWG durchgeführt.

### **2.2.1.3 Transformation kompetenter E. coli.**

Der Ligationsansatz (vgl. 2.2.1.2.4) bzw. die in der vorliegenden Arbeit verwendeten DNA-Konstrukte (vgl. 2.1) wurden zur Amplifikation in E. coli (One Shot TOP10 competent cells, Invitrogen) transformiert. Dazu wurden zunächst die bei -70 °C eingefrorenen Bakterien auf Eis aufgetaut und anschließend 50 µl der Bakteriensuspension mit 25 µl Ligationsansatz bzw. 10 ng Plasmid-DNA vermischt. Nach Zugabe der DNA wurden die Bakterien zunächst 30 min auf Eis inkubiert, danach 30 sec bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt und dann erneut 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zu den Bakterien 250 µl SOC-Medium gegeben und diese dann 45 min bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Zuletzt wurde 100 - 200 µl des Transformationsansatzes auf LB (*lysogeny broth*)-Agarplatten, die ein Antibiotikum entsprechend des Resistenzgens des jeweiligen Plasmids enthielten (vgl. 2.1, Ampicillin: 100 µg/ml, Kanamycin: 30 µg/ml), ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **2.2.1.4 DNA-Minipräparation mit Säulenreinigung**

Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA aus E. coli wurden 5 ml LB-Medium mit einer einzelnen Kolonie von einer LB-Agarplatte (vgl. 2.2.3.2) angeimpft. Dabei enthielt das LB-Medium ein Antibiotikum entsprechend des Resistenzgens des jeweiligen Plasmids (vgl. 2.1, DNA-Konstrukte, Ampicillin: 100 µg/ml, Kanamycin: 30 µg/ml). Die Minikulturen wurden danach über Nacht unter ständigem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte schließlich mithilfe von Säulenreinigung mit dem NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey und Nagel) entsprechend den Herstellerangaben.

### 2.2.1.5 Messung der Konzentration von DNA und RNA

Die Konzentration von DNA und RNA wurde mithilfe des NanoDrop ND-1000 Spektrophotometers bestimmt.

### 2.2.1.6 RNA-Aufreinigung und quantitative *real-time* PCR

Zur Analyse der Genexpression mittels quantitativer TaqMan-PCR in HUH7-Zellen wurde aus den Zellen zunächst die RNA isoliert, die dann mithilfe der Reversen-Transkriptase in cDNA umgeschrieben wurde. Dazu wurden 48 h vor der RNA-Extraktion  $5 \times 10^5$  Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden unter dem Abzug in 500  $\mu$ l TRIzol (Invitrogen) aufgenommen und die RNA mithilfe des NucleoSpin RNA II Kits (Macherey und Nagel) entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Anschließend wurde 1  $\mu$ g RNA mithilfe des High-Capacity Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems) in einem 50  $\mu$ l Reaktionsvolumen in cDNA entsprechend den Herstellerangaben umgeschrieben. Die cDNA wurde in der quantitativen TaqMan-PCR eingesetzt und diese unter Verwendung des TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems) und Gen-spezifischer *Primer* (vgl. 2.1, TaqMan-Sonden) ebenfalls nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die relative Expression wurde schließlich bezogen auf die Expression des Haushältergens TBP mithilfe der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode errechnet.

## 2.2.2 Zellkulturtechniken

Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank, mit sterilen Glas- und Plastikmaterialien durchgeführt. Biologisches Material wurde durch Autoklavieren inaktiviert.

### 2.2.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Die HUH7-, die HEK 293T- und die HeLa-Zellen wurden in sterilen Plastikzellkulturflaschen in D-MEM + GlutaMax<sup>TM</sup> I (High Glucose) Medium (GIBCO), das mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin (GIBCO) supplementiert wurde, in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 96 % kultiviert.

### 2.2.2.2 Transfektion

Zur Analyse der LRP1/PID1-Interaktion und der zellulären Lokalisation von PID1 wurden LRP1 und PID1 meist als Fusionsproteine in HEK 293T- und HeLa-Zellen transient überexprimiert. Die Transfektion der Zellen erfolgte dabei mithilfe des FuGene HD Transfection Reagent (Roche). Dazu wurden 24 h vor der Transfektion  $3 - 5 \times 10^5$  Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde das Medium der Zellen gewechselt (vgl. 2.2.2.1). Für die Transfektion der Zellen wurden 2 µg Plasmid-DNA in 100 µl D-MEM + GlutaMax<sup>TM</sup> I (High Glucose) Medium (GIBCO) aufgenommen, gemischt und anschließend 8 µl FuGene HD Transfection Reagent hinzupipettiert. Der Transfektionsansatz wurde danach durch Anschnipsen gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf die Zellen eines Wells einer 6-Well-Platte getropft. Die Zellen wurden nun 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

### 2.2.2.3 Herstellung stabiler *Knock-down* Zelllinien mittels lentiviralem Gentransfer

Charakteristisch für Retroviren, zu denen auch die Lentiviren gehören, ist die Fähigkeit, ihr RNA-Genom während der Replikation in doppelsträngige DNA umzuschreiben, d.h. revers zu transkribieren, um es anschließend stabil in das Wirtsgenom zu integrieren. Dieser retrovirale Gentransfer kann im Labor als Werkzeug zur Übertragung einer bestimmten genetischen Information auf ausgesuchte Zielzellen genutzt werden. Dazu müssen zunächst in einer Verpackungszelllinie lentivirale Viruspartikel hergestellt werden, mit denen die Zielzellen infiziert werden. Zur Generierung der lentiviralen Viruspartikel wird die Verpackungszelllinie aus Sicherheitsgründen mit einem lentiviralen Transfervektor transfiziert, in dem das Virengenom weitgehend deletiert wurde. Die für den Replikationszyklus der Lentiviren essentiellen Gene werden gesondert auf Koplasmiden in die Verpackungszelllinie kotransfiziert. Dabei soll durch die separate Expression der Gene verhindert werden, dass alle essentiellen Bestandteile des Vektorsystems durch Rekombination in der Verpackungszelllinie wieder in einem einzigen Vektorgenom zusammengeführt werden und es zur Entstehung rekombinanter, replikativer Lentiviren kommt. Transduzierende Viren werden folglich nur generiert, wenn alle Konstrukte gleichzeitig in der Verpackungszelllinie exprimiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden unter S2-Bedingungen die Adapterproteine PID1 und ARH mittels lentiviral-vermittelter RNA-Interferenz in HUH7-Zellen herunterreguliert. Dazu wurden bei der Firma Sigma-Aldrich PID1- und ARH-shRNA-DNA-Plasmide gekauft (vgl. 2.1 und s.u., rot: Sequenz der shRNA). Der Ausgangsvektor (pLKO.1-puro) erlaubt sowohl eine transiente Überexpression der shRNA als auch eine stabile Selektion der shRNA-exprimierenden Zellen aufgrund des im Vektor vorhandenen Puromycin-Resistenzgens. Zusätzlich kann der Vektor als Transfervektor zur Herstellung lentiviraler Viruspartikel in einer Verpackungszelllinie genutzt werden.

#### Vektoren für die Produktion lentiviraler Partikel zum human-spezifischen *Knock-down* von PID1 und ARH

Lentivirale Transfervektoren:

**sh Kontrolle:** pLKO.1-puro\_shRNA Plasmid DNA SHDNAC-002

Der lentivirale Transfervektor sh Kontrolle 002 wurde freundlicherweise von A. Laatsch aus Hamburg zur Verfügung gestellt.

**sh PID1:** pLKO.1-puro\_shRNA Plasmid DNA SHDNAC-TRCN0000123236

**CCGGGACCATGCTGAAGTCTAAATTCTCGAGAATTTAGACTTCAGCATGGTCTTTTGG**

**sh ARH-1:** pLKO.1-puro\_shRNA Plasmid DNA SHDNAC-TRCN0000063463

**CCGGCGACAAGGTGTTTGCATACATCTCGAGATGTATGCAAACACCTTGTCTTTTGG**

Koplasמיד:

pMD2.G VSV G (VSV G *Vesicular Stomatitis Virus G*), Hüllproteinkonstrukt

pMDL g/pRRE (Gag, Pol, RRE = *Rev response element*), Verpackungskonstrukt

pRSV Rev (Rev = *Regulator of expression of virion proteins*), Verpackungskonstrukt

#### Produktion lentiviraler Viruspartikel in der Verpackungszelllinie HEK 293T

Zur Generierung von HUH7-Zellen, die stabil eine Kontroll-, PID1- oder ARH-shRNA exprimieren, wurden zunächst lentivirale Viruspartikel in der Verpackungszelllinie HEK 293T produziert. Dazu wurden jeweils ein lentiviraler Transfervektor (s.o.) und die Koplasמיד

(s.o.) mittels des FuGene HD Transfection Reagent in HEK 293T-Zellen kotransfiziert. 24 h vor der Transfektion wurden  $3 \times 10^5$  Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde das Medium (vgl. 2.2.2.1) gewechselt. Der Transfektionsansatz enthielt 2,5 µg DNA (2:1:1:1 = 1 µg lentiviraler Transfervektor: 0,5 µg pMD2.G VSV G: 0,5 µg pMDLg/pRRE: 0,5 µg pRSV Rev), die in 100 µl D-MEM GlutaMax™ I (High Glucose) Medium (GIBCO) aufgenommen und gemischt wurde, und 8 µl FuGene HD Transfection Reagent, das anschließend hinzupipettiert wurde. Der Transfektionsansatz wurde danach durch Anschnipsen gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf die Zellen eines Wells einer 6-Well-Platte getropft. Die Zellen wurden nun bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

### Virusernte

Zur Virusernte wurde 16 h nach der Transfektion das Medium der HEK 293T-Zellen gegen 1 ml Virenproduktionsmedium (D-MEM + GlutaMax™ I (High Glucose) Medium (GIBCO) mit 5 % FCS, 1 % Penicillin/ Streptomycin (GIBCO) und 25mM HEPES) pro Well ausgetauscht und die Zellen weiterhin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Einen Tag später wurde das Virenproduktionsmedium, das nun die lentiviralen Viruspartikel enthielt, von den HEK 293T-Zellen abgenommen und gegen 1 ml frisches Virenproduktionsmedium ersetzt, das wiederum einen Tag später erneut von den Zellen abgenommen wurde. Zur Vermeidung von Zellkontaminationen wurden die Viruspartikel-enhaltenden Lösungen sofort nach der Ernte zweimal für 4 Minuten bei 1.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Viruslösungen der zwei Erntetage wurden schließlich miteinander vereinigt und bis zur Infektion der HUH7-Zellen bei 4 °C gelagert.

### Infektion der HUH7-Zellen

Zur Herstellung von stabilen *Knock-down* HUH7-Zellen wurden die Zellen mit den lentiviralen Viruspartikeln infiziert. Dazu wurden 24 h vor Infektion  $1 \times 10^5$  HUH7-Zellen pro Well einer 12-Well-Platte ausgesetzt. Zur Infektion der Zellen wurde nun 700 µl der Virus-enhaltenden Lösung auf die Zellen eines Wells einer 12-Well-Platte pipettiert und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. 24 h nach der Infektion wurde die Viruslösung von den Zellen abgenommen, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, 1 ml frisches Medium (vgl.



2.2.2.1) auf die Zellen pipettiert und die Zellen weiterhin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert.

#### Selektion der stabilen *Knock-down* HUH7-Zellen

Der lentivirale Transfervektor weist ein Puromycin-Resistenzgen auf, daher konnten die HUH7-Zellen nach erfolgreicher lentiviral-vermittelter stabiler Integration des Vektors in das Genom der Zellen durch Zugabe von Puromycin (2,5 µg/ml) in das Kulturmedium (vgl. 2.2.2.1) selektioniert werden. Die Selektion der HUH7-Zellen wurde 7 – 10 Tage nach der Infektion durchgeführt.

### **2.2.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **2.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten**

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die adhärenenten HUH7- und HEK 293T-Zellen zunächst mit PBS gewaschen und mittels Trypsin-EDTA oder in PBS mithilfe eines Zellschabers abgelöst. Die Zellen wurden nun in der Zentrifuge bei 1.000 rpm 3 min pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in Phosphatase- und Protease-Inhibitor-Zelllysepuffer aufgenommen (1 x 10<sup>6</sup> Zellen in 200 µl) und mehrfach auf und ab pipettiert. Die Lyse der Zellen erfolgte schließlich 30 min auf Eis. Als letztes wurde das Lysat zweimal 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um Kerne und nicht lysierte Zellen abzutrennen.

#### **2.2.3.2 Messung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten erfolgte nach Bradford mithilfe des Bio-Rad Protein Assays (Bio-Rad Laboratories). Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass der Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* G250 an Proteine bindet und in einer anionischen, kationischen und neutralen Form vorkommt. Unter sauren Bedingungen weist der Farbstoff hauptsächlich die rote, protonierte, kationische Form auf und hat im Absorptionsspektrum ein Maximum bei 470 nm. Wenn der Farbstoff nun an Proteine bindet, wird er in die stabile blaue, nicht-protonierte, anionische Form umgewandelt, wodurch sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm verschiebt, was mithilfe eines Photometers gemessen werden kann. Dazu wurde folgender Ansatz pipettiert:

Probe:

5 µl Zelllysat

95 µl 0,1 N NaOH (Natronlauge)

700 µl H<sub>2</sub>O

200 µl Bio-Rad Protein Assay

Standardreihe:

5 µl BSA-Standard (0,0625 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml)

95 µl 0,1 N NaOH **Blank:** 100 µl 0,1 N NaOH

700 µl H<sub>2</sub>O

200 µl Bio-Rad Protein Assay

Die Ansätze wurden schließlich gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch den Vergleich des Messwerts mit einer Eichkurve bekannter Konzentrationen des Standardproteins BSA (*bovine serum albumin*) konnte die Proteinkonzentration der Probe ermittelt werden.

**2.2.3.3 Herstellung von GST-Fusionsproteinen**

Zur Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen wurde der prokaryotische GST-Expressionsvektor (pGex-6P) mit dem jeweiligen gewünschten Insert (vgl. 2.1, DNA-Konstrukte) in *E. coli* BL21 (Stratagene) transformiert (vgl. 2.2.1.3) und der Transformationsansatz auf Ampicillin-enthaltenden LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zur Induktion der Proteinexpression wurde zunächst eine Vorkultur angelegt. Dazu wurden 5 ml 2xYT-Medium, das mit 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol supplementiert wurde, mit einer Bakterienkolonie der LB-Agarplatte angeimpft. Die Vorkultur wurde dann über Nacht unter ständigem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Diese Bakterienvorkultur wurde schließlich in einen Kolben mit 500 ml 2xYT-Medium, das 100 µg/ml Ampicillin enthielt, überführt, der danach bei 37 °C und 225 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 – 0,8 geschüttelt wurde. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte dann durch Zugabe von 500 µl 500 mM IPTG (Isopropyl-β-D-

thiogalaktopyranosid). Anschließend wurde die Bakterienkultur über Nacht bei 16 °C und 225 rpm geschüttelt. Die Bakterien wurden danach bei 5.000 rpm und 4 °C in der Zentrifuge pelletiert und mit PBS gewaschen. Zum Aufschluss der Bakterienzellen wurde das Zellpellet zunächst in 5 ml PBS + Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail (Roche) (1 Tablette/ 10 ml) resuspendiert, 200 µl Lysozym (10 mg/ml) hinzupipettiert und 60 min bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Anschließend wurde das Bakterienlysate sonifiziert (3 – 4-mal 1 min bei 30 %iger Intensität auf Eis), 4 ml 10 % Triton hinzupipettiert und weitere 20 min bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Nach der Lyse der Bakterienzellen wurde das Lysat zunächst in einem 50 ml Falcon 20 min bei 8.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in 2 ml Tubes überführt und 20 min bei 14.000 rpm und 4 °C erneut abzentrifugiert. Das GST-Fusionsprotein wurde nun mithilfe der Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) aufgereinigt. Dazu wurde 300 µl Glutathion-Sepharose durch dreimaliges Waschen mit 10 ml PBS und anschließender Zugabe von 1 ml PBS, das Complete Mini und 10 % Triton enthielt, äquilibriert. Die Sepharose wurde dabei durch dreiminütiges Zentrifugieren bei 3.500 rpm und 4 °C wieder pelletiert. Danach wurde das Bakterienlysate auf die Sepharose gegeben und 2 Stunden oder über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Glutathion-Sepharose fünfmal in 15 ml kalten PBS gewaschen und diese währenddessen durch eine Zentrifugation von 3 min bei 3.500 rpm und 4 °C wieder pelletiert. Die Glutathion-Sepharose wurde danach in 500 µl Beadpuffer aufgenommen. Der Erfolg der Aufreinigung des GST-Fusionsproteins wurde mithilfe eines Coomassie-Gels überprüft. Die GST-Fusionsprotein-Sepharose wurde schließlich bei -20 °C gelagert.

#### 2xYT-Medium:

16 g Trypton

10 g Hefeextrakt

5 g NaCl

Ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7.0

#### 2.2.3.4 Verdau von GST-Fusionsproteinen mittels der PreScission-Protease

Zur Analyse der LRP1/PID1-Interaktion mittels *GST-Pull-down in vitro* wurde das GST-Tag des GST-LRP1-IZD-Fusionsproteins mittels der PreScission-Protease enzymatisch abgepalten. Dazu wurde 20 µl GST-LRP1-IZD-Fusionsprotein-Sepharose fünfmal mit 300 µl Phosphatase- und Protease-Inhibitor-Zellysepuffer gewaschen und diese währenddessen durch eine Zentrifugation von 3 min bei 2.500 rpm und 4 °C wieder pelletiert. Die GST-LRP1-IZD-Fusionsprotein-Sepharose wurde anschließend in 200 µl PreScission-Proteasespuffer aufgenommen, der 4 units der PreScission-Protease enthielt. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad. Die LRP1-IZD, die sich nun im Überstand befand, wurde anschließend von der GST-Sepharose durch mehrmalige Zentrifugation von 3 min bei 2.500 rpm und 4 °C getrennt. Die LRP1-IZD wurde schließlich bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.3.5 Phosphorylierung mittels der v-Src-Kinase

Zur Analyse des Einflusses einer Tyrosin-Phosphorylierung der NPxY-Motive der LRP1-IZD auf die Interaktion mit PID1 wurde die LRP1-IZD mittels der v-Src-Kinase phosphoryliert. Dazu wurde 20 µl GST-LRP1-IZD-Fusionsprotein-Sepharose zweimal mit 300 µl Kinasespuffer ohne ATP gewaschen und diese währenddessen durch eine Zentrifugation von 3 min bei 2.500 rpm und 4 °C wieder pelletiert. Die GST-LRP1-IZD-Fusionsprotein-Sepharose wurde anschließend in 50 µl Kinasespuffer mit ATP, der 8 µg/ml SRC (Invitrogen) enthielt, aufgenommen. Die v-Src-vermittelte Phosphorylierung erfolgte schließlich 10 min bei 30 °C. Zur Durchführung des *GST-Pull-down*-Experiments wurde das GST-Tag des phosphorylierten GST-LRP1-IZD-Fusionsproteins anschließend, wie in 2.2.3.4 beschrieben, mittels der PreScission-Protease enzymatisch abgepalten.

#### 2.2.3.6 GST-Pull-down

Zur Untersuchung der LRP1/PID1-Interaktion wurden zum einen GST-PID1-*Pull-down*-Experimente mit der mithilfe der PreScission-Protease geschnittenen LRP1-IZD (vgl. 2.2.3.4 und 2.2.3.5) durchgeführt, zum anderen mit Lysaten von primären Hepatozyten. Dazu wurde 20 µl GST-PID1-Fusionsprotein-Sepharose dreimal mit 300 µl PBS gewaschen und diese währenddessen durch eine Zentrifugation von 3 min bei 2.500 rpm und 4°C wieder pelletiert. Anschließend wurde 40 µl LRP1-IZD bzw. 150 µl Zelllysat (1 – 2 µg/µl) auf die GST-

PID1-Fusionsprotein-Sepharose pipettiert und der Ansatz über Nacht auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Die GST-PID1-Fusionsprotein-Sepharose wurde danach fünfmal mit 300 µl PBS gewaschen und diese währenddessen durch eine Zentrifugation von 3 min bei 2.500 rpm und 4 °C wieder pelletiert, wobei der Überstand (nicht-gebundene Proteine bzw. Lysat nach der Bindung) aufbewahrt wurde. Zuletzt wurde die GST-PID1-Fusionsprotein-Sepharose in 80 µl PBS, das NuPage LDS Sample Buffer Agent (4x) und NuPage Sample Reducing Agent (10x) (Invitrogen) enthielt, aufgenommen und für 5 min bei 95 °C gekocht und die Sepharose durch eine Zentrifugation von 1 min bei 10.000 rpm und 4 °C abgetrennt. Die LRP1/PID1-Interaktion wurde nun mithilfe einer Western Blot-Analyse untersucht (vgl. 2.2.3.9). Dabei wurde zuvor in Abhängigkeit des bei der Western Blot-Analyse verwendeten Antikörpers 5 – 20 µl auf ein Gel aufgetragen (IZD: Dolly: 5 µl, 4G10: 20 µl; Lysat: Dolly + α-LDLR: 15 µl (10 Well)). Zusätzlich wurde der LRP1-IZD-*Input*, der Überstand des LRP1-IZD-*Pull-downs* (Verhältnis: IZD-Input/ Überstand: Ladepuffer = 1:2) und das Lysat vor (Input) und nach (Überstand) der Bindung in NuPage LDS Sample Buffer Agent (4x) und NuPage Sample Reducing Agent (10x) aufgenommen, für 5 min bei 95 °C gekocht und gleiche Volumina gegebenenfalls auf das Gel aufgetragen.

### 2.2.3.7 Immunpräzipitation

Zur Analyse der LRP1/PID1-Interaktion in HEK 293T-Zellen mittels Immunpräzipitation wurde zunächst das Flag-PID1-Fusionsprotein und LRP1-CT in HEK 293T-Zellen koexprimiert (vgl. 2.2.2.2) und Zelllysate hergestellt (vgl. 2.2.3.1). Die Immunpräzipitation wurde dann zum einen mit dem Flag-spezifischen Antikörper „M2“, der kovalent an eine Agarose gekoppelt ist, durchgeführt, zum anderen mit dem LRP1-spezifischen Antikörper „Dolly“, der an Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) gebunden wurde. In einer Western Blot-Analyse (vgl. 2.2.3.9) wurde dann untersucht, ob LRP1-CT mithilfe des Flag-spezifischen Antikörpers und das Flag-PID1-Fusionsproteins durch den LRP1-spezifischen Antikörper koimmunpräzipitiert werden kann.

#### IP mit EzView Red Anti-Flag-M2 Affinity Gel (Sigma Aldrich)

Dazu wurde zunächst 40 µl Anti-Flag-Agarose zweimal mit 500 µl TBS gewaschen und diese währenddessen durch eine Zentrifugation von 30 sec bei 10.000 rpm und 4 °C wieder

pelletiert. Anschließend wurde 200 µl Lysat (ca.  $1 \times 10^6$  Zellen) auf die Anti-Flag-Agarose pipettiert und der Ansatz über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die Anti-Flag-Agarose wurde danach dreimal mit 500 µl TBS gewaschen und diese währenddessen durch eine Zentrifugation von 30 sec bei 10.000 rpm und 4 °C wieder pelletiert, wobei der Überstand (Lysat nach der Bindung) aufbewahrt wurde. Die Anti-Flag-Agarose wurde schließlich in 40 µl H<sub>2</sub>O, das NuPage LDS Sample Buffer Agent (4x) und NuPage Sample Reducing Agent (10x) (Invitrogen) enthielt, aufgenommen und für 5 min bei 95 °C gekocht und die Anti-Flag-Agarose durch eine Zentrifugation von 1 min bei 10.000 rpm und 4 °C abgetrennt. Dabei wurde 5 µl auf ein Gel (15 Well) aufgetragen. Zusätzlich wurde das Lysat vor (Input) und nach (Überstand) der Bindung in NuPage LDS Sample Buffer Agent (4x) und NuPage Sample Reducing Agent (10x) aufgenommen, für 5 min bei 95 °C gekocht und das gleiche Volumen auf das Gel aufgetragen.

#### IP mit Anti-LRP1 „Dolly“

Dazu wurde zunächst 30 µl Protein G-Sepharose dreimal mit 500 µl TBS gewaschen und danach einmal mit 300 µl Phosphatase- und Protease-Inhibitor-Zelllysepuffer und diese währenddessen durch eine Zentrifugation von 3 min bei 2.500 rpm und 4°C wieder pelletiert. Anschließend wurde 200 µl Zelllysate (ca.  $1 \times 10^6$  Zellen), in das zuvor der LRP1-spezifische Antikörper „Dolly“ (1: 25, vgl. 2.1, Antikörper) pipettiert wurde, auf die Protein G-Sepharose gegeben und der Ansatz über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die Protein G-Sepharose wurde danach dreimal mit 300 µl Phosphatase- und Protease-Inhibitor-Zelllysepuffer und einmal mit 500 µl TBS gewaschen und diese währenddessen durch eine Zentrifugation von 3 min bei 2.500 rpm und 4 °C wieder pelletiert, wobei der Überstand (Lysat nach der Bindung) aufbewahrt wurde. Die Protein G-Sepharose wurde schließlich in 40 µl H<sub>2</sub>O, das NuPage LDS Sample Buffer Agent (4x) und NuPage Sample Reducing Agent (10x) (Invitrogen) enthielt, aufgenommen und für 5 min bei 95 °C gekocht und die Protein G-Sepharose durch eine Zentrifugation von 1 min bei 10.000 rpm und 4 °C abgetrennt. Dabei wurde 12 µl auf ein Gel (10 Well) aufgetragen. Zusätzlich wurde das Lysat vor (Input) und nach (Überstand) der Bindung in NuPage LDS Sample Buffer Agent (4x) und NuPage Sample Reducing Agent (10x) aufgenommen, für 5 min bei 95 °C gekocht und das gleiche Volumen auf das Gel aufgetragen.

### 2.2.3.8 Biotinylierung von Membranproteinen

Zur Analyse der Lokalisation von LRP1 und des LDL-Rezeptors an der Zelloberfläche in den HUH7-Zelllinien wurden zunächst die Proteine an der Zelloberfläche mithilfe des Pierce Cell Surface Protein Isolation Kits (Thermo Scientific) nach den Angaben des Herstellers biotinyliert. Dabei wurden pro HUH7-Zelllinie vier T75-Zellkulturflaschen eingesetzt, die 90 - 95 % konfluent waren. Anschließend wurden die Membranen der Zellen präpariert. Dazu wurde die biotinylierten Zellen in 1 ml Homogenisierungspuffer, der Proteaseinhibitoren (Thermo Scientific) enthielt, aufgenommen und mithilfe eines Douncers aufgeschlossen. Das Lysat wurde dann in ein 1,5 ml Tube überführt und für 15 min bei 800 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde weiterhin in der Ultrazentrifuge für 1 h bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet, das die Membranen enthielt, mit einer Kanüle in 0,5 ml Lysispuffer (Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit (Thermo Scientific) + Proteaseinhibitoren (Thermo Scientific)) resuspendiert. Das Lysat wurde danach erneut in der Ultrazentrifuge für 30 min bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert, dabei enthielt der Überstand die Membranproteine. Die biotinylierten Proteine des Membranlysats wurden nun mithilfe des Pierce Cell Surface Protein Isolation Kits (Thermo Scientific) durch eine Avidin-Agarose präzipitiert, anschließend eluiert und für eine Western Blot-Analyse entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet.

### 2.2.3.9 SDS-PAGE und Western Blot

Zur Analyse der LRP1/PID1-Interaktion mittels *GST-Pull-down* und Immunpräzipitation oder der Proteinexpression in HUH7-Zellen wurden die Proteine mittels SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) elektrophoretisch aufgetrennt und danach in einem Verfahren, das als Western Blot bezeichnet wird, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach dem Transfer auf die Membran wurden die Proteine mithilfe spezifischer Antikörper und mit dem auf dem HRP (*horseradish peroxidase*)-System basierenden ECL-Verfahren detektiert.

Dazu wurden die Proteine zunächst in NuPage LDS Sample Buffer Agent (4x) und NuPage Sample Reducing Agent (10x) (Invitrogen) für 5 min bei 95 °C gekocht, um die Proteine zu denaturieren und zu reduzieren. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 4-12 % Bis- Tris-

Gradientengelen (Invitrogen) in einem MES-SDS-Puffer-System (Invitrogen) bei einer Spannung von 120 V 60 – 90 min. Das stark anionische Detergenz SDS (*sodium dodecyl sulfate*) bindet an hydrophobe Regionen und positiv geladene Reste der Proteine, wodurch die Proteine zum einen denaturiert werden, zum anderen bringt es gleichzeitig über seine anionischen Kopfgruppen eine hohe negative Gesamtladung in die entstandenen SDS-Protein-Komplexe ein, so dass die ursprüngliche Eigenladung des nativen Proteins vernachlässigbar wird und die Proteine nun entsprechend ihrer Molekularmasse im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Als Massenkontrolle diente der gefärbte Proteinstandard RPN800E (GE Healthcare). Anschließend wurden die Proteine aus dem Gel nach dem Naß-Blot-Verfahren elektrophoretisch in Blotpuffer auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman) bei 350 mA 2 h transferiert. Die Membran wurde nun zunächst 1 h in 5 % Milchpulver/TBST geschwenkt, um noch freie Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen und anschließend dreimal 5 min in TBST gewaschen. Zur Detektion der Proteine wurde die Membran über Nacht in einem spezifischen primären Antikörper (vgl. 2.1, Antikörper), der in 5 % BSA/TBST aufgenommen wurde, bei 4 °C schwenkend inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 min in TBST gewaschen und mit einem sekundären, gegen den primären Antikörper gerichteten, Peroxidasegekoppelten Antikörper (vgl. 2.1, Antikörper) in 5 % Milchpulver/TBST 45 min bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Zuletzt wurde die Nitrocellulosemembran erneut dreimal 5 min in TBST gewaschen. Zur Detektion der spezifischen Proteine wurde ein ECL-Reagenz (GE Healthcare) verwendet und nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Peroxidase katalysiert in Anwesenheit des Substrats ECL eine Chemilumineszenzreaktion. Entsprechend der Intensität der Chemilumineszenz wurde ein Röntgenfilm für 1 Sekunde bis 30 Minuten exponiert und anschließend entwickelt.

#### **2.2.3.10 Generierung eines PID1-Peptid-Antikörpers**

In der vorliegenden Arbeit sollte in Kaninchen ein polyklonaler Maus-spezifischer Peptid-Antikörper gegen PID1 generiert werden. Der Antikörper sollte dabei zum einen nicht an die PTB-Domäne des exprimierten Exons 3 von PID1 binden, zum anderen sollte der Antikörper nach Möglichkeit auch an die humanen PID1-Isoformen binden. Daher wurde für die von der Firma Pineda in Berlin durchgeführte Epitopanalyse ein Sequenzbereich des Exons 2



(Aminosäuren 10 bis 60) ausgewählt. Dabei wurde bei der Epitopanalyse im Sequenzbereich des Exons 2 zunächst ein mögliches Epitop (**LMKA**, AS 49 – 52) ermittelt und dann das entsprechende 15 Aminosäuren lange Peptid LCTTTP**LMK**ARTHSG zur Antikörpergewinnung in Kaninchen abgeleitet. Bei der Epitopanalyse gilt je mehr fettgedruckte, d.h. positiv und negativ geladene Aminosäuren die ermittelte Sequenz enthält, desto relevanter ist sie für die Gewinnung eines Antikörpers.

## 2.2.4 Zellbiologische Methoden

### 2.2.4.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen erfolgten mithilfe einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung. Dabei werden die Proteine zunächst mittels eines spezifischen primären Antikörpers detektiert und dann durch einen sekundären Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, visualisiert. Dazu wurden 24 h vor der Immunfluoreszenzfärbung  $0,75 \times 10^5$  Zellen pro Well einer 24-Well-Platte auf Deckgläschen ausgesät. Die Zellen (pro Well) wurden dann zweimal mit 300 µl PBS gewaschen und durch Zugabe von 200 µl 4 % Paraformaldehyd/ PBS 30 min fixiert und erneut viermal mit 300 µl PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen 5 min in 300 µl PGS (0,5 % Glycin und 0,05 % Saponin in PBS) permeabilisiert und anschließend 15 min in 100 µl Blockpuffer (1 % BSA in PGS) inkubiert. Die Zellen wurden dann mit dem primären Antikörper (vgl. 2.1, Antikörper), der in 100 µl Blockpuffer angesetzt wurde, bei 4 °C über Nacht inkubiert und danach viermal mit 300 µl PGS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen gleichzeitig mit dem sekundären Antikörper und zur Kernfärbung mit DAPI (*4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*), die ebenfalls in 100 µl Blockpuffer angesetzt wurden, bei Raumtemperatur 45 min im Dunkeln inkubiert und dann dreimal mit 300 µl PGS und zweimal mit 300 µl PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden danach mithilfe von Mowiol + p-Phenylendiamin auf Objektträgern eingedeckelt. Die Zellen wurden schließlich mithilfe des konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskops LSM 510 META (Carl Zeiss) analysiert. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der Zeiss LSM Image Browser Software.

#### 2.2.4.2 Aufnahme- und Abbaustudien von $^{125}\text{I}$ -markierten Liganden

Zur Messung der Aufnahme und des Abbaus von CR und LDL in Kontroll-, PID1-defizienten und ARH-defizienten HUH7-Zellen, wurden die Tyrosin-Reste der Proteinanteile der Lipoproteine mit  $^{125}\text{I}$  ( $^{125}\text{I}$ ), das ein  $\gamma$ -Strahler ist, radioaktiv markiert. In dem Experiment wird nun zum einen die zelluläre Radioaktivität, d.h. die von den Zellen internalisierten  $^{125}\text{I}$ -Liganden, zum anderen ebenfalls die Radioaktivität im Kulturüberstand der Zellen, d.h. das Vorhandensein von  $^{125}\text{I}$ -Tyrosin, was dem lysosomalen Abbauprodukt des  $^{125}\text{I}$ -Liganden entspricht, mithilfe eines  $\gamma$ -Counters gemessen.

Dazu wurde zunächst 48 Stunden vor dem Experiment  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well einer 12 Well-Platte ausgesät. In Vorbereitung auf das Experiment wurden die Zellen in 500  $\mu\text{l}$  Inkubationsmedium (1 % BSA (*fatty acid free*), 20 mM HEPES in D-MEM + GlutaMax<sup>TM</sup> I (High Glucose) Medium (GIBCO)) 1 Stunde bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  gehungert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml 37 °C warmen PBS gewaschen und 500  $\mu\text{l}$  Inkubationsmedium, das den  $^{125}\text{I}$ -Liganden ( $^{125}\text{I}$ -CR: 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bzw.  $^{125}\text{I}$ -LDL: 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) enthielt, auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden nun bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert ( $^{125}\text{I}$ -CR: 2,5 h bzw.  $^{125}\text{I}$ -LDL: 1 und 4 h). Da der LDL-Rezeptor die Aufnahme von ApoE-enthaltenden CR kompensieren kann, wurde die LRP1-vermittelte  $^{125}\text{I}$ -CR-Aufnahme zusätzlich nach Inhibition des LDL-Rezeptors durch Zugabe einer 20-fach höheren Konzentration an kaltem LDL untersucht.

Die  $^{125}\text{I}$ -CR,  $^{125}\text{I}$ -LDL und LDL wurden freundlicherweise von J. Heeren aus Hamburg zur Verfügung gestellt.

#### Methode zur Messung der Aufnahme

Zur Messung der Aufnahme der  $^{125}\text{I}$ -Liganden wurden die Zellen zunächst dreimal 5 min mit 1 ml PBS-Heparin (100 *units* Heparin/ ml PBS) und einmal mit 1 ml PBS auf Eis gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 500  $\mu\text{l}$  0,1 N NaOH lysiert. Die lysierten Zellen wurden nun in ein  $\gamma$ -Counter-Röhrchen überführt und schließlich mithilfe eines  $\gamma$ -Counters die Zerfälle pro Minute (cpm = *counts per minute*) gemessen. Zusätzlich wurde die Proteinkonzentration von 50  $\mu\text{l}$  Zelllysate bestimmt (vgl. 2.2.3.2) und die spezifische Aktivität (cpm/ $\mu\text{g}$ ) ermittelt.

### Methode zur Messung des Abbaus

Zur Messung des Abbaus wurde der Zellkulturüberstand nach der Inkubation der Zellen mit dem  $^{125}\text{I}$ -Liganden von den Zellen abgenommen (500  $\mu\text{l}$  Inkubationsmedium +  $^{125}\text{I}$ -Ligand) und in ein Tube überführt, in das zuvor 75  $\mu\text{l}$  10 % Triton-X100 vorgelegt wurde. Zu dem Ansatz wurde nun 175  $\mu\text{l}$  eiskalte 50 % Trichloressigsäure hinzugegeben, um die nicht-aufgenommenen  $^{125}\text{I}$ -Liganden zu fällen. Dazu wurde das Tube gevortext, für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 5 min bei 8.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Zur Abtrennung von freiem  $^{125}\text{I}$  wurde 500  $\mu\text{l}$  des Überstands in ein neues Tube überführt, in das zuvor 5  $\mu\text{l}$  40 % Natrium- oder Kaliumiodid vorgelegt wurde. Das Tube wurde nun invertiert, 30  $\mu\text{l}$  30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  hinzupipettiert, gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert ( $2 \text{ KI} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{I}_2 + 2 \text{ OH}^- + 2 \text{ K}^+$ ). Danach wurde 1 ml Chloroform hinzupipettiert, das Tube erneut gevortext, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und 5 min bei 8.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das elementare Iod löst sich nun in der Chloroform-Phase. Von der oberen wässrigen Phase, die fast ausschließlich das  $^{125}\text{I}$ -Tyrosin enthält, wurde nun 250  $\mu\text{l}$  in ein  $\gamma$ -Counter-Röhrchen überführt und mithilfe des  $\gamma$ -Counters die Zerfälle pro Minute (cpm) gemessen, die auf die Proteinkonzentration des Zelllysats (s.o.) bezogen wurden und somit die spezifische Aktivität (cpm/ $\mu\text{g}$ ) ermittelt wurde.

#### **2.2.4.3 Zelloberflächen-Fluoreszenz-Quenching-Recycling-Experiment**

Der Einfluss des Adapterproteins PID1 auf das *Recycling* von LRP1 wurde mithilfe eines Zelloberflächen-Fluoreszenz-Quenching-Recycling-Experiments untersucht. Dazu wurden die Kontroll- und PID1-defizienten HUH7-Zellen zunächst mit dem LRP1-spezifischen Antikörper „5A6“, der an die extrazelluläre Domäne der LRP1- $\beta$ -Kette bindet und kovalent an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 gekoppelt wurde, 20 min bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert und die Zellen anschließend 0, 5, 10 und 20 min bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  mit einem Fluoreszenz-Quenching-Antikörper (Anti-Alexa Fluor 488) behandelt. Das Prinzip des Experiments beruht darauf, dass LRP1 zunächst an der Zelloberfläche durch den Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten LRP1-spezifischen Antikörper markiert wird. Sobald das fluoreszierende LRP1 dann nach der Internalisierung wieder zurück an die Zelloberfläche *recycelt* wird, wird das Fluoreszenzsignal durch den Quenching-Antikörper aufgehoben. Je mehr fluoreszierendes LRP1 nun an die Zellmembran zurückkehrt bzw. *recycelt* wird, desto

weniger Fluoreszenz weisen die Zellen auf, was durch eine FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Analyse gemessen werden kann. Das Experiment wurde, wie von Knisely, Lee und Bu 2008 beschrieben wurde, durchgeführt. Die FACS-Analyse erfolgte mithilfe des Durchflusszytometers Cytomics FC500 und der CXP Software (Beckman Coulter). Alle in diesem Experiment verwendeten Materialien wie der Alexa Fluor 488-gekoppelte LRP1-spezifische Antikörper „5A6“ und der Anti-Alexa Fluor 488-spezifische Antikörper wurden freundlicherweise von P. Gordts aus Leuven zur Verfügung gestellt.

### 3. Ergebnisse

Die intrazelluläre Domäne von LRP1 enthält verschiedene Motive wie zwei NPxY-Motive (N<sub>26</sub>PTY<sub>29</sub> und N<sub>60</sub>PVY<sub>63</sub>), ein YxxΦ-Motiv (Y<sub>63</sub>ATL<sub>66</sub>) und zwei Dileucin-Motive (LL<sub>43, 44</sub> und LL<sub>86, 87</sub>) sowie mehrere Tyrosin-, Serin- und Threonin-Phosphorylierungsstellen. Der Phosphorylierungsstatus der intrazellulären Domäne von LRP1, der in Abhängigkeit des jeweiligen gebundenen Liganden beeinflusst wird (Boucher et al. 2002), soll nun die Interaktion mit spezifischen Adapterproteinen bestimmen und somit die Funktion von LRP1 als Endozytose- oder Signaltransduktionsrezeptor regulieren (Barnes, Ackermann und van der Geer 2003, Betts, van der Geer und Komives 2008, Boucher und Gotthardt 2004, Loukinova et al. 2002, Ranganathan et al. 2004, Trommsdorff et al. 1998, Zhang et al. 2008). Mutagenesestudien mit LRP1-Minirezeptoren in polarisierten Zellen zeigen zudem, dass die oben genannten Motive der zytoplasmatischen Domäne von LRP1 als essentielle Sortierungssignale beim intrazellulären LRP1-Transport fungieren (Donoso et al. 2009, Marzolo et al. 2003). Dabei sind viele der Adapterproteine nicht bekannt, die via Interaktion mit den Motiven der intrazellulären Domäne von LRP1 dessen intrazellulären Transport regulieren. 2007 wurde das PTB-Domäne-enhaltende Adapterprotein PID1 als Interaktionspartner von LRP1 identifiziert (Caratù et al. 2007). PID1 wird wie LRP1 in der Leber exprimiert und stellte sich interessanterweise als der nächste Verwandte des Adapterproteins ARH heraus, das in Hepatozyten die LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose reguliert (He et al. 2002, Mishra et al. 2005, Mishra, Watkins und Traub 2002). Daher wurde in dieser Arbeit zum einen die Interaktion von LRP1 mit PID1, zum anderen die Rolle von PID1 bei der Regulation des intrazellulären Transports von LRP1 in Hepatozyten näher untersucht.

#### 3.1 Die Interaktion von LRP1 mit dem Adapterprotein PID1

Adapterproteine, die eine PTB-Domäne aufweisen, binden mit hoher Affinität an Peptide, die ein NPxY-Motiv aufweisen. Aufgrund von strukturellen Unterschieden der PTB-Domäne benötigen manche PTB-Domänen für eine affine Bindung an ihren Peptidliganden zusätzlich eine Phosphorylierung des Tyrosins des NPxY-Motivs. PTB-Adapterproteine werden daher in Phosphotyrosin-abhängige Adapterproteine, zu denen die Shc- und IRS-ähnlichen PTB-

Domänen gehören, und in Phosphotyrosin-unabhängige Adapterproteine eingeteilt, zu denen die Dab-ähnlichen PTB-Domänen zählen (Review: Uhlik et al. 2004).

Das PTB-Adapterprotein PID1 wurde 2007 von Caratù et al. als Interaktionspartner von LRP1 identifiziert, allerdings war bisher weder bekannt, welches der beiden NPxY-Motive von LRP1 an der Interaktion mit PID1 beteiligt sind, noch, welchen Einfluss eine Tyrosin-Phosphorylierung der NPxY-Motive auf die LRP1/PID1-Interaktion hat. Dieses Kapitel beschreibt daher die Interaktion von LRP1 mit dem Adapterprotein PID1 und erlaubt eine Einteilung von PID1 in die oben beschriebenen Gruppen. Die Interaktion wurde mittels GST-Pull-down, Immunpräzipitation und Immunfluoreszenzanalysen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* analysiert.

### **3.1.1 PID1 bindet an das distale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1**

Die Interaktion von LRP1 mit dem Adapterprotein PID1 wurde zunächst *in vitro* mittels rekombinant hergestellter Proteine in GST-Pull-down-Experimenten untersucht. Die Versuche wurden dabei mit der intrazellulären Domäne (IZD) von LRP1 durchgeführt, die aus 100 Aminosäuren besteht. LRP1 weist in seiner intrazellulären Domäne mehrere mögliche Adapterbindungsmotive auf, die zur Analyse der LRP1/PID1-Interaktion mutiert wurden. Wie bereits erwähnt, binden PTB-Domäne-enthaltende Adapterproteine wie PID1 an Peptide mit NPxY-Motiven, daher wurden in der intrazellulären Domäne von LRP1 das proximale oder/und das distale NPxY-Motiv mutiert. Zusätzlich wurde ein Einfluss des YxxL-Endozytosesignals und der Serin-Phosphorylierungsstelle an Position 76 auf die LRP1/PID1-Interaktion untersucht (s. Abb. 4 A). Außerdem wurde die LRP1/PID1-Interaktion sowohl mit den drei humanen PID1-Isoformen (MWQP, MPRI und MFSL) als auch mit dem murinen PID1 (MWQP) analysiert, um zu überprüfen, ob es sich um eine Spezies- oder Isoform-spezifische Interaktion handelt. Die humane und murine intrazelluläre Domäne von LRP1 unterscheidet sich dagegen in nur einer Aminosäure, daher wurde hier nur die Bindung von murinen PID1 an die humane Wildtyp-LRP1-IZD im Vergleich zum murinen Wildtyp untersucht. Alle anderen LRP1-IZD-Mutanten sind murin.

Die cDNAs der intrazellulären Domäne von LRP1 und PID1 wurden zunächst in einen GST-Proteinexpressionsvektor kloniert und danach in Bakterien als GST-Fusionsproteine

exprimiert. Das Glutathion-S-Transferase (GST)-Tag wurde dann genutzt, um die GST-Fusionsproteine mittels Glutathion-Sepharose aufzureinigen. In Vorbereitung auf das *Pull-down*-Experiment wurde das GST-Tag von den GST-LRP1-IZD-Fusionsproteinen mittels einer Protease enzymatisch abgespalten. Der *Pull-down* erfolgte schließlich mit dem GST-PID1-Fusionsprotein und den LRP1-IZD-Proteinen. Anschließend wurde in einer Western Blot-Analyse die intrazelluläre Domäne von LRP1 mittels des LRP1-spezifischen Antikörpers „Dolly“ (s. 2.1) detektiert und gezeigt, welche der LRP1-IZD-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp mit PID1 interagieren.

In Abbildung 4 sind die Western Blot-Analysen der *Pull-down*-Experimente zur Untersuchung der LRP1/PID1-Interaktion dargestellt. Dabei wurde zunächst untersucht, an welches der beiden NPxY-Motive PID1 bindet. Abbildung 4 B zeigt nun erstens einen *Pull-down* mit dem murinen GST-PID1-Fusionsprotein und zweitens einen Kontroll-*Pull-down* mit dem GST-Protein von muriner Wildtyp-LRP1-IZD und drei weiteren LRP1-IZD-Mutanten, in denen entweder das proximale NPxY-Motiv (N1 = NPTY→AATA) oder das distale NPxY-Motiv (N2 = NPVY→AAVA) oder beide NPxY-Motive (N1/2 = NPTY→AATA, NPVY→AAVA) mutiert sind (vgl. Abb. 4 A). Dabei stellt sich heraus, dass nur die Wildtyp-LRP1-IZD und die LRP1-IZD-Mutante N1 an PID1 binden, während die LRP1-IZD-Mutanten N2 und N1/2, in denen das distale NPxY-Motiv mutiert ist, nicht mehr mit PID1 interagieren können. Erwartungsgemäß interagieren in dem Kontroll-*Pull-down* weder die Wildtyp-LRP1-IZD noch die LRP1-IZD-Mutanten mit dem GST-Protein. PID1 bindet folglich wie auch die meisten anderen PTB-Adapterproteine an das distale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1. Bei dem distalen NPxY-Motiv handelt es sich um ein FxNPxY-Internalisierungsmotiv (Chen, Goldstein und Brown 1990), das auch in der intrazellulären Domäne des LDL-Rezeptors zu finden ist und über das beispielsweise die Interaktion mit ARH stattfindet (He et al. 2002).

Die humanen PID1-Isoformen MWQP, MPRI (Abb. 4 C) und MFSL (Abb. 5 A) interagieren ebenfalls mit der murinen LRP1-IZD und zeigen dabei das gleiche Bindungsverhalten. Ebenso interagiert die humane LRP1-IZD mit dem murinen PID1 (Abb. 4 D). Die LRP1/PID1-Interaktion ist somit Spezies- und Isoform-unabhängig.

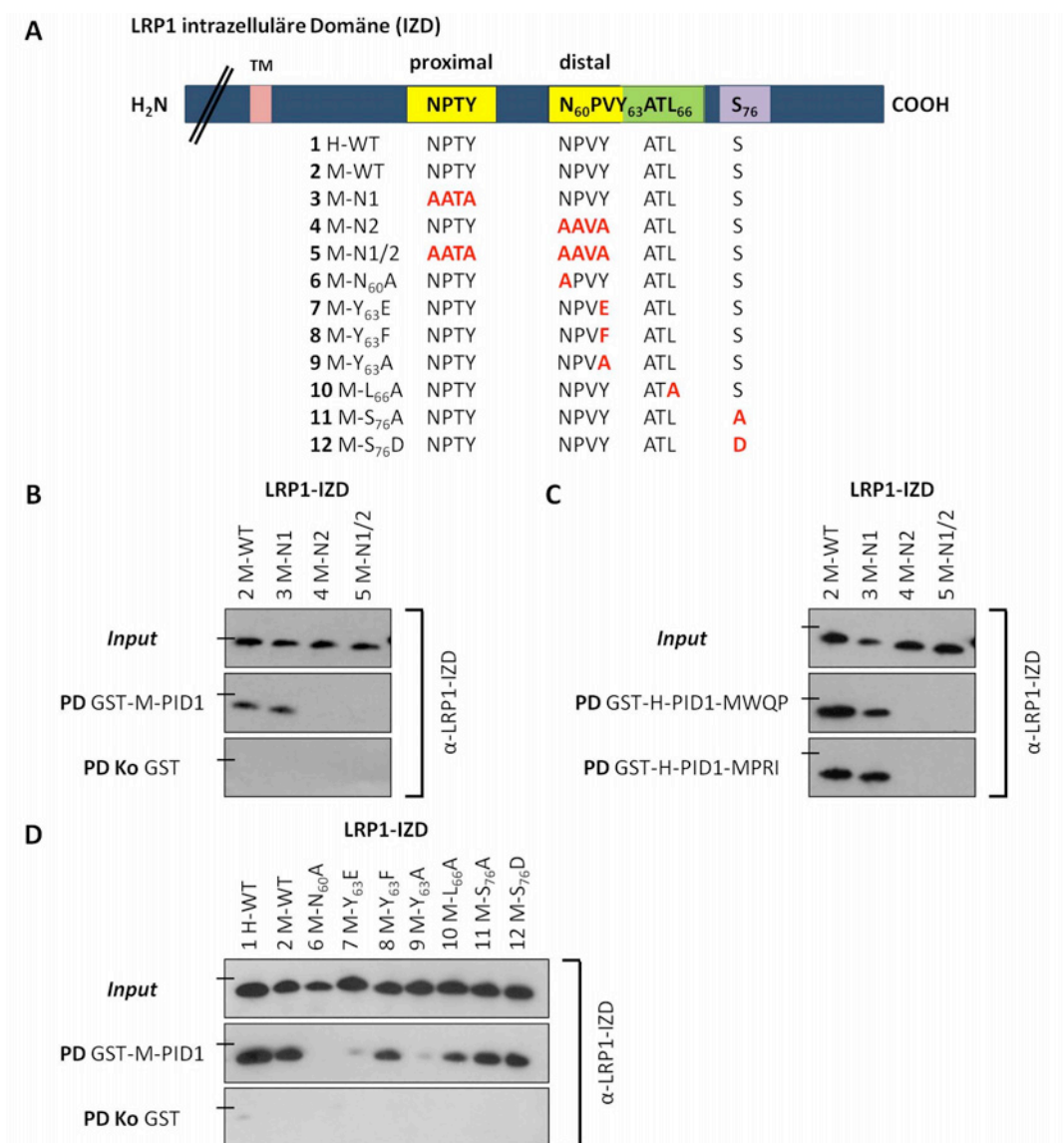


Abbildung 4: **PID1 interagiert mit dem distalen NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1.** **A** zeigt die Proteinsequenzen der Adapterbindungsmotive der humanen (H) und murinen (M) Wildtyp-LRP1-IZD und der murinen LRP1-IZD-Mutanten, die in **B**, **C** und **D** verwendet wurden. Motive: NPTY = Asparagin-Prolin-Threonin-Tyrosin, NPVY = Asparagin-Prolin-Valin-Tyrosin, YATL = Tyrosin-Alanin-Threonin-Leucin, S = Serin; ausgetauschte Aminosäuren: A = Alanin, D Asparaginsäure, E = Glutaminsäure, F = Phenylalanin. **B** und **D** zeigen Western Blot-Analysen von *Pull-down*-Experimenten mit dem murinen GST-PID1-Fusionsprotein und dem GST-Kontrollprotein, während **C** Western Blot-Analysen von *Pull-down*-Experimenten mit den humanen GST-PID1-Fusionsisoformen MWQP und MPRI zeigt. Die intrazelluläre Domäne von LRP1 wurde hierbei mittels des LRP1-spezifischen Antikörpers „Dolly“ detektiert. Sowohl das murine PID1 (**B**) als auch die humanen PID1-Isoformen MWQP und MPRI (**C**) binden an das distale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1, dabei ist sowohl das Asparagin als auch der aromatische Ring des Tyrosins des NPVY-Motivs essentiell für die LRP1/PID1-Interaktion (**D**). Zusätzlich ist ebenfalls das Leucin des YATL-Motivs in die LRP1/PID1-Interaktion involviert (**D**).  $\alpha$  = Anti-IZD = intrazellulären Domäne, PD = *Pull-down*, PD Ko = *Pull-down*-Kontrolle, — = 17 kDa-Bande des Markers RPN800e.

In einem weiteren *Pull-down*-Experiment wurde nun untersucht, welche der Aminosäuren und auch funktionellen Gruppen der Aminosäuren des distalen NPxY-Motivs essentiell für



die Bindung sind. Dazu wurde im distalen NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 zunächst das Asparagin an Position 60 gegen Alanin ( $N_{60}A = NPVY \rightarrow APVY$ ) ausgetauscht. Wie in Abbildung 4 D zu erkennen ist, führt bereits dieser Austausch dazu, dass PID1 nicht mehr mit LRP1 interagieren kann, was die hohe Spezifität von PTB-Domänen für NPxY-Motive zeigt. Desweiteren wurde die Rolle des Tyrosins des NPVY-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 bei der Interaktion mit PID1 untersucht. Tyrosin ist eine Aminosäure mit einem aromatischen Ring, dessen Hydroxygruppe durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen phosphoryliert werden kann. Wie bereits erwähnt, sind PTB-Domänen entweder Phosphotyrosin-abhängig oder -unabhängig, d.h. die Phosphatgruppe bzw. negative Ladung entscheidet darüber, ob eine Interaktion stattfindet oder nicht. Das Tyrosin an Position 63 der intrazellulären Domäne von LRP1 wurde daher gegen verschiedene Aminosäuren ausgetauscht: erstens gegen Alanin ( $Y_{63}A = NPVY \rightarrow NPVA$ ), zweitens gegen Glutaminsäure ( $Y_{63}E = NPVY \rightarrow NPVE$ ), die eine negative Ladung trägt und somit eine Phosphorylierung nachahmen könnte, und drittens gegen Phenylalanin ( $Y_{63}F = NPVY \rightarrow NPVF$ ) (vgl. Abb. 4 A), das wie Tyrosin mit einem aromatischen Ring ausgestattet ist. Abbildung 4 D zeigt, dass im Gegensatz zu der LRP1-IZD-Mutante  $Y_{63}A$  die LRP1-IZD-Mutante  $Y_{63}F$  an PID1 bindet. Der aromatische Ring des Tyrosins des distalen NPxY-Motivs ist folglich essentiell für die LRP1/PID1-Interaktion. Die LRP1-IZD-Mutante  $Y_{63}E$  interagiert ebenfalls nicht mit PID1, was darauf hindeuten könnte, dass eine negative Ladung bzw. eine Phosphorylierung die LRP1/PID1-Interaktion inhibieren könnte. Allerdings könnte die gestörte Interaktion auch auf ein Fehlen des aromatischen Rings in der Aminosäure Glutaminsäure zurückzuführen sein. Ein Einfluss einer Tyrosin-Phosphorylierung auf die LRP1/PID1-Interaktion wird daher in 3.1.2 beschrieben.

Zusätzlich wurde auch ein Einfluss des Internalisierungs- und Sortierungssignals Yxx $\phi$  (Donoso et al. 2009, Li et al. 2000) auf die LRP1/PID1-Bindung untersucht, dazu wurde das Leucin an Position 66 in der intrazellulären Domäne von LRP1 gegen Alanin ausgetauscht ( $L_{66}A = YATL \rightarrow YATA$ ) (vgl. Abb. 4 A). Wie ebenfalls in Abbildung 4.1 D zu sehen ist, bindet die LRP1-IZD-Mutante  $A_{66}$  konstant schwächer an PID1, was darauf hindeutet, dass auch das Yxx $\phi$ -Motiv an der LRP1/PID1-Interaktion partizipieren könnte.

Zuletzt wurde ein Einfluss der PKA-Serin-Phosphorylierungsstelle an Position 76, die eine Rolle in der Endozytose von LRP1 spielt (Li et al. 2001\_1), auf die LRP1/PID1-Interaktion untersucht. Dazu wurde das Serin zum einen gegen Alanin (S<sub>76</sub>A) und zum anderen gegen Asparaginsäure (S<sub>76</sub>D) ausgetauscht, um auch hier eine Phosphorylierung mittels einer negativen Ladung nachzuahmen. Allerdings hat weder das Fehlen des Serins noch eine „nachgeahmte“ Serin-Phosphorylierung an Position 76 in der intrazellulären Domäne von LRP1 einen Einfluss auf die Interaktion mit PID1, wie Abbildung 4 D darstellt.

PID1 bindet somit an das distale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1. Zusätzlich ist das YxxL-Motiv, das das distale NPxY-Motiv carboxyterminal überlappt, an der LRP1/PID1-Interaktion beteiligt.

### **3.1.2 Tyrosin-Phosphorylierung des distalen NPxY-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 hemmt die Interaktion mit PID1**

Adapterproteine, die eine PTB-Domäne aufweisen, werden in Phosphotyrosin-abhängig und -unabhängig eingeteilt, d.h. manche PTB-Domänen brauchen, um affin binden zu können, eine Tyrosin-Phosphorylierung des NPxY-Motivs ihres Peptidliganden, während andere nur an ein nicht-Tyrosin-phosphoryliertes NPxY-Motiv binden (Review: Uhlik et al. 2004). Die intrazelluläre Domäne von LRP1 weist zwei NPxY-Motive auf. In Abhängigkeit des Phosphorylierungsstatus sind diese Motive nun Interaktionsstellen für spezifische PTB-Adapterproteine, die die Funktion von LRP1 in Endozytose oder Signaltransduktion bestimmen (Barnes, Ackermann und van der Geer 2003, Betts, van der Geer und Komives 2008, Boucher und Gotthardt 2004, Loukinova et al. 2002, Ranganathan et al. 2004, Trommsdorff et al. 1998, Zhang et al. 2008). Die hohe Spezifität von PTB-Adapterproteinen für ein phosphoryliertes bzw. nicht-phosphoryliertes NPxY-Motiv ist folglich von zentraler Bedeutung für die Multifunktionalität von LRP1.

Das distale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 kann durch PDGF-Rezeptor-β (Loukinova et al. 2002, Boucher et al. 2002) oder *connective tissue growth factor* (CTGF)-vermittelt (Yang et al. 2004) bzw. durch die v-Src-Kinase phosphoryliert werden (Barnes, Ackermann, van der Geer 2003). Es wurde zudem gezeigt, dass auch das proximale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 durch die v-Src-Kinase phosphoryliert werden

kann, allerdings nur unter der Bedingung, dass das Tyrosin des distalen NPxY-Motivs entweder phosphoryliert ist oder durch die Aminosäure Glutaminsäure ersetzt ist. Die Phosphorylierung bzw. negative Ladung soll dabei dazu führen, dass das proximale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 mehr exponiert wird (Betts, van der Geer und Komives 2008). Die unterschiedliche Phosphorylierung der beiden NPxY-Motive der intrazellulären Domäne von LRP1 hat funktionelle Relevanz. Beispielsweise wird die Interaktion des Adapterproteins SNX17 mit dem proximalen NPxY-Motiv durch Phosphorylierung des Tyrosins inhibiert, wohingegen das Adapterprotein Shp2 am stärksten bindet, wenn sowohl das proximale als auch das distale NPxY-Motiv phosphoryliert sind (Betts, van der Geer und Komives 2008).

Im vorigen Teil des Kapitels wurde gezeigt, dass das PTB-Adapterprotein PID1 an das nicht-phosphorylierte distale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 bindet. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ein Austausch des Tyrosins im distalen NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 gegen Glutaminsäure, einer Aminosäure, die eine negative Ladung trägt und somit eine Phosphorylierung nachahmen könnte, die Interaktion mit PID1 inhibiert. Eine Tyrosin-Phosphorylierung des distalen NPxY-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 könnte somit die Interaktion mit PID1 hemmen. Deshalb wurde hier der Einfluss einer Tyrosin-Phosphorylierung auf die LRP1/PID1-Interaktion in weiteren *GST-Pull-down*-Experimenten *in vitro* untersucht. Die Tyrosin-Phosphorylierung der intrazellulären Domäne von LRP1 erfolgte dabei durch die v-Src-Kinase (vgl. Abb. 5).

Zunächst wurde untersucht, ob die phosphorylierte intrazelluläre Domäne von LRP1 mit PID1 interagiert. Dazu wurden *Pull-downs* von muriner nicht-phosphorylierter und phosphorylierter intrazellulärer Domäne von LRP1 erstens mit dem murinen GST-PID1-Fusionsprotein, zweitens mit der humanen GST-PID1-Fusionsisoform MFSL und drittens als Kontrolle mit dem GST-Protein durchgeführt (Abb. 5 A). Bei der v-Src-Kinase-vermittelten Phosphorylierung konnte aus technischen Problemen immer nur ein Teil der intrazellulären Domänen von LRP1 phosphoryliert werden. In der Western Blot-Analyse wurde daher nicht nur der *IZD-Input* und der *GST-PID1-Pull-down* untersucht, sondern auch der Überstand, d.h. die intrazelluläre Domäne von LRP1, die im *Pull-down* nicht an die GST-PID1-Fusionsproteine bindet. Dabei wurde zum einen die nicht-phosphorylierte und phosphorylierte intrazelluläre

Domäne von LRP1 mittels des LRP1-spezifischen Antikörpers „Dolly“ detektiert (s. Abb. 5 A, obere Blots), zum anderen die phosphorylierte intrazelluläre Domäne von LRP1 mittels eines Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers (s. Abb. 5 A, untere Blots).

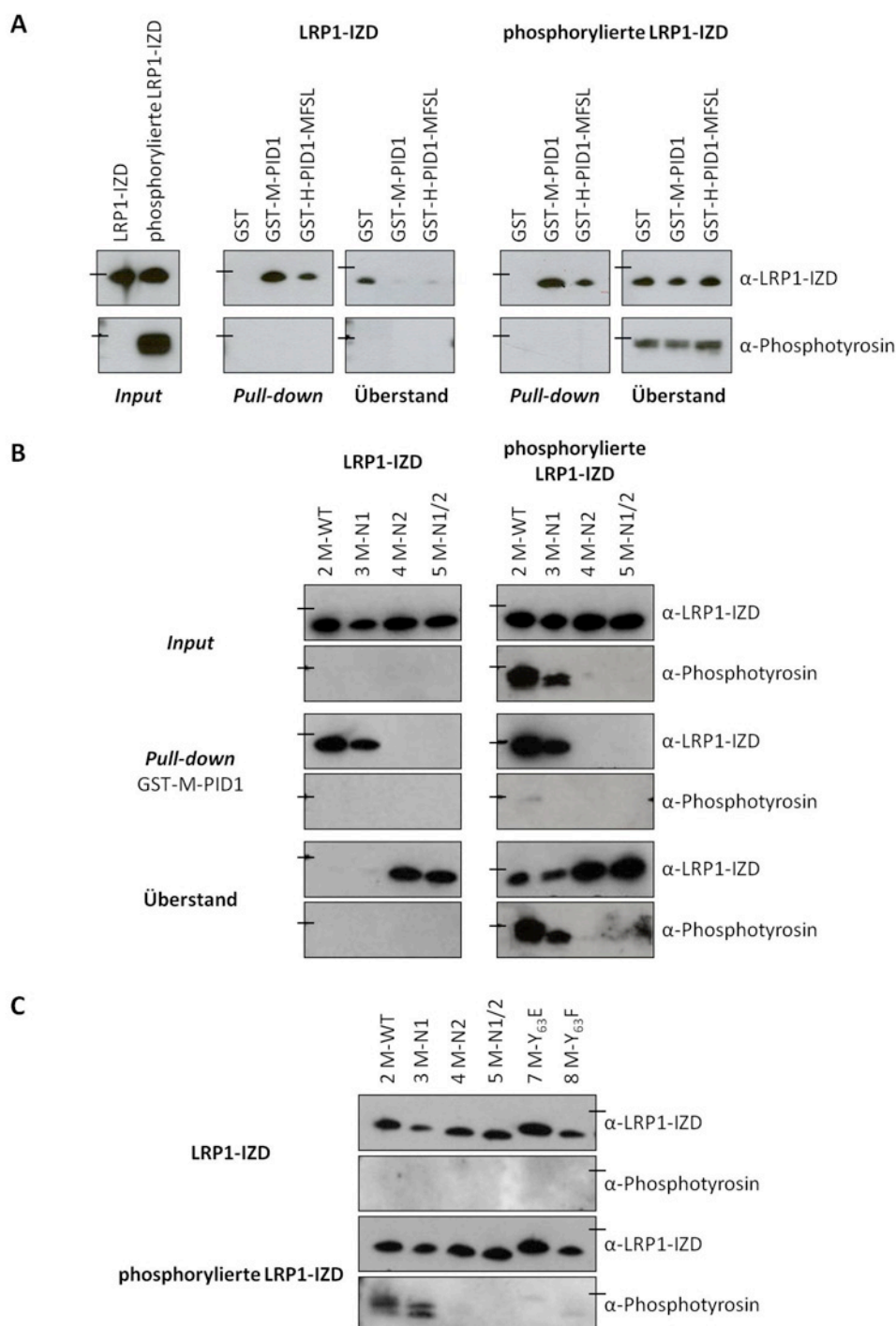


Abbildung 5: Eine v-Src-Kinase-vermittelte Phosphorylierung des Tyrosins des distalen NPxY-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 inhibiert die Interaktion mit PID1. Zur Analyse der Tyrosin-Phosphorylierung der NPxY-Motive und des Einflusses auf die LRP1/PID1-Interaktion wurde die murine (M) Wildtyp-LRP1-IZD (A, B, C) und die murinen LRP1-IZD-NPxY-Mutanten (B, C) (vgl. Abb. 4 A) mittels der v-Src-Kinase phosphoryliert. A zeigt eine Western Blot-Analyse des Pull-downs von

unbehandelter sowie von phosphorylierter Wildtyp-LRP1-IZD mit dem murinen GST-PID1-Fusionsprotein, der humanen GST-PID1-Fusionsisoform MFSL und dem GST-Kontrollprotein und **B** die *Pull-downs* von unbehandelter sowie von phosphorylierter Wildtyp-LRP1-IZD und den LRP1-IZD-NPXY-Mutanten N1, N2 und N1/2 (vgl. Abb. 4 A) mit dem murinen GST-PID1-Fusionsprotein. Bei der v-Src-Kinase-vermittelten Phosphorylierung wurde immer nur ein Teil der intrazellulären Domäne von LRP1 phosphoryliert, daher wurde hier der IZD-Input, der GST-PID1-*Pull-down* und der Überstand des *Pull-downs* untersucht (**A** und **B**). Die nicht-phosphorylierte und die phosphorylierte intrazelluläre Domäne von LRP1 wurde mittels des LRP1-spezifischen Antikörpers „Dolly“ detektiert, während die phosphorylierte intrazelluläre Domäne von LRP1 mittels des Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers „4G10“ detektiert wurde (**A**, **B**, **C**). Die *Pull-down*-Experimente in **A** und **B** zeigen, dass eine v-Src-Kinase-vermittelte Phosphorylierung des distalen NPXY-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 zur Inhibition der Interaktion mit PID1 führt. Die phosphorylierte intrazelluläre Domäne von LRP1 bindet nicht an das GST-PID1-Fusionsprotein, sondern verbleibt im Überstand. **B** und **C** zeigen zusätzlich, dass das distale NPXY-Motiv der intrazellulären Domäne durch die v-Src-Kinase phosphoryliert wird, während das proximale NPXY-Motiv nicht phosphoryliert wird bzw. dessen Phosphorylierung von der des distalen NPXY-Motivs abhängig sein könnte. ) = 17 kDa-Bande des Markers RPN800e.

Der GST-PID1-*Pull-down* von nicht-phosphorylierter intrazellulärer Domäne von LRP1 zeigt hier, wie bereits beschrieben, dass die intrazelluläre Domäne von LRP1 sowohl mit dem murinen PID1 als auch mit der humanen PID1-Isoform MFSL interagiert, während sie nicht an das GST-Kontrollprotein bindet und im Überstand verbleibt (Abb. 5 A, linke obere Blots). Da die intrazelluläre Domäne von LRP1 hier nicht phosphoryliert wurde, kann sie auch nicht mittels eines Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers detektiert werden (Abb. 5 A, linke untere Blots). Dagegen zeigt der GST-PID1-*Pull-down* mit phosphorylierter intrazellulärer Domäne von LRP1 nach Detektion von LRP1, dass ein Teil der intrazellulären Domänen von LRP1 an die GST-PID1-Fusionsproteine bindet, während ein anderer Teil im Überstand verbleibt (Abb. 5 A, rechte obere Blots). Interessanterweise bindet die phosphorylierte intrazelluläre Domäne von LRP1 weder an die GST-PID1-Fusionsproteine noch an das GST-Protein, sondern sie verbleibt im Überstand, wie die Detektion von phosphorylierter intrazellulärer Domäne von LRP1 zeigt (Abb. 5 A, rechte untere Blots). Daraus kann gefolgert werden, dass nur ein Teil der intrazellulären Domänen von LRP1 durch die v-Src-Kinase phosphoryliert wurden und es sich somit bei diesem Teil, der an die GST-PID1-Fusionproteine bindet, um nicht-phosphorylierte intrazelluläre Domäne von LRP1 handelt. Das *Pull-down*-Experiment zeigt somit, dass eine v-Src-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung der intrazellulären Domäne von LRP1 die Interaktion mit PID1 inhibiert, dabei zeigen das murine PID1 und die humane PID1-Isoform MFSL das gleiche Bindungsverhalten.

Als nächstes wurde analysiert, wie die beiden NPxY-Motive der intrazellulären Domäne von LRP1 durch die v-Src-Kinase phosphoryliert werden (vgl. auch Abb. 5 C) und welche funktionelle Relevanz das für die LRP1/PID1-Interaktion hat. Dazu wurden GST-Maus-PID1-*Pull-down*-Experimente mit der murinen Wildtyp-LRP1-IZD und den LRP1-IZD-Mutanten N1, N2 und N1/2, in denen entweder das proximale oder/und das distale NPxY-Motiv mutiert wurden (vgl. Abb. 4 A), durchgeführt (Abb. 5 B). Die Wildtyp-LRP1-IZD sowie die LRP1-IZD-Mutanten N1, N2 und N1/2 wurden dabei entweder unbehandelt gelassen (Abb. 5 B, linke Blots) oder durch die v-Src-Kinase phosphoryliert (Abb. 5 B, rechte Blots). Die in Abbildung 5 B gezeigten linken Blots reproduzieren hier, wie in 3.1 beschrieben, dass PID1 mit dem nicht-phosphorylierten distalen NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 interagiert. Nur die Wildtyp-LRP1-IZD und die LRP1-IZD-Mutante N1 binden an das GST-PID1-Fusionsprotein, während die LRP1-IZD-Mutanten N2 und N1/2, die ein mutiertes distales NPxY-Motiv aufweisen, nicht an das GST-PID1-Fusionsprotein binden und im Überstand verbleiben. Da die Wildtyp-LRP1-IZD und die LRP1-IZD-Mutanten hier nicht durch v-Src-Kinase phosphoryliert wurden, kann auch keine phosphorylierte intrazelluläre Domäne von LRP1 mittels eines Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden.

Der Input der phosphorylierten intrazellulären Domäne von LRP1 (Abb. 5 B, rechte Blots und vgl. Abb. 5 C) zeigt, dass nur die Wildtyp-LRP1-IZD und die LRP-IZD-Mutante N1, die ein mutiertes proximales NPxY-Motiv aufweist, durch die v-Src-Kinase phosphoryliert werden können. Die LRP1-IZD-Mutante N2 mit einem defekten distalen NPxY-Motiv kann dagegen nicht phosphoryliert werden, wie auch erwartungsgemäß die LRP1-IZD-Mutante N1/2 mit zwei mutierten NPxY-Motiven. Im Umkehrschluss bedeutet das zunächst, dass die v-Src-Kinase das Tyrosin des distalen NPxY-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 phosphoryliert. Das proximale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 kann demnach entweder nicht durch die v-Src-Kinase phosphoryliert werden oder dessen Phosphorylierung scheint, wie auch in der Literatur beschrieben, von der Tyrosin-Phosphorylierung des distalen NPxY-Motivs abhängig zu sein. D.h. die Phosphorylierung des distalen NPxY-Motivs führt zur Exposition des proximalen NPxY-Motivs und ermöglicht in der Folge dessen Phosphorylierung. Vergleicht man die Banden der phosphorylierten Wildtyp-LRP1-IZD und der LRP-IZD-Mutante N1, fällt auf, dass die Bande der Wildtyp-LRP1-IZD etwas höher läuft und wesentlich stärker ist. Dies könnte zum einen darauf zurückzuführen sein,

dass in der Wildtyp-LRP1-IZD auch das proximale NPxY-Motiv phosphoryliert ist und dass durch die zusätzliche negative Ladung das Protein höher läuft. Zum anderen könnte es sein, dass auch nur die Wildtyp-LRP1-IZD, die sowohl ein intaktes proximales als auch ein intaktes distales NPxY-Motiv enthält, effizient am distalen NPxY-Motiv phosphoryliert werden kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des proximalen NPxY-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 ebenfalls möglich ist, wenn das Tyrosin des distalen NPxY-Motivs durch die Aminosäure Glutaminsäure ersetzt wird, die eine negative Ladung trägt und folglich eine Phosphorylierung nachahmen könnte (Betts, van der Geer und Komives 2008). Wie Abbildung 5 C zeigt, konnten diese Daten hier nicht reproduziert werden. Sowohl die Phosphorylierung der LRP1-IZD-Mutante Y<sub>63</sub>E, in der das Tyrosin des distalen NPxY-Motivs gegen Glutaminsäure ausgetauscht wurde (vgl. Abb. 4 A), als auch die der LRP1-IZD-Mutante Y<sub>63</sub>F, in der das Tyrosin des distalen NPxY-Motivs gegen Phenylalanin ausgetauscht wurde (vgl. Abb. 4 A), liefert zwei ganz schwache Banden. Da in diesen LRP1-IZD-Mutanten das Tyrosin des distalen NPxY-Motivs modifiziert ist, kann das positive Signal nur auf die Phosphorylierung des proximalen NPxY-Motivs zurückzuführen sein. Allerdings führt der Austausch von Tyrosin gegen Glutaminsäure im distalen NPxY-Motiv auch im Vergleich zum Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin anscheinend nicht zur Nachahmung einer Phosphorylierung und somit zur Exposition des proximalen NPxY-Motivs. Vielmehr scheint bei den LRP1-IZD-Mutanten Y<sub>63</sub>E und Y<sub>63</sub>F, die ein weitgehend intaktes distales NPxY-Motiv aufweisen, das proximale NPxY-Motiv etwas exponierter zu sein als bei der LRP1-IZD-Mutante N2.

Desweiteren stellt der GST-PID1-*Pull-down* von phosphorylierter Wildtyp-LRP1-IZD und den LRP1-IZD-Mutanten N1, N2 und N1/2 in Abbildung 5 B dar, dass eine Tyrosin-Phosphorylierung des distalen NPxY-Motivs der Wildtyp-LRP1-IZD und der N1-LRP1-IZD-Mutante zu einer Inhibition der LRP1/PID1-Interaktion führt. Das Adapterprotein PID1 gehört somit zu den Phosphotyrosin-unabhängigen Dab-ähnlichen PTB-Domänen.

### 3.1.3 Die Gewinnung eines PID1-spezifischen Antikörpers als Werkzeug zur Analyse der LRP1/PID1-Interaktion *in vivo*

Sowohl zur Analyse der endogenen LRP1/PID1-Bindung d.h. der Interaktion *in vivo* als auch zur Feststellung der zellulären Lokalisation von PID1 vorzugsweise in primären Hepatozyten, sollte ein Maus-spezifischer Antikörper gegen PID1 gewonnen werden. Dazu sollte das murine PID1 als GST-Fusionsprotein in Bakterien exprimiert werden, das GST-Tag anschließend mittels der *PreScission Protease* entfernt werden und die Firma Pineda in Berlin mit der Immunisierung von Kaninchen mit dem PID1-Protein zur Gewinnung eines polyklonalen Maus-spezifischen Antikörpers gegen PID1 beauftragt werden. Allerdings gelang es vermutlich aufgrund der Struktur des GST-PID1-Fusionproteins nicht, das GST-Protein effizient vom GST-PID1-Fusionsprotein enzymatisch abzuschneiden. Aufgrund der hohen Immunogenität des GST-Proteins wurde jedoch auf eine Immunisierung mit dem GST-PID1-Fusionsprotein verzichtet und die Generierung eines polyklonalen Peptid-Antikörpers gegen PID1 bevorzugt. Ein Peptid-Antikörper hat dabei zusätzlich den Vorteil, dass zuvor bei einer Epitopanalyse eine bestimmte Aminosäuresequenz des Proteins ausgewählt werden kann, während bei einer Immunisierung mit einem Protein beliebige Epitope erkannt werden. Im Fall von PID1 sollte die Sequenz des Peptids möglichst nicht innerhalb der PTB-Domäne liegen, die im Exon 3 des PID1-Gens codiert ist, da bei einer Interaktionsanalyse die Bindung des Antikörpers in der PTB-Domäne von PID1 die Interaktion mit LRP1 inhibieren könnte. Die humanen PID1-Isoformen unterscheiden sich nur im ersten Exon. Daher hätte die Auswahl einer Peptidsequenz aus dem exprimierten Exon 2 des murinen PID1 den Vorteil, dass falls der Maus-spezifische PID1-Peptid-Antikörper trotz kleiner Unterschiede in der Proteinsequenz zwischen dem murinen und dem humanen PID1 ebenfalls humanspezifisch ist, er auch gleichzeitig Isoform-unabhängig ist (Abb. 6). Für die Epitopanalyse wurde folglich der Sequenzbereich des exprimierten Exons 2 (Aminosäuren 10 bis 60) ausgewählt, wobei ein mögliches Epitop (**LMKA**, Aminosäure 49 – 52) ermittelt und das entsprechende 15 Aminosäuren lange Peptid LCTTTP**LMK**ARTHSG zur Antikörpergewinnung abgeleitet werden konnte. Dabei gilt je mehr fettgedruckte Aminosäuren die ermittelte Sequenz enthält, desto relevanter ist sie für die Gewinnung eines Antikörpers (Abb. 6).



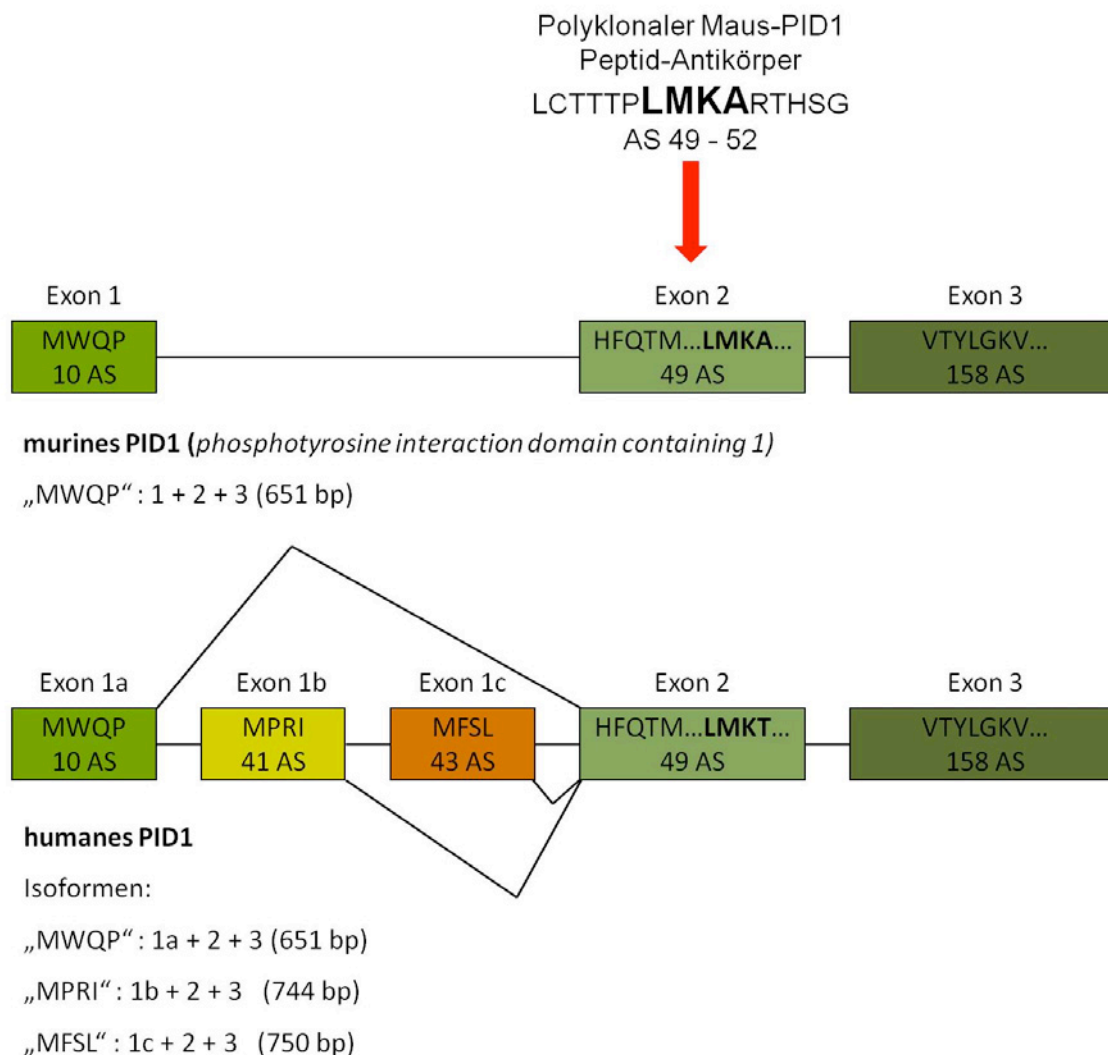


Abbildung 6: **Die Gewinnung eines polyklonalen Kaninchen-Anti-Maus-PID1-Peptid-Antikörpers.** Im Gegensatz zum murinen PID1 weist das humane PID1 drei Isoformen (MWQP, MPRI und MFSL) auf, wobei sich diese nur im Exon 1 unterscheiden und die Exons 2 und 3 teilen. Das für die Gewinnung eines Anti-Maus-PID1-Peptid-Antikörpers bei einer Eitopanalyse ermittelte 15 Aminosäuren lange Peptid entspricht der Sequenz der Aminosäuren 43 – 57 des exprimierten Exons 2 des murinen PID1. Die humanen PID1-Isoformen unterscheiden sich in diesem Bereich in nur einer Aminosäure im Vergleich zum murinen PID1 (Maus: LCTTTP**LMKA**RTHSG → Mensch: LCTTTP**LMKTR**RTHSG), weshalb eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass der Peptid-Antikörper auch humanspezifisch und folglich auch Isoform-unabhängig ist. Bei der Eitopanalyse gilt je mehr fettgedruckte Aminosäuren die ermittelte Sequenz enthält, desto relevanter ist sie für die Gewinnung eines Antikörpers (hier: **LMKA**, AS 49 – 52).

Der polyklonale Kaninchen-Anti-Maus-PID1-Peptid-Antikörper wurde nach der Gewinnung mittels Western Blot-Analysen und Immunpräzipitation getestet. Dabei stellte sich heraus, dass der Peptid-Antikörper sowohl murines überexprimiertes PID1 (Daten nicht gezeigt) und Flag-PID1-Fusionsprotein (vgl. 7 A b und e, 9 B) als auch die humanen GST-PID1-Fusionsisoformen MWQP, MPRI und MFSL (Daten nicht gezeigt) in Western Blot-Analysen

detektiert, obwohl sich das murine und humane PID1 in einer Aminosäure der Epitopsequenz unterscheiden (Maus: LMKA → Mensch: LMKT, AS 49 – 52; vgl. Abb. 6). Allerdings ist es nicht möglich, endogenes PID1 in einer Western Blot-Analyse zu detektieren, was darauf zurückzuführen ist, dass der Peptid-Antikörper zusätzlich ein Protein erkennt, welches das gleiche Molekulargewicht wie PID1 aufweist. Außerdem kann durch den Peptid-Antikörper weder endogenes noch überexprimiertes PID1 immunpräzipitiert werden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass der Peptid-Antikörper nur an die primäre Aminosäuresequenz des entfalteten Proteins bindet, da sich das Epitop beispielsweise nicht an der Proteinoberfläche befindet. Eine Affinitätsreinigung des Peptid-Antikörpers mithilfe des GST-PID1-Fusionsproteins lieferte leider keine spezifischere Bindung des Peptid-Antikörpers, sondern zeigte in Western Blot-Analysen vielmehr, dass das Epitop, an welches der Peptid-Antikörper bindet, vermutlich einer Sequenz entspricht, die vielen Proteinen gemeinsam ist.

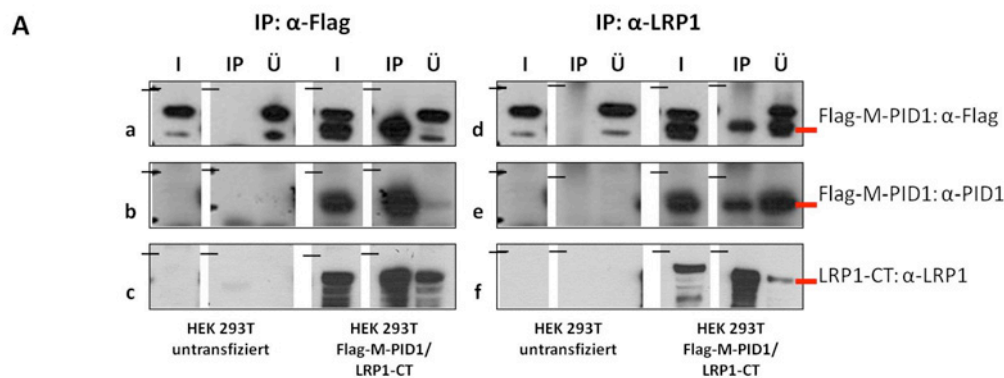
Eine Immunpräzipitation von endogenem PID1 und eine mögliche Koimmunpräzipitation von LRP1 zur Bestätigung der Interaktion *in vivo* sowie die zelluläre Lokalisation von endogenem PID1 konnte in dieser Arbeit aufgrund des nur begrenzt einsetzbaren Anti-PID1-Peptid-Antikörpers daher nicht gezeigt werden.

### **3.1.4 LRP1 interagiert mit PID1 in HEK 293T-Zellen**

Die Gewinnung eines PID1-spezifischen Antikörpers, der eine Untersuchung der endogenen LRP1/PID1-Interaktion erlaubt, war, wie in 3.1.3 beschrieben, nicht möglich. Daher beschreibt dieser Teil des Kapitels die LRP1/PID1-Interaktion nach Überexpression von LRP1 und eines Flag-PID1-Fusionsproteins in HEK (*human embryonic kidney*) 293T-Zellen, die nur sehr geringe Mengen von LRP1 und PID1 exprimieren.

Die Interaktion wurde zunächst mittels Immunpräzipitation untersucht (vgl. 7 A). Dazu wurden HEK 293T-Zellen entweder mit dem LRP1-Konstrukt LRP1-CT (LRP1-Carboxy-Terminus, ca. 65 kDa), das aus einem Teil der extrazellulären Domäne, der Transmembrandomäne und der intrazellulären Domäne der 85 kDa leichten  $\beta$ -Kette von LRP1 besteht, und murinem Flag-PID1 kotransfiziert (Abb. 7 A a-f, rechte Blots) oder zur Kontrolle untransfiziert gelassen (Abb. 7 A a-f, linke Blots). Anschließend wurde der

überexprimierte C-terminale Teil von LRP1 durch den Anti-LRP1-Antikörper „Dolly“, der an Protein G-Sepharose gebunden wurde, immunpräzipitiert (Abb. 7 A f), während das Flag-PID1-Fusionsprotein mittels des Maus-Anti-Flag-Antikörpers „M2“, der kovalent an ein Agarosegel gebunden ist, immunpräzipitiert wurde (Abb. 7 A a und b). Gleichzeitig wurde dabei untersucht, ob eine Koimmunpräzipitation des C-terminalen Teils von LRP1 durch den Flag-spezifischen Antikörper „M2“ (Abb. 7 A c) und des Flag-PID1-Fusionsproteins durch den LRP1-spezifischen Antikörper „Dolly“ (Abb. 7 A d und e) möglich ist und somit eine LRP1/PID1-Interaktion in HEK 293T-Zellen nachgewiesen werden kann. In der Western Blot-Analyse wurde der C-terminale Teil von LRP1 mittels der Anti-LRP1-Antikörper „Dolly“ (Abb. 7 A c) und „11H4“ (Abb. 7 A f) detektiert, während das Flag-PID1-Fusionsprotein zum einen mittels eines Kaninchen-Anti-Flag-Antikörpers (Abb. 7 A a und d) und zum anderen mittels des Anti-PID1-Peptid-Antikörpers (Abb. 7 A b und e) detektiert wurde.



**Abbildung 7 A: LRP1 interagiert mit PID1 in HEK 293T-Zellen.** Die LRP1/PID1-Interaktion wurde in HEK 293T-Zellen nach Überexpression von LRP1-CT (LRP1-Carboxy-Terminus, ca. 65 kDa) und dem murinen (M) Flag-PID1-Fusionsprotein (ca. 25 kDa) mittels Koimmunpräzipitation untersucht. Die Western Blot-Analyse in **a**, **b** und **c** zeigt die Immunpräzipitation mit dem Anti-Flag-M2-Agarosegel, die in **d**, **e** und **f** dagegen die mit dem LRP1-spezifischen Antikörper „Dolly“, der an Protein G-Sepharose gebunden wurde. Die Immunpräzipitation wurde sowohl mit Lysaten von LRP1-CT/Flag-PID1-kotransfizierten Zellen (rechte Blots) als auch zur Kontrolle mit untransfizierten Zellen (linke Blots) durchgeführt. Der Input (**I**) zeigt das Zelllysate vor der Immunpräzipitation (**IP**) und der Überstand (**Ü**) das Lysat nach der IP. Flag-PID1 wurde zum einen durch einen Kaninchen-Anti-Flag-Antikörper (**a** und **d**) und zum anderen durch den PID1-spezifischen Peptid-Antikörper detektiert (**b** und **e**), während LRP1-CT mittels des LRP1-spezifischen Antikörpers „Dolly“ (**c**) oder des LRP1-spezifischen Antikörpers „11H4“ (**f**) detektiert wurde. Wie die Blots zeigen, ist eine Selbst-IP von Flag-PID1 mittels des Anti-Flag-Antikörpers M2 (**a** und **b**) sowie von LRP1-CT mittels des Anti-LRP1-Antikörpers „Dolly“ (**f**) möglich. Gleichzeitig kann ebenfalls LRP1-CT durch den Flag-spezifischen Antikörper „M2“ koimmunpräzipitiert werden (**c**) sowie Flag-PID1 mittels des LRP1-spezifischen Antikörpers „Dolly“ (**d** und **e**). Eine LRP1/PID1-Interaktion kann folglich nach Koexpression von LRP1-CT und Flag-PID1 in HEK 293T-Zellen mittels Koimmunpräzipitation nachgewiesen werden. Die spezifischen Banden sind durch rote Striche markiert. **a**, **b** und **c** — = 38 kDa-Bande des Markers RPN800e; **d**, **e** und **f** — = 76 kDa-Bande des Markers RPN800e.

Abbildung 7 A a-c zeigt nun, dass das Flag-PID1-Fusionsprotein durch den Flag-spezifischen Antikörper „M2“ immunpräzipitiert werden kann, wie die Detektion von Flag-PID1 sowohl durch den Anti-Flag-Antikörper (Abb. 7 A a), als auch durch den PID1-spezifischen Peptid-Antikörper (Abb. 7 A b) zeigt. Zusätzlich ist eine Koimmunpräzipitation des C-terminalen Teils von LRP1 durch den Flag-spezifischen Antikörper „M2“ möglich, wie die Detektion von LRP1 zeigt (Abb. 7 A c). Andererseits zeigt die Immunpräzipitation mit dem LRP1-spezifischen Antikörper „Dolly“ (Abb. 7 A d-f), dass der C-terminale Teil von LRP1 mittels des LRP1-spezifischen Antikörpers „Dolly“ immunpräzipitiert und in der Western Blot-Analyse mit dem Anti-LRP1-Antikörper „11H4“ nachgewiesen werden kann (Abb. 7 A f). Zudem ist hier ebenso eine Koimmunpräzipitation des Flag-PID1-Fusionsproteins mithilfe des LRP1-spezifischen Antikörpers „Dolly“ möglich, wie die Detektion von Flag-PID1 mittels des Kaninchen-Anti-Flag-Antikörpers (Abb. 7 A d) sowie des Anti-PID1-Peptid-Antikörpers (Abb. 7 A e) in der Western Blot-Analyse zeigt. Eine LRP1/PID1-Interaktion kann folglich nach Koexpression des C-terminalen Teils von LRP1 und des Flag-PID1-Fusionsproteins in HEK 293T-Zellen nachgewiesen werden.

Als nächstes wurde die LRP1/PID1-Interaktion in HEK 293T-Zellen mittels einer Immunfluoreszenzanalyse untersucht (Abb. 7 B). Dazu wurde in HEK 293T-Zellen das Flag-PID1-Fusionsprotein und zusätzlich entweder das Wildtyp-LRP1 (Abb. 7 B a, grün), die LRP1-Mutante N<sub>26</sub>A (Abb. 7 B b, grün), die ein defektes proximales NPxY-Motiv aufweist, oder die LRP1-Mutante N<sub>60</sub>A (Abb. 7 B c, grün), die ein defektes distales NPxY-Motiv aufweist, als eGFP-Fusionsproteine koexprimiert. In einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung wurde danach in den HEK 293T-Zellen das Flag-PID1-Fusionsprotein zunächst mittels des Maus-Anti-Flag-Antikörpers „M2“ detektiert und anschließend durch einen sekundären fluoreszierenden Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, markiert (rot, Abb. 7 B a, b und c). Wie in Abbildung 7 B zu sehen ist, wurden die Zellen schließlich mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Dabei zeigt die Übereinanderlagerung (*merge*) der Signale, dass in Zellen, die eine Koexpression von Flag-PID1 und von Wildtyp-LRP1-eGFP (Abb. 7 B a, *merge*) oder von der Mutante LRP1-N<sub>26</sub>A-eGFP (Abb. 7 B b, *merge*) aufweisen, zum einen, dass LRP1 und PID1 kolokalisieren und zum anderen, dass PID1 die gleiche Verteilung wie LRP1 aufweist. Dagegen ist Flag-PID1 in Zellen, die kein LRP1 (Abb. 7 B a und b) oder die Mutante LRP1-N<sub>60</sub>A-eGFP (Abb. 7 B c) mit einem defekten distalen NPxY-

Motiv exprimieren, in allen Kompartimenten verteilt, was auf die fehlende Interaktion mit LRP1 zurückzuführen ist.

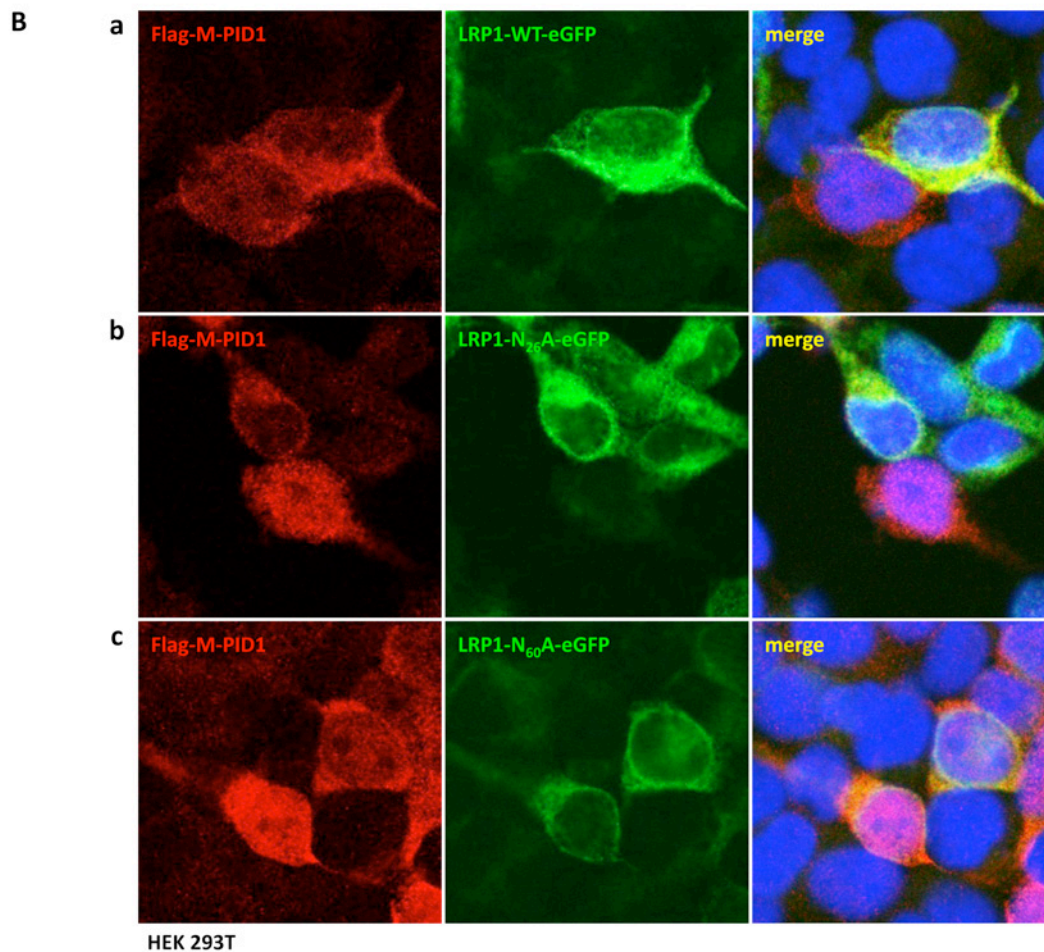


Abbildung 7 B: **LRP1 interagiert mit PID1 in HEK 293T-Zellen.** Die LRP1/PID1-Interaktion wurde ebenfalls in HEK 293T-Zellen mittels einer Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Dazu wurde in HEK 293T-Zellen Flag-PID1 (rot) und zusätzlich entweder das Wildtyp-LRP1 (**a**, grün), die LRP1-Mutante N<sub>26</sub>A mit einem defekten proximalen NPxY-Motiv (**b**, grün) oder die LRP1-Mutante N<sub>60</sub>A mit einem defekten distalen NPxY-Motiv (**c**, grün) als eGFP-Fusionsproteine koexprimiert. Flag-PID1 wurde dann in einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung durch den Maus-Anti-Flag-Antikörper „M2“ detektiert und mittels eines fluoreszierenden sekundären Antikörpers markiert (**a**, **b** und **c**, rot). Die Zellen wurden anschließend mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Die Übereinanderlagerung (*merge*) der Signale zeigt, dass Flag-PID1 mit dem Wildtyp-LRP1-eGFP (**a**) und der Mutante LRP1-N<sub>26</sub>A-eGFP (**b**) kolokalisiert und die gleiche zelluläre Lokalisation wie LRP1 zeigt, während Flag-PID1 alleine (**a** und **b**) oder in Koexpression mit der Mutante LRP1-N<sub>60</sub>A-eGFP (**c**) in allen Kompartimenten verteilt ist. Die Immunfluoreszenzanalyse bestätigt somit ebenfalls, dass PID1 auch in HEK 293T-Zellen mit dem distalen NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 interagiert.

Die LRP1/PID1-Interaktion kann folglich ebenfalls mittels Immunfluoreszenzanalysen in HEK 293T-Zellen nachgewiesen werden. Leider kann hier keine Aussage über die zelluläre Lokalisation von PID1 getroffen werden, da HEK 293T-Zellen aufgrund ihres kleinen

Zytoplasmas nicht optimal für Lokalisierungsstudien geeignet sind. Die zelluläre Lokalisation von PID1 wurde weiterhin in HeLa-Zellen untersucht (vgl. 3.3.3).

### 3.1.5 LRP1 interagiert mit PID1 in primären Hepatozyten

Dieser Teil des Kapitels beschreibt die Interaktion von PID1 mit endogenem LRP1 in murinen primären Hepatozyten. Zur Analyse der LRP1/PID1-Interaktion *in vivo* wurden GST-PID1-Pull-down-Experimente mit Leberlysaten von im Labor vorhandenen Mäusen durchgeführt, die entweder Wildtyp-LRP1 exprimieren (Abb. 8 A a und c und B a), einen hepatischen LRP1-Knock-out aufweisen (Abb. 8 A b, d) oder die LRP1 mit einem mutierten NPVY-Motiv exprimieren (N2-Knock-in, Abb. 8 B b). Dabei zeigt die Detektion von LRP1 in der Western Blot-Analyse, dass das GST-PID1-Fusionsprotein, auch im Vergleich zu LRP1-defizienten primären Hepatozyten (Abb. 8 A b), an endogenes Wildtyp-LRP1 der Leberzellen bindet (Abb. 8 A a und B a). Weiterhin konnte auch hier bestätigt werden, dass über das distale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 die Interaktion mit PID1 stattfindet, da das GST-PID1-Fusionsprotein nicht mit dem N2-LRP1 interagiert (Abb. 8 B b). Interessanterweise zeigt eine Detektion des LDL-Rezeptors (Abb. 8 A c, d), dass das GST-PID1-Fusionsprotein im Gegensatz zu dem Adapterprotein ARH, das mit bislang unbekannter funktioneller Relevanz an LRP1 bindet (Jones et al. 2003), nicht mit dem LDL-Rezeptor interagiert. Eine NPVY-Motiv-spezifische Interaktion von LRP1 mit PID1 kann somit ebenfalls *in vivo* nachgewiesen werden, dabei stellt sich PID1 weiterhin als spezifisches Adapterprotein von LRP1 heraus.

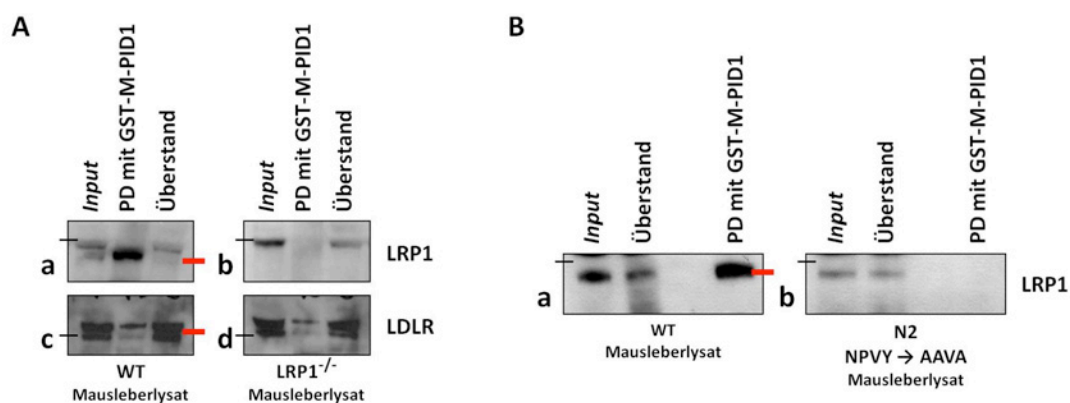


Abbildung 8: **LRP1 interagiert mit PID1 in primären Hepatozyten.** A und B zeigen Western Blot-Analysen nach Pull-down-Experimenten mit dem murinen (M) GST-PID1-Fusionsprotein und Leberlysaten von primären Hepatozyten zur Analyse der LRP1/PID1-Interaktion *in vivo*. A stellt GST-PID1-Pull-downs mit Leberlysaten von Mäusen dar, die entweder eine normale LRP1-Expression (WT) (a und c) oder einen hepatischen LRP1-Knock-out (LRP1<sup>-/-</sup>) (b und d) aufweisen. Die Detektion von LRP1 durch den LRP1-spezifischen Antikörper „Dolly“ (a und b) zeigt, dass endogenes LRP1 mit dem

GST-PID1-Fusionsprotein interagiert (**a**), während LRP1 in den Gewebe-spezifischen LRP1-*Knock-out*-Mäusen nicht exprimiert wird (**b**, vgl. Input) und somit auch nicht mit PID1 interagieren kann (**b**). Wie die Detektion des LDL-Rezeptors (LDLR) mittels eines Maus-LDL-Rezeptor-spezifischen Antikörpers (**c** und **d**) zeigt, interagiert der LDL-Rezeptor nicht mit dem GST-PID1-Fusionsprotein (**c** und **d**). **B** zeigt GST-PID1-*Pull-downs* mit Leberlysaten von Wildtyp-Mäusen (**a**) und von LRP1-N2-*Knock-in* Mäusen, die ein mutiertes distales NPxY-Motiv in der intrazellulären Domäne von LRP1 aufweisen (**b**). Wie die Detektion von LRP1 mittels des LRP1-spezifischen Antikörpers „Dolly“ zeigt (**a** und **b**), bindet nur das endogene Wildtyp-LRP1 an das GST-PID1-Fusionsprotein (**a**), während die Deletion des NPVY-Motivs von LRP1 erwartungsgemäß die Interaktion mit PID1 inhibiert (**b**). Die NPVY-Adapterbindungsmotiv-spezifische Interaktion von LRP1 mit PID1 kann somit auch *in vivo* nachgewiesen werden. Die spezifischen Banden sind durch rote Striche markiert. — = 102 kDa-Bande des Markers RPN800e.

### 3.2 Lentiviral-vermittelte RNA-Interferenz gegen PID1 und ARH in HUH7-Zellen

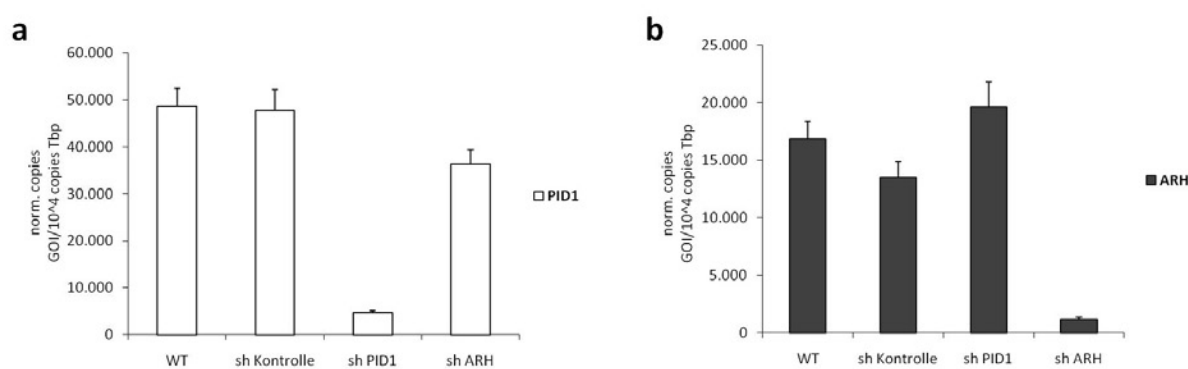
Zur Analyse der Funktion eines Proteins in Zellkultur kann ein Protein durch Transfektion sowohl transient als auch stabil exprimiert sowie auch mittels RNA-Interferenz herunterreguliert werden. Voraussetzung ist allerdings eine hohe Transfektionseffizienz der zu untersuchenden Zellen. In Zellen, die dagegen eine geringe Transfektionseffizienz aufweisen, wird ein Protein meist durch Transduktion, d.h. durch Transport von DNA in eine Zelle mithilfe eines Virus, stabil exprimiert oder herunterreguliert. Dazu werden häufig lentivirale Vektoren verwendet. Charakteristisch für Retroviren, zu denen auch die Lentiviren gehören, ist die Fähigkeit, ihr RNA-Genom während der Replikation in doppelsträngige DNA umzuschreiben, d.h. revers zu transkribieren, um es anschließend stabil in das Wirtsgenom zu integrieren. Dieser retrovirale Gentransfer kann im Labor als Werkzeug zur Übertragung einer bestimmten genetischen Information auf ausgesuchte Zielzellen genutzt werden.

In dieser Arbeit wurde die Funktion des Adapterproteins PID1 nach Herunterregulation von PID1 und als Kontrolle von ARH mittels lentiviraler RNA-Interferenz in der humanen Hepatomazelllinie HUH7 untersucht. Dazu wurden bei der Firma Sigma-Aldrich humanspezifische lentivirale PID1- und ARH-shRNA (*short hairpin* RNA)-DNA-Vektoren gekauft und, wie in 2.2.2.3 beschrieben, zur Herstellung von stabilen PID1- und ARH-defizienten HUH7-Zelllinien genutzt. Die quantitative TaqMan®-PCR in Abbildung 9 A zeigt dazu einen sehr effizienten *Knock-down* von PID1 (Abb. 9 A a) und ARH (Abb. 9 A b) auf RNA-Ebene in HUH7-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-HUH7-Zellen und zu HUH7-Zellen, die stabil eine shRNA exprimieren, die keinen Einfluss auf die Genexpression der HUH7-Zellen haben sollte (sh Kontrolle). Zusätzlich wurde die Herunterregulation von PID1 auf Proteinebene untersucht. Dazu wurde aufgrund eines fehlenden Antikörpers, der endogenes PID1

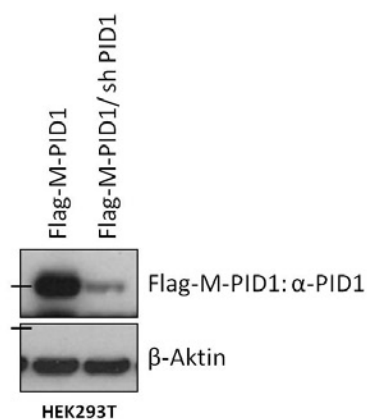


detektiert, murines PID1 als Flag-Fusionsprotein und der lentivirale PID1-shRNA-DNA-Vektor, der eine transiente Expression erlaubt, in HEK 293T-Zellen koexprimiert. Die Detektion des überexprimierten Flag-PID1 in der Western Blot-Analyse erfolgte mithilfe des Anti-PID1-Peptid-Antikörpers (vgl. 3.1.3) und zeigt in Abbildung 9 B einen effizienten siRNA (*small-interfering RNA*)-vermittelten *Knock-down* von Flag-PID1 im Vergleich zu Zellen, die nur das Flag-PID1-Fusionsprotein exprimieren. Zusätzlich zeigt der *Knock-down*, dass die humanspezifische PID1-siRNA auch zur Herunterregulation des murinen PID1 verwendet werden kann.

## A



## B



**Abbildung 9: Lentiviral-vermittelte RNA-Interferenz gegen PID1 und ARH in HUH7-Zellen.** **A** Zur Überprüfung der siRNA-vermittelten Herunterregulation von PID1 und ARH in HUH7-Zellen mittels lentiviralen Gentransfer wurde die Genexpression von PID1 (**a**) und ARH (**b**) auf RNA-Ebene mittels einer quantitativen TaqMan®-PCR in Wildtyp-, Kontroll-, PID1-defizienten und ARH-defizienten HUH7-Zellen gemessen. Wie **A** darstellt, führt die lentiviral-vermittelte RNA-Interferenz zu einem sehr effizienten *Knock-down* von PID1 (**a**) und ARH (**b**) in HUH7-Zellen. **B** Die siRNA-vermittelte Herunterregulation von PID1 wurde ebenfalls auf Proteinebene überprüft. Aufgrund eines fehlenden Antikörpers, der endogenes PID1 detektiert, wurde dazu in HEK 293T-Zellen entweder murines Flag-PID1 alleine exprimiert oder in Kombination mit dem lentiviralen PID1-shRNA-DNA-Vektor koexprimiert. Die Detektion von murinem Flag-PID1 in einer Western Blot-Analyse stellt dar, dass der *Knock-down* von PID1 ebenfalls auf Proteinebene funktioniert. Flag-PID1: — = 31 kDa-Bande des Markers RPN800e. β-Aktin-Ladekontrolle: — = 52 kDa-Bande des Markers RPN800e.



Die hier hergestellten stabilen Kontroll-, PID1-defizienten und ARH-defizienten HUH7-Zellen wurden für alle weiteren, in dieser Arbeit gezeigten Experimente genutzt.

### **3.3 Die Rolle der PTB-Adapterproteine PID1 und ARH bei der Regulation des intrazellulären LRP1-Transports**

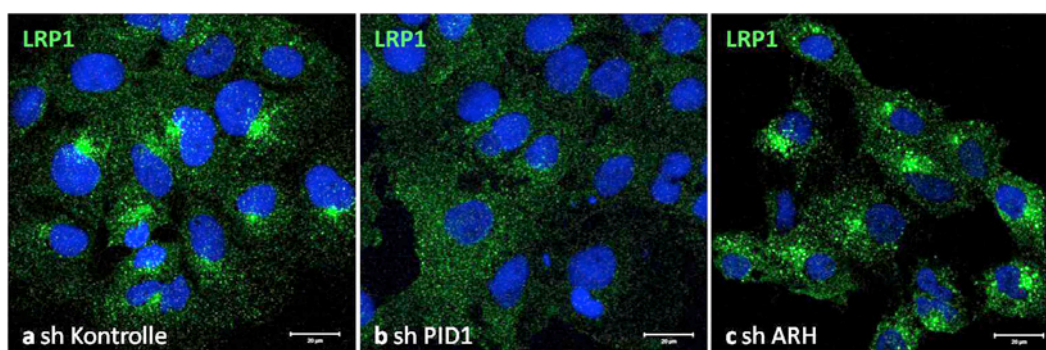
Die intrazelluläre Domäne von LRP1 weist verschiedene Motive wie zwei NPxY-Motive (N<sub>26</sub>PTY<sub>29</sub> und N<sub>60</sub>PVY<sub>63</sub>), ein YxxΦ-Motiv (Y<sub>63</sub>ATL<sub>66</sub>) und das distale Dileucin-Motiv (LL<sub>86, 87</sub>) auf. Verschiedene Mutagenesestudien zeigen, dass diese Motive wichtige Elemente sowohl der endozytischen als auch der basolateralen Sortierungsmaschinerie sind (Donoso et al. 2009, Gordts et al., unveröffentlichte Daten, Li et al. 2000, Marzolo et al. 2003). In 3.1 konnte gezeigt werden, dass für die Interaktion von LRP1 mit dem PTB-Adapterprotein PID1 das nicht-phosphorylierte distale NPxY-Motiv (N<sub>60</sub>PVY<sub>63</sub>) der intrazellulären Domäne von LRP1 essentiell ist. Zusätzlich ist auch das YxxΦ-Motiv (Y<sub>63</sub>ATL<sub>66</sub>) der intrazellulären Domäne von LRP1 in die Interaktion mit PID1 involviert. Diese Daten implizieren, welche essentielle Bedeutung Adapterproteine bei der Regulation des intrazellulären Transports von LRP1, d.h. bei der Sortierung, der Internalisierung und dem *Recycling* des Rezeptors, haben. In diesem Teil der Arbeit wurde daher die Rolle der Adapterproteine PID1 und ARH bei der Regulation des intrazellulären LRP1-Transports in HUH7-Zellen untersucht (vgl. Abb. 11).

#### **3.3.1 Knock-down von PID1 führt zu einer veränderten zellulären Lokalisation von LRP1 in HUH7-Zellen**

Dieser Teil des Kapitels beschreibt die zelluläre Lokalisation von LRP1 in HUH7-Zellen nach Herunterregulation von PID1 (sh PID1) und ARH (sh ARH) mittels lentiviraler RNA-Interferenz im Vergleich zu HUH7-Zellen, die stabil eine shRNA exprimieren, die keinen Einfluss auf die Genexpression der Zellen hat (sh Kontrolle). Aufgrund fehlender Antikörper, die endogenes PID1 und ARH detektieren, wurde der *Knock-down* von PID1 und ARH mittels quantitativer TaqMan®-PCR nachgewiesen (vgl. 3.2 und Abb. 9 A a und b). LRP1 (grün) wurde hier in einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung durch den LRP1-spezifischen Antikörper „8G1“ in den HUH7-Zellen detektiert und durch einen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten sekundären Antikörper immunmarkiert. Die Zellen wurden anschließend mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht (Abb. 10).

LRP1 ist in HUH7-Zellen wie auch in vielen anderen Zellen meist in einem Kern-nahen Kompartiment konzentriert und zeigt zusätzlich eine vesikuläre Lokalisation im Zytoplasma. Wenige Zellen weisen eine rein vesikuläre Lokalisation von LRP1 auf, dabei sind die LRP1-positiven Vesikel ebenfalls juxtanukleär angeordnet (Abb. 10 A a, B a). Die Identität des LRP1-positiven Kompartiments in HUH7-Zellen ist zwar nicht genau bekannt, es fungiert jedoch vermutlich als ein intrazellulärer „LRP1-Pool“, von dem aus LRP1 auf einen Stimulus hin an die Plasmamembran transloziert werden kann (Laatsch et al. 2009). Interessanterweise führt die Abwesenheit des LRP1-spezifischen Adapterproteins PID1 in vielen Zellen zu einer stark veränderten zellulären Lokalisation von LRP1. LRP1 ist nun nicht mehr in dem juxtanukleären Kompartiment lokalisiert, sondern in Vesikeln, die im gesamten Zytoplasma verteilt sind (Abb. 10 A b und B b). Dabei befinden sich die meisten LRP1-positiven Vesikel in den PID1-defizienten HUH7-Zellen in der Nähe der Plasmamembran, wie die Darstellung aller Schichten einer Zelle in einem Z-Stack in Abbildung 10 B b zeigt. Das Fehlen des LDL-Rezeptor-spezifischen Adapterproteins ARH hat dagegen keinen Einfluss auf die zelluläre LRP1-Lokalisation. LRP1 zeigt die gleiche zelluläre Lokalisation wie in den Kontrollzellen (Abb. 10 A c und B c). Allerdings zeigte die Analyse der Zellen mittels Immunfluoreszenz stets, dass die PID1-defizienten HUH7-Zellen eine verringerte LRP1-Expression aufweisen, während die ARH-defizienten HUH7-Zellen eine verstärkte Expression von LRP1 zeigen (Abb. 10 B). Sowohl die veränderte zelluläre Lokalisation von LRP1 als auch dessen verringerte Expression in den PID1-defizienten HUH7-Zellen könnten das Ergebnis einer Fehlsortierung von LRP1 aufgrund einer fehlenden LRP1/PID1-Interaktion sein.

A HUH7



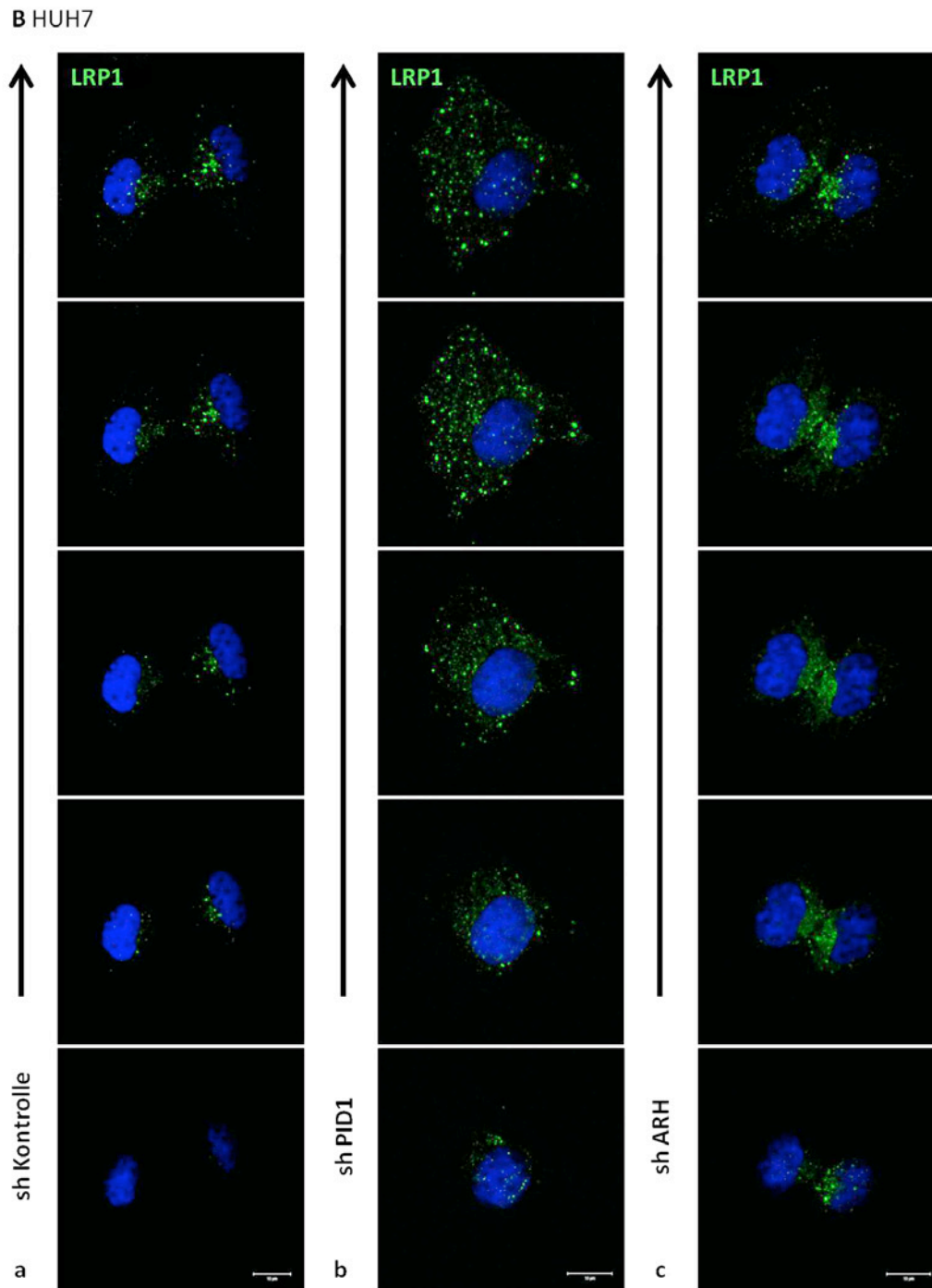


Abbildung 10: **Knock-down von PID1 führt zu einer veränderten zellulären Lokalisation von LRP1 in HUH7-Zellen.** In **A** und **B** wurde in einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung LRP1 (grün) in Kontroll- (**a**), PID1-defizienten (**b**) und ARH-defizienten (**c**) HUH7-Zellen detektiert und die Zellen anschließend mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. **A** zeigt eine Ebene der Zellen, während **B** alle Schichten der Zellen in einem Z-Stack darstellt. LRP1 ist in den Kontroll- (**a** in **A** und **B**) und in den ARH-defizienten (**c** in **A** und **B**) HUH7-Zellen hauptsächlich in einem Kern-nahen Kompartiment lokalisiert. Dagegen führt die Abwesenheit von PID1 dazu, dass die LRP1-positiven Vesikeln im gesamten Zytoplasma verteilt sind (**A b**), wobei sich die meisten LRP1-positiven Vesikel in der Nähe der Plasmamembran befinden, wie der Z-Stack zeigt (**B b**). DAPI-Kernfärbung (blau), Dicke des optischen Schnitts: 1.0  $\mu\text{m}$ , Skalierungsbalken: **A**: 20  $\mu\text{m}$ , **B**: 10  $\mu\text{m}$

### 3.3.2 Analyse der Adapterprotein-vermittelten Regulation des intrazellulären LRP1-Transports in HUH7-Zellen mittels Kolokalisierungsstudien

Als endozytisch-aktiver Rezeptor befindet sich LRP1 in Endosomen, was dessen Lokalisation in zytoplasmatischen Vesikeln in HUH7-Zellen erklärt. Zusätzlich zeigt LRP1 in HUH7-Zellen wie auch in vielen anderen Zellen häufig eine konzentrierte Lokalisation in einem kern-nahen Kompartiment, wobei die Identität dieses LRP1-positiven Kompartiments nicht genau bekannt ist. Vermutlich handelt es sich jedoch um einen intrazellulären „LRP1-Pool“, von dem aus LRP1 auf einen Stimulus hin an die Plasmamembran transloziert werden kann (Laatsch et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass in polarisierten Zellen die Sortierung von Proteinen nach deren Biosynthese an die apikale oder basolaterale Membran am TGN erfolgt (Fuller et al. 1985, Griffiths und Simons 1986, Rindler et al. 1984). Zusätzlich können Membranproteine, die endozytisch aktiv sind, über ein *Recycling*-Endosom sortiert werden (Matter und Mellmann 1994, Mostov und Cardone 1995, Odorizzi und Towbridge 1997). Verschiedene Studien liefern Hinweise, dass auch LRP1 über ein solches *Recycling*-Endosom basolateral sortiert bzw. *recycle*t wird (Donoso et al. 2009, Marzolo et al. 2003). Das Kompartiment könnte folglich zum einen ein *Recycling*-Endosom oder aber aufgrund seiner kern-nahen Lokalisation und Struktur auch der Golgi-Apparat sein. Interessanterweise ist LRP1 in Abwesenheit von PID1 in HUH7-Zellen nicht in diesem Kompartiment konzentriert, sondern in Vesikeln lokalisiert, die im gesamten Zytoplasma verteilt sind, was auf eine Fehlsortierung von LRP1 aufgrund der fehlenden LRP1/PID1-Interaktion hindeutet. Zur Analyse der Regulation des intrazellulären LRP1-Transports wurde daher in Kolokalisationsstudien die zelluläre Lokalisation von LRP1 mittels verschiedener zellulärer Markerproteine für Zellkompartimente der Proteinbiosynthese und des endozytischen Apparates (vgl. Abb. 11) in Kontroll-, PID1-defizienten und als Kontrolle in ARH-defizienten HUH7-Zellen untersucht. Dazu wurde in einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse zum einen LRP1 (grün) durch den LRP1-spezifischen Antikörper „8G1“ detektiert und durch einen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten sekundären Antikörper markiert und gleichzeitig zum anderen die zellulären Markerproteine (rot) durch spezifische primäre Antikörper detektiert und ebenfalls durch fluoreszierende sekundäre Antikörper immunmarkiert und die Zellen anschließend mittels konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie analysiert (Abb. 12 - 19).

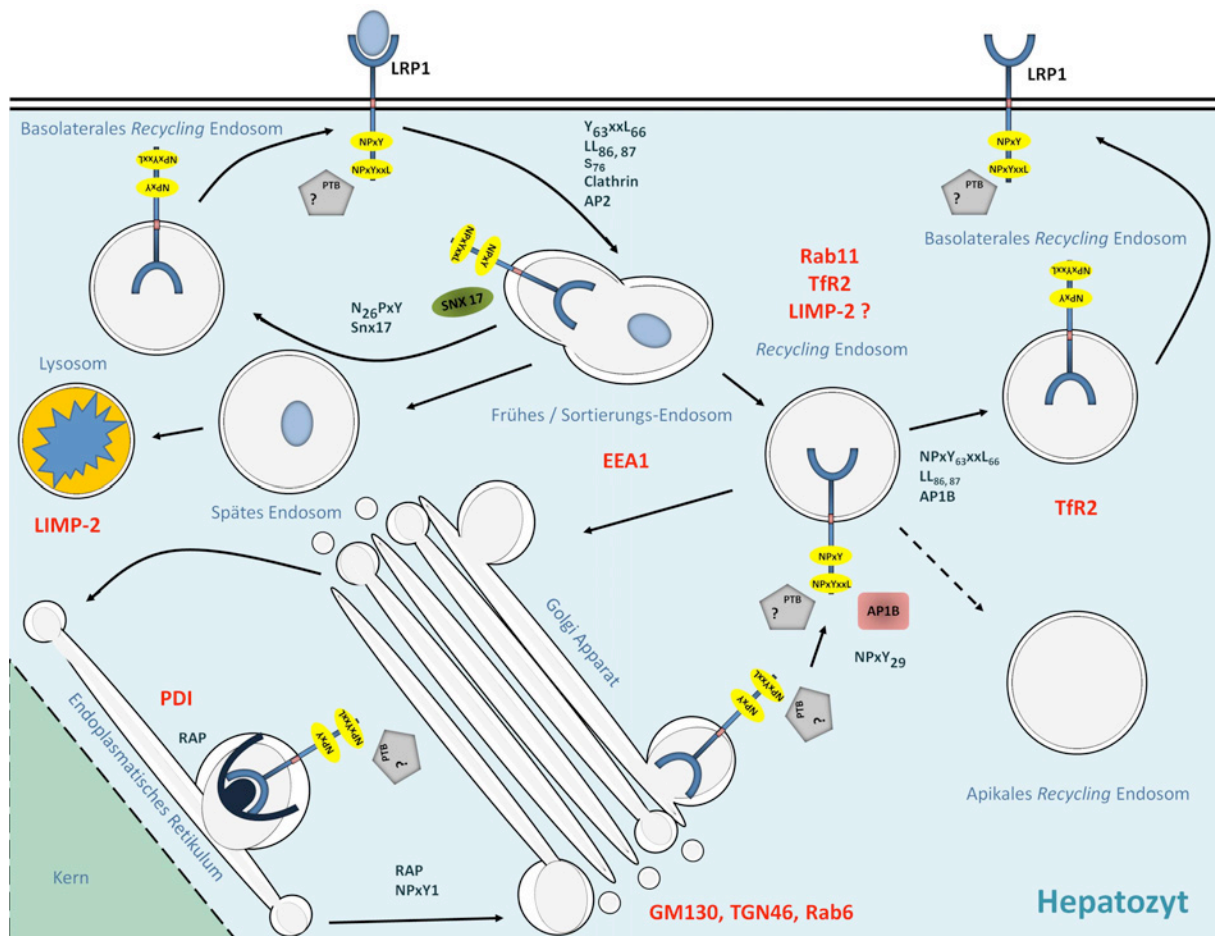
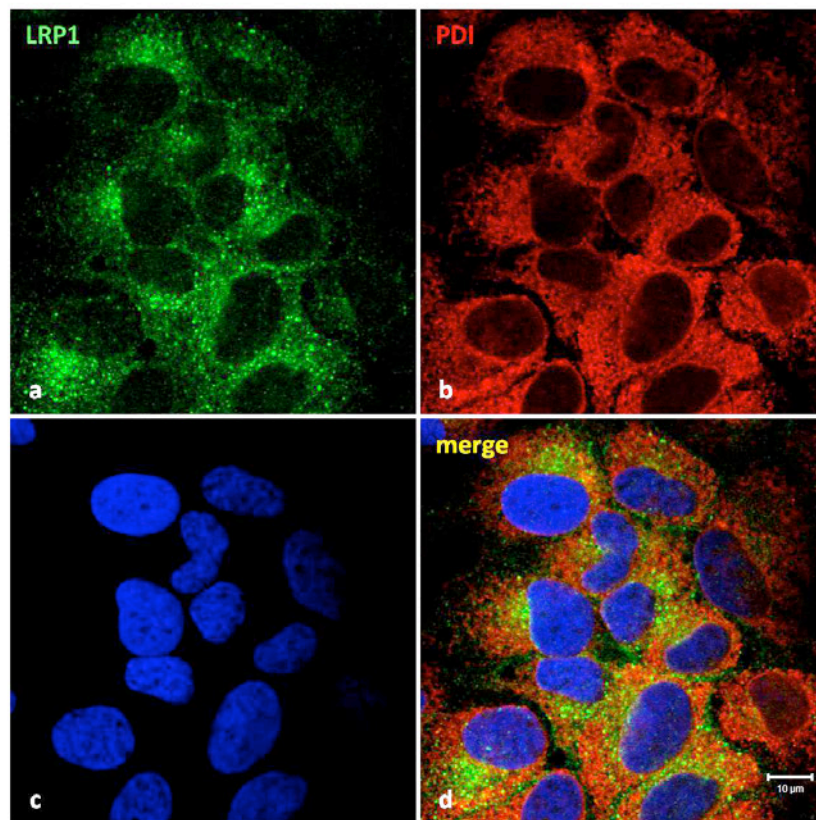


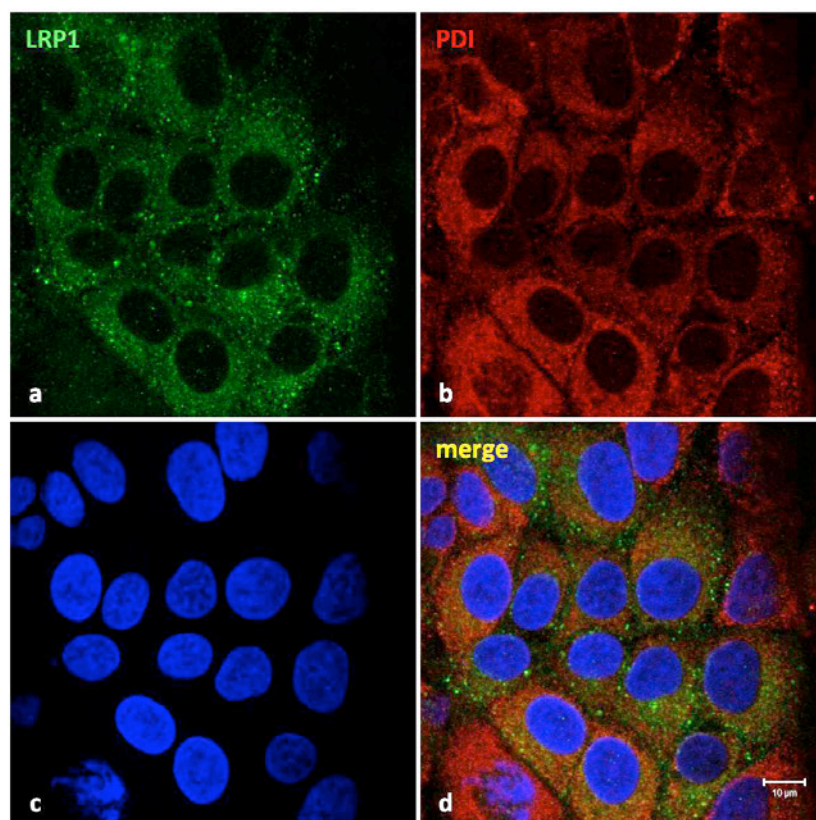
Abbildung 11: **Zelluläre Markerproteine zur Analyse der Funktion von Adapterproteinen bei der Regulation des intrazellulären LRP1-Transports.** Die Abbildung zeigt ein hypothetisches Modell des intrazellulären LRP1-Transports in Hepatozyten. Zusätzlich ist gezeigt, an welchen Kompartimenten PTB-Adapterproteine via Interaktion mit dem distalen NPXYxxL-Motiv von LRP1 den weiteren intrazellulären LRP1-Transport beeinflussen könnten. Die Markerproteine für die entsprechenden Kompartimente sind in rot dargestellt (ER: PDI, Golgi-Apparat: GM130, TGN46 und Rab6, frühe Endosomen: EEA1, Lysosomen: LIMP-2, Recycling-Endosom/ Kompartiment: Rab11, TfR2, basolaterale Recycling-Endosomen: TfR2).



**A** HUH7 sh Kontrolle



**B** HUH7 sh PID1



## C HUH7 sh ARH

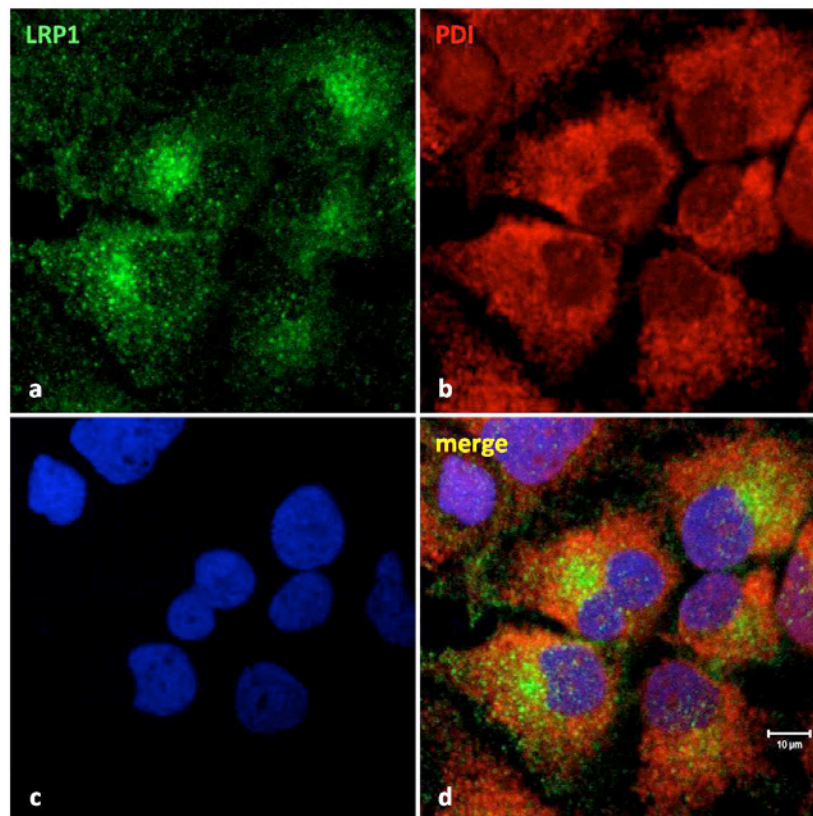
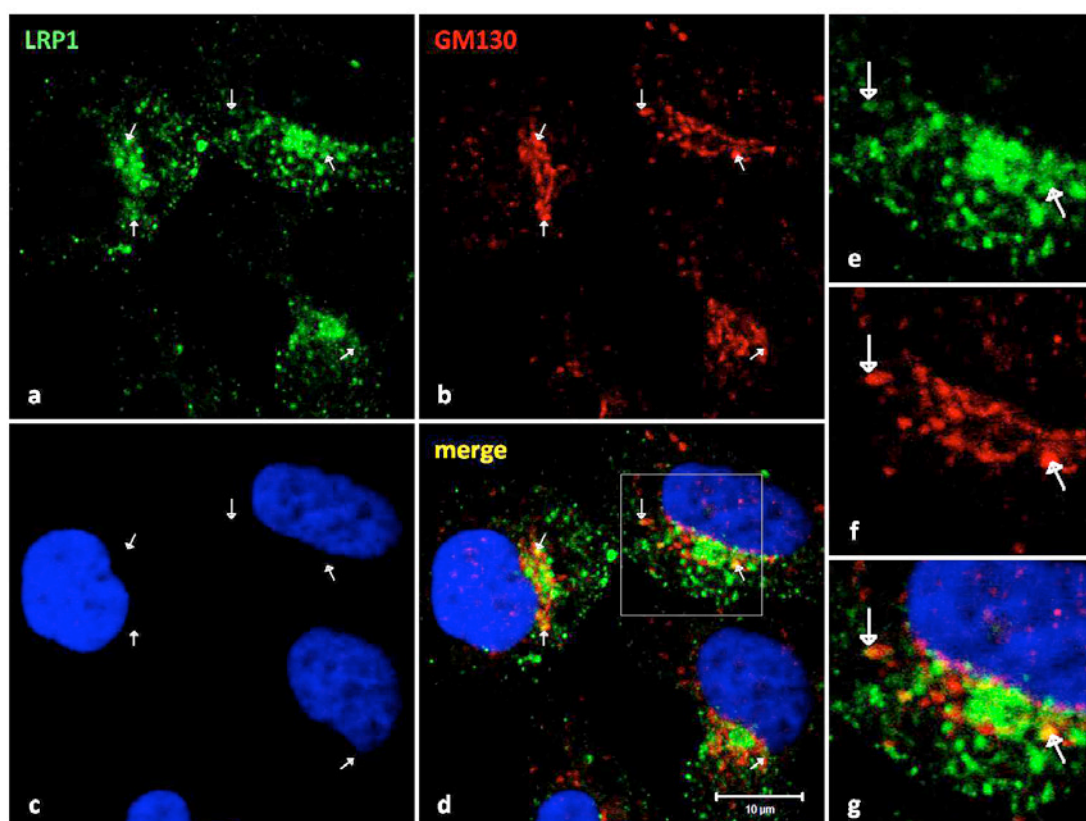
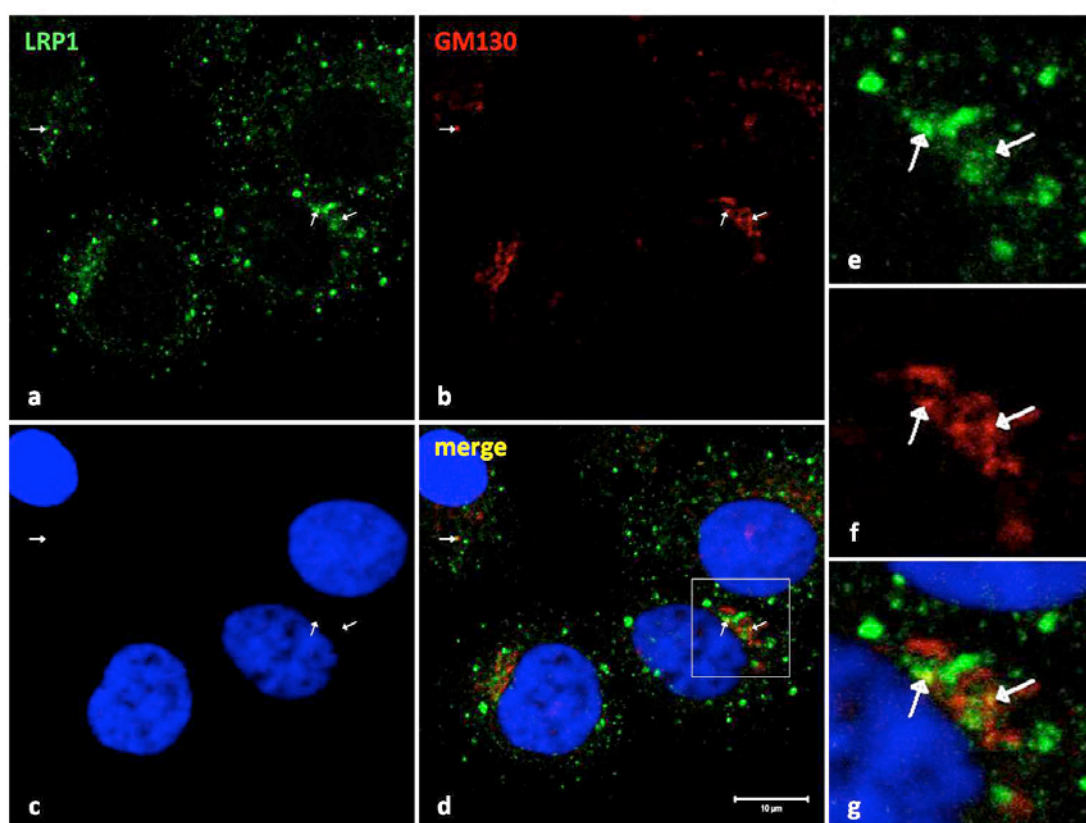


Abbildung 12: **Der überwiegende Teil von LRP1 kolokalisiert nicht mit dem ER-Marker PDI in Kontroll-, PID1-knock-down und ARH-knock-down HUH7-Zellen.** Zur Analyse der zellulären Lokalisation von LRP1 in HUH7-Zellen und einer möglichen Fehlsortierung von LRP1 in PID1-knock-down HUH7-Zellen wurde in einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung gleichzeitig LRP1 (grün: **a** in **A**, **B** und **C**) und das ER-residente Enzym PDI (rot: **b** in **A**, **B** und **C**) in Kontroll- (**A**), PID1-defizienten (**B**) und ARH-defizienten (**C**) HUH7-Zellen detektiert und die Zellen anschließend mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Die Übereinanderlagerung der Signale (merge: **d** in **A**, **B** und **C**) zeigt, dass in allen drei Zelllinien der überwiegende Teil von LRP1 nicht mit dem ER-Marker PDI kolokalisiert. Das impliziert zum einen, dass es sich bei dem LRP1-positiven, Kern-nahen Kompartiment in den Kontroll- (**A**) und in den ARH-defizienten (**C**) Zellen nicht um das ER handelt, zum anderen kann zusätzlich ein Verbleiben von LRP1 im ER bzw. in ER-Vesikeln in Abwesenheit von PID1 aufgrund einer fehlenden LRP1/PID1-Interaktion ausgeschlossen werden. DAPI-Kernfärbung (blau: **c** in **A**, **B** und **C**), Dicke des optischen Schnitts: 1.0 µm, Skalierungsbalken: 10 µm

Da weder die Identität des juxtanukleären, LRP1-positiven Kompartiments bekannt war und es noch ausreichend Hinweise gab, an welchen Kompartimenten PID1 via Interaktion mit dem distalen NPxY-Motiv von LRP1 den weiteren intrazellulären LRP1-Transport beeinflusst, wurde zunächst eine mögliche Kolokalisation von LRP1 mit den Kompartimenten des Proteinbiosyntheseweges, d.h. dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat in den Kontroll-, PID1-defizienten und ARH-defizienten HUH7-Zellen untersucht. Als Marker für das ER wurde das ER-residente Enzym PDI (*oxidoreductase-protein disulfide isomerase*) verwendet (Abb. 12, vgl. Abb. 11). Wie Abbildung 12 zeigt, weisen die PID1-defizienten HUH7-Zellen (Abb. 12 B a) im Gegensatz zu den Kontroll- (Abb. 12 A a) und den ARH-defizienten (Abb. 12 C a) HUH7-Zellen eine veränderte zelluläre Lokalisation von LRP1 auf, jedoch kolokalisiert der überwiegende Teil von LRP1 in allen drei Zelllinien nicht mit PDI (d in Abb. 12 A, B und C). Dies zeigt zum einen, dass das Kern-nahe Kompartiment, in dem sich LRP1 in den Kontroll- und ARH-defizienten HUH7-Zellen überwiegend befindet, nicht das ER ist. Zum anderen führt die Abwesenheit von PID1 nicht zu einem Verbleiben von LRP1 im ER bzw. in ER-Vesikeln. Zur Analyse einer möglichen Kolokalisation von LRP1 mit dem Golgi-Apparat wurde als cis-Golgi-Marker das Golgi-Matrixprotein GM130 (Abb. 13, vgl. Abb. 11) eingesetzt, während als trans-Golgi-Marker das Glykoprotein TGN46 (Abb. 14, vgl. Abb. 11) verwendet wurde. Wie Abbildungen 13 und 14 darstellen, kolokalisieren in allen drei Zelllinien nur vereinzelte LRP1-positive Vesikel sowohl mit dem cis-Golgi-Netzwerk (CGN) (weiße Pfeile, d in Abb. 13 A, B und C, vgl. g Vergrößerung von d) als auch mit dem TGN (weiße Pfeile, d in Abb. 14 A, B und C, vgl. g Vergrößerung von d), wobei es sich bei diesen Kolokalisationen von LRP1 mit dem CGN und dem TGN sowie mit dem ER wahrscheinlich um neu-synthetisiertes LRP1 handelt. Interessanterweise kolokalisiert das Kern-nahe, LRP1-positive Kompartiment der Kontroll- und ARH-defizienten Zellen weder mit dem cis-Golgi-Marker GM130 noch mit dem trans-Golgi-Marker TGN46. Das als „LRP1-Pool“ fungierende Kompartiment scheint demnach auch nicht der Golgi-Apparat zu sein.



**A** HUH7 sh Kontrolle**B** HUH7 sh PID1

## C HUH7 sh ARH

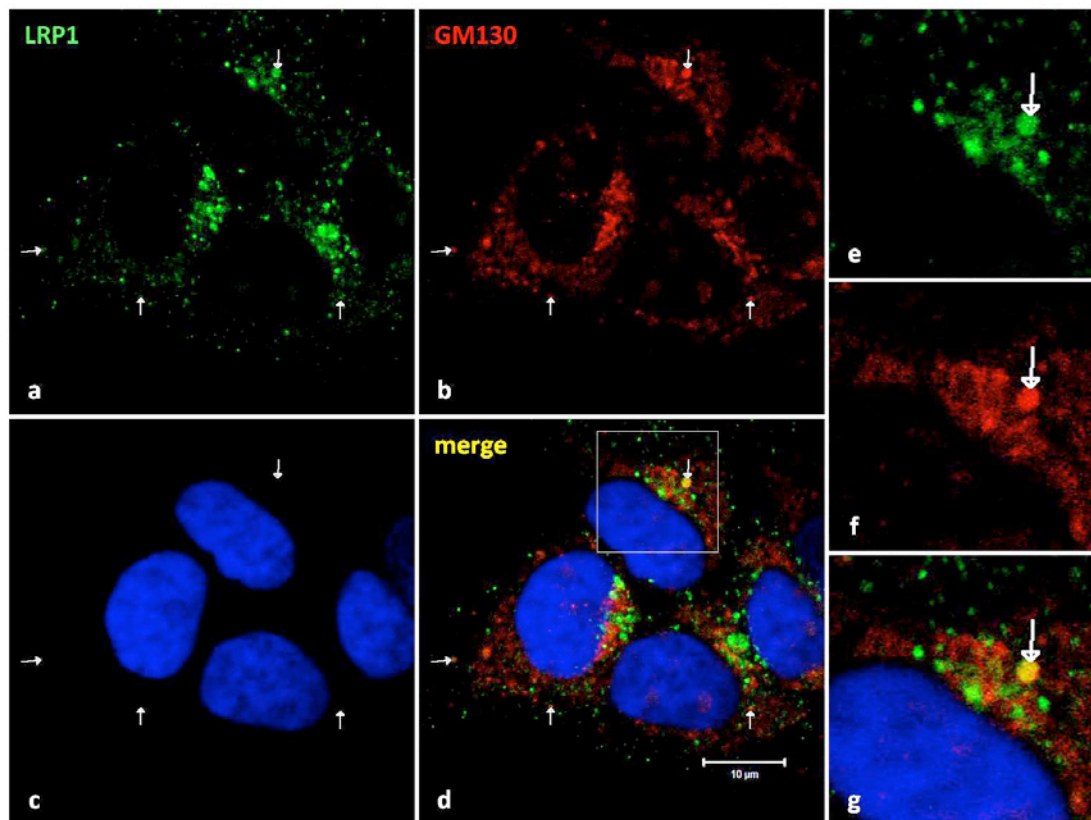
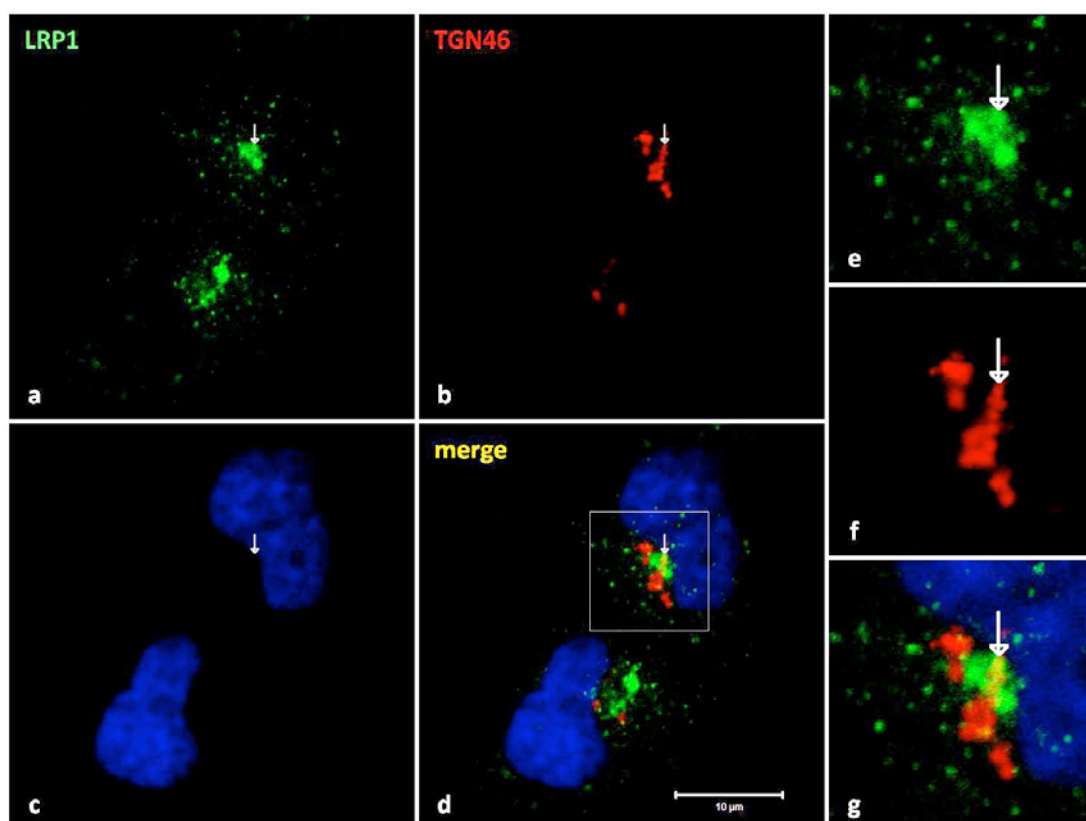
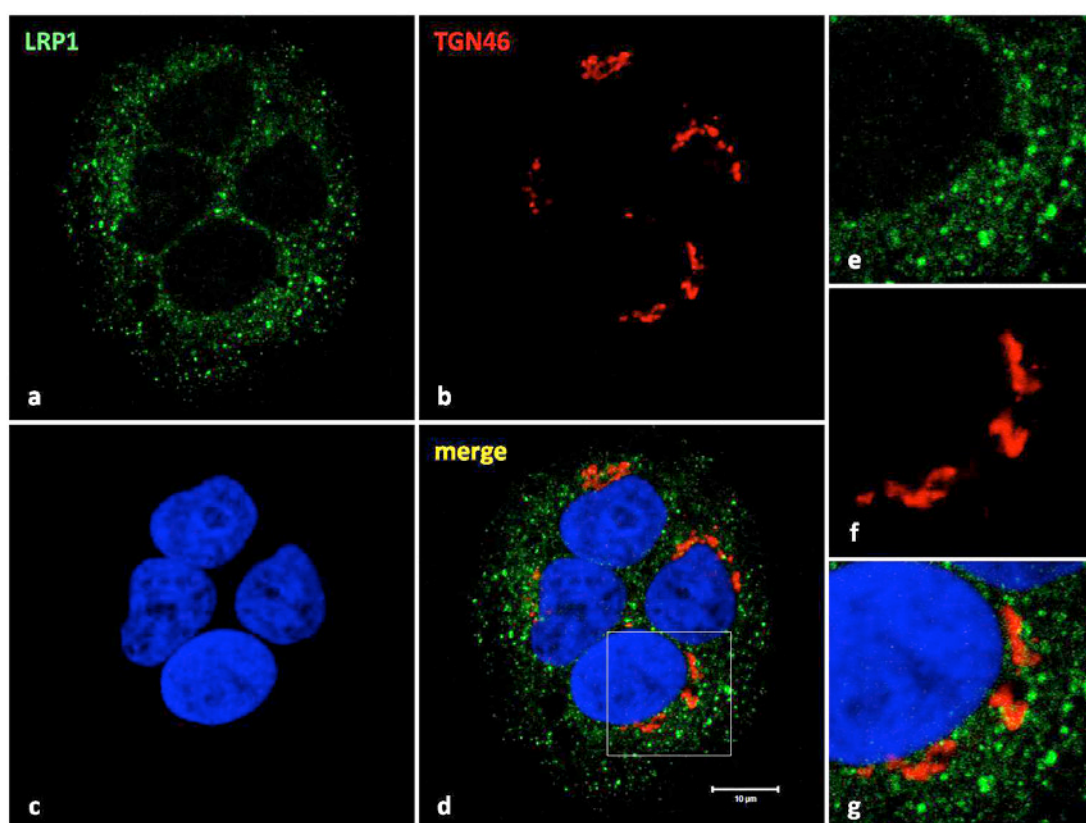


Abbildung 13: **Neu-synthetisiertes LRP1 kolokalisiert mit dem cis-Golgi-Marker GM130 in Kontroll-, PID1-knock-down und ARH-knock-down HUH7-Zellen.** Zur Untersuchung der zellulären LRP1-Lokalisation in HUH7-Zellen und der veränderten LRP1-Lokalisation in PID1-defizienten HUH7-Zellen wurde in einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung gleichzeitig LRP1 (grün: **a** in **A**, **B** und **C**) und der cis-Golgi-Marker GM130 (rot: **b** in **A**, **B** und **C**) in Kontroll- (**A**), PID1-defizienten (**B**) und ARH-defizienten (**C**) HUH7-Zellen detektiert und die Zellen anschließend mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Die Übereinanderlagerung der Signale (merge: **d** in **A**, **B** und **C**) stellt dar, dass in allen drei Zelllinien nur wenige LRP1-positive Vesikel mit GM130 kolokalisieren (weiße Pfeile, vgl. **A**, **B** und **C**; Vergrößerungen eines Ausschnittes (gezeigt in **d**): **e** von **a**, **f** von **b** und **g** von **d**), dabei handelt es sich vermutlich um neu-synthetisiertes LRP1. Das juxtanukleäre Kompartiment, in dem sich LRP1 in den Kontroll- (**A**) und in den ARH-defizienten (**C**) Zellen befindet, entspricht folglich nicht dem CGN. DAPI-Kernfärbung (blau: **c** in **A**, **B** und **C**), Dicke des optischen Schnitts: 1.0 µm, Skalierungsbalken: 10 µm

**A** HUH7 sh Kontrolle



**B** HUH7 sh PID1



## C HUH7 sh ARH

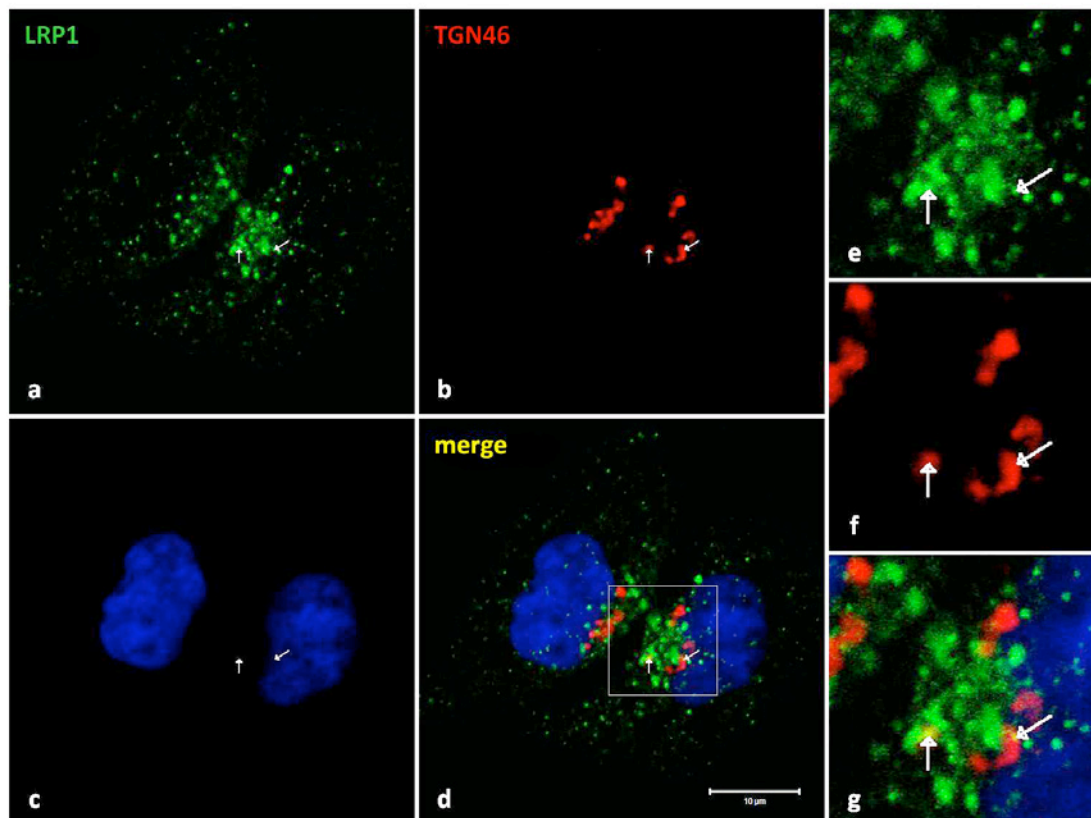
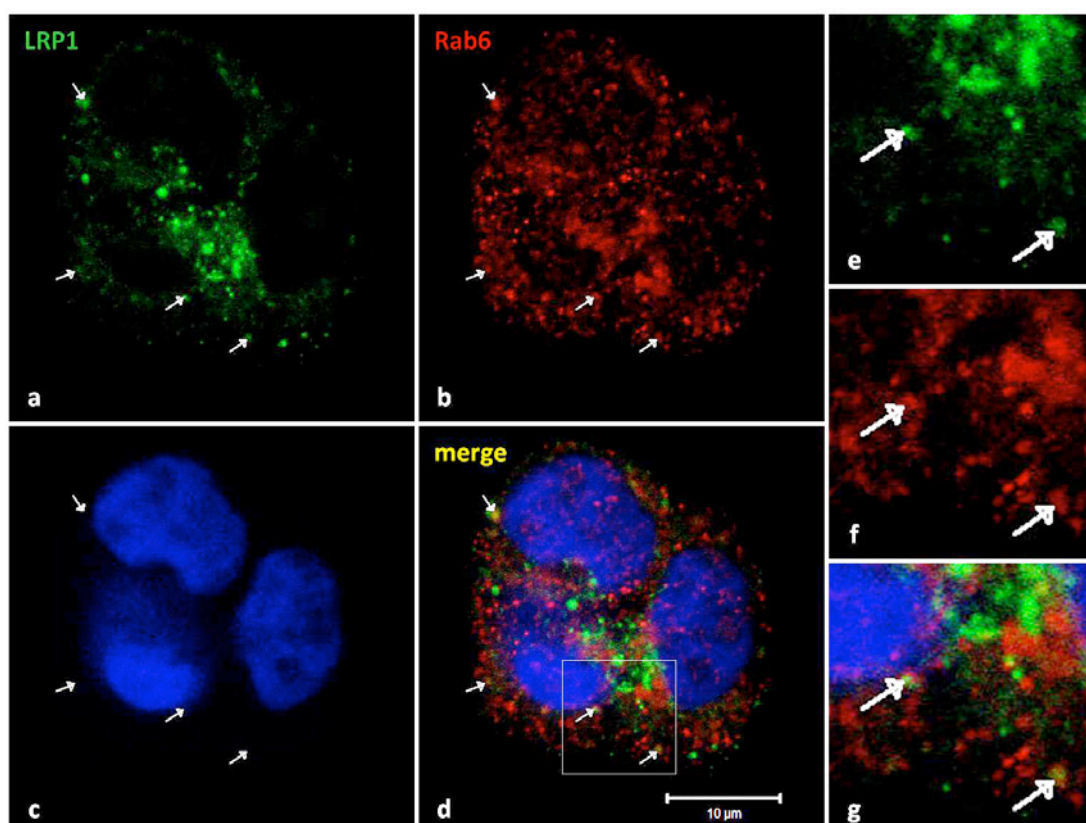


Abbildung 14: **Neu-synthetisiertes LRP1 kolokalisiert mit dem trans-Golgi-Marker TGN46 in Kontroll-, PID1-knock-down und ARH-knock-down HUH7-Zellen.** Zur Untersuchung der zellulären LRP1-Lokalisation in HUH7-Zellen und der veränderten LRP1-Lokalisation in PID1-defizienten HUH7-Zellen wurde in einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung gleichzeitig LRP1 (grün: **a** in **A**, **B** und **C**) und der trans-Golgi-Marker TGN46 (rot: **b** in **A**, **B** und **C**) in Kontroll- (**A**), PID1-defizienten (**B**) und ARH-defizienten (**C**) HUH7-Zellen detektiert und die Zellen anschließend mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Die Übereinanderlagerung der Signale (merge: **d** in **A**, **B** und **C**) zeigt, dass in allen drei Zelllinien nur wenige bis gar keine LRP1-positive Vesikel mit TGN46 kolokalisieren (weiße Pfeile, vgl. **A**, **B** und **C**: Vergrößerungen eines Ausschnittes (gezeigt in **d**): **e** von **a**, **f** von **b** und **g** von **d**). Dabei handelt es sich bei den Kolokalisationen von LRP1 mit TGN46 vermutlich um neu-synthetisiertes LRP1. Das Kern-nahe Kompartiment, in dem sich LRP1 überwiegend in den Kontroll- (**A**) und ARH-defizienten (**C**) HUH7-Zellen befindet, entspricht somit nicht dem trans-Golgi-Netzwerk. DAPI-Kernfärbung (blau: **c** in **A**, **B** und **C**), Dicke des optischen Schnitts: 1.0 µm, Skalierungsbalken: 10 µm

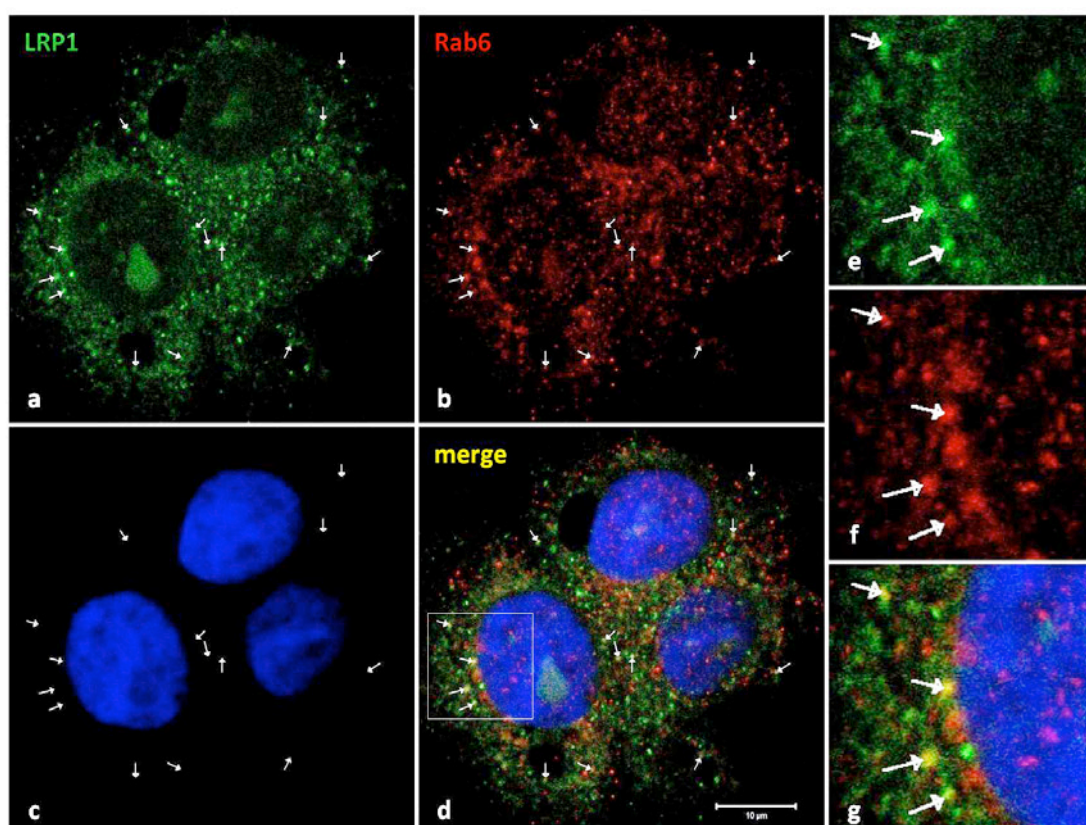
Als zusätzlicher Marker für den Golgi-Apparat wurde Rab6 eingesetzt (Abb. 15, vgl. Abb. 11). Rab-Roteine gehören zur Ras-Superfamilie kleiner G-Proteine und nehmen eine Schlüsselrolle im intrazellulären Membranverkehr ein. Die GTPase Rab6 reguliert dabei den intra-Golgi-Transport sowie diverse Transportprozesse in und aus dem Golgi-Apparat, d.h. den retrograden Golgi-ER-Transport, den Endosom-Golgi-Transport und den Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran (Del Nery et al. 2006, Mallard et al. 2002, Martinez et al. 1994, White et al. 1999), was die zusätzliche Lokalisation von Rab6 in zahlreichen Vesikeln im gesamten Zytoplasma der Zelle erklärt (b in Abb. 15 A, B und C). Die Untersuchung der zellulären LRP1-Lokalisation mit dem Golgi-Marker Rab6 zeigte in den Kontroll- und in den ARH-defizienten Zellen, konsistent zu den Daten der anderen Golgi-Marker GM130 und TGN46, dass nur wenige einzelne, hier auch eher zytoplasmatische LRP1-positive Vesikel mit Rab6 kolokalisieren (weiße Pfeile, d in Abb. 15 A und C, vgl. g Vergrößerung von d), während in PID1-defizienten HUH7-Zellen mehr LRP1-positive Vesikel mit Rab6 kolokalisieren (weiße Pfeile, Abb. 15 B d, vgl. g Vergrößerung von d). Diese Daten deuten darauf hin, dass PID1 nach der Biosynthese von LRP1 an der Regulation des intrazellulären LRP1-Transports zwischen dem Golgi-Apparat und der Plasmamembran partizipiert.



**A** HUH7 sh Kontrolle



**B** HUH7 sh PID1



## C HUH7 sh ARH

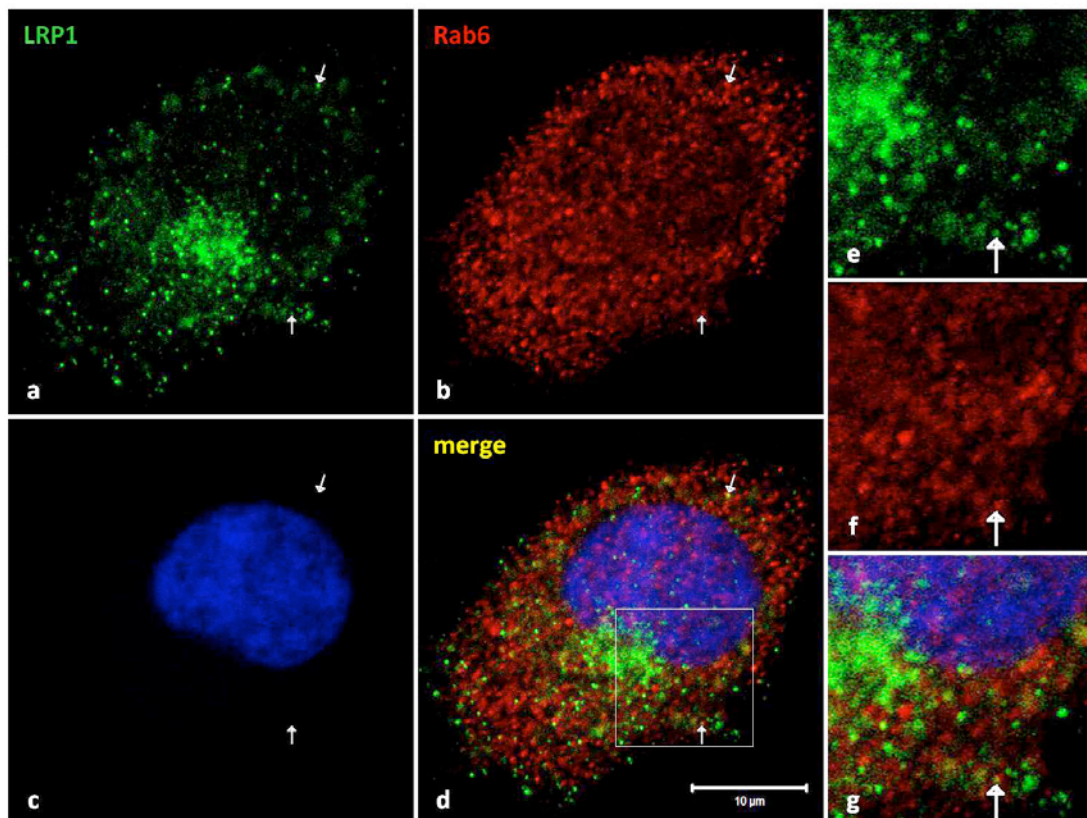
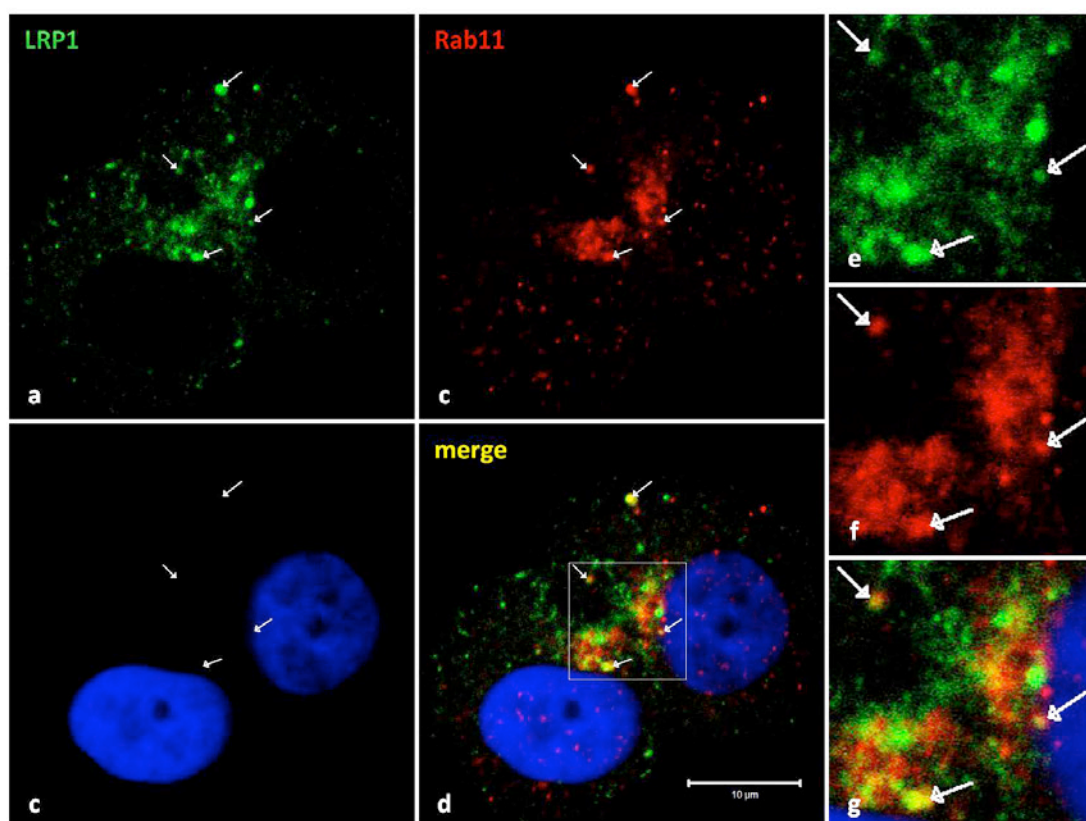


Abbildung 15: In **PID1-defizienten HUH7-Zellen kolokalisieren mehr LRP1-positive Vesikel mit dem Golgi-Marker Rab6**. Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von LRP1 in HUH7-Zellen und einer möglichen Fehlsortierung von LRP1 in Abwesenheit von PID1 wurde in einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung gleichzeitig LRP1 (grün: **a** in **A**, **B** und **C**) und Rab6 (rot: **b** in **A**, **B** und **C**) in Kontroll- (**A**), PID1-defizienten (**B**) und ARH-defizienten (**C**) HUH7-Zellen detektiert und die Zellen anschließend mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Rab6 ist zum einen an der Regulation des intra-Golgi-Transports beteiligt, zum anderen aber auch an diversen Vesikeltransporten in und aus dem Golgi-Apparat, was die zusätzliche Lokalisation von Rab6 in zahlreichen Vesikeln der Zelle erklärt. Die Übereinanderlagerung der Signale (merge: **d** in **A**, **B** und **C**) zeigt, dass in den Kontroll- (**A**) und in den ARH-defizienten (**D**) HUH7-Zellen nur wenige LRP1-positive Vesikel mit Rab6 kolokalisieren (weiße Pfeile, vgl. **A** und **C**: Vergrößerungen eines Ausschnittes (gezeigt in **d**): **e** von **a**, **f** von **b** und **g** von **d**), dabei handelt es sich vermutlich um neu-synthetisiertes LRP1. Das Kern-nahe Kompartiment, in dem sich LRP1 überwiegend in den Kontroll- (**A**) und ARH-defizienten (**D**) HUH7-Zellen befindet, zeigt dabei keine Kolokalisationen mit Rab6 und entspricht folglich nicht dem Golgi-Apparat. Interessanterweise weisen HUH7-Zellen nach *Knock-down* von PID1 mehr Rab6-positive LRP1-Vesikel auf (weiße Pfeile, **B**: Vergrößerungen eines Ausschnittes (gezeigt in **d**): **e** von **a**, **f** von **b** und **g** von **d**), was auf eine Fehlsortierung von neu-synthetisiertem LRP1 in Abwesenheit des Adapterproteins PID1 zurückzuführen sein könnte. DAPI-Kernfärbung (blau: **c** in **A**, **B** und **C**), Dicke des optischen Schnitts: 1.0 µm, Skalierungsbalken: 10 µm

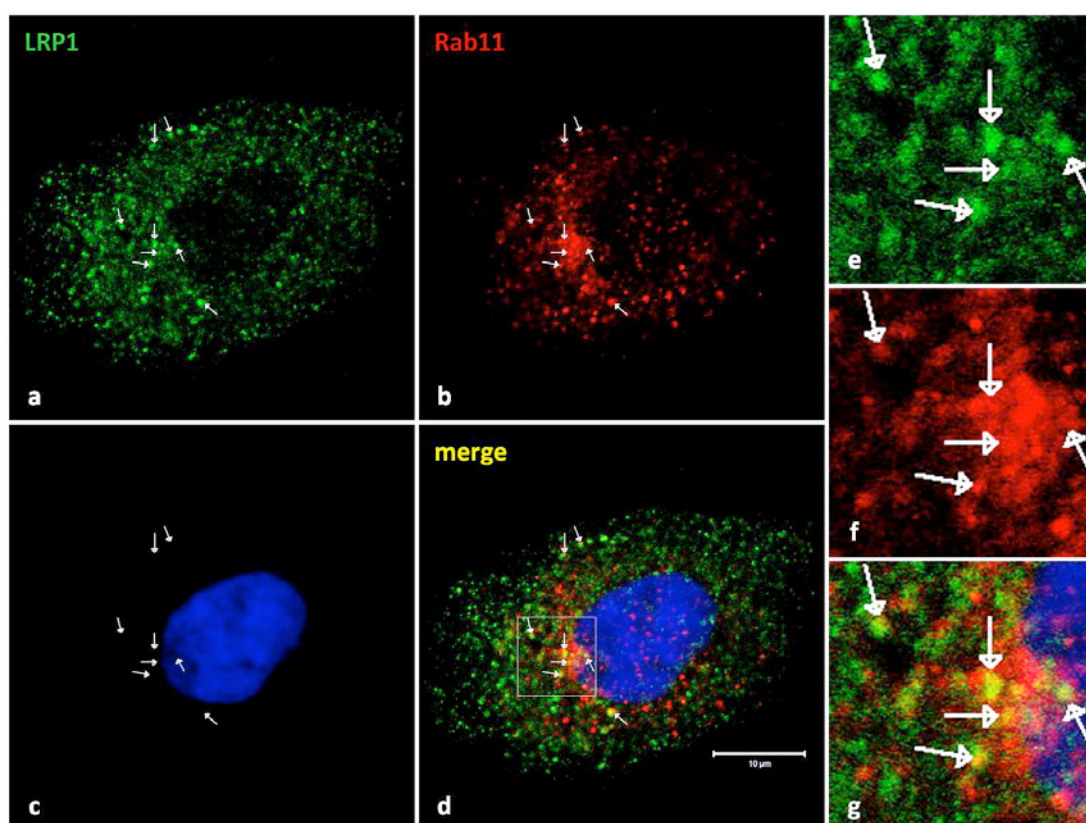
Die Daten der Koloalisationsstudien zeigen, dass das juxtanukleäre, LRP1-positive Kompartiment, das als endozytischer „LRP1-Pool“ fungieren könnte, weder Koloalationen mit dem ER noch mit dem Golgi-Apparat aufweist, was den Verdacht erhärtet, dass es sich bei diesem Kompartiment um ein endozytisches *Recycling*-Kompartiment handeln könnte. Daher wurde hier als nächstes eine Koloalation von LRP1 mit dem *Recycling*-Endosom-Marker Rab11 analysiert (Abb. 16, vgl. Abb. 11). Wie in Abbildung 16 dargestellt, zeigt Rab11 in HUH7-Zellen sowohl eine Lokalisation in zytoplasmatischen Vesikeln als auch eine konzentrierte Lokalisation in einem Kern-nahen Kompartiment (b in Abb. 16 A, B und C). Die Analyse der zellulären LRP1-Lokalisation mittels des Markers Rab11 zeigte, dass in den Kontroll- und ARH-defizienten HUH7-Zellen LRP1 und Rab11 überwiegend in einem juxtanukleären Kompartiment koloalisieren. (weiße Pfeile, d in Abb. 16 A und C, vgl. g Vergrößerung von d). Das LRP1-positive, Kern-nahe Kompartiment ist daher vermutlich ein *Recycling*-Kompartiment. Interessanterweise koloalisieren die LRP1-positiven Vesikel in den PID1-defizienten HUH7-Zellen ebenfalls mit dem Rab11-positiven, juxtanukleären Kompartiment (weiße Pfeile, Abb. 16 B d, vgl. g Vergrößerung von d), allerdings weisen die LRP1-positiven Vesikel jedoch keine stark konzentrierte Lokalisation in diesem Rab11-positiven Kompartiment auf. Diese Daten weisen daraufhin, dass LRP1 ebenfalls in Abwesenheit von PID1 in das *Recycling*-Kompartiment transportiert wird, jedoch nicht in diesem intrazellulären „LRP1-Pool“ zurückgehalten wird, was in der Folge zu einer nicht-polarisierten Verteilung von LRP1 führen könnte.



**A** HUH7 sh Kontrolle



**B** HUH7 sh PID1



## C HUH7 sh ARH

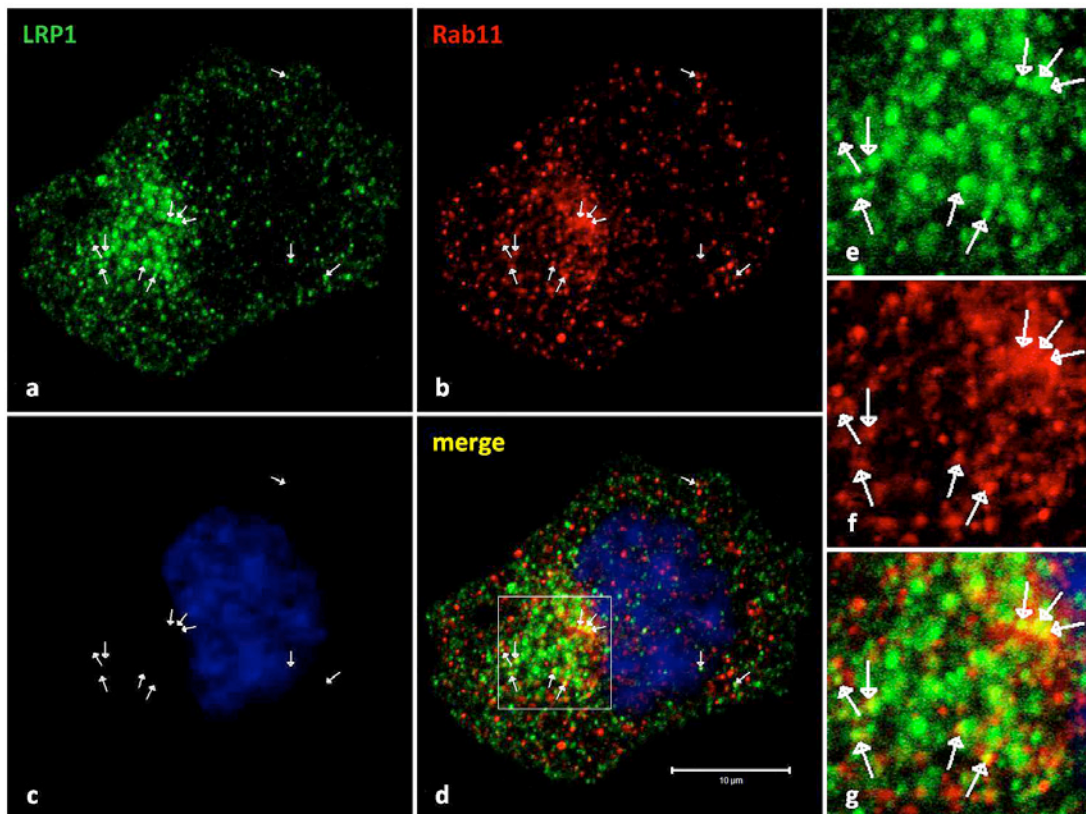
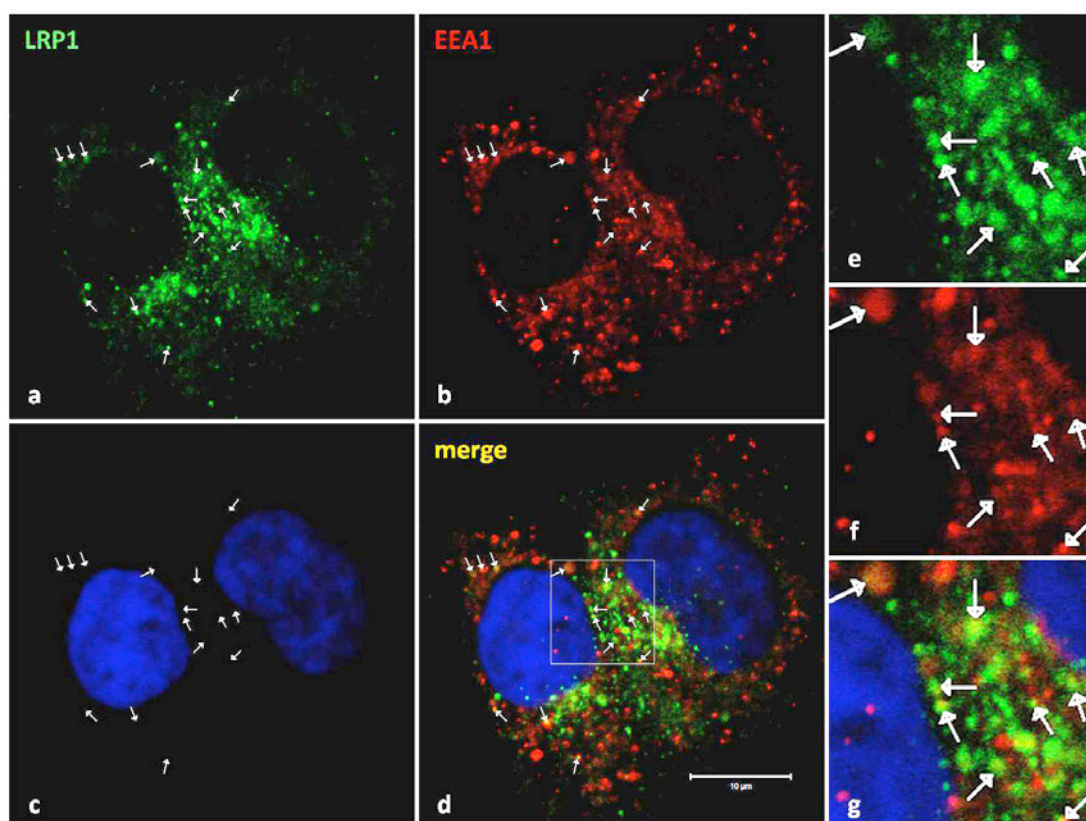


Abbildung 16: **LRP1 kolokalisiert mit dem *Recycling*-Endosom-Marker Rab11 in Kontroll-, PID1-*knock-down* und ARH-*knock-down* HUH7-Zellen.** Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von LRP1 in HUH7-Zellen und der veränderten LRP1-Lokalisation in PID1-defizienten HUH7-Zellen wurde in einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung gleichzeitig LRP1 (grün: **a** in **A**, **B** und **C**) und Rab11 (rot: **b** in **A**, **B** und **C**) in Kontroll- (**A**), PID1-defizienten (**B**) und ARH-defizienten (**C**) HUH7-Zellen detektiert und die Zellen anschließend mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Rab11 ist ein typischer zellulärer Marker für *Recycling*-Endosomen und ist in HUH7-Zellen sowohl in zytoplasmatischen Vesikeln als auch in einem juxtanukleären Kompartiment lokalisiert (vgl. **b** in **A**, **B** und **C**). Die Übereinanderlagerung der Signale (merge: **d** in **A**, **B** und **C**) zeigt, dass in allen drei Zelllinien LRP1 mit Rab11 kolokalisiert (weiße Pfeile, vgl. **A**, **B** und **C**; Vergrößerungen eines Ausschnittes (gezeigt in **d**): **e** von **a**, **f** von **b** und **g** von **d**). Dabei sind in den Kontroll- und den ARH-defizienten HUH7-Zellen LRP1 und Rab11 in einem juxtanukleären Kompartiment konzentriert lokalisiert (vgl. **d** in **A** und **C**). Das LRP1-positive Kompartiment könnte folglich ein *Recycling*-Kompartiment sein. In den PID1-defizienten HUH7-Zellen kolokalisieren die LRP1-positiven Vesikel ebenfalls mit dem Rab11-positiven Kompartiment, jedoch weisen sie keine konzentrierte Lokalisation in diesem Kompartiment auf (vgl. **B d**). LRP1 wird somit auch in Abwesenheit von PID1 über das *Recycling*-Kompartiment transportiert. DAPI-Kernfärbung (blau: **c** in **A**, **B** und **C**), Dicke des optischen Schnitts: 1.0 µm, Skalierungsbalken: 10 µm.

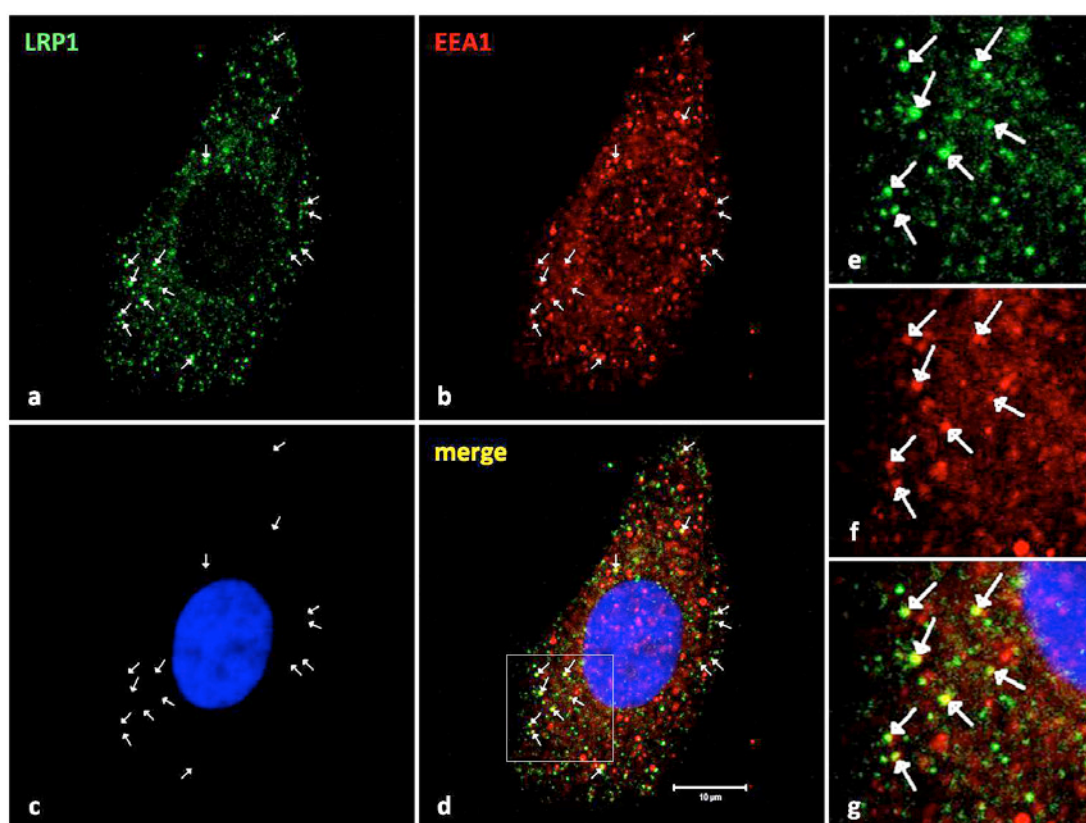
Zur Aufklärung der Identität der LRP1-positiven Vesikel in PID1-defizienten Zellen wurden weitere zelluläre Marker für Kompartimente des endozytischen Apparates eingesetzt. Eine mögliche Fehlsortierung von LRP1 könnte dazu führen, dass LRP1 nicht mehr effizient an die Zelloberfläche transportiert wird, was in der Folge mit einem Funktionsverlust von LRP1 als endozytisch-aktiver Rezeptor einherginge. Daher wurde zunächst in den Kontroll-, PID1-defizienten und ARH-defizienten HUH7-Zellen die zelluläre Lokalisation von LRP1 mittels EEA1 (*early endosome antigen 1*), einem Marker für frühe Endosomen (Abb. 17, vgl. Abb. 11), untersucht. Wie Abbildung 17 darstellt, konnten in allen drei HUH7-Zelllinien viele Kolokalisationen der LRP1-positiven Vesikel mit frühen Endosomen beobachtet werden (weiße Pfeile, d in Abb. 17 A, B und C, vgl. g Vergrößerung von d). Interessanterweise kolokalisieren in den Kontroll- und ARH-defizienten Zellen auch viele der EEA1-positiven Vesikel mit dem LRP1-positiven, Kern-nahen Kompartiment (weiße Pfeile, d in Abb. 17 A und C, vgl. g Vergrößerung von d), das wie oben beschrieben ebenfalls Rab11-positiv ist. Diese Daten sprechen dafür, dass es sich bei diesem Kompartiment um ein endozytisches *Recycling*-Kompartiment handeln könnte, in dem LRP1 solange lokalisiert ist, bis ein äußerer Stimulus die Translokation des Rezeptors an die Plasmamembran induziert. Die PID1-defizienten HUH7-Zellen weisen dagegen viele zytoplasmatische LRP1- und EEA1-positive Vesikel auf (weiße Pfeile, d in Abb. 17 B, vgl. g Vergrößerung von d). Dabei zeigt die Lokalisation von LRP1 in frühen Endosomen in Abwesenheit von PID1, dass trotz der vermuteten Fehlsortierung von LRP1 in PID1-defizienten HUH7-Zellen ein Teil der LRP1-positiven Vesikel die Plasmamembran erreicht und LRP1 dort endozytisch aktiv werden kann, was ebenfalls für eine nicht-polarisierte Verteilung von LRP1 aufgrund einer fehlenden LRP1/PID1-Interaktion in PID1-*knock-down* HUH7-Zellen sprechen würde.



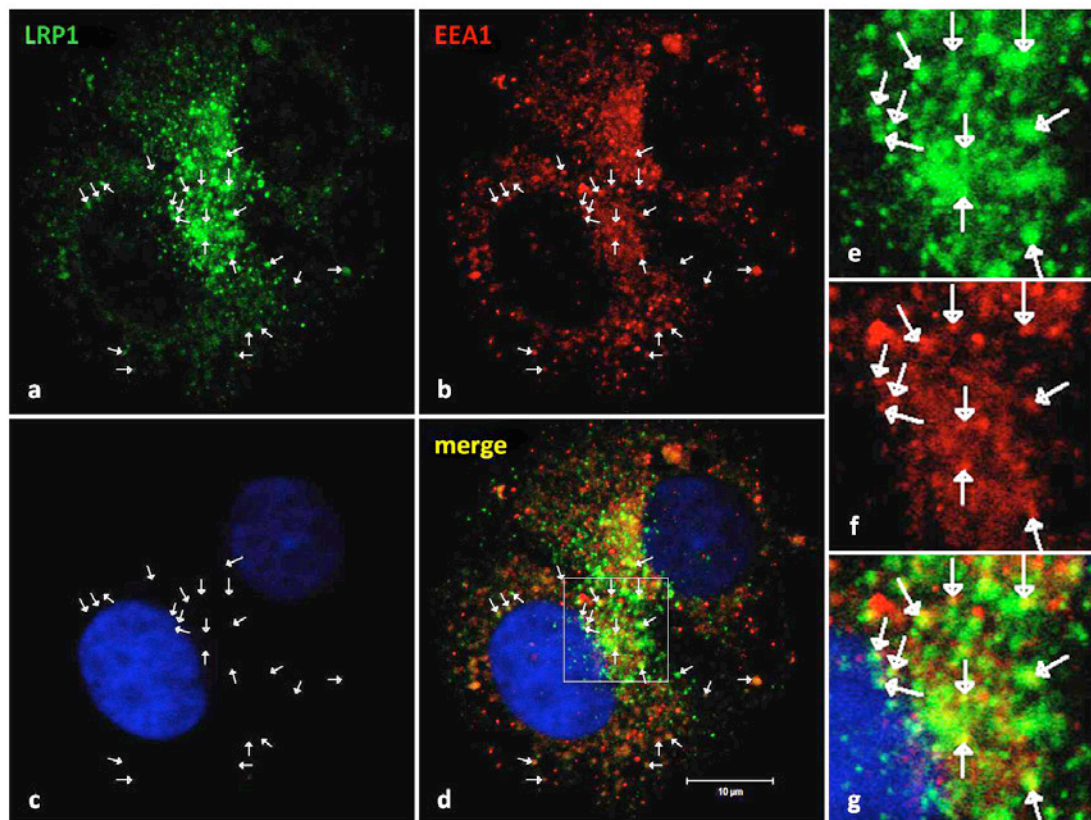
**A** HUH7 sh Kontrolle



**B** HUH7 sh PID1



## C HUH7 sh ARH

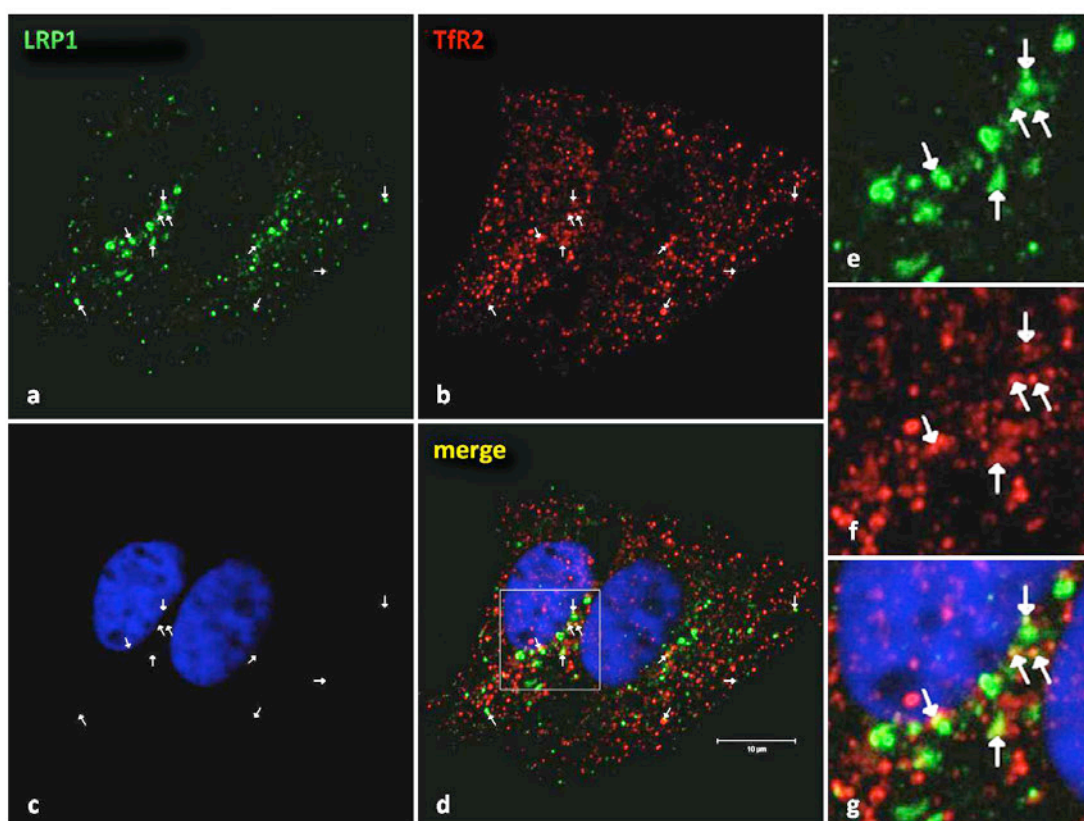


**Abbildung 17: LRP1 kolokalisiert mit frühen Endosomen in Kontroll-, PID1-knock-down und ARH-knock-down HUH7-Zellen.** Zur Analyse der zellulären Lokalisation von LRP1 in HUH7-Zellen und der veränderten LRP1-Lokalisation in PID1-defizienten HUH7-Zellen wurde in einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung gleichzeitig LRP1 (grün: **a** in **A**, **B** und **C**) und EEA1 (*early endosome antigen 1*) (rot: **b** in **A**, **B** und **C**), einem Marker für frühe Endosomen, in Kontroll- (**A**), PID1-defizienten (**B**) und ARH-defizienten (**C**) HUH7-Zellen detektiert und die Zellen anschließend mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Die Übereinanderlagerung der Signale (merge: **d** in **A**, **B** und **C**) zeigt, dass in allen drei Zelllinien (**A** – **C**) viele der zytoplasmatischen LRP1-positiven Vesikel mit EEA1 kolokalisieren. Zusätzlich weist auch das LRP1-positive, Kern-nahe Kompartiment in den Kontroll- (**A**) und ARH-defizienten (**C**) HUH7-Zellen viele Kolokalisationen mit EEA1-positiven Vesikeln auf (weiße Pfeile, vgl. **A**, **B** und **C**: Vergrößerungen eines Ausschnittes (gezeigt in **d**): **e** von **a**, **f** von **b** und **g** von **d**). Die Lokalisation von LRP1 in frühen Endosomen bestätigt dessen Funktion als endozytierender Rezeptor. Die Kolokalisationen des LRP1-positiven Kompartiments mit EEA1 weisen zusätzlich darauf hin, dass LRP1 in einem „endozytischen“ *Recycling*-Kompartiment lokalisiert sein könnte (**d** (vgl. **g**) in **A** und **C**). Außerdem stellt die Kolokalisation der LRP1- und EEA1-positiven Vesikel in den PID1-defizienten Zellen dar (**B d**, vgl. **g**), dass LRP1 trotz einer möglichen Fehlsortierung in Abwesenheit von PID1 noch an die Zelloberfläche gelangt und dort endozytisch aktiv ist. DAPI-Kernfärbung (blau: **c** in **A**, **B** und **C**), Dicke des optischen Schnitts: 1.0 µm, Skalierungsbalken: 10 µm

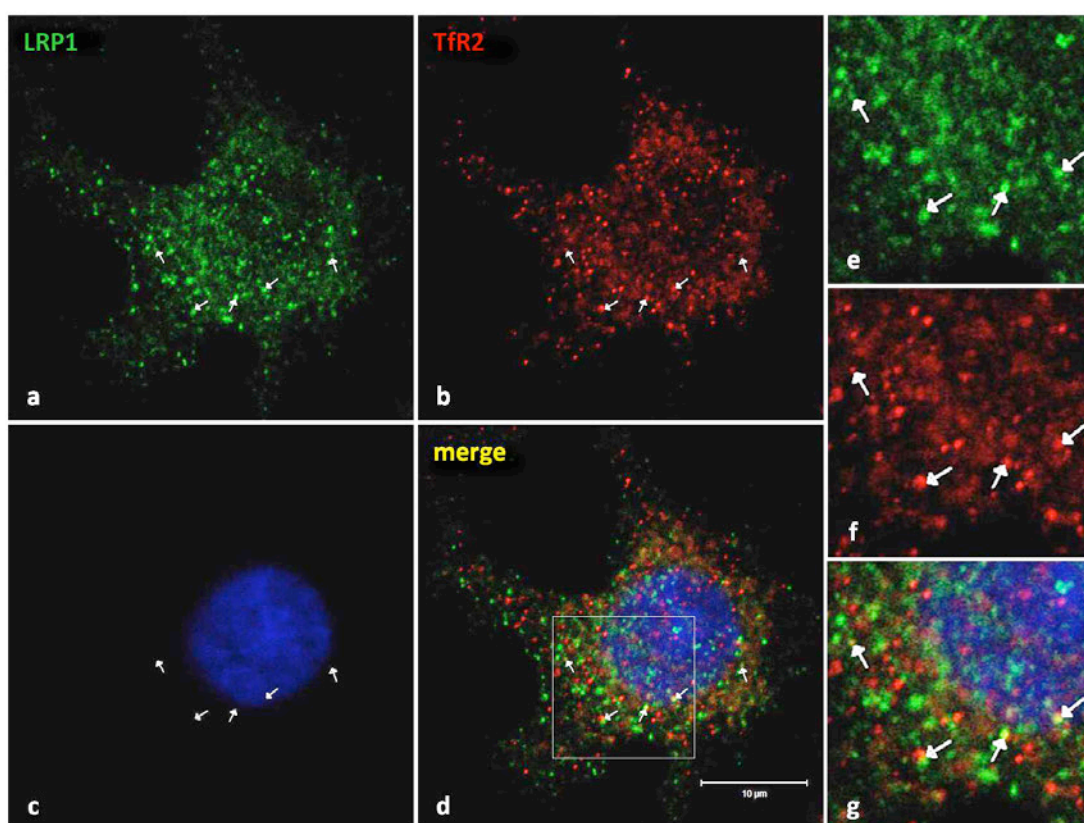
Zur Analyse einer möglichen nicht-polarisierten Verteilung von LRP1 in Abwesenheit von PID1 wurde als nächstes eine Kolokalisation von LRP1 mit dem Transferrinrezeptor 2 (TfR2) (Abb. 18, vgl. Abb. 11) analysiert. TfR2 wird wie LRP1 in Hepatozyten exprimiert und basolateral sortiert. Zusätzlich rezirkuliert TfR2 nach der Endozytose zur Zellmembran. TfR2 wurde daher hier zum einen als *Recycling*-Endosom-Marker und zum anderen als Marker für eine basolaterale Sortierung verwendet (Abb. 18, vgl. Abb. 11). Obwohl es sich bei HUH7-Zellen um eine Hepatomazelllinie handelt, kann davon ausgegangen werden, dass diese Zellen noch eine Polarität, d.h. sowohl eine basolaterale als auch apikale Membran aufweisen. Wie die Abbildung 18 darstellt, kolokalisiert LRP1 in allen drei Zelllinien mit vielen TfR2-positiven Vesikeln. In den Kontroll- und ARH-defizienten HUH7-Zellen kolokalisieren dabei sowohl das LRP1-positive, juxtanukleäre Kompartiment als auch LRP1-positive Vesikel in der Peripherie der Zelle mit TfR2 (weiße Pfeile, d in A und C, vgl. g Vergrößerung von d). Ebenso zeigen die PID1-defizienten Zellen viele Kolokalisationen der LRP1-positiven Vesikel mit TfR2 (weiße Pfeile, d in Abbildung 18 B, vgl. g Vergrößerung von d). Es konnten folglich keine Unterschiede in der Anzahl der LRP1/TfR2-Kolokalisationen zwischen den verschiedenen HUH7-Zelllinien festgestellt werden, was eine Fehlsortierung von LRP1 in PID1-defizienten HUH7-Zellen in Frage stellen könnte. Allerdings sind diese Daten konsistent zu den Daten der Kolokalisationsstudie mittels des Markers EEA1 und deuten an, dass auch in den PID1-defizienten HUH7-Zellen ein Teil der LRP1-positiven Vesikel an die „basolaterale Membran“ sortiert wird und somit eine nicht-polarisierte Verteilung von LRP1 in Abwesenheit von PID1 nicht ausgeschlossen werden kann.



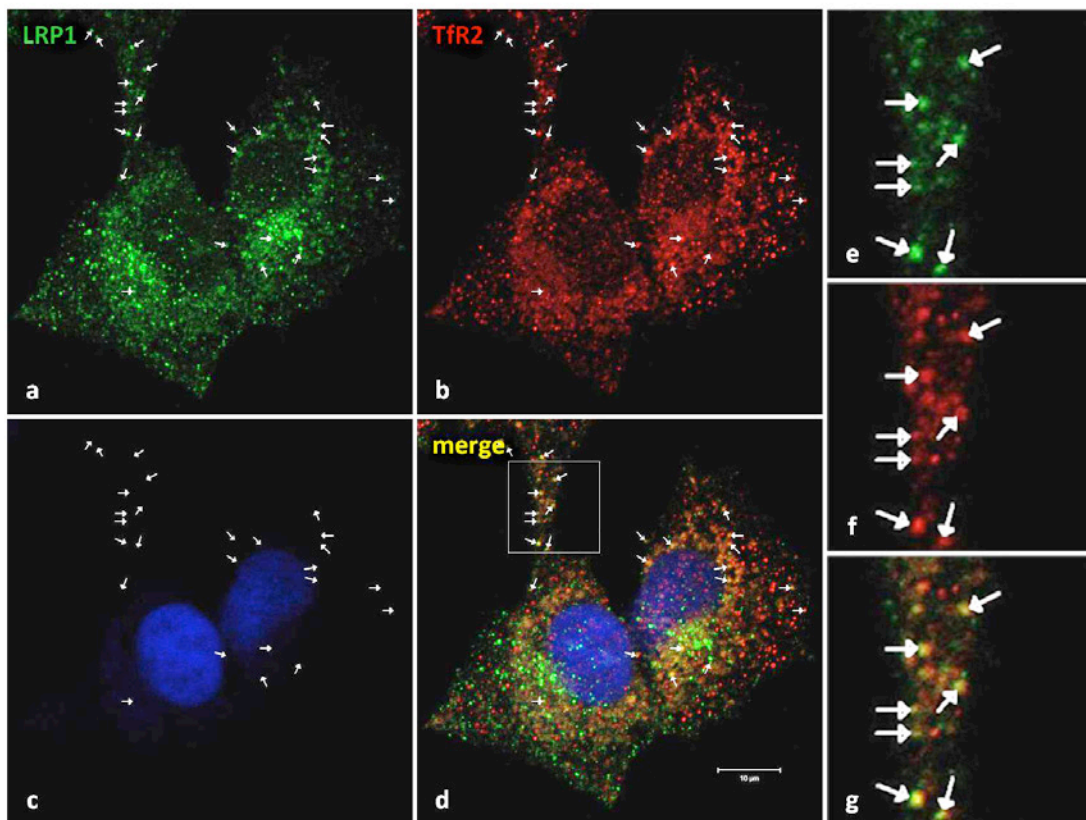
**A** HUH7 sh Kontrolle



**B** HUH7 sh PID1



## C HUH7 sh ARH

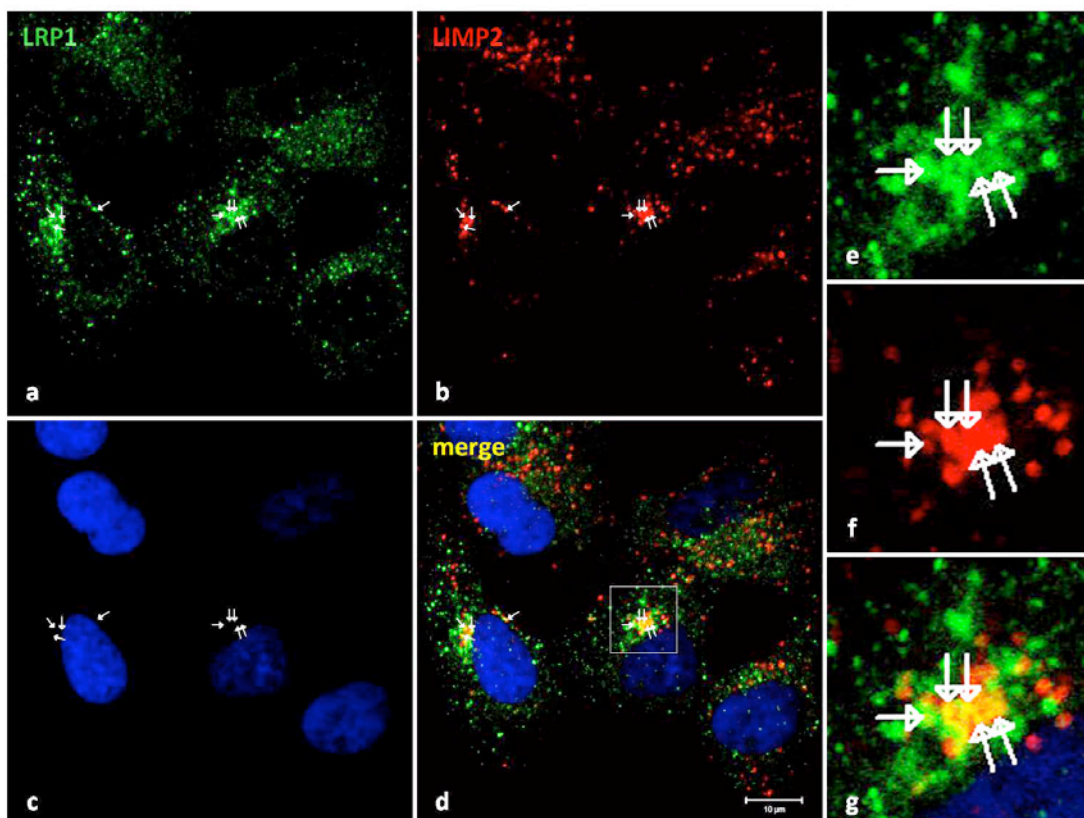


**Abbildung 18: LRP1 kolokalisiert mit TfR2 in Kontroll-, PID1-knock-down und ARH-knock-down HUH7-Zellen.** Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von LRP1 in HUH7-Zellen und der veränderten LRP1-Lokalisation in PID1-defizienten HUH7-Zellen wurde in einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung gleichzeitig LRP1 (grün: **a** in **A**, **B** und **C**) und TfR2 (rot: **b** in **A**, **B** und **C**) in Kontroll- (**A**), PID1-defizienten (**B**) und ARH-defizienten (**C**) HUH7-Zellen detektiert und die Zellen anschließend mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. TfR2 wird häufig als zellulärer Marker für *Recycling*-Endosomen eingesetzt. Zusätzlich wurde hier eine Kolokalisation der beiden basolateral-sortierten Rezeptoren LRP1 und TfR2 zur Analyse einer möglichen nicht-polarisierten Verteilung von LRP1 in Abwesenheit von PID1 untersucht. Die Übereinanderlagerung der Signale (merge: **d** in **A**, **B** und **C**) zeigt, dass in allen drei Zelllinien LRP1 mit TfR2-positiven Vesikeln kolokalisiert (weiße Pfeile, vgl. **A**, **B** und **C**: Vergrößerungen eines Ausschnittes (gezeigt in **d**): **e** von **a**, **f** von **b** und **g** von **d**). Die Kolokalisation der LRP1-positiven Vesikel mit TfR2 in den PID1-defizienten Zellen (**B d**, vgl. **g**) liefert Hinweise, dass die Abwesenheit von PID1 zu einer nicht-polarisierten Verteilung von LRP1 führen könnte. DAPI-Kernfärbung (blau: **c** in **A**, **B** und **C**), Dicke des optischen Schnitts: 1.0 µm, Skalierungsbalken: 10 µm.

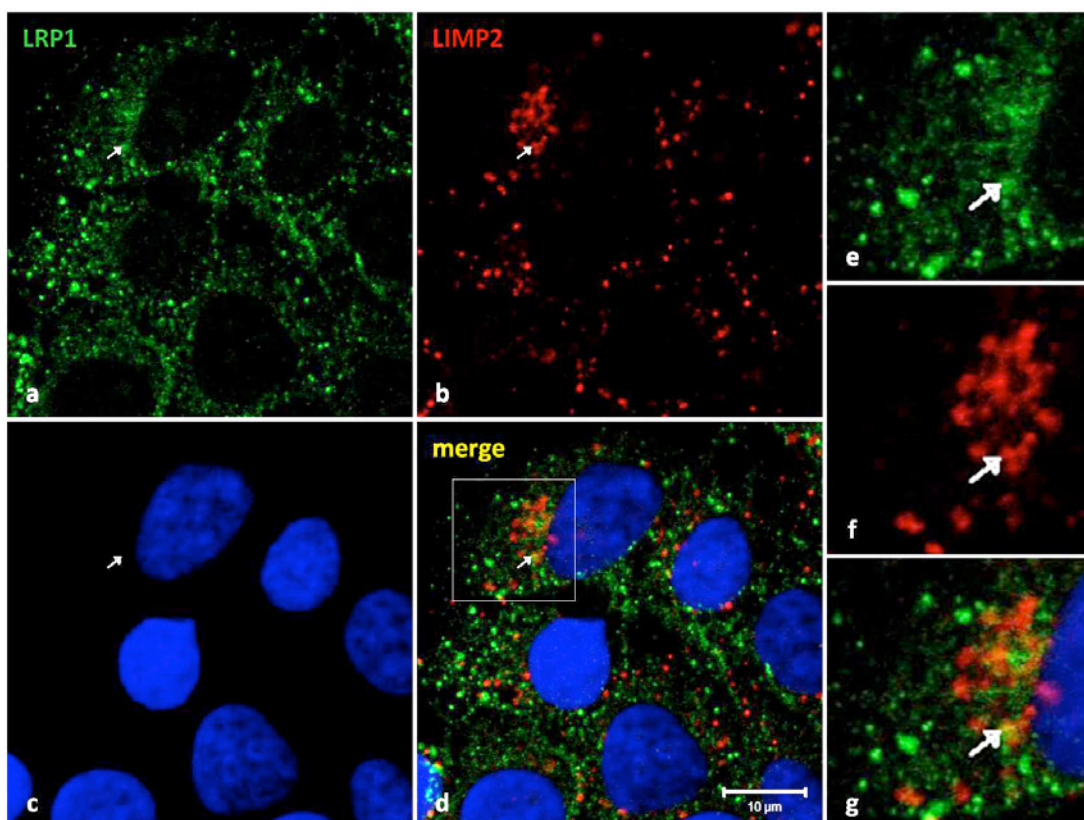


Als letztes wurde noch eine mögliche Kolo-kalisation von LRP1 mit Lysosomen in Kontroll-, PID1-defizienten und ARH-defizienten HUH7-Zellen untersucht. Dabei war es interessant herauszufinden, ob in den PID1-defizienten HUH7-Zellen LRP1 aufgrund der vermeintlichen Fehlsortierung dem lysosomalen Abbau zugeführt wird. Dazu wurde LIMP-2 (*lysosomal integrated membrane protein-2*), ein lysosomales Typ III-Transmembranprotein der CD36-Superfamilie, als lysosomaler Marker eingesetzt (Abb. 19, vgl. Abb. 11). LIMP-2 zeigt jedoch in HUH7-Zellen, neben einer vesikulären Lokalisation, in manchen Zellen auch eine konzentrierte Lokalisation in einem Kern-nahen Kompartiment (b in Abb. 19 A, B und C, vgl. f Vergrößerung von b). Interessanterweise ist LIMP-2 vermutlich auch an der Sortierung von Proteinen der apikalen Membran am endozytischen *Recycling*-Kompartiment (vgl. Abb. 11) in polarisierten Zellen beteiligt (Claussen, unveröffentlichte Daten, Knipper et al. 2006), was neben der lysosomalen Lokalisation von LIMP-2, unter anderem auch eine Lokalisation in frühen Endosomen sowie *Recycling*-Endosomen erklären würde. Wie Abbildung 19 zeigt, kolo-kalisiert der überwiegende Teil von LRP1 in allen drei Zelllinien nicht mit den LIMP-2-positiven Vesikeln, die vermutlich die Lysosomen darstellen. Allerdings kommt es in den Kontroll- und in den ARH-defizienten HUH7-Zellen häufig zu einer Kolo-kalisation von LRP1 und LIMP-2 in einem Kern-nahen Kompartiment (vgl. weiße Pfeile, d in Abb. 19 A und C, vgl. g Vergrößerung von d). In den PID1-defizienten HUH7-Zellen kolo-kalisieren die LRP1-positiven Vesikel dagegen kaum mit dem LIMP-2-positiven Kompartiment (vgl. weiße Pfeile, d in Abb. 19 B vgl. g Vergrößerung von d). Diese Daten weisen einerseits darauf hin, dass LRP1 aufgrund seiner vermutlichen Fehlsortierung in Abwesenheit seines spezifischen Adapterproteins PID1 nicht dem lysosomalen Abbau zugeführt wird, was durch andere Lysosomen-Marker bestätigt werden sollte. Andererseits liefert auch der Marker LIMP-2 Hinweise darauf, dass LRP1 sich in HUH7-Zellen in einem endozytischen *Recycling*-Kompartiment befinden könnte, von dem aus LRP1 auf einen Stimulus hin an die Zellmembran transloziert wird.

**A** HUH7 sh Kontrolle



**B** HUH7 sh PID1



## C HUH7 sh ARH

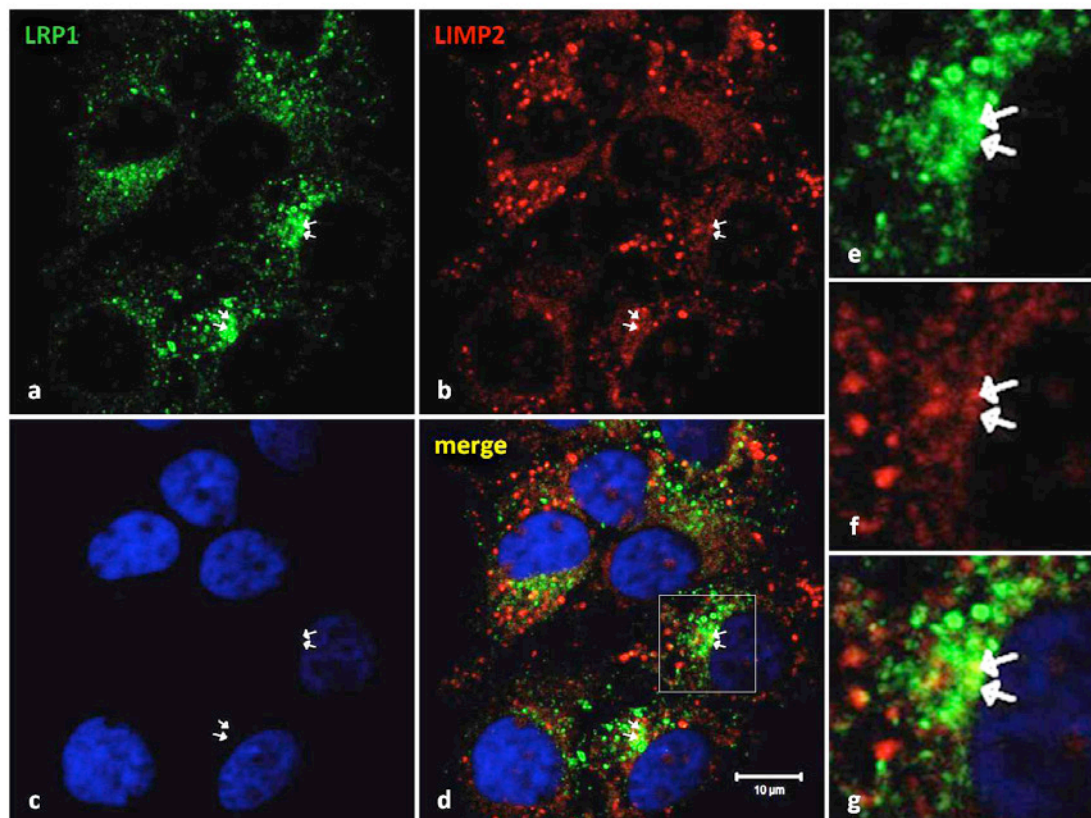


Abbildung 19: In den Kontroll- und ARH-defizienten HUH7-Zellen kolokalisiert LRP1 stark mit LIMP-2 in einem juxtanukleären Kompartiment. Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von LRP1 in HUH7-Zellen und einer möglichen Fehlsortierung von LRP1 in Abwesenheit von PID1 wurde in einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung gleichzeitig LRP1 (grün: **a** in **A**, **B** und **C**) und LIMP-2 (rot: **b** in **A**, **B** und **C**) in Kontroll- (**A**), PID1-defizienten (**B**) und ARH-defizienten (**C**) HUH7-Zellen detektiert und die Zellen anschließend mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Als lysosomales Typ III-Transmembranprotein ist LIMP-2 als zellulärer Marker für Lysosomen anzusehen. Allerdings wird für LIMP-2 auch eine Rolle in der Sortierung apikaler Membranproteine am endozytischen *Recycling*-Kompartiment angenommen, was die zusätzliche Lokalisation von LIMP-2 in frühen sowie *Recycling*-Endosomen erklären könnte. Die Übereinanderlagerung der Signale (merge: **d** in **A**, **B** und **C**) zeigt, dass in allen drei Zelllinien der überwiegende Teil von LRP1 nicht mit den LIMP-2 positiven Vesikeln und folglich Lysosomen kolokalisiert. Interessanterweise kolokalisieren LRP1 und LIMP-2 vor allem in den Kontroll- und in den ARH-defizienten Zellen in einem Kern-nahen Kompartiment (weiße Pfeile, vgl. **A**, **B** und **C**: Vergrößerungen eines Ausschnittes (gezeigt in **d**): **e** von **a**, **f** von **b** und **g** von **d**). LRP1 und LIMP-2 könnten hier in einem endozytischen *Recycling*-Kompartiment lokalisiert sein. DAPI-Kernfärbung (blau: **c** in **A**, **B** und **C**), Dicke des optischen Schnitts: 1.0 µm, Skalierungsbalken: 10 µm

Die oben beschriebenen Kolokalisationsstudien zeigen, dass LRP1 in den Kontroll-, PID1-defizienten und ARH-defizienten HUH7-Zellen mit allen verwendeten zellulären Markern wenigstens teilweise kolokalisiert, was den intrazellulären Transport von LRP1 bestätigt. Dabei konnten in allen untersuchten Zellen der Kontroll-, der PID1-defizienten und der ARH-defizienten Zelllinie beim Einsatz jedes zellulären Markers teils stärkere und teils schwächere

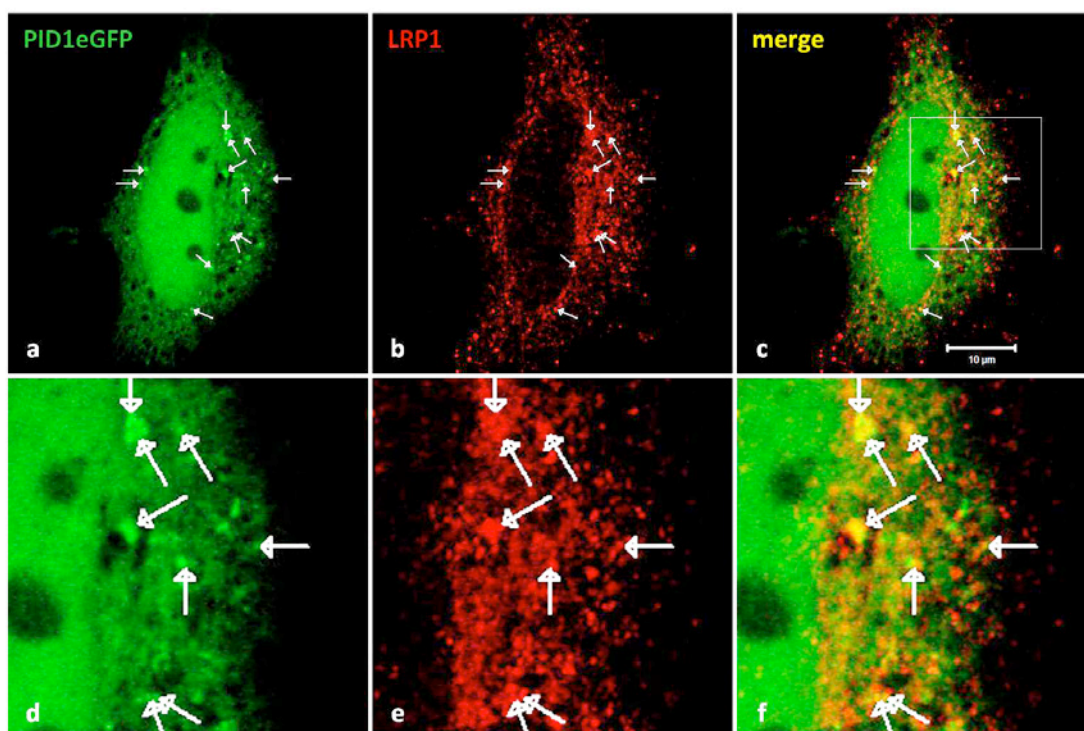
Kolokalisationen beobachtet werden, was vermutlich auf den jeweiligen Zustand der Zelle zurückzuführen ist. Die Untersuchungen zeigten jedoch, dass LRP1 in den Kontroll- und den ARH-defizienten HUH7-Zellen überwiegend in endozytischen Kompartimenten, d.h. in frühen und *Recycling*-Endosomen sowie in einem *Recycling*-Kompartiment lokalisiert ist. Die Kolokalisationsstudien in PID1-defizienten HUH7-Zellen lieferten ähnliche Ergebnisse. Allerdings kolokalisieren die LRP1-positiven Vesikel der PID1-defizienten HUH7-Zellen zum einen stärker mit Rab6-positiven Vesikeln, zum anderen zeigen sie aufgrund ihrer Verteilung im gesamten Zytoplasma tendenziell weniger Kolokalisationen mit dem Rab11- und EEA1-positiven Kompartiment, in dem LRP1 in den Kontroll- und ARH-defizienten Zellen konzentriert lokalisiert ist. Jedoch weist die Kolokalisation von LRP1 mit Rab11-positiven Vesikeln sowie auch die Lokalisation von LRP1 in EEA1- und TfR2-positiven Vesikeln in den PID1-defizienten Zellen darauf hin, dass LRP1 auch in Abwesenheit von PID1 noch über das *Recycling*-Kompartiment an die „basolaterale“ Membran transportiert werden kann, weshalb in diesen Zellen eine nicht-polarisierte Verteilung von LRP1 vermutet werden kann.

### 3.3.3 Die zelluläre Lokalisation von PID1 in HeLa-Zellen

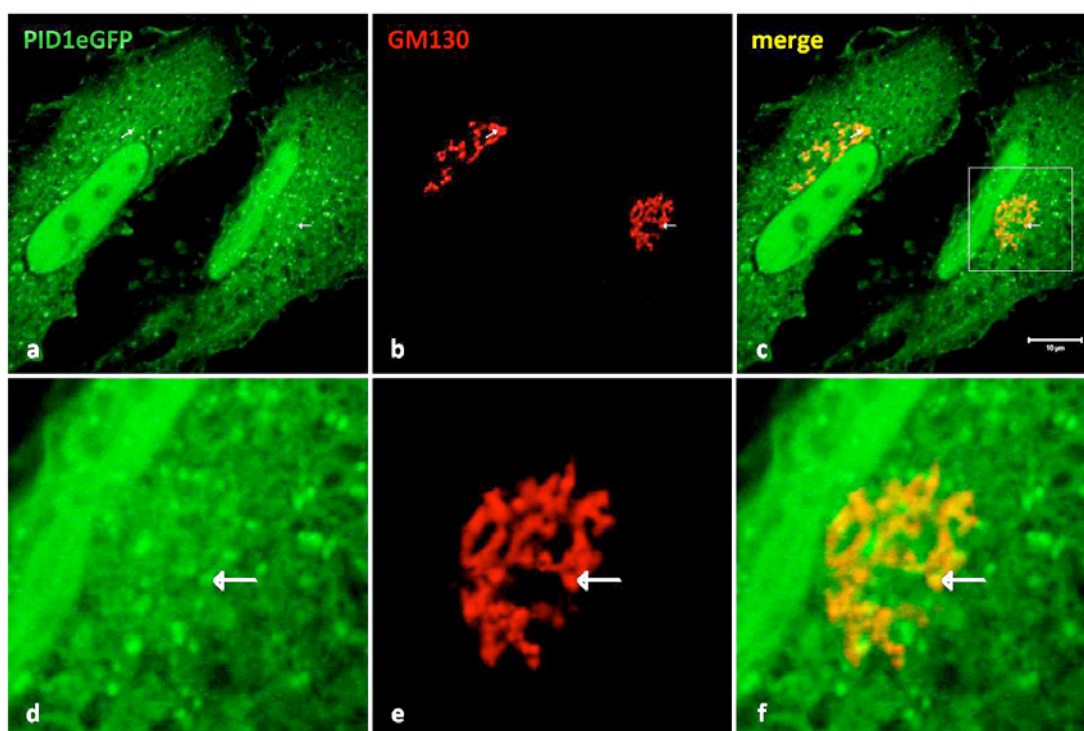
Die Abwesenheit des LRP1-spezifischen Adapterproteins PID1 führt in HUH7-Zellen zu einer veränderten zellulären Lokalisation von LRP1, was auf eine Fehlsortierung von LRP1 aufgrund einer fehlenden LRP1/PID1-Interaktion hindeutet. Daher erschien es wichtig, die zelluläre Lokalisation von PID1 zu untersuchen, um Hinweise darauf zu bekommen, an welchen Kompartimenten PID1 den weiteren intrazellulären Transport von LRP1 beeinflusst. Aufgrund eines fehlenden Antikörpers, der endogenes PID1 detektiert, wurde dazu zunächst in HeLa-Zellen das murine PID1 (grün) als eGFP-Fusionsprotein exprimiert (a in Abb. 20 A, B, C, D, E und F) und in einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung dann zusätzlich sowohl endogenes LRP1 (rot) (Abb. 20 A b) als auch verschiedene zelluläre Marker wie GM130 (Abb. 20 B b, vgl. Abb. 11), TGN46 (Abb. 20 C b, vgl. Abb. 11), Rab6 (Abb. 20 D b, vgl. Abb. 11) als Golgi-Marker, Rab11 (Abb. 20 E b, vgl. Abb. 11) als *Recycling*-Kompartiment-Marker und EEA1 (Abb. 20 F b, vgl. Abb. 11) als Marker für frühe Endosomen detektiert. Die Zellen wurden anschließend mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert.



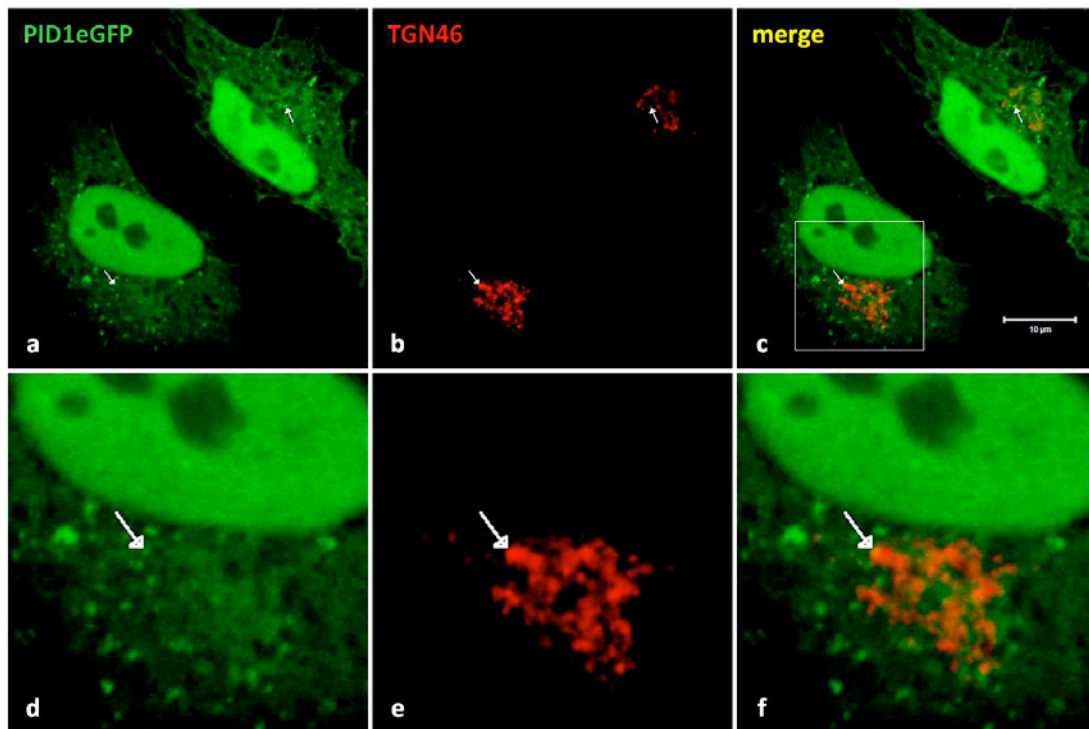
**A HeLa**



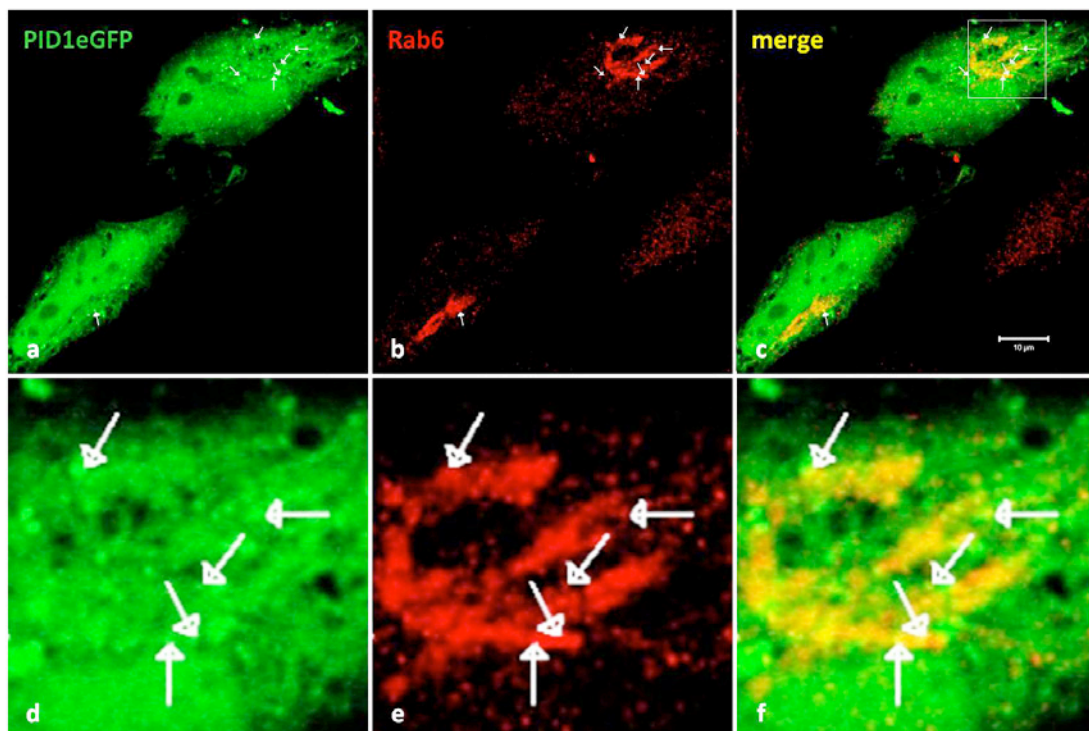
**B HeLa**



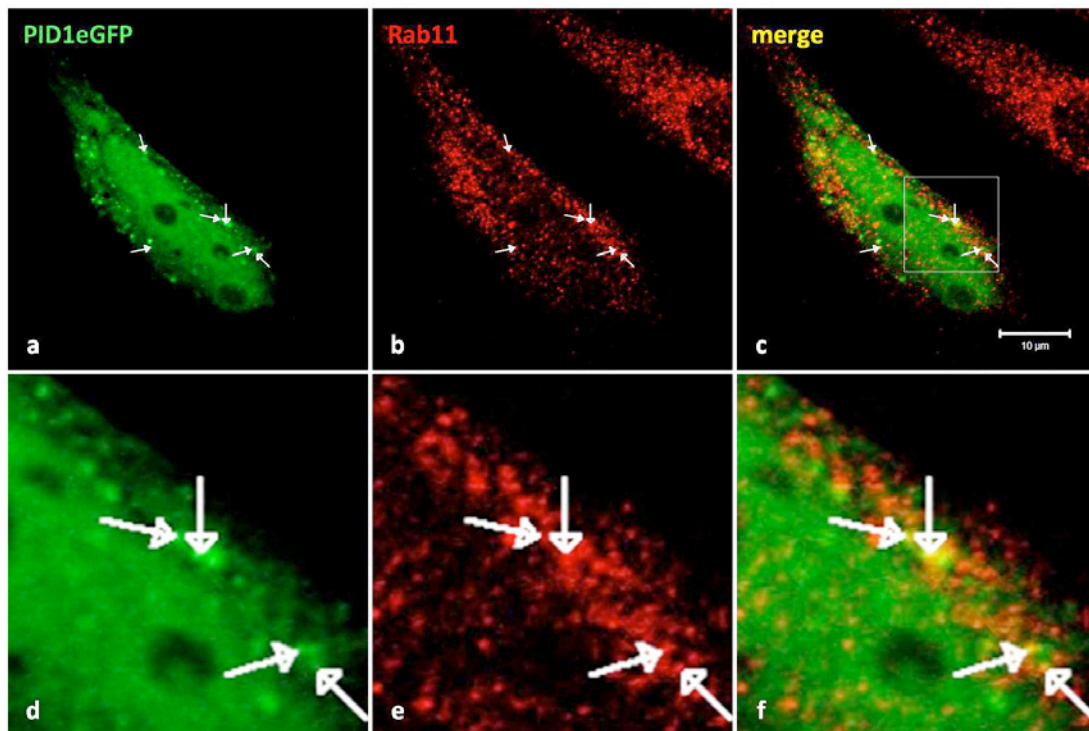
C HeLa



D HeLa



## E HeLa



## F HeLa

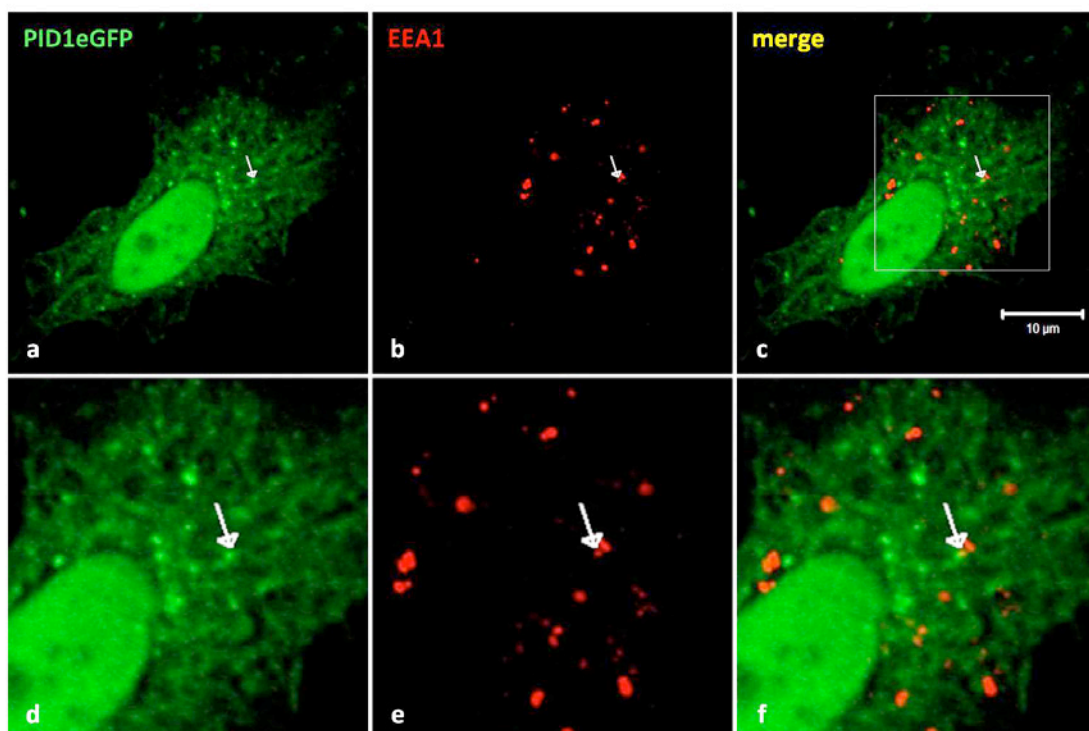


Abbildung 20: **PID1** kolokalisiert mit **LRP1**, **Rab6** und **Rab11** in **HeLa-Zellen**. Zur Analyse der zellulären Lokalisation von PID1 wurde in HeLa-Zellen zunächst murines PID1 (grün) als eGFP-Fusionsprotein überexprimiert (a in A, B, C, D, E und F, vgl. d Vergrößerung von a, Ausschnitt gezeigt in c). In einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung wurde dann zusätzlich sowohl endogenes LRP1



(rot) (**A b**, vgl. **e** Vergrößerung von **b**, Ausschnitt gezeigt in **c**) mittels des LRP1-spezifischen Antikörpers „Dolly“ detektiert und mittels eines Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten sekundären Antikörpers markiert als auch verschiedene zelluläre Marker (rot) (**b** in **B**, **C**, **D**, **E** und **F**, vgl. **e** Vergrößerung von **b**, Ausschnitt gezeigt in **c**) wie GM130 (**B**), TGN46 (**C**) und Rab6 (**D**) als Golgi-Marker, Rab11 (**E**) als *Recycling*-Kompartiment-Marker und EEA1 (**F**) als Marker für frühe Endosomen durch spezifische primäre Antikörper detektiert und durch fluoreszierende sekundäre Antikörper immunmarkiert. Die Zellen wurden anschließend mittels konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie untersucht. Die Übereinanderlagerung der Signale (**c** in **A**, **B**, **C**, **D**, **E** und **F**, vgl. **f** Vergrößerung von **c**, Ausschnitt gezeigt in **c**) zeigt, dass die PID1eGFP-positiven Vesikel mit LRP1 (weiße Pfeile, **A c**, vgl. **f**), mit dem Golgi-Marker Rab6 (weiße Pfeile, **D c**, vgl. **f**) und mit dem *Recycling*-Kompartiment-Marker Rab11 (weiße Pfeile, **E c**, vgl. **f**) kolokalisieren. Dicke des optischen Schnitts: 1.0  $\mu\text{m}$ , Skalierungsbalken: 10  $\mu\text{m}$

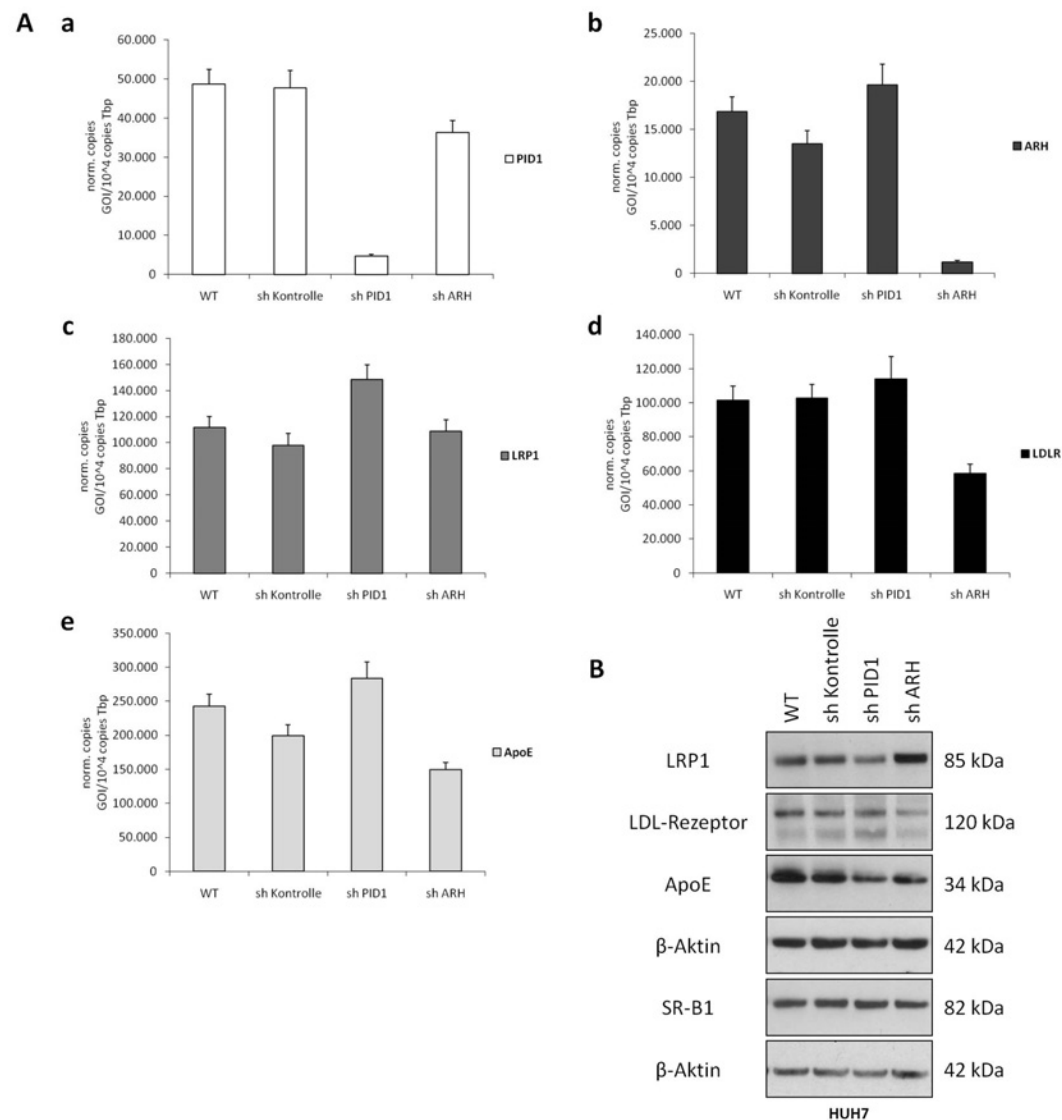
Die Analyse der zellulären Lokalisation von PID1 zeigt, dass das PID1eGFP-Fusionsprotein zum einen eine vesikuläre Lokalisation in HeLa-Zellen aufweist (a in Abb. 20 A, B, C, D, E und F, vgl. d Vergrößerung von a), zum anderen mit LRP1 sowie mit allen hier eingesetzten zellulären Markerproteinen, wie das auch für LRP1 in 3.3.2 beobachtet wurde, wenigstens teilweise kolokalisiert (weiße Pfeile, c in Abb. 20 A, B, C, D, E und F, vgl. f Vergrößerung von c). Besonders viele Kolokalisationen sind allerdings zwischen PID1eGFP und LRP1 (Abb. 20 A c, vgl. f), wobei LRP1 in den PID1eGFP-positiven Vesikeln häufig ein punktiertes Muster aufweist, dem *Recycling*-Kompartiment-Marker Rab11 (Abb. 20 E c, vgl. f) sowie dem Golgi-Marker Rab6 (Abb. 20 D c, vgl. f) zu beobachten. Dabei könnte die Kolokalisation von PID1eGFP mit Rab6 auf neu-synthetisiertes PID1eGFP zurückzuführen sein, allerdings kolokalisiert PID1eGFP wesentlich schwächer sowohl mit dem cis-Golgi-Marker GM130 (Abb. 20 B c, vgl. f) als auch mit dem trans-Golgi-Marker TGN46 (Abb. 20 C c, vgl. f). Interessanterweise kolokalisiert PID1eGFP ebenfalls kaum mit frühen Endosomen (Abb. 20 F c, vgl. f), was darauf hinweist, dass PID1 nicht die LRP1-vermittelte Endozytose reguliert.

Die hier gezeigte zelluläre Lokalisation von PID1 in HeLa-Zellen bestätigt weiterhin, dass PID1 ein LRP1-spezifisches Adapterprotein ist, das an dem intrazellulären Transport von LRP1 möglicherweise an verschiedenen Kompartimenten zwischen dem Golgi-Apparat und der Plasmamembran beteiligt sein könnte.



### 3.4 Die Beeinflussung der Expression der Lipoproteinrezeptoren LRP1 und LDLR in PID1- und ARH-defizienten HUH7-Zellen

Wie in 3.3.1 beschrieben, führt die Abwesenheit von PID1 in HUH7-Zellen zu einer vermutlich zu einer Fehlsortierung von LRP1 und zum anderen zu einer verringerten LRP1-Expression. Die Abwesenheit des LDL-Rezeptor-spezifischen Adapterproteins ARH in HUH7-Zellen führt dagegen stets zu einer verstärkten LRP1-Expression. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass ein Fehlen von PID1 zu einem Funktionsverlust von LRP1 führen könnte, der mit einer verringerten LRP1-Expression einhergeht. Die Abwesenheit von ARH könnte daher mit einem Funktionsverlust des LDL-Rezeptors korrelieren und in der Folge zu einer kompensatorischen Hochregulation von LRP1 führen. Um diese Hypothesen zu überprüfen, wurde hier die Expression der Lipoproteinrezeptoren LRP1 und LDLR in Wildtyp-, Kontroll-, PID1-defizienten und ARH-defizienten HUH7-Zellen sowohl auf RNA-Ebene mittels quantitativer TaqMan®-PCR (Abb. 21 A c und d) als auch auf Proteinebene mittels einer Western Blot-Analyse (Abb. 21 B) untersucht. Dabei zeigten sich jedoch in der quantitativen TaqMan®-PCR in allen vier Zelllinien keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression der Lipoproteinrezeptoren LRP1 (Abb. 21 A c) und LDLR (Abb. 21 A d). Lediglich die Genexpression des LDL-Rezeptors ist nach *Knock-down* von ARH schwach herunterreguliert (Abb. 21 A d). Die Western Blot-Analyse in Abbildung 21 B zeigt jedoch konsistent zu den Beobachtungen der Immunfluoreszenzanalysen (vgl. 3.3.1), dass in den PID1-defizienten HUH7-Zellen die Proteinexpression von LRP1 leicht herunterreguliert ist, während dagegen in den ARH-defizienten HUH7-Zellen die Proteinexpression des LDL-Rezeptors konsistent zu den Daten der Genexpression (Abb. 21 A d) herunterreguliert ist. Interessanterweise kann in Abwesenheit von PID1 in HUH7-Zellen eine leichte Hochregulation des LDL-Rezeptors beobachtet werden und in Abwesenheit von ARH dagegen eine Hochregulation von LRP1, die ebenfalls konsistent mit den Daten der Immunfluoreszenzanalysen ist (vgl. 3.3.1). Diese Effekte könnten, wie bereits erwähnt, darauf zurückzuführen sein, dass die Abwesenheit eines Adapterproteins mit einem Funktionsverlust ihres Rezeptors einhergeht und das in der Folge zu einer kompensatorischen Hochregulation des anderen Lipoproteinrezeptors führt.



**Abbildung 21: Die Beeinflussung der Expression der Lipoproteinrezeptoren LDLR und LRP1 in PID1- und ARH-defizienten HUH7-Zellen.** **A** zeigt eine Analyse der Genexpression von PID1 (**a**), ARH (**b**), LRP1 (**c**), LDLR (**d**) und ApoE (**e**) auf RNA-Ebene mittels quantitativer TaqMan®-PCR in Wildtyp-HUH7-Zellen und in HUH7-Zellen, die stabil eine Kontroll-shRNA, eine PID1-shRNA oder eine ARH-shRNA exprimieren. Der in **a** und **b** dargestellte, sehr effiziente *Knock-down* von PID1 und ARH hat jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression von LRP1 (**c**), LDLR (**d**) und ApoE (**e**). **B** zeigt die Detektion der Proteine LRP1, LDLR, ApoE und SR-B1 in einer Western Blot-Analyse in Wildtyp-, Kontroll-, PID1-defizienten und ARH-defizienten HUH7-Zellen. Dabei zeigt die Detektion von LRP1 und LDLR, dass in den PID1-defizienten HUH7-Zellen LRP1 herunterreguliert ist, während in den ARH-defizienten HUH7-Zellen der LDL-Rezeptor herunterreguliert ist. Gleichzeitig kommt es vermutlich aufgrund des Funktionsverlustes der Lipoproteinrezeptoren in Abwesenheit ihrer spezifischen Adapterproteine zur kompensatorischen Hochregulation des anderen Lipoproteinrezeptors. Interessanterweise weisen sowohl die PID1- als auch die ARH-defizienten HUH7-Zellen weniger ApoE auf, was auf einen Einfluss von PID1 auf die LRP1-vermittelte Endozytose hinweisen könnte. Für ApoE und SR-B1, dessen Expression in allen vier Zelllinien unbeeinflusst ist, ist zusätzlich eine β-Aktin-Ladekontrolle gezeigt. Sowohl der LDL-Rezeptor-spezifische Antikörper als auch der Anti-LRP1-Antikörper „5A6“ binden an das nicht-denaturierte Protein, daher war in diesen Lysaten eine Detektion von β-Aktin als Ladekontrolle nicht möglich. Als Kontrolle wurde hier zunächst LRP1 detektiert, der Blot gestriipt und dann der LDL-Rezeptor detektiert.

Die Daten in Abbildung 21 zeigen zusätzlich, dass die Expression und kompensatorische Hochregulation der Lipoproteinrezeptoren aufgrund des Fehlens ihrer spezifischen Adapterproteine hauptsächlich auf Proteinebene beeinflusst wird. Wie Abbildung 21 B darstellt, wurde als Kontrolle ebenfalls die Proteinexpression des *Scavenger* Rezeptors SR-B1 untersucht, der in der Leber wichtig für die Aufnahme von HDL ist (Acton et al. 1996). Allerdings ist dessen Expression sowohl nach *Knock-down* von PID1 als auch von ARH in HUH7-Zellen erwartungsgemäß unbeeinflusst. Interessanterweise ist die Konzentration des ApoE in HUH7-Zellen sowohl nach *Knock-down* von PID1 als auch von ARH stark erniedrigt (Abb. 21 B). Dieser Effekt könnte zum einen auf eine beeinflusste Genexpression auf RNA-Ebene zurückzuführen sein. Wie Abbildung 21 A e zeigt, konnte dies jedoch weder in den PID1- noch in den ARH-defizienten HUH7-Zellen bestätigt werden. Wie bereits erwähnt, reguliert ARH spezifisch die LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose unter anderem von ApoE-enthaltenden Lipoproteinen. Die verminderte ApoE-Konzentration könnte in den ARH-defizienten HUH7-Zellen folglich auf eine gestörte Aufnahme zurückzuführen sein. Da der gleiche Effekt in den PID1-defizienten HUH7-Zellen zu beobachten ist, könnte dies ein Hinweis auf einen Einfluss des Adapterproteins PID1 auf die LRP1-vermittelte Endozytose sein. Es konnte zwar in 3.3.2 und 3.3.3 gezeigt werden, dass PID1 vermutlich nicht direkt die LRP1-vermittelte Endozytose reguliert wie beispielsweise ARH die LDL-Rezeptor-vermittelte Aufnahme (He et al. 2002, Maurer und Cooper 2006, Mishra et al. 2005, Mishra, Watkins und Traub 2002), jedoch könnte die Fehlsortierung von LRP1 in PID1-defizienten HUH7-Zellen zu einem Funktionsverlust von LRP1 als endozytisch-aktiver Rezeptor führen.

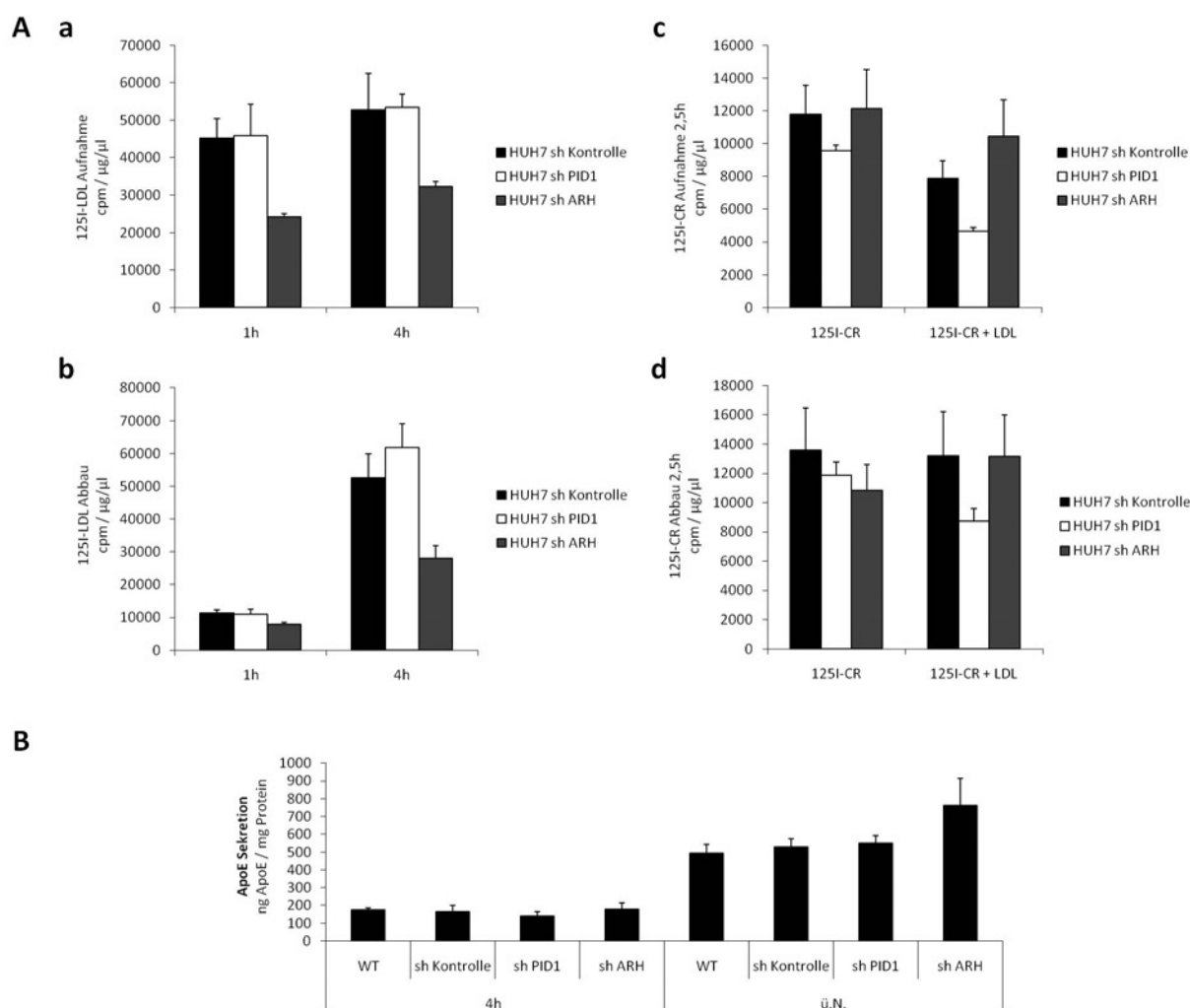
### **3.5 Die Rolle der PTB-Adapterproteine PID1 und ARH in der LRP1- und LDL-Rezeptor-vermittelten Endozytose in HUH7-Zellen**

Der LDL-Rezeptor ist als klassisch endozytierender ApoB100-, ApoE-Rezeptor vor allem essentiell für die Aufnahme cholesterinreicher Lipoproteine geringer Dichte (LDL). Es konnte gezeigt werden, dass das PTB-Adapterprotein ARH mit dem NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne des LDL-Rezeptors interagiert und in Hepatozyten spezifisch die LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose reguliert (He et al. 2002, Mishra et al. 2005, Mishra, Watkins und Traub 2002). LRP1 reguliert dagegen in der Leber die Aufnahme von ApoE-enthaltenden Lipoproteinen wie Chylomikronen-Remnants (Beisiegel et. al. 1989, Rohlmann et al. 1998,

Véniant et al. 1998). Die Adapterproteine, die an der LRP1-vermittelten Endozytose in Hepatozyten partizipieren, sind nicht bekannt.

Die Immunfluoreszenzanalyse in 3.3.3 zeigt, dass PID1 in HeLa-Zellen nicht oder nur teilweise mit frühen Endosomen kolokalisiert, was die Vermutung nahe legt, dass PID1 nicht unmittelbar die LRP1-vermittelte Endozytose reguliert, wie ARH in die LDL-Rezeptor-vermittelte Aufnahme involviert ist. Dennoch liefert die Immunfluoreszenzanalyse in 3.3.1 Hinweise darauf, dass ein Fehlen des LRP1-spezifischen Adapterproteins PID1 im Gegensatz zu einer Abwesenheit von ARH zu einer Fehlsortierung von LRP1 in HUH7-Zellen führt. Zusätzlich weisen die Kolokalisationsstudien in 3.3.2 darauf hin, dass es sich bei der Fehlsortierung von LRP1 um eine nicht-polarisierte Verteilung von LRP1 handeln kann, die dazu führen würde, dass LRP1 nicht nur an die basolaterale Membran, sondern auch an die apikale transportiert wird, was teilweise mit einem Funktionsverlust von LRP1 als endozytischer Rezeptor einhergehen würde. Zusätzlich konnte in 3.4 gezeigt werden, dass PID1- und ARH-defiziente HUH7-Zellen eine geringere ApoE-Konzentration aufweisen (vgl. Abb. 21 B), was als Hinweis auf eine gestörte LRP1- und LDL-Rezeptor-vermittelte Aufnahme gedeutet werden kann. Ein Einfluss von PID1 und ARH auf die Genexpression von ApoE konnte dabei ausgeschlossen werden (vgl. Abb. 21 A e).

Allerdings kann dieser Effekt ebenfalls auf eine erhöhte ApoE-Sekretion zurückzuführen sein, daher wurde zusätzlich im Überstand von vier Stunden- und über Nacht-gehungerten Wildtyp-, Kontroll-, PID1-defizienten und ARH-defizienten HUH7-Zellen (vgl. 3.2 und Abb. 9 A) mithilfe eines ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) sezerniertes ApoE gemessen. Dabei zeigte sich, dass in den PID1-defizienten HUH7-Zellen die ApoE-Sekretion unbeeinflusst ist, während sie in den über Nacht-gehungerten ARH-defizienten HUH7-Zellen erhöht ist (Abb. 22 B). In den ARH-defizienten Zellen könnte die verringerte ApoE-Konzentration (vgl. Abb. 21 B) folglich zum einen auf eine erhöhte ApoE-Sekretion zurückzuführen sein, zum anderen auf einen Funktionsverlust des LDL-Rezeptors in Abwesenheit von ARH, wobei LRP1 die Aufnahme ApoE-enthaltender Lipoproteine hier kompensieren könnte. Für die PID1-defizienten HUH7-Zellen bleibt jedoch der Verdacht einer gehemmten LRP1-vermittelten Endozytose aufgrund der verringerten ApoE-Konzentration dieser Zellen bestehen.



**Abbildung 22: Knock-down von PID1 führt zu einer reduzierten LRP1-vermittelten Aufnahme in HUH7-Zellen.** **A** zeigt die Aufnahme (**a** und **c**) und den Abbau (**b** und **d**) von mit radioaktiven Jod-markierten LDL ( $^{125}\text{I}$ -LDL) (**a** und **b**) nach einer (linke Balken) und nach vier Stunden (rechte Balken) und von Chylomikronen-Remnants ( $^{125}\text{I}$ -CR) nach 2,5 Stunden (**c** und **d**) in Ab- (linke Balken) und in Anwesenheit (rechte Balken) von kalten LDL in Kontroll-, PID1-defizienten und ARH-defizienten HUH7-Zellen. Wie erwartet sind die Aufnahme (**a**) und der Abbau (**b**) von  $^{125}\text{I}$ -LDL in HUH7-Zellen in Abwesenheit des LDL-Rezeptor-spezifischen Adapterproteins ARH stark reduziert. Interessanterweise sind in PID1-defizienten Zellen die Aufnahme (**c**) und der Abbau (**d**) von  $^{125}\text{I}$ -CR nach Inhibition des LDL-Rezeptors durch LDL (rechte Balken) ebenfalls herunterreguliert, was auf einen Einfluss von PID1 auf die LRP1-vermittelte Endozytose hindeutet. **B** zeigt die ApoE-Sekretion von 4 Stunden- und über Nacht- in 1% FCS gehungerten Wildtyp-, Kontroll-, PID1-defizienten und ARH-defizienten HUH7-Zellen, die mittels eines ELISA untersucht wurde. Dabei zeigt sich, dass ARH-defiziente Zellen im Gegensatz zu PID1-defizienten HUH7-Zellen eine erhöhte ApoE-Sekretion aufweisen, die eine verringerte ApoE-Konzentration der Zellen erklären würde (vgl. Abb. 21 B).

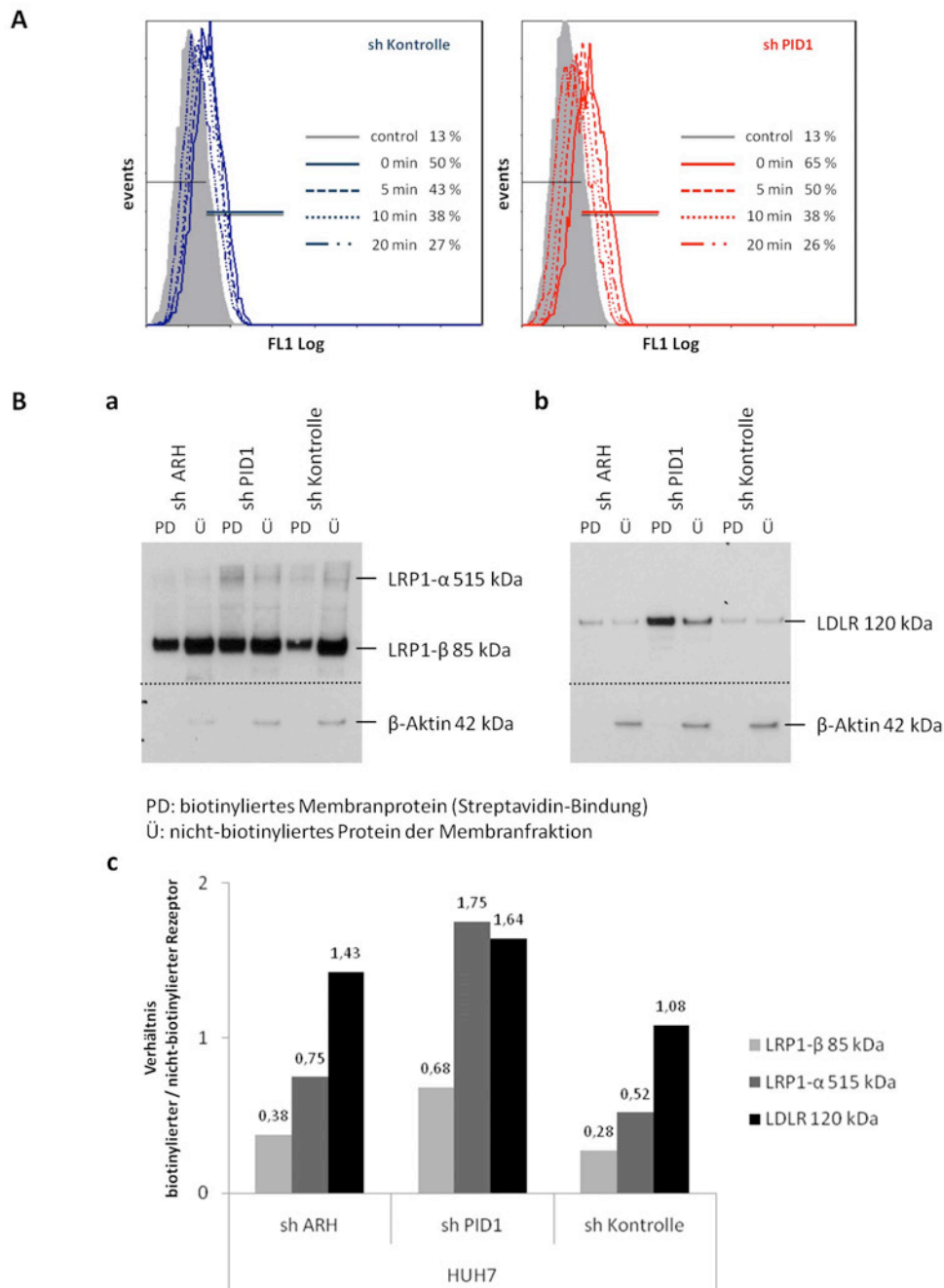
Aufgrund des vermuteten Funktionsverlustes von LRP1 als endozytierender Rezeptor wurde in diesem Teil der Arbeit die Rolle der PTB-Adapterproteine PID1 und ARH in der LRP1- und LDL-Rezeptor-vermittelten Aufnahme in HUH7-Zellen untersucht. Dazu wurden die

Aufnahme und der Abbau von mit radioaktiven Jod-markierten Chylomikronen-Remnants ( $^{125}\text{I}$ -CR) nach 2,5 Stunden (Abb. 22 A c und d) und von LDL ( $^{125}\text{I}$ -LDL) nach einer und nach vier Stunden (Abb. 22 A a und b) in Kontroll-, PID1-defizienten und ARH-defizienten HUH7-Zellen gemessen. Da der LDL-Rezeptor die Aufnahme von ApoE-enthaltenden Lipoproteinen in HUH7-Zellen kompensieren kann, wurde die Aufnahme der  $^{125}\text{I}$ -CR (Abb. 22 A c und d, linke Balken) zur Inhibition des LDL-Rezeptors zusätzlich in Anwesenheit einer hohen Konzentration an kalten LDL in allen drei HUH7-Zelllinien untersucht (Abb. 22 A c und d, rechte Balken). Abbildung 22 A a und b stellt nun dar, dass die Aufnahme (a) und der Abbau (b) von  $^{125}\text{I}$ -LDL nach einer und nach vier Stunden in HUH7-Zellen in Abwesenheit des LDL-Rezeptor-spezifischen Adapterproteins ARH erwartungsgemäß stark reduziert ist, während die Aufnahme und der Abbau von  $^{125}\text{I}$ -LDL in den PID1-defizienten Zellen weitgehend unbeeinflusst ist. Wie die Abbildung 22 A c und d (linke Balken) zeigt, sind die Aufnahme und der Abbau von  $^{125}\text{I}$ -CR sowohl in den PID1-defizienten als auch in den ARH-defizienten HUH7-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht beeinträchtigt. Interessanterweise ist jedoch in HUH7-Zellen in Abwesenheit des LRP1-spezifischen Adapterproteins PID1 und zusätzlicher Hemmung des LDL-Rezeptors durch LDL die Aufnahme und der Abbau von  $^{125}\text{I}$ -CR herunterreguliert, während die Aufnahme und der Abbau von  $^{125}\text{I}$ -CR in den ARH-defizienten Zellen unbeeinflusst ist (Abb. 22 A c und d, rechte Balken), was hier auf eine Kompensation der  $^{125}\text{I}$ -CR-Aufnahme durch LRP1 zurückzuführen sein könnte. Die hier gezeigten Beobachtungen lassen vermuten, dass die in 3.3.1 beschriebene Fehlsortierung von LRP1 in PID1-defizienten Zellen zu einem Funktionsverlust von LRP1 führen könnte, der sich in einer reduzierten Endozytose äußert.

Zusätzlich wurde hier ebenfalls ein Einfluss der PID1-Defizienz in HUH7-Zellen auf das *Recycling* von LRP1 nach dessen Endozytose gemessen. In einem Zelloberflächen-Fluoreszenz-*Quenching-Recycling*-Experiment wurden dazu zunächst Kontroll- und PID1-defiziente HUH7-Zellen mit dem LRP1-spezifischen Antikörper „5A6“, der an die extrazelluläre Domäne der LRP1- $\beta$ -Kette bindet und kovalent an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 gekoppelt wurde, 20 min inkubiert und die Zellen anschließend 0, 5, 10 und 20 min mit einem Fluoreszenz-*Quenching*-Antikörper (Anti-Alexa Fluor 488) behandelt. Das Prinzip des Experiments beruht nun darauf, dass LRP1 zunächst an der Zelloberfläche durch den Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten LRP1-spezifischen Antikörper markiert wird. Sobald

das fluoreszierende LRP1 dann nach der Internalisierung wieder zurück an die Zelloberfläche *recycelt* wird, wird das Fluoreszenzsignal durch den *Quenching*-Antikörper aufgehoben. Je mehr fluoreszierendes LRP1 nun an die Zellmembran zurückkehrt bzw. *recycelt* wird, desto weniger Fluoreszenz weisen die Zellen auf, was durch eine FACS-Analyse gemessen werden kann und in Abbildung 23 A dargestellt ist. Dabei zeigte sich, dass der Knock-down von PID1 in HUH7-Zellen vermutlich keinen Einfluss auf das *Recycling* von LRP1 hat, vielmehr zeigt sich, dass in PID1-defizienten Zellen mehr LRP1 an der Zelloberfläche lokalisiert ist, wie der Zeitpunkt 0 zeigt. Nach Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten LRP1-spezifischen Antikörper fluoreszieren 50 % der Kontrollzellen, dagegen aber 65 % der PID1-defizienten Zellen. Im Verlauf der Zeit zeigt sich zusätzlich, dass in den PID1-defizienten Zellen auch mehr LRP1 an die Zellmembran transportiert wird, was dazu führt, dass nach 20 min die PID1-defizienten HUH7-Zellen mit den HUH7-Kontrollzellen einen Gleichstand aufweisen. Diese Daten sprechen ebenfalls für eine nicht-polarisierte Verteilung von LRP1 in Abwesenheit von PID1, die dazu führen würde, dass LRP1 nicht nur an die basolaterale Membran transportiert wird, sondern auch an die apikale, was mit einem Funktionsverlust von LRP1 als endozytierender Rezeptor einhergehen könnte.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Lokalisation von LRP1 und des LDL-Rezeptors in der Zellmembran von Kontroll-, PID1-defizienten und ARH-defizienten HUH7-Zellen mittels eines Zelloberflächen-Biotinylierungs-Experiments untersucht (Abb. 23 B). Dabei zeigte sich, dass ein *Knock-down* von PID1 in HUH7-Zellen zu einem auch in diesem Experiment konsistent zu einer verstärkten Lokalisation von LRP1 an der Zelloberfläche führt, (Abb. 23 B a, vgl. c) zum anderen ist jedoch auch der LDL-Rezeptor verstärkt an der Zellmembran lokalisiert (Abb. 23 B b). Diese Daten sind erneut ein Hinweis darauf, dass die Abwesenheit des LRP1-spezifischen Adapterproteins PID1 zu einer nicht-polarisierten Verteilung führt, die mit einem Funktionsverlust von LRP1 als endozytisch-aktiver Rezeptor assoziiert ist, der hier durch die verstärkte Translokation des LDL-Rezeptors an die Zelloberfläche kompensiert werden könnte.



**Abbildung 23 Die Abwesenheit von PID1 führt zu einer verstärkten Lokalisation von LRP1 und des LDL-Rezeptors an der Zelloberfläche von HUH7-Zellen.** **A** zeigt das *Recycling* von LRP1 an die Zelloberfläche 0, 5, 10 und 20 min nach der Internalisierung in Kontroll- (blau) und PID1-defizienten (rot) HUH7-Zellen in einem Zelloberflächen-Fluoreszenz-Quenching-Recycling-Experiment, das mittels einer FACS-Analyse untersucht wurde. Dabei zeigte sich, dass eine Herunterregulation von PID1 in HUH7-Zellen vermutlich keinen Einfluss auf das *Recycling* von LRP1 hat, allerdings scheint in PID1-defizienten Zellen mehr LRP1 an der Zelloberfläche lokalisiert zu sein, was die Folge einer Fehlsortierung von LRP1 in Abwesenheit von PID1 sein könnte. In **B** wurde die Lokalisation von LRP1 und des LDL-Rezeptors an der Zelloberfläche von Kontroll-, PID1- und ARH-defizienten Zellen in einem Zelloberflächen-Biotinylierungs-Experiment untersucht. Dazu wurden zunächst die Zellen biotinyliert und anschließend die Zellmembranen aller drei HUH7-Zelllinien präpariert. Die biotinylierten Membranproteine wurden anschließend mittels Streptavidin präzipitiert und sowohl der Streptavidin-Pull-down (PD) der biotinylierten Proteine als auch der Überstand (Ü) des Pull-



*downs*, d.h. die nicht-biotinylierten Membranproteine in einer Western Blot-Analyse analysiert. Dabei wurde zum einen sowohl die  $\alpha$ -Kette als auch die  $\beta$ -Kette von LRP1 (**a**) mittels des LRP1-spezifischen Antikörpers „377“ detektiert und zum anderen der LDL-Rezeptor (**b**). **c** zeigt zusätzlich das Verhältnis von biotinylierten zu nicht-biotinylierten LRP1 und LDL-Rezeptor, das mithilfe des Programms ImageJ ermittelt wurde. Dabei zeigt sich, dass in PID1-defizienten Zellen neben LRP1 ebenfalls der LDL-Rezeptor verstärkt an der Zelloberfläche lokalisiert ist (**c**), wobei es sich hier um einen kompensatorischen Effekt in Folge eines Funktionsverlust von LRP1 in Abwesenheit von PID1 handeln könnte.

Zusammenfassend konnte mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten gezeigt werden, dass nach Ausschalten des PTB-Adapterproteins PID1 die Lokalisation und die Funktion von LRP1 in Leberzellen moduliert wird. Zur Analyse der Bedeutung der LRP1/PID1-Interaktion für den Lipoproteinstoffwechsel *in vivo* werden derzeit entsprechende PID1-defiziente Mäuse hergestellt.

## 4. Diskussion

### 4.1 Die Phosphotyrosin-unabhängige Bindung von PID1 an das distale NPxY-Motiv von LRP1 liefert Hinweise auf die physiologische Bedeutung der LRP1/PID1-Interaktion

Das PTB-Adapterprotein PID1 wurde 2007 von Caratù et al. als Interaktionspartner von LRP1 identifiziert. Allerdings war bisher weder bekannt, mit welchen der beiden NPxY-Motive der intrazellulären Domäne von LRP1 PID1 interagiert, noch welchen Einfluss eine Tyrosin-Phosphorylierung der NPxY-Motive auf die LRP1/PID1-Interaktion hat. Die in dieser Arbeit analysierte Interaktion sollte Hinweise auf die physiologische Bedeutung der LRP1/PID1-Interaktion liefern. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Motive der intrazellulären Domäne von LRP1 wie die NPxY-Motive (N<sub>26</sub>PTY<sub>29</sub> und N<sub>60</sub>PVY<sub>63</sub>), das Yxxφ-Motiv (Y<sub>63</sub>ATL<sub>66</sub>) oder das distale Dileucin-Motiv (LL<sub>86, 87</sub>) dessen intrazellulären Transport, d.h. die Sortierung, die Internalisierung und das *Recycling* des Rezeptors, beeinflussen (Donoso et al. 2009, Gordts et al., unveröffentlichte Daten, Li et al. 2000, Marzolo et al. 2003, Reekmans et al. 2010). Zusätzlich zeigten Guttman et al. 2009, dass die meisten intrazellulären LRP1-Interaktionspartner mit dem distalen NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 interagieren, wovon viele Proteine Phosphotyrosin-abhängig binden. Dabei ist der überwiegende Teil der Proteine, die an die phosphorylierten NPxY-Motive der intrazellulären Domäne von LRP1 binden, an Signaltransduktionsprozessen beteiligt. Aufgrund der Interaktionspartner der nicht-phosphorylierten NPxY-Motive wie AP-2, Clathrin und SNX17 wurde dagegen die Hypothese aufgestellt, dass die nicht-phosphorylierten NPxY-Motive in den intrazellulären LRP1-Transport involviert sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte in unabhängigen Experimenten mittels *GST-Pull-down*, Immunpräzipitation und Immunfluoreszenzanalysen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass das PTB-Adapterprotein PID1 mit dem distalen NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 interagiert (Abb. 24). Zusätzlich konnte mit *GST-PID1-Pull-downs* von rekombinant hergestellten LRP1-IZD-Mutanten *in vitro* gezeigt werden, dass für die LRP1/PID1-Interaktion zum einen das Asparagin des distalen NPxY-Motivs essentiell ist, was die hohe Spezifität von PTB-Adapterproteinen für NPxY-Motive bestätigt. Zum anderen interagiert PID1 noch mit der intrazellulären Domäne von LRP1, wenn im distalen NPxY-Motiv das Tyrosin gegen Phenylalanin (Y<sub>63</sub>F = NPVY→NPVF) ausgetauscht wird, das wie

Tyrosin einen aromatischen Ring aufweist. Ein Austausch von Tyrosin gegen Alanin ( $Y_{63}A = NPVY \rightarrow NPVA$ ) im distalen NPxY-Motiv inhibierte dagegen die Interaktion mit PID1. Der aromatische Ring des Tyrosins des distalen NPxY-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 ist folglich ebenfalls essentiell für die Interaktion mit PID1 (Abb. 24).

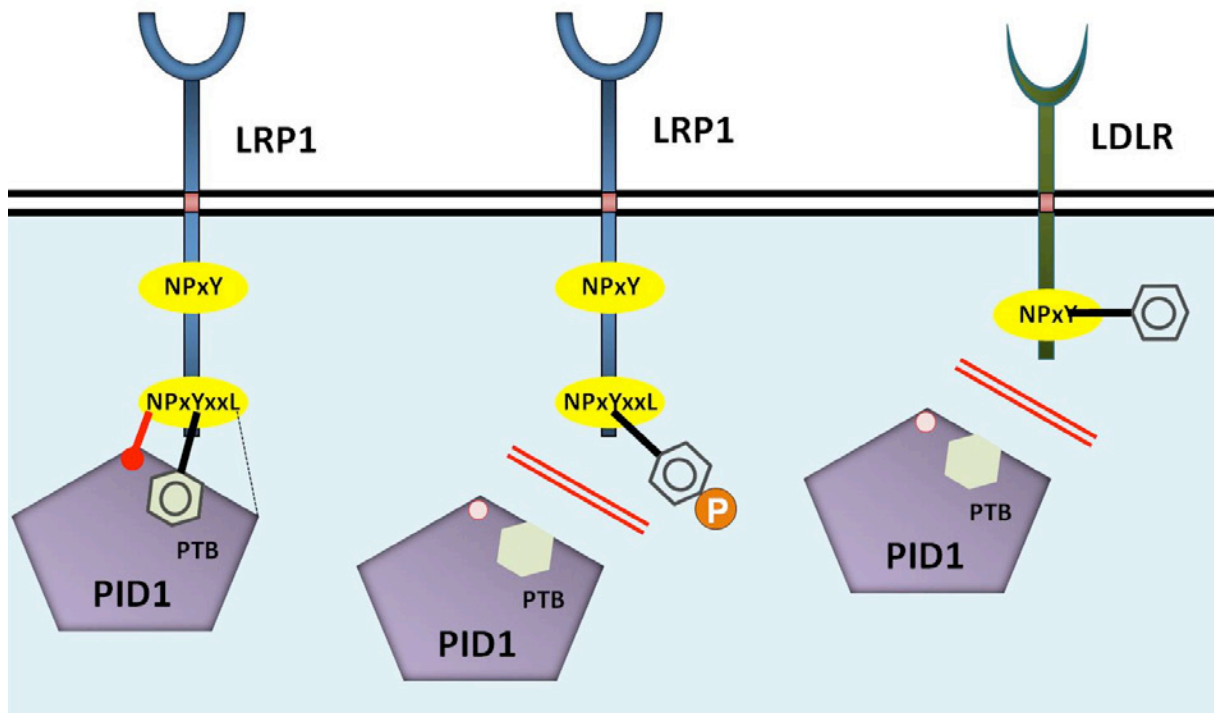


Abbildung 24: **Das PTB-Adapterprotein PID1 interagiert Phosphotyrosin-unabhängig mit dem distalen NPxYxxL-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1.** PID1 interagiert mit dem distalen NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1, dabei ist sowohl das Asparagin als auch der aromatische Ring des Tyrosins des NPxY-Motivs essentiell für die Interaktion mit PID1. Zusätzlich ist ebenfalls das Leucin des YxxL-Motivs, das das distale NPxY-Motiv carboxyterminal überlappt, in die LRP1/PID1-Interaktion involviert. PID1 interagiert folglich mit dem distalen NPxYxxL-Motiv. Eine v-Src-Kinase-vermittelte Phosphorylierung des NPxYxxL-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 inhibierte die Interaktion mit PID1. PID1 gehört somit zu den Dab-ähnlichen PTB-Adapterproteinen. Zudem stellte sich PID1 als LRP1-spezifisches Adapterprotein heraus, da LRP1 nicht mit dem LDL-Rezeptor interagiert.

PID1 bindet dagegen nicht an das proximale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1, was die Beteiligung weiterer Aminosäuren der intrazellulären Domäne von LRP1 in der Interaktion mit PID1 impliziert. Der Unterschied zwischen dem proximalen und den distalen NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 besteht zum einen darin, dass das distale NPxY-Motiv ein FxNPxY-Motiv ist, das beispielsweise auch in der intrazellulären Domäne des LDL-Rezeptors zu finden ist (Chen, Goldstein und Brown 1990). Zum anderen wird das distale NPxY-Motiv carboxyterminal von dem Internalisierungs- und Sortierungssignal YxxL (Donoso

et al. 2009, Li et al. 2000) überlappt und bildet mit diesem ein NPxYxxL-Doppelmotiv, in dem der phosphorylierbare Tyrosin-Rest geteilt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur ein Einfluss des YxxL-Motivs auf die LRP1/PID1-Interaktion untersucht. Ein Austausch von Leucin gegen Alanin an Position 66 im YxxL-Motiv (L<sub>66</sub>A = YATL→YATA) der intrazellulären Domäne von LRP1 führte konstant zu einer schwächeren Interaktion mit PID1. Das NPxYxxL-Doppelmotiv der intrazellulären Domäne von LRP1 ist folglich in die Interaktion mit PID1 involviert (Abb. 24).

Obwohl die *Pull-down*-Experimente bereits darstellten, dass PID1 an das nicht-phosphorylierte distale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 bindet, wurde zusätzlich ein Einfluss einer Tyrosin-Phosphorylierung untersucht, da einige PTB-Adapterprotein wie beispielsweise Fe65 sowohl an das nicht-phosphorylierte als auch an das phosphorylierte distale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne binden (Guttman et al. 2009). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine v-Src-Kinase-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung des distalen NPxY-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 die Interaktion mit PID1 inhibierte. PID1 gehört somit zu den Phosphotyrosin-unabhängigen Dab-ähnlichen PTB-Adapterproteinen (Abb. 24).

Mutagenesestudien mit LRP1-Minirezeptoren liefern Hinweise, dass das Yxx $\phi$ -Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 sowohl die Internalisierung des Rezeptors (Li et al. 2000) als auch dessen basolaterale Sortierung bzw. *Recycling* am *Recycling*-Endosom in polarisierten Zellen vermittelt (Donoso et al. 2009, Marzolo et al. 2003). Zusätzlich führt die Inaktivierung des distalen NPxY-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 in primären Hepatozyten und in MEF zu einem vermehrten Verbleiben von LRP1 in intrazellulären Kompartimenten wie dem Golgi-Apparat und/ oder dem *Recycling*-Kompartiment (Gordts et al., unveröffentlichte Daten). Das PTB-Adapterprotein PID1 könnte daher via Interaktion mit dem NPxYxxL-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 den intrazellulären LRP1-Transport regulieren. Diese Hypothese kann durch die Beobachtung unterstützt werden, dass PID1 keine bekannten funktionellen Domänen aufweist, über die der Aufbau eines Signalkomplexes zustande kommen könnte, wie beispielsweise die Tyrosin-reiche Region in Dab1, die im phosphorylierten Zustand eine SH2-Domäne-abhängige Interaktion erlaubt (Howell et al. 2000, Keshvara et al. 2001, Ballif et al. 2004). Auf der anderen Seite weist PID1

ebenfalls keine bekannten Interaktionsstellen für Clathrin wie das LLDLE-Motiv oder für Clathrin-Adapterproteine wie AP2 auf, die im carboxyterminalen Bereich des PTB-Adapterproteins ARH zu finden sind (He et al. 2002, Mishra, Watkins und Traub 2002), was eine unmittelbare Beteiligung von PID1 in den Internalisierungsprozess von LRP1 in Frage stellt. Allerdings sollte eine Interaktion von PID1 mit Clathrin und Clathrin-Adapterproteinen dennoch untersucht werden, um weitere Hinweise auf die physiologische Bedeutung der LRP1/PID1-Interaktion zu erhalten.

In dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass PID1 nicht mit dem LDL-Rezeptor interagiert. Die meisten PTB-Adapterproteine interagieren mit vielen Lipoproteinrezeptoren. Beispielsweise interagiert das Adapterprotein ARH mit dem distalen NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1, mit dem proximalen NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von Megalin und dem NPxY-Motiv der intrazellulären Domänen von ApoER2, des VLDL-Rezeptors und des LDL-Rezeptors (Jones et al. 2003, Nagai et al. 2003). Dabei ist die physiologische Bedeutung der Interaktion von ARH mit den Lipoproteinrezeptoren nicht immer bekannt wie im Fall von LRP1 (Jones et al. 2003). In MDCK (*Madin-Darby canine kidney*)-Zellen partizipiert ARH, das in Hepatozyten und Lymphozyten die LDLR-vermittelte Endozytose reguliert (Mishra, Watkins und Traub 2002, Jones et al. 2003), jedoch ebenfalls an der Megalin-vermittelten Endozytose (Nagai et al. 2003). Wie bereits oben erwähnt, ist das distale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 ein FxNPxY-Motiv, das auch in der intrazellulären Domäne des LDL-Rezeptors zu finden ist. Allerdings wird das FxNPxY-Motiv der intrazellulären Domäne des LDL-Rezeptors nicht carboxyterminal durch ein Yxx $\Phi$ -Motiv überlappt, weshalb die Interaktion des LDL-Rezeptors mit PID1 nicht stattfinden könnte (Abb. 24). Interessanterweise soll der LDL-Rezeptor im Gegensatz zu LRP1 nicht am TGN über ein *Recycling*-Endosom an die basolaterale Membran sortiert werden (Cancino et al. 2007, Donoso et al. 2009). Obwohl nicht bekannt ist, ob PID1 mit anderen Mitgliedern der LDL-Rezeptor Familie interagiert, könnte die fehlende LDLR/PID1-Interaktion andeuten, dass PID1 nicht für die Regulation des intrazellulären Transports des LDL-Rezeptors benötigt wird. Beispielsweise soll das Adapterprotein SNX17, das nach der Internalisierung von LRP1 oder des LDL-Rezeptors an den frühen Endosomen das schnelle *Recycling* dieser Lipoproteinrezeptoren an die Membran reguliert (Abb. 25), eine Komponente der basolateralen Sortieremaschinerie sein. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass

SNX17 nicht mit dem apikalen Membranprotein Megalin interagiert (Burden et al. 2004, van Kerkhof et al. 2005, Stockinger et al. 2002). PID1 könnte daher ebenso eine spezialisierte Funktion in der Regulation des intrazellulären Transport von LRP1 sowie möglicherweise auch anderer endozytisch-aktiver Membranproteine übernehmen, die über ein *Recycling*-Endosom sortiert werden, und deshalb nicht mit dem LDL-Rezeptor interagieren. Daher sollte eine Interaktion von PID1 mit anderen Lipoproteinrezeptoren wie beispielsweise Megalin untersucht werden. Megalin könnte ebenfalls über ein *Recycling*-Endosom an die apikale Membran sortiert werden (Marzolo et al. 2003, Nagai et al. 2003), wobei in der intrazellulären Domäne von Megalin ein Bereich als apikales Sortierungssignal fungieren soll, der ein NPxY-ähnliches-Motiv (NxxY) aufweist (Takeda, Yamazaki und Farquhar 2003). Interessanterweise weist jedoch die intrazelluläre Domäne von Megalin ein distales NPxYxx $\phi$ -Motiv auf. Kajiwara et al. konnten 2010 ebenfalls bestätigen, dass PID1 ein spezifisches Adapterprotein von LRP1 ist. PID1 bindet im Gegensatz zu einigen anderen PTB-Adapterproteinen, die mit LRP1 und APP interagieren, nicht an die intrazelluläre Domäne von APP.

#### 4.2 Regulation der LRP1/PID1-Interaktion durch Phosphorylierung

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass die Interaktion von LRP1 mit PTB-Adapterproteinen durch Phosphorylierung reguliert wird und folglich die Funktion von LRP1 als Rezeptor in der Endozytose oder Signaltransduktion. Dabei spielt sowohl der Phosphorylierungsstatus der intrazellulären Domäne von LRP1 als auch der der PTB-Adapterproteine eine Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine v-Src-Kinase-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung des distalen NPxY-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 die Bindung an PID1 inhibierte (Abb. 24). Zusätzlich wäre es interessant beispielsweise in einem *Pull-down*-Experiment mit rekombinant aufgereinigten Proteinen *in vitro* zu untersuchen, ob die Interaktion von LRP1 mit PID1 durch eine v-Src-Kinase-vermittelte Phosphorylierung des distalen NPxY-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 aufgehoben werden kann, um Hinweise auf den Mechanismus zu bekommen, wie die LRP1/PID1-Interaktion reguliert wird.

Die NPxY-Motiv-vermittelte Interaktion von LRP1 mit PTB-Adapterproteinen wie Shc oder Dab1 wird zudem durch den Phosphorylierungsstatus des Threonins und der Serine in der

intrazellulären Domäne von LRP1 beeinflusst (Ranganathan et al. 2004). Li et al. zeigten, dass eine Mutation des Serins an Position 76 ( $S_{76}$ ) in der intrazellulären Domäne von LRP1, die eine PKA-vermittelte Phosphorylierung verhindert, zu einer verringerten initialen Internalisierungsrate von LRP1 und zu einer verlangsamten Liganden-Dissoziation führen (Li et al. 2001\_1). Diese Daten weisen daraufhin, dass durch externe Signale der Phosphorylierungsstatus der intrazellulären Domäne beeinflusst wird und in der Folge die Funktion von LRP1 als Endozytoserezeptor durch eine Interaktion mit spezifischen Adapterproteinen reguliert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Einfluss der PKA-Serin-Phosphorylierungsstelle an Position 76 ( $S_{76}$ ) der intrazellulären Domäne von LRP1 auf die Interaktion mit PID1 in GST-*Pull-down*-Experimenten *in vitro* untersucht, um Hinweise auf die Funktion von PID1 und die Regulation der LRP1/PID1-Interaktion zu erhalten. Dazu wurde das Serin zum einen gegen Alanin ( $S_{76}A$ ) und zum anderen gegen Asparaginsäure ( $S_{76}D$ ) ausgetauscht, einer Aminosäure, die eine negative Ladung aufweist und somit eine Phosphorylierung „nachahmen“ könnte. Jedoch wurde weder durch die Deletion des Serins noch durch eine „nachgeahmte Phosphorylierung“ die LRP1/PID1-Interaktion beeinflusst. Diese Daten deuten darauf hin, dass PID1 vermutlich nicht in die LRP1-vermittelte Endozytose involviert ist. Dennoch sollte der Einfluss auf die LRP1/PID1-Interaktion weiterhin mittels einer PKA-vermittelten Phosphorylierung des Serins an Position 76 ( $S_{76}$ ) untersucht werden, da der fehlende Einfluss der negativen Ladung der Asparaginsäure ebenfalls nur auf eine Deletion des Serins zurückzuführen sein könnte. Zusätzlich sollte der Einfluss der anderen Serin- und Threonin-Phosphorylierungsstellen der intrazellulären Domäne von LRP1 auf die Interaktion mit PID1 mittels einer PKC-vermittelten Phosphorylierung analysiert werden. Dabei sollte der Einfluss einer Serin- und/ oder Threonin-Phosphorylierung sowohl vor als auch nach der Bindung von PID1 an LRP1 untersucht werden, um Hinweise auf den Regulationsmechanismus zu erhalten.

Interessanterweise weist PID1 ebenfalls potentielle Serin-Phosphorylierungsstellen auf, dessen Phosphorylierung eine Konformationsänderung von PID1 induzieren könnte, die die Interaktion mit LRP1 verhindert. Daher sollte zusätzlich der Einfluss einer Serin-Phosphorylierung von PID1 auf die Interaktion mit LRP1 untersucht werden.

### 4.3 PID1 als PTB-Adapterprotein der Sortierungsmaschinerie von LRP1

In polarisierten Zellen wie Hepatozyten erfolgt die Sortierung von Proteinen nach deren Biosynthese an die apikale oder basolaterale Membran am TGN (Fuller et al. 1985, Griffiths und Simons 1986, Rindler et al. 1984). Zusätzlich können Membranproteine, die endozytisch aktiv sind, über ein *Recycling*-Endosom sortiert werden (Matter und Mellmann 1994, Mostov und Cardone 1995, Odorizzi und Towbridge 1997). Verschiedene Studien liefern Hinweise, dass ebenfalls LRP1 über ein solches *Recycling*-Endosom an die basolaterale Membran sortiert wird (Donoso et al. 2009, Marzolo et al. 2003). Die intrazelluläre Domäne von LRP1 weist verschiedene Motive wie zwei NPxY-Motive und ein YxxL-Motiv auf, die wichtige Elemente der endozytischen und basolateralen Sortierungsmaschinerie sind (Hunziker und Fumey 1994, Matter und Mellman 1994, Matter, Yamamoto und Mellman 1994, Rodriguez-Boulan, Kreitze und Musch 2005) und eine Interaktion mit Adapterproteinen ermöglichen, die den intrazellulären Transport von LRP1 regulieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die in 4.1 beschriebene Hypothese, dass das PTB-Adapterprotein PID1 an der Regulation des intrazellulären Transports von LRP1 partizipiert, in Hepatozyten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das PTB-Adapterprotein ARH ebenfalls mit LRP1 interagiert, jedoch reguliert ARH in Hepatozyten vermutlich nicht die LRP1-vermittelte Endozytose (Jones et al. 2003), wobei eine andere Funktion von ARH im intrazellulären Transport von LRP1 nicht ausgeschlossen werden kann und daher ebenfalls in dieser Arbeit analysiert wurde.

LRP1 zeigt in Hepatozyten wie HUH7-Zellen eine endosomale Lokalisation, allerdings ist LRP1 überwiegend in einem juxtanukleären Kompartiment lokalisiert. Die Identität dieses Kompartiments ist jedoch nicht genau bekannt. Aufgrund der Hypothese, dass LRP1 am TGN über ein *Recycling*-Endosom an die basolaterale Membran sortiert werden soll (Donoso et al. 2009, Marzolo et al. 2003), könnte dieses LRP1-positive Kompartiment ein *Recycling*-Endosom oder aber aufgrund der Kern-nahen Lokalisation ebenfalls der Golgi-Apparat sein. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Immunfluoreszenzanalysen gezeigt werden, dass LRP1 in HUH7-Zellen mit ER-, Golgi-Apparat- und endosomalen Markern wenigstens teilweise kolokalisiert, was den intrazellulären Transport von LRP1 bestätigt. Das LRP1-positive Kompartiment kolokalisiert dabei sowohl stark mit dem *Recycling*-Endosom-Marker Rab11 als auch teilweise mit dem basolateralen Membranprotein TfR2. LRP1 könnte somit in



HUH7-Zellen überwiegend in einem *Recycling*-Kompartiment lokalisiert sein. Zusätzlich zeigt das Rab11- und TfR2-positive Kompartiment starke Kollokationen mit frühen Endosomen. Mutagenesestudien liefern Hinweise, dass LRP1 zum einen nach dessen Biosynthese am TGN über das *Recycling*-Endosom basolateral sortiert wird (Donoso et al. 2009, Marzolo et al. 2003). Zum anderen kann LRP1 ebenfalls nach der Internalisierung erneut über das *Recycling*-Endosom basolateral sortiert bzw. *recycelt* werden (Donoso et al. 2009, Marzolo et al. 2003) anstelle eines schnellen *Recycling* via SNX17 (van Kerkhof et al. 2005, Marzolo et al. 2003) (vgl. Abb. 25). Das LRP1-positive Kompartiment könnte folglich ein endozytisches *Recycling*-Kompartiment sein, das als ein intrazellulärer „LRP1-Pool“ fungiert, von dem aus LRP1 auf einen äußeren Stimulus hin an die Plasmamembran transloziert werden kann.

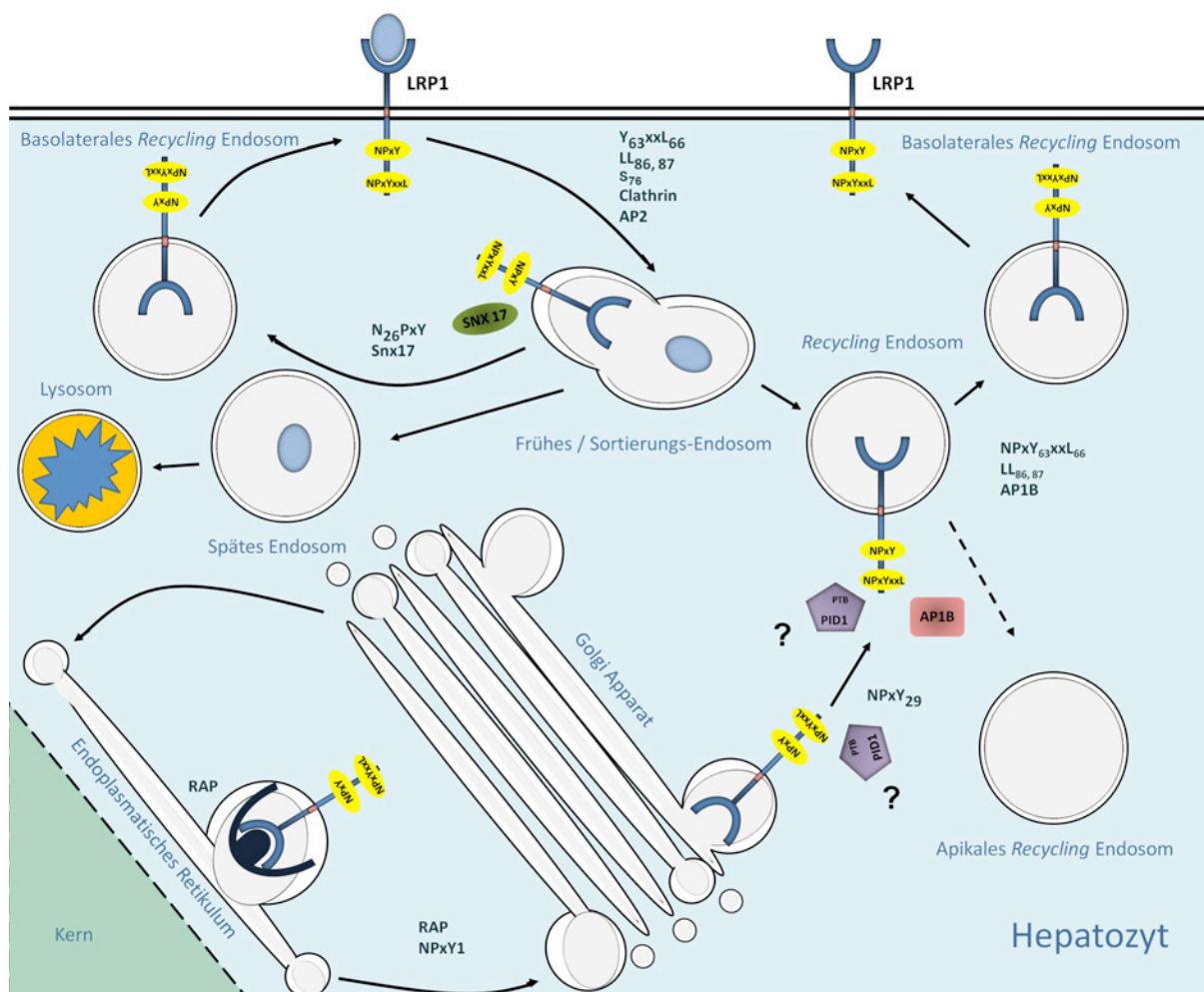


Abbildung 25: **Hypothesisches Modell der Regulation der Sortierung von LRP1 durch das PTB-Adapterprotein PID1 in Hepatozyten.** Die Abbildung zeigt, dass es möglicherweise an mehreren Kompartimenten der Zelle wie dem Golgi-Apparat und dem *Recycling*-Kompartiment zu einer Fehlsortierung von LRP1 aufgrund einer fehlenden Interaktion des distalen NPXYxxL-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 mit dem PTB-Adapterprotein PID1 kommt.

Interessanterweise führt die Abwesenheit des PTB-Adapterproteins PID1 im Gegensatz zu einem Fehlen des PTB-Adapterproteins ARH in HUH7-Zellen zu einer veränderten zellulären Lokalisation von LRP1. LRP1 ist nun überwiegend in Vesikeln lokalisiert, die im gesamten Zytoplasma verteilt sind. Die Analyse der zellulären Lokalisation von LRP1 in PID1-defizienten HUH7-Zellen lieferte ähnliche Ergebnisse wie die der Kontrollzellen. Die LRP1-positiven Vesikel kolokalisieren auch in Abwesenheit von PID1 ebenfalls mit allen verwendeten zellulären Markern wenigstens teilweise. Jedoch ist LRP1 in den PID1-defizienten HUH7-Zellen nicht mehr in dem Rab11-, TfR2- und EEA1-positiven *Recycling*-Kompartiment konzentriert lokalisiert. Allerdings weist die Lokalisation von LRP1 in Rab11-positiven Vesikeln sowie die Kolokalisation einzelner LRP1-positiver Vesikel mit dem Rab11-positiven *Recycling*-Kompartiment in den PID1-defizienten HUH7-Zellen daraufhin, dass LRP1 auch in Abwesenheit von PID1 in das *Recycling*-Kompartiment transportiert wird. Die Lokalisation von LRP1 in TfR2- und EEA1-positiven Vesikeln in den PID1-defizienten HUH7-Zellen zeigt zusätzlich, dass wenigstens ein Teil von LRP1 auch in Abwesenheit von PID1 an die „basolaterale“ Membran transportiert wird und dort endozytisch aktiv ist. Die Abwesenheit von PID1 könnte folglich am *Recycling*-Endosom zu einer nicht-polarisierten Verteilung von LRP1 führen. Dies würde im Umkehrschluss bedeuten, dass PID1 am *Recycling*-Endosom die „basolaterale“ Sortierung von LRP1 reguliert (Abb. 25). Diese Hypothese sollte weiterhin durch ein Experiment untersucht werden, in dem der Transport von LRP1 in Abwesenheit von PID1 sowohl an die basolaterale als auch an die apikale Zellmembran in polarisierten Zellen gemessen wird.

Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten NPxYxxL-Motiv-spezifischen Interaktion von LRP1 mit dem PTB-Adapterprotein PID1 (Abb. 24) kann die Hypothese durch verschiedene Studien unterstützt werden. Zum einen soll LRP1 vermittelt über das Tyrosin an Position 63 (Y<sub>63</sub>) des NPxYxxL-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 am *Recycling*-Endosom die apikale Transzytose umgehen und an die basolaterale Membran transportiert werden (Abb. 25) (Donoso et al. 2009, Marzolo et al. 2003), da ein Austausch von Tyrosin gegen Alanin an Position 63 (Y<sub>63</sub>A, NPxYxxL→NPxAxxL) eine nicht-polarisierte Verteilung von LRP1 zur Folge hatte. Es konnte zwar gezeigt werden, dass ein Austausch von Asparagin gegen Alanin an Position 60 (N<sub>60</sub>A, NPxYxxL→APxYxxL) keinen Einfluss auf die basolaterale Sortierung von LRP1 hat, während ein Austausch von Leucin gegen Alanin an Position 66 (L<sub>66</sub>A,

NPxYxxL→NPxYxxA) zu einer erhöhten Fehlsortierung führte, was darauf hindeutet, dass hier eher das YxxΦ-Motiv (Y<sub>63</sub>ATL<sub>66</sub>) und nicht das distale NPxY-Motiv (NPVY<sub>63</sub>) das basolaterale Sortierungssignal ist. Allerdings zeigt zum anderen eine zelluläre Fraktionierung von MEF, dass eine Inaktivierung des distalen NPxY-Motivs (N2 = NPVY→AAVA) der intrazellulären Domäne von LRP1 zu einer verringerten Lokalisation von LRP1 in frühen Endosomen, dafür aber zu einer vermehrten Lokalisation von LRP1 in intrazellulären Kompartimenten wie dem Golgi-Apparat und/ oder dem *Recycling*-Kompartiment führt (Gordts et al., unveröffentlichte Daten). Laatsch et al. zeigten 2009, dass in Hepatozyten durch Insulin eine Translokation von LRP1 an die Plasmamembran induziert werden kann, was in der Folge mit einer vermehrten Aufnahme von postprandialen Lipoproteinen in die Leber korreliert. Interessanterweise kann diese Membrantranslokation von LRP1 nach einer Inaktivierung des distalen NPxY-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 in murinen Leberzellen nicht mehr effizient durch Insulin induziert werden. Die LRP1-N2-Mutante zeigt in diesen Zellen überwiegend eine juxtanukleäre Lokalisation (Gordts et al., unveröffentlichte Daten). Diese Daten weisen daraufhin, dass ebenfalls das distale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 eine wichtige Rolle in der Sortierung von LRP1 am endozytischen *Recycling*-Endosom spielen könnte (Abb. 25). Es konnte zudem gezeigt werden, dass Insulin die Phosphorylierung der intrazellulären Domäne von LRP1 induziert (Krüger et al. 2008). Es könnte daher sein, dass das Adapterprotein PID1 am endozytischen *Recycling*-Kompartiment mit dem nicht-phosphorylierten distalen NPxYxxL-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 interagiert und dessen Membrantranslokation solange verhindert, bis ein externer Stimulus wie Insulin die Phosphorylierung der intrazellulären Domäne von LRP1 und möglicherweise die Interaktion mit anderen Phosphotyrosin-abhängigen PTB-Adapterproteinen induziert, was in der Folge zu einer Translokation von LRP1 an die Plasmamembran führt. Zur Analyse dieser Hypothese sollte die Insulin-vermittelte Membrantranslokation von LRP1 nach Überexpression und *Knock-down* von PID1 untersucht werden.

Durch Insulin kann ebenfalls eine Membrantranslokation des Glukose-Transporters GLUT4 in Adipozyten und Skelettmuskelzellen induziert werden. Zhang et al. beobachteten 2009 nach Überexpression von PID1 in Adipozyten eine verringerte Insulin-stimulierte Phosphorylierung der stromabwärts des Insulin-Rezeptors gelegenen Komponenten des Insulin-Signalwegs wie IRS-1 und Akt. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass PID1 an den phosphorylierten

Insulin-Rezeptor bindet, IRS-1 verdrängt und somit dessen Phosphorylierung verhindert, was zusätzlich eine reduzierte Memtranslokation von GLUT4 und eine damit assoziierte verringerte Glukose-Aufnahme erklären würde. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Tyrosin-Phosphorylierung des distalen NPxY-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 die Bindung an PID1 hemmt. Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass die PTB-Domäne von PID1 an das phosphorylierte NPxY-Motiv des Insulin-Rezeptors bindet. Es konnte jedoch kürzlich gezeigt werden, dass LRP1 eine wichtige Komponente der GSV (*GLUT4 Storage Vesicles*) und somit des Insulin-Signalwegs ist (Jedrychowski et al. 2010). Daher könnte die oben beschriebene Hypothese, dass PID1 die Insulin-vermittelte Membrantranslokation von LRP1 reguliert, ebenfalls erklären, weshalb eine Überexpression von PID1 in Adipozyten oder Skelettmuskelzellen zu einer ineffizienten Translokation von GLUT4 an die Plasmamembran und somit zu einer verringerten Glukoseaufnahme führt (Zhang et al. 2009, Wu et al. 2011).

Gordts et al. konnten zeigen, dass eine Inaktivierung des distalen NPxY-Motivs zu einem Verbleiben von LRP1 in intrazellulären Kompartimenten sowohl in MEF als auch in murinen primären Hepatozyten führt (unveröffentlichte Daten). Dabei wurde jedoch nicht untersucht, ob es sich bei diesem Kompartiment um den Golgi-Apparat und/ oder ein *Recycling*-Kompartiment handelt. Eine Deletion des distalen NPxY-Motivs könnte folglich ebenfalls zu einer gestörten basolateralen Sortierung von LRP1 am TGN führen. Allerdings gibt es Hinweise, dass die basolaterale Sortierung von LRP1 am TGN durch das Tyrosin an Position 29 des proximalen NPxY-Motivs (NPTY<sub>29</sub>) der intrazellulären Domäne von LRP1 vermittelt wird (Donoso et al. 2009, Marzolo et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch beobachtet werden, dass in Abwesenheit von PID1 die LRP1-positiven Vesikel stärker mit dem Golgi-Marker Rab6 kolokalisieren, was ebenfalls auf eine Fehlsortierung von LRP1 nach dessen Biosynthese am TGN hinweisen könnte. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PID1 nicht nur vermehrt mit dem *Recycling*-Endosom-Marker Rab11 kolokalisiert, sondern auch mit dem Golgi-Marker Rab6, was eine Beteiligung des PTB-Adapterproteins PID1 an verschiedenen Kompartimenten in der basolateralen Sortierung von LRP1 impliziert (Abb. 25). Allerdings wird LRP1 auch in Abwesenheit von PID1 noch am TGN über das *Recycling*-Endosom an die „basolaterale“ Membran transportiert, weshalb das proximale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 und das mit diesem Motiv

interagierende Adapterprotein eine wichtigere Bedeutung für die basolaterale Sortierung am TGN haben könnte.

Das PTB-Adapterprotein ARH interagiert zwar mit LRP1, jedoch reguliert ARH in Hepatozyten nicht die LRP1-vermittelte Endozytose (Jones et al. 2003). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch ebenfalls keine andere Funktion von ARH im intrazellulären Transport von LRP1 festgestellt werden. Diese Daten weisen auch hinsichtlich der Expression von ARH in vielen Geweben und Organen daraufhin, dass ARH weitere physiologische Funktionen erfüllen könnte.

#### **4.4 Der Einfluss der LRP1/PID1-Interaktion auf die Funktion von LRP1 als Lipoproteinrezeptor**

Die Analyse des intrazellulären Transports von LRP1 in Abwesenheit von PID1 in HUH7-Zellen zeigte, dass PID1 vermutlich nicht unmittelbar die LRP1-vermittelte Endozytose reguliert. Diese Vermutung wird zum einen durch die Beobachtung unterstützt, dass PID1 weder bekannte Interaktionsstellen für Clathrin noch für das Clathrin-Adapterprotein AP-2 aufweist, zum anderen ist PID1 in HeLa-Zellen nicht in frühen Endosomen lokalisiert. Jedoch konnten während der Untersuchung des intrazellulären Transports von LRP1 zahlreiche Hinweise geliefert werden, dass ein Ausschalten des Adapterproteins PID1 zu einer nicht-polarisierten Verteilung von LRP1 aufgrund einer fehlenden NPxYxxL-Motiv-spezifischen LRP1/PID1-Interaktion am *Recycling*-Endosom führen könnte. Diese Hypothese wird weiterhin dadurch unterstützt, dass sowohl mithilfe einer FACS-Analyse als auch mithilfe eines Membran-Biotinylierungs-Experiments gezeigt werden konnte, dass LRP1 verstärkt an der Zelloberfläche lokalisiert ist. Eine nicht-polarisierte Verteilung von LRP1 in Abwesenheit von PID1 könnte mit einem Funktionsverlust von LRP1 korrelieren, was in dieser Arbeit mehrfach bestätigt werden konnte. Zum einen ist ein Ausschalten von PID1 in HUH7-Zellen mit einer verringerten LRP1-Expression assoziiert, die das Ergebnis eines proteasomalen Abbaus von LRP1 aufgrund einer Fehlsortierung von LRP1 sein könnte. Zum anderen zeigt sich, dass die Funktion von LRP1 als Lipoproteinrezeptor beeinflusst ist, da in den PID1-defizienten HUH7-Zellen die Aufnahme von ApoE-enhaltenden Lipoproteinen nach Inhibition des LDL-Rezeptors beeinträchtigt ist. Diese Experimente zeigen zusätzlich, dass der Funktionsverlust von LRP1 durch den LDL-Rezeptor kompensiert werden kann, was ebenfalls sowohl die

verstärkte Expression als auch die verstärkte Zelloberflächen-Lokalisation des LDL-Rezeptors in PID1-defizienten HUH7-Zellen erklären würde. Interessanterweise wurde ein solcher kompensatorischer Effekt zum einen in Mäusen beobachtet, die einen hepatischen LRP1-*Knock-out* aufweisen (Rohlmann et al. 1998), zum anderen aber auch in Mäusen, die einen LRP1-N2-*Knock-in* (LRP1<sup>N2/N2</sup>) aufweisen (Gordts et al., unveröffentlichte Daten). Die Inaktivierung des distalen NPxY-Motivs in der intrazellulären Domäne von LRP1 führt hier zu dessen Funktionsverlust und in der Folge zu einer kompensatorischen Hochregulation des LDL-Rezeptors. Diese Daten implizieren, dass ebenfalls das Ausschalten von PID1 mit einem Funktionsverlust von LRP1 korreliert und weisen daraufhin, dass bei einer Analyse des Lipoproteinstoffwechsels *in vivo* der Effekt einer PID1-Defizienz auf dem Hintergrund eines LDL-Rezeptor-*Knock-outs* untersucht werden muss.

## Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 1: Extra- und intrazelluläre Struktur von LRP1 und des LDL-Rezeptor.....                                                                                            | 18  |
| Abbildung 2: Reifung und intrazellulärer Transport von LRP1 in polarisierten Zellen.....                                                                                      | 21  |
| Abbildung 3: Isoformen des humanen und murinen PID1.....                                                                                                                      | 33  |
| Abbildung 4: PID1 interagiert mit dem distalen NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1.....                                                                            | 66  |
| Abbildung 5: Eine v-Src-Kinase-vermittelte Phosphorylierung des Tyrosins des distalen NPxY-Motivs der intrazellulären Domäne von LRP1 inhibiert die Interaktion mit PID1..... | 70  |
| Abbildung 6: Die Gewinnung eines polyklonalen Kaninchen-Anti-Maus-PID1-Peptid-Antikörpers.....                                                                                | 75  |
| Abbildung 7 A: LRP1 interagiert mit PID1 in HEK 293T-Zellen.....                                                                                                              | 77  |
| Abbildung 7 B: LRP1 interagiert mit PID1 in HEK 293T-Zellen.....                                                                                                              | 79  |
| Abbildung 8: LRP1 interagiert mit PID1 in primären Hepatozyten.....                                                                                                           | 80  |
| Abbildung 9: Lentiviral-vermittelte RNA-Interferenz gegen PID1 und ARH in HUH7-Zellen.....                                                                                    | 82  |
| Abbildung 10: <i>Knock-down</i> von PID1 führt zu einer veränderten zellulären Lokalisation von LRP1 in HUH7-Zellen.....                                                      | 84  |
| Abbildung 11: Zelluläre Markerproteine zur Analyse der Funktion von Adapterproteinen bei der Regulation des intrazellulären LRP1-Transports.....                              | 87  |
| Abbildung 12: Der überwiegende Teil von LRP1 kolokalisiert nicht mit dem ER-Marker PDI in Kontroll-, PID1- <i>knock-down</i> und ARH- <i>knock-down</i> HUH7-Zellen.....      | 88  |
| Abbildung 13: Neu-synthetisiertes LRP1 kolokalisiert mit dem cis-Golgi-Marker GM130 in Kontroll-, PID1- <i>knock-down</i> und ARH- <i>knock-down</i> HUH7-Zellen.....         | 91  |
| Abbildung 14: Neu-synthetisiertes LRP1 kolokalisiert mit dem trans-Golgi-Marker TGN46 in Kontroll-, PID1- <i>knock-down</i> und ARH- <i>knock-down</i> HUH7-Zellen.....       | 93  |
| Abbildung 15: In PID1-defizienten HUH7-Zellen kolokalisieren mehr LRP1-positive Vesikel mit dem Golgi-Marker Rab6.....                                                        | 96  |
| Abbildung 16: LRP1 kolokalisiert mit dem <i>Recycling</i> -Endosom-Marker Rab11 in Kontroll-, PID1- <i>knock-down</i> und ARH- <i>knock-down</i> HUH7-Zellen.....             | 99  |
| Abbildung 17: LRP1 kolokalisiert mit frühen Endosomen in Kontroll-, PID1- <i>knock-down</i> und ARH- <i>knock-down</i> HUH7-Zellen.....                                       | 102 |
| Abbildung 18: LRP1 kolokalisiert mit TfR2 in Kontroll-, PID1- <i>knock-down</i> und ARH- <i>knock-down</i> HUH7-Zellen.....                                                   | 105 |
| Abbildung 19: In den Kontroll- und ARH-defizienten HUH7-Zellen kolokalisiert LRP1 stark mit LIMP-2 in einem juxtanukleären Kompartiment.....                                  | 108 |
| Abbildung 20: PID1 kolokalisiert mit LRP1, Rab6 und Rab11 in HeLa-Zellen.....                                                                                                 | 111 |
| Abbildung 21: Die Beeinflussung der Expression der Lipoproteinrezeptoren LDLR und LRP1 in PID1- und ARH-defizienten HUH7-Zellen.....                                          | 116 |

|                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 22: <i>Knock-down</i> von PID1 führt zu einer reduzierten LRP1-vermittelten Aufnahme in HUH7-Zellen.....                                       | 119 |
| Abbildung 23: Die Abwesenheit von PID1 führt zu einer verstärkten Lokalisation von LRP1 und des LDL-Rezeptors an der Zelloberfläche von HUH7-Zellen..... | 122 |
| Abbildung 24: Das PTB-Adapterprotein PID1 interagiert Phosphotyrosin-unabhängig mit dem distalen NPxYxxL-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1.....  | 125 |
| Abbildung 25: Hypothetisches Modell der Regulation der Sortierung von LRP1 durch das PTB-Adapterprotein PID1 in Hepatozyten.....                         | 131 |



## Literaturverzeichnis

- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H. und Krieger, M.** 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271: 518-520.
- Andrae, J., Gallini, R. und Betsholtz, C.** 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 22: 1276-1312.
- Ang, A. L., Taguchi, T., Francis, S., Folsch, H., Murrells, L. J., Pypaert, M., Warren, G. und Mellman, I.** 2004. Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *J Cell Biol* 167: 531-543.
- Aroeti, B. und Mostov, K. E.** 1994. Polarized sorting of the polymeric immunoglobulin receptor in the exocytotic and endocytotic pathways is controlled by the same amino acids. *EMBO J* 13: 2297-2304.
- Ashcom, J.D., Tiller, S.E., Dickerson, K., Cravens, J.L., Argraves, W.S. und Strickland, D.K.** 1990. The human  $\alpha_2$ -macroglobulin receptor: identification of a 420-kD cell surface glycoprotein specific for the activated conformation of  $\alpha_2$ -macroglobulin. *J Cell Biol* 110: 1041-1048.
- Ballif, B.A., Arnaud, L., Arthur, W.T., Guris, D., Imamoto, A. und Cooper, J.A.** 2004. Activation of a Dab1/CrkL/C3G/Rap1 pathway in Reelin-stimulated neurons. *Curr Biol* 14: 606-610.
- Barnes, H., Ackermann, E.J. und 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: 3589-3597.
- Beglova, N., North, C.L. und Blacklow, S.C.** 2001. Backbone dynamics of a module pair from the ligand-binding domain of the LDL receptor. *Biochemistry* 40: 2808-2815.
- Beisiegel, U.** 1998. Lipoprotein metabolism. *Eur Heart J* 19 Suppl A: A20-A23.
- Beisiegel, U., Weber, W. und Bengtsson-Olivecrona, G.** 1991. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8342-8346.
- Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J. und Stanley, K.K.** 1989. The LDL-receptor related protein, LRP, is an apolipoprotein E binding protein. *Nature* 341: 162-164.
- Betts, G.N., van der Geer, P. und Komives, E.A.** 2008. Structural and functional consequences of tyrosine phosphorylation in the LRP1 cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 283: 15656-15664.
- Boucher, P. und Gotthardt, M.** 2004. LRP and PDGF signaling: a pathway to atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 14: 55-60.
- Boucher, P., Gotthardt, M., Li, W.P., Anderson, R.G.W. und Herz, J.** 2003. LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science* 300: 329-332.
- Boucher, P., Liu, P., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Anderson, R.G. und 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: 15507-15513.
- Bu, G., Geuze, H.J., Strous, G.J. und Schwartz, A.L.** 1995. 39 kDa receptor associated protein is an ER resident protein and molecular chaperone for LDL receptor-related protein. *EMBO J* 14: 2269-2280.

**Bu, G. und Rennke, S.** 1996. Receptor-associated protein is a folding chaperone for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 271: 22218-22224.

**Burden, J.J., Sun, X.M., García, A.B. und Soutar, A.K.** 2004. Sorting motifs in the intracellular domain of the low density lipoprotein receptor interact with a novel domain of sorting nexin-17. *J Biol Chem* 279: 16237-16245.

**Cancino, J., Torrealba, C., Soza, A., Yuseff, M. I., Gravotta, D., Henklein, P., Rodriguez-Boulan, E. und Gonzalez, A.** 2007. Antibody to AP1B adaptor blocks biosynthetic and recycling routes of basolateral proteins at recycling endosomes. *Mol Biol Cell* 18: 4872-4884.

**Cao, X. und Sudhof, T.C.** 2001. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293: 115-120.

**Casanova, J. E., Apodaca, G. und Mostov, K. E.** 1991. An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor. *Cell* 66: 65-75.

**Caratù, G., Allegra, D., Bimonte, M., Schiattarella, G.G., D'Ambrosio C., Scaloni, A., Napolitano, M., Russo, T. und Zambrano, N.** 2007. Identification of the ligands of protein interaction domains through a functional approach. *Mol Cell Proteomics* 6: 333-345.

**Catterall, C.F., Lyons, A., Sim, R.B., Day, A.J. und Harris, T.J.** 1987. Characterization of primary amino acid sequence of human complement control protein factor I from an analysis of cDNA clones. *Biochem J* 242: 849-856.

**Chen, W.J., Goldstein, J.L. und 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: 3116-3123.

**Cooper, A.D.** 1997. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res* 38: 2173-2192.

**Croy, J.E., Shin, W.D., Knauer, M.F., Knauer, D.J. und Komives, E.A.** 2003. All three LDL receptor homology regions of the LDL receptor-related protein bind multiple ligands. *Biochemistry* 42: 13049-13057.

**Daly, N.L., Scanlon, M.J., Djordjevic, J.T., Kroon, P.A. und Smith, R.** 1995. Three-dimensional structure of a cysteine-rich repeat from the low-density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6334-6338.

**D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D.S., Sheldon, M. und Curran, T.** 1999. Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* 24: 471-479.

**Davis, C.G., Goldstein, J.L., Sudhof, T.C., Anderson, R.G.W., Russell, D.W. und Brown, M.S.** 1987. Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* 326: 760-765.

**Deane, R., Wu, Z., Sagare, A., Davis, J., Du, Y.S., Hamm, K., Xu, F., Parisi, M., LaRue, B., Hu, H.W., Spijkers, P., Guo, H., Song, X., Lenting, P.J., Van Nostrand, W.E. und Zlokovic, B.V.** 2004. LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron* 43: 333-344.

**Del Nery, E., Miserey-Lenkei, S., Falguières, T., Nizak, C., Johannes, L., Perez, F. und Goud, B.** 2006. Rab6A and Rab6A' GTPases play non-overlapping roles in membrane trafficking. *Traffic* 7(4): 394-407.

**Deora, A. A., Gravotta, D., Kreitzer, G., Hu, J., Bok, D. und Rodriguez-Boulán, E.** 2004. The basolateral targeting signal of CD147 (EMMPRIN) consists of a single leucine and is not recognized by retinal pigment epithelium. *Mol Biol Cell* 15: 4148-4165.

**Dolmer, K. und Gettins, P.G.** 2006. Three complement-like repeats compose the complete alpha2-macroglobulin binding site in the second ligand binding cluster of the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 281: 34189-34196.

**Donoso, M., Cancino, J., Lee, J., van Kerkhof, P., Retamal, C., Bu, G., Gonzalez, A., Cáceres, A. und Marzolo, M.P.** 2009. Polarized traffic of LRP1 involves AP1B and SNX17 operating on Y-dependent sorting motifs in different pathways. *Mol Biol Cell* 20: 481-497.

**Espirito Santo, S.M.S., Pires, N.M.M., Boesten, L.S.M., Gerritsen, G., Bovenschen, N., van Dijk, K.W., Jukema, J.W., Princen, H.M.G., Bensadoun, A., Li, W.P., Herz, J., Havekes, L.M. und van Vlijmen, B.J.M.** 2004. Hepatic low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency in mice increases atherosclerosis independent of plasma cholesterol. *Blood* 103: 3777-3782.

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

**Fass, D., Blacklow, S., Kim, P.S. und Berger J.M.** 1997. Molecular basis of familial hypercholesterolaemia from structure of LDL receptor module. *Nature* 388: 691-693.

**Fisher, C., Beglova, N. und Blacklow, S.C.** 2006. Structure of an LDLR-RAP complex reveals a general mode for ligand recognition by lipoprotein receptors. *Mol Cell* 22: 277-283.

**Fuchs, H.E., Shifman, M.A. und Pizzo, S.V.** 1982. In vivo catabolism of  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor-trypsin, antithrombin III-thrombin,  $\alpha_2$ -macroglobulin-methylamine. *Biochim Biophys Acta* 716: 151-157.

**Fuller, S. D., Bravo, R. und Simons, K.** 1985. An enzymatic assay reveals that proteins destined for the apical and basolateral domains of an epithelial cell line share the same late Golgi compartments. *EMBO J* 4: 297-307.

**Goldstein, J.L. und Brown, M.S.** 1977. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 46: 897-930.

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

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

**Gotthardt, M., Trommsdorff, M., Nevitt, M.F., Shelton, J., Richardson, J.A., Stockinger, W., Nimpf, J. und 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: 25616-25624.

**Gravotta, D., Deora, A., Perret, E., Oyanadel, C., Soza, A., Schreiner, R., Gonzalez, A. und Rodriguez-Boulán, E.** 2007. AP1B sorts basolateral proteins in recycling and biosynthetic routes of MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1564-1569.

**Griffiths, G. und Simons, K.** 1986. The trans-Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* 234: 4381-4443.

**Guttman, M., Betts, G.N., Barnes, H., Ghassemian, M., van der Geer, P. und Komives, E.A.** 2009. Interactions of the NPXY microdomains of the low density lipoprotein receptor-related protein 1. *Proteomics* 9: 5016-5028.

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

**Heeren, J., Grewal, T., Jäckle, S. und Beisiegel, U.** 2001. Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. *J Biol Chem* 276: 42333-42338.

**Herz, J.** 2006. The switch on the RAPper's necklace... *Mol Cell* 23: 451-455.

**Herz, J., Clouthier, D.E. und Hammer, R.E.** 1992. LDL receptor-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. und 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: 4119-4127.

**Herz, J., Goldstein, J.L., Strickland, D.K., Ho, Y.K. und Brown, M.S.** 1991. 39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* 266: 21232-21238.

**Herz, J., Kowal, R.C., Goldstein, J.L. und Brown, M.S.** 1990. Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. *EMBO J* 9: 1769-1776.

**Herz, J. und Strickland, D.K.** 2001. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* 108: 779-784.

**Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B.W., Goffinet, A., Mumby, M.C., Cooper, J.A. und Herz, J.** 1999. Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* 24: 481-489.

**Hilliker, C., Van Leuven, F. und Van den Berghe, H.** 1992. Assignment of the gene coding for the alpha 2-macroglobulin receptor to mouse chromosome 15 and to human chromosome 12q13-q14 by isotopic and nonisotopic in situ hybridization. *Genomics* 13: 472-474.

**Hobbs, H.H., Brown, M.S., Goldstein, J.L. und Russell, D.W.** 1986. Deletion of exon encoding cysteine-rich repeat of low density lipoprotein receptor alters its binding specificity in a subject with familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 261: 13114-13120.

**Howell, B.W., Hawkes, R., Soriano, P. und Cooper, J.A.** 1997. Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* 389: 733-737.

**Howell, B.W., Herrick, T.M., Hildebrand, J.D., Zhang, Y. und Cooper, J.A.** 2000. Dab1 tyrosine phosphorylation sites relay positional signals during mouse brain development. *Curr Biol* 10: 877-885.

**Hunziker, W. und Fumey, C.** 1994. A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. *EMBO J* 13: 2963-2967.

**Jedrychowski, M.P., Gartner, C.A., Gygi, S.P., Zhou, L., Herz, J., Kandror, K.V. und Pilch, P.F.** 2010. Proteomic analysis of GLUT4 storage vesicles reveals LRP1 to be an important vesicle component and target of insulin signaling. *J Biol Chem* 285: 104-114.

**Jeon, H., Meng, W., Takagi, J., Eck, M.J., Springer, T.A. und Blacklow, S.C.** 2001. Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair. *Nat Struct Biol* 8: 499-504.

**Jones, C., Hammer, R.E., Li, W.P., Cohen, J.C., Hobbs, H.H. und Herz J.** 2003. Normal sorting but defective endocytosis of the low density lipoprotein receptor in mice with autosomal recessive hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 278: 29024-29030.

**Kajiwara, Y., Franciosi, S., Takahashi, N., Krug, L., Schmeidler, J., Taddei, K., Haroutunian, V., Fried, U., Ehrlich, M., Martins, R.N., Gandy, S. und Buxbaum, J.D.** 2010. Extensive proteomic screening identifies the obesity-related NYGGF4 protein as a novel LRP1-interactor, showing reduced expression in early Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 5: 1.

**Keshvara, L., Benhayon, D., Magdaleno, S. und Curran, T.** 2001. Identification of reelin-induced sites of tyrosyl phosphorylation on disabled 1. *J Biol Chem* 276: 16008-16014.

**Kita, T., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Watanabe, Y., Hornick, C.A. und Havel, R.J.** 1982. Hepatic uptake of chylomicron remnants in WHHL rabbits: a mechanism genetically distinct from the low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 3623-3627.

**Knauer, M.F., Orlando, R.A. und Glabe C.G.** 1996. Cell surface APP751 forms complexes with protease nexin 2 ligands and is internalized via the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Brain Res* 740: 6-14.

**Knipper, M., Claussen, C., Rüttiger, L., Zimmermann, U., Lüllmann-Rauch, R., Eskelinen, E.L., Schröder, J., Schwake, M. und Saftig P.** 2006. Deafness in LIMP2-deficient mice due to early loss of the potassium channel KCNQ1/KCNE1 in marginal cells of the stria vascularis. *J Physiol* 576: 73-86.

**Knisely, J.M., Lee, J. und Bu, G.** 2008. Measurement of receptor endocytosis and recycling. *Methods Mol Biol* 457:319-332.

**Ko, K.W., McLeod, R.S., Avramoglu, R.K., Nimpf, J., FitzGerald, D.J., Vukmirica, J. und Yao, Z.** 1998. Mutation at the processing site of chicken low density lipoprotein receptor-related protein impairs efficient endoplasmic reticulum exit, but proteolytic cleavage is not essential for its endocytic functions. *J Biol Chem* 273: 27779-27785.

**Kounnas, M.Z., Moir, R.D., Rebeck, G.W., Bush, A.I., Argraves, W.S., Tanzi, R.E., Hyman, B.T. und Strickland, D.K.** 1995. LDL receptor-related protein, a multifunctional apoE receptor, binds secreted  $\beta$ -amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell* 82: 331-340.

**Krapp, A., Ahle, S., Kersting, S., Hua, Y., Kneser, K., Nielsen, M., Gliemann, J. und Beisiegel U.** 1996. Hepatic lipase mediates the uptake of chylomicrons and beta-VLDL into cells via the LDL receptor-related protein (LRP). *J Lipid Res* 37: 926-936.

**Kristensen, T., Moestrup, S.K., Gliemann, J., Bendtsen, L., Sand, O. und Sottrup-Jensen, L.** 1990. Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein (LRP) is the alpha 2-macroglobulin receptor. *FEBS Lett* 276: 151-155.

**Krüger, M., Kratchmarova, I., Blagoev, B., Tseng, Y.H., Kahn, C.R. und Mann, M.** 2008. Dissection of the insulin signaling pathway via quantitative phosphoproteomics. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 2451-2456.

**Kwon, O.Y., Hwang, K., Kim, J.A., Kim, K., Kwon, I.C., Song, H.K. und Jeon, H.** 2010. Dab1 binds to Fe65 and diminishes the effect of Fe65 or LRP1 on APP processing. *J Cell Biochem* 111: 508-519.

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

**Laatsch, A., Ragozin, S., Grewal, T., Beisiegel, U. und Joerg, H.** 2004. Differential RNA interference: replacement of endogenous with recombinant low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Eur J Cell Biol* 83: 113-120.

**Lee, D., Walsh, J.D., Mikhailenko, I., Yu, P., Migliorini, M., Wu, Y., Krueger, S., Curtis, J.E., Harris, B., Lockett, S., Blacklow, S.C., Strickland, D.K. und Wang, Y.X.** 2006. RAP uses a histidine switch to regulate its interaction with LRP in the ER and Golgi. *Molecular Cell* 22: 423-430.

**Le Gall, A. H., Powell, S. K., Yeaman, C. A. und Rodriguez-Boulton, E.** 1997. The neural cell adhesion molecule expresses a tyrosine-independent basolateral sorting signal. *J Biol Chem* 272: 4559-4567.

**Li, Y., Marzolo, M. P., van Kerkhof, P., Strous, G. J., und Bu, G.** 2000. The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal For LDL receptor-related protein (LRP). *J Biol Chem* 275: 17187-17194.

**Li, Y., van Kerkhof, P., Marzolo, M. P., Strous, G. J. und Bu, G.** 2001\_1. 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: 1185-1195.

**Li, Y., Lu, W., Marzolo, M. P. und Bu, G.** 2001\_2. Differential functions of members of the low density lipoprotein receptor family suggested by their distinct endocytosis rates. *J Biol Chem* 276: 18000-18006.

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

**Lillis, A.P., Van Duyn, L.B., Murphy-Ullrich, J.E. und Strickland, D.K.** 2008. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev* 88: 887-918.

**Liu, Q., Zerbinatti, C.V., Zhang, J., Hoe, H.S., Wang, B., Cole, S.L., Herz, J., Muglia, L. und Bu, G.** 2007. Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. *Neuron* 56: 66-78.

**Lock, J. G. und Stow, J. L.** 2005. Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol Biol Cell* 16: 1744-1755.

**Loukinova, E., Ranganathan, S., Kuznetsov, S., Gorlatova, N., Migliorini, M.M., Loukinov, D., Ulery, P.G., Mikhailenko, I., Lawrence, D.A. und Strickland, D.K.** 2002. Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for integrated co-receptor function between LRP and the PDGF. *J Biol Chem* 277: 15499-15506.

- MacArthur, J.M., Bishop, J.R., Stanford, K.I., Wang, L., Bensadoun, A., Witztum, J.L. und Esko, J.D.** 2007. Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *J Clin Invest* 117: 153-164.
- Mahley, R.W. und Huang, Y.** 2007. Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, internalizing. *J Clin Invest* 117: 94-98.
- Mahley, R.W., Hui, D.Y., Innerarity, T.L. und Beisiegel, U.** 1989. Chylomicron remnant metabolism. Role of hepatic lipoprotein receptors in mediating uptake. *Arteriosclerosis* 9: 114-18.
- Mahley, R.W. und Innerarity T.L.** 1983. Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 737: 197-222.
- Mallard, F., Tang, B.L., Galli, T., Tenza, D., Saint-Pol, A., Yue X., Antony, C., Hong W., Goud, B. und Johannes, L.** 2002. Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J Cell Biol* 156(4): 653-664.
- Martinez, O., Schmidt, A., Salaméro, J., Hoflack, B., Roa, M. und Goud, B.** 1994. The small GTP-binding protein rab6 functions in intra-Golgi transport. *J Cell Biol* 127(6 Pt 1): 1575-1588.
- Marzolo, M. P., Yuseff, M. I., Retamal, C., Donoso, M., Ezquer, F., Farfan, P., Li, Y. und Bu, G.** 2003. Differential distribution of low-density lipoproteinreceptor-related protein (LRP) and megalin in polarized epithelial cells is determined by their cytoplasmic domains. *Traffic* 4: 273-288.
- Matter, K. und Mellman, I.** 1994. Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* 6: 545-554.
- Matter, K., Whitney, J. A., Yamamoto, E. M. und Mellman, I.** 1993. Common signals control low density lipoprotein receptor sorting in endosomes and the Golgi complex of MDCK cells. *Cell* 74: 1053-1064.
- Matter, K., Yamamoto, E. M. und Mellman, I.** 1994. Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J Cell Biol* 126: 991-1004.
- Maurer, M.E. und Cooper, J.A.** 2006. The adaptor protein Dab2 sorts LDL receptors into coated pits independently of AP-2 and ARH. *J Cell Sci* 119: 4235-4246.
- May, P., Herz, J. und Bock, H.H.** 2005. Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling. *Cell Mol Life Sci* 62: 2325-2338.
- May, P., Reddy, Y.K. und Herz, J.** 2002. Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain. *J Biol Chem* 277: 18736-18743.
- Migliorini, M.M., Behre, E.H., Brew, S., Ingham, K.C. und Strickland, D.K.** 2003. Allosteric modulation of ligand binding to low density lipoprotein receptor-related protein by the receptor-associated protein requires critical lysine residues within its carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem* 278: 17986-17992.
- Mikhailenko, I., Considine, W., Argraves, K.M., Loukinov, D., Hyman, B.T. und 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: 3269-3281.

**Mishra, S.K., Keyel, P.A., Edeling, M.A., Dupin, A.L., Owen, D.J. und Traub, L.M.** 2005. Functional dissection of an AP-2 beta2 appendage-binding sequence within the autosomal recessive hypercholesterolemia protein. *J Biol Chem* 280: 19270-19280.

**Mishra, S.K., Watkins, S.C. und Traub, L.M.** 2002. The autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) protein interfaces directly with the clathrin-coat machinery. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16099-16104.

**Moestrup, S.K. und Gliemann, J.** 1989. Purification of the rat hepatic  $\alpha_2$ -macroglobulin receptor as an approximately 440 kDa single chain polypeptide. *J Biol Chem* 264: 15574-15577.

**Mostov, K. E. und Cardone, M. H.** 1995. Regulation of protein traffic in polarized epithelial cells. *Bioessays* 17: 129-138.

**Muratoglu, S.C., Mikhailenko, I., Newton, C., Migliorini, M. und Strickland, D.K.** 2010. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) forms a signaling complex with platelet-derived growth factor receptor-beta in endosomes and regulates activation of the MAPK pathway. *J Biol Chem.* 285: 14308-14317.

**Myklebost, O., Arheden, K., Rogne, S., Geurts van Kessel, A., Mandahl, N., Herz, J., Stanley, K., Heim, S. und Mitelman, F.** 1989. The gene for the human putative apoE receptor is on chromosome 12 in the segment q13-14. *Genomics* 5: 65-69.

**Nagai, M., Meerloo, T., Takeda, T. und Farquhar, M. G.** 2003. The adaptor protein ARH escorts megalin to and through endosomes. *Mol Biol Cell* 14: 4984-4996

**Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. und Sato, J.** 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42: 3858-3863.

**Neels, J.G., van Den Berg, B.M., Lookene, A., Olivecrona, G., Pannekoek, H. und Van Zonneveld, A.J.** 1999. The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties. *J Biol Chem* 274: 31305-31311.

**Newton, C.S., Loukinova, E., Mikhailenko, I., Ranganathan, S., Gao, Y., Haudenschild, C. und Strickland, D.K.** 2005. Platelet-derived growth factor receptor-beta (PDGFR-beta) activation promotes its association with the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for co-receptor function. *J Biol Chem* 280: 27872-27878.

**Nielsen, K.L., Holtet, T.L., Etzerodt, M., Moestrup, S.K., Gliemann, J., Sottrup-Jensen, L. und Thøgersen, H.C.** 1996. Identification of residues in  $\alpha$ -macroglobulins important for binding to the  $\alpha_2$ -macroglobulin receptor low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 271: 12909-12912.

**Nykjaer, A., Bengtsson-Olivecrona, G., Lookene, A., Moestrup, S.K., Petersen, C.M., Weber, W., Beisiegel, U. und Gliemann, J.** 1993. The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds lipoprotein lipase and beta-migrating very low density lipoprotein associated with the lipase. *J Biol Chem* 268: 15048-15055.

**Obermoeller, L.M., Chen, Z., Schwartz, A.L. und Bu, G.** 1998. Ca<sup>2+</sup> and receptor-associated protein are independently required for proper folding and disulfide bond formation of the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 273: 22374-22381.



- Obermoeller, L.M., Warshawsky, I., Wardell, M.R. und Bu, G.** 1997. Differential functions of triplicated repeats suggest two independent roles for the receptor-associated protein as a molecular chaperone. *J Biol Chem* 272: 10761-10768.
- Odorizzi, G. und Trowbridge, I. S.** 1997. Structural requirements for basolateral sorting of the human transferrin receptor in the biosynthetic and endocytic pathways of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 137: 1255-1264.
- Oleinikov, A.V., Zhao, J. und Makker, S.P.** 2000. Cytosolic adaptor protein Dab2 is an intracellular ligand of endocytic receptor gp600/megalin. *Biochem J* 347: 613-21.
- Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L. und Baltimore, D.** 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8392-8396.
- Pietrzik, C.U., Busse, T., Merriam, D.E., Weggen, S. und Koo, E.H.** 2002. The cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing. *EMBO J* 21: 5691-5700.
- Pietrzik, C.U., Yoon, I.S., Jaeger, S., Busse, T., Weggen, S. und Koo, E.H.** 2004. FE65 constitutes the functional link between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 24: 4259-4265.
- Ranganathan, S., Liu, C.X., Migliorini, M.M., Von Arnim, C.A., Peltan, I.D., Mikhailenko, I., Hyman, B.T. und 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: 40536-40544.
- Reekmans ,S.M., Pflanzner, T., Gordts, P.L., Isbert, S., Zimmermann, P., Annaert, W., Weggen, S., Roebroek, A.J. und Pietrzik, C.U.** 2010. Inactivation of the proximal NPXY motif impairs early steps in LRP1 biosynthesis. *Cell Mol Life Sci* 67: 135-145.
- Rindler, M. J., Ivanov, I. E., Plesken, H., Rodriguez-Boulan, E. und Sabatini, D. D.** 1984. Viral glycoproteins destined for apical or basolateral plasma membrane domains traverse the same Golgi apparatus during their intracellular transport in doubly infected Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 98: 1304-1319.
- Rodenburg, K.W., Kjoller, L., Petersen, H.H. und Andreasen, P.A.** 1998. Binding of urokinase-type plasminogen activator-plasminogen activator inhibitor-1 complex to the endocytosis receptors alpha2-macroglobulin receptor/low-density lipoprotein receptor-related protein and very-low-density lipoprotein receptor involves basic residues in the inhibitor. *Biochem J* 329: 55-63.
- Rodriguez-Boulan, E. und Gonzalez, A.** 1999. Glycans in post-Golgi apical targeting: sorting signals or structural props? *Trends Cell Biol* 9: 291-294.
- Rodriguez-Boulan, E., Kreitze, G. und Musch, A.** 2005. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 233-247.
- Rohlmann, A., Gotthardt, M., Hammer, R.E. und Herz, J.** 1998. Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J Clin Invest* 101: 689-695.
- Rubinsztein, D.C., Cohen, J.C., Berger, G.M., van der Westhuyzen, D.R., Coetzee, G.A. und Gevers, W.** 1990. Chylomicron remnant clearance from the plasma is normal in familial hypercholesterolemic homozygotes with defined receptor defects. *J Clin Invest* 86: 1306-1312.

**Rudenko, G., Henry, L., Henderson, K., Ichtchenko, K., Brown, M.S., Goldstein, J.L. und Deisenhofer, J.** 2002. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science* 298: 2353-2358.

**Russell, D.W., Schneider, W.J., Yahamoto, T., Luskey, K.L., Brown, M.S. und Goldstein, J.L.** 1984. Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor. *Cell* 37: 577-585.

**Sheldon, M., Rice, D.S., D'Arcangelo, G., Yoneshima, H., Nakajima, K., Mikoshiba, K., Howell, B.W., Cooper, J.A., Goldowitz, D. und Curran, T.** 1997. Scrambler and yotari disrupt the disabled gene and produce a reeler-like phenotype in mice. *Nature* 389: 730-733.

**Simonovic, M., Dolmer, K., Huang, W., Strickland, D.K., Volz, K. und Gettins, P.G.** 2001. Calcium coordination and pH dependence of the calcium affinity of ligand-binding repeat CR7 from the LRP. Comparison with related domains from the LRP and the LDL receptor. *Biochemistry* 40: 15127-15134.

**Springer, T.A.** 1998. An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, extracellular matrix components. *J Mol Biol* 283: 837-862.

**Stefansson, S., Muhammad, S., Cheng, X.F., Battey, F.D., Strickland, D.K. und Lawrence, D.A.** 1998. Plasminogen activator inhibitor-1 contains a cryptic high affinity binding site for the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 273: 6358-6366.

**Stein, Y. und Stein, O.** 2003 Lipoprotein lipase and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 170: 1-9.

**Stockinger, W., Sailer, B., Strasser, V., Recheis, B., Fasching, D., Kahr, L., Schneider, W. J. und Nimpf, J.** 2002. The PX-domain protein SNX17 interacts with members of the LDL receptor family and modulates endocytosis of the LDL receptor. *EMBO J* 21: 4259-4267.

**Stolt, P. C. und Bock, H. H.** 2006. Modulation of lipoprotein receptor functions by intracellular adaptor proteins. *Cell Signalling* 18: 1560-1571.

**Strickland, D.K., Ashcom, J.D., Williams, S., Burgess, W.H., Migliorini, M. und Argraves, W.S.** 1990. Sequence identity between the  $\alpha_2$ -macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J Biol Chem* 265: 17401-17404.

**Strickland, D.K. und Ranganathan, S.** 2003. Diverse role of LDL receptor-related protein in the clearance of proteases and in signaling. *J Thromb Haemost* 1: 1663-1670.

**Takeda, T., Yamazaki, H. und Farquhar, M.G.** 2003. Identification of an apical sorting determinant in the cytoplasmic tail of megalin. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C1105-1113.

**Trommsdorff, M., Borg, J.P., Margolis, B. und Herz, J.** 1998. Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 273: 33556-33560.

**Uhlik, M.T., Temple, B., Bencharit, S., Kimple, A.J., Siderovski, D.P. und Johnson, G.L.** 2005. Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains. *J Mol Biol* 345: 1-20.

**Ulery, P.G., Beers, J., Mikhailenko, I., Tanzi, R.E., Rebeck, G.W., Hyman, B.T. und Strickland D.K.** 2000. Modulation of beta-amyloid precursor protein processing by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence that Lrp contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 275: 7410-7415.

**van der Geer, P. und Pawson, T.** 1995. The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem Sci* 20: 277-280.

**van Kerkhof, P., Lee, J., McCormick, L., Tetrault, E., Lu, W., Schoenfish, M., Oorschot, V., Strous, G. J., Klumperman, J. und Bu, G.** 2005. Sorting nexin 17 facilitates LRP recycling in the early endosome. *EMBO J* 24: 2851-2861.

**Véniant, M.M., Zlot, C.H., Walzem, R.L., Pierotti, V., Driscoll, R., Dichek, D., Herz, J. und Young, S.G.** 1998. Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient "Apo-B48-only" and "Apo-B100-only" mice. *J Clin Invest* 102: 1559-1568.

**Wang, B., Zhang, M., Ni, Y.H., Liu, F., Fan, H.Q., Fei, L., Pan, X.Q., Guo, M., Chen, R.H. und Guo, X.R.** 2006. Identification and characterization of NYGGF4, a novel gene containing a phosphotyrosine-binding (PTB) domain that stimulates 3T3-L1 preadipocytes proliferation. *Gene* 379: 132-140.

**White, J., Johannes, L., Mallard, F., Girod, A., Grill, S., Reinsch, S., Keller, P., Tzschaschel, B., Echard, A., Goud, B. und Stelzer, E.H.** 1999. Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J Cell Biol* 147(4): 743-760.

**Willnow, T.E., Armstrong, S.A., Hammer, R.E. und Herz J.** 1995. Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4537-4541.

**Willnow, T.E., Moehring, J.M., Inocencio, N.M., Moehring, T.J. und Herz, J.** 1996\_1. The low-density-lipoprotein receptor-related protein (LRP) is processed by furin in vivo and in vitro. *Biochem J* 313: 71-76.

**Willnow, T.E., Orth, K. und Herz, J.** 1994. Molecular dissection of ligand binding sites on the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 269: 15827-15832.

**Willnow, T.E., Rohlmann, A., Horton, J., Otani, H., Braun, J.R., Hammer und R.E., Herz, J.** 1996\_2. RAP, a specialized chaperone, prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL receptor-related endocytic receptors. *EMBO J* 15: 2632-2639.

**Willnow, T.E., Sheng, Z., Ishibashi, S. und Herz, J.** 1994. Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. *Science* 264: 1471-1474.

**Worby, C. A., und Dixon, J. E.** 2002. Sorting out the cellular functions of sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 919-931.

**Wu, W.L., Gan, W.H., Tong, M.L., Li, X.L., Dai, J.Z., Zhang, C.M. und Guo, X.R.** 2011. Over-expression of NYGGF4 (PID1) inhibits glucose transport in skeletal myotubes by blocking the IRS1/PI3K/AKT insulin pathway. *Mol Genet Metab.* 102: 374-377.

**Yamamoto, T., Davis, C.G., Brown, M.S., Schneider, W.J., Casey, M.L., Goldstein, J.L. und Russell, D.W.** 1984. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* 39: 27-38.

**Yang, M., Huang, H., Li, J., Li, D. und Wang, H.** 2004. Tyrosine phosphorylation of the LDL receptor-related protein (LRP) and activation of the ERK pathway are required for connective tissue growth factor to potentiate myofibroblast differentiation. *FASEB J* 18: 1920-1921.

**Zhang, C.M., Chen, X.H., Wang, B., Liu, F., Chi, X., Tong, M.L., Ni, Y.H., Chen, R.H. und Guo, X.R.** 2009. Over-expression of NYGGF4 inhibits glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via attenuated phosphorylation of IRS-1 and Akt. *Acta Pharmacol Sin* 30:120-124.

**Zhang, H., Lee, J.M., Wang, Y., Dong, L., Ko, K.W., Pelletier, L. und Yao, Z.** 2008. Mutational analysis of the FXNPXY motif within LDL receptor-related protein 1 (LRP1) reveals the functional importance of the tyrosine residues in cell growth regulation and signal transduction. *Biochem J* 409: 53-64.

**Zhang, C.M., Zeng, X.Q., Zhang, R., Ji, C.B., Tong, M.L., Chi, X., Li, X.L., Dai, J.Z., Zhang, M. und Cui, Y., Guo X.R.** 2010. Effects of NYGGF4 knockdown on insulin sensitivity and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. *J Bioenerg Biomembr* 42: 433-439.

**Zhao, Y., Zhang, C., Chen, X., Gao, C., Ji, C., Chen, F., Zhu, C., Zhu, J., Wang, J., Qian, L. und Guo, X.** 2010\_1. Overexpression of NYGGF4 (PID1) induces mitochondrial impairment in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biochem.* 340: 41-48.

**Zhao, Y.P., Zhang, C.M., Zhu, C., Chen, X.H., Wang, J.L., Ji, C.B., Chi, X., Hong, Q., Peng, Y.Z. und Guo, X.R.** 2010\_2. NYGGF4 homologous gene expression in 3T3-L1 adipocytes: regulation by FFA and adipokines. *Mol Biol Rep* 2010 37: 3291-3296.

**Zhou, M.M., Ravichandran, K.S., Olejniczak, E.F., Petros, A.M., Meadows, R.P., Sattler, M., Harlan, J.E., Wade, W.S., Burakoff, S.J. und Fesik, S.W.** 1995. Structure and ligand recognition of the phosphotyrosine binding domain of Shc. *Nature* 378: 584-592.

**Zurhove, K., Nakajima, C., Herz J., Bock, H.H. und May, P.** 2008. Gamma-secretase limits the inflammatory response through the processing of LRP1. *Sci Signal* 1: ra15.

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Jörg Heeren** und Herrn **Dr. Dirk Warnecke** für die freundliche Übernahme des Gutachtens meiner Arbeit bedanken.

Bei Herrn **Prof. Dr. Jörg Heeren** möchte ich mich zusätzlich ganz herzlich für die Ermöglichung und für die hervorragende Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt ebenfalls Herrn **Prof. Dr. Hartwig Schmale** sowohl für die hervorragende Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit als auch für das in jeder Hinsicht große Interesse und die stets vorhandene Zeit.

Bei **Anette Rosche, Birgit Henkel und Sandra Ehret** möchte ich mich ganz herzlich für die technische Unterstützung während dieser Arbeit bedanken.

Ich möchte mich beim gesamten Labor für die schöne Atmosphäre bedanken, besonders bei **Anette Rosche und Walter Tauscher**.

Bei meinen Doktorandenkollegen **Karoline Brügelmann, Alexander Bartelt, Oliver Bruns, Dorothee Lasrich, Leah Eissing, Tobias Schmidt, Brigitte Müller, Artur Giemsa und Barbara Freund**, die alle ganz besondere Persönlichkeiten sind, möchte ich mich für den guten Austausch und für viele lustige Momente bedanken.

*Blot Blot, Western Baby, Got No Bands, This Shit Is Crazy...* (Zheng et al. 2011)

Ich möchte mich ebenfalls bei allen **Mitgliedern des Graduiertenkollegs 1459** für den guten Austausch und die nette Atmosphäre bedanken. Mein besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Thomas Braulke** sowohl für die Ermöglichung meiner Arbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs als auch für die vielen Möglichkeiten, die uns mit großem Zeitaufwand geboten wurden.

Ich möchte mich bei **meinen Eltern**, bei meinen Schwestern **Diana Foretic und Juliane Hoffzimmer** und bei meinen Freunden **Zohra Sahavi-Ouriaghi, Elvira Mahmic, Fathia Ghazi, Karoline Brügelmann, Sarah Jones, Adrian Foretic und Nicolas Caratiola** herzlich bedanken, dass sie mich in jeder Hinsicht unterstützt und mich stets motiviert haben.