

Aus dem Institut für Molekulare Zellbiologie
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktorin: Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

Funktion von Annexin VI und Caveolin im intrazellulären Transport von Cholesterin

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Cara Kosack

aus Aachen

Hamburg 2005

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Mündliche Prüfung abgelegt am: 18. April 2005

Veröffentlicht mit der Genehmigung des
Fachbereiches Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss: Vorsitzende/r: Prof. Beisiegel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Sohendra/PD Dr. Ameis

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. de Weerth

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Zellbiologische Grundlagen	6
1.1.1	Endozytose	6
1.1.1.1	Rezeptor-vermittelte Endozytose	6
1.1.1.2	Endosomale Kompartimente	7
1.1.1.3	Rezeptor-vermittelte Endozytose des LDL	10
1.1.2	Exozytose	10
1.1.3	Molekulare Mechanismen der Endo- und Exozytose	11
1.1.3.1	Steuerung des Vesikeltransportes bei der Endozytose	12
1.1.3.2	Steuerung des Vesikeltransportes bei der Exozytose	12
1.2	Lipoproteine	14
1.2.1	Metabolismus der Lipoproteine	14
1.2.2	Einteilung der Lipoproteine	14
1.2.3	HDL	15
1.2.3.1	HDL-Klassen	15
1.2.3.2	HDL-Metabolismus	15
1.2.4	LDL-Metabolismus	16
1.2.5	Intrazelluläre Verteilung von Cholesterin	17
1.2.5.1	Cholesterinefflux	18
1.2.6	Pathobiochemie	19
1.2.6.1	Wolman-Krankheit	19
1.2.6.2	CESD	20
1.2.6.3	Niemann-Pick-Krankheit	20
1.2.6.4	Tangier-Erkrankung	20
1.2.6.5	Hyperlipoproteinämie Typ II (familiäre Hypercholesterinämie)	21
1.3	Annexine	21
1.3.1	Familie der Annexine	21
1.3.1.1	Aufbau der Annexine	21
1.3.1.2	Vorkommen der Annexine	22
1.3.1.3	Funktion der Annexine	22
1.3.2	Annexin VI	22
1.3.2.1	Zelluläre Lokalisation und Gewebeverteilung	24
1.3.2.2	Funktionen und assoziierte Proteine	24
1.3.3	Annexine und Endozytose	26
1.3.4	Annexine und Exozytose	26
1.4	Caveolae und Lipid Rafts	27
1.4.1	Caveolae	27
1.4.1.1	Aufbau und Vorkommen der Caveolae	27
1.4.1.2	Funktion der Caveolae	28
1.4.1.3	Caveolae und Signaltransduktion	28
1.4.1.4	Caveolin	29
1.4.1.4.1	Aufbau und Vorkommen von Caveolin	29
1.4.1.4.2	Funktion von Caveolin	30
1.4.2	Lipid Rafts	31
1.4.2.1	Aufbau von Lipid Rafts	31
1.4.2.2	Isolierung von Lipid Rafts	32
1.4.2.3	Lipid Rafts und assoziierte Proteine	32
1.4.2.4	Lipid Rafts und Signaltransduktion	32
1.4.2.5	Die Rolle von Lipid Rafts im Membranverkehr	33
1.4.3	Lipid Rafts, Caveolae und Krankheiten	34

1.5	Ziel der Arbeit	37
2	Material und Methoden	38
2.1	Material	38
2.1.1	Zellen und Bakterien	38
2.1.2	Geräte	38
2.1.3	Materialien/Verbrauchsmittel	39
2.1.4	Chemikalien	40
2.1.5	Antikörper	43
2.1.5.1	Primäre Antikörper	43
2.1.5.2	Sekundäre Antikörper	43
2.2	Methoden	44
2.2.1	Zellkultur	44
2.2.2	Ausplattieren von Zellen	44
2.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	44
2.2.4	Transformation von Bakterien	45
2.2.5	DNS-Mini- und Max-Präparationen	45
2.2.5.1	Mini-Präparation	46
2.2.5.2	Restriktionsverdau	46
2.2.5.3	Agarosegelelektrophorese	46
2.2.5.4	Maxi-Präparation	47
2.2.6	Transfektion	47
2.2.7	Proteinextraktion aus Zellen	48
2.2.8	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	48
2.2.9	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Page	49
2.2.9.1	Vorbereitung der Proben	49
2.2.9.2	Gelelektrophorese	49
2.2.10	Western Blot und Immundetektion	50
2.2.11	Isolierung von humanem LDL und HDL	51
2.2.12	LPDS-Herstellung	51
2.2.13	Radioaktive Markierung von LDL mit Tritium	52
2.2.14	Aufnahme von ³ H-LDL	52
2.2.15	Efflux von ³ H-LDL	52
2.2.16	Immunfluoreszenz (IMF)	53
2.2.16.1	Beschichtung von Coverslips	53
2.2.16.2	Ausplattieren von Zellen	53
2.2.16.3	Immunfluoreszenz	53
2.2.17	Raft-Präparation	54
3	Ergebnisse	55
3.1	Übersicht der CHO-Zelllinien	55
3.1.1	CHO-Wildtyp(WT)-Zellen	55
3.1.2	CHO-anxVI-Zellen	56
3.1.3	CHO-Caveolin-Mutanten	56
3.1.3.1	CHO-Cav1(WT)-Zellen	56
3.1.3.2	CHO-Cav3(DGV)-Zellen	56
3.1.3.3	CHO-Cav1(DGI)-Zellen	57
3.2	Nachweis und Charakterisierung von Caveolin	57
3.2.1	Nachweis der Caveolin-Expression in verschiedenen Zelllinien	57
3.2.2	Nachweis des Hämagglutinin-Epitops in CHO-Cav1(DGI)- und CHO-Cav3(DGV)-Zellen	58
3.3	Nachweis von Annexin VI in verschiedenen CHO-Zelllinien	60

3.4	Aufnahmekinetik von ³ H-LDL in HuH7-WT- und HuH7-Cav3(DGV)-Zellen	61
3.5	Konzentrationsabhängiger HDL stimulierter Cholesterinefflux in CHO-WT-, CHO-Cav1(DGI)- und CHO-Cav3(DGV)-Zellen	62
3.5.1	Versuchsdarstellung der Effluxexperimente	63
3.5.2	³ H-Cholesterinefflux mit 5, 50 und 100 µg/ml HDL als Akzeptor	64
3.5.3	Zusammenfassung des Effluxexperimentes	67
3.6	Konzentrationsabhängiger HDL stimulierter Cholesterinefflux von ³ H-Cholesterin in CHO-WT- und CHO-anxVI-Zellen	71
3.6.1	³ H-Cholesterinefflux mit 5, 50 und 100 µg/ml HDL als Akzeptor	71
3.6.2	Zusammenfassung des Effluxexperimentes	73
3.7	Mechanismus des Cholesterineffluxes ist spezifisch	75
3.8	Cholesterinefflux in transient transfizierten CHO-Zellen	77
3.8.1	Western Blot	79
3.8.2	³ H-Cholesterin-Efflux	81
3.9	Lokalisation von Caveolin in CHO-WT- und CHO-anxVI-Zellen	83
3.10	Lokalisation von Annexin VI in CHO-WT- und CHO-anxVI-Zellen	85
3.11	NBD-Cholesterin in CHO-WT- und CHO-anxVI-Zellen	87
3.12	Raft-Präparation in CHO-WT-, CHO-Cav1(WT), CHO-Cav3(DGV) und CHO-anxVI-Zellen	87
4	Diskussion	90
4.1	Endozytose	90
4.1.1	Funktion von Annexin VI bei Rezeptor-vermittelter Endozytose	90
4.1.2	Funktion von Caveolin bei Rezeptor-vermittelter Endozytose	91
4.2	Sekretionsvorgänge/Exozytose	92
4.2.1	Funktion von Annexin VI beim Cholesterinefflux	93
4.2.2	Überexpression von Annexin VI in CHO-Zellen führt zu einer Reduktion des Effluxes von ³ H-Cholesterin	93
4.2.3	Funktion von Caveolin bei der Exozytose	94
4.2.3.1	Alleinige Überexpression von Cav1(WT), Cav1(DGI) und Cav3(DGV) in CHO-Zellen zeigt keinen Effekt auf den Cholesterinefflux	95
4.2.3.2	ABC-AI-Transporter	97
4.2.3.3	Scavenger Rezeptor BI und Caveolae	98
4.2.3.4	ABC-AI- und SR-BI-Transporter	100
4.3	Assoziation von Caveolin und Annexin VI	100
4.3.1	Aufgaben von Caveolin und Annexin VI beim intrazellulären Cholesterintransport	101
4.4	Ausblick	102
5	Zusammenfassung	104
6	Abkürzungen	105
7	Literaturverzeichnis	107
8	Danksagung	125
9	Lebenslauf	126
10	Erklärung	128

1 Einleitung

1.1 Zellbiologische Grundlagen

1.1.1 Endozytose

Der Prozess der Endozytose bezeichnet den Eintritt von extrazellulären Materialien in das Zellinnere. Er ist essentiell für den Ablauf des Zellstoffwechsels.

Bei der Endozytose (Synonym Pinozytose) stülpen sich spezialisierte Abschnitte der Plasmamembran, die Coated Pits, nach innen und schnüren sich als endozytotische Vesikel, den Coated Vesikel (früher auch als Akanthosom bezeichnet), ab. Nach einigen Sekunden streifen die Coated Vesikel ihre Hülle ab und verschmelzen mit den Endosomen. Von dort aus werden sie meist zu den Lysosomen transportiert, wo sie in niedermolekulare Produkte wie Zucker, Aminosäuren und Nukleotide gespalten und von der Zelle verwertet werden können. Viele Membranbestandteile werden sowohl aus den Endosomen, als auch den Lysosomen zurückgewonnen und gelangen durch Exozytose wieder zurück an die Plasmamembran (PM).

In vielen Zellen ist die Endozytose so ausgedehnt, dass ständig ein großer Teil der PM in das Zellinnere gelangt. Viele Membranbestandteile u. a. Rezeptoren werden kontinuierlich in einem umfangreichen Endozytose-/Exozytosezyklus umgebaut und an die Zelloberfläche zurücktransportiert.

1.1.1.1 Rezeptor-vermittelte Endozytose

Die Rezeptor-vermittelte Endozytose beginnt in spezialisierten Teilen der PM, den Clathrin-Coated Pits (Roth und Porter, 1964). Pits sind ca. 150 nm große Einstülpungen auf der Innenseite der Membran, die neben Clathrin mit AP2-Adapter-Proteinkomplexen bekleidet sind (Willingham et al., 1981; Kirchhausen et al., 2000). Pits sind kurzlebig und bilden sich innerhalb einer Minute aus. Dabei wird ein Clathrin-Gerüst, das aus einem Triskelion (Trimer) von drei schweren (190 kDa) und drei leichten (25 kDa) Ketten besteht, an der inneren Oberfläche der Coated Pits geformt (Schroeder et al., 1991; Kirchhausen et al., 1993). Der AP2-Komplex interagiert mit der zytoplasmatischen Domäne der Rezeptoren (Ahle et al., 1988; Robinson, 1992) und es kommt zu einer fortschreitenden Einstülpung der PM durch Umstrukturierung des Clathrin-Netzwerkes (Kirchhausen et al. 2000). Dynamin, eine 100 kDa große GTPase, legt sich wie eine Kette um den Hals der eingestülpten PM (Takei et al., 1995) und ermöglicht unter GTP Verbrauch das Abschnüren der Coated Pits und die Entstehung von Clathrin-Coated Vesikeln (Hinshaw und Schmid, 1995; Takei et al., 1995; Vallee und Okamoto, 1995).

Die Clathrin-Coated Vesikel müssen nun ihren Weg in das Zytosol durch das Zytoskelett finden. Für die Internalisation des Clathrin-Coated Vesikel sorgt das Calpain I, eine Cystein-abhängige Protease. Calpain I wird durch Annexin VI rekrutiert und ermöglicht durch kurzfristige Spaltung der β -Einheiten des tetrameren Spektrins den Durchtritt durch das aus Aktin und Spektrin bestehende Zytoskelett (Kamal et al., 1998).

Kurz nach Eintritt in die Zelle verlieren die Vesikel ihre Hülle durch das ATP-abhängige Chaperonprotein hsc 70 (uncoating enzyme) (Braell et al., 1984) und der Clathrinmantel kann wieder zu Triskelionen depolymerisieren (Rothman und Schmid, 1986). Die internalisierten Rezeptor-Liganden-Komplexe werden an endosomale Kompartimente übergeben, wo sie im saueren Milieu in ihre Bestandteile dissoziieren. Die Rezeptoren werden meist mit Hilfe von rezyklierenden Endosomen wieder zurück zur PM transportiert und dort erneut in den Zyklus der Rezeptor-vermittelten Endozytose eingeschleust. In einigen Fällen werden aber auch Rezeptor und Ligand in den Lysosomen abgebaut und es kommt somit zu einer Rezeptor-Herunterregelung. In anderen Fällen werden Rezeptor und Ligand zu einer anderen Domäne in der PM befördert, wo der Ligand schließlich durch Exozytose an einer Stelle der Zelloberfläche freigelassen wird, die sich von seinem Ursprungsort unterscheidet. Dieser Prozess, der u. a. in Epithelien oder Hepatozyten vorkommt, wird als Transzytose bezeichnet.

1.1.1.2 Endosomale Kompartimente

Der Transport von Liganden und Rezeptoren innerhalb der Zelle wird durch Endosomen vollzogen. Endosomen sind eine komplexe Gruppe uneinheitlicher, membranumhüllter Röhren und Vesikel. Sie werden aufgrund der intrazellulären Verteilung, der Morphologie, des pH-Wertes und bestimmter Markerproteine in Frühe und Späte Endosomen unterteilt (Barrett, 1972; Nelson, 1987). In Frühen Endosomen werden Sortierende- von Recycling-Endosomen unterschieden (Yamashiro und Maxfield, 1987):

Sortierende Endosomen sind peripher im Zytoplasma lokalisiert und stellen die erste Station für internalisierte Makromoleküle dar (Griffiths et al., 1989; Dunn et al., 1989). Es kommt zur Trennung der Moleküle, die für den Recycling- (z. B. Transferrin) oder Degradations- (z. B. LDL) Weg bestimmt sind.

Recycling Endosomen finden sich verstreut im Zytoplasma und bilden das Bindeglied zwischen Sortierenden Endosomen und der Membranoberfläche im Recyclingweg.

Späte Endosomen, aufgrund ihrer Vielzahl tubulovesikulärer Membranen auch Multivesicular Bodies (MVB) genannt, verteilen sich vor allem perinukleär. Sie gewährleisten durch ihren sauren pH-Wert von 5,0-5,5 optimale Voraussetzungen für die Degradation der internalisierten Moleküle durch lysosomale Enzyme (Murkherjee et al., 1997; Cavalli et al. 2001).

Der Transport von einem endosomalen Kompartiment zum anderen wird mit Hilfe von Endosomalen Carrier Vesikeln (ECV) bewerkstelligt (Gruenberg et al., 1995).

Frühe Endosomen sind die wichtigste Sortierstelle auf dem Endozytose-Transportweg. Sie besitzen die gleiche Funktion, die das trans-Golgi-Netzwerk für den biosynthetisch-sekretorischen Transportweg erfüllt.

Im sauren Milieu des Frühen Endosom verändern viele der aufgenommenen Rezeptorproteine ihre Konformation, lassen ihre Liganden frei und werden dem Abbau in Späten Endosomen und Lysosomen zugeführt. Andere Liganden bleiben jedoch an ihren Rezeptor gebunden und werden auf verschiedenen Transportwegen ihrem biologischen Verwendungszweck zugeführt:

1. Rezyklierende Rezeptoren:

a. Der LDL-Rezeptor dissoziiert im Sortierenden Endosom von seinem Liganden ab und gelangt erneut an die PM und wird dort wiederverwendet (Davis et al., 1987). Das freie LDL wird zur Degradation in die Lysosomen transportiert.

b. Transferrin-Rezeptoren transportieren das Transferrin mit gebundenem Eisen in Frühe Endosomen. Der niedrige pH im Endosom veranlasst das Transferrin das Eisen freizusetzen. Das Eisen-freie Protein selbst, das in diesem Zyklus als Apotransferrin bezeichnet wird, bleibt an den Rezeptor gebunden und wird im Komplex mit ihm wieder zur PM gebracht. Im neutralen pH der extrazellulären Flüssigkeit dissoziiert das Apotransferrin vom Rezeptor ab. Durch Bindung weiteren Eisens kann der Zyklus erneut beginnen. Das Transferrin pendelt also zwischen der extrazellulären Flüssigkeit und dem Endosom hin und her und liefert somit den Zellen das zum Wachstum notwendige Eisen, ohne selbst in die Lysosomen zu gelangen (Dautry-Varsat et al., 1983).

2. Einige Rezeptoren gelangen weiter in die Lysosomen und werden dort abgebaut:

a. Diesen Weg benutzt der Epidermale-Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor, EGF). Es handelt sich hierbei um ein kleines Protein, das Epidermis-Zellen und auch einige andere Zellen zur Teilung anregt. Rezeptoren für den EGF sammeln sich nur in den Coated Pits, wenn sie EGF gebunden haben. Sie werden auch nicht wiederverwertet, sondern gelangen schließlich in die Lysosomen, wo sie mit dem

aufgenommenen EGF abgebaut werden. Die EGF-Bindung hat eine Verminderung der Dichte der Rezeptoren an der Zelloberfläche zur Folge (Rezeptor-Herunterregulation). Die Konzentration der signalauslösenden Liganden reguliert dementsprechend die Zahl der zugehörigen Rezeptormoleküle auf der Oberfläche der Zelle (Dipaola et al., 1984).

3. Einige Rezeptoren können sich auch an eine andere Seite der PM begeben von der sie aufgenommen wurden, z. B. von basolateral nach apikal, um bei der Transzytose mitzuarbeiten.

a. Die Gallenproduktion in der Leber ist ein physiologisches Beispiel der Transzytose.

b. Als weiteres Beispiel sei genannt, dass Antikörper der Mutter z. B. bei Säugern mittels Transzytose vom Blut der Mutter in die Muttermilch übertragen werden und so für das Neugeborene zugänglich sind. Die endozytierten Moleküle gelangen wahrscheinlich über die Mikrotubuli, einem dynamisches Röhrenchensystem, von einem Kompartiment zum anderen. Der genaue Vorgang ist nicht geklärt.

An dieser Stelle seien noch Proteine erwähnt, die am Golgi-Apparat produziert werden und in den Lysosomen ihre Funktion entfalten. Diese Proteine tragen terminal eine Mannose-6-Phosphat(M6P)-Markierung und gelangen in Clathrin-bedeckten Transportvesikeln über die Endosomen in die Lysosomen. Die M6P-Gruppen werden von M6P-Rezeptorproteinen erkannt, die zu den Transmembranproteinen im trans-Golgi-Netz gehören. Diese Rezeptoren binden die Hydrolasen und helfen bei deren Verpackung in spezifische Vesikel. Diese spezifischen Vesikel lösen sich vom trans-Golgi-Netz ab und verschmelzen anschließend mit den Späten Endosomen, an die sie ihren Inhalt abgeben. Das M6P-Rezeptorprotein wird bei dem niedrigeren pH im Späten Endosom wieder freigesetzt und die Hydrolasen können mit dem Abbau des von Frühen Endosomen gelieferten endozytierten Material beginnen. In den entstehenden Lysosomen halten Protonenpumpen in der Lysosomenmembran den niedrigen pH von 5 durch Hydrolyse von ATP aufrecht, indem sie mit der dabei gewonnenen Energie H^+ -Ionen in das Lysosom transportieren. Die freigesetzten M6P-Rezeptoren werden wieder in Transportvesikel aufgenommen, die sich vom Späten Endosom abschnüren und zur erneuten Verwendung an die Membran des trans-Golgi-Netzes zurückkehren (Kornfeld und Mellman, 1989; Kornfeld, 1992).

1.1.1.3 Rezeptor-vermittelte Endozytose des LDL

Die meisten tierischen Zellen nehmen Cholesterin durch Rezeptor-vermittelte Endozytose auf (Anderson et al., 1977). Dadurch werden sie mit dem Hauptanteil des Cholesterins versorgt, den sie für die Synthese von Membranen benötigen. Das Cholesterin wird im Blut zum größten Teil durch Lipoproteinpartikel transportiert, die eine relativ niedrige Dichte aufweisen und daher Low Density Lipoprotein (LDL) genannt werden. Benötigt eine Zelle Cholesterin für ihre Membransynthese, produziert sie Transmembran-Rezeptormoleküle für LDL (Brown und Goldstein, 1986), die LDL binden und über Coated Vesikel in das Zellinnere befördern. Nach Entfernung der Clathrin-Hülle gelangt der Rezeptor-Ligand-Komplex in Frühe Endosomen, von wo aus er den Sortierenden Endosomen zugeführt wird. Dort dissoziiert das LDL von seinem Rezeptor ab, wird den Späten Endosomen zugeführt bis es letztendlich vollständig in den Lysosomen degradiert wird (Maxfield und Yamashiro, 1984). Intralysosomal erfolgt die Abspaltung des ApoB₁₀₀ durch lysosomale Proteasen. Cholesterinesteranteile werden durch die lysosomale saure Lipase zu freiem Cholesterin (FC) hydrolysiert, wonach das FC das Lysosom verlässt und zum Golgi-Apparat transportiert wird (Voorhees et al., 1995). Dort steht es der Synthese von neuen Membranen zur Verfügung. Die LDL-Rezeptoren werden über die Rezyklierenden Endosomen zur Zelloberfläche transportiert, von wo sie den Prozeß der Endozytose erneut durchlaufen können.

1.1.2 Exozytose

In diesem Kapitel soll der Transport von Molekülen vom Golgi-Netz zur Zelloberfläche beschrieben werden: die cis-Seite des Golgi-Komplexes empfängt Vesikel vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) und repräsentiert das aufnehmende Ende des Golgi-Komplexes. Die trans-Seite hingegen sendet andersartige Vesikel zu einer Vielzahl von Zielorten. Die Übertragung von einem Golgi-Kompartiment zu einem anderen innerhalb des Golgi-Komplexes erfolgt ebenfalls durch kleine Vesikel (Durchmesser ca. 50 nm). Die Lipiddoppelschicht dieser Vesikel ist von einer borstenartigen Hülle umgeben, die wie endozytierte Vesikel Clathrin enthält.

Im Rahmen der Vesikelbeförderung vom ER über das cis-Kompartiment zur trans-Seite werden alle weiteren für das jeweilige Glykoprotein typischen Saccharidreste zur Identifizierung angehängt.

Transportvesikel, die für die Plasmamembran bestimmt sind verlassen das trans-Golgi-Netz (TGN) in einem ständigen Fluss. Die in ihnen enthaltenen löslichen

Proteine werden an die Zellumgebung abgegeben und beförderte Membranproteine und -lipide werden als neue Bausteine für die PM der Zelle gebraucht. Auf diese Weise produzieren und sezernieren die Zellen die meisten Proteoglykane und Glykoproteine der extrazellulären Matrix. Dieser konstitutive Ausscheidungsweg ist für alle Zellen unentbehrlich.

Zellen, die auf Ausscheidung spezialisiert sind, besitzen außerdem noch einen weiteren gesteuerten Ausscheidungsweg über den ausgewählte Proteinmoleküle im TGN abgetrennt und in sekretorische Vesikel verpackt werden. Dort werden Proteine angereichert und gespeichert, bis ein extrazelluläres Signal ihre Ausscheidung in Gang setzt. Diesen gesteuerten Ausscheidungsweg findet man vor allem in Zellen, die auf die schnelle Abgabe von Produkten wie Hormonen, Verdauungsenzymen oder Neurotransmittern spezialisiert sind.

Proteine aus der Membran der sekretorischen Vesikel werden wieder in das Zellinnere zurückbefördert, wo sie erneut verwendet werden können, so dass sich die Verteilung der Membranbestandteile zwischen den einzelnen Komponenten im Fließgleichgewicht befindet. Als Beispiele seien hier der Transferrin-Rezeptor und Transportmoleküle genannt, die zwischen der PM und intrazellulären Strukturen hin und her wandern.

1.1.3 Molekulare Mechanismen der Endo- und Exozytose

Der Transport bestimmter Membranbestandteile von einem Kompartiment zum anderen wird durch den Einsatz freier Energie aufrechterhalten. Markierungen auf der dem Zytosol zugewandten Membranoberfläche dienen als Wegweiser für diese Vesikel, die so mit dem richtigen Kompartiment verschmelzen. Dabei spielen Coated Vesikel eine wichtige Rolle (Murkherjee et al., 1997).

Zwei Arten dieser Coated Vesikel sind bekannt: die Clathrin- und die Coatamer bedeckten Vesikel. Clathrin-bedeckte Vesikel vermitteln den Transport von Transmembranproteinen wie z. B. dem LDL-Rezeptor aus der PM, dem M6P-Rezeptor aus dem TGN und löslichen Molekülen, die an Rezeptoren gebunden haben. Sie sind an der Endozytose und dem Transport am Golgi-Apparat (GA) beteiligt und wurden bereits in Kapitel 1.1.1 beschrieben.

Coatamer-bedeckte Vesikel dagegen sind beim unspezifischen Transport aus dem ER und den Golgi-Zisternen aktiv (1.1.3.2).

Rab-Proteine (Pfeffer et al., 1994; Simons und Zerial et al., 1993) und SNAREs (SNAP Rezeptor) erfüllen ihre Aufgaben sowohl bei der Endo-, als auch Exozytose.

1.1.3.1 Steuerung des Vesikeltransportes bei der Endozytose

In der Zelle verfügen alle Transportvesikel über Oberflächenmarkierungen, wodurch zum einen ihre Herkunft, zum anderen ihr Zielort identifiziert werden kann.

Rab-Proteine, die zur Familie der monomeren GTPasen gehören, übernehmen die Aufgabe des Erkennens und Anheftens von Vesikeln an intrazelluläre Kompartimente (Zerial et al., 2001; Chavrier und Goud, 1999). Bei diesem Erkennungsschritt spielen SNAREs (Soluble NSF Attachment Protein Receptor; NSF: N-ethyl-maleimide-sensitive fusion protein), die als v-SNAREs auf der Vesikelmembran vorliegen und komplementär als t-SNARE auf der Zielmembran, eine elementare Rolle. Trifft nun das Vesikel mit seinem v-SNARE auf das passende t-SNARE der Zielmembran und wird diese Verbindung lang genug gehalten, kann das Rab-Protein sein gebundenes GTP hydrolysieren, wodurch die Fusion zwischen Vesikel und Membran erfolgen kann. Das inaktive Rab-GDP wird in das Zytosol an den Rab-GDP Dissoziations-Inhibitor (Rab-GDI) abgegeben und steht für einen erneuten Transport zur Verfügung (Ullrich et al., 1994).

In einer Zelle existieren verschiedene Typen von Rab-Proteinen. Jedes von ihnen ist mit einem membranbegrenzten Organell assoziiert, das bei der Endo- bzw. Exozytose beteiligt ist. Die Aminosäuresequenz des Schwanzes des Rab-Proteins bestimmt die intrazelluläre Lokalisation (Pfeffer, 1994; Zerial et al., 2001).

Nach Andockung des Vesikels an die Zielmembran, muss der Inhalt des Vesikel durch Membranverschmelzung entladen werden. Anlegen und Fusion sind zwei in ihrer Dynamik voneinander trennbare Prozesse. Für das Andocken reicht es aus, dass sich zwei Membranen so nahe kommen, dass die Proteine der Membran in Wechselwirkung treten und aneinander haften. Für eine erfolgreiche Fusion ist aber eine stärkere Annäherung erforderlich, die durch zytosolische Enzyme wie SNAPs und NSF katalysiert wird (NSF = N-Ethylmaleimid Sensitives Fusionsprotein; SNAP = Soluble NSF Attachment Protein) (Rothmann, 1986; Clary et al., 1990). An die SNAREs lagern sich die als SNAP bezeichnete Proteine an, die mit Hilfe einer ATPase NSF binden. Dieser Komplex katalysiert mit Hilfe von Acyl-CoA und weiteren Proteinen die Fusion der zwei Lipid-Doppelschichten (Wilson et al., 1992).

1.1.3.2 Steuerung des Vesikeltransportes bei der Exozytose

Im Gegensatz zu den Clathrin-bedeckten Vesikeln vermitteln die Coatamer-bedeckten Vesikel den nicht-selektiven Vesikeltransport des normalen

Ausscheidungsweges. Dazu gehört der Transport vom ER zum GA, von einer Golgi-Zisterne zur anderen und vom TGN zur PM.

Die Hülle dieser Vesikel bildet u. a. das Coatamer, ein großer Proteinkomplex, der sich aus sieben Hüllprotein-Untereinheiten, den sogenannten COPs (Coat-Protein Subunits) zusammensetzt (Kreis und Pepperkok, 1994). Im Gegensatz zu den Clathrin-Belägen setzen sich die Coatamer-Beschichtungen nicht selbständig zusammen, sondern benötigen ATP zu ihrer Bildung. Weiterhin zerfällt die Hülle nicht, wenn sie sich von der Membran abgeschnürt hat, sondern der Coatamer-Belag bleibt solange erhalten bis das Vesikel die Zielmembran erreicht.

Die Bildung und der Zerfall der Coatamer-Beschichtung ist von dem sogenannten ARF (ADP Ribosylationsfaktor), einem GTP-bindenden Protein abhängig (Serafini et al., 1991). Es handelt sich bei dem ARF um eine monomere GTPase mit einem Fettsäureschwanz, die man in hoher Konzentration in inaktivem Zustand (GDP) im Zytosol findet. Die Donatormembran, aus welcher das Coatamer-bedeckte Vesikel entspringt, enthält ein Guanin-Nucleotid-freisetzendes Protein, das bei ARF die Ablösung von GDP und die Bindung von GTP an dessen Stelle verursacht. Die Bindung von GTP führt bei ARF zum Ausstrecken des Fettsäureschwanzes, der sich in die Lipiddoppelschicht der Donatormembran einfügt. Das festgehaltene ARF bindet so Coatamer-Untereinheiten. Nach Zusammensetzung des Coatamer-Belages mit GTP beladenem ARF und Coatamer-Proteinen zieht sich die Membran zu einer Knospe zusammen und schnürt sich dann als Coated Vesikel ab (Aniento et al., 1996).

Wenn das mit Coatamer-bedeckte Vesikel an seiner Zielmembran angelangt ist, wird das gebundene GTP des ARF mit Hilfe eines in der Membran ortständigem, spezifischem GTPase-aktivierendem Enzym zu GDP und anorganischem Phosphat hydrolysiert. Durch die Konformationsänderung im ARF kann die Fettsäurekette aus der Membran heraustreten, was den Zerfall der Vesikelbeschichtung zur Folge hat und dadurch die Membranfusion vorbereitet. (Murkherjee et al., 1997)

Der letzte Schritt auf diesem durch Steuersignale bestimmten Ausscheidungsweg ist die auf einen Reiz hin erfolgende Freisetzung des Produktes durch Exozytose. Das Signal zur Sekretion ist häufig ein chemischer Botenstoff, z. B. ein Hormon, der an Rezeptoren der Zelloberfläche bindet. Die daraus folgende Aktivierung der Rezeptoren erzeugt intrazelluläre Signale, was häufig mit einem vorübergehenden Anstieg der intrazellulären Konzentration von freiem Ca^{2+} einhergehen kann. Der plötzliche Ca^{2+} -Fluß oder ähnliche intrazelluläre Signale in der sekretorischen Zelle

lösen über einen noch unbekanntem Mechanismus die Exozytose aus. Sekretorische Vesikel verschmelzen dann mit der PM und geben ihre Inhaltstoffe an den extrazellulären Raum ab.

1.2 Lipoproteine

1.2.1 Metabolismus der Lipoproteine

Lipide stellen nicht nur die wichtigsten Energieträger des menschlichen Organismus dar, sie sind auch fundamentale Bestandteile zellulärer Membranen, sowie einiger Hormone und Vitamine. Nach Verdauung und Resorption im Gastrointestinaltrakt werden Nahrungslipide über den Blutkreislauf und das Lymphsystem in die unterschiedlichen Gewebe transportiert. Aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften geschieht dies in Form von Lipoproteinen.

1.2.2 Einteilung der Lipoproteine

Die im Plasma vorkommenden Lipoproteine sind sphärische Gebilde, die sich zu unterschiedlichen Anteilen aus Protein (auch Apolipoprotein genannt) und Lipiden zusammensetzen. Geometrisch gesprochen umschließt eine hydrophile Hülle einen hydrophoben Kern; die Hülle besteht aus Phospholipiden (PL), freiem Cholesterin und Apolipoprotein; der Kern enthält vor allem Triglyceride und Cholesterinester (CE). 5 bekannte Lipoproteinklassen unterscheiden sich in Größe, Dichte, Zusammensetzung und elektrischer Ladung (Gotto et al., 1986) (Tabelle 1).

	Durchmesser (nm)	Dichte (g/ml)	Lipid/Protein-Verhältnis	Apolipoproteine	Elektrophoretische Mobilität
Chylomikronen	75-1200	<0,96	98/2	AI, AII, AIV, B48	Start
VLDL	30-80	0,96-1,006	90/10	C, E, B100	prä-β
IDL	25-35	1,006-1,019	83/17	B100, E	β
LDL	18-25	1,019-1,063	78/22	B100, E	β
HDL	5-12	1,063-1,21	50/50	AI, AII, AIV, C, E	α

Tabelle 1: Lipoproteinklassifizierung (modifiziert nach Dörner, 1998)

VLDL=Very Low Density Lipoprotein, IDL=Intermediate Density Lipoprotein, LDL=Low Density Lipoprotein, HDL=High Density Lipoprotein

Die Vielzahl der Apolipoproteine verdeutlicht die komplexe Dynamik des Lipoproteinstoffwechsel. Sie fungieren nicht nur als Transportvehikel für die Lipide,

sondern auch als Co-Faktoren von Enzymen und als Bindungspartner für Zelloberflächenrezeptoren.

1.2.3 HDL

1.2.3.1 HDL-Klassen

HDL kann im Plasma in verschiedene Subpopulationen nach Kriterien wie Größe, Dichte, elektrophoretischer Mobilität, Lipid- oder auch Apolipoproteinzusammensetzung eingeteilt werden.

Die Gelelektrophorese unterteilt die HDL-Fraktionen in fünf unterschiedliche Klassen, wobei die alpha-Fraktion die größte Menge ausmacht und pre-β-HDLs, eine kleine, lipidarme Gruppe repräsentiert, die aber als initialer Akzeptor von Zellmembrancholesterin gilt.

Nach Lipoproteinzusammensetzung werden drei Subpopulationen unterschieden:

A-I HDL, die ApoA-I, jedoch nicht Apo A-II enthalten; dann die A-I/A-II HDL, die Apo A-I und Apo A-II enthalten und zuletzt die kleine Gruppe der A-II HDL, die nur Apo A-II besitzen.

1.2.3.2 HDL-Metabolismus

Die zunächst lipidarmen HDL-Vorläufer (diskoidale HDL) werden durch Hepatozyten und Mukosazellen des Darmes (Danielsen et al., 1993) produziert. Sie enthalten bevorzugt das Apolipoprotein A, PL und CE (Musliner et al., 1991). Diese Vorläufer sind in der Lage PL und unverestertes Cholesterin von hepatischen und nicht-hepatischen Zellen aufzunehmen (Oram et al., 1997), wobei diese Aufnahme sowohl extra-, als auch intrazellulär stattzufinden scheint. Für eine extrazelluläre Neuzusammensetzung des HDL-Partikels spricht, dass lipidfreie Apolipoproteine den Efflux von PL und Cholesterin induzieren (Forte et al., 1993). Bei der intrazellulären Zusammensetzung werden lipidfreie Apolipoproteine, HDL und Chylomikronen-Remnants zunächst internalisiert und nach Lipidaufnahme wahrscheinlich als lipidreiche Apolipoproteine resekretiert (Heeren et al., 1999; Takahashi et al., 1999).

Nach der Aufnahme von unverestertem Cholesterin, Apo-B-haltigen Lipoproteinen oder PL reifen die HDL-Vorläufer (HDL₁) durch die Wirkung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) [Cholesterin + Phosphatidylcholin ↔ Cholesterinester + Lysophosphatidylcholin] (Miida et al., 1992) zu sphärischen, lipidreichen HDL₃ (alpha-LpA-I). Durch weitere Veresterung mittels LCAT und Fusion von HDL₃ untereinander,

kommt es zur Bildung der größeren HDL₂-Partikel (Dieplinger et al., 1985; Lusa et al., 1996).

Die Lipide der alpha-HDL verlassen das Plasma indem sie selektiv über den Scavenger Rezeptor BI (SR-BI) (Husten et al., 1997) oder über ApoE- oder ApoA-I-Rezeptoren als komplette Partikel in die Leber aufgenommen werden.

Cholesterin aus extrahepatischen Geweben wird ebenfalls auf beschriebenen Wege über das Plasma zurück zur Leber transportiert, wo es entweder zur Synthese anderer Substanzen wie Steroidhormonen oder Vitamin D benötigt wird (Stein et al., 1999; Genest et al., 1999) oder es wird in Form von Gallensäuren in den Darm ausgeschieden. Durch den Abtransport von überflüssigem Cholesterin aus dem Blut und extrahepatischen Gewebe zurück zur Leber und anderen Geweben wird die antiatherogene Rolle von HDL deutlich.

1.2.4 LDL-Metabolismus

Cholesterin und Cholesterinester werden mittels LDL zu extrahepatischen Geweben transportiert, wo sie meist als Membranbaustein Verwendung finden. Die Cholesterinbiosynthese der extrahepatischen Gewebe wird durch die Anwesenheit des Plasma-LDL reguliert.

LDL ist ein runder Partikel mit einem Durchmesser von ca. 22 nm, der etwa 1500 Cholesterinestermoleküle enthält, die von Phospholipid- und nicht-veresterten Cholesterinmolekülen umgeben sind. Das aus der Oberfläche ragende Apo B₁₀₀ ermöglicht die Bindung an den transmembranären LDL-Rezeptor der Zielzelle, wodurch die Endozytose des LDL ausgelöst wird. Der Rezeptor-Ligand-Komplex wird durch einen Clathrin-Coated Vesikel internalisiert und an Sortierende Endosomen übergeben. Hier kommt es durch den niedrigen pH-Wert zur Dissoziation des LDL-Rezeptors vom LDL. Der Rezeptor gelangt in die tubulären Ausläufer, die sich von den Sortierenden Endosomen abtrennen und sogenannte rezyklierende Endosomen bilden. Über diese Endosomenfraktion gelangt der Rezeptor zurück zur Membranoberfläche, wo er für die erneute Bindung des Lipoproteins zur Verfügung stehen kann. Der Rezeptor durchläuft alle 10 Minuten einen solchen Zyklus. Der LDL-Partikel akkumuliert als Teil der löslichen Fraktion im vakuolären Abschnitt der Sortierenden Endosomen und gelangt über die endozytotischen Carriervesikel in die Späten Endosomen. Die Vesikel bewegen sich entlang der Mikrotubuli in die perinukleäre Region der Zelle (Gruenberg et al., 1989), wo schließlich die Fusion der

Späten Endosomen mit den Lysosomen erfolgt und die sekundären Lysosomen entstehen.

Das Apolipoprotein B₁₀₀ wird bei der Degradation durch lysosomale Proteasen gespalten und CE durch eine lysosomale saure Lipase zu FC und Fettsäuren (FS) hydrolysiert. Das freie Cholesterin verlässt das Lysosom und wird zum ER transportiert. Die Gegenwart von Cholesterin am ER reduziert die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase und unterdrückt somit die Geschwindigkeit der zelleigenen Cholesterinbiosynthese.

Im ER wird Cholesterin durch die ACAT verestert, um die Zellen vor zytotoxischen Wirkungen des unveresterten Cholesterins zu schützen (Fielding et al., 1997). Die durch die ACAT gebildeten CE werden in Form von Lipidtropfen im Zytoplasma gespeichert und können durch die Neutrale Cholesterinesterhydrolase (NCEH) über den cAMP-abhängigen Proteinkinaseweg A wieder hydrolysiert werden. Dieser Zyklus der Cholesterin- und Cholesterinesterbildung kann durch die Gegenwart von extrazellulären Akzeptoren wie dem HDL durchbrochen werden (von Eckardstein, 1996).

Die Zelle reguliert die Cholesterinaufnahme durch Hemmung der Synthese neuer LDL-Rezeptoren und vermindert somit die überschüssige Cholesterinaufnahme.

Nicht-hepatische Zellen wie die Endothelzellen sind nicht fähig überschüssiges Cholesterin abzubauen. Die Aufnahme von Lipoproteinen besonders durch Makrophagen in den Gefäßwänden spielt eine große Rolle in der Entstehung von Atherosklerose. Makrophagen können im Gegensatz zu anderen Zellen die Aufnahme von Lipoproteinen (besonders über Scavenger Rezeptoren des A-Typs) und Zelltrümmern nicht regulieren. Sie akkumulieren Lipide immer weiter bis sie schließlich zu Schaumzellen werden, die sich später in atherosklerotische Plaques umwandeln. Toxischen Wirkungen einer Akkumulation werden anderweitig versucht zu verhindern: das aus der Leber stammende HDL bewerkstelligt den Rücktransport von Cholesterin zur Leber. Dort wird es zur Bildung von Gallensäuren benutzt und dadurch eliminiert.

1.2.5. Intrazelluläre Verteilung von Cholesterin

Clathrinhaltige Invaginationen der Plasmamembran, in denen sich Lipoproteinrezeptoren befinden und aus denen sich die Coated Pits formen, besitzen weniger Cholesterin und Sphingolipide als andere Teile der Zellmembran. Caveolae hingegen, die sich durch die Gegenwart von Caveolin, aber der gleichzeitigen

Abwesenheit von Clathrin auszeichnen, besitzen reichlich Cholesterin und Sphingolipide.

Relativ geringe Mengen an unverestertem Cholesterin werden in fast allen Zellorganellen gefunden, mit Ausnahme derer, die mit der PM in Verbindung stehen wie die Endosomen, Lysosomen und das TGN (Fielding et al., 1997).

Das TGN dient als Akzeptor von neusynthetisiertem Cholesterin vom ER und von exogenem Cholesterin aus endozytierten Vesikeln, Lysosomen und Caveolae (Bretscher et al., 1993). Es verteilt Cholesterin und PL in Form von detergentresistenten, caveolinhaltigen Vesikeln (Lipid Rafts) oder als detergentlösliche, sekretorische Vesikel.

1.2.5.1 Cholesterinefflux

Gesunde Zellen können ca. 0,1% ihres totalen Cholesterins pro Minute aus der Zelle befördern. Es wird von den Zellen sowohl unspezifisch und passiv, als auch spezifisch und aktiv abgegeben (Oram et al., 1997; von Eckardstein et al., 1996; Rothblat et al., 1999).

Proteinfreie Phospholipidvesikel, synthetische Cyclodextrine, Albumin und HDL vermitteln einen langsamen und ungesättigten Cholesterinefflux in allen Zelltypen (Rothblat et al., 1999; Zhao et al., 1996). Diese Art des Transportes basiert auf Diffusion und benötigt keine spezifische Interaktion mit Rezeptoren der Zelloberfläche oder aktive zelluläre Transportmechanismen. Bei einer niedrigen Konzentration von Akzeptorpartikeln wird die Diffusionsrate sowohl von Konzentration des Akzeptors, als auch von der Rate der Desorption der PM, bestimmt. Bei hohen Akzeptorkonzentration wird die Diffusion jedoch nur von der Desorption der PM bestimmt (Rothblat et al., 1992). Diese Form des Effluxes kann die Zelle aber nur zu einem geringen Teil von den intrazellulär gespeicherten Cholesterinen befreien. Nach der Übertragung von Cholesterin auf HDL kommt es zur Veresterung von Cholesterin durch die LCAT, was die Rediffusion von Cholesterin vom HDL zurück zur PM verhindert und somit die Cholesterineffluxrate erhöht (Czarnecka et al., 1995).

Die Bindung von HDL an den in Caveolae lokalisierten SR-BI ermöglicht eine Zunahme des HDL-vermittelten Effluxes (Ji et al., 1997). Es scheint, dass diese Bindung den bidirektionalen Flux durch Reorganisation der Lipide der cholesterin- und caveolaereichen Domänen innerhalb der Membran ermöglicht (de la Llera-Moya et al., 1999).

Der spezifische und aktive ABC-AI-vermittelte (ATP-Binding Cassette Transporter A Type I) Cholesterinefflux auf lipidfreie Apolipoproteine oder lipidarme Partikel ist der initiale Schritt beim reversen Cholesterintransport und geht schnell vonstatten. Er sorgt für eine Translokation von Cholesterin und PL von intrazellulären Kompartimenten zur PM (von Eckardstein, 1996) mit anschließender Bildung von PL/Apo-AI-Komplexen. Erst diese Komplexe scheinen den Cholesterinefflux in Gang zu setzen. Zwar bindet der ABC-AI-Transporter Cholesterin nicht direkt, aber die gebildeten PL/Apo-AI-Komplexe regulieren den Cholesterinefflux (Wang et al., 2001). Der ABC-AI-abhängige Cholesterinefflux beinhaltet eventuell auch die Internalisation von HDL und reguliert damit auf einem zweiten Weg den Cholesterinefflux. Der genaue Mechanismus ist aber noch nicht genau aufgeklärt.

Wichtige Funktion übernimmt der ABC-AI-Transporter nicht nur beim Cholesterinefflux vom TGN zur PM, sondern auch beim direkten Weg von Endosomen bzw. Lysosomen zur PM (Neufeld et al., 2001; Chen et al., 2001). Diese Transportwege sind bei Patienten mit der Tangier Krankheit und in ABC-AI Knock-Out Mäusen defekt (Orso et al., 2000).

1.2.6 Pathobiochemie

1.2.6.1 Wolman Krankheit

Es handelt sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung bei der ein Defekt in der lysosomalen sauren Lipase bzw. Cholesterinester Hydrolase vorliegt. Diese Enzyme katalysieren die Hydrolyse von Cholesterinestern und Triglyceriden in endozytierten Lipoproteinpartikeln. Der Enzymdefekt hat die Zunahme von Cholesterin im Zytoplasma zur Folge und somit drei wichtige Effekte auf den Zellstoffwechsel. Erstens wird das Schlüsselenzym der intrazellulären Cholesterinsynthese, die HMG-CoA-Reduktase vermindert produziert. Zweitens wird die Synthese des LDL-Rezeptors verringert, was zu einem verminderten „Influx“ von Apo-B- und Apo-E-enthaltenen Lipoproteinen führt. Drittens wird die Aktivität der ACAT vermindert, die normalerweise die intrazelluläre Formierung von Cholesterinestern katalysiert. Folge ist eine Akkumulation von Cholesterin und CE in den Lysosomen der meisten Zellen. Bisher sind 7 verschiedene Mutationen im kodierenden Abschnitt auf Chromosom 10 gefunden worden, die ursächlich für die Wolman Erkrankung sind. (Lohse et al., 1999)

1.2.6.2 CESD (Cholesteryl Ester Storage Disease)

Bei dieser Erkrankung wird die lysosomale saure Lipase bzw. Cholesterinester Hydrolase nicht defekt synthetisiert wie bei der Wolman Krankheit, sondern nur in geringerem Maße. Die Produktion ist aber insofern ausreichend, dass die Patienten das Erwachsenenalter erreichen. (Lohse et al., 1999)

1.2.6.3 Nieman-Pick-Krankheit

Es handelt sich um eine Sphingomyelinlipidose, die autosomal-rezessiv vererbt wird. Der kodierende Genabschnitt liegt auf Chromosom 18. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine vermehrte Akkumulation von unverestertem Cholesterin. Damit ist der Transport von Cholesterin, das über die LDL aufgenommen wurde, aus dem Zellinneren zum ER oder zur PM nicht mehr möglich (Neufeld et al., 1996). Stattdessen akkumuliert es in den Späten Endosomen (Neufeld et al., 1999; Kobayashi et al., 1999). Nieman Pick C-Protein (NPC) ist demzufolge in die Sortierung von Cholesterin von intrazellulären Kompartimenten zur PM oder zum ER involviert. Interessant ist außerdem, dass die Cav-1-Level in NPC1-Zellen zunehmen (Garver et al., 1997), was die Vermutung nahe legt, dass NPC1 ein indirekt regulatorischer Faktor bezüglich der Cav-1 Expression ist.

1.2.6.4 Tangier-Erkrankung

Die Tangier Erkrankung zeichnet sich bei den Patienten durch koronare Herzkrankheit und klinische Zeichen wie orangefarbene Tonsillen, als Zeichen der Cholesterinablagerung, aus. Diese rezessiv vererbte Erkrankung ist durch eine Reduktion des Cholesterineffluxes aus den Zellen charakterisiert, da ein Gendefekt im ABC-Transporter vorliegt. Es sind verschiedenste Mutation in dem auf Chromosom 9 liegenden kodierenden Abschnitt bekannt.

Der ABC-Transporter besteht aus zwölf Transmembrandomänen und zwei zytoplasmatischen Domänen, die für die Energie beim Ligandentransfer sorgen. Der Transporter wird im Zytoplasma peripherer Zellen synthetisiert und zur Plasmamembran befördert. Hier bewegt er normalerweise freies Cholesterin und PL zwischen dem inneren und äußeren Blatt der Membran. An der Außenseite wird das Cholesterin dann von Apo-AI aufgenommen und für die Bildung von HDL benutzt. Bei Patienten mit der Tangier Krankheit misslingt die Formation von HDL aufgrund des Transporterdefektes. Folge ist eine niedrige HDL-Plasmakonzentration. Die immer

wieder neusynthetisierten lipidarmen HDLs werden aber rasch aus dem Blut über die Niere entfernt (Horowitz et al., 1993).

Ob Cholesterin und PL die einzigen Liganden des ABC-Transporters sind, ist bis jetzt nicht eindeutig geklärt.

1.2.6.5 Hyperlipoproteinämie Typ II (familiäre Hypercholesterinämie)

Die autosomal-dominant vererbte Erkrankung geht mit einer Erhöhung der LDL-Fraktion einher. Die Triacylglycerinkonzentration kann normal (Typ IIa) bzw. leicht erhöht (Typ IIb) sein.

Die Ursache liegt in einem Funktionsdefekt des LDL-Rezeptors. Am häufigsten findet sich ein Rezeptormangel (ca. 50% der Fälle). In anderen Fällen wird der Rezeptor zwar synthetisiert, aber posttranslational nicht korrekt prozessiert und glykosyliert, so dass er nicht in die Membran eingebaut werden kann. Gelegentlich fanden sich Defekte der LDL-Bindungsstellen des Rezeptors oder infolge von Mutationen am C-terminalen Ende eine Störung der Assoziation mit Clathrin und der Bildung der für die Internalisation des Rezeptor wichtigen Coated Pits. Alle genannten Defekte führen zu einer Hemmung der LDL-Aufnahme und führen zu einer Erhöhung des Serumcholesterins. Auf der anderen Seite fällt die Hemmung der zellulären Cholesterinbiosynthese der extrahepatischen Gewebe durch LDL-Aufnahme weg, so dass es zur überschüssigen Cholesterinbiosynthese kommt. Dies erhöht die Serumcholesterinkonzentration und damit das Arterioskleroserisiko weiter.

1.3 Annexine

1.3.1 Familie der Annexine

Die Annexine stellen eine Familie von Proteinen dar, die neben den schon beschriebenen Proteinen ebenfalls an der Rezeptor-vermittelten Endozytose und an der Regulation des endosomalen Membrantransportes beteiligt ist. Annexine sind zum einen durch ihre hochkonservierte Aminosäuresequenz und zum anderen durch ihre Ca^{2+} -abhängige Bindung an vorzugsweise negativ geladenem Phospholipiden gekennzeichnet, wobei aber ihr molekularer Wirkungsmechanismus noch weitgehend ungeklärt ist.

1.3.1.1 Aufbau der Annexine

Derzeit sind mehr als 10 Mitglieder der Annexinfamilie bekannt. Sie bestehen aus einem Annexinkern und einer kurzen, variablen N-terminalen Domäne. Der

Annexinkern besteht aus vier sich wiederholenden homologen Segmenten (Annexin-Repeats), die jeweils 70-80 Aminosäuren lang sind (Glennay et al., 1985; Weber et al., 1986; Smith und Moss 1994) und durch 5 α -Helices (A-E) miteinander verbunden sind (Liemann und Huber, 1997). Zwischen den Helices liegen Ca^{2+} -Bindungsstellen, die die Bindung an negativ geladene PL ermöglicht und damit der Membranbindung dienen. Die funktionelle Spezifität der einzelnen Annexine wird vermutlich durch die unterschiedlichen N-terminalen Domänen hervorgerufen, die den Annexinkernen vorausgehen. Die Sequenzen besitzen eine Länge von 11-21 Aminosäuren, sind hoch variabel und die räumliche Anordnung bis auf einige Ausnahmen noch unbekannt. U. a. werden die N-terminalen Domänen für eine intramolekulare Beeinflussung des Kerns verantwortlich gemacht, wodurch die Ca^{2+} - und Phospholipidbindungsfähigkeit des Moleküls beeinflusst werden kann (Powell et al., 1987; Ando et al., 1989). Zum Teil tragen sie potentielle Phosphorylierungsstellen für signaltransduzierende Proteinkinasen, was zu einer reduzierten Affinität zu PL nach N-terminaler Phosphorylierung führt (Raynal et al., 1994).

Die überwiegende Zahl der bis jetzt an verschiedenen Annexinen gefundenen Proteinbindungsstellen lokalisieren sich ebenfalls am N-Terminus.

1.3.1.2 Vorkommen der Annexine

Das Vorkommen von Annexinen ist für eine große Anzahl von Organismen wie Insekten, Nematoden und Pflanzen beschrieben. Einige Mitglieder der Familie, wie die Annexine I, II und VI, werden in sehr vielen Zelltypen angetroffen, andere hingegen, dazu gehören die Annexine VIII und XIII, beschränken sich auf nur sehr wenige.

Alle Annexine wurden bei Lokalisationsstudien mit zellulären Membranen assoziiert. Sie kommen in mehreren Kompartimenten einer Zelle vor und passen den Grad ihrer Expression dem Aktivitätszustand der Zelle an (Gerke und Moss, 1997).

Die Annexine I-VII, XIII fand man an Plasmamembranen, die Annexine I, II und VI in Frühen Endosomen, die Annexine I und VI in Späten Endosomen und außerdem die Annexine II und VI in Caveolae (Gerke et al., 1997).

1.3.1.3 Funktion der Annexine

Eine zentrale Eigenschaft der Annexine ist die Fähigkeit zur Ca^{2+} -abhängigen Bindung negativ geladener Membranphospholipide wie Phosphatidsäure, Phosphatidylserin oder Phosphatidylinositol (Raynal et al., 1994). Sie spielen eine

Rolle bei der Membranorganisation, dem Membrantransport, der Interaktion von aufgenommenen Vesikeln mit dem Zytoskelett, bei der Endozytose selbst und bei der Formation von Lipid Rafts (Gerke und Moss, 1997; Watanabe et al., 1994, König und Gerke, 2000).

Die Vermutung, dass Annexine im endo- und exozytotischen Membranverkehr eine Rolle spielen, basieren auf mehreren Beobachtungen. Die Lokalisation vieler Annexine und die Fähigkeiten zur Bindung an Membranphospholipide und zur Aggregation von Membranen, legen eine Rolle im Andockungs- und Fusionsprozess von endo- und exozytotischen Vesikeln nahe. Annexin I wird beispielsweise durch den EGF-R in MVB beim endosomalen Transport phosphoryliert (Futter et al, 1994) und Annexin II ist an der Fusion von endosomalen Vesikeln beteiligt (Emans et al., 1993; Harder und Gerke, 1993). Dazu passt auch, dass einige Annexine mit Bestandteilen des Zytoskelett (Aktin und Spektrin) interagieren (Gerke und Moss, 1997; Watanabe et al., 1994) und dadurch u. a. bei der Ablösung von membrangebundenem Cholesterin eine Rolle spielen (Harder et al., 1997).

1.3.2 Annexin VI

Annexin VI wurde 1984 erstmals aus einer Plasmamembranpräparation menschlicher Lymphozyten isoliert (Owens et al., 1984). Die Annexin-Familie war noch nicht bekannt, weswegen das Protein damals und in den darauffolgenden Jahren unter verschiedenen Namen, wie z. B. Calelectrin (Südhof et al., 1988) oder p68 (Moss et al., 1990) in der Literatur auftauchte. Erst mit der Entdeckung weiterer Proteine ähnlicher Struktur und Sequenz wurde klar, dass es sich um eine Genfamilie handelt, in die das Annexin VI einzuordnen ist.

Humanes Annexin VI besitzt ein Molekulargewicht von 68 kDa und besteht aus insgesamt 674 Aminosäuren. Im Gegensatz zu den meisten anderen Annexinen setzt es sich aus 2 Annexinkernen und dementsprechend 8 Annexinwiederholungen zusammen. Die beiden Kerne werden durch ein Verbindungssegment mit einer Länge von 49 Aminosäuren verbunden, während die Abschnitte zwischen den Annexinwiederholungen von variabler Länge sind. Der ersten Wiederholung geht eine N-terminale Sequenz von 24 Aminosäuren voraus (Südhof et al, 1988). Wegen der auffälligen Sequenzhomologie zwischen den beiden Annexinkernen wird angenommen, dass das Annexin VI durch Genduplikation aus einem Vorläuferprotein mit 4 Wiederholungssegmenten entstanden ist (Smith et al., 1994).

Das oftmals beobachtete Auftauchen einer Doppelbande im SDS-PAGE führte zur Entdeckung zweier Isoformen des Annexin VI. Die cDNAs unterscheiden sich durch ein 18 Nukleotide umfassendes Insert, das für 6 Aminosäuren am Beginn der 7. Wiederholungsdomäne codiert. Geringe biochemische Differenzen (Moss et al., 1990; Kaetzel et al., 1994) machen es möglich, dass die beiden Isoformen auch unterschiedliche Funktionen besitzen (Fleet et al., 1999).

1.3.2.1 Zelluläre Lokalisation und Gewebeverteilung

Annexin VI konnte bis jetzt in fast allen Zelltypen nachgewiesen werden. Die Liste umfaßt u.a. hämatopoetische Zellen, Hepatozyten, Muskelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen (Owens et al., 1984; Weinman et al., 1994; Hazarika et al., 1991). Allein in Erythrozyten von Säugetieren (Clark et al., 1991) scheint das Protein nicht exprimiert zu werden.

Ebenso breit gefächert ist offensichtlich die intrazelluläre Verteilung des Annexin VI. Es wurde auffallend häufig an der PM lokalisiert gefunden (Owens et al., 1984; Tagoe et al., 1994), in Caveolae (Babiychuck et al., 2000), Lipid Rafts (Orito et al., 2001), in Vesikeln des endosomalen Kompartiments (Jäckle et al., 1994; Ortega et al., 1998) und in Phagosomen von J774 Makrophagen (Desjardins et al., 1994), was auf eine wichtige Rolle bei der Endozytose weist. Außerdem konnten Annexin VI in Leberzellmitochondrien (Rainteau et al., 1995), dem Sarkoplasmatisches Retikulum von quergestreiften Muskelzellen (Hazarika et al., 1991) und dem ER (Hazarika et al., 1991) identifiziert werden, was auf vielfältige Funktionen im Membranverkehr hindeutet.

1.3.2.2 Funktionen und assoziierte Proteine

Die Identifikation einiger Proteine, die mit Annexin VI interagieren, gaben Anlass, Annexin VI Funktionen in unterschiedlichen biologischen Prozessen zuzuordnen. Dazu gehören Aufgaben innerhalb der Signaltransduktion, bei der Modulation von Ionenkanälen, im Membranverkehr, bei der Verknüpfung des Zytoskeletts mit Membranen und antiinflammatorische Eigenschaften,.

Die Interaktion mit mehreren Proteinen, die definierte Funktionen innerhalb der zellulären Signaltransduktion besitzen, machen es möglich, daß das Annexin VI selbst Aufgaben innerhalb dieser biologischen Prozesse übernimmt. U. a. wurden Assoziationen mit der Proteinkinase C (Schmitz-Pfeiffer et al., 1998), dem Ras-spezifischen GTPase-aktivierenden Protein P120^{GAP} (Davis et al., 1996) sowie einer

56 kDa-großen Proteinkinase in aktivierten Jurkatzellen (Dubois et al., 1995) nachgewiesen.

Die weitaus meisten Bemühungen in der Annexin VI-Forschung konzentrieren sich auf potentielle Aufgaben von Annexinen innerhalb des intrazellulären Membranverkehrs und der Verknüpfung von Membranen mit dem Zytoskelett. Zum einen wurden Elemente des Zytoskeletts oder damit assoziierte Proteine als Bindungspartner identifiziert, zum anderen ergaben viele Lokalisationsstudien, dass sich der bevorzugte Aufenthaltsort des Proteins an der Zellmembran oder intrazellulären Membransystemen befindet. In den letzten Jahren wurde deswegen verstärkt nach Funktionen vor allem innerhalb endozytischer Prozesse gesucht.

Bei *in vitro* Versuchen an isolierten Plasmamembranen konnte gezeigt werden, daß in von Annexin VI-befreitem Zytosol keine Abknospung von Coated Pits mehr stattfand. Die Zugabe von Annexin VI zum Annexin VI-befreiten Zytosol führte wieder zu voller Aktivitätswiederherstellung (Lin et al., 1992).

Als mögliche Interaktionspartner bei derartigen Vorgängen kommen Moleküle in Frage, welche bei physikalischen Veränderungen während des Abknospungsprozesses vermitteln. Spektrin und Aktin stellen in diesem Zusammenhang die beiden wichtigsten Zytoskelettelemente dar, die bis jetzt als Bindungspartner des Annexin VI identifiziert worden sind (Watanabe et al., 1994; Hosaya et al., 1992). Außerdem co-immunpräzipitierte Annexin VI bei Charakterisierungsstudien von Clathrinvesikeln auch mit Dynamin, welches für den letzten Schritt der Vesikelabtrennung von der PM zuständig ist (Turpin et al., 1997). Neben Annexin VI ist das Annexin II an der Fusion von Membranen beteiligt, indem es durch Verknüpfung von endosomalen Membranen mit dem Zytoskelett die Lokalisation von Frühen Endosomen sicherstellt (Harder et al., 1997). Außerdem stabilisiert Annexin II mit Annexin VI die Verbindung zwischen Lipid Rafts und Aktin (Harder et al., 1997).

Über diese Forschung hinaus gibt es Interpretationen, die dem Annexin VI sogar Steuerungsfunktionen innerhalb des endozytischen Membranverkehrs zuweisen. In einer Studie wurde die Bedeutung der Bindung des Annexin VI an Spektrin für das Abknospen der Coated Pits von der PM erkannt. Bei der Blockade dieser Interaktion trat eine offensichtlich neue Population von Endosomen auf, die auf ihrem intrazellulären Weg vermutlich fehlgeleitet wurde. Das mit diesen Endosomen transportierte LDL wurde nachweislich nicht mehr der Degradation zugeführt. Daraus wurde geschlossen, dass durch das Abknospen ohne das Annexin VI den

Endosomen eine wichtige Information für die Wechselwirkung mit den intrazellulären Zytoskelettstraßen fehlt (Kamal et al., 1998).

In Annexin VI überexprimierenden Zellen wurde zwar keine Änderung der Endozytose und Degradation von aufgenommenen LDL festgestellt, aber die Co-Expression von Annexin VI und dem LDL-Rezeptor zeigt eine Zunahme der LDL-Aufnahme und der begleitenden Zunahme der LDL-Degradation. Es wird vermutet, dass das Annexin VI nach Stimulation der Endozytose an der Zelloberfläche in endozytotischen Vesikeln verbleibt und den Eintritt von Liganden in prälysosomale Kompartimente reguliert (Grewal et al., 1999).

1.3.3 Annexine und Endozytose

Die Erkenntnis, dass Annexine Aufgaben im Rahmen von Endozytoseprozessen übernehmen, zeichnete sich schon seit einigen Jahren ab. Schon 1992 fanden Lin und Mitarbeiter heraus, dass es Zellen, denen das Annexin VI entzogen wurde, nicht mehr möglich ist, die Coated Pit-Bildung aus Plasmamembranarealen durchzuführen. Weitere Publikationen berücksichtigend lässt sich festhalten, dass auch die Annexin I, II und IV in verschiedenste Schritte des Endozytoseweges involviert sind (siehe u. a. Kapitel 1.3.2.2): dazu gehört die subzelluläre Verteilung von Frühen Endosomen (Harder et al., 1993), die Formation von Frühen Endosomen (Emans et al., 1993), die Formierung von multivesikulären Körpern (Futter et al., 1993) und auch der Rezyklierung von Endosomen (Jäckle et al., 1994).

1.3.4 Annexine und Exozytose

Studien bezüglich der Beteiligung von Annexinen bei Exozytosevorgängen haben sich hauptsächlich auf Annexin II konzentriert. Das Annexin II bedarf nur einer sehr niedrigen Ca^{2+} -Konzentration, um an Phospholipidvesikel zu binden und beeinflusst auf diesem Wege die Calcium-getriggerte Exozytose. Aber auch die Annexine I und VII scheinen Einfluss auf die Exozytose zu nehmen. Sie zeigen eine starke Aktivität bezüglich der Vesikelaggregation.

Annexin VI hingegen scheint die Vesikelaggregation zu blockieren. Es übernimmt die Funktion eines negativen Regulators (Donnelly and Moss, 1997).

1.4 Caveolae und Lipid Rafts

1.4.1 Caveolae

Die Struktur der Caveolae ist bisher wenig erforscht worden, da es sich zum einen um dynamische und zum anderen um sehr kleine Molekülstrukturen handelt; dies gestaltet die Untersuchungen schwierig. Das Interesse der Vergangenheit galt in erster Linie morphologischen Untersuchungen und der Entdeckung von Molekülen, die in Caveolae lokalisiert sind. Erst am Anfang ihrer Entwicklung steht die Forschung, die sich direkt auf die Funktionen der Caveolae konzentriert, da erst in den letzten Jahren Untersuchungsmethoden entwickelt wurden, um molekulare Mechanismen in Caveolae selbst studieren zu können. Ein wichtiger Schritt war die Entwicklung eines Prozesses, mit dessen Hilfe es gelang Caveolae direkt von gereinigten Plasmamembranen zu isolieren (Schnitzer et al., 1995). Aufgefallen waren sie zunächst durch Unlöslichkeit gegenüber Triton X-100.

1.4.1.1 Aufbau und Vorkommen der Caveolae

Caveolae sind Clathrin-freie, cholesterinreiche Plasmamembraninvaginationen mit einer Größe von 50-100 nm (Van Deurs et al., 1993), die an der Zelloberfläche der meisten peripheren Zellen exprimiert werden (Anderson, 1998). Bis zu 90% des freien Cholesterins der Zelle ist in der PM lokalisiert, wobei der Großteil an der zytoplasmatischen Seite der Doppelmembran, den Caveolae, zu finden ist.

Caveolae kommen in Fibroblasten, primären Adipozyten, Muskel- und Endothelzellen vor, wohingegen Hepatozyten nur wenig Caveolae besitzen und sie in Monozyten und Lymphozyten gar nicht zu finden sind. Caveolae stellen eine spezialisierte Form der Lipid Rafts dar (Simons K und Ikonen E, 1997) und werden aus verschiedenen Lipiden (Ganglioside, Sphingomyeline, Ceramide, Cholesterin etc.) und Proteinen (Caveolin, Src, heterotrimerisches G_{α} - und G_{β} -Proteinen etc.) gebildet, wobei ein hoher Cholesteringehalt der Zelle zu einer erhöhten Anzahl von Caveolae führt und umgekehrt. Die Struktur der Caveolae wird zum einen durch Caveoline und zum anderen durch andere Proteine wie den Annexine II und VI aufrechterhalten (Babiychuck et al., 2000). Die zytoplasmatische Oberfläche ist von Filamenten in Form von Spiralen umgeben (Kurzchalia et al., 1996).

In Caveolae sind Rezeptoren (z. B. für Insulin, EGF, SR-BI, Endothelin, Bradykinin etc.), Signaltransduktionsmoleküle (wie z. B. Adenylatzyklase, Phosphoinositide, H-Ras, MAP-Kinase, Raf1 etc.) und Membrantransporter (wie z. B. H^+ -ATPase, IP_3 -Rezeptoren, Ca^{2+} -ATPase etc.) lokalisiert.

1.4.1.2 Funktion der Caveolae

Den Caveolae werden bedeutsame Rollen innerhalb verschiedener physiologischer und pathologischer Vorgänge zugeschrieben:

Caveolae stellen eine spezialisierte Form der Lipid Rafts dar und sind dynamische Carrier, die gebraucht werden, um Vesikel andocken und fusionieren zu lassen (Schnitzer et al., 1995). Sie sind fähig, Moleküle von der Zelloberfläche zu umschließen und über einen GTP-abhängigen Spaltungsprozess in freie Transportvesikel zu überführen. Außerdem transportieren sie Moleküle, wie z. B. Insulin oder Albumin in das oder durch das Endothel (Schnitzer et al., 1996). So besteht die Möglichkeit chemische und mechanische Information vom Extrazellulärraum in die Zelle zu transportieren (Liu et al., 1996). Caveolae sind somit an der Internalisation von Molekülen und deren intra- und transzellulären Transport beteiligt (Anderson, 1998).

Im Lipidtransport fungieren die Caveolae als wichtige Durchgangsstation: intrazellulär synthetisiertes Cholesterin (Smart et al., 1994) und Cholesterin, das beim intrazellulären Abbau von LDL entsteht (Fielding et al., 1996), passiert Caveolae, um von intra- nach extrazellulär zu gelangen. Das cholesterinbindende Markerprotein Caveolin-1 (Murata et al., 1995) fungiert als Teil eines Lipidtransportsystems. Caveolin bewegt sich zwischen intrazellulären Kompartimenten wie z. B. dem Golgi-Apparat und der Zelloberfläche hin und her. Seine Hauptaufgabe dabei ist der Transport von endozytierten bzw. degradierten Cholesterin (Simons et al., 2000).

Auch die Lokalisation des SR-BI in den Caveolae unterstreicht die wichtige Position dieser Membranstruktur im Lipidverkehr (Babitt et al., 1997), denn SR-BI ist neben passiver Diffusion und dem ABC-AI-Transporter für den Cholesterinefflux zuständig (Krieger, 1999; Young et al., 1999).

Weiterhin haben viele Studien gezeigt, dass in den Caveolae viele inaktive Signalkomplexe gelagert werden, die in Gegenwart von Wachstumsfaktoren schnell aktiviert werden können. Das Caveolin selbst kann mit Signaltransduktionsmolekülen interagieren und ist dadurch auch an der Zelltransformation beteiligt.

1.4.1.3 Caveolae und Signaltransduktion

In den Caveolae befinden sich verschiedene Moleküle, denen eine Schlüsselfunktion in der Signaltransduktion zugeschrieben wird (Anderson, 1998). Sie aktivieren G-Proteine oder fungieren als zweiter Bote. Im Folgenden soll auf einige dieser Moleküle genauer eingegangen werden:

Die Liste von Signalmolekülen, die in Caveolae lokalisiert sind, ist lang und beinhaltet u. a. Mitglieder des MAP Kinase Weges wie das H-Ras, Fyn und Src Kinasen, Nitritoxidsynthetase (NOS), EGF-R (Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor), PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor), Phospholipase C γ (PLC γ), Proteinkinase C α und Proteinkinase C β (PKC), Ras, trimerische G-Proteine (Okamoto et al., 1998; Shaul et al., 1998). Caveolin kann direkt mit diesen Signalmolekülen über eine 20 aminosäurenlange Domäne, die Caveolin Scaffolding Domain (CSD), in Wechselwirkung treten. In der Mehrzahl der Fälle sorgt die Gegenwart von CSD dafür, dass die Signalmoleküle in inaktiver Konformation vorliegen, was auf eine negativ regulatorische Funktion der CSD weist. Durch den Einfluss von Molekülen wie z. B. dem Calcium-Calmodulin im Fall der eNOS, wird die inaktive Konformation gelöst (Feron et al., 1998). Zu dem inhibiert die Überexpression von Caveolin den MAP Kinase Weg (Roy et al., 1999).

1.4.1.4 Caveolin

1.4.1.4.1 Aufbau und Vorkommen von Caveolin

Caveolin ist ein ca. 22 kDa großes Protein, das die Struktur der Caveolae maßgeblich bestimmt. Caveolin ist hauptsächlich an der zytoplasmatischen Seite der PM lokalisiert, wird aber auch am GA und an post-Golgi-Vesikeln gefunden (Smart et al., 1999; Kurzchalia et al., 1992). Man unterscheidet 3 Typen von Caveolin:

Caveolin 1 und 2 kommen in fast allen peripheren Zellen vor. Dazu gehören Adipozyten, Fibroblasten, Pneumozyten 1. Ordnung oder Endothelzellen (Scherer et al., 1997). Caveolin 3 hingegen ist hauptsächlich in quergestreiften Muskelzellen, dem Herzmuskel, Diaphragma und neuroglialen Zellen anzutreffen (Tang et al., 1997). Intrazellulär ist Cav-1 vornehmlich an der Zelloberfläche lokalisiert, wohingegen Cav-2 am GA gefunden wird und somit nicht an der Formierung von Caveolae an der PM beteiligt ist. Trotz ihrer ungleichen räumlichen Verteilung interagieren Cav-1 und Cav-2 miteinander. Cav-2 trägt zur Bildung von post-Golgi-Vesikeln bei, benötigt aber dazu die Gegenwart von Cav-1 (Parolini et al., 1999).

Cav-3 kolokalisiert mit Cav-1 in den Muskelzellen in denen Cav-3 exprimiert wird. Dies haben Immunfluoreszenzuntersuchungen und Zellfraktionierungsstudien gezeigt.

Am Beispiel des Caveolin 1 soll der Aufbau des Proteins beispielhaft dargestellt werden: das intrazellulär liegende N- (Reste 1-101) und C-terminale Ende (Reste 135-178) ist durch eine membranüberspannende Domäne (Reste 102-134)

verbunden, die das Molekül letztendlich in zwei zytoplasmatische Domänen teilt (Glenney et al., 1992).

Cav-2 besitzt 38% Identität und 58% Ähnlichkeit, Cav-3 65% Identität und 85% Ähnlichkeit in der Sequenz mit Cav-1. Die codierende Region für Cav-1 liegt auf Chromosom 7 (7q31). Es kommt als lange (α) (1-178) und kurze Isoform (β) (32-178) vor (Scheiffele et al., 1998; Scherer et al., 1996).

Caveolin 1 und 3 besitzen die Fähigkeit zur Homooligomerisation, d. h., sie bilden homotypische Oligomere mit 14-16 individuellen Molekülen. Diese Domäne der Oligomerisierung (Rest 82-101) reguliert u. a. die Aktivität von Signalmolekülen wie EGF-R, H-Ras, MEPK, ERK, Src, G-Protein gekoppelte Rezeptoren, eNOS, um nur einige zu nennen. Diese Domäne wurde aufgrund ihrer Fähigkeit andere Moleküle zu binden auch CSD genannt. Für die Befestigung des Caveolins an der PM sorgt ebenfalls die CSD und nicht die Transmembrandomäne, wie lange angenommen (Schlegel et al., 2000).

Das Caveolin am ER bildet die CSD mit den Resten 61-101 (Sargiacomo et al., 1995). Am GA durchlaufen die Homooligomere ein zweites Stadium der Oligomerisation indem sie miteinander interagieren. Diese Oligomer/Oligomer-Interaktion produziert ein räumliches Netzwerk von Caveolin-Molekülen, das man im Elektronenmikroskop als eine Art gestreifte Hülle mit einer Größe von ca. 350 kDa erkennen kann (Song et al., 1997).

Caveolin 2 selber kann nicht diese höheren Oligomerkomplexe bilden, sondern benötigt die Gegenwart von Cav-1 zur Bildung von Heterooligomerkomplexe (200-400 kDa). Cav-2 kann nur Monomere und Dimere ausbilden (Mora et al., 1999).

1.4.1.4.2 Funktion von Caveolin

Caveolin werden viele verschiedene Funktionen zugeschrieben. Dazu gehört das Sortieren von Vesikeln (Fiedler et al., 1994; Dupree et al., 1993), die Regulation bei der Signaltransduktion (Smart et al., 1999; Li et al., 1995), die Bildung des Strukturproteins der Caveolae (Rothberg et al., 1992), die Beteiligung am zellulären Transformation (Engelmann et al., 1997; Koleske et al., 1995) und Beteiligung am Cholesterinmetabolismus (Smart et al., 1999; Field et al., 1998).

Caveolin 1 ist auf mehr als eine Art und Weise am intrazellulären Cholesterinmetabolismus beteiligt:

1. Es kann Cholesterin direkt binden (Murata et al., 1995).

2. Die Transfektion von Cav-1 cDNS in Lymphozyten, die keine Caveolae besitzen induziert eine 4-fache Cholesterinanreicherung in Caveolae-ähnlichen Domänen und führt so zur Bildung von Caveolae-ähnlichen Invaginationen (Frau et al., 1995; Smart et al., 1996).

3. Caveolin besitzt eine 23 Aminosäuren lange, saure, hydrophobische Domäne mit Cysteinresten am C-terminalen Ende, die palmitoyliert sind. Diese Palmitoylierung ist nötig, um den Caveolin-Chaperon-Transportkomplex (HSP56, Cyclophilin 40, Cyclophilin A, Cholesterin) zu formieren und Cholesterin vom ER durch das Zytoplasma zu den Caveolae zu transportieren (Uittenbogaard et al., 2000).

Zellen mit niedrigen Cav-1-Leveln zeigen eine reduzierte Transportmenge von Cholesterin, wohingegen Zellen, die viel Cav-1 exprimieren wie z. B. Adipozyten mehr Cholesterin transportieren und somit als Konsequenz eine höhere Anzahl an Caveolae besitzen (Anderson, 1998). Hohe Cholesterinspiegel in der Zelle gehen mit einer Zunahme der m-RNA für Caveolin-1 einher.

1.4.2 Lipid Rafts

In der Doppelmembran von Zellen sind verschiedene Lipide asymmetrisch über die zytoplasmatische und extrazelluläre Seite der Zellmembran verteilt und organisiert. Aus dieser Anordnung resultiert die Formation von Sphingolipiden und Cholesterin in bewegbare Plattformen, die Lipid Rafts genannt werden. Ihre Größe beträgt ca. 50 nm im Durchmesser und sie sind daher im Lichtmikroskop nicht sichtbar. Sie fungieren als eine Art Floß in der PM, das für den Transport von Membranbestandteilen und als Weiterleitungsstation in der intrazellulären Signaltransduktion dient (Simons und Ikonen, 1997). Außerdem sind die Lipid Rafts an Zell-Zell-Interaktionen beteiligt und übernehmen eine wichtige Funktion bei der Regulation des intrazellulären Cholesterinhaushaltes (Smart et al., 1996).

1.4.2.1 Aufbau von Lipid Rafts

Sphingolipid- und Cholesterin- enthaltene Lipid Rafts werden folgendermaßen beschrieben: die nebeneinanderliegenden Sphingolipide treten durch schwache Interaktion ihrer Carbohydratköpfchen der Glykosphingolipide miteinander in Kontakt. Die Köpfe der Sphingolipide ragen aus der PM heraus und belegen größere freie Flächen außerhalb der Zelle. Der verbleibende freie Raum zwischen assoziierenden Sphingolipiden wird durch Cholesterinmoleküle gefüllt, die als Platzhalter dienen. Diese Sphingolipidköpfe sind mit gesättigte Fetthydrocarbonketten verbunden, die in

der Membran verankert sind. Die lange Fettsäurekette der Glykosphingolipide ist über eine Amidbindung mit der Sphingosinbasis verbunden und tritt auf diese Weise mit der zytoplasmatischen Seite der Doppelmembran in Wechselwirkung. Cholesterin fungiert auch in der zytoplasmatischen Seite der Doppelmembran als Platzhalter und füllt den Raum zwischen den ineinandergreifenden Fettsäureketten. Die Aufgabe der Phospholipide, die sich auf der zytoplasmatischen Seite dieser Mikrodomäne befinden ist noch nicht ganz geklärt, wahrscheinlich befördern auch sie Fettsäureketten und optimieren damit die Anordnung und Zusammensetzung der Lipid Rafts.

1.4.2.2 Isolierung von Lipid Rafts

Aufgrund ihrer charakteristischen chemischen Eigenschaften konnten die Lipid Rafts im Labor identifiziert werden. Dazu zählt die Unlöslichkeit gegenüber Triton X-100 bei 4 °C und einer damit verbundenen Bildung glykolipidreicher Komplexe in diesem Detergenz. Aufgrund ihres hohen Lipidgehaltes bilden die Detergent-Insoluble Glycolipid-Enriched Complexes (DIGs), zu denen Lipid Rafts gehören, bei der Zentrifugation einen Gradienten niedriger Dichte aus. Durch diese Zentrifugation ist eine Unterscheidung zwischen Proteinen, die mit DIGs assoziiert sind, von anderen unlöslichen Komplexen möglich (Simons und Ikonen, 1997).

1.4.2.3 Rafts und assoziierte Proteine

Es existieren mehrere Proteine, die mit Lipid Rafts assoziieren. Ihre Anzahl schwankt je nach Dichte zwischen 10 und 30. Zu diesen Proteinen zählen u. a. GPI-verankerte Proteine, palmitoylierte Proteine, Transmembranproteine (z. B. Influenzavirus Hämagglutinin) und Tyrosinkinasen der Src-Familie. Bei den GPI-verankerten Proteinen z. B. stellt der Lipidanker mit seinen zwei gesättigten Fettsäureketten eine Verbindung zu den Lipid Rafts her.

Ein weiteres Membranprotein, das in DIGs gefunden wird, ist das Caveolin, das in den Caveolae und post-Golgi-Transportvesikeln gefunden wird und Cholesterin binden kann. Diese Eigenschaften erklären die Assoziation mit DIGs.

1.4.2.4 Rafts und Signaltransduktion

Die Hauptfunktion der Lipid Rafts im Rahmen der Signaltransduktion ist vermutlich die Fähigkeit zur Konzentrierung von Rezeptoren, um mit Liganden und Effektoren auf beiden Seiten der Membran interagieren zu können. Die Größe und

Zusammensetzung der Lipid Rafts ändert sich durch intra- und extrazelluläre Stimuli und eine kleine Änderung in ihrer Konformation kann eine Signalkaskade initiieren (Simons et al., 2000).

Die traubenförmige Anhäufung von GPI-verankerten Proteinen kann verschiedene Signaltransduktionswege, abhängig vom Zelltyp, aktivieren. Bei der Aktivierung von Enzymen, die in Lipid Rafts lokalisiert sind, werden wasserlösliche Phosphooligosaccharide durch Lösung der Verankerung frei. Diese müssen durch die Doppelmembran transportiert werden, um als zweiter Bote im Zytosol aktiv werden zu können (Parpal et al., 1995). Zu diesen GPI verankerten Proteinen gehören Mitglieder des MAP Kinase Weges (H-Ras), Fyn, s-Src, EGF und die Proteinkinasen A und C und Phosphoinositide wie Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (Hope et al., 1996; Simons und Toomre, 2000; Smart et al., 1999).

Lipid Rafts beschleunigen Bindungen zwischen Interaktionspartnern während der Signaltransduktion und verhindern unangebrachte Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Wegen.

1.4.2.5 Die Rolle von Lipid Rafts im Membranverkehr

Lipid Rafts sortieren und verpacken Proteine und Lipide in nackte Transportvesikel für den endozytotischen und sekretorischen Weg. Der Transport durch die Membran findet sowohl von Außen nach Innen, als auch von Innen nach Außen statt.

Lipid Rafts transportieren intrazellulär bevorzugt GPI-verankerte Proteine und apikalgelegene Transmembranproteine. GPIs scheinen nur durch Wechselwirkung mit ihren N-Glykanen, als apikales Sortierungssignal, an die mit Lipid Rafts assoziierenden Lektine binden zu können, wohingegen andere Proteine direkt an Lipid Rafts binden, um an apikale Orte der Zelle transportiert zu werden.

Der basolaterale Transport hingegen hängt von chemischen Signalen ab, die aus zytoplasmatischen Domänen von basolateral lokalisierten Zielproteinen stammen. Neben N-Glykanen als Sortierungssignal werden auch Tyrosine oder Leucine benutzt.

Beim intrazellulären Cholesterintransport wird internalisiertes Cholesterin über Endosomen und Lysosomen u. a. in das TGN transportiert oder neusynthetisiertes Cholesterin gelangt über das ER in das TGN. Der folgende Cholesterintransport vom TGN zur PM wird ebenfalls durch Caveolin-haltige Lipid Rafts bewerkstelligt (Smart et al, 1996; Mendez et al, 2001). Neben den Lipid Rafts scheint auch der ABC-A1-Transporter beim Cholesterintransport von Endosomen und Lysosomen zur PM

beteiligt zu sein (Orso et al., 2000), der durch Translokation von PL in der PM letztendlich den Cholesterinefflux auslöst (Wang et al, 2001; Hamon et al., 2000).

1.4.3 Lipid Rafts, Caveolae und Krankheiten

Einige Erkrankungen werden mit Lipid Rafts bzw. Caveolae in Zusammenhang gebracht, was sie für die klinische Forschung interessant macht. Dazu gehört z. B. die Infektionen mit Pathogenen wie dem Semliki Forest Virus (SFV) (Phalen & Kielian, 1991) oder auch dem SV 40, einem nicht-umhüllten DNS-Virus, das über die Caveolae in die Zelle aufgenommen werden (Kartenbeck et al., 1989; Anderson et al., 1996). Das SV 40 bedient sich dabei der Major Histocompatibility Complex (MHC) Klasse I Antigene um an seine Zielzellen zu docken (Stang et al., 1997) und internalisiert zu werden. Das Virus befindet sich dann in ca. 60 nm großen, nicht-umhüllten Vesikeln, die neutralen pH besitzen und sich als Caveolin-positiv darstellen lassen, aber weder Marker vom GA, noch der Frühen Endosomen, der Lysosomen oder dem ER enthalten. Diese Struktur wurde von Kartenbeck et al. als Caveosom bezeichnet. In diesen Caveosomen verbleibt das Virus einige Stunden bis es nach verschiedenen Fusionen und Spaltungen Mobilität erlangt und über Mikrotubuli nach perinukleär transportiert wird bis es das ER erreicht und von dort aus seine Pathogenität entfalten kann (Pfeffer, 2001).

Auch Teile des HIV-1 benutzen Lipid Rafts, um ihre Pathogenität entfalten zu können: das N-terminale Ende des Gag Proteins, das die HIV Replikation fördert, assoziiert mit Lipid Rafts an der PM. Nach dieser Assoziation kommt zur Membranbindung (Ono et al., 2001). Weiterhin konnte Ono zeigen, dass eine Entfernung von zellulärem Cholesterin die HIV-1 Partikelproduktion spezifisch senken konnte. Auch die Behandlung von virusproduzierenden Zellen mit Lipid Raft-zerstörendem Agens beeinträchtigt die Virusproduktion signifikant.

Weitere Ergebnisse jüngerer Arbeiten zeigen, dass das Aerolysintoxin (Abrami et al., 1998), das Cholera toxin (Tran et al., 1987) und das Shigatoxin (Sandvig et al., 1996) ebenfalls über Lipid Rafts in Zellen eindringen. Auch diese Aufnahme wird durch die Anwesenheit von Cholesterin reguliert.

Weiterhin scheinen Lipid Rafts auch bei der Entstehung in Prionerkrankungen involviert zu sein. Prione sind eine Klasse von Proteinen, die tödliche Enzephalopathien in Menschen und Tieren auslösen können. Durch posttranslationale Konversion von zellulärem Prion (Pr^{C}) zu der Scrapie-Isoform (Pr^{Sc}) entfaltet das Prion seine Pathogenität und diese Konversion von Pr^{C} zu Pr^{Sc} findet in

Caveolae statt (Kaneko et al., 1994). Eine Senkung des zellulären Cholesterins, inhibiert die Konversion (Taraboulos et al., 1995) und damit das Risiko einer Infektion. Eine Anhäufung von Pr^{Sc} in Caveolae behindert außerdem viele der verschiedenen Caveolefunktionen.

Auch an kardiovaskulären Krankheiten sind Caveolae beteiligt. Caveolae sind reichlich in den parenchymalen Zellen des kardiovaskulären Systems vorhanden. Sie besitzen Rezeptoren, die HDL, LDL und oxidierte Lipoproteine binden und haben Schlüsselfunktionen im Calciummetabolismus, in der Signaltransduktion, der Blutgerinnung und dem Cholesterintransport. Diese Vorgänge stehen alle mit Caveolae in Verbindung. Durch inadäquate Aktivierung der Signalkaskaden kann es zu einer Störung dieser Stoffwechselwege kommen. Hervorgerufen wird dies z. B. durch eine hohe Empfindlichkeit gegenüber oxidiertem Cholesterin (Babitt et al., 1997) und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer Zerstörung der Caveolae. Dadurch kann es zu inadäquater Aktivierung von Signalkaskaden in Caveolae kommen, die u. a. eine Zellproliferation in Gefäßwänden während der Atherogenese zur Folge haben können (Anderson, 1998).

Auch bei Tumorerkrankungen spielen Caveolae eine wichtige Rolle, da invaginierte Caveolae in vielen Typen von transformierten Zellen stark reduziert sind (Koleske et al., 1995). Der Verlust dieser Invaginationen geht mit der Tyrosinphosphorylation von Cav-1 einher und hat einen Funktionsverlust der Zelle zur Folge (Koleske et al., 1995). Cav-1 scheint ein Tumor-Suppressor zu sein, da die Expression der cDNAs in transformierten Zellen das haltlose Wachstum aufhebt (Engelmann et al., 1997).

Auch die Angiogenese (Bildung von neuen Kapillaren aus schon bestehenden Blutgefäßen) hat im Zusammenhang mit dem Tumorwachstum besondere Bedeutung. Dies wiederum macht die Antiangiogenesetherapie attraktiv und vielversprechend bezüglich der Behandlung von Tumoren. Einige Angiogenesinhibitoren sind bereits bekannt. Liu et al. untersuchten 1999 die Wirkung von Angiostatin, Fumagillin (gebildet von *Aspergillus fumigatus*), 2-Methoxyoestradiol (endogener Oestrogenmetabolit), Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta) und Thalidomid. Sie alle blockierten die Vascular Endothelial Growth Factor-induzierte (VEGF) Verminderung der Cav-1-Expression. VEGF ist einer der vielen Angiogenesaktivatoren, die den Tyrosinkinase-Rezeptor in Endothelzellen aktivieren und somit mit Signaltransduktionswegen wie dem Ras/MAPK-Weg in Verbindung stehen. Liu et al. stellten allerdings auch fest, dass die Behandlung mit

Angiogeneseinhibitoren allein keinen signifikanten Effekt auf die Cav-1-Expression hat. Cav-1 kann aber als negativer Regulator der VEGF Signaltransduktion fungieren. Arbeiten in der Zukunft sollen klären, ob die Eigenschaften der Lipid Rafts und Caveolae genutzt werden können, um diese Krankheiten zu heilen oder sie präventiv zu bekämpfen.

1.5 Ziel der Arbeit

Der Reverse Cholesterin Transport (RCT) beschreibt den Weg des Cholesterins aus extrahepatischen Geweben in die Leber, wo es über die Produktion und anschließende Sekretion von Gallensäuren ausgeschieden werden kann. Dies stellt den einzigen Mechanismus zur Eliminierung von überschüssigem Cholesterin in der Peripherie dar. Der erste Schritt des RCT ist der Transfer von zellulärem Cholesterin auf Transportmoleküle, wie z.B. HDL, der in cholesterinreichen Regionen der Zellmembran, den Caveolae, vonstatten geht. Dabei ist der Anteil der Caveolae an der Zelloberfläche und die Expression von Caveolin eng mit dem Cholesterinefflux der Zelle verknüpft. Das Cholesterin stammt zum einen aus der PM und zum anderen aus intrazellulären Organellen wie den Endosomen oder Lysosomen. Der vom trans-Golgi-Netzwerk ausgehende exozytotische Membranfluss ermöglicht schließlich den Transport des Cholesterins in Form von Caveolin-haltigen Lipid Rafts an die Zelloberfläche. Annexin VI ist ebenfalls an der Bildung und Stabilisierung von Lipid Rafts beteiligt. Es bindet cholesterinabhängig an Membranen und spielt eine regulatorische Rolle beim Transport von LDL/Cholesterin.

Die genauen Mechanismen der Beteiligung von Caveolin und Annexin VI am Cholesterintransport sind jedoch unklar. Die Annexin VI und Caveolin betreffenden Studien haben sich bisher auf die Lokalisation, biochemischen Eigenschaften und Bindungspartner konzentriert, sich aber wenig mit dem Einfluss der Proteine auf den intrazellulären Transport von Cholesterin beschäftigt. Um die potentielle Funktion von Annexin VI und Caveolin im Rahmen des intrazellulären Cholesterintransportes zu studieren, sollten der Einfluss der Überexpression von Annexin VI (anxVI), Caveolin 1 [Cav1(WT)] und dominant negativen Mutanten des Caveolin in einem Zellmodell (CHO-Zellen) studiert werden. Die Caveolinmutanten Cav3(DGV) und Cav1(DGI) zeichnen sich durch eine Deletion im N-terminalen Ende von Caveolin 3 bzw. 1 aus.

Mit Hilfe von radioaktiven Assays sollte der Einfluss der verschiedenen Zellen auf den Cholesterinefflux studiert werden. Im Anschluss sollte mittels Immunfluoreszenzen die Lokalisation des Caveolins in den zuvor erzeugten Situationen in den Zellen dargestellt werden. Lipid Raft Präparationen sollten als eine zweite Methode angewandt werden, um die Cholesterinverteilung in den verschiedenen Zellkompartimenten zu zeigen.

Aus diesen Ergebnissen sollten sich weitere Rückschlüsse auf die tatsächliche Funktion von Caveolin und Annexin VI im zellulären Cholesterinmetabolismus ziehen lassen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen und Bakterien

Für die Zellkulturexperimente wurden folgende Zelllinien verwendet:

HuH7-WT-Zellen

HuH7-Cav3(DGV)^{HA}-Zellen

CHO-WT-Zellen

CHO-Cav1(WT)^{VSV}-Zellen

CHO-Cav1(DGI)^{HA}-Zellen

CHO-Cav3(DGV)^{HA}-Zellen

CHO-anxVI-Zellen

Die verschiedenen DNS zur Herstellung der stabilen Zelllinien wurden freundlicherweise von Prof. Parton (Brisbane, Australien) zur Verfügung gestellt, die Klonierungen wurden von der Arbeitsgruppe Grewal (Hamburg) durchgeführt.

Zur Transformation, Klonierung und Präparation der Plasmid-DNS wurden kompetente Bakterien des Stammes E. coli JM 109 (Yanish-Peron et al., 1985) verwendet. Dieser Stamm wurde kommerziell bei der Firma Promega erworben.

2.1.2 Geräte

Accu-Jet Pipettierhilfe	Merck
AF-10	Scotsman
Agarosegelelektrophoresekammer	Bio-rad
Autoradiographiekammer mit Verstärkerfolien	Rego
Bioclav	Schütt
Feinwaage U 4100S	Sartorius Universal
Gelelektrophoresekammer P10 DS	Peqlab
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss
Inkubator mit Schüttelvorrichtung	Heraeus Instruments
Kühlzentrifuge Universal 16 R	Hettich
Liquid Scintillation Analyzer 1600 TR	Packard
Magnetrührer mit Heizung Ikamag RH	Janke & Kunkel
Messzylinder 100, 500, 1000, 2000 ml	Hirschmann
Mini-Shaker Modell Kühne	B. Braun
Mikroskop Diavert	Leitz

Mikroskop Axiovert 100	Zeiss
Pinzette stahl, L105	Merck
Pipetten (Glas) 1, 2, 5, 19, 20, 25 ml	Brand
PH-Meter 50	Beckmann
Photometer Lambda 20	Perkin Elmer
Präzisionspipetten	Eppendorf
Schüttler Certomat TC-2	Braun
Transblot-Zelle	Bio-rad
Ultrazentrifuge L7-55	Beckmann
Ultrazentrifuge TL-100	Beckmann
Vortexer Ika-Vibor-Fix VF2	Janke & Kunkel
Wasserbad	GFL
Zählkammer Thomae	Hausser Scientific
Zellinkubator IR 1500	Flow Laboratories
Zellkultur-Werkbank	Baker
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus Instruments
Zentrifuge Universal 16 R	Hettich

2.1.3 Materialien/Verbrauchsmittel

Coverslips	Assistent
Deckgläschen 20 x 20 mm	Superior
Dialyseschlauch	Serva
Einmalspritzen (steril) [1, 5, 20 ml]	Becton Dickinson
Einmalimpfeschlingen	Nunc
Gel-Blotting-Papier GB 002, 150 x 200 m	Schleicher Schüll
Gewebekulturflaschen 75 cm ²	Conrad & Co
Glasplatten mit fixierten Spacern 1,0 mm	Biometra
Injektionskanülen Sterican 27 G	Braun
Kryoröhrchen (steril) 1,8 ml	Nunc
Mehrfachkulturschalen (6-well/12-well)	Costar
Microliter Syringes Pipette	Hamilton
Objektträger 76 x 26 x 1 mm	Marienfeld
Parafilm M	American National Can
Pasteurpipetten Glas 230 mm	Brand
PD 10 Columns G-24M	Pharmacia LKB Biotech.

Petrischalen Zellkultur steril	Nunc
Pipetten serologisch (steril) [5, 10, 25 ml]	Becton Dickinson
Plastikzentrifugenröhrchen (steril) [15, 50 ml]	Becton Dickinson
Protran Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher Schüll
PS-Halbmikroküvetten 10 x 45 mm	Greiner Labortechnik
Quick-Seal Centrifuge Tubes 25 x 89 mm	Beckmann
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 15 ml/50 ml	Greiner Labortechnik
Röhrchen (steril) [17,0 x 100 mm]	Greiner Labortechnik
Röhrchen Sarstedt 3,5 ml/5 ml	Sarstedt
Röntgenfilm Biomax MR 18 x 24 cm	Kodak
Sterilfilter (0,45 µm)	Nunc
Szintillationsflasche 27,0 x 60,0 mm	Beckmann
Zellschaber	Costar

2.1.4 Chemikalien

Es wurden Chemikalien mit größtem Reinheitsgrad (p. a.) verwendet:

3-Amonipropyltriethoxy-Silane	Sigma
Aceton	Merck
Acrylamid-Bisacrylamid (30/0,8 %)	Boehringer Mannheim
Agar	Difco
Agarose	Bio-Rad
Albumin Standard (2 mg/ml)	Pierce
Ammonium Persulfat (AP)	Bio-Rad
Ampicillin	Sigma
Antifect	Schülke & Mayr
Aqua ad injectabilia	Braun
Benzamidine	Sigma
β-Galactosidase encoding pCMV SPORT-βGal	Life Technologies, Inc.
Biotinylierter Proteinmarker (Western-Blot)	Biolabs
Bisbenzimid (DAPI)	Bayer
Borsäure krist.	Merck
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Merck
Dithioerythritol (DDT)	Sigma

DMEM	Gibco-Brl
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
Dye Terminator Cycle Sequencing reaction kit	Perkin Elmer
ECL-Chemolumineszenz-Kit	Pharmacia Biotech.
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
Ethylenglykol-bis-N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA)	Sigma
F12 (HAM) Nutrient Mixture	Gibco-Brl
FCS (Foetales Kälber Serum)	Gibco-Brl
Ficoll Typ 400-D1	Sigma
Fugene 6 Transfection Reagent	Boehringer Mannheim
Gentamycin-Sulfat-Lösung	Gibco-Brl
Geneticin G-418 Sulfat	Gibco-Brl
Glycerol	Sigma
Hefextrakt	Difco
Heparin	Roche
Isopropanol (2-Propanol)	Merck
Kaliumbromid (KBr)	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Kaliumnatriumtartrat	Merck
Kupfersulfat (CuSO ₄)	Merck
Lambda DNS-HindIII-Marker	Pharmacia Biotech.
L-Glutamin	Gibco-Brl
Liquid Scintillator Aquasafe Plus 500	Zinsser Analytic
2-Mercaptoethanol	Serva
Methanol (CH ₃ OH)	Merck
Mowiol	Calbiochem
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	J. T. Baker
Natriumazid-Lösung	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natronlauge (NaOH)	Merck
NBD-Cholesterin	Molecular Probes
Non-Fat Dry Milk (Milchpulver)	Bio-Rad

N,N,N`N`-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad
One Phor-all Plus-Puffer	Pharmacia Biot.
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Gibco-Brl
Penicillin/Streptomycin	Gibco-Brl
pcDNS 3,1+	Invitrogen
pGEMT	Promega
1,2 Phenylidiamin (PPD)	Merck
Plasmid-Maxipräparationskit	Quiagen
Ponceau-S-Lösung	Serva
Rainbow Coloured Protein Weight Markers RPN 756	Pharmacia Biot.
Salzsäure (HCl)	Merck
T7, SP6	Promega
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Sigma
Tritium	Amersham Life Science
Triton X-100	Sigma
Trypsin-EDTA Lösung	Gibco-Brl
Trypton	Difco
Tween 20	Merck

Proteaseinhibitoren:

Für den Ansatz des Proteinaseinhibitorcocktails (PIC) wurden folgende Antiproteasen benötigt:

Inhibitor	Inaktivierung von	Firma
Antipain	Kathepsin A und B Papain Trypsin	Calbiochem
Chymostatin	Chymotrypsin Papain Cystein-Proteasen	Calbiochem
Leupeptin	Plasmin Trypsin Papain Kathepsin B	Calbiochem
Pepstatin A	Pepsin Kathepsin D	Calbiochem

Restriktionsenzyme:

Enzym	Schnittstelle	Firma
BamHI	G↓GATCC	Pharmacia Biotech
BglII	A↓GATCT	Pharmacia Biotech
Eco RI	G↓AATTC	Pharmacia Biotech
HdIII	A↓AGCTT	Pharmacia Biotech
KpnI	GGTAC↓C	Pharmacia Biotech
XbaI	T↓CTAGA	Pharmacia Biotech

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primäre Antikörper

Primäre Antikörper in Western Blots und Immunfluoreszenz:

Firma/ Hersteller	Ursprung/ Herkunft	Antigen/ Größe	Verdünnung WB	Verdünnung IMF
Arbeits- gruppe Grewal (Hamburg)	Schaf/ Polyklonal	Synthetisches Peptid des Annexin VI N- Terminus 68 kDa	1 : 250	1 : 10-50
Arbeits-gruppe Enrich (Spanien)	Kaninchen/ Polyklonal	Annexin VI (aus Endosomenfraktion) 70 kDa	1 : 250	1 : 100
Transduct. Laboratories	Kaninchen/ Polyklonal	Caveolin 22 kDa	1 : 5000	1 : 100
Roche	Ratte/ Monoklonal	Hämagglutinin 16 kDa	1 : 1000-2000	1 : 100-200

2.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper zur Immundetektion im Western Blot:

Antigen	Verdünnung	Firma
Esel-anti-Kaninchen F(ab') ₂ -Fragment HRP-konj.	1 : 1000	Jackson Immuno Research
Esel-anti-Maus F(ab') ₂ -Fragment HRP-konjugiert	1 : 1000	Jackson Immuno Research
Esel-anti-Ratte F(ab') ₂ -Fragment HRP-konjugiert	1 : 1000	Jackson Immuno Research
Hase-anti-Schaf F(ab') ₂ -Fragment HRP-konj.	1 : 1000	Jackson Immuno Research
Ziege-anti-Kaninchen F(ab') ₂ -Fragment HRP-k.	1 : 1000	Jackson Immuno Research
Ziege-anti Maus F(ab') ₂ -Fragment HRP-konj.	1 : 1000	Jackson Immuno Research
Ziege-anti Ratte F(ab') ₂ -Fragment HRP-konj.	1 : 1000	Jackson Immuno Research
Anti-Biotin-Antikörper HRP-konjugiert	1 : 100	Sigma

Sekundäre Antikörper zur Darstellung der 1. Antikörper in der Immunfluoreszenz:

Fluorochrom	Maxim. Absorption	Maxim. Emission
Cy2 (Carbocyanin)	490 nm	508 nm
Cy3 (Indocarbocyanin)	550 nm	570 nm

Antigen	Verdünnung	Firma
Ziege-anti-Schaf F(ab') ₂ -Fragment Cy3-konjugiert	1 : 250	Jackson Immuno Research
Ziege-anti-Hase F(ab') ₂ -Fragment Cy2-konjugiert	1 : 250	Jackson Immuno Research

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

CHO-Zellen wurden in 72 cm² Zellkulturflaschen gezüchtet und von einem Nährmedium, das aus F12 (HAM) Nutrient Mixture und 10% foetalem Kälberserum, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin bestand, bedeckt. Das Medium für die Zellklonkultivierung enthielt außerdem 1 mg/ml G 418 zur Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes.

Die Zellen wurden im Zellinkubator bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach einer 2-3-tägigen Wachstums- und Vermehrungsphase im Zellinkubator wurden die Zellen ausgedünnt. In einer sterilen Zellkulturwerkbank wurde das alte Medium entsorgt, die Zellen einmal kurz mit PBS gespült und dann für 1 Minute mit 5 ml Trypsin-EDTA angedaut. Zum Stoppen der Proteolyse wurden 10 ml Nährmedium zugegeben und die suspendierten Zellen nach Bedarf ausgedünnt.

2.2.2 Ausplattieren von Zellen

2 Tropfen suspendierter Zellen wurden in eine Zählkammer überführt und quantifiziert. Der Zellzahl entsprechend wurde ein Aliquot in 6-well- oder 12-well-Mehrfachkulturschalen überführt und mit Nährmedium auf ein Endvolumen von 1,5 bzw. 2 ml aufgefüllt.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Suspendierte Zellen wurden in 15 ml Plastikzentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 2.000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml PBS gelöst. Die Suspension wurde 5 Minuten bei 2.500 U/min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml F12

(HAM) gelöst und tropfenweise mit 1 ml Gefrierlösung (60% F12, 20% DMSO und 20% FCS) versetzt. Anschließend wurde das Gemisch in Kryoröhrchen überführt, diese mehrere Stunden bei 4°C vorgekühlt, 3 Tage bei -80°C tiefgefroren, bis sie letztendlich in flüssigen Stickstoff gelagert wurden.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen für 90 Sekunden bei 37°C im Wasserbad erwärmt, der Inhalt in 10 ml Nährmedium überführt und 2 Minuten bei 2.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Nährmedium resuspendiert und in einer Zellkulturschale kultiviert.

2.2.4 Transformation von Bakterien

Die Transformation von Bakterien wurde nach der im Buch „Molecular Cloning“ (Maniatis et al, 2nd Ed., 1989) beschriebenen Methode durchgeführt.

Kompetente *Escherichia coli* Bakterien vom Stamm JM109 wurden bei -80°C gelagert und vor der Transformation für 10 Minuten auf Eis aufgetaut. 25 µl der Bakteriensuspension wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und für 20 Minuten mit 10-100 Nanogramm DNS inkubiert. Diese Inkubation diente der Inhibition der Zellwandsynthese, so dass die DNS ungehindert in die Zellen aufgenommen werden konnte. Nach einer Inkubation von 1 Minute bei 42°C im Heizblock, zur Induktion der Zellwandsynthese, wurden die Bakterien für 2 Minuten auf Eis gelagert. Mit Hilfe von 600 µl LB-Medium (Luria-Bertani-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl in 1 l Aq. dest; pH 7,0) wurden die Bakterien für 1 Stunde im Schüttelinkubator bei 37°C vermehrt. Zwei ampicillinhaltige (100 µg/ml) LB-Agar-Bakterienkulturschalen wurden mit 200 bzw. 400 µl der Bakteriensuspension beimpft und über 12 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert, so dass vereinzelt stehende Kolonien sichtbar waren. Die Platten wurden luftdicht abgeschlossen und bei 4°C gelagert.

Autoklavierter LB-Agar enthielt 15 g Agar in 1 Liter LB-Medium. Die Bakterienkulturschalen wurden mit LB-Agar gefüllt und waren nach ca. 30minütiger Trocknung bei Raumtemperatur gebrauchsfertig.

2.2.5 DNS-Mini- und Maxi-Präparation

Gemäß der Standardmethode von Birnboim et al. (1979) wurden transformierte und selektionierte *Escherichia coli* (JM 109) benutzt, um mittels Mini- und Maxipräparation Plasmid-DNS zu gewinnen. Für dieses Verfahren wurden DNS-Kits von Qiagen benutzt.

2.2.5.1 Mini-Präparation

Eine ausgewählte Bakterienkolonie wurde in 1,5 ml ampicillinhaltigen LB-Medium bei 37°C über Nacht geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde für 1 Minute bei 8.000 U/min zentrifugiert und das Pellet anschließend in 200 µl Quiagen-Puffer 1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA und 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Mit Hilfe von 200 µl Quiagen-Puffers 2 (0,2 M NaOH, 1% Natriumdodecylsulfat) wurden die Bakterien für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Natriumdodecylsulfat solubilisiert Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellmembran und das NaOH denaturiert die chromosomale und Plasmid-DNS. Zur Neutralisation wurden 200 µl eisgekühlter Quiagen-Puffer 3 (3 M Kaliumacetat) zugegeben, der aufgrund der hohen Salzkonzentration zusätzlich noch Zelltrümmer und Proteine zur Präzipitation brachte, aber auch kleinere, kovalent geschlossene Plasmid-DNS denaturierte. Zur Trennung der beiden Fraktionen wurde das Gemisch 10 Minuten auf Eis gelegt und anschließend für 10 Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert (Hereaus Biofuge 13). Der Überstand wurde abpipettiert und die darin befindliche Plasmid-DNS mit zweifachem Volumen Ethanol (100%) gefällt und für weitere 15 Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol zur Entfernung präzipitierter Salze und zur Erhöhung der Löslichkeit gewaschen und weitere 15 Minuten zentrifugiert. Dieses zweite Pellet wurde an der Luft getrocknet und anschließend in 30-50 µl Aq. bidest resuspendiert. Bei hoher Effizienz ergab die Präparation 0,5-2,0 µg/µl Plasmid-DNS, die bei -20°C gelagert wurde.

Die in der Mini-Präparation gewonnene Plasmid-DNS wurde nach Restriktionsverdau in der Agarosegelelektrophorese geprüft bevor eine Maxipräparation begonnen wurde.

2.2.5.2 Restriktionsverdau

1 µg DNS wurde mit Restriktionsenzymen der Firma Pharmacia Biotech unter Zugabe von 10 x One-Phor-All plus Puffer (100 mM Magnesiumacetat, 100 mM Tris-acetat, 500 mM Kaliumacetat) verdaut. Durch Zugabe von Aq. bidest wurde das Volumen auf 10 µl erhöht und anschließend für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Eine Agarosegelelektrophorese diente der Auftrennung der DNS-Fragmente.

2.2.5.3 Agarosegelelektrophorese

Den Proben wurde zum Beschweren 1,5 µl Probenpuffer hinzugegeben, der sich aus 1 x TBE (90 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA), 0,05% Bromphenolblau, 8,75% Ficoll

zusammensetzte. Als Größenmarker wurde ein Lambda DNS-HindIII-Marker (Pharmacia) benutzt. Zur Auftrennung der DNS-Fragmente wurde mit einem 1%-igem Agarosegel gearbeitet. Es wurde 1 g Agarose in 100 ml 1 x TBE unter Erwärmung aufgelöst. Nach der Abkühlung auf ca. 60°C wurde fluoreszierendes Ethidium-Bromid mit der Endkonzentration von 0,85 µg/ml zugegeben. Das Gemisch wurde in die Elektrophoresekammer gegossen und bis zur vollständigen Polymerisation abgekühlt. Die Agarose wurde mit 1 x TBE bedeckt, mit den Proben beladen und die DNS-Fragmente bei einer Spannung von 60 Volt über 1,5 bis 2 Stunden aufgetrennt. Die Ethidiumbromid/DNS-Komplexe wurden unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

2.2.5.4 Maxi-Präparation

1 ml einer Bakterienkultur wurden in 200 ml ampicillinhaltigem LB-Medium für 12-16 Stunden bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert (120 U/min), was schließlich eine Dichte von ca. 1×10^9 Bakterien pro ml ergab. Die Suspension wurde ebenfalls mit den Quiagen-Puffern 1-3 behandelt (s. Mini-Präparation). Der Plasmid-DNS-haltige Überstand wurde mit Quiagen-QBT-Puffer [750 mM NaCl, 50 mM MOPS (3-N-Morpholinopropansulfonsäure), 15% Isopropanol und 0,15% Triton X-100] equilibriert und in eine Quiagen-tip-Säule gegeben. Die Säule war mit Diethylaminoethanol beschichteten Silikat-Partikeln bestückt, die abhängig vom pH-Wert und der Salzkonzentration, mit den Phosphatgruppen der Plasmid-DNS in Wechselwirkung tritt. Zur Entfernung von RNS- und Proteinresten wurde die Säule zweimal mit Quiagen-QC-Puffer (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Isopropanol; pH 7,0) gewaschen. Zur Elution der gebundenen DNS wurden 15 ml des Quiagen-QF-Puffers (1,25 M NaCl, 50 mM Tris, 15% Isopropanol, pH 8.5) verwendet. Auf die Fällung mit 10,5 ml Isopropanol folgte eine dreißigminütige Zentrifugation bei 15.000 U/min. Das DNS-haltige Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in 100 µl Aq. bidest suspendiert. Die Konzentration der Plasmid-DNS betrug ca. 0,5-2,0 µg/µl.

2.2.6 Transfektion

Transiente Gentransferexperimente an CHO-Zellen wurden mit Fugene 6 Transfektionsreagenz (Boehringer) durchgeführt. Bei dieser Substanz handelte es sich um eine nicht-liposomale Mischung aus Lipiden in 80% Ethanol. Ein Gentransfer fand an Zellen statt, die 24 Stunden zuvor in einer 6- oder 12-well-Schale ausplattiert worden waren. Die Anzahl der Zellen betrug $1-2 \times 10^5$ /well. Fugene 6 wurde in F12

Nutrient Mixture (Verhältnis 1 : 50) überführt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde tröpfchenweise auf die zu transfizierende Plasmid-DNS gegeben und für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Verhältnis von DNS (μg) : Fugene 6 (μl) : F12 (μl) betrug 1 : 2 : 100. In eine 6- bzw. 12-well-Mehrfachkulturschale wurden 2 bzw. 1 μg DNS/well transfiziert. Das Gemisch aus DNS-Lipid-Komplexen wurde zum Nährmedium in die 6- bzw. 12-well-Schalen pipettiert, leicht geschüttelt und ca. 20 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.2.7 Proteinextraktion aus Zellen

Zum Nachweis der Überexpression von Proteinen in den Gentransferexperimenten wurden CHO-Zellen in Mehrfachkulturschalen ausgesät und 24 Stunden später transfiziert. Nach weiteren 16-24 Stunden wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen kurz mit PBS (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 8,1 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2HPO_4 , pH 7,3) gewaschen. Mit einem Schaber wurden die Zellen vom Boden der Vertiefungen abgelöst und in einer kleinen Menge von PBS resuspendiert, in Eppendorf-Hütchen überführt und bei 13.000 U/min für 2 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 150 μl Solubilitätspuffer und PIC (1000 : 1) resuspendiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Solubilitätspuffer besteht aus 1% Triton X-100, 50 mM Tris, 2 mM CaCl₂, 80 mM NaCl bei pH-Wert 7,4 und PIC (Proteaseinhibitorcocktail) beinhaltet 1 mM Pepstatin A, 10 mM Chymostatin, 10 mM Leupeptin, 10 mM Antipain. Die Antiproteasen im PIC-Reagenz sollten die Freisetzung intrazellulärer Proteasen möglichst gering halten. Nach der Zellyse wurde das Gemisch für 3 Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert, der proteinreiche Überstand abpipettiert und die Proteinkonzentration bestimmt.

2.2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden nach der Methode von Lowry et al. (1951) durchgeführt. Der Probe wurde ein Aliquot entnommen, je nach erwarteter Proteinkonzentration zwischen 2 bis 100 μl , und auf ein Volumen von 400 μl mit Aq. bidest aufgefüllt. Es folgte die Zugabe von 1 ml Lowry-Reagenz zu jeder Probe.

Lowry-Reagenz besteht aus: Lowry A: 3% Na_2CO_3 in 0,15 N NaOH, Lowry B: 2% Kaliumnatriumtartrat und Lowry C: 1% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ im Verhältnis 65 : 1 : 1.

Die Proben wurden gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 125 μl Folinreagenz, das im Verhältnis 1 : 1 mit Aq. dest verdünnt war, versetzt. Die Proben wurden wieder gemischt und 25 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert, in Photometerküvetten überführt und bei einer Wellenlänge von 750 nm mit einem Lambda 20 Photometer gemessen. Der Nullabgleich wurde mit einer Probe durchgeführt, die nur Aq. dest enthielt (Leerwert). Standardisiertes Rinderalbumin mit einer Konzentration von 2 mg/ml diente der Erstellung der Eichgeraden.

2.2.9 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Page

2.2.9.1 Vorbereitung der Proben

Die Proben wurden entsprechend ihrer Konzentration dem Volumen einander angeglichen indem sie mit Lämmli-Laufpuffer [0,25 M Tris, 0,2 M Glycin und 1% Natriumdodecylsulfat (pH 8,8)] und 20 µl 2-Mercaptoethanol aufgefüllt wurden. 2-Mercaptoethanol reduzierte und beschwerte die Proben.

Durch anschließendes zehnmütiges Erhitzen bei 92°C im Heizblock wurden die Proteine denaturiert und die Polypeptide an Natriumdodecylsulfat gebunden. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben kurz abzentrifugiert und bis zum Auftragen in die Geltaschen auf Eis gelagert. Als Größenmarker wurde bei allen Gelen ein Rainbow Marker RPN 756 (Amersham) (ohne vorheriges Erhitzen) und für das folgende Western Blot Verfahren ein biotylinierter Protein Marker (ECL) der Firma Biorad International (Erwärmung nur für 5 Minuten) mitgeführt.

2.2.9.2 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine mittels Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) wurde nach der Methode von Lämmli et al. (1970) durchgeführt. Dabei wurde ein diskontinuierliches Gelsystem für das große Elektrophoresesystem der Firma Peqlab/Höfer verwandt, das aus einem unteren Trenngel und oberen Sammelgel bestand. Das 10%-ige Trenngel bestand aus 10 ml 30% Acrylamid-0,8% Bisacrylamid, 7,5 ml 1,5 M Tris HCl (pH 8,8), 11,8 ml Aq. bidest, 0,6 ml 10% Natriumdodecylsulfat und 0,2 ml Ammonium Persulfat. Zu der Beschleunigung der Polymerisation wurden noch 10 µl TEMED hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde zwischen 2 Glasplatten pipettiert und mit Isobutanol zur Glättung der Oberfläche überschichtet. Nach vollendeter Polymerisation wurde das Isobutanol abgeschüttet und die Oberfläche des Trenngels mehrmals mit Aq. dest gespült. Das 3,5%-ige Sammelgel wurde auf die Oberkante des Trenngels gegossen. 20 ml des 3,5%-igen Sammelgels bestanden aus 2,4 ml 30% Acrylamid-0,8% Bisacrylamid, 5 ml Tris-HCl (pH 6,8), 12,1 ml Aq. bidest, 0,2 ml 10% Natriumdodecylsulfat, 0,3 ml

10% Ammonium Persulfat und 10 µl TEMED. Zur Bildung der Probenkammern wurde ein Kamm eingesetzt, der nach abgeschlossener Polymerisation wieder entfernt wurde. In die entstandenen Probenfächer wurden die Proben überführt, nachdem sie zuvor mit Lämmli-Laufpuffer gespült wurden. Die Fächer wurden anschließend mit Lämmli-Laufpuffer überschichtet, das Laufsystem geschlossen und mit der Stromquelle verbunden. Eine Stromstärke von 20 mA für 30-40 Minuten wurde pro Gel verwendet, um die Sammlung der Proteine im oberen Gel zu erreichen. Zur Probenauftrennung wurde eine Stromstärke von 40 mA für ca. 3-5 Stunden gewählt.

2.2.10 Western Blot und Immundetektion

Das Western Blotting wurde nach dem Verfahren von Towbin et al. (1979) durchgeführt. Das Proteingel wurde in eine Transblot-Zelle, die mit Blottingpuffer (3% Borsäure und 20% Methanol bei pH 9,0) gefüllt war, überführt. Dabei wurde das Gel auf eine Nitrocellulosemembran gelegt und von 4 Blatt Blottingpapier und 2 Polstern der zu klappbaren Transferplastik umgeben. Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde über ca. 4 Stunden bei einer Stromstärke von 200 mA vollzogen. Zur Kontrolle wurde die Membran für 5-10 Minuten unter leichtem Schütteln mit Ponceau-S gefärbt und durch mehrmaliges spülen mit Aq. bidest und PBS wieder entfärbt.

Die folgende ECL Immundetektion richtete sich nach der Methode von Whitehead et al. (1979). Die Nitrocellulosemembran wurde über 45 Minuten in Blocklösung (0,1% Tween, 10% Milchpulver in PBS) auf dem Wippen zur Minimierung unspezifischer Antikörperbindungen geschüttelt. Die Membran wurde anschließend 60-90 Minuten lang bei Raumtemperatur mit dem 1. Antikörper behandelt, der in 0,1% Tween und 5% BSA in PBS gelöst war. Die Verdünnung des Antikörpers basierte auf Angaben der jeweiligen Firma bzw. auf Erfahrungswerten. Anschließend wurde die Membran dreimal über 10 Minuten in 0,1% Tween in PBS gewaschen und für 45 Minuten mit dem 2. Antikörper (Anti-IgG-AK an Peroxidase gebunden), der in Blocklösung verdünnt wurde, inkubiert. Vor der eigentlichen Immundetektion wurde die Membran je dreimal in 0,3% Tween, 0,1% Tween und reinem PBS gewaschen. Mit Hilfe des ECL Chemolumineszenz-Kits der Firma Amersham wurde Luminol, von der Peroxidase des 2. Antikörpers oxidiert. Eine maximale Lichtemission bei einer Wellenlänge von 428 nm führte zu einer quantifizierbaren Schwärzung des Röntgenfilms. Der Höhepunkt der Chemolumineszenzreaktion wurde nach 5 bis 20 Minuten erreicht.

2.2.11 Isolierung von humanem LDL und HDL

Die Isolierung von humanem Low Density Lipoproteinen wurde nach der Methode von Havel et al. (1955) durchgeführt. 500 µl Benzamidin wurden 2000 ml Spenderblut zur Beschleunigung der Gerinnung zugesetzt. Anschließend wurde der Serumanteil durch Zentrifugation bei 4.000 U/min für 10 Minuten vom Blutkuchen getrennt und Volumen bestimmt. Zu 1000 ml Serum wurden 5 ml 4% EDTA-Lösung (pH 7,4) zugegeben, um kalziumabhängige Proteasen zu inhibieren. Zur Erhaltung der Keimfreiheit wurden dem Serum je 5 ml 2%-ige Gentamycin-Sulfat-Lösung und 4%-ige Natriumazid-Lösung (pH 7,4) zugesetzt. Zwei aufeinanderfolgende Ultrazentrifugationen im Kaliumbromidgradienten führten zur Separation des LDL und HDL. Die Eigendichte des Serums von 1,006 g/ml wurde durch Zugabe von 27,75 g Kaliumbromid pro 1000 ml Serum auf 1,025 g/ml gesteigert. Das Serum wurde in Quick-Seal-Röhrchen in einem 60 Ti-Rotor 20 Stunden bei 38.000 U/min ultrazentrifugiert und anschließend von dem IDL- und VLDL-haltigen Überstand separiert. Die Bodenfraktion (LDL und HDL) mit einer Dichte von 1,025 g/ml wurde mit 36,932g Kaliumbromid auf eine Dichte von 1,050 g/ml pro 1000 ml Serum erhöht und erneut für 20 Stunden bei 38.000 U/min ultrazentrifugiert. Der LDL-reiche Überstand und die HDL-reiche Bodenfraktion wurden gegen PBS dialysiert und bei 4°C gelagert. Vor dem Gebrauch in Zellkulturexperimenten wurde das LDL- bzw. HDL-Serum vom Kaliumbromid mit Hilfe einer PD-10-Säule befreit, da dieses zelltoxisch ist.

2.2.12 LPDS Herstellung

Fötale Kälberserum (FCS) wurde bei 4°C mit 0,3816 g Kaliumbromid pro Milliliter Serum versetzt, um die Dichte auf 1,24 g/ml zu erhöhen. Das Gemisch wurde 20 Stunden in Quick-Seal-Röhrchen bei 38.000 U/min ultrazentrifugiert. Die Top-Fraktion (lipoproteinreich) wurde verworfen und aus der unteren Hälfte wurde lipoproteinarmes Serum gewonnen, das anschließend viermal mit PBS dialysiert wurde. Anschließend wurde das Serum mit 0,15 M NaCl auf eine Proteinkonzentration von 25 mg/ml verdünnt und vor Gebrauch steril filtriert.

LPDS wurde statt FCS in Nährmedien gebraucht, um unspezifische Bindungen und Stoffwechselverkehr von Lipoproteinpartikeln zu vermindern.

2.2.13 Radioaktive Markierung von LDL mit Tritium

100 µl des kommerziell erworbenen ^3H -Cholesterins (8,125 µg Cholesterin/ml; 42 Curie/mmol) wurden eingedampft und mit 100 µl 2,5% BSA in F12-Medium vermischt. Nach der Zugabe von 1 ml LDL (ca. 5 mg/ml) wurde das Gemisch für mindestens 3 Stunden bei 37° C inkubiert und anschließend über eine PD-10-Säule gereinigt und die spezifische Aktivität des gelabelten LDL bestimmt.

2.2.14 Aufnahme von ^3H -LDL

Radioaktive Aufnahmeexperimente mit ^3H -LDL wurden mit verschiedenen Zelllinien bzw. 24 Stunden nach transientem Gentransfer an CHO-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden vom Nährmedium befreit, kurz mit PBS gewaschen und 20-24 Stunden in LPDS-Nährmedium bei 37°C vorinkubiert, um die Anzahl unspezifischer Bindungsstellen zu reduzieren. Durch den Cholesterinmangel kommt es kompensatorisch zu einer vermehrten Expression des LDL-Rezeptors. Dieser Effekt wird über die Sterol-Responsive-Elements (SREs) vermittelt (Goldstein und Brown, 1990). Durch diese Vorbehandlung kommt es zu einer höheren Zahl der LDL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche der mit LPDS inkubierten Zellen und dadurch zu einer höheren Aufnahme von LDL bei einer Inkubation mit ^3H -LDL.

Die Zellen wurden mit ^3H -LDL im ca. 10-fachen Überschuss inkubiert, wobei die Aufnahme im dreifachen Versuchsansatz durchgeführt wurde. Es folgte eine Internalisation des ^3H -LDL während unterschiedlich langer Inkubationszeiten. Anschließend wurden die Zellen zunächst dreimal mit eiskaltem PBS und zur Ablösung des oberflächengebundenen ^3H -LDL für 5 Minuten mit Heparin in PBS (20 Einheiten/ml) gewaschen. Vor der Überführung in Zählröhrchen wurden die Zellen mit Hilfe von 1 ml 1 N NaOH bei Raumtemperatur vom Boden gelöst und lysiert. In einem Gamma-Counter wurde die aufgenommene Radioaktivität bestimmt, wobei die Werte anschließend entsprechend der Zellproteinkonzentration korrigiert wurden.

Ziel dieser Experimente war das relative Aufnahmemaximum der verschiedenen CHO-Zelllinien zu ermitteln.

2.2.15 Efflux von ^3H -Cholesterin

Nach Aufnahme von ^3H -LDL über Nacht wurde den Zellen das ^3H -LDL-Medium entzogen. Sie wurden je dreimal mit PBS und PBS-Heparin gewaschen und im Folgenden mit LPDS-Medium versetzt. Zusätzlich wurde ihnen HDL als Akzeptor für das internalisierte ^3H -Cholesterin in verschiedenen Konzentrationen angeboten. Nach

unterschiedlicher Inkubationsdauer wurde den CHO-Zellen das Medium entzogen und in Zählröhrchen überführt; ebenso das PBS und Heparin-PBS mit dem die Zellen gewaschen wurden. Anschließend wurden die Zellen mit 1 N NaOH lysiert und die aufgenommene Radioaktivität der Zellen wurde separat bestimmt und proteinkorrigiert.

2.2.16 Immunfluoreszenz (IMF)

2.2.16.1 Beschichtung von Coverslips

Um den Zellen bessere Haftungsmöglichkeiten zu bieten, wurden Coverslips beschichtet. Dazu wurden die Coverslips für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf den Mini-Shaker in eine Mischung aus Silane und Aceton (1 : 50) gestellt. Anschließend wurden die Coverslips für 5 Minuten einmal mit reinem Aceton und zweimal mit Aqua bidest gewaschen, an der Luft getrocknet und für mindestens 4 Stunden mittels einer UV-Lampe sterilisiert, bis sie gebrauchsfertig waren.

2.2.16.2 Ausplattieren der Zellen

Es wurden nach dem üblichen Vorgehen ca. 100-200 Zellen in eine 12-well-Vertiefung, die je ein beschichtetes Coverslip enthielt, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen entsprechend der Experimente weiter bearbeitet oder direkt auf den Coverslips fixiert.

2.2.16.3 Immunfluoreszenz

Die Zellen auf den Coverslips wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen und anschließend mit 100% Methanol für 2,5 Minuten bei -20°C fixiert. Es folgte eine weitere Waschung mit PBS für 5 Minuten. Die Coverslips wurden dann in eine abgedunkelte Schale überführt und mit je 60 µl Blocklösung (PBS mit 0,5% Glycin und 1% BSA) für 20-60 Minuten bei Raumtemperatur bedeckt. Die 1. Antikörperverdünnungen wurden nach Herstellerangaben oder nach Erfahrungswerten mit der Blocklösung hergestellt und auf die Coverslips geschichtet, die dann für 60 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Coverslips zweimal für 5 Minuten bei Raumtemperatur in PBS gewaschen bis sie mit der 2. Antikörperlösung für 45 Minuten bei 37°C bedeckt wurden. Diese Verdünnung betrug immer 1 : 250. Es folgte wieder ein dreimaliges Waschen mit PBS für je 5 Minuten, eine Zellkernfärbung mit Hilfe von DAPI (5 µl DAPI in 50 ml PBS) für 3 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend dreimaliges Waschen mit PBS. Die

Coverslips wurden auf Objektträger mit Hilfe von 3-5 µl eines PPD-Mowiol-Mixes (Verhältnis 1 : 5) eingedeckelt und mit Nagellack umrandet, um die Zellen vor dem Austrocknen zu schützen. Die fluoreszierenden Zellstrukturen wurden dann im Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe des 100er Objektivs und Ölemulsion betrachtet.

2.2.17 Lipid Raft Präparation

Die Zellen wurden in 6-wells ausplattiert und am nächsten Tag nach Waschung mit PBS über 24 Stunden in LPDS-Medium und am nächsten Tag in LPDS mit 50 µg/ml ³H-LDL inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS und zweimal mit PBS-Heparin gewaschen. Die Zellen wurden nun in 1 ml PBS vom Boden der 6-wells abgeschabt, in Eppendorf-Hütchen überführt und kurz abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 300 µl Lysispuffer [10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM DDT und 5 mM EGTA (pH 7,5)] und PIC (Verhältnis 1000 : 1) gelöst. Das Gemisch wurde 30 Minuten bei 4 °C gerollt und anschließend mit 200 µl Optipräp (Nycomed Pharma) versetzt und in Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Dieses Gemisch wurde mit 600 µl 30%-igem, 600 µl 25%-igem und 400 µl 5%-igem Optipräp überschichtet und 4 Stunden bei 55.000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden von oben 9-10 Fraktion von je 200 µl abpipettiert und einzeln im Gamma-Counter quantifiziert.

3 Ergebnisse

Die Rolle des Caveolin und des Annexin VI bei Endo- und Exozytoseprozessen von LDL/Cholesterin wurde im Rahmen dieser Arbeit auf verschiedenen Ebenen untersucht.

Im ersten Teil wurde zunächst das Aufnahmemaximum von LDL in verschiedenen Zelllinien ermittelt, um im Anschluss mittels radioaktiver Assays die Auswirkung der unten beschriebenen Mutationen auf den Efflux von Cholesterin genauer studieren zu können.

Die Identifikation der Lokalisation von Caveolin und Annexin und die mögliche Co-Lokalisation der beiden Proteine beim Cholesterin- und efflux ist Schwerpunkt des zweiten Teils dieser Arbeit und wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenzen untersucht. Lipid Raft Präparationen dienen der Klärung der intrazellulären Lokalisation von Cholesterin nach LDL/Cholesterin Internalisation.

3.1 Übersicht der CHO-Zelllinien

3.1.1 CHO-Wildtyp(WT)-Zellen

CHO-WT-Zellen bezeichnen Zellen, die vom Ovar des Chinesischen Hamsters präpariert und kultiviert wurden. Es wurde mit Fibroblasten ähnlichen CHO-Zellen gearbeitet, wobei man generell Epithel ähnliche, Fibroblasten ähnliche und Epithel und Fibroblasten ähnliche CHO-Zellen unterscheidet. Sie zeichnen sich durch eine gute Kultivierbarkeit aus und haben sich schon in der Vergangenheit bewährt, um Zellstrukturen und Endo- und Exozytosevorgänge zu studieren (Pons et al., 2001; Grewal et al., 2000; Moringa et al., 2001).

CHO-WT-Zellen besitzen physiologisch nur geringe Mengen von endogenem Annexin VI; dies wird in diesem Kapitel durch Western Blot Untersuchungen und Immunfluoreszenzen dargestellt. Caveolin hingegen besitzen CHO-WT-Zellen quantitativ in höherem Ausmaß, was sich ebenfalls in den Western Blot Untersuchungen und Immunfluoreszenzen zeigen lässt.

3.1.2 CHO-anxVI-Zellen

Um die Rolle des Annexin VI im Rahmen der Endozytose und sekretorischen Vorgängen studieren zu können, wurde mit speziellen CHO-Zellen gearbeitet, die Annexin VI aus der Ratte überexprimieren. Die Annexin VI cDNS der Ratte wurde aus der Leber isoliert und in pGEMT subkloniert. Die kodierende Region wurde mit Hilfe

der PCR-Technik amplifiziert, um ein 2,0 Kilobasenpaare großes anxVI cDNS Fragment zu erzeugen, das wiederum in den Expressionsvektor von Mammazellen geklont wurde (pcDNS3,1+), um anxVI pcDNS zu erzeugen. Die DNS-Sequenzanalyse wurde mit „Dye Terminator Sequencing reaction kit“ mit T7, SP6 und anxVI Primern durchgeführt, die die Wildtyp Ratten anxVI cDNS Sequenz in der anxVI pcDNS bestätigten. Alle klonierenden Vorgänge wurden nach den allgemeingültigen Protokollen durchgeführt.

Zur Herstellung der anxVI überexprimierenden Zelllinie wurden CHO-Zellen ausplattiert und mit 10 µg, der oben beschriebenen DNS, die eine Resistenz gegenüber G-418 besitzt, transfiziert. Um die Zellen selektionieren zu können, die das Annexin VI überexprimieren (CHO-anxVI-Klon), wurde sie mit G-418 versetzt. Einzelne Zellklone wurden auf diese Weise gezüchtet und auf die Expression des Gens hin überprüft. Dieser Zellklon wurde von der Arbeitsgruppe Grewal (Hamburg) hergestellt und kultiviert und mir für weitere Experimente zur Verfügung gestellt.

3.1.3 CHO-Caveolin-Mutanten

3.1.3.1 CHO-Cav1(WT)-Zellen

Auch bei dieser Zelllinie handelt es sich um Zellen, die ein spezielles Protein, in diesem Falle das Caveolin 1, überexprimieren. Sie wurden auf die gleiche Art und Weise hergestellt, wie der CHO-anxVI-Klon. Die 600 Basenpaare lange Cav1 cDNS, die uns freundlicherweise von Prof. Parton (Brisbane, Australien) zu Verfügung gestellt wurde, wurde in einen Expressionsvektor kloniert und mit einem Epitop, dem VSV-G (Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein) versehen. Dieser Zellklon wurde ebenfalls auf seine Überexpression hin überprüft (3.2.1).

3.1.3.2 CHO-Cav3(DGV)-Zellen

Bei dieser dominant negativen Mutante liegt eine Deletion der ersten 53 Aminosäuren am N-terminalen Ende des Caveolin 3 vor. Die Reste 54-151 bleiben erhalten und das Caveolin 3 besitzt somit noch eine intakte Scaffolding Domäne. Am COOH-Ende ist es mit HA markiert. Cav3(DGV) wurde mit Hilfe der folgenden Primer erzeugt: 5' CGGGGTACCATGAATGAGGACATTGTGAAG 3'; als reverser Primer diente RORrev 5' CCGGAATTCTTAGCCTTCCCTTCGCAGCACACCTT 3'. Die resultierende Mutante wurde in pCB6-KXHA, einem Derivat des eukaryontischen Expressionvektors pCB6, geklont, der das Hämagglutinin-Epitop (YPYDVPDYA) besitzt. Diese DNS wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Parton (Brisbane,

Australien) zur Verfügung gestellt, um die Zelllinie zu klonieren. Der spezifische Nachweis gelang ebenfalls im Western Blot, in dem das Hämagglutinin-Epitop dargestellt werden konnte (3.2.2).

3.1.3.3 CHO-Cav1(DGI)-Zellen

Diese Mutation im physiologisch längeren Caveolin 1 ist äquivalent zu dem der Cav3(DGV) Mutation. Es handelt sich um eine Deletion von 81 Basenpaaren an der NH₂-terminalen Domäne. Auch hier bleibt die Scaffolding Domäne intakt. Die Reste 82-178 sind erhalten. Diese mutierte cDNS wurde in einen Cytomegalievirus (CMV) negativen Expressionsvektor kloniert und mit einem Hämagglutinin-Epitop (HA) versehen. Freundlicherweise wurde uns auch diese DNS von der Arbeitsgruppe Parton (Brisbane, Australien) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie wurde nach dem oben beschriebenen Verfahren kloniert. Der spezifische Nachweis gelang im Western Blot, in dem das Hämagglutinin-Epitop dargestellt wurde (3.2.2).

Bei all den Zellklonen, die in 3.1.2 und 3.1.3 beschrieben wurden, handelt es sich um stabil exprimierende und neomycinresistente Zellen; im Gegensatz zu den CHO-WT-Zellen, die die Eigenschaft der Neomycinresistenz nicht besitzen.

3.2 Nachweis und Charakterisierung von Caveolin

3.2.1 Nachweis der Caveolin-Expression in verschiedenen Zelllinien

CHO-WT-Zellen, CHO-Cav1(WT)-, CHO-Cav1(DGI)- und CHO-Cav3(DGV)-Zellen wurden in 6-well-Mehrfachkulturschalen ausplattiert mit dem Ziel die Expression von Caveolin darzustellen. Die Zellen wurden lysiert und die Zellproteine mit Hilfe von Solubilitätspuffer gewonnen. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt und gleiche Proteinmengen wurden auf ein 10%-iges SDS-Page aufgetragen. Im Anschluss an den Western Blot erfolgte der Nachweis der Expression von Caveolin mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers (Abbildung 1).

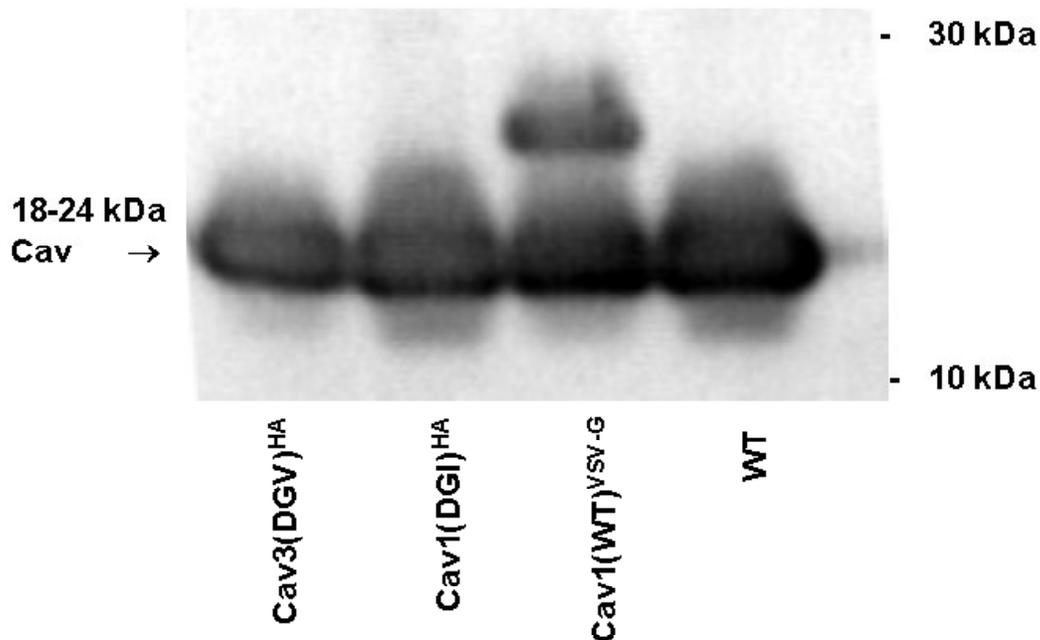


Abbildung 1: In diesem Ansatz wurden pro Spur 70 µg Proteinextrakte in reduziertem Zustand auf ein 10%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Größenmarker wurde ein biotinylierter Proteinmarker verwendet (nicht dargestellt). Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde mit einem Kaninchen-Anti-Caveolin-Antikörper (18-24 kDa) inkubiert. Zu sehen ist die ECL-Detektion (Belichtungsdauer 2 Sekunden).

In Abbildung 1 erscheinen alle Signale auf Höhe der 18-24 kDa-Marke, was für die Caveolin-Mutanten zu erwarten war. In der Spur des CHO-WT stellt sich das endogene Caveolin dar; in der Spur der CHO-Cav1(DGI)- und CHO-Cav3(DGV)-Zellen wird die Expression des endogenen und des mutierten Caveolins detektiert. In der Spur der CHO-Cav1(WT)-Zellen ist die Expression des endogenen Caveolins und des klonierten Caveolins zu sehen.

3.2.2 Nachweis des Hämagglutinin-Epitops in CHO-Cav1(DGI)- und CHO-Cav3(DGV)-Zellen

Die hier untersuchten CHO-WT-, CHO-Cav1(WT)-, CHO-Cav1(DGI)- und CHO-Cav3(DGV)-Zellen wurden ebenfalls in 6-well-Mehrfachkulturschalen ausplattiert. Es sollte das Hämagglutinin-Epitop der CHO-Cav1(DGI)- und der CHO-Cav3(DGV)-Zellen dargestellt werden. Als Negativkontrolle wurden die CHO-WT- und CHO-Cav1(WT)-Zellen verwendet, da diese kein Hämagglutinin-Epitop besitzen. Die Zellproteine wurden mit Hilfe von Solubilitätspuffer gewonnen, einer

Konzentrationsbestimmung unterzogen und anschließend durch Western Blot und Immundetektion auf die Expression des Hämagglutinins hin untersucht (Abbildung 2).

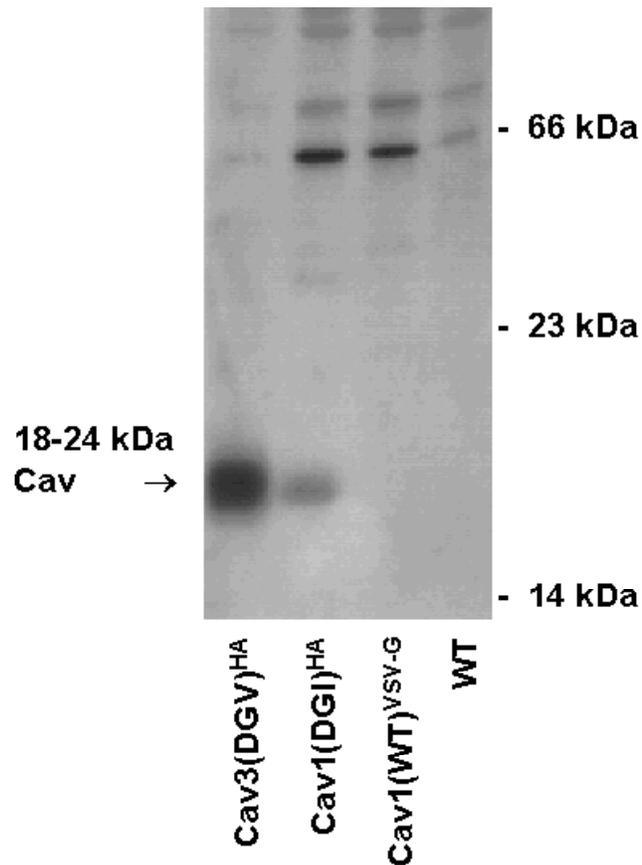


Abbildung 2: In diesem Ansatz wurden pro Spur 70 µg Proteinextrakte in reduziertem Zustand auf ein 10%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Größenmarker wurde ein biotinylierter Proteinmarker verwendet (nicht dargestellt). Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde der Ansatz mit einem Ratte-Anti-Hämagglutinin-Antikörper (18-24 kDa) inkubiert. Zu sehen ist die ECL-Detektion (Exponat über Nacht).

Sowohl das Hämagglutinin der CHO-Cav1(DGI)-Zellen, als auch der CHO-Cav3(DGV)-Zellen sind in den jeweiligen Spuren deutlich zu erkennen. Die unterschiedliche Stärke der Signale kann durch die unterschiedliche Stabilität der Proteine begründet werden. Da es in den Negativkontrollen nicht zu ähnlichen Signalen in den jeweiligen Proteingrößenordnungen kommt, ist die Expression des Hämagglutinins und damit die Spezifität des Klones gezeigt.

Der Cav1(WT)-Klon besitzt ein VSV-G-Epitop, das aber aufgrund des Fehlens eines spezifischen Antikörpers nicht genauer detektiert werden konnte. Die in Abbildung 1 zu sehende Doppelbande, weist aber auf ein weiteres Caveolinprodukt des CHO-Cav1(WT)-Klons hin.

3.3 Nachweis von Annexin VI in verschiedenen CHO-Zelllinien

Diese Versuchsreihe diente dem Nachweis der Überexpression von Annexin VI in CHO-Zellen: dazu wurden CHO-anxVI- und CHO-WT-Zellen neben den Caveolin-Zellklonen in 6-well-Mehrfachkulturschalen ausplattiert. Anschließend wurden Zellproteine mit Hilfe von Solubilitätspuffer gewonnen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem Verfahren nach Lowry durchgeführt, um vergleichbare Proteinmengen im Western Blot Verfahren und anschließender Immundetektion auf die Expression hin untersuchen zu können. Als Antikörper wurde in dieser Testreihe ein gegen das Annexin VI der Ratte gerichteter Antikörper verwendet.

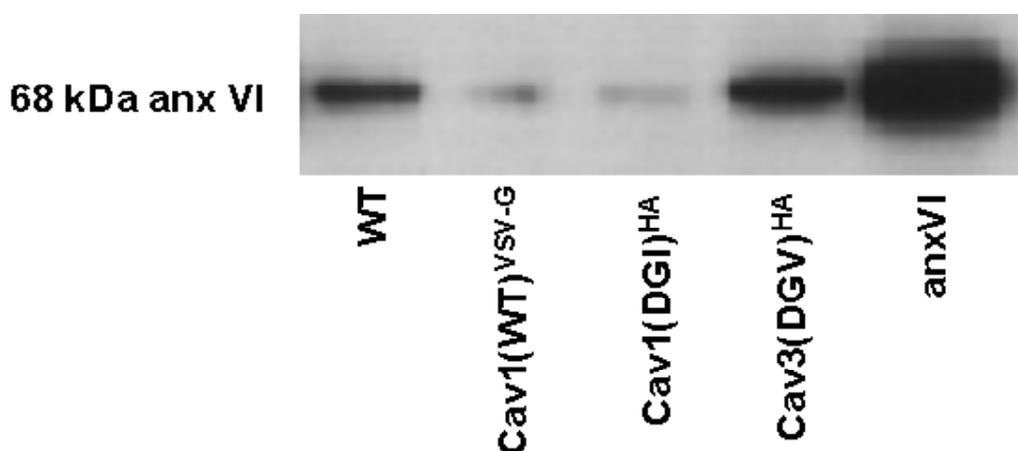


Abbildung 3: In diesem Ansatz wurden pro Spur 70 µg Proteinextrakte in reduziertem Zustand auf ein 10%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Größenmarker wurde ein biotinylierter Proteinmarker verwendet (nicht dargestellt). Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde der eine Ansatz mit einem Schaf-Anti-Annexin-Antikörper (68 kDa) inkubiert. Zu sehen ist die ECL-Detektion (Exponat über Nacht).

Der CHO-anxVI-Klon zeigt in seiner Spur eine deutliche Überexpression des 68 kDa großen Annexin-Proteins verglichen mit den anderen Zelllinien. Dieses starke Annexin VI-Signal, verglichen mit dem relativ schwachen Signal in den anderen Zellen, lässt darauf schließen, dass die Überexpression des Annexin VI im Klon von hoher Effizienz ist.

In der Spur der CHO-WT-Zellen lässt sich das endogene Annexin VI erkennen. Die CHO-Cav1(WT)- und CHO-Cav1(DGI)-Zellen zeigen in ihrer Spur nur ein schwaches Signal für das Annexin VI. Es bleibt daher zu vermuten, dass die Klonierung mit der Cav1(WT)-DNS bzw. der Cav1(DGI)-DNS zu einer Repression des Annexin VI führt.

In der Spur der CHO-Cav3(DGV)-Zellen kommt es dagegen zu einem deutlichen Signal auf Höhe der 68 kDa Marke. Dieses Ergebnis widerspricht der Vorstellung, dass es durch die Klonierung mit der veränderten DNS, die für das Caveolin kodiert, zu einer Repression des Annexin VI kommt. Es ist wahrscheinlich, dass es durch unsauberes Auftragen der Proteinextrakte in die Geltaschen zu einem Überlaufen der reduzierten Extrakte der CHO-anxVI-Zellen in die Tasche der CHO-Cav3(DGV)-Zellen gekommen ist, was ein starkes Signal in der Spur der CHO-Cav3(DGV)-Zellen zur Folge hat. Weiterhin bleibt zu beachten, dass die Expression einzelner Proteine der unterschiedlichen Zellklone einer natürlichen Schwankung unterliegt.

3.4 Aufnahmekinetik von ^3H -LDL in HuH7-WT- und HuH7-Cav3(DGV)-Zellen

Zur Ermittlung eines relativen Aufnahmemaximums (Sättigung) von ^3H -LDL wurden beide Zelllinien ein Aufnahmeexperiment unterzogen, indem die Aufnahmezeit von 8 bis 48 Stunden variiert wurde. Dieser Versuch diente als Vorversuch für folgende Effluxexperimente, um den Zeitpunkt zu ermitteln, an dem die Zellen mit ^3H -LDL gesättigt sind. Dies ist wichtig, um spezifisch nur die Vorgänge zu untersuchen, die am ^3H -Cholesterinefflux beteiligt sind. Das Ergebnis des Aufnahmeexperimentes ist in Abbildung 4 dargestellt.

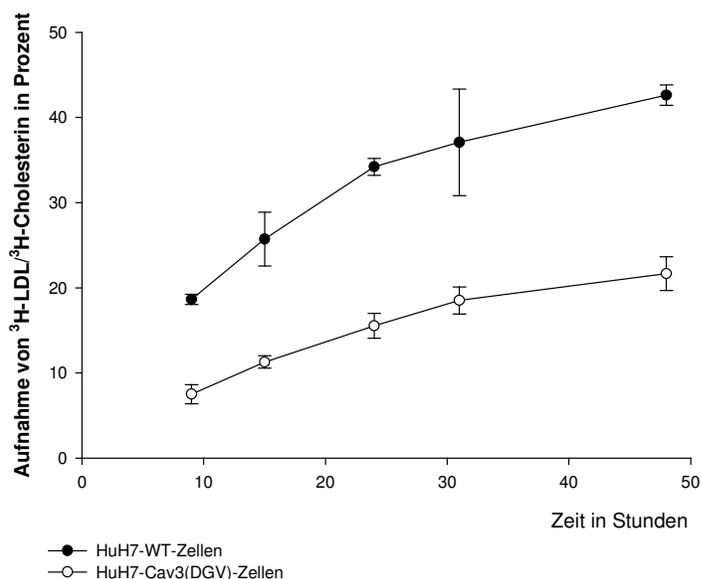


Abbildung 4: ^3H -LDL-Aufnahme in HuH7-WT- und HuH7-Cav3(DGV)-Zellen nach unterschiedlicher Inkubationsdauer und LPDS-Präinkubation (Lipoprotein-depletiertes Serum). Jeder Wert ist als Mittelwert von drei Werten innerhalb des selben Experimentes berechnet. Nach Bestimmung der zellassozierten und nicht-zellassozierten Radioaktivität erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit eine Proteinbestimmung und die Korrektur auf Cpm/ μg Zellprotein.

Nach 24 Stunden ist von den Zellen ausreichend Cholesterin aufgenommen worden, um im Anschluss den Efflux messen zu können, woraufhin eine 24 Stunden Inkubation mit ^3H -LDL gewählt wurde, um die Zellen für die folgenden Effluxexperimente zu beladen.

Für die Folgeexperimente war es jedoch nicht ausschlaggebend, Unterschiede im Zeitverhalten bei der Aufnahme innerhalb der verschiedenen Zelllinien herauszuarbeiten, sondern lediglich einen Zeitpunkt zu ermitteln, an dem die Zellen eine relativ große Menge an ^3H -LDL aufgenommen hatten. Die Zunahme der ^3H -LDL-Internalisation nach 30 oder 48 Stunden gegenüber 24 Stunden wurde als nicht mehr signifikant eingeschätzt, so dass eine 24-stündige Beladungszeit für die weiteren Experimente gewählt wurde. Außerdem sprach gegen eine längere Aufnahmezeit, dass die Zellen zu dicht zusammenwachsen würden und es zu einem programmierten Zellsterben käme. Es lägen damit keine Bedingungen mehr vor, die dem physiologischen Stoffwechsel entsprechen würden.

Während der Experimente stellte sich heraus, dass für die anschließenden Effluxexperimente nicht mehr mit HuH7-Zellen gearbeitet werden konnte, da die Zellklone in der Zellkultur eine kurze Lebensdauer besaßen und abstarben. Aufgrund der Schwierigkeiten in der Kultivierung der HuH7-Zellen, wurden die weiteren Versuche mit CHO-Zellen durchgeführt. (Dieser Vorversuch wurde parallel mit CHO-WT- und CHO-anxVI-Zellen mit ähnlichen Ergebnissen in der Arbeitsgruppe durchgeführt.)

3.5 Konzentrationsabhängiger HDL stimulierter Cholesterinefflux von ^3H -Cholesterin in CHO-WT-, CHO-Cav1(WT)-, CHO-Cav1(DGI)- und CHO-Cav3(DGV)-Zellen

Eine wichtige Frage ist, ob es aufgrund der Mutationen bzw. Überexpression des Caveolins zu einer Änderung der Effluxfähigkeit in den einzelnen Zelllinien, die in Kapitel 3.1 beschrieben wurden, kommen kann. Bekannt ist, dass Caveolin ein cholesterinbindendes Protein ist und Cholesterin im Rahmen des Effluxes vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert. Es sollte herausgefunden werden, ob es speziell bei den Deletionsmutanten Cav1(DGI) und Cav3(DGV) durch Expression eines defekten Caveolins zu einer Verminderung des Cholesterineffluxes kommt. Umgekehrt sollte beobachtet werden, ob die Überexpression von Caveolin 1 [Cav1(WT)] eine Steigerung des Cholesterineffluxes bewirken kann.

3.5.1 Versuchsdarstellung der Effluxexperimente

Die CHO-Zelllinien wurden nach Präinkubation mit LPDS über 24 Stunden mit ^3H -LDL (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Anschließend wurde ihnen über 4, 8 und 24 Stunden ein extrazellulärer Akzeptor (HDL) zur Abgabe des internalisierten ^3H -Cholesterins in unterschiedlicher Konzentration (5 μg , 50 μg und 100 μg pro ml Medium) angeboten. Abbildung 5 verdeutlicht exemplarisch, dass aufgrund des Überangebotes von ^3H -LDL die untersuchten Zellen je nach ihrer spezifischen Fähigkeit das angebotene ^3H -LDL zu unterschiedlichen Mengen aufnehmen und intrazellulär verteilen.

Versuchsdurchführung:

Jeweils 5×10^4 CHO-Zellen wurden pro Vertiefung in eine Zwölflochplatte ausplattiert und mit Zellkulturmedium über 24 Stunden inkubiert. Das Zellkulturmedium enthielt 10%-iges FCS, 5% Glutamin und 5% Penicillin und Streptomycin. Nach dieser Wachstumsphase wurden die Zellen zweimal mit PBS gespült und im nächsten Schritt für weitere 24 Stunden mit einem Zellkulturmedium bedeckt, das statt des FCS nun LPDS enthielt. Die Präinkubation mit LPDS sollte die Cholesterinkonzentration in den Zellen reduzieren, um so eine erhöhte Aufnahme von ^3H -Cholesterin zu gewährleisten und unspezifischen Transport von nicht markiertem LDL/Cholesterin zu minimieren. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen sowohl mit PBS, als auch mit PBS-Heparin gewaschen, um oberflächengebundenes ^3H -LDL vom LDL-Rezeptor an der Zelloberfläche zu lösen. Die Zellen wurden nun mit LPDS-Zellkulturmedium versetzt, das verschiedene Konzentrationen (5, 50 und 100 μg) HDL enthielt, das als extrazellulärer Akzeptor für internalisiertes ^3H -Cholesterin diente. Nach verschiedenen Inkubationszeitpunkten (4, 8 und 24 Stunden) wurde szintillatorisch bestimmt, welche Mengen ^3H -Cholesterin die Zellen ausschleusen konnten und welche Menge von ^3H -LDL bzw. ^3H -Cholesterin sich noch in den Zellen befand. Alle gemessenen Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit anschließend auf μg Zellprotein pro μl korrigiert.

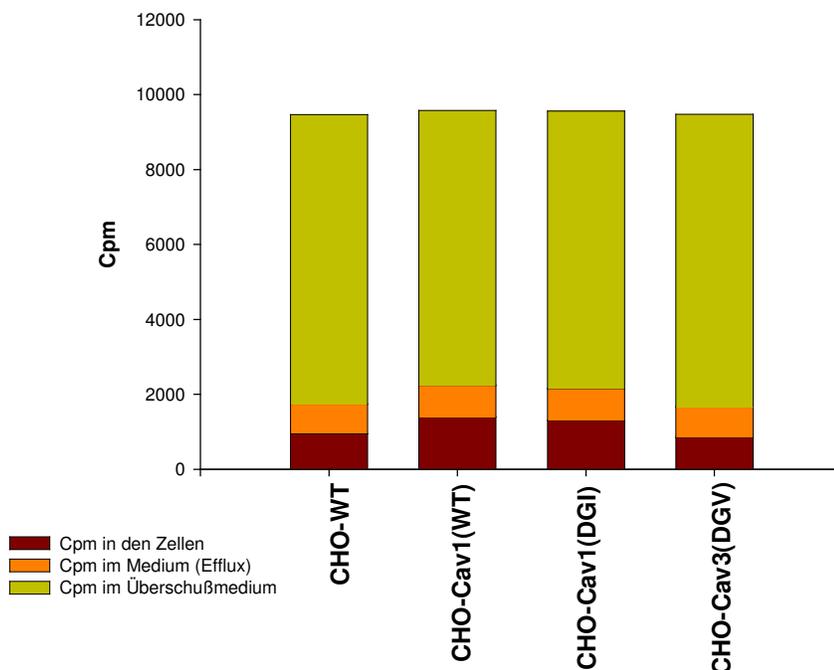


Abbildung 5: ^3H -LDL/ ^3H -Cholesterinverteilung in den verschiedenen Kompartimenten (Überschussmedium, im abgegeben Medium (Efflux) und in den Zellen) nach 24 Stunden ^3H -LDL-Aufnahme. Die Zellen haben ca. 20% des angebotenen ^3H -LDL internalisiert. Anschließend wurde die Menge bestimmt, die sie in 8 Stunden an einen extrazellulären Akzeptor (HDL), der mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Medium vorlag, übertragen konnten.

Jeder Wert ist als Mittelwert von drei Werten innerhalb des selben Experimentes berechnet. Nach Bestimmung der zellassozierten und nicht-zellassozierten Radioaktivität erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit eine Proteinbestimmung und die Korrektur auf Cpm/ μg Zellprotein.

Dargestellt in Abbildung 5 ist die Menge des mit Tritium markierten Cholesterins (ca. 10.000 Cpm pro Vertiefung), das den Zellen zur Aufnahme angeboten wurde. Die Zellen waren je nach Typ in der Lage 1/5-1/10 des angebotenen ^3H -LDL zu internalisieren (Medium und Zellen). Da in dieser Arbeit jedoch als Schwerpunkt der Efflux und nicht die Internalisation von LDL bearbeitet werden soll, wurde auf weitere Untersuchung verzichtet. Nach der Inkubation mit HDL konnten die Zellen einen Teil des internalisierten ^3H -LDL in Form von ^3H -Cholesterin aus der Zelle schleusen und auf HDL übertragen (Medium). Ein Rest des ^3H -LDL bzw. ^3H -Cholesterins verblieb in den Zellen.

3.5.2 ^3H -Cholesterinefflux mit 5, 50 und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HDL als Akzeptor

Wie in den vorherigen Experimenten wurden jeweils 5×10^4 CHO-Zellen pro Vertiefung in eine Zwölflochplatte ausplattiert und mit Zellkulturmedium 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 24 Stunden mit LPDS-Zellkulturmedium und ^3H -LDL bedeckt und nach dieser Inkubation sowohl mit PBS, als auch mit PBS-Heparin

gewaschen. Die Zellen wurden nun mit LPDS-Zellkulturmedium versetzt, das 5, 50 bzw. 100 µg HDL pro ml LPDS enthielt und als extrazellulärer Akzeptor für internalisiertes ^3H -Cholesterin dient. Nach je 4, 8 bzw. 9 und 24 Stunden Inkubation wurde szintillatorisch bestimmt, welche Mengen ^3H -Cholesterin die Zellen ausschleusen konnten und welche Menge von ^3H -LDL bzw. ^3H -Cholesterin sich noch in den Zellen befanden. Alle gemessenen Werte wurden anschließend auf µg Zellprotein pro µl korrigiert.

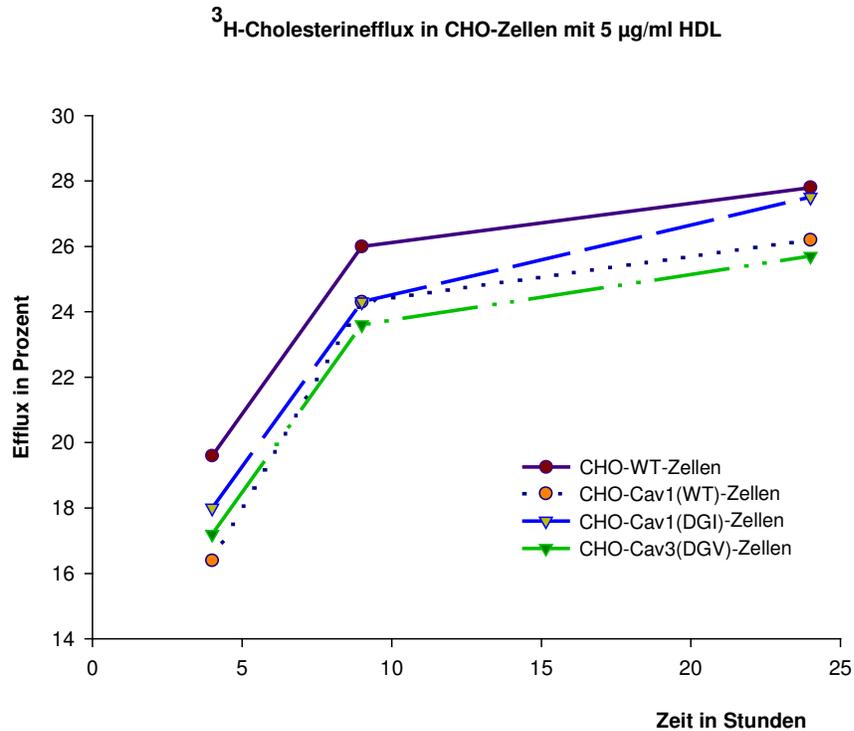


Abbildung 6

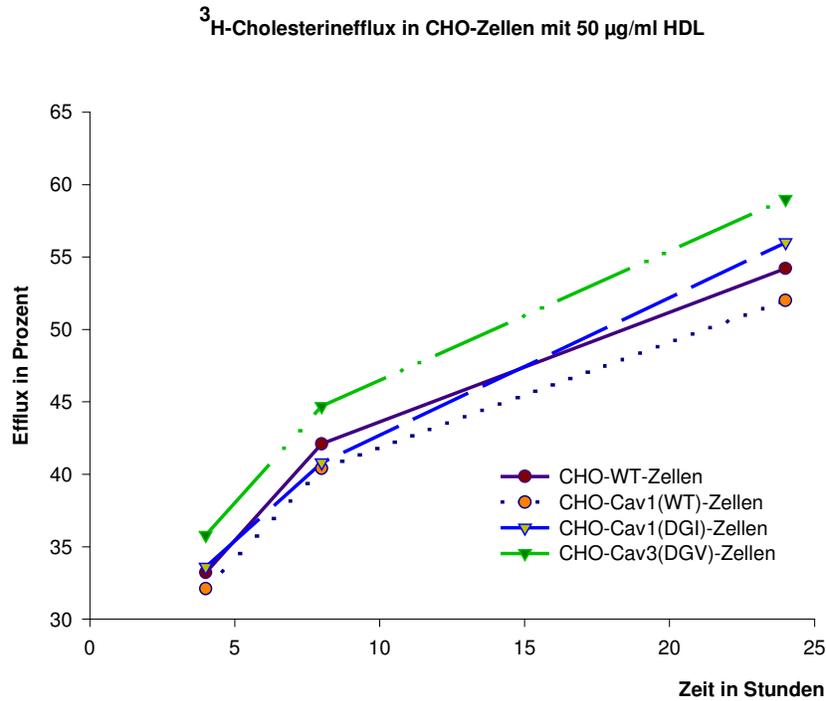


Abbildung 7

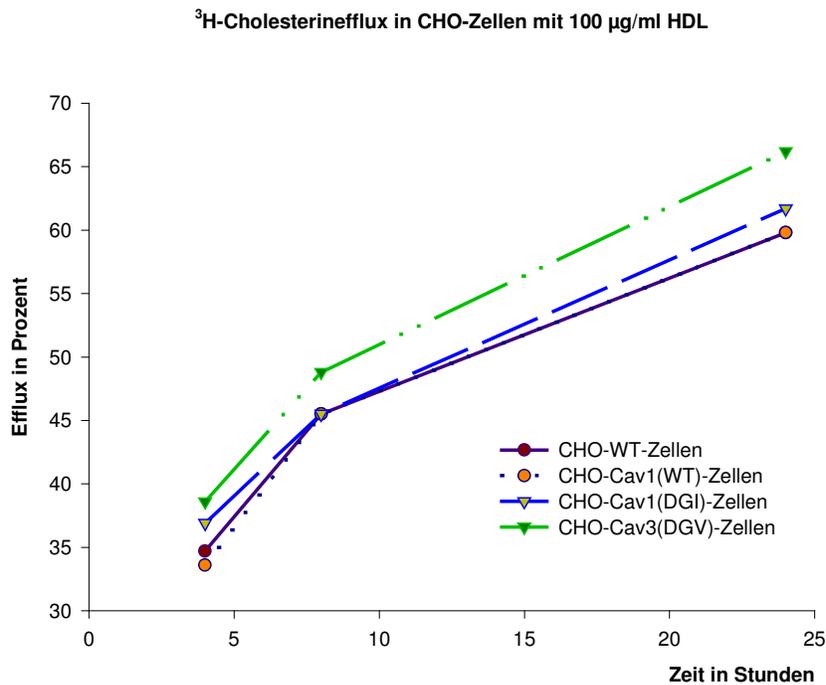


Abbildung 8

Abbildung 6-8: ³H-Cholesterinefflux in CHO-WT-, CHO-Cav1(WT)-, CHO-Cav1(DGI)- und CHO-Cav3(DGV)-Zellen nach LPDS- und LDL-Präinkubation (LPDS = Lipoprotein-depletiertes Serum) und 4, 8 bzw. 9 und 24 Stunden Inkubation mit 5, 50 bzw. 100 µg HDL. Jeder Wert berechnet sich als Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in 3-fach Bestimmung durchgeführt wurden (Standardabweichungen sind in den Abbildungen 10a-c mitaufgetragen.) Nach Bestimmung der zellassoziierten und nicht-zellassoziierten Radioaktivität erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit eine Proteinbestimmung und die Korrektur auf Cpm/µg Zellprotein.

Bei der Inkubation mit 5 µg HDL haben alle Zellarten nach 4 Stunden ca. 16-20% des aufgenommenen ^3H -LDL als ^3H -Cholesterin aus der Zelle ausschleusen können, nach 9 Stunden ca. 23-26% und nach 24 Stunden ca. 25-28%. Die relative Zunahme des Effluxes ist in der Zeit von 4-9 Stunden deutlicher ausgeprägt, als in der Zeit von 9-24 Stunden. D. h., dass die Zelle in den ersten Stunden nach HDL-Zugabe die Hauptmenge des internalisierten ^3H -Cholesterins aus der Zelle ausschleust. Weiterhin bleibt festzuhalten, dass die CHO-WT-Zellen während der ganzen Zeit geringfügig höhere Mengen des ^3H -Cholesterin abgeben können, als die CHO-Cav-Mutanten, die während der Inkubation über die ganze Zeit ähnliche Mengen aus der Zelle ausschleusen.

Bei der Inkubation mit 50 µg HDL haben alle Zellarten nach 4 Stunden ca. 32–36% des aufgenommenen ^3H -LDL als ^3H -Cholesterin aus der Zelle ausschleusen können, nach 8 Stunden ca. 39-45% und nach 24 Stunden ca. 52-58%. Die relative Zunahme des Effluxes ist in der Zeit von 4-9 Stunden gegenüber der Inkubationszeit von 9-24 Stunden nicht mehr so stark ausgeprägt wie bei der Inkubation mit 5 µg HDL. Diese Versuchsreihe zeigt, dass die CHO-Cav3(DGV)-Zellen geringfügig höhere Mengen des ^3H -Cholesterin abgeben, als die andere CHO-Cav-Mutante und die CHO-WT-Zellen. Die CHO-Cav1(WT)-Zellen können die geringsten Mengen ^3H -Cholesterin abgeben. Unterschiede werden aber als sehr gering betrachtet.

Bei der Inkubation mit 100 µg HDL haben alle Zellarten nach 4 Stunden ca. 33-38% des aufgenommenen ^3H -LDL als ^3H -Cholesterin aus der Zelle ausschleusen können, nach 8 Stunden ca. 43-48% und nach 24 Stunden ca. 57-66%. Die relative Zunahme des Effluxes ist in der Zeit von 4-9 Stunden gegenüber der Inkubationszeit von 9-24 Stunden ebenfalls nicht mehr so stark ausgeprägt wie bei der Inkubation mit 5 µg HDL. Während dieser Versuchsreihe konnten ebenfalls wieder die CHO-Cav3(DGV)-Zellen geringfügig höhere Mengen des ^3H -Cholesterin abzugeben, als die andere CHO-Cav-Mutante und die CHO-WT-Zellen. Die CHO-Cav1(WT)-Zellen konnten die geringsten Mengen ^3H -Cholesterin abgeben.

3.5.3 Zusammenfassung des Effluxexperimentes

Die Abbildungen 9a-c fassen zusammen, wie der ^3H -Cholesterinefflux jeder untersuchten Zelllinie mit steigendem HDL-Angebot (5, 50 und 100 µg/ml HDL) zunimmt. Im Gegensatz zu den Abbildungen 6-8 bei denen die Darstellung der ^3H -Cholesterinefflux-Zunahme über die Zeit gewählt wurde.

Zu erwähnen bleibt, dass aufgrund des komplexen experimentellen Ansatzes mit den 4 verschiedenen Zelllinien kein Ansatz ganz ohne Akzeptor durchgeführt wurde. Generell unterscheiden sich nicht HDL-inkubierte Zellen nicht in ihrer Fähigkeit Cholesterin passiv aus der Zelle an das Medium abzugeben (Arbeitsgruppe Grewal, Hamburg, nicht veröffentlicht).

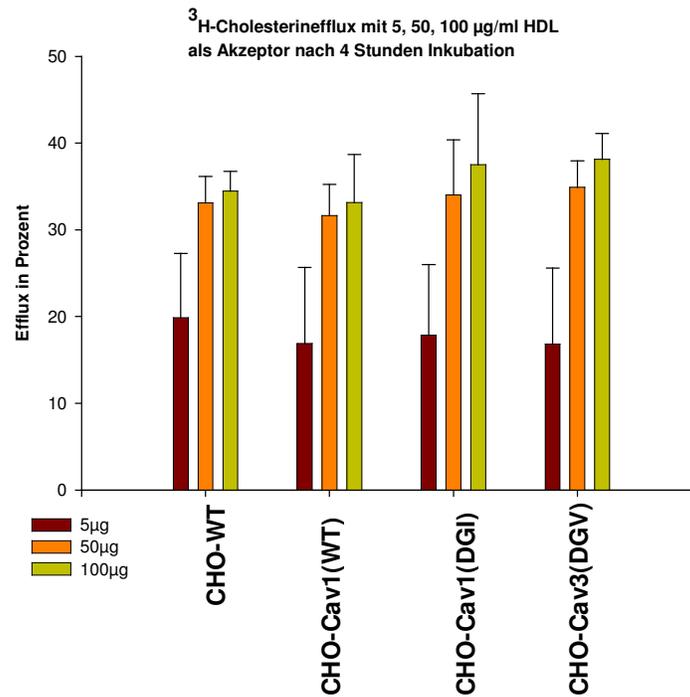


Abbildung 9a

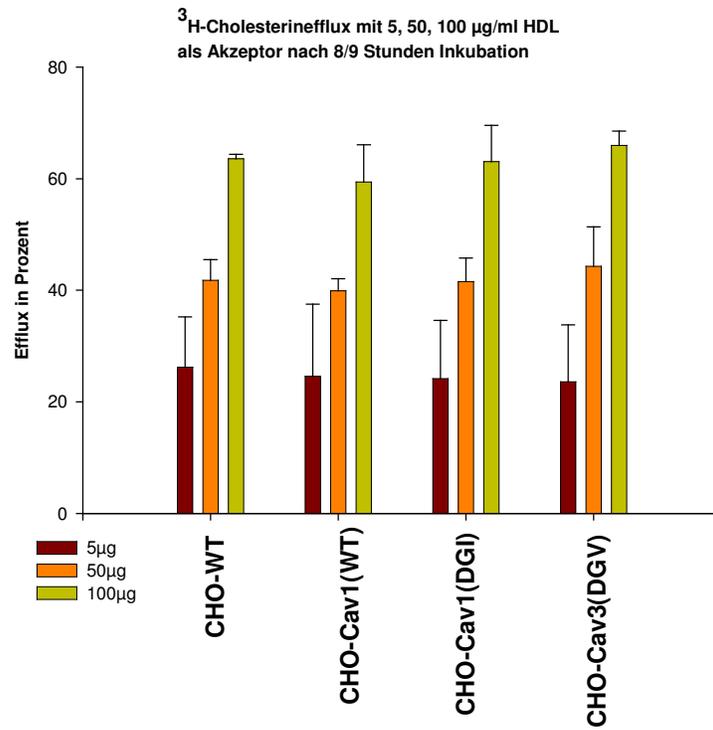


Abbildung 9b

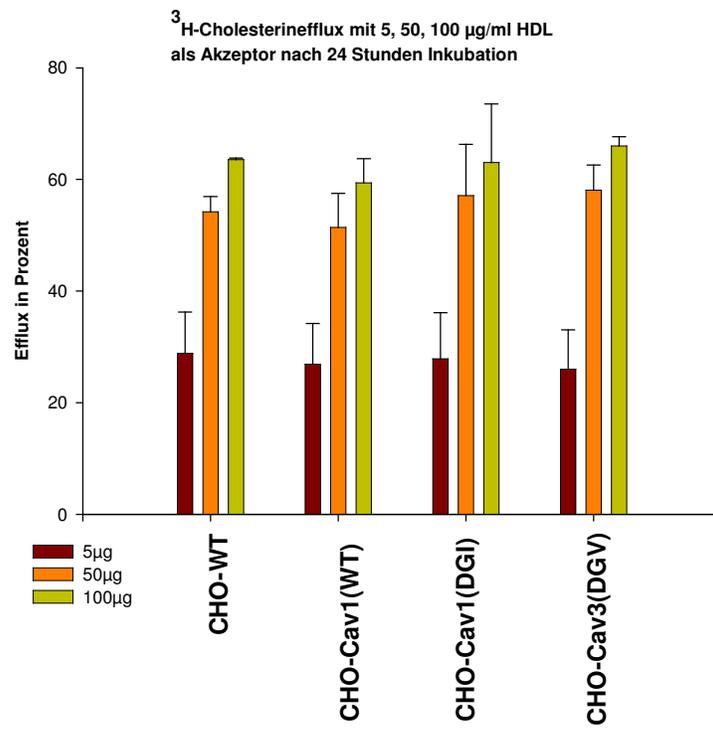


Abbildung 9c

Abbildung 9a-c: Darstellung der Effluxzunahme abhängig von der Menge des angebotenen extrazellulären Akzeptors und abhängig von der Inkubationszeit:

Nach LPDS- (LPDS = Lipoprotein-depletiertes Serum) und ^3H -LDL-Präinkubation über Nacht wurde den CHO-WT-, CHO-Cav1(WT)-, CHO-Cav1(DGI)- und CHO-Cav3(DGV) -Zellen 4, 8 bzw. 9 und 24 Stunden 5, 50 und 100 μg HDL als extrazellulärer Akzeptor für internalisiertes ^3H -Cholesterin angeboten. Jeder Wert symbolisiert den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in 3-fach Bestimmung durchgeführt wurden. Nach Bestimmung der zellassozierten und nicht-zellassozierten Radioaktivität erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit eine Proteinbestimmung und die Korrektur auf Cpm/ μg Zellprotein.

Überraschenderweise konnte in den Deletionsmutanten, Cav1(DGI) und Cav3(DGV), keine Abnahme des Cholesterineffluxes gegenüber CHO-WT-Zellen festgestellt werden. Die Zellen scheinen über alternative Kompensationsmechanismen zu verfügen, um angereichertes intrazelluläres Cholesterin aus der Zelle zu schleusen. Andersherum konnte eine vermehrte Expression des Caveolin 1 zu keiner Effluxzunahme führen.

Die steigende ^3H -Cholesterinefflux-Zunahme bei steigendem HDL-Angebot, lässt sich wie folgt erklären: Lipidarme HDL-Vorläufer sind in der Lage unverestertes Cholesterin intra- und extrazellulär aufzunehmen. Eine Erklärung dieses Mechanismus fanden Heeren et al. (1999) und Takahashi et al. (1999), die postulierten, dass beim Cholesterinefflux die HDL zunächst internalisiert und nach Cholesterinaufnahme wieder resekretiert werden.

Die Untersuchungen zeigten aber auch, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den CHO-WT-, CHO-Cav1(WT)-, CHO-Cav1(DGI)- und CHO-Cav3(DGV)-Zellen bezüglich der Fähigkeit aufgenommenes ^3H -LDL über sekretorische Vorgänge aus der Zelle zu schleusen, gibt. Das kann bedeuten, dass die in Kapitel 3.1 beschriebenen Defekte im Caveolinmolekül der verschiedenen Zelllinien keinen Einfluss auf den ^3H -Cholesterinefflux besitzen und die Zellen weiterhin ^3H -Cholesterin über Rezeptoren wie SR-BI oder ABC-AI-Transporter, Diffusion o. ä. aus der Zelle schleusen können. Weiterhin wäre möglich, dass die Produktion des endogenen Caveolins der Mutanten ausreicht, um für einen ausreichenden Cholesterinefflux zu sorgen.

Ob der Grund für die geringen Unterschiede bei den einzelnen Zelllinien tatsächlich in der noch erhaltenen Funktion der Caveolae liegt oder wie die genauen kompensatorische Wege aussehen, die die Zelle findet, um internalisiertes ^3H -Cholesterin wieder abzugeben, konnte mit diesem experimentellen Ansatz nicht geklärt werden.

3.6 Konzentrationsabhängiger HDL stimulierter Cholesterinefflux von ^3H -Cholesterin in CHO-WT- und CHO-anxVI-Zellen

Ziel dieser Experimente war herauszufinden, ob es aufgrund der Überexpression von Annexin VI in den CHO-anxVI-Zellen zu einer Änderung der Effluxfähigkeit von ^3H -Cholesterin kommt. Andere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass Zellen, die auf Sekretion spezialisiert sind fast kein Annexin VI exprimieren, wohingegen es in Zellen, deren Hauptaufgabe nicht die Sekretion ist, Annexin VI reichlich vorhanden ist (Clark et al., 1991). Ob nun das Annexin VI auch den Cholesterinefflux beeinflusst, sollte durch die folgenden Versuchen gezeigt werden.

Die CHO-WT- und CHO-anxVI-Zellen wurden nach Präinkubation mit LPDS 24 Stunden mit ^3H -LDL inkubiert und anschließend wurde ihnen, wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, über 4, 8 und 24 Stunden ein extrazellulärer Akzeptor (HDL) zur Abgabe des internalisierten Cholesterins in unterschiedlicher Konzentration (5, 50 und 100 μg pro ml Zellkulturmedium) angeboten.

3.6.1 ^3H -Cholesterinefflux mit 5, 50 bzw. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HDL als Akzeptor

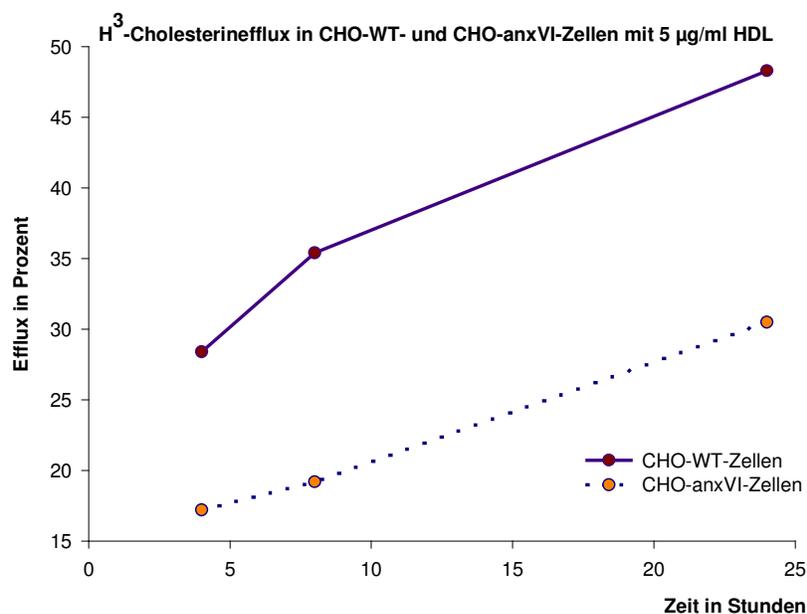


Abbildung 10

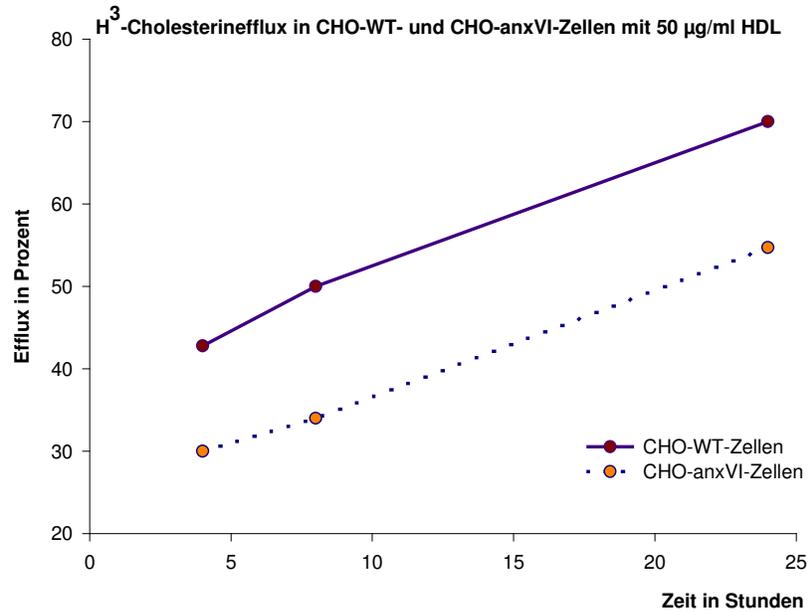


Abbildung 11

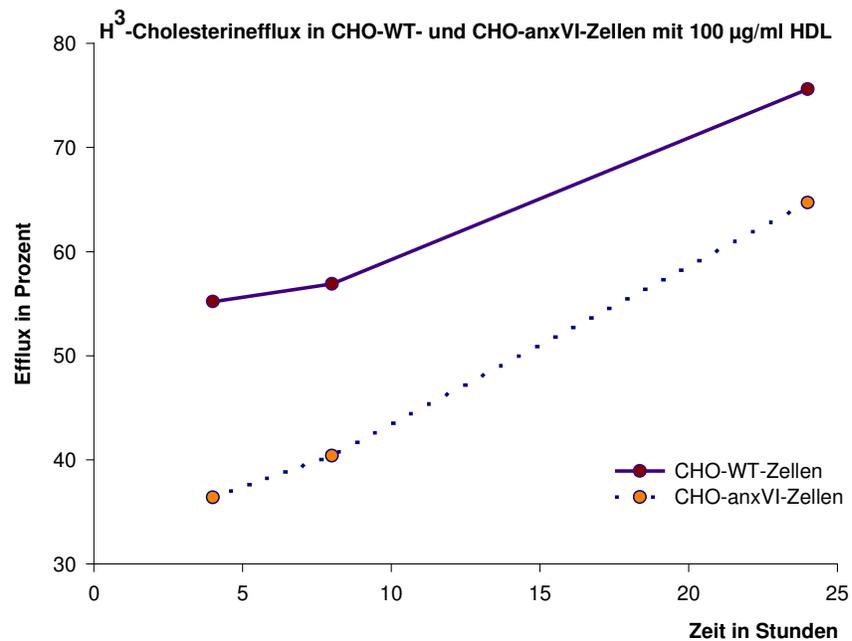


Abbildung 12

Abbildung 10-12: ³H-Cholesterinefflux in CHO-WT-, und CHO-anxVI-Zellen nach LPDS- und LDL-Präinkubation (LPDS = Lipoprotein-depletiertes Serum) und 4, 8 und 24 Stunden Inkubation mit 5, 50 und 100 µg/ml HDL. Jeder Wert stellt den Mittelwert von einem Experiment dar, das in 3-fach Bestimmung durchgeführt wurde (Standardabweichungen sind in den Abbildungen 13a-c mitaufgetragen.) Nach Bestimmung der zellassoziierten und nicht-zellassoziierten Radioaktivität erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit eine Proteinbestimmung und die Korrektur auf Cpm/µg Zellprotein.

Die absolute Menge des ^3H -Cholesterins, die eine Zelle abgeben kann, nimmt mit Dauer der HDL-Inkubationszeit, wie bei den Experimenten, die in Kapitel 3.5 beschrieben wurden, kontinuierlich zu.

Festzuhalten bleibt außerdem, dass die CHO-WT-Zellen gegenüber den CHO-anxVI-Zellen während der ganzen Inkubationsdauer bis zu 20% des internalisierten ^3H -Cholesterins mehr aus der Zelle ausschleusen können als die CHO-anxVI-Zellen.

3.6.2 Zusammenfassung des Effluxexperimentes

Die Abbildungen 13a-c stellen zusammen, wie der ^3H -Cholesterinefflux der untersuchten Zelllinie mit steigendem HDL-Angebot zunimmt, wie dies auch bei den Caveolin-Mutanten der Fall war. Die Darstellungen 13a-c legen den Schwerpunkt auf die Effluxzunahme bei steigendem HDL-Angebot im Gegensatz zu den Abbildungen 10-12, die die ^3H -Cholesterinefflux-Zunahme über 24 Stunden verdeutlichen sollten.

In Abbildung 13a-c ist eindeutig zu erkennen, dass die CHO-anxVI-Zellen nicht im selben Maße wie CHO-WT-Zellen fähig sind, internalisiertes ^3H -Cholesterin aus der Zelle auszuschleusen.

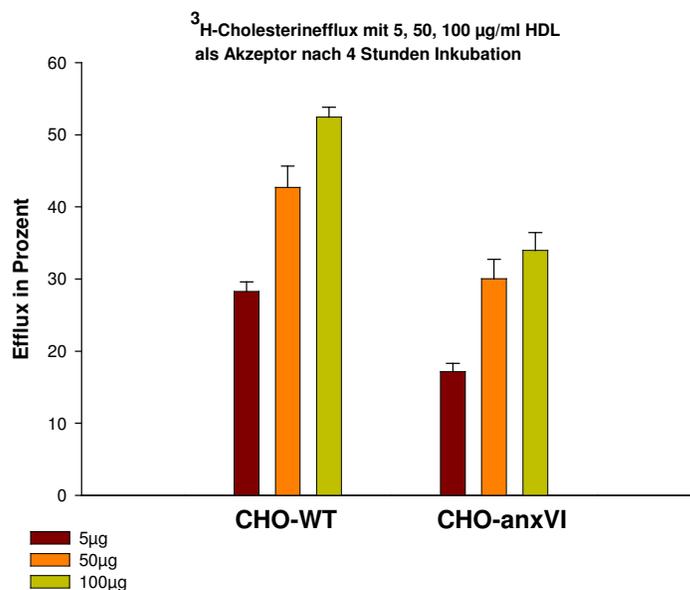


Abbildung 13a

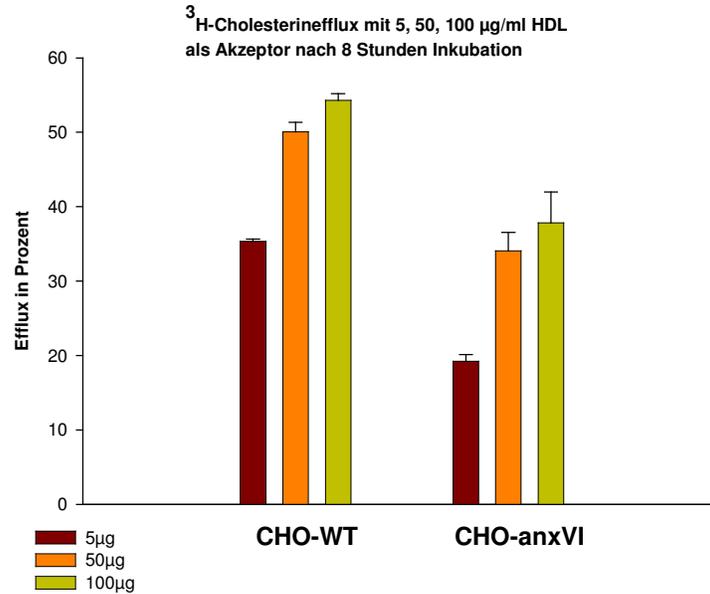


Abbildung 13b

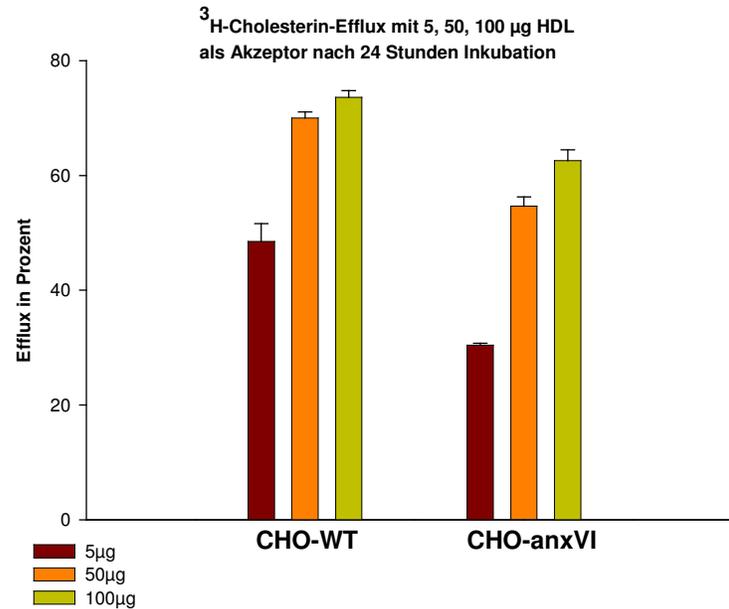


Abbildung 13c

Abbildung 13a-c: Darstellung der Effluxzunahme abhängig von der Menge des angebotenen extrazellulären Akzeptors.

Nach LPDS- und ³H-LDL-Präinkubation (LPDS = Lipoprotein-depletierendes Serum) über Nacht wurde den CHO-WT- und CHO-anxVI-Zellen über 4 (Abbildung 13a), 8 (Abbildung 13b) bzw. 24 (Abbildung 13c) Stunden 5, 50 und 100 µg HDL als extrazellulärer Akzeptor für internalisiertes ³H-Cholesterin angeboten. Jeder Wert stellt den Mittelwert einer 3-fach Bestimmung dar. Nach Ermittlung der zellassoziierten und nicht-zellassoziierten Radioaktivität erfolgte eine Proteinbestimmung und die Korrektur auf Cpm/µg Zellprotein.

Die Abbildungen 10-13 zeigen, dass der HDL stimulierbare Cholesterinefflux sowohl zeitabhängig (Abbildungen 10-12), als auch konzentrationsabhängig ist (Abbildung 13). Es stellt sich ein im Durchschnitt 10-25%-ige geringere Effluxfähigkeit der CHO-anxVI-Zellen gegenüber den CHO-WT-Zellen dar. Die möglichen Ursachen werden Kapitel 4.2 diskutiert.

3.7 Mechanismus des Cholesterineffluxes ist spezifisch - Vergleichende Analyse von ^3H -Cholesterin- und ^3H -Cholesterin-Ether-Efflux in verschiedenen CHO-Zelllinien

Um zu zeigen, dass die LDL-Degradation und der Cholesterinefflux ein spezifischer Prozess ist, wurden alle untersuchten Zellen (CHO-WT-, CHO-Cav1(WT)-, CHO-Cav1(DGI)-, CHO-Cav3(DGV)- und CHO-anxVI-Zellen) mit ^3H -Cholesterin-Ether inkubiert. ^3H -Cholesterin-Ether sollte weder von intrazellulären Enzymen degradiert werden, noch aus der Zelle ausgeschleust werden.

Versuchsdurchführung:

Dieser Versuch wurde nach dem in Kapitel 3.5 beschriebenen Vorgehen durchgeführt. Es wurde den CHO-Zellen neben ^3H -LDL, auch ^3H -Cholesterin-Ether zur Aufnahme über 24 Stunden zur Internalisation angeboten. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen mit LPDS-Zellkulturmedium versetzt, das 100 μg HDL pro ml enthielt. Nach einer 8-stündigen Inkubation wurde szintillatorisch bestimmt, welche Mengen ^3H -Cholesterin-Ether die Zellen ausschleusen konnten und welche Menge in der Zelle akkumulierten. Alle gemessenen Werte wurden anschließend auf μg Zellprotein korrigiert.

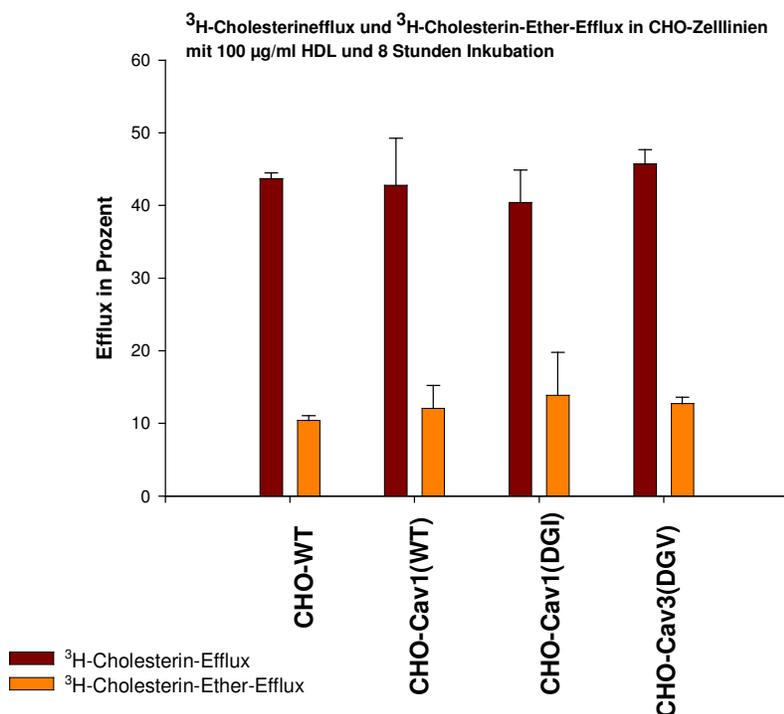


Abbildung 14: Die CHO-WT-, CHO-Cav1(WT)-, CHO-Cav1(DGI)-, CHO-Cav3(DGV)-Zellen wurden nach LPDS-Präinkubation über 24 Stunden mit ^3H -Cholesterin/ ^3H -LDL bzw. ^3H -Cholesterin-Ether inkubiert. Anschließend wurde den Zellen über 8 Stunden 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HDL als extrazellulärer Akzeptor zur Verfügung gestellt. Jeder Wert symbolisiert den Mittelwert von einem Experiment, das in 3-fach Bestimmung durchgeführt wurden. Nach Bestimmung der zellassozierten und nicht-zellassozierten Radioaktivität erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit eine Proteinbestimmung und die Korrektur auf Cpm/ μg Zellprotein.

Aus der Abbildung geht klar hervor, dass alle Zelllinien nicht in der Lage sind, aufgenommenes ^3H -Cholesterin-Ether zu spalten, wie sie es mit dem ^3H -LDL vermögen. Die Zellen können lediglich ^3H -LDL abbauen. Die Menge von ^3H -Cholesterin-Ether, die trotzdem als Efflux gemessen wurde, ist zum einen als Diffusionseffekt zu bewerten, zum anderen als Unspezifischkeit der Experimente. Die gemessenen Menge an ^3H -Cholesterin-Ether-Efflux kann z. B. von akkumulierten ^3H -Cholesterin-Ether aus der Zellmembran stammen, das bei den Waschvorgängen nicht von der Plasmamembran gelöst wurde.

³H-Cholesterinefflux und ³H-Cholesterin-Ether-Efflux in CHO-WT- und CHO-anxVI-Zellen mit 100 µg HDL und 8 Stunden Inkubation

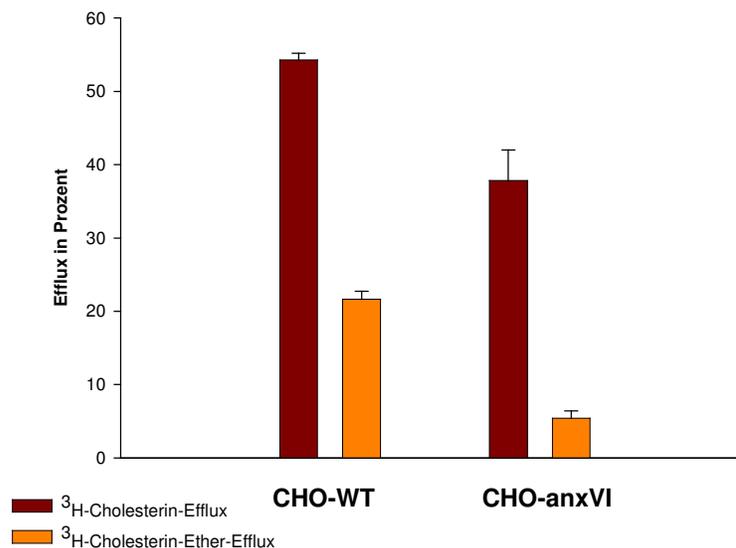


Abbildung 15: Die CHO-WT-, CHO-anxVI-Zellen wurden nach LPDS-Präinkubation über 24 Stunden mit ³H-Cholesterin/³H-LDL bzw. ³H-Cholesterin-Ether inkubiert. Anschließend wurde den Zellen über 8 Stunden 100 µg/ml HDL als extrazellulärer Akzeptor zur Effluxerleichterung zur Verfügung gestellt. Jeder Wert symbolisiert den Mittelwert von einem Experiment, das in 3-fach Bestimmung durchgeführt wurden. Nach Bestimmung der zellassoziierten und nicht-zellassoziierten Radioaktivität erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit eine Proteinbestimmung und die Korrektur auf Cpm/µg Zellprotein.

In Abbildung 15 wird deutlich, dass CHO-WT-Zellen, als auch die CHO-anxVI-Zellen nur geringfügig in der Lage sind ³H-Cholesterin-Ether aus der Zelle zuschleusen. Die Werte liegen bei ca. 22% für die CHO-WT-Zellen und ca. 5% für die CHO-anxVI-Zellen. Die Differenz wurde als Ungenauigkeit der Experimente bewertet.

3.8 Cholesterinefflux in transient transfizierten CHO-Zellen

Da in den Experimenten, die Kapitel 3.5 beschrieben wurden, die Überexpression von Caveolin und die Mutationen im Caveolinmolekül keinen Effekt auf den Efflux zeigte, sollte untersucht werden, ob zwei mutierte Proteine in einer Zelle einen messbaren negativen Effekt auf den Cholesterinefflux hat. Um die Auswirkung der Überexpression von Cav1(DGI)-DNS, Cav3(DGV)-DNS, anxVI-DNS und einer Annexin VI-Mutante (del 1490-DNS) in CHO-WT-, CHO-anxVI- und CHO-Cav3(DGV)-Zellen auf den ³H-Cholesterin-Efflux zu studieren, wurden die CHO-Zellen mit entsprechenden Expressionsfaktoren transfiziert.

Jeweils 3×10^5 CHO-Zellen wurden pro Vertiefung in eine Sechslöchplatte ausplattiert. Die Transfektion erfolgte mit liposomalem Transfektionsreagenz und dem jeweiligen

Expressionsvektor im Verhältnis 1 : 2 zu einem Zeitpunkt, an dem die Zellen etwa zu 60% konfluent auf den 6-well-Platten gewachsen waren. Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass sich noch Zellen in ausreichender Zahl in Teilung befanden, um bei der Replikation die Expressionsvektoren in ihr Genom integrieren zu können.

1. β -gal SPORT-DNS: Transfektion dieser DNS dient als Negativkontrolle. Die Zellen bilden nach Transfektion vermehrt β -Galactosidase, ein Enzym, das keinen Einfluss auf den Cholesterintransport in der Zelle hat. Durch den Vorgang der Transfektion und der damit verbundenen Expression eines Proteins sind die Zellen Transfektionsstress ausgesetzt und mit der Bildung des Proteins beschäftigt, für das die transfizierte DNS kodiert. Durch diese Aufgabe kann die Zelle ihrer eigentlichen Aktivität nicht mehr in dem üblichen Maße nachkommen. Wenn man die Effluxfähigkeit der transfizierten Zellen mit der Effluxfähigkeit der jeweiligen Zelllinie im Grundzustand vergleicht, kann man quantifizieren, um welche Prozentzahl die Effluxfähigkeit durch den Vorgang der Transfektion sinkt. Um diesen Effekt unter den Zelllinien vergleichen zu können, wurden alle Zelllinien mit β -gal SPORT transfiziert.

2. Cav1(DGI)-DNS: Das DNS Konstrukt wurde in Kapitel 3.1 beschrieben.

3. Cav3(DGV)-DNS: Das DNS Konstrukt wurde in Kapitel 3.1 beschrieben.

4. AnxVI-DNS: Es ist bekannt, dass das Annexin VI die LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose stimuliert (1.3.2) und somit Einfluss auf den Membranverkehr besitzt. Unklar ist bisher aber noch, ob Annexin VI auch eine Funktion im Rahmen des Cholesterineffluxes übernimmt. Daher sollte in diesem Experiment überprüft werden, ob Annexin VI zusammen mit einem defekten Caveolinmolekül einen Einfluss auf die Effluxfähigkeit besitzt.

5. del 1490-DNS: Die del 1490-DNS kodiert für die Bildung einer Annexin VI Mutante, der 6 Hülldomänen im Annexin VI fehlen. Durch diese Mutation kommt es zu einem Verlust der normalen Annexin VI Funktion. Dadurch ist keine Membranbindung des Annexins und keine Interaktion mit den in Kapitel 1.3 beschriebenen Bindungspartnern mehr möglich. Auch der Vorgang der Rezeptor-vermittelten Endozytose und der folgenden Assoziation und der Transport von endozytierten Molekülen mit endosomalen Kompartimenten ist behindert. Vermutlich kommt es weiterhin auch zu einer Einstellung der Assoziation mit Lipid Rafts.

Die folgende Tabelle stellt zusammen in welche Zelllinie, welche DNS transfiziert wurde. Die Effizienz dieser Transfektion wurde anschließend mit dem Western Blot überprüft (3.8.1).

Zelllinie	β gal-DNS	Cav1(DGI) ^{HA} -DNS	Cav3(DGV) ^{HA} -DNS	anxVI-DNS	del 1490-DNS
CHO-WT	6 μ g	6 μ g	6 μ g	-----	6 μ g
CHO-anxVI	6 μ g	6 μ g	6 μ g	-----	6 μ g
CHO-Cav3(DGV) ^{HA}	6 μ g	6 μ g	-----	6 μ g	6 μ g

Tabelle 2: Übersicht und Mengenangaben der transfizierten DNS in die verschiedenen Zelllinien

3.8.1 Western Blot

Zur Kontrolle der Transfektionen wurden Zellproteine mittels Solubilitätspuffer gewonnen, einer Konzentrationsbestimmung unterzogen und anschließend im Western Blot mit Immundetektion auf die Expression der Proteine hin untersucht.

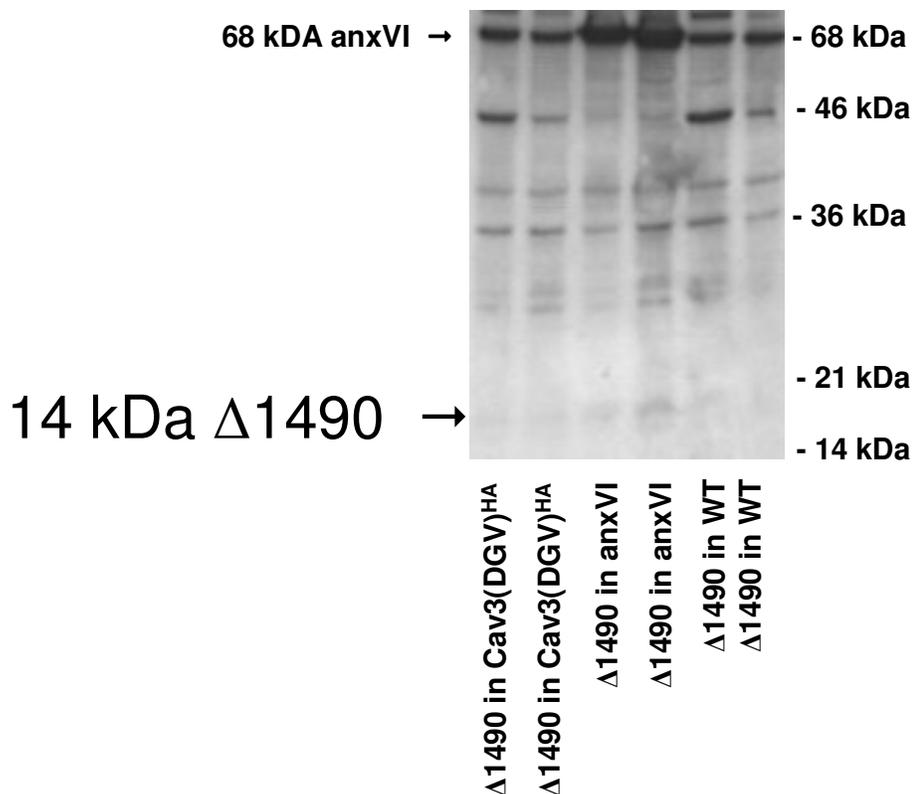
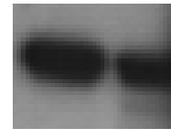


Abbildung 16: Darstellung der Expression von delta 1490 in CHO-WT, CHO-anxVI- und CHO-Cav3(DGV)-Zellen aus zwei unabhängigen Transfektionsexperimenten. Pro Spur wurden 70 μ g Zellprotein im reduzierten Zustand auf ein 12%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde der Blot mit einem Anti-GST-anxVI-Antikörper inkubiert. Zu sehen ist die ECL-Detektion.

Da delta 1490 ein sehr instabiles Protein ist, ist es nicht deutlich im Western Blot zu erkennen. Die Darstellung des Annexin VI in Höhe der 68 kDa-Marke ist jedoch sichtbar.

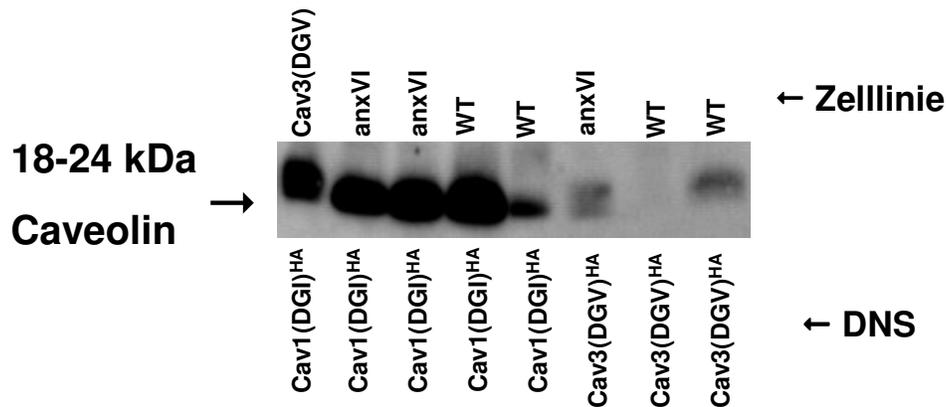
68 kDa anxVI



anxVI-DNS in Cav3(DGV)^{HA}

anxVI-DNS in Cav3(DGV)^{HA}

Abbildung 17: Darstellung der Expression von Annexin VI in CHO-Cav3(DGV)-Zellen aus zwei unabhängigen Transfektionsexperimenten. Pro Spur wurden 70 µg Zellprotein im reduzierten Zustand auf ein 12%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde der Blot mit Hase-Anti-Schaf-Antikörper inkubiert. Zu sehen ist die ECL-Detektion.



18-24 kDa

Caveolin



Cav3(DGV)

anxVI

anxVI

WT

WT

anxVI

WT

WT

↑ Zelllinie

Cav1(DGI)^{HA}

Cav1(DGI)^{HA}

Cav1(DGI)^{HA}

Cav1(DGI)^{HA}

Cav1(DGI)^{HA}

Cav3(DGV)^{HA}

Cav3(DGV)^{HA}

Cav3(DGV)^{HA}

↑ DNS

Abbildung 18: Darstellung der Expression von Hämagglutinin (dem Epitop, das mit den verschiedenen Caveolin-DNS exprimiert wird) in CHO-WT, CHO-anxVI- und CHO-Cav3(DGV)-Zellen nach Transfektion der Vektoren Cav1(DGI) und Cav3(DGV) aus zwei unabhängigen Transfektionsexperimenten.

Pro Spur wurden 70 µg Zellprotein im reduzierten Zustand auf ein 12%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde der Blot mit Ziege-Anti-Ratte(Hämagglutinin)-Antikörper inkubiert. Zu sehen ist die ECL-Detektion.

Bei der Transfektion von Cav1(DGI)-DNS sind in allen 3 Zelllinien deutliche Signale in der jeweiligen Spur zu erkennen, wohingegen sich die Signaleffekte bei der Transfektion von Cav3(DGV)-DNS schwächer darstellen, aber dennoch sichtbar sind. Generell bleibt anzumerken, dass die Transfektion von DNS einen äußerst komplexen Vorgang darstellt und immer viele Faktoren, wie Güte der Zellen, Transfektionseffizienz, Distribution der DNS auf die Zielzellen u. v. m. einen entscheidenden Einfluss auf das Resultat ausüben. Insgesamt werden nur ca. 10-20% der ausplattierten Zellen transfiziert und von diesen sind wiederum nur 10-20% aktiv, was die Transkription und Translation der Zelle betrifft. Dieser geringe Anteil bezüglich der Effektivität einer Transfektion kann unter Umständen zu gering sein, um einen Einfluss der transfizierten DNS auf den Zellstoffwechsel zu messen.

3.8.2 ³H-Cholesterinefflux

Nachdem gezeigt werden konnte, dass durch Transfektion der kultivierten Zellen eine Expression von Cav3(DGV), Cav1(DGI), anxVI und del 1490 erzielt werden konnte, sollte nun die Auswirkung der Transfektionen auf den Efflux von ³H-Cholesterin aus zuvor internalisiertem ³H-LDL untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen CHO-Zelllinien transfiziert und anschließend für 24 Stunden mit ³H-LDL in LPDS-Zellkulturmedium inkubiert. Anschließend wurde die Zellen 50 µg HDL pro ml Zellkulturmedium für 6 Stunden inkubiert. Es erfolgte nun wie in den zuvor durchgeführten Effluxexperimenten die szintillatorische Bestimmung der Verteilung des ³H-Cholesterin. Alle gemessenen Werte wurden anschließend auf µg Zellprotein pro µl korrigiert. Auch dieses Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander jeweils in 3-fach Bestimmung durchgeführt. In den Abbildungen sieht man die gemittelten Ergebnisse der 3 Versuche.

Zelllinie	β-gal-DNS Efflux in %	Cav1(DGI) ^{HA} - DNS Efflux in %	Cav3(DGV) ^{HA} - DNS Efflux in %	anxVI-DNS Efflux in %	del 1490-DNS Efflux in %
CHO-WT	36,7	35,3	36,9	-----	35,1
CHO-anxVI	23,1	22,6	27,7	-----	27,1
CHO- Cav3(DGV) ^{HA}	30,2	30,1	-----	30,6	27,2

Tabelle 3: Prozentuale Effluxangaben nach verschiedenen Transfektionen und 6 Stunden Inkubation mit 50 µg HDL/ml.

³H-Cholesterinefflux nach transienten Transfektionen

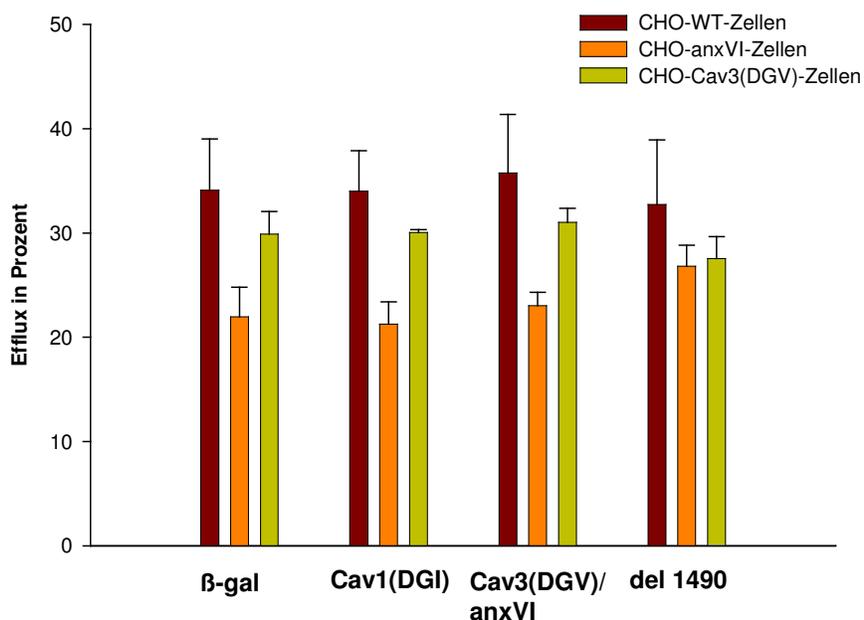


Abbildung 19: Die 3 Zelllinien wurden nach durchgeführter Transfektion über 24 Stunden mit ³H-Cholesterin inkubiert. Anschließend wurde den Zellen über 6 Stunden 50 µg HDL/ml als extrazellulärer Akzeptor zur Verfügung gestellt. Jeder Wert symbolisiert den Mittelwert von 3 Experimenten, die in 3-fach Bestimmung durchgeführt wurden. Nach Bestimmung der zellassozierten und nicht-zellassozierten Radioaktivität erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit eine Proteinbestimmung und die Korrektur auf Cpm/µg Zellprotein.

Betrachtet man die Menge des nicht-zellassozierten ³H-Cholesterins in den transfizierten CHO-WT-Zellen (Abbildung 19), so lässt sich nach der Transfektion kein signifikanter Unterschied bezüglich des Effluxes gegenüber den Kontrollzellen (β-gal SPORT in CHO-WT-Zellen) feststellen. In allen transfizierten CHO-WT-Zellen liegt der prozentuale Anteil des Effluxes bei ca. 35-37%.

Der CHO-anxVI-Klon zeigt sowohl bei zusätzlicher Expression des Cav1(DGI), als auch bei Expression der Annexin VI-Mutation (del 1490) eine Verbesserung des Effluxes um 4-4,5 Prozentpunkte gegenüber der Transfektion mit β-gal SPORT. Bei Transfektion von Cav3(DGV) verringert sich der Efflux um eine nur geringfügige Menge, die nicht als signifikant betrachtet werden kann.

Durch Transfektion von Cav1(DGI)-DNS und anxVI-DNS in CHO-Cav3(DGV)-Zellen verändert sich die Effluxfähigkeit dieser Zellen kaum. Lediglich bei Transfektion mit del 1490-DNS kommt es zu einer Effluxverminderung um 3 Prozentpunkte.

Festzuhalten bleibt, dass die CHO-anxVI-Zellen erheblich schlechter in der Lage sind als die CHO-WT- und CHO-Cav3(DGV)-Zellen, internalisiertes ³H-LDL bzw. ³H-

Cholesterin aus der Zelle auszuschleusen. Dies stimmt mit den Ergebnissen, die in Kapitel 3.6 beschrieben wurden, überein.

3.9 Lokalisation von Caveolin in CHO-WT- und CHO-anxVI-Zellen

Mittels Immunfluoreszenzen wurde die intrazelluläre Lokalisation von Caveolin in CHO-WT- und CHO-anxVI-Zellen verglichen. Bekannt ist, dass sich Caveolin zwischen der Plasmamembran, den Caveolae, Lipid Rafts, Endosomen und dem Golgi-Apparat bewegt und am Transport von intrazellulären Proteinen und Lipiden beteiligt ist und dass die Überexpression von Annexin VI die Effluxfähigkeit von Zellen reduziert (Kapitel 3.6). Diese Lokalisationsstudien sollten Aufschluss darüber geben, ob Annexin VI die intrazelluläre Lokalisation von Caveolin beim intrazellulären Cholesterintransport beeinflusst.

CHO-WT- und CHO-anxVI-Zellen wurden unter verschiedenen Bedingungen mit LPDS, LDL und HDL (50 µg/ml) inkubiert. Anschließend folgte der in Kapitel 2.2.16 beschriebene Vorgang der Immunfluoreszenz. Das Caveolin wurde mit einem polyklonalen anti-Caveolin-Antikörper dargestellt.

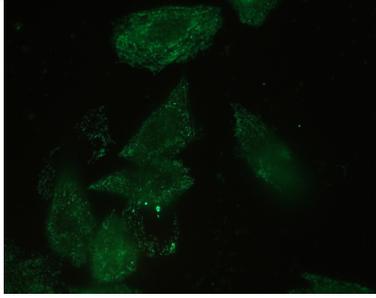
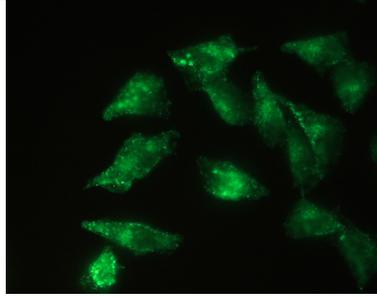
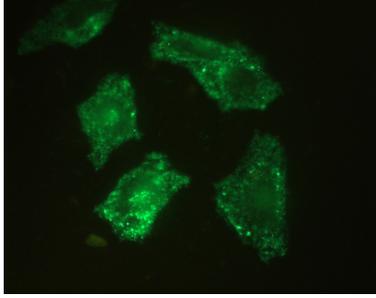
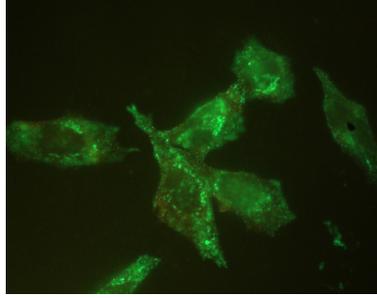
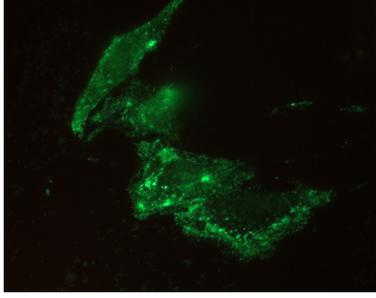
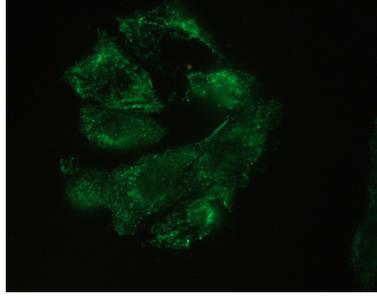
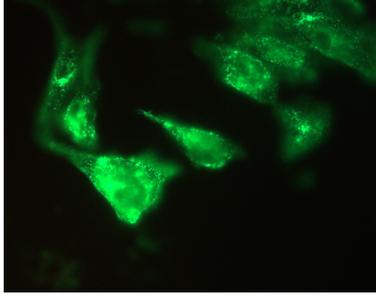
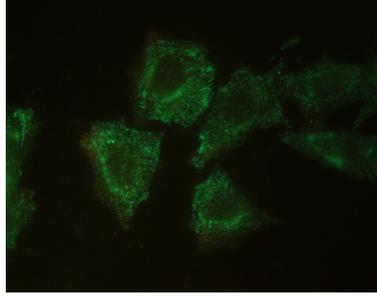
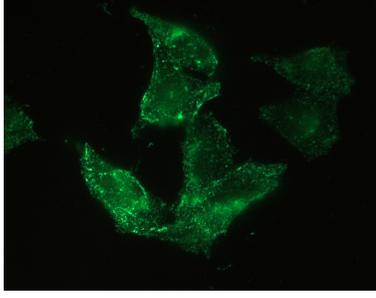
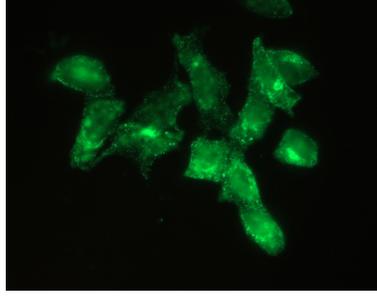
CHO-WT-Zellen	CHO-anxVI-Zellen	Inkubation
		FCS
		LPDS
		LPDS + LDL (15h)
		LPDS + LDL (15h) + HDL (2h)
		LPDS + LDL (15h) + HDL (15h)

Tabelle 4: Darstellung der Caveolinlokalisierung

	WT	WT	WT	anxVI	anxVI	anxVI
Inkubation	Expressions-niveau	Plasma-membran	Zellkern (GA)	Expressions-niveau	Plasma-membran	Zellkern (GA)
FCS	+/-	+	++	+/-	+	++
LPDS (90 min)	+	+	++	+	+	++
LDL (15 h)	+	+	++	+	+	++
LDL (15 h) + HDL (2 h)	++	++	+++	+	+	++
LDL (15 h) + HDL (15h)	+	++	+	++	+	+++

Tabelle 5: Darstellung der Caveolinlokalisierung nach den verschiedenen Inkubationen

In CHO-WT-Zellen ist Caveolin vor allem an der Plasmamembran und im kernnahen Golgi-Apparat lokalisiert. In CHO-anxVI-Zellen dagegen ist Caveolin vorwiegend am Golgi-Apparat und nur zu geringen Anteilen an der Plasmamembran zu finden. Dies geht mit elektronenmikroskopischen Analysen der Arbeitsgruppe Grewal einher, die zeigten, dass es zu keiner Veränderung der Morphologie des Golgi-Apparates in CHO-anxVI-Zellen gegenüber CHO-WT-Zellen kommt. Allerdings konnten in CHO-anxVI-Zellen keine typischen Invaginationen an der Plasmamembran gefunden werden, die typisch für Caveolae sind. Somit führt die Annexin VI Überexpression zu einer veränderten Struktur der Caveolae.

3.10 Lokalisation von Annexin in CHO-WT- und CHO-anxVI-Zellen

CHO-WT- und CHO-anxVI-Zellen wurden wieder unter verschiedenen Bedingungen inkubiert, um eventuelle Änderungen der Lokalisation oder auch Hochregulation der Expression des Annexin VI im Rahmen des Cholesterintransportes studieren zu können. Die Darstellung des Annexin VI der CHO-WT-Zellen ist leider nicht geglückt, da die endogene Expression des Annexin zu gering zu sein scheint.

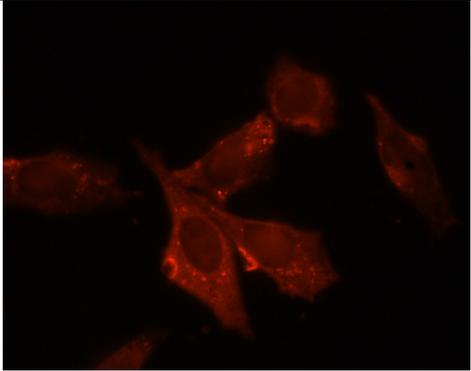
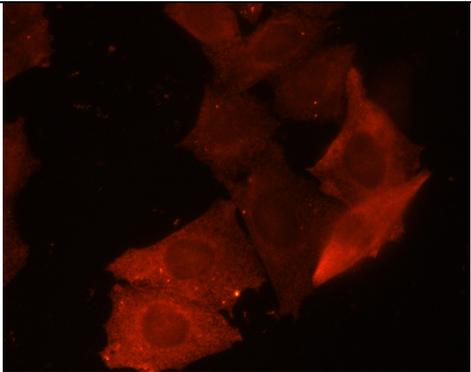
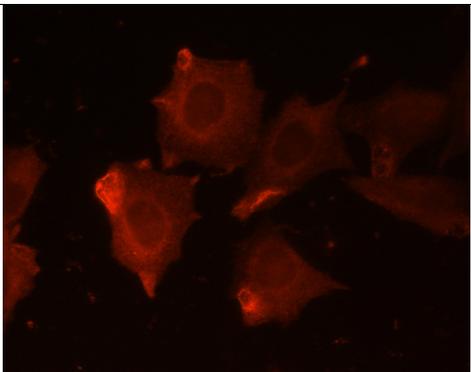
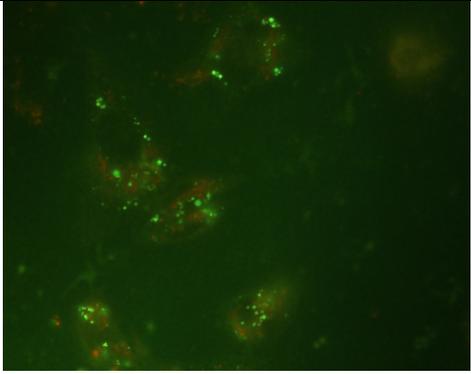
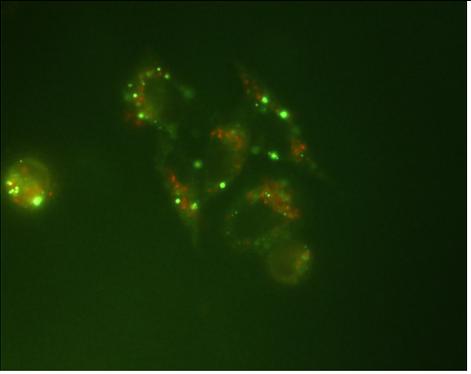
CHO-anxVI-Zellen	Inkubation	Expressions-niveau	Plasma-membran	ZK-Nähe
	FCS	+/-	++	+
	LPDS + LDL (15h)	++	+	++
	LPDS + LDL (15h) + HDL (90 min, 50 µg/ml)	+	+	++

Tabelle 6: Darstellung der Annexinlokalisierung nach den verschiedenen Inkubationen

Bei der Inkubation im Grundzustand findet sich das Annexin VI sowohl an der Plasmamembran, als auch diffus im Zytoplasma verteilt. Nach der Zugabe von LDL scheint es vermehrt exprimiert zu werden und Schwerpunkt der Lokalisation liegt im Zytoplasma. Dies geht mit der bekannten von Funktion des Annexin VI bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose einher. Nach Zugabe von HDL findet sich das Annexin VI, verglichen mit dem Grundzustand, vermehrt um den Zellkern.

3.11 NBD-Cholesterin in CHO-WT- und CHO-anxVI-Zellen

Um über den intrazellulären Weg des Cholesterins in CHO-WT- und CHO-anxVI-Zellen genaueren Aufschluss zu bekommen wurden die Zellen mit einem fluoreszierendem Cholesterin inkubiert. Die Zellen wurden zunächst in 12-well Zellkulturschalen, die Coverslips enthielten, ausplattiert. Nach einer 12-stündigen Wachstumsphase, wurden die Zellen 2 Stunden in LPDS präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem direkt fluoreszierendes NBD-Cholesterin über 2 Stunden inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen wieder mit PBS gespült, auf den Coverslips fixiert und anschließend im Mikroskop betrachtet.

	CHO-WT-Zellen	CHO-anxVI-Zellen
		
Inkubation	LPDS + NBD-Cholesterin (2h)	LPDS + NBD-Cholesterin (2h)

Leider ließ sich nach der Aufnahme des NBD-Cholesterins nur feststellen, dass das Cholesterin wahrscheinlich im endozytotischen Kompartimenten akkumuliert. Grund für diese Akkumulation kann sein, dass der Fluoreszenzstoff das Angreifen von spaltenden Enzymen und das Andocken von Transportproteinen verhindert. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde darauf verzichtet die Zellen zu verschiedenen Bedingungen wie in den Immunfluoreszenzversuchen zu inkubieren.

3.12 Raft-Präparation in CHO-WT-, CHO-Cav1(WT)-, CHO-Cav3(DGV)- und CHO-anxVI-Zellen

Dass Annexin VI eine bedeutende Rolle bei der Endozytose zukommt, konnten Präparationen von Annexin VI in Lipid Rafts und Caveolae zeigen (Babiychuck et al., 2000). Ebenso besitzt Annexin VI eine entscheidende Rolle bei der Cholesterin induzierten Fusion von Membranen während der Endozytose (Ayala-Sanmartin, 2001). Lipid Raft Präparationen sollten klären, ob es in Annexin VI

überexprimierenden Zellen zu einer vermehrten Anreicherung von ^3H -Cholesterin in Lipid Rafts gegenüber Wildtyp-Zellen nach ^3H -LDL Aufnahme kommt. Ebenso sollte die ^3H -LDL/Cholesterin Verteilung in CHO-Cav1(WT)- und CHO-Cav3(DGV)-Zellen ermittelt werden.

Bei der Lipid Raft Präparation wurden die Zellen zunächst 20 Stunden in LPDS-Zellkulturmedium mit ^3H -LDL inkubiert, um anschließend eine Raft-Präparation durchzuführen (2.2.17). Mit Hilfe von Optipröp konnten insgesamt 10 verschiedenen Fraktionen isoliert werden: Fraktionen 2-3 stellen die Rafts dar. Die Fraktionen 7-10 werden durch schwerere Membranen, wie z. B. der Plasmamembran, den Frühen und Späten Endosomen, den Lysosomen und den Membranen des Golgi-Apparates gebildet. Nach Quantifizierung der ^3H -LDL/Cholesterin-Konzentration in den präparierten Fraktionen konnte folgende Verteilung des ^3H -LDL/Cholesterins festgestellt werden:

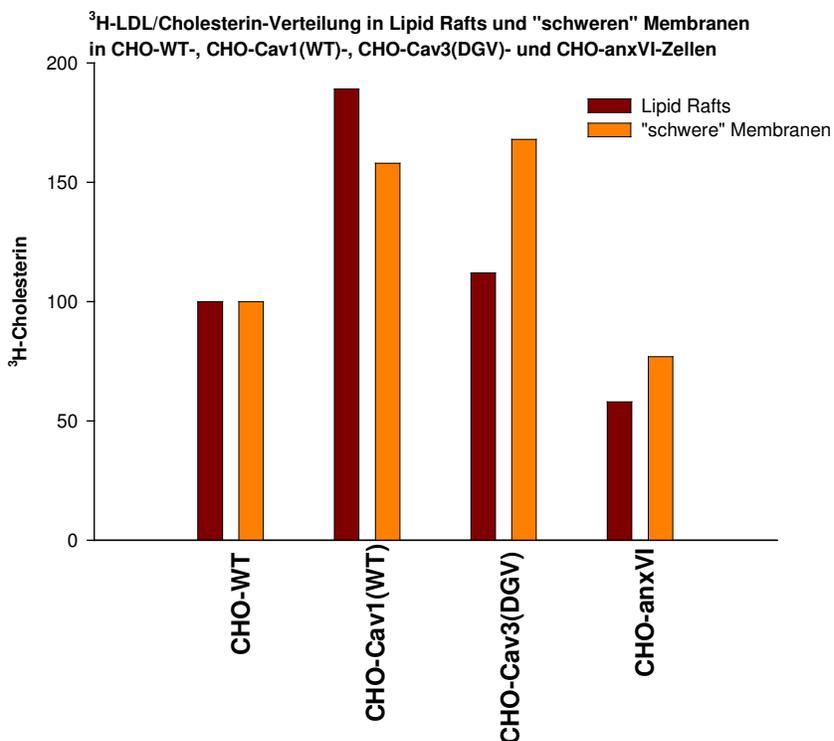


Abbildung 19: Die abgebildeten Zelllinien wurden 12 Stunden mit $30 \mu\text{g/ml}$ ^3H -LDL inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mit Hilfe der Opti-Präparation aufgetrennt. In dieser Abbildung wird das akkumulierte ^3H -LDL in den Fraktionen (2-4) der Rafts und das ^3H -LDL in den Fraktionen (7-9) der „schweren“ Membranen dargestellt. Die Messwerte stellen jeweils den Mittelwert aus 2 Messungen dar.

Die Überexpression von Caveolin 1 führte gegenüber WT-Zellen zu einer vermehrten Bindung von ^3H -LDL/Cholesterin und zu einer deutlich erhöhten Anreicherung in Lipid Rafts und schweren Membranen. Dies bestätigt, dass Caveolin 1 überexprimierende Zellen vermehrt internalisiertes Cholesterin in Form von Lipid Rafts intrazellulär transportieren. In der N-terminalen Deletionsmutante Cav3(DGV) hingegen kommt es nur zu einer ^3H -Cholesterin Anreicherung in den schweren Membranen. Dies könnte zum einen in einer Anreicherung des ^3H -LDL/Cholesterin in der Plasmamembran begründet sein und zum anderen in einer Akkumulation des ^3H -Cholesterins im Golgi-Apparat.

CHO-anxVI-Zellen reichern ^3H -LDL/Cholesterin in den schweren Fraktion wie der Plasmamembran und dem Golgi-Apparat an. Dieses Verteilungsmuster korreliert mit der Anreicherung von Caveolin im GA und der fehlenden Caveolae-Struktur in diesen Zellen.

4 Diskussion

4.1 Endozytose

4.1.1 Funktion von Annexin VI bei Rezeptor-vermittelter Endozytose

Eine wichtige der bisher bekannten Aufgaben übernimmt Annexin VI bei der Abtrennung von Clathrin-umhüllten Vesikeln der Plasmamembran, dem ersten Schritt der Rezeptor-vermittelten Endozytose. Durch die Interaktion von Annexin VI mit β -Spektrin kommt es zur Aktivierung einer Calpain I-ähnlichen Protease, die wiederum zum Auflösen des Zytoskeletts führt und dadurch das Abschnüren von Coated Pits ermöglicht (Kamal et al., 1998). Annexin VI bewegt sich in einem Zyklus zwischen der Plasmamembran und den Frühen und Späten Endosomen. Nach der Bindung von Liganden und Erreichen seines Bestimmungsortes, dissoziiert Annexin VI von dem Liganden, der verstoffwechselt wird, ab. Die Relokalisation von Annexin VI vom Zytosol zur Plasmamembran erfolgt Ca^{2+} -abhängig (Babiychuck et al., 1999).

Neben GTP-bindenden Proteinen, Adaptoren, Calmodulin und Ca^{2+} scheint auch Annexin VI für den gerichteten Transport in Späte Endosomen und Lysosomen verantwortlich zu sein. Es fördert den Kontakt von Spätem Endosom mit Lysosomen und die Bildung von Vesikeln, die schließlich mit den Lysosomen verschmelzen (Pons et al., 2001). Allerdings besitzt Annexin VI selber nur schwache Wirkung auf die Fusion von Membranen (Liemann und Huber, 1997; Gerke und Moss, 1997) und ist auf die Gegenwart von Ca^{2+} (Liemann und Huber, 1997; Gerke und Moss, 1997) und Cholesterin angewiesen (Ayala-Sanmartin, 2001).

In vorausgegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe Grewal wurde festgestellt, dass durch Überexpression von Annexin VI nicht nur die an der Zelloberfläche stattfindende Internalisation des LDL gefördert wird, sondern auch dessen weiter intrazellulär gelegene Degradation (Grewal et al., 2000), wobei Annexine nicht direkt an Cholesterin binden, aber an benachbarte Phospholipide (Ayala-Sanmartin, 2001). Untersuchungen mit $\text{anxVI}_{\Delta 1-175}$ überexprimierenden Zellen (Deletion der 6 C-terminalen Annexin Repeats) konnten zeigen, dass diese Zellen zwar weiterhin LDL internalisieren können, aber LDL in kernnahen Vesikeln akkumulieren und es zu einer verminderten Degradation der Lipoproteinpartikel kommt (Grewal et al., 2000).

Durch eine Mutation im Annexin VI-Gen könnte es somit entweder zum Erliegen der Aufnahme von Liganden kommen, die per Rezeptor-vermittelter Endozytose in die Zelle gelangen oder der Transport zum vorgesehenen intrazellulären Ziel könnte misslingen. Es kann vermutet werden, dass an dieser Stelle eine der pathophysiologischen Ursachen für die Erkrankung der familiären

Hypercholesterinämie liegt, bei der nachweislich kein Defekt am LDL-Rezeptor oder am ApoB₁₀₀ vorliegt. Bei immerhin 15% aller Patienten mit der Diagnose „heterozygote familiäre Hypercholesterinämie“ ist sowohl der LDL-Rezeptor, als auch sein Ligand vollkommen intakt (Sun et al., 1997). Diese These stützen Norman und seine Mitarbeiter (1999), die zwei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie vorstellten, bei denen keine Defekte im klassischen Sinne festgestellt werden konnten. Sie fanden heraus, dass die Zellen dieser Patienten nicht mehr in der Lage waren, den LDL-Rezeptor mitsamt gebundenem Liganden zu internalisieren, wohingegen die Transferrinaufnahme weiterhin im physiologischen Maße funktionierte. Daraus schlossen sie, dass der Defekt spezifisch den LDL-Internalisierungsmechanismus betreffen muss. Das bedeutet, dass die Aufnahme von LDL einem Mechanismus unterliegt, der eigene Mechanismen, Transporter oder Signale benötigt, die speziell auf die Internalisation von LDL ausgerichtet sind. Defektes Annexin VI könnte ein Protein sein, das in diesem pathophysiologischen Zusammenhang eine Rolle spielt.

4.1.2 Funktion von Caveolin bei Rezeptor-vermittelter Endozytose

Das 21-24 kDa-große Caveolin ist das wichtigste Markerprotein für Caveolae. Es stellt eines der integralen Membranproteine des caveolären Überzugs dar und besitzt essentielle Bedeutung für die Ausbildung der Caveolae (Tang et al., 1996; Rothberg et al., 1992; Fra et al., 1995). Vier Caveolin-Genprodukte sind bis jetzt in Säugetieren gefunden worden: Caveolin-1 α und -1 β (Glenney et al., 1992; Kurzchalia et al., 1992; Scherer et al., 1995), -2 (Scherer et al., 1996) und -3 (Tang et al., 1996). Jedes enthält eine 33 Aminosäuren lange hydrophobe Domäne, durch die das Protein in der Membran verankert wird, während sowohl das Amino-, als auch das Carboxyterminale Ende frei ins Zytoplasma reichen (Kurzchalia et al., 1994). Gering unterschiedliche Aminosäuresequenzen und mit einiger Sicherheit auch gewebespezifische Expressionsmuster lassen vermuten, dass die verschiedenen Caveoline nur bis zu einem gewissen Grade die gleichen Aufgaben erfüllen (Dietzen et al., 1995; Tang et al., 1996).

Die Mechanismen der caveolären Internalisation von Molekülen sind weitgehend ungeklärt. Einige Studien legen jedoch eine weitgehende Parallelität mit dem Clathrin-vermittelten Weg nahe:

1. Bei der caveolären Internalisation bedarf es in gleicher Weise wie im Clathrin-vermittelten Weg einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts, bevor es zur Internalisation von Molekülen kommt.
2. Dynamin wurde bei Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz von Epithelzellen in Caveolae gefunden und auch biochemisch-funktionell als essentieller Faktor für die caveoläre Endozytose nachgewiesen (Henley et al., 1998). Somit scheint es in Caveolae ebenfalls einen Dynamin-vermittelten Abtrennungsprozess eines Membranabschnittes zu geben.
3. In endothelialen Caveolae wurden alle diejenigen Moleküle nachgewiesen, die nach heutigem Verständnis für Vesikelknospung, -andockung und -fusion nötig sind. Dazu gehören VAMP, NSF, SNAP, GTPasen, sowie die Annexine II und VI (Schnitzer et al., 1995).
4. Versuche an Rattenleberendosomen von Pol et al. (1999) zeigten, dass Frühe Endosomen Caveolin enthalten und Durchgangsstation von Caveolin darstellen. Da das Annexin VI schon früher als Markerprotein für Rattenleberendosomen nachgewiesen wurde (Jäckle et al., 1994), ist die Überschneidung der intrazellulären Stoffwechselwege der beiden Proteine offensichtlich.

Weitere Interaktionen zwischen Caveolin und Annexin VI werden in Kapitel 4.3 beschrieben.

4.2 Sekretionsvorgänge/Exozytose

Der Cholesterinefflux in Zellen geht normalerweise schnell vonstatten: bis zu 0,1% des totalen Zellcholesterins können in einer Minute aus der Zelle geschleust werden. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass das meiste Cholesterin an der Plasmamembran lokalisiert ist. 60-90% des freien Cholesterins der Zelle liegen in der PM, wovon sich 95% auf der zytoplasmatischen Seite der Lipiddoppelschicht der Caveolae befinden. Geringe Mengen von freiem Cholesterin finden sich in anderen intrazellulären Organellen wie Endosomen, Lysosomen. Dazu muss noch der Cholesterinanteil, der nicht in Membranen akkumuliert, sondern als Cholesterinester in zytosolischen Lipidtropfen gespeichert wird, addiert werden. Das Cholesterin, das aus der Zelle geschleust wird, wird durch die Cholesterinbiosynthese ebenso reguliert, wie durch Cholesterinaufnahme über den LDL-Rezeptor und anderen Rezeptoren, wie z. B. dem SR-BI. Um zelluläres, freies Cholesterin aus der Zelle zu befördern, spielt neben der passiven Diffusion der aktive ABC-AI-Transporter, der freies Cholesterin auf HDL übertragen kann eine wichtige Rolle.

4.2.1 Funktion von Annexin VI bei der Exozytose

Zwar wurde Annexin VI wiederholt im Zusammenhang mit der Rezeptor-vermittelten Endozytose untersucht, aber potentielle Aufgaben bei der Exozytose sind weitgehend unbekannt und unerforscht. Die bisherigen Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass Annexin VI den Cholesterinefflux (3.6) und sekretorische Prozesse inhibiert, wobei der molekulare Mechanismus der Sekretionsinhibition noch unklar ist. Bereits 1990 zeigten Zaks und Creutz, dass Annexin VI die Vesikelaggregation verhindert. Es wird postuliert, dass Annexin VI als kompetitiver Inhibitor die Interaktionsstellen bei der Vesikelformation besetzt. Wenn das Annexin II Heterotetramer eine Brücke zwischen zwei Vesikeln bildet, ist vorstellbar, dass Annexin VI diese Brückenkonstruktion stört, indem es um die Bindungsstellen des Annexin II konkurriert (Donnelly and Moss, 1997).

Außerdem kann man aufgrund des Gewebeverteilungsmusters von Annexin VI annehmen, dass Annexin VI eine negativ regulatorische Rolle bezüglich der Exozytose besitzt: In nicht-laktierenden Drüsenzellen der Mamma beispielsweise findet sich Annexin VI, während es in der laktierenden Mamma nicht nachweisbar ist. Daraus kann man folgern, dass der Einfluss des Hypophysenhormons Prolaktin, das für die Laktation verantwortlich ist und selbst wiederum über den Hypothalamus zur Sekretion angeregt wird, die Expression von Annexin VI vermindert (Donnelly and Moss, 1997).

4.2.2. Überexpression von Annexin VI in CHO-Zellen führt zu einer Reduktion des Effluxes von ³H-Cholesterin

In der vorliegenden Arbeit wurde eine stabil Annexin VI überexprimierende Zelllinie dazu verwendet Aufschluss über Effekte des Proteins auf den Cholesterinefflux zu geben. Als experimentelle Hilfsmittel wurde dazu mit radioaktiven Assays, Immunfluoreszenzen (IMF) und Lipid Raft Präparationen gearbeitet.

Bei der Analyse des Cholesterineffluxes mit Hilfe von radioaktiven Assays wurde eine ca. 15-20%-ige Reduktion des ³H-Cholesterineffluxes der CHO-anxVI-Zellen gegenüber den Wildtyp-Zellen festgestellt (3.5). Annexin VI scheint indirekt für das Zurückhalten von Caveolinbewegung (3.9) verantwortlich zu sein. Dadurch kommt es zu einer Reduktion des Cholesterineffluxes, da Cholesterin nicht mehr in ausreichendem Maße vom trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran transportiert werden kann, wo es auf Transporter, die den Efflux vermitteln (ABC-A1 oder SR-B1),

übertragen wird. Dies wurde auch in den Lipid Raft Präparationen bestätigt, die auf eine Akkumulation von Cholesterin im GA hindeuten.

4.2.3 Funktion von Caveolin bei der Exozytose

Caveolin ist ein in den Transport von Cholesterin involviertes Membranprotein. Wenn Fibroblasten mit Cholesterin inkubiert werden, so findet man Caveolin bald in der Region um den Golgi-Komplex. Es erreicht den Golgi-Komplex, indem es von den Caveolae zum ER wandert, bevor es sich weiter zum Golgi-ER bewegt, einem Zwischenkompartiment auf dem Weg zum Golgi-Apparat. Wenn nun das Cholesterin aus dem Medium entfernt wird, wandert das Caveolin zurück zur Zelloberfläche. Somit stimuliert die Gegenwart von Cholesterin in Caveolae die Bewegung von Caveolin zum Golgi-Apparat und umgekehrt.

Außerdem fördern Strukturproteine der Caveolae, wie das Caveolin, den Efflux von freiem Cholesterin (Fielding und Fielding, 2000). Allerdings kann Caveolin nicht den direkten Transport von freiem Cholesterin (FC) durch die komplette Zellmembran an einen extrazellulären Akzeptor vermitteln. Verschiedene Mechanismen werden diskutiert, wie der Transfer von FC durch die Plasmamembran auf HDL vonstatten gehen kann:

1. Die einfache Diffusion bestimmt den Austausch von freiem Cholesterin über die Plasmamembran abhängig vom Konzentrationsgefälle. Die einfache Diffusion ist nicht kompetitiv und unabhängig von Rezeptoraktivität und Energieverfügbarkeit in Form von ATP.
2. Erleichterte Diffusion benötigt die Hilfe eines Carriers, ist sättigbar und findet nur an einem Konzentrationsgradienten statt. Sie benötigt wie die einfache Diffusion keine Energie in Form von ATP. Der in Caveolae lokalisierte SR-BI Transporter scheint Phospholipide, freies und verestertes Cholesterin nach den Regeln der erleichterten Diffusion über die Plasmamembran transportieren (Ji et al., 1997). Er katalysiert sowohl die selektive Aufnahme von Lipiden, als auch den Efflux von Cholesterin entlang des Konzentrationsgefälles (Silver et al., 2001).

Weitere Membranproteine, die vergleichbare Funktionen übernehmen, sind z. B. das CD-36 (de la Llera Moya et al.; 1999), das mit dem Scavengerprotein verwandt ist und wie das Caveolin selber bei steigenden Konzentrationen an freiem Cholesterin vermehrt exprimiert wird (Han et al., 1999).

Auch Annexin II, das konzentriert in den Caveolae vorliegt (Schnitzer et al., 1995), kann direkt an Apo A-1 binden (Brownawell et al., 1996).

3. Der aktive Transport ist abhängig von einem Carrier, benötigt Energie in Form von ATP, ist sättigbar und kompetitiv (Broccardo et al., 1999). Der ABC-AI-Transporter bewerkstelligt den Efflux von Phospholipiden und freiem Cholesterin auf lipidarme Apo A-I (Oram, 2000). Außerdem ist der ABC-AI-abhängige Efflux proportional zur Expression des Transporters (Bortnick et al., 2000).

4.2.3.1 Alleinige Überexpression von Cav1(WT), Cav1(DGI) und Cav3(DGV) in CHO-Zellen zeigt keinen Effekt auf den Cholesterinefflux

In den beschriebenen Experimenten in Kapitel 3.5 wurde der ³H-Cholesterinefflux in den oben genannten CHO-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen bestimmt. Eine Änderung des Cholesterinefflux konnte bei keiner der Zelllinien im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Dies weicht sowohl von der aufgestellten Hypothese dieser Arbeit, als auch von bisher gewonnenen Daten in der Literatur ab.

Smart et al. zeigten 1997, dass Caveolin den direkten Transport von Cholesterin vom ER zu den Caveolae an der PM bewerkstelligt. Dort wurde das Cholesterin von den Caveolae auf Caveolae-freie Membranabschnitte übertragen. In diesen Experimenten ging der Cholesterintransport in Zellen die Caveolin exprimieren 3-4 x schneller vonstatten, als in Zellen die kein Caveolin exprimieren. Allerdings wurden diese Ergebnisse bei kurzen Dynamiken gefunden. Der Transport von Cholesterin durch Caveolin vom ER zur PM dauert nur ca. 10 Minuten. Dies mag eine Erklärung sein, dass in dieser Arbeit keine Unterschiede in den beschriebenen Cholesterinefflux Experimenten gefunden wurden. Es scheint wahrscheinlich, dass die CHO-Zellen während der langen Inkubationszeiten mit HDL kompensatorische Mechanismen gefunden haben, um das Cholesterin aus der Zelle zu schleusen.

Außerdem ist interessant, dass bei den Untersuchungen von Smart et al. die Caveolinbewegung vom ER durch Zugabe von Progesteron gestoppt werden konnte. Dies erinnert an die Untersuchung, die zeigen konnte, dass in laktierenden Mammazellen, die unter dem Einfluss von einem anderen Hormon, dem Prolaktin stehen, Annexin VI nicht exprimiert wird (4.2.1). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Überexpression von Annexin VI die Caveolinbewegung zu hemmen scheint. Interessant wäre zu klären, ob Annexin VI unter Einfluss verschiedener Hormone vermehrt bzw. vermindert exprimiert wird und so wiederum indirekten Einfluss auf das Caveolin nimmt, welches wiederum für den direkten Transport von Cholesterin verantwortlich zu sein scheint.

Die Arbeitsgruppe von Frank (2000) fand hingegen heraus, dass es zu einer Minderung des ^3H -Cholesterineffluxes kommt, wenn Cav-1 überexprimiert wird und umgekehrt zu einer Zunahme des Effluxes bei verminderter Caveolinexpression. Nach einer 48-stündigen Inkubation mit ^3H -LDL und anschließender 30-minütiger bis 4-stündiger HDL-Inkubation mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zeigte sich eine 10-20%-ige Minderung des Effluxes. Bezüglich des Cav-1 wurde weiterhin festgestellt, dass steigende Mengen von HDL die Cav-1 Promotoraktivität senkt und somit HDL einen direkt negativen Effekt auf die Cav-1 Gentranskription hat, vermutlich durch Aktivierung des MAP-Kinase Weges. Weiterhin konnten Frank und Mitarbeiter herausfinden, dass die HDL induzierte verminderte Expression von Cav-1 die Aufnahme von oxidiertem LDL in humanen endothelialen Zellen senkt und somit Caveolin eine proatherogene Rolle bezüglich der Aufnahme von Lipoproteinen spielen kann.

Die Arbeitsgruppe von Pol zeigte 2001, dass es in Zellen, in die Cav3(DGV) transfiziert wurde, zu einer geringen, aber signifikanten Reduktion des Cholesterinefflux von ca. 15% nach 2-stündiger Inkubation mit einem extrazellulären Akzeptor kommt. Weiterhin ist interessant, dass aber die Gesamtmenge des aufgenommenen Cholesterins, sich nicht von der Menge der Kontrollzellen unterschied. Neben der Abnahme von freiem Cholesterin an der Plasmamembran kam es zu einer Akkumulation in Späten Endosomen und Lipidkörpern in Kernnähe, was zu einer Imbalance der intrazellulären Cholesterinverteilung führt.

Warum die vorliegende Arbeit sowohl die Ergebnisse von Frank et al. (2000) und Smart et al. (1997), als auch von Pol et al. (2001) nicht bestätigen konnte, kann vielfältige Gründe haben:

Die Arbeitsgruppe von Frank hat nicht mit CHO-Zellen, sondern mit NIH/3T3-Zellen gearbeitet, in die Onkogene wie v-Abl und H-Ras transfiziert wurden. Die Aufnahmefähigkeit für LDL, das Wachstumsverhalten in der Zellkultur, die Expression von Caveolin-Subtypen bzw. Caveolin-Isoformen können unterschiedlich sein und somit Auswirkung auf den Efflux haben. Möglicherweise haben die CHO-Zellen andere kompensatorische Wege gefunden, um das internalisierte ^3H -Cholesterin wieder abzugeben. Dazu könnte z. B. eine vermehrte Nutzung von Diffusion an der Zellmembran oder eine vermehrte Expression des ABC-AI- oder des SR-BI-Transporters zählen. Ob der ABC-AI-Transporter strikt an der Plasmamembran lokalisiert ist oder ob er sich im Zytoplasma bewegen kann, ist bisher nicht geklärt. Weiterhin kann Cholesterin aus degradiertem LDL direkt zur Plasmamembran transportiert werden, ohne dass es zuvor in Lysosomen gespeichert wird.

Außerdem unterscheidet sich die im Rahmen dieser Arbeit gewählte Inkubationszeit von 4 bis 24 Stunden mit dem extrazellulären Akzeptor von den Inkubationszeiten der anderen Arbeitsgruppen. Dieser lange Zeitraum scheint ausreichend gewesen sein, dass die Zelle andere kompensatorische Mechanismen entwickeln konnte, um das Cholesterin aus der Zelle zu befördern.

4.2.3.2 ABC-AI-Transporter

Der aktive Efflux von inkooperiertem Cholesterin wird durch den ABC-AI Transporter Ca^{2+} -abhängig vermittelt (Takahashi und Smith, 1999), wobei seine genaue Lokalisation noch unklar ist. Die verbreitete Annahme, dass er in der PM lokalisiert ist, wird auf die Tatsache zurückgeführt, dass auch die anderen Mitglieder der ABC-Familie dort gefunden wurden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass er in einem intrazellulären Membrankompartiment lokalisiert ist und lediglich indirekt den Cholesterinefflux an der PM vermittelt. Wie auch immer, neuere Untersuchungen weisen daraufhin, dass die Hauptaufgabe des ABC-AI-Transporters in der Translokation von PL in der PM liegt (Wang N et al. 2001), die dann den Cholesterinefflux zur Folge hat (Fielding et al., 2000). Außerdem scheint der ABC-AI-Transporter auch eine wichtige Rolle beim intrazellulären Transport von internalisiertem LDL von den Späten Endosomen bzw. Lysosomen zum TGN oder zur PM zu übernehmen (Neufeld et al., 2001; Chen W, 2001). Diese Ergebnisse widersprechen allerdings denen der Arbeitsgruppe Mendez (2001), die keine Beteiligung des ABC-AI-Transporters beim Cholesterinefflux aus Lipid Rafts zeigen konnten.

Wie auch immer, bei Patienten, die an der Tangier Krankheit leiden, ist der ABC-AI-vermittelte Lipidtransport durch verschiedenste Mutationen im ABC-AI-Gen gestört (Brooks-Wilson et al., 1999 ; Marcil et al., 1999; Bodzich et al., 1999; Rust et al., 1999). Dies führt zu einer Ansammlung von Cholesterinestern in Lipidtropfen und damit zu einer Verminderung des Cholesterineffluxes auf lipidarme Apolipoproteine (Oram et al., 1995), wobei aber weiterhin das Cholesterin mittels SR-BI aus der Zelle transportiert werden kann (Farcis et al., 1995; Rogler et al., 1995). Durch Abwesenheit von ABC-AI nehmen die lipidarmen Apo-AI-Partikel nicht mehr das zelluläre Cholesterin auf und entfernen es so aus dem Plasma. Eine Transformation der lipidfreien Apo A-I Partikel bzw. der lipidarmen pre- β -HDL in lipidreiche α -HDL kann nicht stattfinden und somit ist auch kein Austausch mit den Apo-B-haltigen

Lipoproteinen möglich. Niedrige triglyceridreiche LDL-Spiegel, sind deshalb die Folge bei Tangier Patienten.

Neben der defekten Übertragung von FC und PL an der PM auf lipidarme HDL ist außerdem der Transport von Lipiden vom GA zur PM bei Tangier-Patienten und ABC-AI defekten Mäusen gestört (Orso et al., 2000). Morphologisch zeigt sich auch eine abnormale Expression der zelloberflächlichen Caveolae, was auf einen Einfluss des ABC-AI Proteins auf die Caveolinexpression nahe legt.

Wie auch immer, heterozygote Träger des Defektes im ABC-AI besitzen halbnormale HDL Konzentrationen. Eine Untersuchung von M. Hayden hat ergeben, dass Hypo- α -Lipoproteinämie durch eine heterozygote Mutation im ABC-AI-Transporter begründet werden kann denn bei Patienten mit Hypo- α -Lipoproteinämie liegt ein niedriges HDL vor. Es wird interessant zu klären sein, ob und wenn ja wie ein Polymorphismus im ABC-AI-Transporter Mitursache für eine Verminderung der HDL-Plasmakonzentration um 10-20% sein kann. Umgekehrt wäre es interessant zu wissen, ob eine Überexpression von ABC-AI eine Zunahme der HDL-Konzentration bewirken könnte und somit die Akkumulation von cholesterinreichen Makrophagen in atherosklerotischen Plaques reduzieren kann (Young and Fielding CJ, 1999).

4.2.3.3 Scavenger Rezeptor BI und Caveolae

SR-BI ist ein 57 kDa-großes Protein. Es besteht aus 509 Aminosäuren und besitzt eine kurze N-terminale, zytoplasmatische Domäne (9 AS), eine Transmembrandomäne (22 AS), eine große extrazelluläre Domäne (408 AS), eine zweite Transmembrandomäne (23 AS) und ein C-terminales, zytoplasmatisches Ende. SR-BI wird in geringen Mengen von fast allen Plasmamembranen peripherer Zellen synthetisiert. Die physiologische Relevanz ist jedoch nicht völlig geklärt.

SR-BI vermittelt einerseits die selektive Aufnahme von Phospholipiden in die Zelle (Urban et al., 2000) und andererseits den durch Lipoproteine vermittelten Efflux von Cholesterin (Ji et al., 1997).

Acton und Mitarbeiter (1996) fanden heraus, dass SR-BI HDL bindet und so die selektive Aufnahme von Cholesterinestern in CHO-Zellen, die den transfizierten Rezeptor überexprimieren, vermittelt. Dieses Ergebnis war das erste Indiz dafür, dass SR-BI eine wichtige Rolle im Rahmen des zellulären und systemischen HDL-Stoffwechsels spielt. SR-BI kann neben HDL und LDL auch andere Liganden wie modifizierte Lipoproteine, anionische Phospholipidvesikel und abgestorbenen

Thymozyten erkennen und binden, aber nur bei Bindung von LDL und HDL ist eine Bedeutung für den Stoffwechsel bekannt.

Neben der selektiven Aufnahme von HDL/Cholesterin/-estern, kann SR-BI auch den Cholesterinefflux stimulieren, wenn er in CHO-Zellen überexprimiert wird (Ji et al., 1997; Jian et al., 1998). Die SR-BI-Expression stimuliert die bidirektionale Bewegung von freiem Cholesterin zwischen Zellen und HDL. Diese Fähigkeit ist physiologisch relevant, da die SR-BI-Expression in verschiedenen Zelllinien, die SR-BI physiologisch exprimieren, mit der Menge des abgegebenen Cholesterins korreliert.

Aktuelle Studien postulieren auch, dass SR-BI den Metabolismus der Apo-B-enthaltenen Lipoproteinen ändert und die Entstehung von Atherosklerose beeinflusst (Williams and Wilkins, 1999).

SR-BI bewirkt eine Veränderung von Membranmikrodomänen wie der Caveolae und verbessert so die Bewegung von freiem Cholesterin über die Membran. 60% der SR-BI wird in den Caveolae von CHO-Zellen gefunden (Babitt et al., 1997; Graf et al., 1999), so dass vermutet werden kann, dass die SR-BI-abhängige Bewegung zwischen FC und HDL über Caveolae vonstatten geht.

Andererseits wird SR-BI in den Kanalsystemen der Mikrovilli von Gelbkörperzellen gefunden, die nur wenig Caveolin enthalten (Reaven et al., 1998; Reaven et al., 1989). Des Weiteren konnte in Granulosazellen des Ovars der Ratte die SR-BI-Expression massiv durch Hormone stimuliert werden, ohne dass es zu einer parallelen Zunahme der Caveolin-Expression kam. Bei der Ratte wurde die Caveolinproduktion sogar noch reduziert, während sie in der Maus gleich blieb (Azhar et al., 1998; Reaven et al., 1999). Der endgültige Zusammenhang zwischen SR-BI und Caveolin ist nicht geklärt und ist Gegenstand weiterer Forschung.

4.2.3.4 ABC-AI- und SR-BI-Transporter

SR-BI erleichtert die Abgabe von FC an HDL. ABC-AI besitzt Schlüsselfunktion bei der Übertragung von FC auf Apolipoproteine/HDL. Die Vermutung, dass Überexpression dieser beiden Transporter synergetische Effekte bezüglich ihrer Funktion besitzen, also zusammen effektiver arbeiten als jeder für sich alleine genommen, konnte in Experimenten nicht bestätigt werden. Im Gegenteil die Co-Transfektion von SR-BI und ABC-AI verhinderte sogar eine Zunahme des Cholesterineffluxes. Es scheint, dass SR-BI und ABC-AI getrennte und konkurrierende Rollen bezüglich des Cholesterinaustausches zwischen Makrophagen und HDL besitzen (Chen et al., 2000).

Die Energie, die der ABC-AI Transporter benötigt, um seiner Funktion nachkommen zu können, erklärt, warum SR-BI in vivo in steroidhaltigen Geweben und der Leber in höherem Maße exprimiert wird: Sicherung der Aufnahme und Speicherung von Cholesterinestern (CE) und FC, um die Steroidsynthese und Sekretion in die Galle bewerkstelligen zu können.

Vorstellbar ist auch, dass SR-BI und ABC-AI in polarisierten Zellen auf gegenüberliegenden Seiten der Zelle exprimiert werden und so im Zusammenspiel den Transport von Cholesterin durch die Zelle fördern.

4.3 Assoziation von Caveolin und Annexin VI

Die Tatsache, dass Annexin VI mit dem caveolären Markerprotein Caveolin interagiert, wirft neues Licht auf die Fragen über die Aufgaben dieses Proteins. Annexin VI wird mit anderen Proteinen, die für Vesikelabknospungen verantwortlich sind, in endothelialen Caveolae gefunden (Schnitzer et al., 1995) und übernimmt Aufgaben bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose. Außerdem interagiert Annexin VI Ca^{2+} -abhängig mit Lipid Rafts (Babiychuck und Draeger, 2000; Orito et al., 2001). Zusammen mit der Cholesterin-abhängigen Membranassoziation von Annexin VI (Ayala-Sanmartin, 2000) spricht dies für eine regulatorische Aufgabe von Annexin VI in Caveolae und für einen Einfluss auf die in Caveolae stattfindende Signaltransduktion (Simons und Toomre, 2000).

Pol et al. (1999) haben in Frühen Endosomen Anteile von Caveolin gefunden und konnten damit eine Überschneidung der intrazellulären Routen von Rezeptor-vermittelter und caveolärer Endozytose in die Diskussion bringen. Sie vermuteten, dass es verschiedene Subpopulationen von Caveolae geben könnte, die helfen, Moleküle über verschiedene Wege an ihre intrazellulären Ziele zu transportieren. Beim dynamischen Transport zwischen Caveolae, Lipid Rafts und Endosomalen Kompartimenten scheint Annexin VI eine regulatorische Rolle zu übernehmen (Grewal et al., 2000; Pol et al., 2000). Erste Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Cholera Toxin B zu den Molekülen gehört, die einen solchen Weg beschreiten. Kurz nach der Aufnahme durch Caveolae konnte es nämlich in einem tubulovesikulären Kompartiment, was wohl das Frühe Endosomale Kompartiment darstellt, und in Multivesikulären Körpern nachgewiesen werden. (Tran et al., 1987). Da Caveolin für den intrazellulären Cholesterintransport verantwortlich gemacht wird, ist nicht auszuschließen, dass es auch für andere zu transportierende Moleküle als Vehikel dient.

Alternativ wird vorgeschlagen, dass Annexin VI in Caveolae an einem ganz anderen zellbiologischen Prozess teilhaben könnte, der Signaltransduktion. Ras-GTPasen regulieren wichtige molekulare Schlüsselwege, die für das Wachstum und die Differenzierung von Zellen von großer Bedeutung sind (Downward, 1997). Caveolin wurde als Ras-bindendes Protein identifiziert (Song et al., 1996), weshalb Caveolae als wichtige Integrationszentren der Signaltransduktion angesehen werden (Anderson, 1998). Ein wichtiger Regulator der Ras-Aktivität ist das p120^{GAP}, welches von Davis und Mitarbeitern (1996) als Annexin VI-bindendes Protein identifiziert wurde. p120^{GAP} und Annexin VI scheinen außerdem mit Fyn und Pyk2, zwei Tyrosinkinase, die ebenfalls mit der Regulation von Ras assoziiert sind, einen Proteinkomplex zu bilden, dessen Rolle noch nicht genau bekannt ist (Chow et al., 2000). Anzunehmen ist, dass das Annexin VI in diesem Komplex mit Hilfe seiner Lipidbindungsfähigkeit eine Überbrückungsfunktion übernimmt, um die Moleküle an die Plasmamembran zu rekrutieren und so eine Interaktion mit Ras in Caveolae zu ermöglichen. Erwähnt sei in diesem Zusammenhang, dass mutierte Ras-Proteine zur Zelltransformation führen und in vielen verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden konnten (Joneson et al., 1997; Bos, 1989).

Zwar sind mittlerweile einige Interaktionspartner von Caveolin und Annexin bekannt, aber welche Rolle sie im physiologischen Rahmen spielen bzw. wie der genaue Ablauf derartiger Wechselwirkungen ist, ist bisher unklar. Aus den bisherigen Arbeiten geht auch hervor, dass insbesondere die Aufklärung eines Mechanismus zur Steuerung von Liganden weiterer und intensiverer Forschung bedarf, um Prozesse, wie den Weg des Cholesterins an die Plasmamembran zum Efflux, besser zu verstehen. Eine ähnliche Wertung gilt auch für die Rolle des Annexin VI beim Efflux; erst weitere Forschung kann hier Klarheit bringen.

4.3.1 Aufgaben von Caveolin und Annexin VI beim intrazellulären Cholesterintransport

Annexin VI hat neben der inhibitorischen Wirkung auf den HDL induzierten Cholesterinefflux (3.6) auch Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung von Cholesterin und damit auch auf die Lokalisation des Cholesterin transportierenden Proteins Caveolin (3.9). Aufgabe des Caveolin ist der Transport von Cholesterin an die Plasmamembran, da es sich zwischen dem ER, dem Golgi-Apparat, den Lipid Rafts und der Plasmamembran bewegen kann (Smart et al., 1996; Frank et al., 2001; Uittenbogaard und Smart, 2000).

Annexin VI übernimmt stabilisierende Aufgaben in Caveolae und Lipid Rafts und ist an der Membranfusionierung, die Ca^{2+} - und Cholesterin-abhängig ist, beteiligt (Babychuck und Draeger, 2000; Pol et al., 1999; Orito et al., 2001, Ayala-Sanmartin et al., 2001). Die Überexpression von Annexin VI scheint allerdings insgesamt destabilisierenden Einfluss auf die Caveolae zu haben, was die Anreicherung von Caveolin am Golgi-Apparat zeigt (3.9) und zum darauffolgenden Verlust der Caveolae an der Zelloberfläche führt (Grewal, unveröffentlichte EM-Aufnahmen). Annexin VI scheint zwar nicht direkt mit Caveolin zu interagieren, aber seine Gegenwart führt zu einer verminderten Beweglichkeit von Lipid Rafts. Folge ist eine Zerstörung der intrazellulären Cholesterinbalance mit vermindertem Transport von Cholesterin zur PM, was wiederum zum Verlust der Stabilität der Caveolae führt und die Anreicherung von Caveolin am GA in CHO-anxVI-Zellen zur Folge hat.

4.4 Ausblick

Um genauere Aufschlüsse über den intrazellulären Cholesterintransport und Cholesterinefflux zu bekommen, bedarf es weiterer Untersuchungen. Von Bedeutung wären Erkenntnisse über die Transporter in der PM, die den Cholesterinefflux vermitteln. In diesem Rahmen wäre es wichtig zu wissen, ob und wie der Einfluss von SR-BI auf den ABC-AI bzw. umgekehrt ist. Außerdem wäre die Erkenntnis wichtig, ob sich der ABC-AI-Transporter im Zytoplasma bewegen kann oder ob er in der Plasmamembran verankert ist. Auch Aufschluss über die genaue Art der Interaktion zwischen Caveolin als Transportmolekül und den in der Plasmamembran lokalisierten Transportern wäre von Bedeutung.

Auf DNS- und RNS-Ebene könnte man untersuchen, welche Gene hochreguliert werden, wenn mutierte Caveoline exprimiert werden, vor allem wenn die Zellen große Menge von Cholesterin akkumuliert haben.

Auch genauere Kenntnisse bezüglich der Interaktion zwischen Annexin VI und Caveolin wären von Interesse. Ebenso welche Hormone Einfluss auf die Expression von Annexin haben.

In diesem Rahmen könnte die Perspektive mit einer Annexin „knock-out“ Maus experimentell zu arbeiten große Bedeutung haben.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Funktionen von Annexin VI und Caveolin im intrazellulären Cholesterintransport in CHO-Zellen. Cholesterinreiche Lipid Rafts und Caveolae an der Zelloberfläche sind entscheidend am Cholesterintransport beteiligt. Caveolin als Strukturelement der Caveolae bindet und transportiert Cholesterin innerhalb der Zelle. Annexin VI bindet zwar kein Cholesterin, ist aber ebenfalls an der Regulation der Bildung und Stabilität von Lipid Rafts und Caveolae beteiligt.

Die Hypothese dieser Arbeit war, dass die Überexpression von dominant negativen Mutanten des Caveolinproteins Cav3(DGV) und Cav1(DGI), die Funktion der Caveolae beeinträchtigt und den Cholesterinefflux stört. Umgekehrt würde eine erhöhte Anzahl von Caveolae in Caveolin 1 überexprimierenden Zellen [Cav1(WT)] eine Steigerung des Cholesterineffluxes zur Folge haben. Überexpression von Annexin VI (anxVI) interferiert mit der Bildung von Lipid Rafts und führt ähnlich den Cav-Mutanten zu einer reduzierten Bildung cholesterinreicher Caveolae.

Mit Hilfe radioaktiver Assays wurde der ^3H -Cholesterinefflux untersucht. Es zeigte sich eine 15-20%ige Minderung des HDL induzierten Effluxes in anxVI-Zellen gegenüber Wildtyp(WT)-Zellen, was daraufhin weist, dass die Überexpression von Annexin VI die Zellmembran und Lipidzusammensetzung der Zelle verändert, dass der Transport des Cholesterins in Lipid Rafts und Caveolae beeinträchtigt ist und eine Reduktion des Effluxes zur Folge hat.

Im Anschluss wurde mittels Immunfluoreszenzen die Lokalisation von Annexin VI und Caveolin beim Cholesterintransport dargestellt. Obwohl Annexin VI nicht im Golgi-Apparat zu finden ist, beeinflusst es die Lokalisation und Konzentration von Caveolin in anxVI-Zellen. Dieser Phänotyp ähnelt dem der Cav3(DGV) Mutante. Somit ist vermutlich der reduzierte Transport von Caveolin vom Golgi-Apparat an die Zelloberfläche für den reduzierten Cholesterinefflux in anxVI-Zellen verantwortlich.

Lipid Raft Präparationen der verschiedenen Zellen bestätigten diese Beobachtungen. In Cav1(WT)-Zellen kommt es gegenüber WT-Zellen zu einer Anreicherung von ^3H -Cholesterin sowohl in Lipid Rafts, als auch in schweren Membranen, die vorwiegend Plasmamembran und Golgi-Apparat enthalten. Im Gegensatz dazu findet sich ^3H -Cholesterin in anxVI- und Cav3(DGV)-Zellen vermehrt in schweren Membranen, was wiederum mit der Akkumulation von Caveolin im Golgi-Apparat in anxVI-Zellen in den Immunfluoreszenzen korreliert. Demzufolge scheint Annexin VI für die Bildung und den Transport von cholesterinreichen Membranstrukturen an die Zelloberfläche und den daran gekoppelten reversen Cholesterintransport enorm wichtig zu sein.

6 Abkürzungen

ABC-AI	ATP-Binding Cassette Transporter AI
ACAT	Acyl Coenzym A Cholesterin Acyltransferase
Acyl CoA	Acyl Coenzym A
Anx	Annexin
Apo	Apolipoprotein
ARF	ADP Ribosylationsfaktor
ATP	Adenosinnukleotidtriphosphat
β -Gal	β -Galaktosidase
BSA	Bovine Serum Albumin
Cav	Caveolin
CE	Cholesterinester
CESD	Cholesteryl Ester Storage Disease
CHO	Chinese Hamster Ovar
Chol	Cholesterin
CMV	Cytomegalievirus
COP	Coat Protein Subunit
CP	Coated Pit
Cpm	Counts per minute
CSD	Caveolin Scaffolding Domain
DAG	Diacylglycerol
DIG	Deteregnt Insoluble Glycolipid-enriched Complexes
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
Dyn	Dynamamin
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EGTA	Ethylenglykol-bis-N,N,N',N'-tetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGF-R	EGF-Rezeptor
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular Signal Related Kinase
FC	Freies Cholesterin
FCS	Fötale Kälber Serum
GAP	GTPase Activating Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosinnukleotidtriphosphat
GTPase	GTP spaltendes Enzym
HDL	High Density Lipoprotein
HMG-CoA	3-Hydroxy-3Methylglutaryl Coenzym A
HRP	Horseradish Peroxidase
HSP 56	Heat Shock Protein 56
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IMF	Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
IP3	Inositol-Triphosphat
LAMP	Lysosome Associated Membrane Protein
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-R	LDL-Rezeptor
LE	Late Endosomes
LPDS	Lipoprotein Deficient Serum
Igp120	lysosomal glycoprotein 120

LPL	Lipoprotein Lipase
LRP	LDL-R Related Protein
LY (Lys)	Lysosomen
M6P	Mannose-6-Phosphat
MDCK	Madine Darby Canine Kidney
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MVB	Multivesicular Bodies
NCEH	Neutrale Cholesterinesterhydrolase
NSF	N-Ethylmaleimide sensitive fusion protein
NPC	Niemann Pick Type C
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Plateled Derived Growth Factor
PIC	Proteinase Inhibitor Cocktail
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PL	Phospholipide
PM	Plasmamembran
RBD	Ras-binding domain
RC	Recycling Compartment
RCT	Reverse Cholesterol Transport
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium (=Natrium) Dodecylsulfat
SE	Sortierende Endosomen
SFV	Semliki Forest Virus
SNAP	Soluble NSF Attachment Protein
SNARE	SNAP Rezeptor
SR-BI	Scavenger Receptor B Type I
SRE	Sterol Responsive Elements
Tf	Transferrin
Tf-R	Tf-Rezeptor
TD	Tangier Disease
TGN	Trans Golgi Netzwerk
Tris	Trishydroxyaminomethan
t-SNARE	target SNAP Rezeptor
TX-100	Triton X-100
U	Units (Enzymeinheiten)
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
v-SNARE	vesicle SNAP Rezeptor
VSV-G	Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp

7 Literaturverzeichnis

- Abrami L, Fivaz M, Glauser P-E, Parton RG, Goot van der FG (1998) A pore-forming toxin interacts with a GPI-anchored protein and causes vacuolation of the endoplasmic reticulum *J Cell Biol* 140:525-40
- Ahle S, Mann A, Eichelsbacher U, Ungewickell E (1988) Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasmamembrane *EMBO J* 7:919-929
- Ahle S, Ungewickell E (1989) Identification of a clathrin binding subunit in the HA2 adaptor protein complex *J Biol Chem* 264:20089-20093
- Anderson HA, Chen Y, Norkin LC (1996) Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae *Mol Biol Cell* 7:1825-1834
- Anderson RGW (1998) The caveolae membrane system *Annu Rev Biochem* 67:199-225 (1998)
- Anderson RGW, Brown MS, Beisiegel U, Goldstein JL (1982) Surface distribution and recycling of the low density lipoprotein receptor as visualized with antireceptor antibodies *J Cell Biol* 93:523-531
- Anderson RGW, Brown MS, Goldstein JL (1977) Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts *Cell* 10:351-364
- Ando Y, Imamura S, Hong YM, Owada MK, Kakunaga T, Kannagi R (1989) Enhancement of calcium sensitivity of lipocortin I in phospholipid binding induced by limited proteolysis and phosphorylation at the amino terminus as analyzed by phospholipid affinity column chromatography *J Biol Chem* 264:6948-6955
- Aniento F, Gu F, Parton RG, Gruenberg J (1996) An endosomal β -COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes *J Cell Biol* 133:29-41
- Avila-Sakar AJ, Creutz CE, Kretsinger RH (1998) The structure of bovine annexin VI in a calcium-bound state *Biochim Biophys Acta* 1387:103-116
- Ayala-Sanmartin J (2001) Cholesterol enhances phospholipid binding and aggregation of Annexins by their core domain *Biochim Biophys Res Comm* 283:72-79
- Azhar S, Nomoto A, Leers-Sucheta S, Reaven E (1998) Simultaneous induction of an HDL receptor protein (SR-BI) and the selective uptake of HDL-cholesteryl esters in a physiologically relevant steroidogenic cell model *J Lipid Res* 39:1616-1628
- Babitt J, Trigatti B, Rigotti A, Smart EJ, Anderson RG, Xu S, Krieger M (1997) Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae *J Biol Chem* 272:13242-13249
- Babiyhuck EB, Draeger A (2000) Annexins in cell membrane dynamics: Ca^{2+} -regulated association of lipid domains *J Cell Biol* 150:1113-1123
- Babiyhuck EB, Draeger A, Babiyhuck EB (2000) Smooth muscle actomyosin promotes Ca^{2+} -dependent interactions between annexin VI and detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched membrane domains *Acta Biochim Pol* 47:579-589

- Barrett AJ (1972) Lysosomal enzymes *Lysosomes: a Laboratory Handbook*, edited by J. T. Dingle. Amsterdam: Elsevier p. 46-135
- Bilderback TR, Grigsby RJ, Dobrowsky RT (1997) Association of p75 (NTR) with caveolin and localization of neurotrophin-induced sphingomyelin hydrolysis to caveolae *J Biol Chem* 272:10922-27
- Blackwood RA, Ernst JD (1990) Characterisation of Ca²⁺-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins *J Biol Chem* 266:195-200
- Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diedrich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G (1999) The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease *Nat Genet* 22:347-351
- Bortnick AE, Rothblat GH, Stoudt G, Hoppe KL, Royer IJ, McNeish J, Francone OL (2000) The correlation of ATP binding 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines *J Biol Chem* 275:28634-28640
- Braell WA, Schlossman DM, Schmid SL, Rothman JE (1984) Dissociation of clathrin coats coupled to the hydrolysis of ATP: role of an uncoating ATPase *J Cell Biol* 99:734-741
- Bretscher MS, Munro S (1993) Cholesterol and Golgi apparatus *Science* 261:1280-1281
- Broccardo C, Luciani M, Chimini G (1999) The ABCA class of mammalian transporters *Biochim Biophys Acta* 1461:395-404
- Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashborne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Primstone S, Genest J Jr, Kastelein JJ, Hayden MR (1999) Mutations in ABC1 in Tangier disease and family high-density lipoprotein deficiency *Nat Genet* 22:336-345
- Brown DA, London E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes *Annu Rev Cell Dev Bio* 14:111-136
- Brown DA, Rose JK (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface *Cell* 68:533-544
- Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis *Science* 232:34-47
- Brown MS, Goldstein JL (1983) Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis *Annu Rev Biochem* 52:223-261
- Brown MS, Goldstein JL (1997) The SREBP pathway regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor *Cell* 89:331-340
- Chen W, Sun Y, Welch C, Gorelik A, Leventhal A, Tabs I, Tall AR (2001) Preferential ATP-binding Cassette Transporter A1 (ABCA1)-mediated cholesterol efflux from Late Endosomes/Lysosomes *J Biol Chem* 276:43564-43569

- Chun M, Liyanage UK, Lisanti MP, Lodish HL (1994) Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11728-32
- Clark DM, Moss SE, Wright NA, Crumpton MJ (1991) Expression of annexin VI (p68, 67 kDa-calelectrin) in normal human tissues: evidence for developmental regulation in B- and T-lymphocytes *Histochemistry* 96:405-412
- Clary DO, Griff IC, Rothmann JE (1990) SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animal and yeast *Cell* 61:709-721
- Clary DO, Rothmann JE (1990) Purification of three related peripheral membrane proteins needed for vesicular transport *J Biol Chem* 265:10109-10117
- Clemente R, Jones DR, Ochoa P, Romero G, Mato JM, Varela-Nieto I (1995) Role of glycosyl-phosphatidylinositol hydrolysis as a mitogenic signal for epidermal growth factor *Cell Signal* 7:411-21
- Creutz CE (1992) The annexins and exocytosis *Science* 258:924-931
- Czarnecka H, Yokoyama S (1995) Lecithin cholesterol acyltransferase reaction on cellular lipid released by free apolipoprotein-mediated efflux *Biochemistry* 34:4385-4392
- Danielsen EM, Deurs van B (1995) Involvement of detergent-insoluble complexes in the intracellular transport of intestinal brush border enzymes *J Cell Biol* 131:939-950
- Danielsen EM, Hansen GH, Poulsen MD (1993) Apical secretion of apolipoproteins from enterocytes *J Cell Biol* 120:1347-1356
- Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF (1983) pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2258-2262
- Davis AJ, Butt JT, Walker JH, Moss SE, Gawler DJ (1996) The Ca²⁺-dependent lipid binding domain of P120^{GAP} mediates protein-protein interactions with Ca²⁺-dependent membrane-binding proteins *J Biol Chem* 271:24333-24336
- Davis CG, Goldstein JL, Sudhof TC, Anderson RGW, Russell DW, Brown MS (1987) Acid-dependant ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region *Nature* 326:760-765
- Desjardins M, Celis JE, van Meer G, Dieplinger H, Jahraus A, Griffiths G, Huber LA (1994) Molecular characterization of phagosomes *J Biol Chem* 269:32194-32200
- Diaz-Munoz M, Hamilton SL, Kaetzel MA, Hazarika P, Dedman JR (1990) Modulation of Ca²⁺ release channel activity from sarcoplasmic reticulum by annexin VI (67-kDa calcimedlin) *J Biol Chem* 265:15894-15899
- Diego de I, Schwartz F, Siegfried H, Dauterstedt P, Heeren J, Beisiegel U, Enrich C, Grewal T (2002) Cholesterol Modulates the Membrane Binding and Intracellular Distribution of Annexin 6 *J Biol Chem* 277:32187-32194
- Dieplinger H, Zechner R, Kostner GM (1985) The in vitro formation of HDL2 during the action of LCAT: the role of triglycerid-rich lipoproteins *J Lipid Res* 26:273-279

- Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM (1995) Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem* 270:6838-6842
- Dipaola M, Maxfield FR (1984) Conformational changes in the receptors of epidermal growth factor and asialoglycoproteins induced by the mildly acid pH found in endocytic vesicles *J Biol Chem* 259:9163-9171
- Donnelly SR, Moss SE (1997) Annexins in the secretory pathway *Cell Mol Life Sci* 53: 533-538
- Dörner K (1998) Klinische Chemie und Hämatologie *Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart*
- Driessen HPC, Newman RH, Freemont PS, Crumpton MJ (1992) A model of the structure of human annexin VI bound to lipid monolayers *FEBS* 306:75-79
- Dubois T, Soula M, Moss SE, Russo-Marie F, Rothhut B (1995) Potential interaction between annexin VI and a 56-kDa protein kinase in T cells *Biochem Biophys Res Com* 212:270-278
- Dunn KW, Maxfield FR (1992) Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes by maturation of sorting endosomes *J Cell Biol* 117:301-310
- Dunn KW, McGraw TE, Maxfield FR (1989) Iterative Fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome *J Cell Biol* 109:3303-3314
- Dunn WA, Hubbard AL (1984) Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by hepatocytes in the perfused rat liver: ligand and receptor dynamics *J Cell Biol* 98:2148-2159
- Dupree P, Parton RG, Raposo G, Kurzcahlia TV, Simons K (1993) Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells *EMBO J* 12:1597-1605
- Eckardstein von A (1996) Cholesterol efflux from macrophages and other cells *Curr Opin Lipidol* 7:308-319
- Edwards HC, Booth AG (1987) Calcium-sensitive, lipid-binding cytoskeletal proteins of the human placental microvillar region *J Cell Biol* 105:303-311
- Edwards HC, Crumpton MJ (1990) Ca²⁺-dependent phospholipid and arachidonic acid binding by the placental annexins VI and IV *Eur J Biochem* 198:121-129
- Emans N, Gorvel J-P, Walter C (1993) Annexin II is a major component of fosogenic endosomal vesicles *J Cell Biol* 120: 137-69
- Engelman JA, Wykoff CC, Yasuhara S, Song KS, Okamoto T, Lisanti MP (1997) Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth *J Biol Chem* 272:16374-16381
- Feron O, Saldana F, Michel JB, Michel T (1998) The endothelial nitric oxide synthase-caveolin regulatory cycle *J Biol Chem* 273:3125-3128
- Feron O, Smith TW, Michel T, Kelly RA (1997) Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes *J Biol Chem* 272:17744-48
- Fiedler K, Parton RG, Kellner R, Etzold T, Simons K (1994) VIP 36, a novel component of glycolipid rafts and exocytic carrier vesicles in epithelial cells *EMBO J* 13:1729-1740

- Field FJ, Born E, Murthy S, Mathur SN (1998) Caveolin is present in intestinal cells: role in cholesterol trafficking? *J Lipid Res* 39:1938-1950
- Fielding CJ, Bist A, Fielding PE (1999) Intracellular cholesterol transport in synchronized human skin fibroblasts *Biochemistry* 38:2506-2513
- Fielding CJ, Fielding PE (2000) Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships *Biochim Biophys Acta* 1529:210-222
- Fielding CJ, Fielding PE (1997) Intracellular cholesterol transport *J Lipid Res* 38:1503-1521
- Fielding PE, Fielding CJ (1995) Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol *Biochemistry* 34:14288-14292
- Fielding PE, Fielding CJ (1996) Intracellular transport of low density lipoprotein derived free cholesterol begins at Clathrin-coated pits and terminates at cell surface caveolae *Biochemistry* 35:14932-14938
- Fielding PE, Nagao K, Hakamata H, Chimini G, Fielding CJ (2000) A two-step mechanism for free cholesterol and phospholipid efflux from human vascular cells to apolipoprotein A-1 *Biochemistry* 39:14113-14120
- Fleet A, Ashworth R, Kubista H, Edwards H, Bolsover S, Mobbs P, Moss SE (1999) Inhibition of EGF-dependent calcium influx by Annexin VI is splice form-specific *Biochem Biophys Res Com* 260:540-546
- Forte TM, Goth-Goldstein R, Nordhausen RW, McCall MR (1993) Apolipoprotein A-I-cell membrane interaction: extracellular assembly of heterogeneous nascent HDL particles *J Lipid Res* 34:317-324
- Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG (1995) De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8655-8659
- Francis GA, Knopp RH, Oram JF (1995) Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier disease *J Clin Invest* 96:78-87
- Frank PG, Galbiati F, Volonte D, Razani B, Cohen DE, Marcel YL, Lisanti MP (2001) Influence of caveolin-1 on cellular cholesterol efflux mediated by high-density lipoproteins *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C1204-C1214
- Fridriksson EK, Shipkova PA, Sheets ED, Holowka D, Baird B, McLafferty FW (1999) Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry *Biochemistry* 38:8056-8063
- Frokjaer-Jensen J (1980) Three-dimensional organization of plasmalemmal vesicles in endothelial cells. An analysis by serial sectioning of frog mesenteric capillaries. *J Ultrastruct Res* 73:9-20
- Fujimoto T (1993) Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae *J Cell Biol* 120:1147-57
- Fujimoto T, Nakade S, Miyawaki A, Mikoshiba K, Ogawa K (1992) Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae *J Cell Biol* 119:1507-13
- Furuchi T, Anderson RG (1998) Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK) *J Biol Chem* 273:21099-21104

- Futter CE, Felder S, Schlessinger J, Ullrich A, Hopkins CR (1993) Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor *J Cell Biol* 120:77-83
- Galbiati F, Volonte D, Engelmann JA, Watanabe G, Burk R, Pestell RG, Lisanti MP (1997) Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactive the p42/44 MAP kinase cascade *EMBO J* 17:6633-6648
- Garver WS, Erickson RP, Wilson JM, Colton TL, Hossain GS, Kozloski MA, Heidenreich RA (1997) Altered expression of caveolin-1 and increased cholesterol in detergent insoluble membrane fractions from liver in mice with Niemann-Pick disease type C *Biochim Biophys Acta* 1361:272-280
- Genest J, Marcil M, Denis M, Yu L (1999) High density lipoproteins in health and disease *J Invest Med* 47:31-42
- Gerke V, Moss E (1997) Annexins and membrane dynamics *Biochim Biophys Acta* 1357:129-154
- Gerke V, Weber K (1984) Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin *EMBO J* 3:227-233
- Glenney J (1986) Two related but distinct forms of the Mr 36,000 tyrosine kinase substrate (calpactin) that interact with phospholipid and actin in a Ca^{2+} -dependent manner *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4258-4262
- Glenney JR, Soppet D (1992) Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10517-10521
- Glenney JR, Tack BF (1985) Amino-terminal sequence of p36 and associated p10: identification of the site of tyrosine phosphorylation and homology with S-100 *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7884-7888
- Goldberg RI, Smith RM, Jarett L (1987) Insulin and alpha 2-macroglobulin-methylamine undergo endocytosis by different mechanisms in rat adipocytes: Comparison of intracellular events *J Cell Physiol* 133:213-218
- Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ (1985) Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system *Annu Rev Cell Biol* 1:1-39
- Gotto AM, Pownall HJ, Havel RJ (1986) Introduction to the plasma lipoproteins *Method Enzymol* 128:3-41
- Greenspan P, St Clair RW (1984) Retroendocytosis of low density lipoprotein. Effect of lysosomal inhibitors on the release of undegraded 125I-low density lipoprotein of altered composition from skin fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 259:1703-1713.
- Grewal T, Heeren J, Mewawala D, Schnittgerhans T, Wendt D, Salomon G, Enrich C, Beisiegel U, Jäckle S (2000) Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of low density lipoprotein to the prelysosomal compartment *J Biol Chem* 275:33806-33813
- Griffiths G, Back R, Marsh M (1989) A quantitative analysis of the endocytic pathway in baby hamster kidney cells *J Cell Biol* 109:2703-2720

- Gruenberg J, Griffiths G, Howell KE (1989) Characterisation of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro *J Cell Biol* 108:1301-1316
- Hajjar KA, Jacovina AT, Chacko J (1994) An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator I. Identity with annexin II *J Biol Chem* 269:21191-21197
- Hara H, Yokoyama S (1991) Interaction of free apolipoproteins with macrophages: formation of high density lipoproteins-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol *J Biol Chem* 226:3080-3086
- Harder T, Gerke V (1993) The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin II-2 p11-2 complex *J Cell Biol* 123: 1119-32
- Hazarika P, Kaetzel MA, Sheldon A, Karin NJ, Fleischer S, Nelson TE, Dedman JR (1991) Annexin VI is associated with calcium-sequestering organelles *J Cell Biochem* 46:78-85
- Heeren J, Weber W, Beisiegel U (1999) Intracellular processing of endocytosed triglycerid-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation *J Cell Sci* 112:349-359
- Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA (1998) Dynamin-mediated internalization of caveolae *J Cell Biol* 141:85-99
- Heuser JE, Evans L (1980) Three dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts *J Cell Biol* 84: 560-583
- Hicke L, Schekman R (1990) Molecular Machinery required for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex *Bioessays* 12:253-258
- Hinshaw JE, Schmid SL (1995) Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding *Nature* 374:190-192
- Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL (1992) Molecular genetics of the LDL-receptor gene familial hypercholesterolemia *Hum Mut* 1:445-466
- Hope HR, Pike LJ (1996) Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains *Mol Biol Cell* 7:843-851
- Horowitz BS, Goldberg IJ, Merab J, Vanni TM, Ramakrishnan R, Ginsberg HN (1993) Increased plasma and renal clearance of an exchangeable pool of apolipoprotein A-I in subjects with low levels of high density lipoprotein cholesterol *J Clin Invest* 91: 1743-1752
- Hosaya H, Kobayashi R, Tsukita S, Matsumura F (1992) Ca²⁺-regulated actin and phospholipid binding protein (68kD-protein) from bovine liver: Identification as a homologue for annexin VI and intracellular localization *Cell Motil Cytosk* 22:200-210
- Huang C, Hepler JR, Chen LT, Gilman AF, Anderson RGW, Mumby SM (1997) Organization of G proteins and adenylyl cyclase at the plasma membrane *Mol Biol Cell* 8:2365-78
- Huber R, Berendes R, Burger A, Schneider M, Karshikov A, Luecke H, Romisch J, Paques E. (1992) Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins. *J Mol Biol* 223:683-704
- Husten L. (1997) Receptor Offers Clues to How "Good" Cholesterol Works *Science* 278:1228

- Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J (1993) Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery *J Clin Invest* 92:883-893
- Jäckle S, Beisiegel U, Rinninger F, Buck F, Grigoleit A, Block A, Groger I, Greten H, Windler E (1994) Annexin VI, a marker protein of hepatocytic endosomes *J Biol Chem* 269:1026-1032
- Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, Rothblat GH, Swaney JB, Tall AR (1997) Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux *J Biol Chem* 272:20982-20985
- Kaetzel MA, Pula G, Campos B, Uhrin P, Horseman N, Dedman JR (1994) Annexin VI isoforms are differentially expressed in mammalian tissues *Biochim Biophys Acta* 1223:368-374
- Kamal A, Ying Y, Anderson RGW (1998) Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes *J Cell Biol* 142:937-947
- Kartenbeck J, Stukenbrok H, Helenius A (1989) Endocytosis of simian virus 40 into the endoplasmic reticulum *J Cell Biol* 109:2721-2729
- Keen JH, (1990) Clathrin and associated assembly and disassembly proteins *Annu Rev Biochem* 59:415-438
- Kirchhausen T (1993) Coated pits and coated vesicles - sorting it all out *Curr Opin Struct Biol* 3:182-188
- Kirchhausen T (2000) Clathrin *Annu Rev Biochem* 69:699-727
- Kobayashi T, Beuchat MH, Lindsay M, Frias S, Palmiter RD, Sakuraba H, Parton RG, Gruenberg J (1999) Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport *Nat Cell Biol* 1:113-118
- Koleske AJ, Baltimore D, Lisanti MP (1995) Reduction of Caveolin and Caveolae in Oncogenically Transformed Cells *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1381-1385
- Kornfeld S (1992) Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulin like growth factor II receptors *Annu Rev Biochem* 61:307-330
- Kornfeld S, Mellmann I (1989) The biogenesis of lysosomes *Annu Rev Cell Biol* 5:483-525
- Kreis TE, Pepperkok R (1994) Coat proteins in intracellular membrane transport *Curr Opin Cell Biol* 6:533-537
- Krieger M (1999) Charting the fate of the „good cholesterol“: Identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-B1 *Ann Rev Biochem* 68:523-558
- Kurzchalia TV, Dupree P, Parton RG, Kellner R, Virta H, Lehnert M, Simons K (1992) VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles *J Cell Biol* 118:1003-1014
- Kurzchalia TV & Parton RG (1996) Dynamic properties of caveolae *FEBS Letters* 389:52-54

- Kurzchalia TV & Parton RG (1999) Membrane microdomains and caveolae *Curr Opin Cell Biol* 11:424-431
- Latker CH, Shinowara NL, Miller JC, Rapoport SI (1987) Differential localization of alkaline phosphatase in barrier tissues of the frog and rat nervous systems: a cytochemical and biochemical study *J Comp Neurol* 264:291-302
- Li S, Couet J, Lisanti MP (1996) Src Tyrosine Kinase, G_αSubunits, and H-Ras Share a Common Membrane-anchored Scaffolding Protein, Caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 271:29182-90
- Li S, Okamoto T, Chun M, Sargiacomo M, Casanova JE, Hansen SH, Nishimoto I, Lisanti MP (1995) Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin *J Biol Chem* 270:15693-15701
- Li S, Seitz R, Lisanti MP (1996) Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoforms of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J Biol Chem* 271:3863-68
- Lin HC, Südhof TC, Anderson RGW (1992) Annexin VI is required for budding of Clathrin-coated pits *Cell* 70:283-291
- Liemann S, Huber R (1997) Three dimensional structure of annexins *Cell Mol Life Sci* 53:516-521
- Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M (1994) Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease *J Cell Biol* 126:111-126
- Liu J, Razani B, Tang S, Terman BI, Ware JA, Lisanti MP (1999) Angiogenesis Activators and Inhibitors Differentially Regulate Caveolin-1 Expression and Caveolae Formation in Vascular Endothelial Cells *J Biol Chem* 274:15781-15785
- Liu P, Anderson RGW (1995) Compartmentalized production of ceramide at the cell surface *J Biol Chem* 270:27179-85
- Liu P, Ying Y, Ko YG, Anderson RG (1996) Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae *J Biol Chem* 271:10299-10303
- Liu P, Ying Y-S, Anderson RGW (1997) Platelet-derived growth factor activates mitogen-activated protein kinase in isolated caveolae *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13666-70
- Llera Moya de la M, Rothblat GH, Connelly MA, Kellner-Weibel G, Sakr SW, Phillip MC, Williams DL (1999) Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface *J Lipid Res* 40:575-580
- Löffler G, Petrides PE (1997) Biochemie und Pathobiochemie *Springer-Verlag* S. 469-479
- Lohse P, Maas S, Lohse P, Sewell AC, Diggelen van OP, Seidel D (1999) Molecular defects underlying Wolman disease appear to be more heterogeneous than those resulting in cholesteryl ester storage disease *J Lipid Res* 40:221-228
- London E (1992) How bacterial protein endotoxins enter cells: the role of partial unfolding in membrane translocation *Mol Microbiol* 6:3277-3282

- Lusa S, Jauhiainen M, Metso J, Somerharju P, Ehnholm C (1996) The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion *J Biochem* 313:275-282
- Machleidt T, Li WP, Liu P, Anderson RG (2000) Multiple domains in caveolin-1 control its intracellular traffic *J Cell Biol* 148:17-28
- Mahley RW, Ji Z-S (1999) Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E *J Lipid Res* 40:1-16
- Marcil M, Brooks-Wilson A, Clee SM, Roomp K, Zhang LA, Yu L, Collins JA, van Dam M, Molhuizen HO, Loubster O, Ouellette BF, Sensen CW, Fichter K, Mott S, Denis M, Boucher B, Primstone S, Genest J Jr, Kastelein JJ, Hayden MR (1999) Mutations in the ABC1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux *Lancet* 354:1341-1346
- Mastick CC, Brady MJ, Saltiel AR (1995) Insulin stimulates the tyrosine phosphorylation of caveolin *J Cell Biol* 129:1523-31
- Mendez AJ (1997) Cholesterol efflux mediated by apolipoproteins is an active cellular process distinct from efflux mediated by passive diffusion *J Lipid Res* 38:1807-1821
- Mendez AJ, Anantharamaiah GM, Segrest JP, Oram JF (1994) Synthetic amphiphatic helical peptides that mimic apolipoprotein A-I in clearing cellular cholesterol *J Clin Invest* 94:1698-1705
- Mendez AJ, Lin G, Wade DP, Lawn RM, Oram JF (2001) Membrane lipid domains distinct from Cholesterol/Sphingomyelin-rich rafts are involved in the ABCA1-mediated lipid secretory pathway *J Biol Chem* 276:3158-3166
- Mendez AJ, Oram JF, Biermann EL (1991) Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein dependant efflux of intracellular cholesterol *J Biol Chem* 266:10104-10111
- Miida T, Kawano M, Fielding CJ, Fielding PE (1992) Regulation of the concentration of pre high density lipoprotein in normal plasma by cell membranes and lecithin:cholesterol acyltransferase *Biochemistry* 31:11112-11120
- Mineo C, Anderson RGW (1996) A vacuolar-type proton ATPase mediates acidification of plasmalemmal vesicles during potocytosis *Exp Cell Res* 224:237-79
- Mineo C, Anderson RGW, White MA (1997) Physical association with ras enhances activation of membrane bound raf (RafCAAX) *J Biol Chem* 272:10345-48
- Monier S, Parton RG, Vogel F, Behlke J, Henske A, Kurzchalia TV (1995) VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro *Mol Biol Cell* 6:911-927
- Mora R, Bonhila VL, Karmorstein A, Scherer PE, Brown D, Lisanti MP, Rodriguez-Boulan E (1999) Caveolin-2 Localizes to the Golgi Complex but Redistributes to Plasma Membrane, Caveolae, and Rafts when Co-expressed with Caveolin-1 *J Biol Chem* 274:25708-25717
- Moring N, Kaihou Y, Vitale N (2001) Involvement of ADP-ribosylation factor 1 in cholera toxin-induced morphological changes in Chinese hamster ovary cells *J Biol Chem* 276:22838-43

- Moss SE, Crumpton MJ (1990) Alternative splicing gives rise to two forms of the p68 Ca²⁺-binding protein *FEBS* 261:299-302
- Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR (1997) Endocytosis *Physiol Rev* 77:759-803
- Muller G, Geisen K (1996) Characterization of the molecular mode of action of the sulfonylurea, glimepiride, at adipocytes *Horm Metab Res* 28:469-87
- Murata M, Peraenen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K (1995) VIP21/ caveolin is a cholesterol binding protein *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10339-10343
- Musliner TA, Long DL, Forte TM, Nichols AV, Gong EL, Blanche, Krauss RM (1991) Dissociation of high density lipoprotein precursors from apolipoprotein B-containing lipoproteins in the presence of unesterified fatty acids and source of apolipoprotein A-I *J Lipid Res* 32:917-932
- Nelson N (1987) The vacuolar proton-ATPase of eukaryotic cells *Bioessays* 7:251-254
- Neufeld EB, Cooney AM, Pitha J, Dawidowicz EA, Dwyer NK, Pentchev PG, Blanchette-Mackie EJ (1996) Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin *J Biol Chem* 271:21604-21613
- Neufeld EB, Remaley AT, Demosky SJ, Stonik JA, Cooney AM, Comly M, Dwyer NK, Zhang M, Blanchette-Mackie J, Santamarina-Fojo S, Brewer HB Jr (2001) Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter *J Biol Chem* 276:27584-27590
- Neufeld EB, Wastney M, Patel S, Suresh S, Cooney AM, Dwyer NK, Roff CF, Ohno K, Morris JA, Carstea ED, Incardona JP, Strauss JF, Vanier MT, Patterson MC, Brady RO, Pentchev PG, Blanchette-Mackie EJ (1999) The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo *J Biol Chem* 274:9627-9635
- Nieva JL, Bron R, Corver J, Wilschut J (1994) Membrane fusion of Semliki forest virus requires sphingolipids in the target membrane *EMBO J* 13:2797-2804
- Pentchev PG, Vanier MT, Suzuki K, Patterson MC (1995) The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease *McGraw-Hill Inc, New York* pp. 2625-2639
- Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane *J Biol Chem* 273:5419-5422
- Olivecrona G, Olivecrona T (1995) Triglycerid lipases and atherosclerosis *Curr Opin Lipidol* 6:291-305
- Ono A, Freed EO (2001) Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release *Proc Natl Acad Sci USA* 98(24):13925-30
- Oram JF (2000) Tangier disease and ABCA1 *Biochim Biophys Acta* 1529:321-330
- Oram JF, Yokoyama S (1997) Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids *J Lipid Res* 37:2473-2491
- Orito A, Kumanogoh H, Yasaka K, Sokawa J, Hidaka H, Sokawa Y, Maekawa S (2001) Calcium-dependent association of Annexin VI, Protein Kinase C alpha, and Neurocalcin alpha on the raft fraction derived from the synaptic plasma membrane of rat brain *J Neurosci Res* 64:235-241

- Orso E, Broccardo C, Kaminski WE, Bottcher A, Liebisch G, Drobnik W, Gotz A, Chambenoit O, Diederich W, Langmann T, Spruss T, Luciani MF, Rothe G, Lackner KJ, Chimini G, Schmitz G (2000) Transport of lipids from Golgi to plasma membrane is defective in Tangier disease patients ABC1-deficient mice *Nat Genet* 24:192-196
- Ortega D, Pol A, Biermer M, Jäckle S, Enrich C (1998) Annexin VI defines an apical endocytic compartment in rat liver hepatocytes *J Cell Sci* 111:261-269
- Owens RJ, Crumpton MJ (1984) Isolation and characterisation of a novel 68,000-Mr Ca^{2+} -binding protein of lymphocyte plasma membrane *J Biochem* 219:309-316
- Owens RJ, Gallagher CJ, Crumpton (1984) Cellular distribution of p68, a new calcium-binding protein from lymphocytes *EMBO J* 3:945-952
- Parpal S, Gustavsson J, Stralfors P (1995) Isolation of phosphooligosaccharide/phosphoinositol glycan from caveolae and cytosol of insulin-stimulated cells *J Cell Biol* 131:125-35
- Parolinil, Sargiacomo M, Galbiati F, Rizzo G, Grignani F, Engelmann JA, Okamoto T, Ikezu T, Scherer PE, Mora R, Rodriguez-Boulant E, Peschle C, Lisanti MP (1999) Expression of Caveolin-1 Is Required for the Transport of Caveolin-2 to the Plasma Membrane *J Biol Chem* 274:25718-25725
- Pfäffle M, Ruggiero F, Hofmann H, Fernandez MP, Selmin O, Yamada Y, Garrone R, von der Mark K (1988) Biosynthesis, secretion and extracellular localization of anchorin CII, a collagen-binding protein of the calpactin family *EMBO J* 7:2335-2342
- Pfeffer SR (1994) Rab GTPases: master regulators of membrane trafficking *Curr Opin Cell Biol* 6:522-526
- Pfeffer SR (2001) Caveolae in the move *Nat Cell Biol* E108-E110
- Phalen T, Kielian M (1991) Cholesterol is required for infection by Semliki forest virus *J Cell Biol* 112:615-23
- Pike LJ, Casey L (1996) Localization and turnover of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolin-enriched membrane domains *J Biol Chem* 271:26453-56
- Pol A, Calvo M, Lu A, Enrich C (1999) The "early-sorting" endocytic compartment of rat hepatocytes is involved in the intracellular pathway of caveolin-1 (VIP-21) *Hepatology* 29:1848-1857
- Pol A, Calvo M, Lu A, Enrich C (2000) EGF triggers caveolin redistribution from the plasma membrane to the early/sorting endocytic compartment of hepatocytes *Cell Signal* 12:537-540
- Pol A, Lu A, Pons M, Peiro D, Enrich C (2000) Epidermal growth factor mediated caveolin recruitment to early endosomes and MAPK activation. Role of cholesterol and actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 275:30566-30572
- Pons M, Ihrke G, Koch S, Biermer M, Pol A, Grewal T, Jäckle S, Enrich C (2000) Late endocytic compartments are major sites of annexin VI localization in NRK fibroblasts and polarized WIF-B hepatoma cells *Exp Cell Res* 257:33-47

- Pons M, Grewal T, Rius E, Schnitgerhans T, Jäckle S, Enrich C (2001) Evidence for the involvement of annexin VI in the trafficking between the endocytic compartment and lysosomes *Exp Cell Res* 269:13-22
- Powell MA, Glenney JR (1987) Regulation of calpactin I phospholipid binding by calpactin I light-chain binding and phosphorylation by p60v-src *J Biochem* 247:321-328
- Predescu D, Horvat R, Predescu S, Palade GE (1994) Transcytosis in the continuous endothelium of the myocardial microvasculature is inhibited by N-ethylmaleimide *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3014-3018
- Rainteau D, Mansuelle P, Rochat H, Weinman S (1995) Characterization and ultrastructural localization of annexin VI from mitochondria *FEBS* 360:80-84
- Raynal P, Pollard HB (1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins *Biochem Biophys Acta* 1197:63-93
- Reaven E, Lua Y, Nomoto A, Temel R, Williams DL, Westhuyzen van der DR, Azhar S (1999) The selective pathway and a high-density lipoprotein receptor (SR-BI) in ovarian granulosa cells of the mouse *Biochim Biophys Acta* 1436(3):565-576
- Robinson MS (1992) Adaptins *Trends Cell Biol* 2:293-297
- Roettger BF, Rentsch RU, Pinon D, Holicky E, Hadac E (1995) Dual pathways of internalization of the secretin receptor *J Cell Biol* 128:1029-41
- Rogler G, Trümbach B, Klima B, Lackner KJ, Schmitz G (1995) HDL-mediated efflux of intracellular cholesterol is impaired in fibroblasts from Tangier disease patients *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:683-690
- Roth TF, Porter KR (1964) Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti* *J Cell Biol* 20:313-332
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats *Cell* 68:673-82
- Rothberg KG, Ying YS, Kamen BA, Anderson RG (1990) Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate *J Cell Biol* 111:2931-2938
- Rothblat GH, de la Llera Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC (1999) Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights *J Lipid Res* 40:781-796
- Rothblat GH, Mahlberg FH, Johnson WJ, Phillips MC (1992) Apolipoprotein membrane cholesterol domains and the regulation of cholesterol efflux *J Lipid Res* 33:1091-1097
- Rothman JE (1994) Mechanism of intracellular protein transport *Nature* 372:55-63
- Rothman JE, Schmid SL (1986) Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles *Cell* 46:5-9

- Roy S, Luetterforst R, Harding A, Apolloni A, Etheridge M, Stang E, Rolls B, Hancock JF, Parton RG (1999) Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains *Nature Cell Biol* 1:98-105
- Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P, Assmann G (1999). Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 *Nat Genet* 22:352-355
- Sakr SW, Williams DL, Stoudt GW, Phillips MC, Rothblat GH (1999) Induction of cholesterol efflux to lipid-free apolipoprotein A-I by cAMP *Biochem Biophys Acta* 1438:85-98
- Sandvig K, Garred O, Helvoort van A, Meer van G, Deurs van B (1996) Importance of glycolipid synthesis for butyric acid-induced sensitization to Shiga toxin and intracellular sorting of toxin in A 431 cells *Mol Biol Cell* 7:1391-404
- Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z, Kubler E, Song KS, Sanders MC, Lisanti MP (1995) Oligomeric structure of caveolin implications for caveolae membrane organization *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9407-9411
- Sargiacomo M, Sudol M, Tang ZL, Lisanti MP (1993) Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells *J Cell Biol* 122:789-807
- Scheel J, Srinivasan J, Honnert U, Henske A, Kurzchalia TV (1999) Involvement of Caveolin-1 in meiotic cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans* *Nat Cell Biol* 1:127-129
- Scheiffele P, Vekade P, Fra AM, Virta H, Simons K, Ikonen E (1998) Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells *J Cell Biol* 140:795-806
- Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelmann JA, Galbiati F, Couet J, Kohtz DS, van Donsselaar E, Peters P, Lisanti MP (1997) Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem* 272:29337-29346
- Scherer PE, Okamoto T, Chun MIN, Sodisn HF, Lisanti MP (1996) Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:131-135
- Schlegel A, Lisanti MP (2000) A Molecular Dissection of Caveolin-1 Membrane Attachment and Oligomerization *J Biol Chem* 275:21605-21617
- Schlegel A, Schwab RB, Scherer PE, Lisanti MP (1999) A Role for the Caveolin Scaffolding Domain in Mediating the Membrane Attachment of Caveolin-1 *J Biol Chem* 274:22660-22667
- Schmitz G, Assmann G, Robenek H, Brennhause B (1985) Tangier disease: a disorder of intracellular membrane traffic *Proc Natl Acad Sci USA* 82:6305-6311
- Schmitz-Pfeiffer C, Browne CL, Walker JH, Bide TJ (1998) Activated protein kinase C α associates with annexin VI from skeletal muscle *J Biochem* 330:675-681
- Schnitzer JE, Allard J, Oh P (1995) NEM inhibits transcytosis, endocytosis, and capillary permeability: implication of caveolae fusion in endothelia *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 268:H48-H55

- Schnitzer JE, Liu J, Oh Phil (1995) Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, Annexins and GTPases *J Biol Chem* 270:14399-14404
- Schnitzer JE, Oh P (1996) Aquaporin-1 in plasma membrane and caveolae provides mercury-sensitive water channels across lung endothelium *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 39:H416-H422
- Schnitzer JE, Oh P, Jacobson BS, Dvorak AM (1995) Caveolae from luminal plasmalemma of rat lung endothelium: microdomains enriched in caveolin, (Ca²⁺)-ATPase, and inositol trisphosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1759-63
- Schroeder S, Ungewickell E (1991) Subunit interaction and function of Clathrin-coated vesicle adapters from the Golgi and the plasma membrane *J Biol Chem* 266:7910-7918
- Schwandt P, Richter WO, Parhofer KG (2001) Handbuch der Fettstoffwechselstörungen: Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie der Dyslipoproteinämien - Prävention der Atherosklerose *Schattauer-Verlag, Stuttgart*
- Serafini TL, Orci L, Amherdt M, Brunner M, Kahn RA, Rothman JE (1991) ADP-ribosylation factor (ARF) is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein *Cell* 67:239-253
- Severs NJ (1988) Caveolae: static in-pocketings of the plasma membrane, dynamic vesicles or plain artifact? *J Cell Sci* 90:341-349
- Shaul PW, Anderson RG (1998) Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction *Am J Physiol* 275:L843-L851
- Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS (1996) Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae *J Biol Chem* 271:6518-22
- Silver DL, Nan W, Xiao X, Tall AR (2001) HDL particle uptake mediated by SR-BI results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion *J Biol Chem* 276:25287-25293
- Simionescu N (1983) Cellular aspects of transcapillary exchange *Physiol Rev* 63:1536-1579
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes *Nature* 387:569-572
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1:31-39
- Simons K, Zerial M (1993) Rab proteins and the road maps for intracellular transport *Neuron* 11:789-799
- Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelmann JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP (1999) Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction *Mol Cell Biol* 19:7289-7304
- Smart EJ, Mineo C, Anderson RGW (1996) Clustered folate receptor deliver 5-methyltetrahydrofolate to cytoplasm of MA 104 cells *J Cell Biol* 134:1169-77
- Smart EJ, Ying YS, Conrad PA, Anderson RG (1994) Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation *J Cell Biol* 127:1185-1197

- Smart EJ, Ying Y, Donzell WC, Anderson RG (1997) A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane *J Biol Chem* 271:29427-29435
- Smart EJ, Ying YS, Mineo C, Anderson RG (1995) A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10104-10108
- Smith JD, Miyata M, Ginsberg M, Grigaux C, Shmookler E, Plump AS (1996) Cyclic AMP induces apolipoprotein E binding activity and promotes cholesterol efflux from a macrophage cell line to apolipoprotein acceptors *J Biol Chem* 271:30647-30655
- Smith PD, Moss SE (1994) Structural evolution of the annexin supergene family *Trends Genet* 10:241-246
- Smythe E, Smith PD, Jacob SM, Theobald J, Moss SE (1994) Endocytosis occurs independently of annexin VI in human A431 cells *J Cell Biol* 124:301-306
- Song KS, Li S, Okamoto T, Quilliam LA, Sargiacomo M, Lisanti MP (1996) Co-purification and direct interaction of Ras with Caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains *J Biol Chem* 271:9690-9697
- Song KS, Tang Z, Li S, Lisanti MP (1997) Mutational analysis of the properties of caveolin-1. A novel role for the C-terminal domain in mediating homo-typic caveolin-caveolin-interactions. *J Biol Chem* 272:4398-4403
- Stahl A, Mueller BM (1995) The orokinase-type plasminogen activator receptor, a GPI-linked protein, is localized in caveolae *J Cell Biol* 129:335-44
- Stang E, Kartenbeck J, Parton RG (1997) Major histocompatibility complex class I molecules mediate association of SV40 with caveolae *Mol Biol Cell* 8:47-57
- Stein O, Stein Y (1999) Atheroprotective mechanisms of HDL *Atherosclerosis* 144:285-303
- Stoorvogel W, Oorschot V, Geuze HJ (1996) A novel class of Clathrin-coated vesicles budding from endosomes *J Cell Biol* 132:21-33
- Stralfors P (1997) Insulin second messengers *Bioessays* 19:327-35
- Südhof TC (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions *Nature* 375:645-653
- Südhof TC, Slaughter CA, Leznicki I, Barhon P, Reynolds GA (1988) Human 67-kDa calelectrin contains a duplication of four repeats found in 35-kDa lipocortins *Proc Natl Acad Sci USA* 85:664-668
- Tagoe CE, Boustead CM, Higgins SJ, Walker JH (1994) Characterization and immunolocalization of rat liver annexin VI *Biochim Biophys Acta* 1192:272-280
- Takahashi Y, Smith JL (1999) Cholesterol efflux to apolipoprotein A-I involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway *Proc Natl Acad Sc USA* 96:11358-11363
- Takei K, McPherson PS, Schmid SL, De Camilli P (1995) Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals *Nature* 374:186-190

- Tang ZL, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP (1996) Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle *J Biol Chem* 271:2255-2261
- Theret N, Delbart C, Aquie G, Furchart JC, Vassaux G, Ailhaud G (1990) Cholesterol efflux from adipose cells is coupled to diacylglycerol production and protein kinase C activation *Biochem Biophys Res Commun* 137:1361-1368
- Tran D, Carpentier J-L, Sawano F, Gorden P, Orci L (1987) Ligands internalized through coated or noncoated invaginations follow a common intracellular pathway *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7957-61
- Turpin E, Russo-Marie F, Dubois T, Paillerets C, Alfsen A, Bomsel M (1997) In adrenocortical tissue, annexins II and VI are attached to clathrin coated vesicles in a calcium-independent manner *Biochem Biophys Acta* 1402:115-130
- Urban S, Zeisseniss S, Werder M, Hauser H, Budzinski R, Engelmann B, Scavenger receptor BI transfers major lipoprotein-associated phospholipids into cells *J Biol Chem* 275:33409-33415
- Uittenbogaard A, Smart EJ (2000) Palmitoylation of Caveolin-1 Is Required for Cholesterol Binding, Chaperone Complex Formation, and Rapid Transport of Cholesterol to Caveolae *J Biol Chem* 275:25595-25599
- Uittenbogaard A, Ying Y, Smart EJ (1998) Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking *J Biol Chem* 273:6525-6532
- Vallee RB, Okamoto PM (1995) The regulation of endocytosis: identifying dynamin's binding partners *Trends Cell Biol* 5:43-47
- Van Deurs B, Holm PK, Sandvig K, Hansen SH (1993) Are caveolae involved in clathrin-independent endocytosis? *Trends Cell Biol* 3:249-251
- Vepa S, Scribner WM, Natarajan V (1997) Activation of protein phosphorylation by oxidants in vascular endothelial cells: identification of tyrosine phosphorylation of caveolin *Free Radic Biol Med* 22:25-35
- Voorhees P, Deignan E, Van Donselaar E, Humphrey J, Marks MS, Peters PJ, Bonifacino JS (1995) An acid sequence within the cytoplasmic domain of furin functions as a determinant of trans-Golgi network localization and internalization from the cell surface *EMBO J* 14:4961-4975
- Wagner RC, Kreiner P, Barnett RJ, Bitensky MW (1972) Biochemical characterization and cytochemical localization of a catecholamine-sensitive adenylate cyclase in isolated capillary endothelium *Proc Natl Acad Sci USA* 69:3175-3179
- Wang N, Silver DL, Thiele C, Tall AR (2001) ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein *J Biol Chem* 276:23742-23747
- Wary KK, Mariotti A, Zurzolo C, Giancotti FG (1998) A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependant cell growth *Cell* 94:625-634
- Watanabe T, Inui M, Chen BY, Iga M, Sobue K (1994) Annexin VI-binding proteins in brain. Interaction of annexin VI with a membrane skeletal protein, caldesmon (brain spectrin or fodrin). *J Biol Chem* 269:17656-17662

- Weber K, Johnsson N (1986) Repeating sequence homologies in the p36 target protein of retroviral protein kinases and lipocortin, the p37 inhibitor of phospholipase A2 *FEBS* 203:95-98
- Weerd de WF, Leeb-Lundberg LMF (1997) Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galphaq and Galphai in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells *J Biol Chem* 272:17858-66
- Weinman JS, Feinberg JM, Rainteau DP, Gaspera BD, Weinman SJ (1994) Annexins in rat enterocyte and hepatocyte: an immunogold electron-microscope study *Cell Tissue Res* 278:389-397
- Willingham MC, Pastan IH, Sahagian GG, Jourdain GW, Neufeld EF (1981) Morphologic study of the internalization of a lysosomal enzyme by the mannose-6-phosphate receptor in cultured Chinese hamster ovary cells *Proc Natl Acad Sci USA* 78:6967-6971
- Wilson DW, Whiteheart SW, Wiedmann M, Brunner M, Rothmann JE (1992) A multisubunit particle implicated in membrane fusion *J Cell Biol* 117:531-538
- Yamada N, Shames DM, Takahashi S, Havel RJ (1988) Metabolism of apolipoprotein B-100 in large very low density lipoproteins of blood plasma. Kinetic studies in normal and heritable hyperlipidemic rabbits. *J Clin Invest* 82:2106-2113
- Yamamoto M, Toya Y, Schwencke C, Lisanti MP, Myers MG Jr, Ishikawa Y (1998) Caveolin is an activator of insulin receptor signaling *J Biol Chem* 273:26962-26968
- Yamashiro DJ, Maxfield FR (1987) Acidification of morphologically distinct endosomes in mutant and wild-type Chinese hamster ovary cells *J Cell Biol* 105:2723-2733
- Yamashiro DJ, Maxfield FR (1987) Kinetics of endosome acidification in mutant and wild-type Chinese hamster ovary cells *J Cell Biol* 105:2713-2721
- Yamashiro DJ, Tycko B, Fluss SR, Maxfield FR (1984) Segregation of transferrin to mildly acidic (pH 6.4) para-Golgi compartment in the recycling pathway *Cell* 37:789-800
- Yecey PG, Bielicki JK, Johnson WJ, Lund-Katz S, Palgunachari MN, Anantharamaiah AM, Segrest JP, Philipps MC, Rothblat GH (1995) Efflux of cellular cholesterol and phospholipid to lipid-free apolipoproteins and class A amphiphatic peptides *Biochemistry* 34:7955-7965
- Ying YS, Anderson RGW, Rothberg KG (1992) Each caveola contains multiple glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins *Cold Spring Harbour Symp Quant Biol* 57:593-604
- Young SG, Fielding CJ (1999) The ABCs of cholesterol efflux *Nat Genet* 22:316-8
- Zaks WJ, Creutz CE (1991) Ca²⁺-dependent Annexin VI self-association on membrane-surfaces *Biochem* 30:9607-9615
- Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers *Nature* 2:107-117
- Zhao Y, Marcel YL (1996) Serum albumin is a significant intermediate in cholesterol transfer between cells and lipoproteins *Biochemistry* 35:7174-7180

8 Danksagung

Zunächst möchte ich Frau Prof. Beisiegel und Herrn Prof. Jäckle für die Vergabe des Themas und ihrer Unterstützung bei der Durchführung dieser Dissertation danken.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. T. Grewal, Herrn W. Tauscher und Herrn D. Mewawala für die exzellente Betreuung und Anleitung.

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

Meinen Eltern, Pflegeeltern, meinen Freunden und nicht zuletzt meinem Mann Joe und meiner Tochter Kira danke ich für ihre Geduld und Unterstützung; ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

9 Lebenslauf

Cara Simone KOSACK

Püngeler Strasse 39, 52074 Aachen
 Telephon: +49-(0)241-82742
 e-mail: cacos74@yahoo.com

Geburtsdatum	16. September 1974	
Geburtsort	Aachen	
Nationalität	deutsch	
Familienstand	ledig	
Konfession	evangelisch	
Eltern	Mutter:	Ulrike Kosack, geborene Grünewald, geb. 23. März 1948, Steuerberaterin
	Vater:	Gunter Kosack, geb. 2. September 1938, Ingenieur
Geschwister	Volker Kosack	geb. 7. März 1979, Installateur

Ausbildung

Aug 1982 - Jul 1986	Montessori-Grundschule, Aachen
Aug 1986 - Jul 1994	St. Leonhard Gymnasiums, Aachen
Okt 1994 - Sep 1997	Ausbildung zur Medizinisch-Technischen Assistentin für Laboratoriumsmedizin, Prof. Dr. Dr. H. Greiling Universitätsklinikum Aachen
Okt 1997 – Okt 2004	Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg, Sep 1999 Ärztliche Vorprüfung Aug 2000 1. Staatsexamen Mrz 2003 2. Staatsexamen Okt 2004 3. Staatsexamen

Famulaturen/Praktisches Jahr

Feb 2000	Rechtsmedizin, Dr. med. M. Birkholz, ZKH St.-Jürgen-Strasse, Bremen (Universität Göttingen)
Mrz 2000	Innere Medizin, Gastroenterologie, Prof. Dr. W. Arnold ZKH St.-Jürgen-Strasse, Bremen (Universität Göttingen)
Aug/Sep 2000	Innere Medizin und Pädiatrie, Bundibugyo Hospital, Uganda, „Ärzte Ohne Grenzen“ und „Ministry of Health - Uganda“
Apr 2003 - Aug 2003	Chirurgie, Allgemeinchirurgie, Magburaka Hospital, Sierra Leone, „Ärzte Ohne Grenzen“ und „Ministry of Health - Sierra Leone“
Aug 2003 - Okt 2003	Innere Medizin, Nephrologie, Prof. Dr. R. Stahl, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
Okt 2003 - Dez 2003	Innere Medizin, Hämatologie/Onkologie, Prof. Dr. D. K. Hossfeld, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
Dez 2003 - Jan 2004	Pädiatrie, Allgemeine Pädiatrie, Prof. Dr. F. Riedel, Altonaer Kinderkrankenhaus (Universität Hamburg)
Feb 2004 - Mrz 2004	Pädiatrie, Paediatric Emergency Medicine, Dr. William Mounstephen, The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada

Kurse

- Okt 2000 - Feb 2001 „English for Medical Students“, Institut für Anglistik und Amerikanistik, Universität Hamburg
- Okt 2001 - Feb 2002 „Klinik der Tropenmedizin, Tropenlabor mit hämatologischem Praktikum“, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg

Forschung und Auslandsaufenthalte

- Feb 2002 – Aug 2002 Koordination und Supervision einer „Antimalarial in vivo efficacy study“ in Bundibugyo District, Uganda in Kooperation mit „Ärzte Ohne Grenzen“, Epicentre und dem Ministry of Health - Uganda
- Mrz 2003 – Jul 2003 Koordination und Supervision einer „Antimalarial in vivo efficacy study“ in Makeni, Sierra Leone, in Kooperation mit „Ärzte Ohne Grenzen“, Epicentre, WHO, Merlin, Concern und dem Ministry of Health – Sierra Leone
- Apr 2004 – Jul 2004 Assessment of HIV Rapid Diagnostic Tests in Humera, Ethiopia and set up of Quality Control System for the laboratory in Humera Hospital für „Ärzte Ohne Grenzen“

Veröffentlichung

Checchi F, Piola P, Kosack C, Ardizzoni E, Klarkowski D, Kwezi E, Priotto G, Balkan S, Bakayita N, Brockman A, Guthman JP (2004) Antimalarial efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine, and a combination of chloroquine plus sulfadoxine-pyrimethamine in Bundi Bugyo, western Uganda
Tropical Medicine & International Health, accepted 15 December 2003

Anstellung

- Mai 1998 - Jul 2003 Notfalllabor des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf
Prof. Dr. C. Wagener, Abteilung für Klinische Chemie,
Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Ehrenamtliche Tätigkeit

- Mai 1998 - Feb 2002 Sterbebegleitung von terminal AIDS- und Krebskranken im Hamburg Leuchtfeuer Hospiz im Rahmen ehrenamtlicher Tätigkeit der Aids-Hilfe Hamburg e.V.

Sprachen

- Englisch fließend
Französisch, Latein Schulniveau

Computer

Word, Excel, Power Point, Sigma Plot, Statistica, Epilinfo

Hobbys

- Sport Squash, Schwimmen
Lesen Moderne Literatur
Reisen Nordamerika, Afrika, Südost-Asien

10 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel habe ich nicht gebraucht und die aus dem benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe, Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht.

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