

***In vitro*-Rekonstitution des vesikulären Transportes zu
Recycling-Endosomen und Analyse von sekretiertem
Caveolin-1 aus humanen Prostatakrebszellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

René Bartz

geboren in Bonn

Mainz, 2003

Dekan:

1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:

Jahr der mündlichen Prüfung: 2003

Danksagung

Dem Boehringer Ingelheim Fonds danke ich für das Vertrauen bei der Vergabe eines Stipendiums zum Forschungsaufenthalt in Dallas, U.S.A.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die meine Ausbildung ermöglicht und mich stets unterstützt haben.

Vorbemerkung

Aufgrund eines Auslandsaufenthaltes ist die vorliegende Arbeit thematisch in zwei Teile gegliedert: dem in Mainz erarbeiteten Teil über die *in vitro*-Rekonstitution vesikulären Transportes wurde ein in Dallas (USA) behandelter Projektteil beigefügt, der sich mit der Analyse von sekretiertem Caveolin beschäftigt. Trotz eines thematisch verwandten Forschungsgebietes wurde auf eine Stoffverknüpfung verzichtet, und es erfolgte eine Trennung der Inhalte in Einleitung, Diskussion sowie in der Darstellung der Ergebnisse.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Rezeptorvermittelte Endocytose am Beispiel des Transferrin-Zyklus.....	6
1.2	Rab-Proteine als Regulatoren des vesikulären Transportes	9
1.3	Der Rab-Zyklus	11
1.4	Rab-Proteine im Transferrin-Zyklus	12
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	13
1.6	Caveolae und Caveolin.....	15
1.7	Caveolae und intrazellulärer Transport	16
1.8	Weitere Funktionen von Caveolae	17
1.9	Caveolin und andere Lokalisationen von Caveolae	17
1.10	Potenzielle Funktionen für sekretiertes Caveolin	18
1.11	Zielsetzung der Arbeit.....	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.2	Proteinanalytische Methoden.....	22
2.2.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	22
2.2.2	Proteinfärbung mit Coomassie-Blau	23
2.2.3	Proteinfärbung mittels Silberfärbung	24
2.2.4	Native Blau-Gelelektrophorese	24
2.2.5	Western-Blotting	25
2.2.6	Ponceau-S-Färbung.....	25
2.2.7	Immunodetektion membrangebundener Proteine.....	26
2.2.8	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	27
2.2.9	TCA-Präzipitation von Proteinen	27
2.3	Zellkultur.....	28
2.3.1	Allgemeine Bedingungen	28

2.4	Passagieren der Zellen.....	28
2.4.1	Anlegen, Lagerung und Auftauen von Dauerkulturen.....	28
2.5	Präparation der Donor- und Akzeptormembranen für den in vitro-Fusionsassay ..	29
2.5.1	Kopplung von Acridiniumester an Transferrin.....	29
2.5.2	Internalisierung von Acridinium-markiertem Transferrin in Endosomen von CHO-Zellen	30
2.5.3	Präparation eines postnukleären Überstandes (PNS) und endosomenangereicherten Ausgangsmaterials.....	31
2.5.4	Immunisierung endosomaler Membranen	32
2.5.5	Kovalente Kopplung von Sekundärantikörpern an oberflächenaktivierte Dynabeads.....	33
2.5.6	Immunisierung mit anti-Rab11 Antikörpern-gekoppelten Dynabeads	34
2.5.7	Präparation von Rattenlebercytosol	35
2.5.8	<i>In vitro</i> -Rekonstitution des vesikulären Transportes von endosomalem Transferrin zu immunisierten Recycling-Endosomen.....	36
2.5.9	Kopplung von His ₆ -Rab11 an CnBr-Sepharose-Partikel.....	37
2.5.10	Affinitätschromatographische Aufreinigung Rab11-interagierender Proteine.....	38
2.6	Gewinnung konditionierter Medien mit sekretierten Cav-1 Partikeln	39
2.6.1	Präparation von Cav-1 c-DNA mit Qiagen Kit (Maxiprep).....	39
2.6.2	Transiente Transfection von LNCaP-Zellen mit Cav-1 c-DNA	40
2.6.3	Herstellung konditionierter Medien	41
2.6.4	Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)	41
2.6.5	Cäsiumchlorid-Dichtezentrifugation.....	42
2.6.6	Optiprep-Dichtezentrifugation.....	42
2.6.7	Aufreinigung von Cav-1-Partikeln aus konditioniertem Medium durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie	43
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Detektion verschiedener Endosomenpopulationen.....	44
3.2	Anreicherung von Endosomen durch Sucrosedichtezentrifugation aus PNS	44
3.3	Verteilung von Endosomenpopulationen in Sucrosegradienten	46
3.4	Isolierung von Recycling-Endosomen durch Dichtezentrifugation und Immunisierung	46

3.5	Rekonstitution des intrazellulären Transportes zu Recycling-Endosomen durch ein <i>in vitro</i> -System.....	49
3.6	Experimente zur Charakterisierung des Fusions-Assays	51
3.7	Zeitkinetik der Fusion sowie Wirkung von GDI und Cytochalasin D auf den Transport.....	54
3.7.1	GDI	54
3.7.2	Cytochalasin D.....	55
3.8	Affinitätschromatographische Aufreinigungen von Rab11-interagierenden Proteinen	56
3.9	Transiente Transfektion von Cav-1 in LNCaP-Zellen	60
3.10	Bestimmung der Größe sekretierter Cav-1-Partikel	63
3.11	Bestimmung der Dichte sekretierter Cav-1-Partikel	66
3.11.1	Aufreinigung sekretierter Cav-1-Partikel durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie	69
3.12	Elektronenmikroskopische Untersuchung von aufgereinigten Cav-1-Partikeln	72
3.13	Identifizierung von Proteinen in sekretierten Cav-1-Partikeln	73
4	Diskussion.....	76
4.1	Temperatur und ATP	77
4.2	GDI.....	79
4.3	Cytochalasin D	80
4.4	Myosin-Motorproteine als mögliche Interaktionspartner zu Rab11 und Aktin	82
4.5	Cytoskelett und intrazellulärer Transport	83
4.6	Sekretiertes Caveolin-1	85
4.7	Dichtebestimmung.....	86
4.8	Aufreinigung von Partikeln durch Ni-NTA-Chromatographie	88

4.9	Nm23.....	90
4.10	Mögliche Funktionen von sekretiertem Cav-1	91
5	Zusammenfassung	94
6	Abkürzungsverzeichnis	97
7	Literatur	99

1 Einleitung

Eukaryontische Zellen sind in eine Vielzahl von unterschiedlichen Kompartimenten gegliedert, die essentiell für das Überleben dieser Zellen sind. Diese Kompartimente, die sich in Struktur und biochemischer Zusammensetzung unterscheiden, sind durch Membranen voneinander getrennt, bedürfen aber auch der Interaktion untereinander. Diese Wechselwirkung, die sich in dem geordneten Austausch von Molekülen und Lipiden widerspiegelt, wird zu einem großen Teil von kleinen, membranumhüllten Vesikeln, übernommen. Bei diesem Prozess werden von einem Donorkompartiment diese Vesikel mit ihrer Ladung entlassen, die dann mit einem Akzeptorkompartiment fusionieren (Palade et al., 1975). Beispiele für Kompartimente, die so miteinander verbunden sind, sind das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, aber auch die Plasmamembran ist als ein solches zu bezeichnen.

Der oben beschriebene, vesikuläre Transport ist auch für das Überleben der Zelle wichtig, da er die Kompartimente untereinander verbindet und spezifisch Proteine, die beispielsweise für die Sekretion bestimmt sind, nach der Synthese am ER über den Golgi-Apparat bis an die Plasmamembran transportiert, wo sie dann in den extrazellulären Raum hin entlassen werden. Neben der Sekretion von Molekülen spielt der vesikuläre Transport auch bei der Endocytose, der Aufnahme von (Makro-) Molekülen, eine wichtige Rolle. Bei diesem Prozess umschließt ein kleiner Teil der Plasmamembran um die aufzunehmenden Moleküle, löst sich von der Plasmamembran ab und die endocytierten Vesikel werden dann gerichtet in das Zellinnere transportiert. Je nach Zelltyp kann sich die Aktivität der Endocytose unterscheiden. MDCK Zellen, die endocytotisch sehr aktiv sind, nehmen pro Stunde einen Plasmamembranbereich auf, der etwa 40% ihrer Zelloberfläche entspricht. Dieser große Umfang der Aufnahme verdeutlicht auch, dass der vesikuläre Transport nicht nur dem Molekültransport dient, sondern auch eine Balance in der Verteilung der zellulären Membranen herstellt, da der Umfang und das Volumen dieser Zellen weitestgehend konstant bleibt.

Bei der Endocytose unterscheidet man zwischen so genannter Pino-, und Phagocytose: bei der Phagocytose, einer speziellen Form der Endocytose, werden größere Partikel (über 250 nm im Durchmesser) in die Zelle aufgenommen; bei der Pinocytose werden Flüssigkeit und kleine gelöste Substanzen durch Vesikel geringer Größe (ca. 100 nm im Durchmesser) aufgenommen. Von besonderer Bedeutung ist die rezeptorvermittelte Endocytose, die sich durch eine sehr hohe Spezifität auszeichnet. Hierbei binden Liganden aus dem extrazellulären Raum spezifisch an ihre Rezeptoren, die in der Plasmamembran verankert sind.

1.1 Rezeptorvermittelte Endocytose am Beispiel des Transferrin-Zyklus

Ein wichtiges (da für die Aufnahme von Eisen essentiell), und daher gut untersuchtes Beispiel für die rezeptorvermittelte Endocytose ist der Transferrin-Zyklus. Transferrin (Tf), ist ein 77 kDa großes Protein welches nach Bindung von zwei Fe^{3+} -Ionen gelöst im Blut vorliegt. Eisengebundenes Transferrin nennt man Holotransferrin, eisenfreies dagegen Apotransferrin. Der Zyklus beginnt mit der Bindung des Holotransferrins an den Transferrin-Rezeptor (TfR), ein über eine Disulfidbrücke verbundener Homodimer mit einer Masse von etwa 180 kDa für den humanen TfR (Fuchs et al., 1998). Der Komplex wird dann mit weiteren Komplexen in Membraninvaginationen konzentriert. Das Hüllprotein auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran, das an der Invagination beteiligt ist, ist Clathrin. Nach dem Verlust der Clathrinhülle fusionieren die Vesikel mit den Frühen-Endosomen (Bleil and Bretscher, 1982; Pearse, 1982; Hopkins and Towbridge, 1983). Der niedrige pH-Wert in diesen auch als Sorting-Endosomen bezeichneten Vesikeln führt zu einer Dissoziation der beiden Fe^{3+} -Ionen, der Ligand bleibt jedoch weiterhin am TfR gebunden (Morgan 1981; Rao et al., 1983; Klausner et al., 1984). Das Eisen wird über die Späten-Endosomen zu den Lysosomen hin transportiert, wo es über spezifische Transporter in das Cytosol gelangt (Abb. 1).

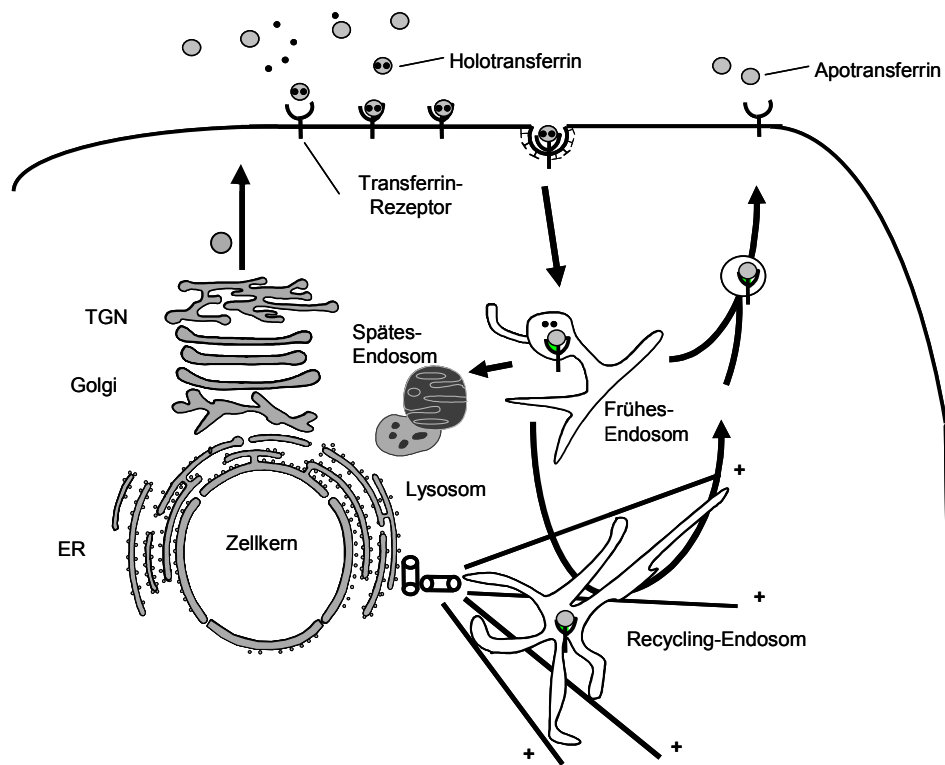


Abb. 1: Der Transferrin-Zyklus.

Transferrin ist ein gut untersuchter Marker für den Prozess der rezeptorvermittelten Endocytose. Das mit zwei Fe³⁺-Ionen beladene Holotransferrin (oder Ferrotransferrin) gelangt über das Blut zu den Zellen und bindet an der Zelloberfläche an den in der Plasmamembran inserierten Transferrin-Rezeptor (TfR). Dieser Rezeptor-Ligand-Komplex wird in Clathrin-umhüllte Vesikel aufgenommen und gelangt zu den Sorting-Endosomen. Nach dem Verlust der Clathrinhülle fusioniert es dann mit einem Sorting-Endosom. In diesem Kompartiment beträgt der pH-Wert 6,0 was zur Dissoziation der beiden Fe³⁺-Ionen führt, das eisenfreie Apotransferrin bleibt hingegen an seinen Rezeptor gebunden. Der Rezeptor-Ligand-Komplex wird nun zur Plasmamembran zurücktransportiert (Recycling), wobei dieser Transport direkt von den Sorting-Endosomen aus erfolgen kann (A) oder über ein weiteres Kompartiment, dem pericentriolär lokalisierten Recycling-Endosom (B). Der neutrale pH-Wert an der Zelloberfläche führt zur Dissoziation des Apotransferrins vom TfR, nach Bindung von zwei Fe³⁺-Ionen kann das Protein einen neuen Zyklus durchlaufen.

Der TfR-Apotransferrin-Komplex wird unter Vermeidung der Lysosomen in einem als Recycling bezeichneten Prozess an die Plasmamembran zurückgeführt, wo der Ligand Apotransferrin von dem Rezeptor abdissoziiert und für eine erneute Beladung mit Fe³⁺-Ionen zur Verfügung steht, und so erneut an den TfR binden kann, der dann ebenfalls neue Zyklen durchlaufen kann.

Das Recycling des TfR-Tf-Komplexes kann generell über zwei verschiedene Wege erfolgen: direkt vom Sorting-Endosom an die Plasmamembran in einem „schnellen Zyklus“ oder aber über ein weiteres Kompartiment, dem Recycling-Endosom, in einem „langsamen Zyklus“ ebenfalls zurück an die Plasmamembran (Yamashiro et al., 1984; Hopkins et al., 1994; Gruenberg and Maxfield, 1995).

Durch genauere Untersuchungen musste die die bisherige Auffassung über das als Frühe-Endosom bezeichnete Kompartiment erweitert werden, es existieren wahrscheinlich mindestens zwei räumlich und funktionell unterschiedliche Kompartimente. Die von Hopkins et al. (1990) postulierte kontinuierliche Organisation lässt sich jedoch nicht mit Ergebnissen vereinbaren, die für einen getrennten Aufbau der Kompartimente sprechen. Mikroskopische Untersuchungen zeigen beispielsweise morphologisch und von der Lokalisation her distinkte Kompartimente. Während die vakuolenförmigen Sorting-Endosomen eine periphere Lokalisation aufweisen, zeichnen sich die perinukleären Recycling-Endosomen durch eine tubuläre Morphologie aus (Yamashiro et al., 1984; Willingham et al., 1984; Marsh et al., 1986; Murphy, 1991; Tooze and Hollinshead, 1991; Gruenberg and Maxfield, 1995; Stoorvogel et al., 1996; Ullrich et al., 1996; Trischler et al., 1999).

Fluorometrische pH-Wertbestimmungen endosomaler Kompartimente *in vivo* zeigen, dass der TfR bei seinem Zyklus drei verschiedene pH-Wert-Bereiche durchläuft: nach dem zu Beginn neutralen pH-Wert an der Plasmamembran herrschen im Sorting-Endosom pH-Werte von 6,0 bis 6,2; das anschließende Recycling-Endosom hat einen pH-Wert von 6,5, während zum Abschluss des Zyklus an der Zelloberfläche wieder ein neutraler pH-Wert herrscht (Sipe and Murphy, 1987; Yamashiro et al., 1984; Yamashiro and Maxfield 1987). Die Bereiche mit unterschiedlichen pH-Werten weisen auf räumlich getrennte Kompartimente hin. Ein weiterer Hinweis auf eine räumliche Unterscheidung von Sorting- und Recycling-Endosomen ist darin zu finden, dass Recycling-Endosomen lediglich zum Recycling bestimmte Moleküle wie Apotransferrin (mit seinem Rezeptor) oder auch der low-density-lipoprotein-Rezeptor (LDL-Rezeptor) enthalten, während sich in Sorting-Endosomen auch Moleküle finden, die für den Abbau in den Lysosomen bestimmt sind, wie beispielsweise das LDL (Dunn et al., 1989; Ghosh et al., 1994). Diese Befunde stützen die Hypothese einer diskontinuierlichen Organisation der beiden Kompartimente. Trischler et al. (1999) konnten durch den Ansatz der Immunisolierung zwei unterschiedliche Endosomenpopulationen getrennt voneinander isolieren, wobei es sich hierbei um Sorting-Endosomen bzw. Recycling-Endosomen handelt, die neben einer unterschiedlichen Morphologie, zudem eine unterschiedliche Proteinkomposition aufwiesen.

Die Aufnahme von Eisen ist ein gut untersuchtes Beispiel eines endocytotischen Prozesses, der durch die bereits erwähnte Rückführung des Rezeptors (in diesem Falle sogar mit dem Liganden Transferrin) an die Plasmamembran charakterisiert ist. Ein weiteres, wichtiges Beispiel für das Recycling von Rezeptoren ist die Aufnahme von LDL über den LDL-Rezeptor (Brown and Goldstein, 1986).

Die meisten Rezeptoren werden wie beschrieben an die Plasmamembran zurückgeführt, während einige Rezeptoren an eine andere Plasmamembrandomäne transportiert werden (Transcytose). Als eine dritte Möglichkeit werden aber auch Rezeptoren nicht recycelt, sondern teilen das Schicksal des Liganden und werden in den Lysosomen degradiert.

1.2 Rab-Proteine als Regulatoren des vesikulären Transportes

Der oben beschriebene vesikuläre Transport bedarf aufgrund seiner Komplexität einer sehr exakten Regulation. Diese Regulation ist prinzipiell in zwei unterschiedliche Aufgaben zu unterteilen: zum einen muss die Sortierung der Fracht (beispielsweise eines Proteins) in die dafür vorgesehenen Vesikel korrekt erfolgen, zum anderen darf das Transportvesikel nur mit der spezifischen Akzeptormembran fusionieren. Diese Regulation muss hierbei auf Proteinebene erfolgen, aber auch die Sortierungsvesikel und die Akzeptor- und Donorkompartimente müssen eine Art Kennung besitzen. Proteine besitzen diese Sortierungssignale in Form von Aminosäuresequenzen, wie beispielsweise die KDEL-Sequenz, für Proteine die im ER resident bleiben (Pelham, 1990).

Beim vesikulären Transport ist die Fracht von einer Membranhülle umschlossen. Um einen exakten Membranverkehr zu gewährleisten, müssen die Transportvesikel ihre Zielmembran hochspezifisch erkennen, denn durch die hohe Vielfalt der verschiedenen Membransysteme wird ein Transportvesikel wahrscheinlich vielen Membranen begegnen, bevor es die richtige Zielmembran findet. Zur Zeit werden zwei -sich allerdings nicht ausschliessende- Modelle diskutiert, die die Spezifität dieses Transportes gewährleisten sollen. Ein Modell ist der Transport basierend auf dem SNARE (Soluble NSF Attachment Protein Receptor)-System (Rothman and Sollner, 1997; Hay and Scheller, 1997). Bei dieser Hypothese wird postuliert, dass sich ein SNARE-Protein auf der Donormembran befindet (das Vesikel- v-SNARE), welches spezifisch an ein SNARE auf der Akzeptormembran (Ziel- oder target- t-SNARE) bindet. Die beiden SNARE-Proteine bilden stabile trans-SNARE-Komplexe, welche die beiden Membranen in eine räumliche Nähe bringen. Mit den SNARE-Proteinen zusammen spielen Rab-Proteine eine wichtige Rolle in der Steigerung der Transportspezifität. Rab-Proteine sind kleine (20-25 kDa) GTP-bindende Proteine (Abb. 2). Sie sind mit momentan über 60 (im Menschen) unterschiedlichen Vertretern die größte Teilgruppe in der Ras-Superfamilie (Bock et al., 2001). Jedes Rab-Protein hat hierbei eine spezielle Lokalisation auf den Membranen und diese Lokalisation soll die Spezifität des Transportes regulieren. Rab-Proteine wurden zuerst in der Hefe entdeckt (Salminen and Novick, 1987; Segev et al., 1988), wo sie nach ihrer Funktion im Proteintransport Ypt (yeast protein transport) benannt wurden. Rab-Proteine besitzen als posttranslationale Modifikation ein oder zwei kovalent gebundene

hydrophobe Geranylgeranyl-Gruppen, welche essentiell für die Membranbindung dieser Proteine sind (Alexandrov et al., 1994; Stenmark et al., 1994; Novick and Zerial, 1997). Rab-Proteine besitzen zudem Guanin-Nukleotid-Bindemotive (G_1-G_5) mit konservierten Sequenzen zwischen den Motiven (Dever et al., 1987; Bourne et al., 1991). Rab-Proteine werden auch „molekulare Schalter“ genannt, da sie zwischen den Konformationen GTP- und GDP-gebunden wechseln. Die Rab-Proteine durchlaufen einen Zyklus, der eng mit der GTP-/GDP-gebundenen Form sowie mit der Lokalisation der Rab-Proteine zusammenhängt.

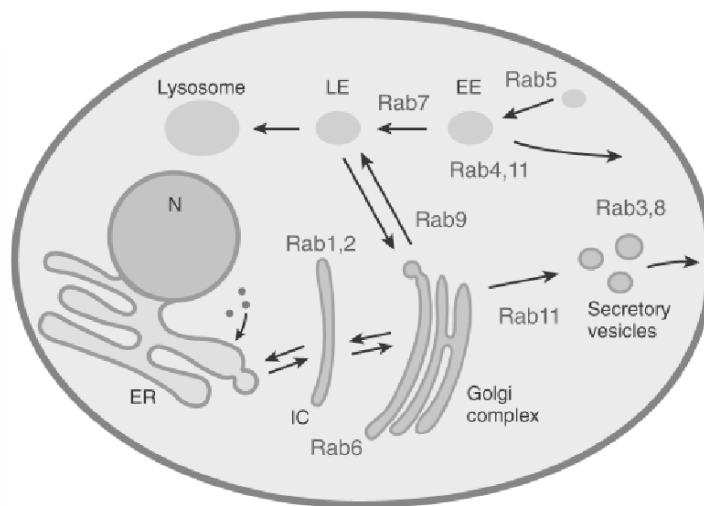


Abb. 2: Lokalisationen von Rab-Proteinen in der Zelle.

Rab-Proteine liegen cytosolisch oder an spezifischen Membranen gebunden vor. Bestimmte Rab-Proteine regulieren hierbei bestimmte Transportschritte. So ist beispielsweise Rab5 an der Plasmamembran und auf Frühen-Endosomen zu finden, wo es die Fusion von Clathrin-umhüllten Vesikeln und Frühen-Endosomen, sowie die homotypische Fusion von Frühen-Endosomen reguliert. Rab7 reguliert den vesikulären Transport zu den Späten-Endosomen und den Lysosomen. Rab11 hingegen ist auf den Membranen des TGN, sowie auf Recycling-Endosomen zu finden. IC: intermediate compartment, LE: Late-Endosome, Späte-Endosomen, EE: Early-Endosomes, Frühe-Endosomen, N: Nucleus, ER: Endoplasmatisches Retikulum. Aus: Segev, 2001.

1.3 Der Rab-Zyklus

Rab-GTPasen wechseln zwischen membrangebundener und cytosolischer Lokalisation, wobei die membrangebundene Form entscheidend für ihre Funktion ist. Rab-Proteine binden reversibel an der cytosolischen Seite ihrer spezifischen Membran mittels der oben beschriebenen Geranylgeranyl-Lipide. Gegenwärtige Diskussionen schlagen zwei Faktoren vor, die für die Lokalisation der Rab-Proteine wichtig zu sein scheinen. Zum einen ist dies das Protein GDI (guanyl-nucleotide dissociation inhibitor). GDI bindet Rab-Proteine bevorzugt in seiner GDP- (inaktiven) Form, unterscheidet jedoch nicht die verschiedenen Rab-Proteine untereinander. GDI ist in der Lage Rab-Proteine von ihrer Membran zu extrahieren und liegt dann als Rab-GDI-Komplex im Cytosol vor (Ullrich et al., 1993). GDI verhindert eine GDP-Dissoziation vermutlich durch Stabilisierung des Rab-GDP-Komplexes. Modelle schlagen eine Extraktion von Rab-Proteinen durch GDI nach der Fusion von Vesikeln vor um so für weitere Fusionsereignisse zur Verfügung zu stehen (Pfeffer et al., 1995). Aufgrund seiner Fähigkeit Rab-Proteine von Membranen zu extrahieren wird GDI intensiv bei *in vitro*- und *in vivo*-Studien zur Inhibierung von Rab-Funktionen eingesetzt (Chen et al., 1998; Pfeffer et al., 1995; Band et al., 2002). Säugetierzellen haben mehrere GDI-Isoformen, wobei es nicht bekannt ist ob sie sich in der Funktion unterscheiden (Pfeffer et al., 1995). Ein weiterer Faktor, GDF (GDI Displacement Factor), ist aktuellen Modellen zu Folge an der korrekten „Platzierung“ von Rab-Proteinen an ihre spezifische Membran beteiligt. GDF's sind Membranproteine und binden Rab-Proteine bevorzugt in ihrer GDP-gebundenen Form im Komplex mit GDI. GDF ersetzt GDI in dem cytosolischen Rab-GDI-Komplex und rekrutiert das Rab-Protein so spezifisch zur Membran. Es scheint zudem so, dass wenn verschiedene Rab-Proteine an ein Kompartiment rekrutiert werden, sie doch an unterschiedliche Membrandomänen gelangen (Sönnichsen et al., 2000). Während GDI Rab-Proteine promiskuitiv zu binden scheint, wird für GDF-Proteine eine Spezifität vermutet. So wurde für ein GDF eine spezifische Aktivität für Rab5, Rab7 und Rab9 festgestellt nicht jedoch für Rab1 (Dirac-Svejstrup et al., 1997). Von dem endosomalen Membranprotein Rab5ip wird vermutet, dass es als GDF für Rab5 wirken könnte (Hoffenberg et al., 2000). Wie für alle GTPasen, so ist auch der Wechsel zwischen GTP- und GDP-gebundener Form für Rab-Proteine essentiell. Der Wechsel von der GDP- zu der GTP-Form wird durch Nukleotid-Austausch, die Änderung von der GTP- zur GDP-Form hingegen wird durch GTPase-Aktivität erreicht. Der Nukleotid-Austausch wird von den GEF (Guanin Nucleotide Exchange Factor)-Proteinen katalysiert, die schwache intrinsische GTPase-Aktivität der Rab-Proteine wird durch GAP's (GTPase Activating Proteins) stimuliert. Generell wird die biologische Aktivität der Rab-Proteine in der GTP-gebundenen, membranständigen Form geleistet, und in dieser aktiven Form interagiert es mit verschiedenen Partnern um mit

diesen zusammen in mehreren Schritten den Transport vom Akzeptor zum Donorkompartiment zu steuern. So wurde für Rab5 gezeigt, dass an dieses 22 verschiedene Proteine spezifisch binden können, wenn es in seiner GTP-Konformation vorliegt (Christoforidis et al., 1999). Diese Rekrutierung von Effektorproteinen kann bei Rab5 zu einer Interaktion mit Motorproteinen führen, die wiederum mit Komponenten des Cytoskeletts (Aktinfilamente oder Mikrotubuli) interagieren, was zu einer gerichteten Bewegung von Vesikeln führt (Nielsen et al., 1999). Für Rab6 wurde eine ähnliche Interaktion mit dem Motorprotein Rabkinesin-6 gezeigt (Echhardt et al., 1998).

Neben der Interaktion mit Motorproteinen spielen die Rab-Effektorproteine zudem eine wichtige Rolle in der Vesikelanheftung (Docking), sowie in der Fusion zwischen Donor- und Akzeptorkompartiment. Ein Rab-Effektor, das Early Endosome Autoantigen 1 (EEA1), hat zwei Rab5-Bindestellen an jedem Ende des Moleküls, es könnte also theoretisch zwei Endosomen in räumliche Nähe bringen und so eine homotypische Fusion initiieren (Christoforidis et al., 1999). Bei der Fusion von Akzeptor und Donorkompartiment wurde gezeigt, dass eine Reihe von Rab-Effektorproteinen mit SNARE-Proteinen interagieren (Jahn and Südhof, 1999). So bildet Rab5 einen Komplex mit EEA1, Rabaptin5, Rabex5 und NSF welcher mit Syntaxin-13 (ein t-SNARE) interagiert (Mc Bride et al., 1999). EEA1 ist zudem in der Lage direkt mit einem anderen SNARE, Syntaxin6, zu interagieren (Simonsen et al., 1999). Diese Interaktionen könnten auf eine Zusammenarbeit von Rab-Proteinen und SNARE's bei der Vesikelfusion hinweisen, d.h. eine Kooperation der SNARE bzw. Rab-Maschinerie bei Docking- und Fusionsereignissen.

1.4 Rab-Proteine im Transferrin-Zyklus

Auf den Kompartimenten, die bei dem endocytotischen Transport involviert sind, wurden 12 verschiedene Rab-Proteine bestimmt, von denen 4 in Epithelzellen exprimiert werden (Lütcke et al., 1994; Hunziker and Peters, 1998; Zacchi et al., 1998; Rodman and Wandinger-Ness, 2000). Diese Zahlen spiegeln die hohe Komplexität des endocytotischen Transportes wider; auch die Kompartimente des Transferrin-Zyklus sind mit mehreren Rab-Proteinen assoziiert. So ist Rab5 auf den Frühen-Endosomen lokalisiert worden, es reguliert den Transport (nicht nur für Transferrin) von der Plasmamembran zu diesen Endosomen (Gorvel et al., 1991; Bucci et al., 1992; Zerial and McBride, 2001). Rab4 reguliert das „schnelle“ Recycling von Rezeptoren von den Frühen-Endosomen zur Plasmamembran. Rab11 scheint sowohl in der Endocytose, als auch in der Exocytose beteiligt zu sein. So wurde seine Beteiligung im Transport vom TGN zur Plasmamembran (Chen et al., 1998), im Recycling zum Golgi-Apparat (Wilcke et al.,

2000), sowie im Recycling vom perinukleären Recycling-Endosom zur Plasmamembran vermutet (Ullrich et al., 1996; Trischler et al., 1999).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das perinukleäre Recycling-Endosom wurde bisher durch Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie untersucht, wodurch seine tubuläre Morphologie, sein pH-Wert, und seine zeitliche Stellung im Transferrin-Zyklus bestimmt werden konnte. Trischler et al. (1999) führten eine erste biochemische Analyse dieses Kompartiments mit Hilfe eines Immunsolierungsansatzes durch, bei dem spezifisch Recycling-Endosomen sowie Sorting-Endosomen angereichert werden konnten. Die Arbeiten basierten auf der Möglichkeit einer spezifischen Isolierung durch die Identifizierung von Rab11 als endogenem Marker für diese Organellen durch Arbeiten von Ullrich et al. (1996). Im Gegensatz dazu enthalten die Frühen-Endosomen Rab5 als spezifischen Marker. Im Vergleich zwischen den beiden Endosomenpopulationen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Rab5-positive Membranen in der Lage sind den Rab5-Effektor EEA1 aus dem Cytosol an die Membranen zu rekrutieren, während bei Rab11-positiven Recycling-Endosomen diese Rekrutierung nicht oder kaum stattfindet (Trischler et al., 1999), auch Aktin ist unterschiedlich auf beiden Populationen lokalisiert. Recycling-Endosomen enthalten Aktin, während die Frühen-Endosomen dieses Protein nicht besitzen.

In den Arbeiten wurden somit zwei unterschiedliche Endosomenpopulationen isoliert und charakterisiert, bei denen es sich wahrscheinlich um Rab5-positive Sorting-Endosomen (enthält u.a. EEA1) sowie um Rab11-positive Recycling-Endosomen (enthält u.a. Aktin) handelte.

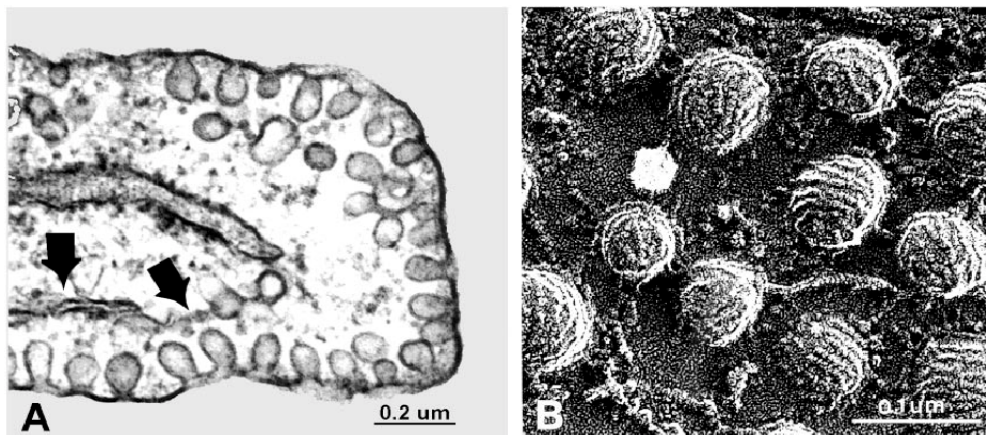
In der vorliegenden Arbeit sollte nun eine funktionelle Analyse vorgenommen, und die Rolle der Recycling-Endosomen im vesikulären Transport des Transferrins untersucht werden. Hierbei sollte ein *in vitro*-Fusionsassay etabliert werden, mit dem -basierend auf den spezifischen Immunsolierungen des Recycling-Endosoms mittels Rab11-Antikörpern- vesikulärer Transport rekonstituiert werden sollte, um neue Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen der Regulation dieser Schritte zu gewinnen. Ein *in vitro*-Ansatz sollte deshalb gewählt werden, weil eine *in vivo*-Analyse aufgrund der hohen Komplexität der intrazellulären Transportwege sehr schwierig ist. Der *in vitro*-Ansatz birgt den Vorteil einer Untersuchung definierter Abschnitte dieser Transportwege, wobei eine Konzentration auf den Transport zu Rab11-positiven Recycling-Endosomen erfolgen sollte, sowie Hinweise auf eine eventuelle, funktionelle Beteiligung des Aktin-Cytoskeletts gesucht werden sollten (Trischler et al., 1999).

In einem weiteren experimentellen Ansatz sollten Rab11-interagierende Proteine isoliert und funktionell analysiert werden, die eventuell als Effektoren mit Rab11 zusammen an

vesikulären Transportschritten beteiligt sind (beispielsweise in der Phase des Andockens von Donor- und Akzeptormembran oder direkt in dem Fusionsereignis).

1.6 Caveolae und Caveolin

Eukaryotische Zellen sind von einer Plasmamembran umgeben. Diese Plasmamembran ist jedoch nicht gleichförmig in ihrer Zusammensetzung, vielmehr ist sie in unterschiedliche Regionen oder Domänen unterteilt. Diese Domänen sind beispielsweise Mikrovilli, Clathrin-umhüllte Membranınvaginationen oder Zell-Zell-Kontaktstellen („junctions“). In letzter Zeit sind auch Lipiddomänen, zu denen auch die sog. „rafts“ (deutsch: Flöße) gehören, (Ikonen and Simons, 1997) zu diesen Regionen hinzuzuzählen. Der Begriff „raft“ spiegelt dabei nicht nur eine spezifische Domäne oder Domänenfamilie wider, sondern auch die Aufreinigungsschritte, die durchgeführt werden um diese Lipiddomänen von der übrigen Plasmamembran zu isolieren. Diese rafts sind durch Unlöslichkeit in nichtionischen Detergenzien bei 4°C, einer speziellen Lipidkomposition (reich an Cholesterol, Sphingomyelin und bestimmten Glycolipiden), sowie einer geringen Dichte in Sucrosegradienten charakterisiert. Eine Gruppe dieser rafts sind Membranınvaginationen, die erstmals 1954 durch Palade beschrieben wurden. Diese Invaginationen, die später als Caveolae benannt wurden, besitzen einen Durchmesser von etwa 50-80 nm, und erscheinen als flaschenhalsförmige, vesikuläre oder tubuläre Strukturen. Neben der offenen Struktur der Caveolae scheinen diese aber auch als geschlossene Vesikel in endocytotischen oder exocytotischen Strukturen vorzuliegen.



Anderson, 1998

Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Caveolae in Fibroblastenzellen.

A zeigt eine Dünnschichtaufnahme von invaginierten Caveolae. Pfeile zeigen das Endoplasmatische Retikulum nahe der Membranınvaginationen. B zeigt eine Aufnahme der inneren Plasmamembran mit Blick auf invaginierte Caveolae. Aus: Anderson, 1998.

Caveolae besitzen, ähnlich wie Clathrin-umhüllte Vesikel, eine Ummantelung durch Hüllproteine, und eines dieser Hüllproteine ist Caveolin. Es gibt vier Caveolin-codierende Gene: Caveolin-1 α und β , sowie Caveolin-2 und -3. Jedes der Caveolin-Proteine besitzt eine Transmembranregion mit 33 hydrophoben Aminosäuren, wobei der C- sowie der N-Terminus des Proteins in das Cytosol ragt. Caveolin-1 und -2 besitzen jeweils ein Molekulargewicht von etwa 23 kDa; Caveolin-1 scheint *in vivo* und *in vitro* hochmolekulare Komplexe mit einer Masse bis zu 600 kDa zu bilden (Monier et al., 1995). Während Caveolin-1 und -2 in vielen verschiedenen Zelllinien zu finden ist, wird Caveolin-3 spezifisch in Muskelzellen vorgefunden, wo es Caveolin-1 zu ersetzen scheint (Way and Parton, 1995; Tang et al., 1996). Eine potenzielle Rolle für Caveolin-1 ist der Transport von Cholesterol zu Caveolae.

Die Entdeckung des Markerproteins Caveolin-1 für Caveolae ist von großer Bedeutung, da die Methoden, die mit Hilfe des Proteins zur Aufreinigung von Caveolae entdeckt wurden auch in Abwesenheit von Caveolin-1 durchgeführt werden können. Diese Methoden sind im Einzelnen:

- Zentrifugation von Detergenz-unlöslichen Membranen in Sucrose-Gradienten (Sargiacomo et al., 1993)
- Dichtezentrifugation isolierter Plasmamembran in Opti-Prep-Gradienten (Smart et al., 1995)
- Differentielle Zentrifugation von Zell-Homogenaten (Chang et al., 1994)
- Immunoabsorption (Stan et al., 1997)

Neben der Aufreinigung von Caveolae sind auch die vielfältigen Funktionen von Caveolae von Interesse, die nachfolgend beschrieben werden sollen.

1.7 Caveolae und intrazellulärer Transport

Caveolae sind in endocytotischen Transportwegen involviert. Dieser Transport unterscheidet sich jedoch von der Aufnahme von Molekülen bei dem Clathrin-umhüllte Vesikel eine Rolle spielen. Ein Beispiel für die Aufnahme von Stoffen über Caveolae ist die so genannte Protocytose, der rezeptorvermittelten Aufnahme von Folat. Dieser Transportweg wurde durch die Beobachtung von konzentrierten Folatrezeptoren in invaginierten Caveolae, nicht jedoch in Invaginationen im Clathrin-Weg entdeckt (Anderson et al., 1992). Mittels des Folatrezeptors wird 5-Methyltetrahydroxyfolat in die Zellen internalisiert: in Caveolae, die dann als membranumhüllte Vesikel vorliegen, führt eine pH-Wert-Reduzierung zu einer Dissoziation des Liganden vom Rezeptor. Folat diffundiert in das Cytosol, während der Rezeptor anschließend wieder an die Plasmamembran transportiert wird. Der Begriff Protocytose wurde erweitert durch die Entdeckung, dass Caveolae ebenfalls an dem Transport von Molekülen zum ER beteiligt

sind. Neben Caveolin-1 (Conrad et al., 1995) werden vermutlich auch Pathogene wie das SV40-Virus (Anderson et al., 1996; Pelkmans et al., 2001) oder das Cholera Toxin (Parton, 1994) in retrograden Transportprozessen über diesen Weg transportiert.

1.8 Weitere Funktionen von Caveolae

Caveolae spielen ebenso wie im intrazellulären Transport und im Eintritt von Pathogenen über Caveolae auch eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion. Es gibt eine große Anzahl von Signaltransduktionsmolekülen, die in dieser Membrandomäne konzentriert vorliegen. Dabei ist Caveolin-1 direkt in Signaltransduktionsereignissen involviert, da es ein Substrat für Serin- und Thyrosinkinase ist. Caveolin-1 wird beispielsweise nach Stimulation von Insulin, Angiotensin II, osmotischem Schock und Oxidativem Stress an der Aminosäure 14 (Tyrosin) durch Src, Fyn und Abl phosphoryliert (Mastick et al., 1995; Mastick and Saltiel, 1997; Ushio-Fukai et al., 2001). Diese Phosphorylierung wiederum führt zur Bindung von Protein-Phosphotyrosin Bindedomänen, die eine Aktivierung weiterer Signalkaskaden mit sich bringt.

Eine Konzentration in Caveolae findet sich auch bei Rezeptoren für Cholecystinin (Roettger et al., 1995) und Acetylcholin (Feron et al., 1997) statt, wobei eine funktionelle Verbindung von diesen Rezeptoren mit den jeweiligen Effektorproteinen besteht. Auch bestimmte Proteine, die mit einem so genannten GPI- (glycosylphosphatidylinositol) Anker in der Membran verankert sind, wie z.B. der angesprochene Folatrezeptor, oder die alkalische Phosphatase, sind in Caveolae konzentriert.

1.9 Caveolin und andere Lokalisationen von Caveolae

Überraschenderweise entdeckten Liu et al. (1999) für das integrale Membranprotein Caveolin-1 in exokrinen Maus-Pankreaszellen eine sekretierte Form von Caveolin-1. Durch die Aminosäuresequenz mit hydrophober Transmembrandomäne wurde eine Sekretion als Lipoproteinpartikel vermutet. Auf dieser Entdeckung basierend wurden weitere Gewebe auf eine Lokalisation von Caveolin-1 hin untersucht: so wird in Endothelzellen, Fibroblasten und polarisierten Epithelzellen Caveolin-1 in Caveolae gefunden (Li et al., 2001), in einigen Fibroblasten scheinen jedoch gewisse Mengen von Caveolin-1 im Cytoplasma vorzuliegen (Uittenbogaard et al., 1998), auch hier wird ein Lipoproteinpartikel vermutet. Ebenfalls eine cytosolische Lokalisation besitzt Caveolin-1 in Skelettmuskelzellen der Maus, während Caveolin-3 in diesen Zellen an der Plasmamembran zu finden ist, es wird vermutet, dass Caveolin-3 Caveolin-1 dort funktionell „ersetzt“ (Li et al., 2001).

In vitro-Experimente zeigen, dass Caveolin-1 während der Translation in die ER-Membran prozessiert wird (Dupree et al., 1993), und es als integrales Membranprotein über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche gelangt (Machleidt et al., 2000), von wo es höchstwahrscheinlich sekretiert wird; vermutlich in Form eines Lipoproteinpartikels. Verschiedene Experimente (Immunfluoreszenz-, Elektronenmikroskopie- und Western-Blot-Analysen) zeigten eine Sekretion von Caveolin in professionell sekretierenden Pankreaszellen der Ratte. Perfusionen dieser Tiere mit bekannten, die Sekretion stimulierenden Reagenzien (Sekretin, Colecystokinin und Dexamethason) zeigten eine Steigerung der Sekretion von Caveolin-1 (Liu et al., 1999).

1.10 Potenzielle Funktionen für sekretiertes Caveolin

Sekretiertes Caveolin ist, wie verschiedene Publikationen zeigen, ein potenzieller Effektor *in vivo* und *in vitro*. So zeigten Tahir et al., (2001), dass Caveolin in humanen Prostatakrebszellen (LNCaP) in Zellkultur in niedrigeren Passagen weder exprimiert noch sekretiert wird, dagegen in späteren Passagen sowohl exprimiert und dann auch sekretiert wird. Die Sekretion kann hierbei durch Zugabe von Dexamethasone (DEX) oder Dihydroxytestosteron (DHT) verstärkt werden. LNCaP-Zellen in geringer Passagenzahl zeigen nach transienter Transfektion mit Caveolin-1 ebenfalls eine Sekretion des Proteins. Tahir et al. (2001) zeigten in Experimenten Veränderungen von LNCaP-Zellen, die selbst keinerlei Cav-1 exprimierten, aber mit konditioniertem Medium inkubiert wurden, die solche Cav-1-Partikel enthielten. Die Proliferation und die Vitalität dieser Zellen war erhöht, ein Effekt, der sich mit Zugabe von anti-Caveolin-Antikörper (zur Maskierung des Caveolins im Medium) reduzieren ließ. Neben diesen *in vitro*-Experimenten wurden auch Caveolin-1-sekretierende Zellen in Mäuse injiziert, und diese gleichzeitig mit anti-Caveolin-1-Antikörpern bzw. als Kontrolle IgG-Antikörper durch Injektion behandelt. Hierbei zeigten die mit anti-Caveolin-1-Antikörpern behandelten Mäuse neben einem geringeren Gewicht des Primärtumors auch eine geringere Metastasenbildung beispielsweise in Lunge oder Knochenmark. Die Autoren postulieren Caveolin-1 als autokrinen/ parakrinen Faktor bei androgen insensitivem Prostatakrebs.

Die These einer verstärkten Proliferation und die erhöhte Metastasenbildung durch Caveolin-1 wird jedoch nicht von allen Autoren geteilt. So zeigten Lee et al. (1998), dass in humanen Brustkrebszellen T47D, die normalerweise kein Caveolin exprimieren eine künstliche Expression des Proteins zu einer Inhibierung der Metastasenbildung bei diesen Tumoren führt. Es ist jedoch zu bedenken, dass sich die Autoren dieser Publikation lediglich mit der Expression des Caveolins und seiner Funktion, nicht jedoch mit der Sekretion und damit möglicherweise verbundenen Effekten beschäftigen.

1.11 Zielsetzung der Arbeit

Die überraschende Entdeckung der Sekretion des normalerweise als integrales Membranprotein vorliegenden Caveolins wirft die Frage nach der Zusammensetzung und der Funktion dieses sekretierten Proteins auf. Die Sekretion als ein Lipoproteinpartikel durch die bereits erwähnte Struktur des Caveolins wird vermutet. Es ist jedoch unklar, wie gross dieses Partikel sein könnte. Ebenso unklar ist, ob sich auf diesem Partikel neben Cav-1 noch weitere Proteine befinden könnten, die eventuell die oben postulierten Funktionen als autokriner/ parokriner Faktor ausüben oder unterstützen können. Um solche Analysen durchführen zu können, bedarf es einer effizienten Aufreinigung dieser Partikel, um eine nachfolgende Charakterisierung, bzw. Identifikation der dort befindlichen Proteine zu erreichen.

Caveolin wird lediglich von bestimmten Zellen sekretiert. Zu diesen Zellen gehören humane Prostatakrebszellen (LNCaP) höherer Passagen oder aber auch LNCaP-Zellen nach transienter Transfektion mit Caveolin-1. Diese Zellen sollen daher Ausgangsmaterial für die Gewinnung konditionierter, Cav-1-haltiger Medien sein. Die transiente Transfektion mit Cav-1-c-DNA, die neben der Sequenz für das Protein zusätzlich für einen His₆-tag codiert, birgt zudem den Vorteil einer Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose. Neben der Aufreinigung sollen charakterisierende Experimente Hinweise auf die Dichte, sowie die Größe des Partikels geben. Mittels der Dichte können zudem Aussagen darüber gemacht werden, ob die Sekretion tatsächlich in Form eines Lipoproteinpartikels erfolgt.

2 Material und Methoden

2.1 *Material*

Zellen

CHO-Zellen	Dr. Marino Zerial (MPI Dresden)
LNCaP-Zellen	ATCC

Zellkultur

Medien und Lösungen	Gibco
Fötale Kälberserum	Sigma, Atlanta Biologicals
Zellkulturflaschen und Schalen	Nunc, Greiner
DMSO	Sigma
Transfektionsreagenz (Lipofectamine Plus)	Invitrogen

SDS-PAGE und native Blau-Elektrophorese

2-Mercaptoethanol	Sigma
6-Aminocaproic Säure	Sigma
Acrylamid/ Bisacrylamidlösungen	Roth
APS	Biorad
BisTris	Sigma
Coomassie G250	Biorad
Glycerol	Sigma
Molekulargewichtsmarker	Biorad
PMSF	Roche
SDS	Biorad
Silberfärbung	Biorad
TEMED	Biorad
Tris	Sigma

Western-Blot-Analyse

Apparaturen	Biorad
Nitrocellulosemembran Ba85	Schleicher & Schuell
PVDF-Membran	Schleicher & Schuell
Chemilumineszenz- Detektionssystem (ECL)	Amersham
Röntgenfilme	Kodak
Ponceau S	Serva

FPLC

Superose6 Chromatographiesäule	Pharmacia
Protein-Kalibrierungskit	Pharmacia

Dichtegradienten und Ultrazentrifugation

Sucrose	Amersham
CsCl	Sigma
Optiprep	Nycomed/ Invitrogen
HDL	Brown and Goldstein (Dallas, USA)
Zentrifugen	Kontron und Beckman
Zentrifugenröhrchen	Beckman

Immunisolierung

Dynabeads M-450	Dynal
Magnetischer Partikel Sammler (MPC)	Dynal

Laborzentrifugen

Eppendorf, Hettich

Chromatographie

Ni-NTA-Agarose	Qiagen
CnBr-Sepharose	Pharmacia

In vitro-Fusionsassay

Acridinium-Ester	Biotrend
Transferrin	Sigma
Kreatinkinase	Roche
Kreatinphosphat	Roche
Hexokinase	Roche

Antikörper

anti-Rab11 Antikörper	eigenes Laboratorium
anti-Kaninchen Antikörper	Dianova
anti-Aktin Antikörper	Sigma
anti-Caveolin Antikörper	BD Transduction Labs
anti-Kaninchen Antikörper HRP-gekoppelt	Dianova
anti-ApoA1 Antikörper	UTSW, Dallas

Alle anderen Chemikalien wurden von Sigma, Merck, Serva und Roth bezogen.

2.2 Proteinanalytische Methoden**2.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht wurde mittels SDS-PAGE (Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli, 1970) durchgeführt. Hierbei wurden gelöste oder pelletierte Proteine mit SDS-Probenpuffer versetzt und je nach Versuchsbedingungen und Zielsetzung mit 2% 2-Mercaptoethanol reduziert. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C erhitzt und direkt elektrophoretisch getrennt oder aber bei -20°C zur späteren Analyse aufbewahrt.

Die Gelmatrix bestand normalerweise aus zwischen zwei Glasplatten eingebettetem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel, in einigen Fällen wurden auch kontinuierliche Gele verwendet, die einen Gradienten in ihrer Acrylamid-Konzentration aufwiesen (beispielsweise 4%-16%). Bei allen Gelen wurden die Reagenzien für das Trenngel zusammengegeben und die Polymerisation startete mit der Zugabe von TEMED und APS. Nach gründlichem Mischen durch einem Magnetrührer wurde die Lösung in die an drei Seiten abgedichtete Glaskammer gegossen. Die Polymerisation erfolgte unter Luftabschluss durch vorsichtige Überschichtung des Gels mit $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$ oder Isopropanol. Die Acrylamid-Endkonzentration betrug je nach Versuchsansatz in diskontinuierlichen Gelen 10-15%. Nachdem die Trenngellösung auspolymerisiert war und das $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$ / Isopropanol entfernt wurde, erfolgte das Auftragen der Sammelgellösung (nach Zugabe von TEMED und APS, sowie nach gründlicher Durchmischung auf dem Magnetrührer) in die Glasplattenkammer direkt auf das Trenngel. Die erforderlichen Taschen zur Probenbeladung wurden durch das Einsetzen eines Teflonkammes in die noch flüssige Sammelgelschicht erzeugt. Nachdem das Sammelgel auspolymerisiert war, wurden die

Abdichtungen der Glasplatten entfernt und die Gelplatten über ein Puffersystem so verbunden, das das Sammelgelende in Elektrodenpuffer der ersten Kammer und das Trenngelende in Elektrodenpuffer der zweiten Kammer eingetaucht war (vertikale Anordnung). Beide Kammern enthielten den gleichen Elektrodenpuffer. Nach Entfernen des Teflonkamms konnten die Proben in die jeweiligen Taschen hineinpipettiert werden. Die oben befindliche Pufferkammer (Sammelgel, Probenseite) wurde an die Kathode einer Gleichstromquelle angeschlossen, die untere Pufferkammer (mit eingetauchtem Trenngelende) wurde entsprechend mit der Anode verbunden. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht (bei 9 mA) oder in einem Bereich bis zu 3 Stunden (75 mA). Die Gelelektrophorese war beendet, wenn das im Probenpuffer befindliche Bromphenolblau in die untere Pufferkammer hinauslief. Das Gel wurde abgebaut und je nach experimentellem Ansatz weiter prozessiert.

12% Trenngel (29x25 cm Glasplatten)

32 ml 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid
 11,2 ml 3 M Tris-HCl pH 8,8
 400 µl 20% SDS w/v
 16 ml _{dd}H₂O
 20 ml 60% Sucrose w/v
 40 µl TEMED
 300 µl 10% APS

5% Sammelgel (29x25 cm Glasplatten)

8 ml 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid
 4 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8
 300 µl 20% SDS w/v
 32,2 ml _{dd}H₂O
 15 ml 60% Sucrose w/v
 30 µl TEMED
 600 µl 10% APS

2x SDS-PAGE Probenpuffer

0,1 M Tris-HCl pH 6,8
 20% v/v Glycerol
 4% w/v SDS
 0,02% Bromphenolblau
 falls reduzierend: 2% 2-Mercaptoethanol

10x Elektrophoresepuffer

0,25 M Tris
 1,92 M Glycin
 1% w/v SDS

2.2.2 Proteinfärbung mit Coomassie-Blau

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine können im Gel durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden. Hierzu wurde das Gel für 1 h bei RT unter sanftem Schütteln mit Coomassie-Blau Färbelösung inkubiert. Ein Entfärben des Geles erfolgte durch Inkubation in der Entfärbelösung (mit mehrmaligem Austausch der Lösung), bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Zur Dokumentation wurde das Gel auf einem Geltrockner getrocknet oder mittels eines Scanners digitalisiert.

Entfärbelösung

40% v/v Methanol
 50% v/v _{dd}H₂O
 10% v/v Essigsäure

Coomassie-Blau Färbelösung

wie Entfärbelösung
 zusätzlich 0,5% w/v Coomassie-Brilliant-Blue

2.2.3 Proteinfärbung mittels Silberfärbung

Eine 30-50 fach sensitivere Proteinfärbung als die Coomassie-Färbung bietet die Silberfärbung. Bei dieser wurde das Produktpaket Silver Stain Plus (Biorad) verwendet. Das Gel wurde zunächst in Fixierlösung für 20 min unter leichtem Schütteln bei RT fixiert. Die Fixierlösung wurde dann durch Waschen mit 2 x 400 ml ddH_2O für jeweils 10 min bei RT entfernt. Die Färbung erfolgte in der Silberlösung bis eine befriedigende Färbung der Proteinbanden erzielt wurde, die Reaktion konnte durch Inkubation des Geles in einer 5% Essigsäurelösung abgebrochen werden. Das Gel wurde dann in ddH_2O gewaschen und dann auf einem Gelrockner getrocknet oder eingescannt, bzw. für weitere Analysen prozessiert.

Fixierlösung

50% v/v Methanol
10% v/v Essigsäure
10% v/v Fixative Enhancer Concentrate (Biorad)
30% v/v ddH_2O

Färbelösung

35% v/v ddH_2O
5% v/v Silver Complex Solution (Biorad)
5% v/v Reduction Moderator Solution (Biorad)
5% v/v Image Development Reagent (Biorad)
50% v/v Development Accelerator Solution (Biorad)

Stopplösung

5% v/v Essigsäure

2.2.4 Native Blau-Gelelektrophorese

Die native Blau-Gelelektrophorese ist im Aufbau der SDS-PAGE ähnlich, jedoch wird hier ein anderer Probenpuffer, sowie ein anderer Gelpuffer verwendet. Ein weiterer Unterschied ist die Verwendung von Anoden- bzw. Kathodenpuffer, die sich ebenfalls in ihrer Zusammensetzung unterscheiden.

Vor dem Lauf der nativen Elektrophorese wurde die Probe in 10-fach Probenpuffer resuspendiert und anschließend in einem 4-16% Gel aufgetrennt. Der Gellauf erfolgte bei 4°C und 200V für etwa 12 Stunden. Der Transfer der Proteine auf eine Membran erfolgte wie in 2.2.5 beschrieben.

10-fach Probenpuffer

0,05 g Coomassie G250
0,1 g 6-Aminocaproic Säure
50 μl BisTris Puffer (Stammlösung)
7 μl PMSF
100 μl 87%ige Glycerol-Lösung
auf 1 ml mit ddH_2O

BisTris Stammlösung (1 M)

209,2 g BisTris
auf 1 l mit ddH_2O
pH 7,0 mit HCl einstellen

Tricine Stammlösung (1 M)
179,2 g Tricine
auf 1 l mit $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$
auf pH 7,0 mit NaOH einstellen

Kathodenpuffer
50 ml Tricine Stammlösung
15 ml BisTris Stammlösung
0,2 g Coomassie G250
auf 1 l mit $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$

Anodenpuffer
50 ml BisTris Stammlösung
auf 1 l mit $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$

Gelpuffer
20 ml BisTris Stammlösung
26,2 g 6-Aminocaproic Säure

4% Nativ Blau-Gel (14 ml)
5,8 ml $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$
7,0 ml Gelpuffer
1,2 ml Acrylamid (40%)
50 μl APS (10%)
5 μl TEMED

16% Nativ Blau-Gel (14 ml)
7,0 ml Gelpuffer
4,5 ml Acrylamid (40%)
2,3 ml Glycerol (87%)
50 μl APS (10%)
5 μl TEMED

2.2.5 Western-Blotting

Für immunochemische Analysen wurden die durch SDS-Page aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran transferiert, und damit auch immobilisiert (Towbin et al., 1979).

Hierzu wurde ein schichtweiser Aufbau aus einem Kunststoffschwamm, drei Lagen 3MM Papier (in Abmessung des Geles), dem Gel, der Membran und wiederum drei Lagen 3 MM Papier gefolgt von einem Kunststoffschwamm erstellt. Der gesamte Aufbau erfolgte in 1x Western Blot Puffer, und wurde luftblasenfrei durchgeführt (auftretende Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten wurden durch eine Pipette herausgestrichen). Bei PVDF-Membranen mussten diese vorher mit Methanol befeuchtet und anschließend in $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$ gewaschen werden. Der Aufbau wurde zwischen zwei gelochten Kunststoffplatten zusammengepresst und in einen Tank mit zwei gegenüberliegenden Platinelektroden parallel zu diesen Elektroden befestigt. Der Tank wurde bis zum Rand mit 1x Western Blot Puffer aufgefüllt, und die Elektroden an eine Gleichstromquelle angeschlossen, wobei sich die Membran zwischen Anode und Gelstück befand. Der Transfer erfolgte bei 4°C bei 30 V für 12 h bzw. für 1,5 Stunden bei 100 V.

10x Western Blot Puffer
0,2 M Tris
1,5 M Glycin

1x Western Blot Puffer
20% v/v Methanol
70% v/v $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$
10% v/v 10x Western Blot Puffer

2.2.6 Ponceau-S-Färbung

Nach Abschluss des Transfers der Proteine auf die Membran wurde diese und das Gel dem Aufbau entnommen. Eine Überprüfung des Transfers erfolgte durch Coomassie-

Färbung des Gels (siehe 2.2.2), sowie durch eine reversible Ponceau-S-Färbung der Membran. Hierbei wurde die Membran in Ponceau-S-Lösung für 5 min inkubiert und anschließend mit PBS soweit entfärbt, bis Proteinbanden optimal sichtbar waren. Die so gefärbte Membran wurde mittels Photokopie dokumentiert und anschließend mit PBS vollständig entfärbt. Die Membran konnte dann entweder weiter prozessiert, oder aber in Aluminiumfolie verpackt und bei 4°C gelagert werden.

Ponceau-S
95% Lösung (Serva)

PBS
8,0 g NaCl
0,2 g KCl
1,1 g Na₂HPO₄
0,2 g KH₂PO₄
auf 1 l mit ddH₂O auffüllen

2.2.7 Immunodetektion membrangebundener Proteine

Die Membran mit den immobilisierten Proteinen wurde zu Beginn der Immunodetektion 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln in Blockierungspuffer inkubiert um noch proteinfreie Flächen der Membran mit neutralen Proteinen abzusättigen. Nach Entfernen des Blockierungspuffers wurde der für das zu detektierende Protein spezifische Antikörper in Blockierungspuffer (in adäquater Verdünnung) mit der Membran unter leichtem Schütteln für 1 h bei RT (oder 4°C über Nacht) inkubiert. Die Antikörperlösung war zuvor zentrifugiert worden (4°C, 5 min, 14.000 x g). Nach Inkubation mit dem Erstantikörper wurde die Membran dreimal für 5 min mit Blockierungspuffer gewaschen (ein Antrocknen der Membran sollte hierbei vermieden werden) und es folgte die Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Zweitantikörper, der gegen Immunglobuline der Spezies gerichtet war, aus der der Erstantikörper stammte, und zwar für 30 min bei RT, ebenfalls in Blockierungspuffer verdünnt. Auch dieser Antikörper wurde zunächst durch Zentrifugation (5 min, 14.000 x g, 4°C) von Präzipitaten befreit. Nach Ende des zweiten Inkubationsschrittes wurde die Membran erneut dreimal für jeweils 5 min bei RT mit Blockierungspuffer gewaschen, gefolgt von zwei Waschschritten mit PBS/ 0,1% Tween 20 für je 2 min. Als letzter Waschschriff wurde die Membran für zweimal 2 min mit PBS inkubiert. Für die Detektion der Proteine wurde das PBS entfernt und mit einer Substratlösung für die Meerrettichperoxidase (ECL von Amersham, zwei Stammlösungen 1:1 vermischt) für 1 min bei RT inkubiert. Überschüssige Substratlösung wurde dann durch Abtupfen auf ein Papiertuch entfernt und die Membran dann zwischen zwei Overheadfolien gelegt, die sich in einer Röntgenfilmkassette befanden. Bei der enzymatischen Reaktion der Peroxidase mit dem Substrat wird Licht frei (Chemilumineszenz), das dann auf Röntgenfilmen, die der Membran aufgelegt wurden, dokumentiert werden konnte.

Blockierungspuffer
5% Magermilchpulver
0,1% Tween 20
in 1x PBS

PBS
2.2.6

PBS/ Tween 20
0,1% Tween 20 in 1x PBS

2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde mit dem Protein-Assay der Firma Biorad durchgeführt, der auf der Methode von Bradford (1978) beruht. Hierfür wurden 800 μl ddH_2O mit 1-10 μl (je nach zu erwartender Konzentration) Proteinlösung unbekannter Konzentration, sowie 200 μl des Proteinfärbekonzentrates gründlich vermischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Lösung bei 595 nm gemessen. Mit Hilfe einer Eichgeraden, die mit einer BSA-Lösung bekannter Konzentration erstellt wurde, konnte die vorhandene Proteinkonzentration ermittelt werden.

2.2.9 TCA-Präzipitation von Proteinen

Bei der TCA-Präzipitation von Proteinen wurde die Lösung mit den zu fällenden Proteinen (in der Regel 1 ml) mit 100 μl 72%iger, wässriger TCA-Lösung (Sigma) versetzt. Nach intensivem Mischen wurde die Suspension für 20 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei 14.000 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde nachfolgend dreimal mit jeweils 1 ml Aceton gewaschen (Resuspension durch vortexen, Zentrifugation bei 14.000 x g für 5 min. bei 4°C). Nach der letzten Zentrifugation und der Abnahme des Überstandes wurden die Reaktionsgefäße offen bei RT für etwa 10 min unter einen Abzug gestellt, damit überschüssiges Aceton verdunsten konnte. Das getrocknete Pellet konnte anschließend in geeignetem Volumen Probenpuffer für SDS-PAGE Analysen aufgenommen werden.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Allgemeine Bedingungen

Die Kultur der verwendeten Zelllinien erfolgte in sterilen Kulturschalen und -flaschen in spezifischen Zellkulturmedien. Ein Brutschrank gewährleistete die nötigen Wachstumsbedingungen (37°C, 5% CO₂-Gehalt, 95% Luftfeuchtigkeit). Die Arbeiten wurden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt (Laminar-Flow, sterilisierte Gerätschaften, Lösungen und Medien).

2.4 Passagieren der Zellen

Da die verwendeten, immortalisierten Zellen nach Erreichen eines konfluenten Monolayers ihr Wachstum einstellen, müssen sie in regelmäßigen Abständen (Durchschnittlich alle 3-5 Tage) ausgedünnt werden um neue Teilungen zu ermöglichen. Hierbei wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit Trypsin/ EDTA Lösung versetzt. Nach 3-10 min (je nach Zellart) wurden die durch das Trypsin vom Schalenboden abgelösten Zellen in Medium aufgenommen und durch auf- und abpipettieren vereinzelt und schließlich in weitere Kulturgefäße je nach gewünschter Verdünnung überführt.

2.4.1 Anlegen, Lagerung und Auftauen von Dauerkulturen

Zur Anlage haltbarer Dauerkulturen wurden die trypsinisierten Zellen in FKS/ 10% DMSO aufgenommen und für 5 min bei 300 x g bei 4°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen erneut in FKS/ 10% DMSO resuspendiert und in 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen überführt. Ein Zellkulturflasche von 75 cm² Fläche entspricht hierbei einem Aliquot von 1 ml. Die Zellen wurden dann schrittweise abgekühlt: 4 h in einem Styroporgefäß -20°C, über Nacht in einem Styroporgefäß bei -80°C. Schließlich die Einlagerung in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch rasche Überführung der Kryoröhrchen vom flüssigen Stickstoff (-196°C) auf 37°C. Die Zellsuspension wurde in ein Zellkulturgefäß mit vorgelegtem Medium gegeben und sodann vorsichtig vereinzelt. Nach Anheften der Zellen an den Boden des Zellkulturgefäßes (nach ca. 2-3 h) wurde das Medium ausgetauscht um verbliebenes DMSO zu entfernen.

CHO-Medium

500 ml Ham's F12 Grundmedium
5 ml 200 mM L-Glutamin
5 ml Penicillin/ Streptomycin (10.000 U)
10% fötales Kälberserum (FKS); zuvor 30 min bei 56°C dekomplementiert

LNCaP-Medium

RPMI1640 Medium
2 g NaHCO₃/ Liter
10% fötales Rinderserum,
dekomplementiert

Trypsin/EDTA
Trypsin/ EDTA 1x Lösung

DMSO
DMSO wasserfrei für Zellkultur

2.5 Präparation der Donor- und Akzeptormembranen für den in vitro-Fusionsassay

2.5.1 Kopplung von Acridiniumester an Transferrin

Die kovalente Kopplung des Markermoleküls Acridiniumester (4-(2-succinimidyl-oxycarbonyl) ethyl) phenyl-10-acridinium-9-carboxylate trifluoromethyl sulfonate) an Transferrin erlaubt eine spezifische Detektion nach Aufnahme des Transferrins über seinen Rezeptor in den Kompartimenten des Rezeptor-Recycling Weges.

38 mg lyophilisiertes, humanes, holo-Transferrin wurde in 7 ml Kopplungspuffer gelöst (Endkonzentration: 5 mg/ml), in ein Becherglas überführt und 10 min bei RT inkubiert um die Lösung auf RT zu erwärmen. Zum gelösten Transferrin wurde dann unter langsamen Rühren 1,9 mg Acridiniumester (gelöst in 750 µl DMF) langsam und tropfenweise hinzugegeben. Die Lösung wurde anschließend für 30 min bei RT unter langsamen Rühren inkubiert. Noch freie Kopplungsgruppen wurden durch Hinzugabe von 80 µl einer 10% Lysinlösung und Inkubation bei RT unter Rühren für 15 min abgesättigt. Zur Trennung von niedermolekularen Bestandteilen von gekoppeltem Acridinium-Transferrin wurde die Lösung auf eine PD-10 Entsalzungssäule (Pharmacia) gegeben, welche zuvor mit 50 ml Säulenpuffer gewaschen wurde. Die Proben wurden dann mit 13 ml Säulenpuffer von der Säule eluiert, dabei wurden 26 Fraktionen mit einem Volumen von jeweils 500 µl gesammelt. Von allen Fraktionen wurde die Proteinkonzentration gemessen, die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration (normalerweise Fraktionen 6-8) wurden schließlich vereinigt.

Da eisenbeladenes holo-Transferrin eine höhere Affinität zu seinem Rezeptor besitzt, als unbeladenes apo-Transferrin, empfiehlt es sich nach der Kopplung eine erneute Beladung des Transferrins mit Fe^{3+} vorzunehmen (Verlust des Eisens beim holo-Transferrins während Lyophilisierung und Kopplung des Acridiniumesters), um unspezifische und niederaffine Bindungen auszuschließen. Hierbei wurden die vereinigten Fraktionen nach Entsalzung in einen Dialyseschlauch (MWCO: 10.000 Da) gegeben, der zuvor sorgfältig mit PBS gewaschen wurde. Die Sättigung des Transferrins mit Eisen erfolgte durch Dialyse gegen 2x 1 Liter Eisen-Sättigungspuffer bei 4°C für 4 Stunden (erster Pufferaustausch nach 1 Stunde). Zur Entfernung des Eisen-Sättigungspuffers wurde das Acridinium-Transferrin über Nacht gegen 4x 1 Liter Dialysepuffer dialysiert. Nach Absammeln des Dialysates wurde die Acridinium-Transferrin Lösung für 5 min bei 14.000

x g zentrifugiert um eventuell entstandene Aggregate zu entfernen. Die Langzeitlagerung (bis zu 6 Monate) erfolgte in 1 ml Aliquots bei -20°C.

Kopplungspuffer

0,1 M Na₂CO₃
0,1 M NaHCO₃
pH 8,5

10% Lysinlösung

in Kopplungspuffer
pH 8,5

Säulenpuffer

50 mM Tris-HCl
pH 8,0

Eisensättigungspuffer

1 mM NaHCO₃
2 mM Na₂NTA
0,25 M Tris/ HCl
0,25 M FeCl₃
pH 8,2

Dialysepuffer

20 mM Hepes
150 mM NaCl
pH 7,4

PBS

2.2.6

2.5.2 Internalisierung von Acridinium-markiertem Transferrin in Endosomen von CHO-Zellen

Bei der rezeptorvermittelten Endocytose durchlaufen die aufgenommenen Rezeptoren mit ihren Liganden verschiedene Subpopulationen von Endosomen. Bei der Aufnahme von Transferrin sind dies die Early-/ Sorting-Endosomen und das Recycling-Endosom. Um spezifisch diese Endosomentypen zu markieren wurde Acridinium-markiertes Transferrin in CHO-Zellen internalisiert. Hierzu wurden CHO-Monolayer in Zellkulturschalen mit 60-80% Konfluenz zunächst 2 mal mit PBS (37°C) auf einem Schüttler gewaschen und dann durch Inkubation mit CHO-Medium für 60 min in einem Zellinkubator (5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) von endogenem Transferrin erschöpft und anschließend mit Acridinium-markiertem Transferrin in CHO-Medium für 30 min bei 37°C in einem Zellinkubator inkubiert. Dabei war darauf zu achten, dass die Zellen vollständig mit dem Medium überschichtet waren. Nach der Inkubation wurden die Schalen sofort auf Eis platziert und dreimal mit PBS (4°C) auf einem Schüttler gewaschen. Nach dem Waschen folgte eine Inkubation mit eiskaltem PBS/0,5% BSA für 20 min auf einem Schüttler. Das BSA wurde anschließend durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Es folgte das Protokoll zur Präparation eines (PNS) und endosomenangereicherten Ausgangsmaterials (siehe 2.5.3).

PBS
2.2.6

Internalisierungsmedium
Hams F12/10 mM Hepes pH 7.4
20 µg/ml Ac-Tfn

Erschöpfungsmedium

Hams F12/10 mM Hepes pH 7.4

2.5.3 Präparation eines postnukleären Überstandes (PNS) und endosomenangereicherten Ausgangsmaterials

CHO-Zellen mit 60-80%iger Monolayerdichte wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen (10 ml PBS je 10 cm Zellkulturschale). Anschließend wurde das PBS entfernt und mit 1,5 ml eiskaltem PBS pro Zellkulturschale ersetzt. Die Zellen wurden sodann mit einem Zellschaber vom Schalenboden vorsichtig abgeschabt (um ein Aufplatzen der Zellen zu vermeiden). Die Zellsuspension wurde dann mit einer 3 ml Einweg-Pasteurpipette in ein 15 ml Greinergefäß (auf Eis) überführt. Zellen von insgesamt 10 Zellkulturschalen wurden in einem Greinergefäß vereinigt und anschließend 5 min bei 4°C mit 250 x g zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde das PBS durch eiskalten Homogenisierungspuffer (4 ml pro Greinergefäß) ersetzt und das Zellpellet vorsichtig mit einer 3 ml Einweg-Pasteurpipette in dem Puffer aufgeschwemmt und so resuspendiert. Danach wurden die Zellen für 10 min bei 1.500 x g abzentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen aufgebrochen, hierbei wurde das Zellpellet entsprechend dem Eigenvolumen in Homogenisierungspuffer aufgenommen und dann in einer 1 ml Spritze mit 22G1/2 Kanüle mit hohem Druck -ohne Luft anzuziehen- 3-5 mal resuspendiert. Die Effizienz des Aufbrechens der Zellen durch die entstehenden Scherkräfte wurde mehrfach durch Kontrolle kleiner Volumina der Zellsuspension im Phasenkontrastmikroskop vorgenommen. Ein Aufbrechen der Zellkerne sollte vermieden werden, da freiwerdende DNA zu einem Verkleben der Zellorganellen führt. Üblicherweise wurden Präparationen mit einer Brechungseffizienz von etwa 60% hergestellt.

Der postnukleäre Überstand (PNS) wurde schließlich durch Zentrifugation bei 1.500 x g (4°C, 15 min) gewonnen; der Zentrifugationsschritt diente der Aufreinigung durch Entfernen von Zelltrümmern, Kernen und noch ungebrochenen Zellen. Der milchigtrübe PNS wurde mit abgeschnittener blauer Pipettenspitze (Vermeidung von Scherkräften) vorsichtig abgenommen und dann zur Herstellung endosomenangereicherten Ausgangsmaterials verwendet.

Der frische PNS wurde in ein Zentrifugenröhrchen (auf Eis) überführt und sodann mit 62% w/w Sucroslösung auf eine Sucrosekonzentration von 40,6% w/w eingestellt. Dabei wurde das etwa 1,2 fache PNS-Volumen 60% w/w Sucroslösung hinzugegeben und beide Lösungen mit einer 3 ml Einweg-Pasteurpipette gründlich vermischt. Das Überprüfen der Zuckerkonzentration erfolgte mittels Refraktometer. Das Gesamtvolumen der PNS/ Sucroslösung betrug in der Regel 10 ml und es wurden 5 ml dieser Suspension pro Gradient eingesetzt. Der mit Sucrose vermischte PNS wurde

anschließend vorsichtig mit 12 ml 35% w/w Sucroslösung gefolgt von 8 ml 20% w/w überschichtet. Das verbleibende Volumen wurde mit Homogenisierungspuffer bis zum Rand des Zentrifugenröhrchens aufgefüllt. Der Gradient wurde nachfolgend für 3 h bei 4°C mit $108.000 \times g_{av}$ zentrifugiert (Kontron Ausschwingrotor TST.28.38). Die endosomenangereicherte 35%/20%-Interphase wurde mit Hilfe eines Fraktionssammlers abgenommen, aliquotiert (mittels abgeschnittener Pipettenspitze) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Endosomen konnten so bis zu einem Monat bei -80°C aufbewahrt werden.

Homogenisierungspuffer
 250 mM Sucrose (8,5% w/w)
 3 mM Imidazol
 pH 7,4

PBS
 2.2.6

60% Sucroslösung
 80,49 g Sucrose / 100 ml $_{dd}H_2O$
 3 mM Imidazol
 pH 7,4

35% Sucroslösung
 40,30 g Sucrose / 100 ml $_{dd}H_2O$
 3 mM Imidazol
 pH 7,4

20% Sucroslösung
 21,62 g Sucrose / 100 ml $_{dd}H_2O$
 3 mM Imidazol
 pH 7,4

2.5.4 Immunisolierung endosomaler Membranen

Die Gewinnung von endosomenangereicherten Membranen, genauer die 35%/20%-Interphase (siehe 2.5.3), diente als Ausgangsmaterial für eine Immunisolierung mit anti-Rab11 gekoppelten, magnetischen Partikeln (Dynabeads). Eine direkte Verwendung dieser magnetischen Partikel zur Immunisolierung spezifischer Membranen aus dem PNS war nicht möglich, da Quencheffekte von cytosolischem Rab11 eine Immunisolierung ineffizient werden ließen.

Dynabeads sind kugelförmige Polystyrenpartikel uniformer Größe, die superparamagnetisch sind und in einer Suspension monodispers vorliegen. Der Kern dieser Partikel besteht aus gleichmäßig in Polystyren verteiltem δFe_2O_3 und Fe_3O_4 und ist von einer dünnen Polyurethanhülle umgeben, so dass ein unerwünschter Kontakt zwischen dem Eisen im Kern und dem Probenmaterial vermieden wird. Die definierte Oberfläche besitzt kleine, chemisch aktivierbare Brückenmoleküle (p-Toluensulfonylchlorid-Gruppen), an die verschiedene biologische Substanzen (beispielsweise Antikörper) kovalent gekoppelt werden können. Die Antikörper können dann direkt für Immunisolierungen eingesetzt werden oder aber sie dienen als Sekundärantikörper zur Bindung eines Primärantikörpers, der wiederum an die eigentlichen Zielstrukturen bindet.

Bei den in dieser Arbeit dargestellten Experimenten wurde ausschließlich nach der letztgenannten Methode verfahren.

2.5.5 Kovalente Kopplung von Sekundärantikörpern an oberflächenaktivierte Dynabeads

Bei den in dieser Arbeit dargestellten Experimenten wurden generell Dynabeads M-450 verwendet, die einen Durchmesser von 4,5 μm besitzen. Die Oberfläche der Partikel war tosylaktiviert, d.h. sie war mit p-Toluen-Sulfonylchlorid-Gruppen versehen. An diese Gruppen wurden gegen Immunglobuline (Subtyp G) aus Kaninchen gerichtete Sekundärantikörper kovalent gekoppelt, wobei je mg Partikel 5 μg Antikörper eingesetzt wurden. Die Partikel lagen bei Lieferung in einem Glasgefäß in Suspension vor, deren Konzentration 4×10^8 Partikel je ml (=30 mg/ml) betrug. Für ein typisches Kopplungsprotokoll zur Herstellung von 10 ml antikörpergekoppelter Partikelsuspension wurde die gelieferte Stammsuspension zunächst 1-2 min gründlich durch kräftiges Vermischen homogenisiert und danach 10 ml Suspension entnommen und in ein 15 ml Greinergefäß überführt. Nach Zentrifugation (5 min, 10°C, 1.500 x g) und Entfernen des Überstandes wurden die Partikel bei RT in 10 ml Boratpuffer 1 min gründlich resuspendiert, und anschließend wie zuvor beschrieben pelletiert und der Überstand entfernt. Die Partikel wurden insgesamt dreimal auf diese Weise in Boratpuffer gewaschen. Nach den Waschschritten wurden die Partikel erneut in 10 ml Boratpuffer aufgenommen und dann der zu koppelnde Zweitantikörper hinzugegeben (3 mg in 1,6 ml Volumen wie geliefert; vor Zugabe 5 min bei 4°C und 14.000 x g zentrifugiert). Die Antikörper-Partikel-Suspension wurde zunächst schonend per Hand vermischt und dann in einem 15 ml Greinergefäß für 24 h bei RT auf einem Drehinkubator (Fröbel Labortechnik, Deutschland) bei etwa 30 rpm vermischt. Die Umdrehungszahl wurde so gewählt, um einerseits ein Sedimentieren der Partikel zu vermeiden und andererseits ein Denaturieren des Antikörpers (Schaumbildung) umgangen wurde. Nach der 24-stündigen Inkubationszeit wurden die Partikel durch Zentrifugation pelletiert (3 min, 4°C, 1.500 x g) und der Überstand abgenommen. Durch Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand (ungebundener Antikörper) mittels Biorad-Assay und dem Vergleich mit der bekannten Ausgangskonzentration des Antikörpers (Herstellerangabe) konnte die Kopplungseffizienz kalkuliert werden. Sie lag in der Regel bei etwa 70-80% (Herstellerangabe: 40-80%).

Nach Entfernen des Überstandes wurden die Partikel in 10 ml Tris-Puffer schonend resuspendiert und danach wie beschrieben pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes und erneutem Resuspendieren in 10 ml Tris-Puffer wurden die Partikel für 2 h bei RT auf dem Drehinkubator (30 rpm) inkubiert. Die Inkubation mit Tris-Puffer diente der

Absättigung noch freier Tosylreste auf den Partikeln durch die freien Aminogruppen des Tris. Somit wurde eine spätere Bindung von Proteinen im Experiment der Immunsolierung vermieden.

Um die rein physikalische Adsorption von freiem Antikörper an die Partikeloberfläche zu entfernen, wurden die magnetischen Partikel erneut pelletiert (3 min, 4°C, 1.500 g) und in 10 ml PBS/ 0,1% BSA/ 0,1% Tween 20 vereinzelt, gefolgt von einer Inkubation auf dem Drehinkubator (5 min, RT, 30 rpm). Nach Wiederholung des beschriebenen Waschschrittes wurde das Tween 20 durch zweimaliges Waschen der Partikel mit jeweils 10 ml PBS/ 0,1% BSA entfernt. Die Partikel wurden abschließend pelletiert und konnten in 10 ml PBS/ 0,1% BSA/ 0,02% Natriumazid bei 4°C gelagert werden.

Boratpuffer

0,1 M H₃BO₃
pH 9,5
0,2 µm steril filtriert

Tris-Puffer

50 mM Tris
100 mM NaCl
mit HCl auf pH 8,5 einstellen

PBS

2.2.6

PBS/ 0,1% BSA/ 0,02% Natriumazid

PBS/ 0,1% BSA

PBS/ 0,1% BSA/ 0,1% Tween 20

PBS/ 0,1% BSA
Tween hinzugeben und lösen

2.5.6 Immunsolierung mit anti-Rab11 Antikörpern-gekoppelten Dynabeads

50 µl einer Dynabeads-Suspension mit kovalent gekoppeltem anti-Kaninchen Sekundärantikörper wurden in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml PBS/0,5% BSA aufgefüllt. 50 µl Dynabeads-Suspension entsprechen hierbei einem experimentellen Ansatz. Die Partikel wurden zunächst bei 4°C für 2 min mit 1.800 x g pelletiert und nach Abnahme des Überstandes mit 2 ml PBS/0,5% BSA überschichtet. Eine Resuspension der Partikel mit dem Puffer erfolgte auf einem Drehinkubator bei 4°C mit 30 rpm für 2 min. Nach erneutem Pelletieren wie oben beschrieben erfolgte ein erneuter Waschschritt. Der Zyklus wiederholte sich insgesamt dreimal. Nach letzter Zentrifugation wurde das Pellet erneut mit 2 ml PBS/0,5% BSA überschichtet und anti-Rab11-Antikörper in geeigneter Konzentration hinzupipettiert (der Antikörper wurde vorher durch Zentrifugation für 5 min, 4°C mit 14.000 x g von eventuellen Aggregaten befreit). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Drehinkubator (30 rpm). Nach dem Kopplungsschritt wurden die mit Primärantikörper beladenen Dynabeads erneut, wie zuvor beschrieben, viermal mit PBS/0,5% BSA gewaschen. Beim letzten Waschschritt betrug das zugegebene Volumen PBS/0,5% BSA lediglich 1 ml, die Partikel wurden dann

vorsichtig mit einer Pipettenspitze mit weiter Öffnung (blaue Pipettenspitze, am konischen Ende abgeschnitten) resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Abschneiden der Pipettenspitze sollten auftretende Scherkräfte vermieden werden.

Die schockgefrorene, und bei -80°C gelagerte 35%/20%-Interphase wurde auf Eis aufgetaut und dann für 10 min mit $14.000 \times g$ bei 4°C zentrifugiert um eventuell entstandene Membranaggregate zu entfernen. Der Überstand wurde dann in ein 15 ml Greinergefäß überführt und in einem Verhältnis von 1:7 mit PBS/0,1% BSA verdünnt. Das Vermischen erfolgte durch auf- und abpipettieren mit einer 3 ml Einweg-Pasteurpipette. 1,5 ml dieser Suspension wurden zu den pelletierten, und vom Überstand befreit vorliegenden Partikeln (im 1,5 ml Reaktionsgefäß) gegeben.

Resuspension und Inkubation erfolgten bei 4°C für 4 Stunden auf dem Drehinkubator bei 30 rpm. Nach Ende der Inkubation wurden die Partikel in einem MPC-Dauermagneten (Magnetic Particle Concentrator, Dynal) eingesammelt, der sich in einer Eis/ Wasser-Mischung befand, der Überstand wurde entfernt und die immunisolierten Recycling-Endosomen konnten für nachfolgende Experimente (wie den Fusions-Assay) verwendet werden.

2.5.7 Präparation von Rattenlebercytosol

Mit Äther betäubte Ratten wurden dekapitiert und die Leber entnommen. Die Lebern wurden anschließend gründlich mit 5 ml Homogenisierungspuffer pro Gramm gewaschen und in kleinere Stücke geschnitten. Es folgte die Homogenisierung mit Hilfe eines Potter-Elvehjem in 3 ml Homogenisierungspuffer pro Gramm Leber bei 1.000 rpm unter Kühlung. Das Homogenat wurde auf eine sterile Gaze gegeben um Lipide zurückzuhalten und das Filtrat dann für 10 min bei $16.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert um in einem ersten Schritt ungebrochene Zellen und größere Zelldebris zu entfernen. Der so gewonnene Überstand wurde abschließend erneut für 1 h bei 4°C zentrifugiert ($107.000 \times g_{av}$). Nach der Zentrifugation wurde ein eventuell vorkommender Lipidfilm auf dem Überstand vorsichtig abgesaugt, bevor der restliche Überstand (Cytosol) abgenommen, aliquotiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Die Lagerung des Cytosols erfolgte bei -80°C und bis zu 6 Monaten.

Homogenisierungspuffer

250 mM Sucrose

3 mM Imidazole

auf pH 7,4 einstellen

2.5.8 *In vitro*-Rekonstitution des vesikulären Transportes von endosomalem Transferrin zu immunisolierten Recycling-Endosomen

Bei der Rekonstitution dieses Transportesweges wurde als Markerprotein Acridinium-markiertes Transferrin verwendet. Gemessen wurde der Transport dieses Liganden (mit seinem Rezeptor) zu immunisolierten Recycling-Endosomen.

Immunisierte, Rab11-positive Recycling-Endosomen (gefällt mit 50 µl Partikelsuspension pro Versuchspunkt) wurden nach Inkubation mit Endosomen angereichertem Ausgangsmaterial in 2,0 ml Reaktionsgefäßen in einen Dauermagneten gestellt, der sich auf Eis befand. Nach 2 min konnte der Überstand entfernt werden und die Partikel wurden mit 1,5 Fusionspuffer/ 0,1% BSA versetzt und anschließend für 2 min auf einem Drehinkubator bei 4°C langsam inkubiert. Die Suspension wurde dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (mittels abgeschnittene Pipettenspitze) überführt und die Partikel anschließend erneut mit Hilfe des Magneten eingesammelt, und dann mit 150 µl Fusionsmischung überschichtet und vorsichtig vermischt. Die Fusionsmischung, die anschließende Inkubationszeit, sowie die Inkubationstemperatur variierten hierbei je nach Versuchsansatz, die Fusionsmischung bestand jedoch in der Regel aus Fusionspuffer, Rattenlebercytosol, einem ATP-regenerierendem System, sowie den Ac-Tfn-markierten Donorendosomen (siehe 2.5.2)

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die Reaktionsgefäße auf Eis in den Magneten gestellt, der Überstand abgenommen und die Partikel anschließend mit 1,5 ml KCL/ 0,1% BSA Lösung für 2 min auf einem Drehinkubator bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde anschließend in ein neues 2,0 ml Reaktionsgefäß überführt (mit abgeschnittener Pipettenspitze) und die Partikel erneut in dem Magneten eingesammelt. Der letzte Waschschritt erfolgte mit 2,0 ml PBS pro Reaktionsansatz. Die Partikel wurden anschließend wiederum mittels Magneten eingesammelt, der Überstand abgenommen und das Partikelpellet mit 100 µl 0,5% Triton X-100 Lösung (pro Punkt) vermischt, um alle Membranen zu solubilisieren. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert, der Überstand (nach Einsammeln der Partikel mittels Magneten) wurde in einem Luminometer mit Trigger-Lösungen versetzt, die zur chemischen Spaltung des Acridiniummoleküls führten. Die entstehende Chemilumineszenz wurde im Luminometer detektiert.

Fusionsmischung (für einen Reaktionsansatz)

62,5 µl 1x Fusionspuffer
50 µl Rattenlebercytosol [10 mg/ml]
50 µl Donorendosomen (Ac-Tfn)
6 µl ATP regenerierendes System oder
6 µl ATP erschöpfendes System
2 µl 50x Fusionspuffer

50x Fusionspuffer

625 mM Hepes
75 mM Magnesiumacetat
3,75 M Kaliumacetat
mit KOH auf pH 8,25 einstellen
nach Verdünnung mit d_2O auf 1x
Fusionspuffer beträgt der pH 7,3

1x Fusionspuffer

50x Fusionspuffer 1:50 verdünnt mit $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$

ATP-regenerierendes System

0,8 M Kreatinphosphat
Kreatinkinase (4 mg/ml) in 50% Glycerol
0,1 M ATP pH 7,0 (mit NaOH)
jeweils Stammlösungen gelagert bei -20°C
kurz vor Gebrauch 1:1:1 vermischt und bis
zur Zugabe zur Fusionsmischung auf Eis
gelassen

ATP-erschöpfendes System

30 μl Hexokinase (Suspension in
Ammoniumsulfat) werden für 1 min bei
14.000 x g abzentrifugiert; nach Abnahme
des Überstandes in 20 μl einer eiskalten
0,5 M Glucoselösung aufgelöst

KCl/ BSA-Waschlösung

0,3 M KCl in PBS
0,1% BSA

Solubilisierungslösung

0,5% Triton X-100 in PBS

PBS

2.2.6

2.5.9 Kopplung von His₆-Rab11 an CnBr-Sepharose-Partikel

1 g CnBr-aktivierte Sepharose wurden in 50 ml HCl-Lösung für etwa 20 min bei RT inkubiert und anschließend durch einen an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Porzellanfilter intensiv mit HCl-Lösung (etwa 500 ml) gewaschen. Nach Überführung der Sepharose-Partikel in 15 ml-Reaktionsgefäße und anschließender Zentrifugation bei 1.000 x g für 1 min wurden die Partikel zweimal mit Kopplungspuffer gewaschen (Resuspension der Partikel gefolgt von Zentrifugation bei 1.000 x g für 1 min). 10 ml Partikel wurden dann mit 30 mg rekombinantem Rab11 (His₆-Rab11) in 50 ml Kopplungspuffer für 2 h bei RT, und dann über Nacht bei 4°C auf einem Drehinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Suspension abzentrifugiert (2 min, 1.000 x g), und durch die Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand konnte so die Kopplungseffizienz ermittelt werden (in der Regel etwa 70%). Die Suspension wurde dreimal mit Kopplungspuffer (jeweils 15 ml) gewaschen. Um noch freie Bindungsstellen der CnBr-Sepharose abzusättigen, wurden die Partikel 2 h bei RT mit Blockierungspuffer inkubiert. Abschließend wurden die Partikel alternierend mit Kopplungs- bzw. Acetat-Puffer gewaschen (jeweils 15 ml). Dieser Waschschrift wiederholte sich insgesamt dreimal, wobei das Waschen der Partikel mit Kopplungspuffer abgeschlossen wurde. Die Partikel wurden abschließend in 15 ml PBS resuspendiert und bei 4°C gelagert.

Kopplungspuffer

0,2 M NaHCO_3
0,5 M NaCl
pH 8,5

Acetatpuffer

0,1 M Na-Acetat x3 H_2O / HCl
0,5 M NaCl
pH 4,0

HCl-Lösung
1 mM HCl-Lösung
pH 3

Blockierungspuffer
0,2 M Glycin
pH 8,5

PBS
siehe 2.2.6

2.5.10 Affinitätschromatographische Aufreinigung Rab11-interagierender Proteine

2 ml Sepharose-Suspension mit gekoppeltem His₆-Rab11 wurde in 15 ml Reaktionsgefäße überführt und einmal mit 15 ml 1xFusionspuffer gewaschen. Nach Zentrifugation der Partikel (2 min, 1.000 x g) wurden die Partikel in 15 ml Rattenlebercytosol (1:1 mit 2x Fusionspuffer verdünnt) resuspendiert. Die Proteinkonzentration des Cytosols betrug nach Verdünnung dabei etwa 7,5 mg/ml. Die Partikel wurden auf einem Über-Kopf-Schüttler auf niedrigster Geschwindigkeits-Stufe bei 4°C für 1 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte zunächst ein zweimaliges Waschen (durch Zentrifugation für 2 min bei 1.000 x g und anschließender Resuspension) mit 1x Fusionspuffer gefolgt von zweimaligem Waschen mit einem Waschpuffer hoher Salzkonzentration. Die Elution gebundener Proteine erfolgte durch Inkubation der Partikel mit 2 ml Elutionspuffer auf einem Über-Kopf-Schüttler (niedrigste Stufe) für 20 min bei RT. Stark mit Rab11-interagierende Proteine, und daher nicht mit Elutionspuffer zu eluierende Proteine, wurden durch Inkubation der Partikel in 1 ml 2x SDS-Probenpuffer und anschließendem Erhitzen (95°C, 5 min) von den Partikeln entfernt.

Die in Elutionspuffer vorliegenden Proteine wurden nach TCA-Präzipitation ebenfalls in SDS-Probenpuffer aufgenommen, oder nach Dialyse gegen 4x 1 Liter 1x Fusionspuffer (MWCO: 10.000 Da) in dem *in vitro*-Fusionsassay eingesetzt.

Die in SDS-Probenpuffer aufgenommenen Fraktionen konnten anschließend in einem SDS-PAGE aufgetrennt, und die Proteine in einer Silberfärbung visualisiert werden.

50x Fusionspuffer
siehe 2.5.8

1x Fusionspuffer
50x Fusionspuffer 1:50 verdünnt mit _{dd}H₂O
1 mM DTT

2x Fusionspuffer
50x Fusionspuffer 1:25 verdünnt mit _{dd}H₂O
2 mM DTT

2x SDS-Probenpuffer
siehe 2.2.1

Waschpuffer (hohe Salzkonzentration)
1x Fusionspuffer
1 mM DTT
250 mM NaCl

Elutionspuffer
1x Fusionspuffer
1 mM DTT
3 M NaCl

2.6 Gewinnung konditionierter Medien mit sekretierten Cav-1 Partikeln

2.6.1 Präparation von Cav-1 c-DNA mit Qiagen Kit (Maxiprep)

1 µl Cav-1 c-DNA (0,415 µg/µl) mit 6x Histidin-tag am N-Terminus in einem pcDNA 3.1-Vektor wurden mit 50 µl *Escherichia coli*-Suspension (Stamm DH5α) vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Aufnahme von DNA in die Zellen wurde durch Hitzeschock (bei 43°C für 90 sec) durchgeführt, und die Zellen wurden anschließend in 1 ml LB-Medium resuspendiert. 100 µl dieser Suspension wurden auf eine Agarplatte (100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert (Einzelklonbildung). Am folgenden Tag wurde eine einzelne Kolonie mit einer sterilen Inkubationsnadel aufgepickt und in 2 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) für 8 Stunden bei 37°C unter Schütteln (300 rpm) inkubiert. Von dieser Starterkultur wurden 500 µl zu 250 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) gegeben und über-Nacht bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Die Zellen konnten am nächsten Tag durch Zentrifugation bei 6.000 x g für 15 Minuten bei 4°C eingesammelt werden und das Zellpellet wurde in 10 ml P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 und 4-6 maligem Invertieren wurde das Gemisch bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert und dann 10 ml eiskalter P3-Puffer hinzugegeben und sofort vermischt. Das entstandene Lysat wurde dann in eine Spritzenhülse mit Filter und geschlossener Spitze in einem 50 ml Reaktionsgefäß überführt und so bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Die Spitze der Hülse wurde dann entfernt und das Lysat mit Hilfe eines Spritzenkolbens durch den Filter gepresst, das Filtrat konnte anschließend in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgefangen werden. Zu dem gefilterten Lysat wurden 2,5 ml Puffer P3 hinzugegeben, das Gemisch 10 mal invertiert und dann für 30 min auf Eis inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend in eine Qiagen tip 500 Säule überführt, welche zuvor mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert wurde. Nach dem der Durchfluss eingesammelt wurde und ein Waschen der Säule mit 2x 30 ml QC-Puffer erfolgte, konnte die DNA mit 15 ml QN-Puffer eluiert und in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgefangen werden. Die DNA wurde durch Zugabe und Vermischen mit 10,5 ml Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation bei 15.000 x g für 30 min präzipitiert. Das Pellet (DNA) wurde zweimal mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen (mit anschließender Zentrifugation bei 15.000 x g für 10 min), und sodann überschüssiger Ethanol durch Verdunstung entfernt. Das getrocknete Pellet wurde in 1 ml TE-Puffer vorsichtig resuspendiert (um ein Zerstören der DNA durch Scherkräfte zu vermeiden) und abschließend seine Konzentration in einem Photometer bei 260 nm bestimmt. Die DNA konnte nun direkt verwendet oder bei -20°C für bis zu 3 Monaten gelagert werden.

LB-Medium

10 g Trypton
5 g Hefe Extrakt
10 g NaCl
in 800 ml $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$
mit 1 N NaOH auf pH 7,0 einstellen
auf 1 Liter mit $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$ auffüllen
Sterilisation durch Autoklavieren

Puffer P2

200 mM NaOH
1% SDS (w/v)

Ampicilin Stammlösung

100 mg/ml in $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$
steril filtrieren

QC Puffer

1 M NaCl
50 mM MOPS pH 7,0
15% Isopropanol (v/v)

TE-Puffer

10 mM Tris-Cl pH 8,0
1 mM EDTA

Puffer P1

50 mM Tris-Cl pH 8,0
10 mM EDTA
100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A

Puffer P3

3 M Kaliumacetat
pH 5,5

Puffer QBT

750 mM NaCl
50 mM MOPS pH 7,0
15% Isopropanol (v/v)
0,15% Triton X-100 (v/v)

QN Puffer

1,6 M NaCl
50 mM MOPS pH 7,0
15% Isopropanol (v/v)

LB-Agar

LB-Medium
15 g/l bacto Agar
autoklavieren

2.6.2 Transiente Transfection von LNCaP-Zellen mit Cav-1 c-DNA

Da LNCaP-Zellen, wie viele andere Tumorzellen auch, keine detektierbare Menge von Caveolin synthetisieren, bietet eine transiente Transfektion dieser Zellen mit Cav-1 c-DNA die Möglichkeit ektopisch exprimiertes Caveolin-1 sekretieren zu lassen.

Bei der transienten Transfektion mit Reagenzien der Firma Invitrogen von 10 Zellkulturflaschen (75 cm^2 Fläche) mit LNCaP-Zellen von etwa 80%iger Konfluenz wurden 480 μl Cav-1 c-DNA (0,415 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) mit 600 μl Plus-Reagenz in 10 ml RPMI 1640 Medium (serumfrei) nach Vermischen für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde dieser erste Ansatz mit 750 μl Lipofecatmine in 10 ml RPMI 1640 Medium (serumfrei) gründlich suspendiert und es folgte eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min. Die Suspension der beiden Ansätze wurde anschließend in 80 ml RPMI 1640 Medium (serumfrei) gründlich vermischt. Den Zellen wurde das bisherige Medium abgenommen und gegen 10 ml Suspension pro Flasche ausgetauscht. Es folgte eine dreistündige Inkubation im CO_2 -Brutschrank; nach Ablauf dieser Zeit wurden zu diesem Inkubationsansatz 10 ml RPMI 1640 (10% FKS) hinzugegeben und die Zellen so über Nacht im Zellkulturschrank inkubiert. Die Effizienz der Transfektion (durchschnittlich bei etwa 60-70%) konnte durch parallele Transfektion der Zellen mit β -

Galactosidase c-DNA und entsprechender Zugabe von Substrat (X-Gal) überprüft werden. Transfizierte Zellen setzten das Substrat um und die Zellen nehmen eine blaue Färbung an. Die Transfektionseffizienz konnte so durch Vergleich von gefärbten mit ungefärbten Zellen (nicht transfizierte Zellen) ermittelt werden.

RPMI1640-Medium
siehe 2.4.1

2.6.3 Herstellung konditionierter Medien

Transfizierte LNCaP-Zellen wurden nach der über Nacht-Inkubation mit RPMI1640 und 10% FKS (siehe 2.6.2) pro 75 cm²-Zellkulturflasche jeweils 3 mal mit jeweils 20 ml RPMI1640 (serumfrei) gewaschen. Anschließend folgte eine Inkubation der Zellen mit serumfreiem Medium für 24 Stunden. Die konditionierten Medien wurden am nächsten Tag von den Kulturflaschen abgesaugt und anschließend bei 220.000 x g_{av} für 1 Stunde bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig, ohne ein Resuspendieren des Pellets, abgenommen und in ein Greinergefäß überführt. Das zentrifugierte, konditionierte Medium wurde für weitere Analysen prozessiert, oder aber für bis zu 1 Woche bei 4°C aufbewahrt.

RPMI1640 serumfrei
siehe 2.4.1

2.6.4 Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)

Bei der chromatographischen Auftrennung von Proteingemischen wurde das System von Amersham/ Pharmacia mit der Säule „Superose 6“ mit angeschlossenem Computersystem und Fraktionssammler verwendet. Die Säule wurde vor Gebrauch mit zweifachem Säulenvolumen Elutionspuffer equilibriert. Vor Probenzugabe wurden sowohl die Säulenpumpen, als auch die Zugaberöhrchen („loops“) mit ddH₂O gewaschen. Damit eventuelle Präzipitate nicht zu einer Verklumpung in der Säule führen, wurde die Probe vor Zugabe durch Filtration (0,2 µm-Sterilfilter) von diesen Präzipitaten befreit. Danach wurden 0,5 ml Proteingemisch auf die Säule gegeben und mit Elutionspuffer eluiert. Die Flussrate des Solvens betrug hierbei konstant 0,4 ml/ min und es wurden in der Regel 26 Fraktionen mit jeweils 1 ml Volumen gesammelt. Das chromatographische Verteilungsspektrum wurde dokumentiert und die Fraktionen wurden nach TCA-Präzipitation und SDS-PAGE im Western-Blot analysiert.

Da die Bestimmung des Molekulargewichtes der eluierten Proteine rein rechnerisch nicht erfolgen konnte, musste die verwendete Säule kalibriert werden. Dazu wurden Proteine mit bekanntem Molekulargewicht auf die Säule aufgetragen und das Maximum der Proteinkonzentration während der Elution einer Fraktion zugeordnet. Zur Kalibrierung der Säulen wurden daher Proteine definierter Molekulargewichte (Thryoglobulin, Molekulargewicht 660.000 Da und Katalase, Molekulargewicht 230.000 Da) verwendet. Zur Bestimmung des Säulenausschlussvolumens V_0 wurde Dextran Blau (Molekulargewicht > 2.000.000 Da) auf die Säule gegeben.

Elutionspuffer

20 mM Hepes

100 mM KCL

2 mM KCL

pH 7,4 mit KOH einstellen

2.6.5 Cäsiumchlorid-Dichtezentrifugation

Eine Auftrennung sekretierter Partikel nach der Dichte wurde mit Hilfe einer diskontinuierlichen Cäsiumchlorid (CsCl)-Dichtezentrifugation durchgeführt. Hierbei wurden 2 ml CsCl (1,35 g/ml, die Angaben beziehen sich auf die Dichte) mit 9 ml CsCl (1,21 g/ml) und 7 ml CsCl (1,063 g/ml) vorsichtig mit Hilfe eines Fraktionsammlers oder mit einer Pasteurpipette in einem Zentrifugenröhrchen überschichtet. Abschließend wurde der Gradient in gleicher Weise mit 7 ml der Probenlösung überschichtet. Der Gradient wurde für 21 bis 24 h bei $220.000 \times g_{av}$ zentrifugiert.

Nach Zentrifugation wurden 1,7 ml, bzw. 500 μ l Fraktionen des Gradienten von oben eingesammelt. Die Fraktionen wurden in der Regel nach TCA-Präzipitation und SDS-PAGE im Western-Blot analysiert.

Cäsiumchlorid (1,35 g/ml)

48 g CsCl

in 87 ml $_{dd}$ H₂O lösen

bei 4°C aufbewahren

Cäsiumchlorid (1,21 g/ml)

29 g CsCl

in 92,7 ml $_{dd}$ H₂O lösen

bei 4°C aufbewahren

Cäsiumchlorid (1,063 g/ml)

8,3 g CsCl

in 98 ml $_{dd}$ H₂O lösen

bei 4°C aufbewahren

2.6.6 Optiprep-Dichtezentrifugation

Als ergänzende Dichtezentrifugation wurde eine Auftrennung mittels einer sterilen Iodixanol, 5,5'-[(2-hydroxy-1-3 propanediyl)-bis(acetylamino)]bis[N,N']-

bis(2,3dihydroxypropyl-2,4,5-triiodo-1,3-benzenecarboxamide]-Lösung (Optiprep-Lösung der Firma Nycomed) durchgeführt. Hierbei wurde aus der 60%igen Stammlösung nach Verdünnung mit Hepes-Puffer ein 40-5% Stufengradient hergestellt, der abschließend mit der Proteinlösung überschichtet wurde. Auch dieser Gradient wurde 21-24 h bei 200.000 x g_{av} zentrifugiert, und es wurden 1,7 ml, bzw. 500 μ l Fraktionen von oben eingesammelt. Die Fraktionen wurden in der Regel nach TCA-Präzipitation und SDS-PAGE im Western-Blot analysiert.

Optiprep Stammlösung (60%)
Iodixanol, 5,5'-[(2-hydroxy-1-3
propanediyl)-bis(acetylamino)]bis[N,N'-
bis(2,3dihydroxypropyl-2,4,5-triiodo-1,3-
benzenecarboxamide]-Lösung

Hepes-Puffer (Verdünnungslösung)
20 mM Hepes
100 mM KCL
2 mM KCL
pH 7,4 mit KOH einstellen

2.6.7 Aufreinigung von Cav-1-Partikeln aus konditioniertem Medium durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Nach transienter Transfektion von LNCaP-Zellen mit His₆-Cav-1 c-DNA wurden die Zellen pro Flasche (75 cm² Fläche) mit 2x 30 ml RPMI1640-Medium (serumfrei) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit 15 ml RPMI1640-Medium (serumfrei) pro Flasche für 24 h im Zellinkubator inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und für 1 h bei 4°C und 200.000 x g_{av} abzentrifugiert. Der so gewonnene Überstand konditionierter Medien (in der Regel 45 ml) wurde mit 2 ml Ni-NTA Agarose (das Volumen bezieht sich auf das reine Partikelvolumen) für 1,5 h auf einem Drehinkubator bei 4°C inkubiert. Die Agarose-Partikel wurden vor Gebrauch durch Waschen mit 3x 15 ml PBS und anschließender Zentrifugation (2 min, 800 x g) von ihrem Lagerungspuffer (80% Ethanol-Lösung) befreit. Die Suspension wurde nach der Inkubationszeit schrittweise auf eine Biorad-Chromatographiesäule gegeben und der Durchfluss eingesammelt. Die Partikel wurden in der Säule durch Zugabe des vierfachen Matrixvolumens PBS/ 0,5 M NaCl, sowie durch Waschen mit PBS/ 10 mM Imidazol (dreifaches Bettvolumen) von unspezifisch gebundenen Proteinen befreit. Die Elution erfolgte durch Zugabe von jeweils einem Bettvolumen PBS/ 150 mM Imidazol gefolgt von PBS/ 250 mM Imidazol, das Eluat konnte nach Vereinigung der beiden Elutionsfraktionen sofort weiterverwendet werden, oder durch TCA-Präzipitation für Western-Blot Analysen prozessiert werden.

PBS
2.2.6

NaCl-Waschpuffer
PBS/ 0,5 M NaCl

Imidazol-Waschpuffer
PBS/ 10 mM Imidazol

Elutionspuffer
PBS/ 150, bzw. 250 mM Imidazol

3 Ergebnisse

3.1 Detektion verschiedener Endosomenpopulationen

Bei den nachfolgend beschriebenen Experimenten, die einer Isolierung von Recycling-Endosomen bedurften, diente Rab11 als endogener Marker. Rab11 wurde durch die Arbeiten von Ullrich et al. (1993) als ein, neben dem im Komplex mit GDI cytosolisch vorliegendem Protein, sehr spezifisch auf Recycling-Endosomen lokalisiertes Protein definiert. Bei der Rekonstitution endocytotischer Transportschritte wurde neben dem endogenen Rab11 noch ein weiterer, exogener Marker zur Markierung von Endosomen verwendet. Hierbei handelte es sich um Transferrin, an das ein Acridinium-NHS-Ester gekoppelt wurde. Acridinium-C₂-NHS-Ester ist ein Chemilumineszenz-Detektionssystem, der Ester wird hierbei kovalent an Aminogruppen des Transferrins gebunden. Die Definitionen von endogen und exogen beziehen sich hierbei auf den Unterschied, dass es sich bei Rab11 um einen Kompartiment- bzw. Zell-eigenen Marker handelte, während das Transferrin einer experimentell bedingten, kovalenten Kopplung des Markers Acridinium unterzogen wurde. Zusätzlich wurde endogenes, nicht mit einem Marker versehenes Transferrin durch eine Erschöpfung mit Transferrin-freiem Medium für 1 Stunde von den Zellen, bzw. in den intrazellulären Kompartimenten durch Recycling verarmt. Die nun von Transferrin erschöpften Zellen konnten durch die Zugabe von Ac-Transferrin „neu“ beladen werden. Das Ac-Tfn wurde vor der Zugabe in einem speziellen, eisenhaltigen Puffer mit Fe³⁺ beladen, um so sicherzustellen, dass Ac-Tfn auch von den Rezeptoren aufgenommen wurde. Durch eine Inkubation mit Ac-Tfn für 30 min bei 37°C gelangte das Markerprotein durch Endocytose in die Frühen-Endosomen, sowie in die Recycling-Endosomen, es wurde somit der gesamte Rezeptor-Recycling-Weg markiert. Im Gegensatz zu Rab11 bezog sich die endosomen-spezifische Markierung im Falle des Transferrins daher auf den gesamten Transferrin-Recycling-Weg. Die Detektion des Recycling-Kompartimentes durch Rab11 allein zu definieren war allerdings nicht möglich, da Rab11 (wie alle anderen Rab-Proteine auch) zwischen der cytosolischen, bzw. membrangebundenen Form wechselt. Um eine Detektion des membrangebundenen Rab11, und somit zu einer Detektion des Recycling-Endosoms zu gewährleisten, musste daher eine Trennung dieser beiden Rab11-Populationen durchgeführt werden.

3.2 Anreicherung von Endosomen durch Sucrosedichtezentrifugation aus PNS

Bei der Anreicherung der subzellulären Strukturen sowie Abtrennung cytosolischer Proteine wurde eine Trennung nach der Dichte angewandt, ein etabliertes Verfahren

(Evans, 1992), das eine relativ einfache und rasche Separation erlaubt. Zudem können durch die geeignete Wahl des Trennungsmediums, das bei der Zentrifugation verwendet wird, die zu reinigenden Organellen geschont angereichert werden. Dies ermöglicht zum Einen den Erhalt dieser Organellen für nachfolgende Analysen, und zum Anderen einen Erhalt der biologischen Aktivität der gereinigten Proben.

Bei der hier verwendeten isopyknische Zentrifugation (Sedimentations-Gleichgewichtszentrifugation) wird je nach experimentellem Ansatz die Probe am Boden des Zentrifugenröhrchens mit dem Gradientenmedium unterlegt, oder aber die Probe wird den bereits vorgelegten Lösungen überschichtet. Der Gradient deckt dabei einen Dichtebereich ab, der sowohl größer, als auch kleiner der vermuteten Dichte der Probe ist. Entsprechend der Eigendichte des aufzureinigenden Materials und der Ausgangsposition der Probe, steigen weniger dichte Komponenten auf, während Probenbestandteile höherer Dichte sedimentieren. Die Sedimentation, bzw. das Aufsteigen des Probenmaterials hört zu dem Zeitpunkt auf, bis es in einen Dichtebereich gelangt, der der apparenten Eigendichte entspricht, die Proben verbleiben dort. Dieses Verhalten lässt sich gemäß der Svedberg-Gleichung ableiten:

$$V = [d^2(\rho_p - \rho_m)g] / 18\eta$$

V: Geschwindigkeit des Teilchens
d: Durchmesser des Teilchens
 ρ_p : Dichte des Teilchens
 ρ_m : Dichte des Mediums
g: Relative Zentrifugalbeschleunigung
 η : Viskosität des Mediums

Erreichen laut obiger Formel die Dichte des Mediums, sowie die Teilchendichte den gleichen Wert, so wird die Geschwindigkeit des Teilchens Null, die Probe verbleibt an der momentanen Position im Gradienten und es findet keine weitere Wanderung mehr statt.

Dichtegradienten dieser Art können auf zweierlei Weise aufgebaut sein:

a) ein kontinuierlicher Gradient

Bei einem kontinuierlichen Gradienten wird das Trennmedium in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben, wobei sich das Medium der höchsten Dichte am Boden der Röhrchen befindet. Es folgt eine weitere Auffüllung des Röhrchens mit Medium geringerer Dichte, wobei die Dichteabstufung fließend ist.

b) ein diskontinuierlicher Gradient

Bei einem diskontinuierlichen Gradienten wird ebenfalls das Medium höherer Dichte am Boden des Zentrifugenröhrchens eingefüllt. Jedoch erfolgt die weitere Abstufung nicht

fließend, vielmehr werden definierte Volumina der Medien jeweiliger Dichte nacheinander überschichtet, so dass sich Stufen verschiedener Dichte mit jeweiligen Grenzphasen an den jeweiligen Dichtesprüngen im Zentrifugenröhrchen ergeben.

Da es sich bei den Dichtezentrifugationen um einen ersten Aufreinigungsschritt vor den Immunsolierungen handelte, war ein diskontinuierlicher Gradient, der nicht so fein in der Dichtentrennung wie ein kontinuierlicher Gradient ist, ausreichend. Das Ziel der Aufreinigung war eine Trennung von Endosomen von cytosolischen Proteinen, da bei den nachfolgenden Immunoadsorptionen von Recycling-Endosomen mit Hilfe von anti-Rab11 Antikörpern eine Fällung von cytosolischem Rab11 unerwünscht war.

3.3 Verteilung von Endosomenpopulationen in Sucrosegradienten

In Experimenten zum Vergleich verschiedener Endosomenpopulationen konnten Trischler et al. (1999) zeigen, dass sich Rab5-positive Frühe-Endosomen, sowie Rab11-positive Recycling-Endosomen hinsichtlich ihrer Dichte sehr ähnlich sind. Aus post-nukleärem Überstand (PNS) aufgebrochener CHO-Zellen, welcher auf einen Sucrosedichtegradienten geladen wurde kam es zu einer überlappenden Verteilung in diesen Zentrifugationen. Nachfolgende Western-Blot-Analysen ergaben eine Anreicherung von Faktor 9,6 von Rab5 in Sucrosegradienten gegenüber dem PNS. Bei der Analyse des Rab11 lag dieser Wert mit Faktor 16,6 sogar noch höher (Trischler, 2000). Auch internalisiertes Transferrin konnte überlappend mit den Rab11-, bzw. Rab5-haltigen Fraktionen detektiert werden. Das endosomenangereicherte Material befand sich hierbei in der 35%/20%-Interphase. In diesen Arbeiten konnte auch gezeigt werden, dass in die Endosomen internalisierte Enzyme auch nach Sucrosedichtezentrifugation aktiv blieben, somit war auch von einer erhaltenen biologischen Aktivität der angereicherten Endosomen auszugehen. Basierend auf diesen Arbeiten konnte von einer effizienten Anreicherung von Recycling-Endosomen mit biologisch intakten Organellen ausgegangen werden.

3.4 Isolierung von Recycling-Endosomen durch Dichtezentrifugation und Immunsolierung

Da mit Sucrosedichtezentrifugationen zwar eine Trennung von cytosolischen und membrangebundenen Rab-Proteinen möglich war, eine definierte Trennung des Rab11-positiven Recycling-Kompartimentes von anderen Endosomenpopulationen (wie Frühe-Endosomen) mit dieser Methodik jedoch nicht erzielt werden konnte, wurde ein weiterer Isolierungsschritt in Form einer Immunsolierung vorgenommen. Bei dieser sequentiellen

Aufreinigung wurden zuerst CHO-Zellen durch Scherkräfte aufgebrochen und ein Abzentrifugieren der Kerne vorgenommen. Die Gewinnung dieses PNS, war ein kritischer Schritt, denn beim Aufbrechen der Zellen musste darauf geachtet werden, dass zwar die Zellmembran so aufgebrochen wurde, dass das Cytosol, sowie die Organellen von der Plasmamembran befreit wurden, es durfte jedoch nicht zu einem Aufbrechen der Kerne kommen, da freigewordene DNA mit Vesikeln interagiert hätte, und so die Dichte dieser Organellen beeinflusst hätte. Bei nachfolgenden Dichtezentrifugationen wären so überlappende Verteilungen entstanden, die eine weitere Aufreinigung, bzw. die Definition des endosomenangereicherten Ausgangsmaterials unmöglich gemacht hätten. Abb.4 zeigt CHO-Zellen, die aufgebrochen wurden, die Kerne liegen hierbei unzerstört vor. Die Brechungseffizienz lag in der Regel aufgrund der schonenden Handhabung bei 60%.

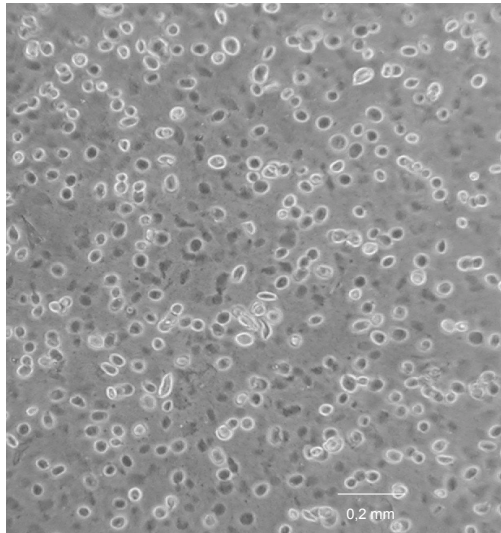


Abb. 4: Lichtmikroskopische Aufnahme gebrochener und ungebrochener CHO-Zellen.

CHO-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mittels Zellschaber von den Zellkulturschalen mechanisch gelöst. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert und in Homogenisierungspuffer resuspendiert. Die Suspension wurde mehrfach durch eine Spritze mit aufgesetzter Kanüle gezogen um die Zellen zu brechen. Zur Kontrolle der Brechungseffizienz (hier: etwa 60%) und zur Überprüfung der intakten Zellkerne wurden kleine Proben lichtmikroskopisch untersucht. In der Abbildung sind intakte Zellen als helle Strukturen zu erkennen, während Zellkerne dunkel erscheinen.

Um eine effiziente und spezifische Immunisolierung zu ermöglichen, wurden Endosomen in einer vorangehenden Zentrifugation von PNS in einem Sucroседichtegradienten angereichert. Der diskontinuierliche Gradient bestand hierbei aus vier Stufen unterschiedlicher Sucrosekonzentration (vom Boden beginnend):

40,6%, 35%, 20% und 8% (Homogenisierungspuffer).

Diese Präparation wurde seit seiner Entwicklung (Gorvel et al., 1991) in zahlreichen Arbeiten zur Gewinnung Früher-Endosomen entwickelt, die sich in der 35/20%-Interphase

anreichern. Spätere Arbeiten zeigten (Trischler et al., 1999), dass sich auch Recycling-Endosomen hier anreichern. Cytosolische Proteine sedimentieren bei dieser Methode aufgrund ihrer höheren Dichte in den 40,6%- und 35%-Sucrosekonzentrationsbereich. Ebenfalls in diesen Bereichen ist die Plasmamembran zu finden (Gorvel et al., 1991; Escola et al., 1995). Wurden die Zellen mit dem Marker Ac-Tfn inkubiert, so diente die endosomenangereicherte 35/20%-Interphase als Donorfraktion. Wurde Ausgangsmaterial für die Immunisolierungen benötigt, so wurde keine Ac-Tfn-Internalisierung vorgenommen. Die 35/20%-Interphase war optisch recht leicht zu identifizieren (Abb. 5), und konnte mittels eines Fraktionssammlers abgenommen werden. Die Fraktionen wurden anschließend unmittelbar verwendet, oder aber durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließender Lagerung bei -80°C für spätere Experimente aufgehoben.

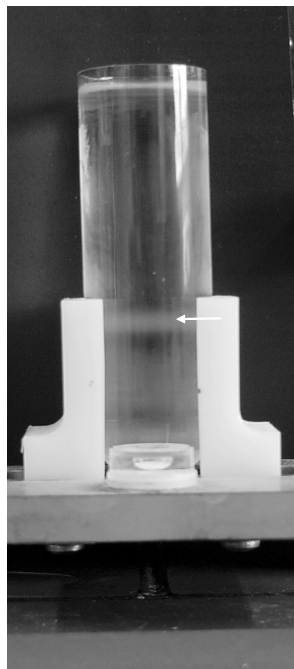


Abb. 5: Sucrosedichtegradient mit 35/20%-Interphase.

Postnukleärer Überstand gebrochener CHO-Zellen wurde in einem Sucrosedichtegradienten auf Endosomen hin angereichert. PNS wurde mit 62% Sucrose auf 40,6% eingestellt und anschließend mit 35%, 20% und 8% Sucrose überschichtet. Nach Zentrifugation für 3 h bei 4°C mit $108.000 \times g$ wurde die 35/20%-Interphase, das endosomenangereicherte Ausgangsmaterial, ingesammelt. Hier zu erkennen als weiße Bande (Pfeil).

Das Ausgangsmaterial für die Immunisolierungen, d.h. die 35/20%-Interphase wurde mit magnetischen Partikeln (Dynabeads) inkubiert, an die über einen kovalent gekoppelten Sekundärantikörper der für Immunisolierung von Recycling-Endosomen spezifische Rab11-Antikörper gebunden war. Abb. 6 zeigt den Ansatz der Immunisolierung von Recycling-Endosomen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Immunisolierungen von

Recycling-Endosomen unterschieden sich von den beschriebenen Experimenten in der Verwendung verschiedener anti-Rab11-Antikörper. Der hier verwendete Antikörper (Bartz, 1999) wurde aber vor den Experimenten mit dem anti-Rab11-Antikörper aus den Experimenten von Trischler et al (1999) verglichen. Beide anti-Rab11-Antikörperpopulationen fällten hierbei die gleichen Organellen, und auch die Effizienz der Fällung war entsprechend der eingesetzten Antikörperkonzentration vergleichbar.

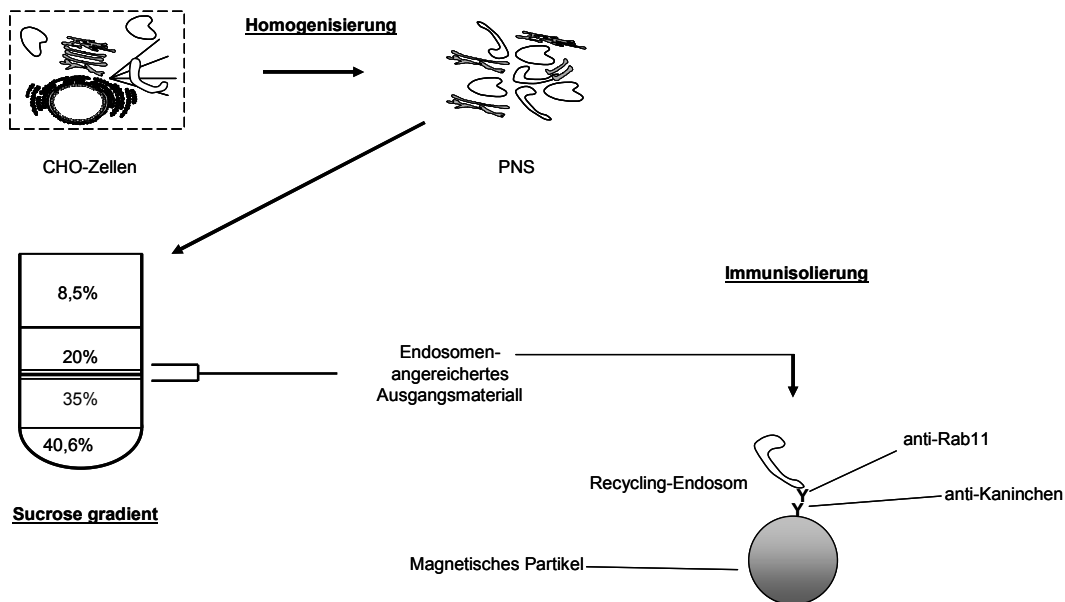


Abb. 6: Prinzip der Immunisolierung.

CHO-Zellen wurden homogenisiert und der entstandene PNS wurde in einem Sucrosegradienten zentrifugiert. Die Endosomen aus der 35%/20%-Interphase dienten nachfolgend als Ausgangsmaterial für die Immunisolierungen. Für die Immunisolierung von Recycling-Endosomen wurden Magnetische Partikel (Dynabeads) verwendet, die mit anti-Rab11 Antikörper beschichtet waren. Die Isolierung der Recycling-Endosomen erfolgte bei 4°C für 4 Stunden auf einem Drehinkubator.

3.5 Rekonstitution des intrazellulären Transportes zu Recycling-Endosomen durch ein in vitro-System

Die Untersuchung von vesikulärem Transport zwischen Kompartimenten auf der Ebene von intakten Zellen bzw. Zellverbänden ist oft schwierig, da neben dem zu interessierenden Transportschritt noch zahlreiche andere Prozesse ablaufen, die mit dem zu untersuchenden Transportschritt auf vielfache Weise interferieren können. In Zellverbänden können zusätzliche Zell-Zell-Signale auf die mannigfaltigen Transportwege einwirken und auch so die zu untersuchenden Prozesse beeinflussen. Durch die Komplexität dieser Ereignisse ist eine experimenteller Einfluss auf diese Wechselwirkungen oftmals beschränkt, so dass die erzielten Untersuchungsdaten oft eine mangelnde Reproduzierbarkeit aufweisen, da der Reaktionsansatz insgesamt schwer zu

reproduzieren ist. Aus diesem Grunde dienen *in vitro*-Rekonstitutionen bestimmter zellulärer Ereignisse als Ergänzung, oftmals auch als Voraussetzung zu *in vivo*-Daten. Die Rekonstitution vesikulären Transportes *in vitro* bietet den Vorteil einer Untersuchung bestimmter, streng definierter Transportschritte unter leicht reproduzierbaren äußeren Parametern. Neben der Untersuchung eines bestimmten Transportschrittes aus dem Kontext anderer Transportschritte heraus lassen diese Systeme zudem den Einsatz von Drogen und anderen Chemikalien zu, die diesen Ereignisse manipulieren können. Dies könne inhibierende, aber auch stimulierende Substanzen sein, aber auch äußere Einflüsse wie Temperatur oder die Dauer bestimmter Fusionsereignisse können so recht einfach untersucht werden.

In den nachfolgend beschriebenen Experimente wurde versucht den vesikulären Transport von Endosomen des Transferrin-Rezeptor-Weges zu immunisolierten Recycling-Endosomen zu rekonstituieren. Es handelte sich hierbei wahrscheinlich um die homotypische Fusion von Recycling-Endosomen untereinander, oder die heterotypische Fusion von Frühen-Endosomen zu Recycling-Endosomen. Die *in vitro*-Assays bestanden aus einer Akzeptorfraktion, nämlich immunisolierten Recycling-Endosomen (durch die Verwendung von anti-Rab11 Antikörpern definiert), sowie einer Donorfraktion. Bei dieser Donorfraktion handelte es sich um Endosomen des TfR-Recycling-Weges, d.h. um Endosomen aus der 35%/20%-Interphase des bereits erwähnten Sucrosegradienten. Diese Endosomen waren durch die vorherige, 30-minütige Inkubation der CHO-Zellen mit Ac-Tfn markiert worden. Die immunadorbierte Akzeptorfraktion, sowie die Donorfraktion wurden in der Regel mit Rattenlebercytosol und einem ATP-regenerierendem System in einer iso-osmotischen Hepes-Lösung mit neutralem pH-Wert bei 37°C inkubiert. Aufgrund der Bindung an die Dynabeads konnte die Akzeptorfraktion mittels eines Magneten aus der Lösung entfernt und mehrmals gewaschen werden. Um eine Unterscheidung zwischen Fusion und lediglichem Anheften der Membranen (Docking) treffen zu können, wurden zudem Waschschrte mit hoher Stringenz (hohe Salzkonzentration) durchgeführt. Die partikelgebundenen Membranen konnten nach der Fusionsreaktion solubilisiert werden. Der Transfer von Ac-Tfn von der Donorfraktion zum Akzeptor durch vesikulären Transport konnte durch Spaltung des Acridiniums mittels Triggerlösungen in einem Luminometer detektiert werden, da die Spaltung zu einer Lichtemission bei 430 nm führt. Abb. 7 zeigt die schematische Übersicht des Vorganges.

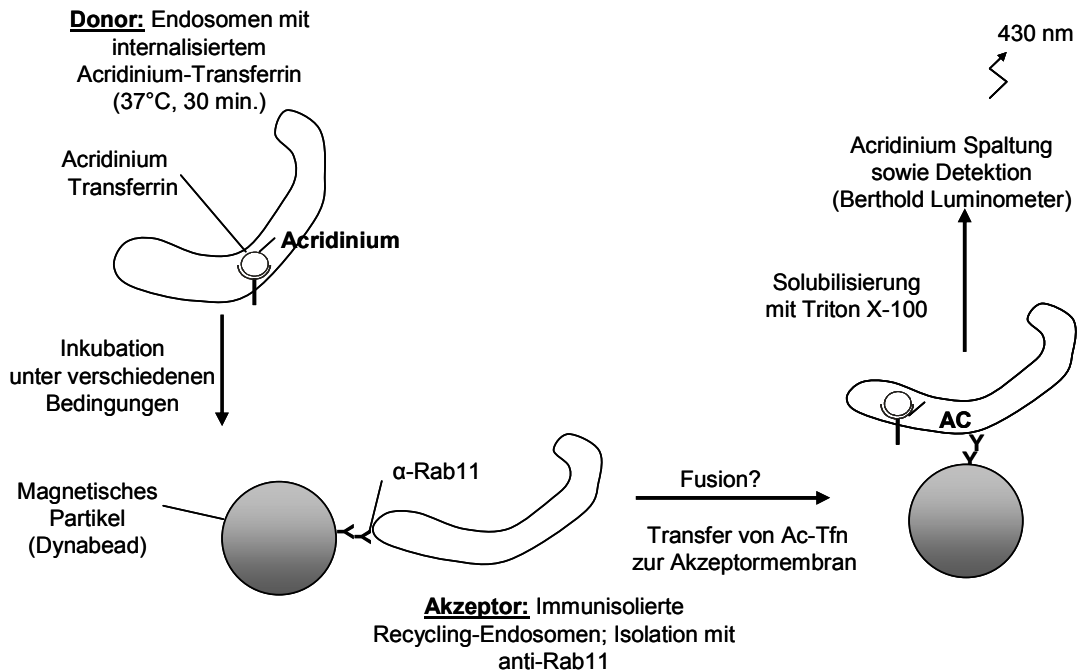


Abb. 7: Prinzip des *in vitro*-Fusionsassays.

In vitro-Transport wurde durch Inkubation von Donor- und Akzeptormembranen in einem Gemisch aus Rattenlebercytosol, einem ATP-regenerierenden System in Hepes-gepufferter Lösung rekonstituiert. Akzeptormembranen waren immunisierte, Rab11-positive Recycling-Endosomen. Das Ausgangsmaterial für die Immunoabsorption wurde aus aufgebrochenen CHO-Zellen gewonnen, die Endosomen dieser Zellen wurden in einem Sucrosegradienten angereichert (35%/20%-Interphase). Donor waren angereicherte Endosomen aus einem Sucrosegradienten. Die CHO-Zellen wurden vor dem Aufbrechen für 30 Minuten mit Ac-Tfn inkubiert. *In vitro*-Transport definierte sich als Transport von Ac-Tfn zu immunisierten Recycling-Endosomen bei definierter Zeit und Temperatur (in der Regel 30 Minuten und 37°C). Nach dem Transport wurden die an den Partikeln gebundenen Recycling-Endosomen mittels eines Magneten aus dem Ansatz entfernt und gewaschen. Eine Messung des Transportes erfolgte über eine Solubilisierung der Endosomen mit Triton X-100 und anschließender Messung in einem Luminometer.

3.6 Experimente zur Charakterisierung des Fusions-Assays

Für die Rekonstitution des Transportes zu immunisolierten Recycling-Endosomen sollte in Experimenten eine erste Charakterisierung vorgenommen werden. Zunächst wurde eine mögliche unspezifische Bindung von Membranen an die magnetischen Partikel untersucht. Hierbei wurden Recycling-Endosomen nach Zellaufschluss und Dichtezentrifugation durch magnetische Partikel immunisoliert. Diese Partikel waren vorher mit Rab11-Antikörper inkubiert oder es erfolgte keine Inkubation mit diesem Antikörper (IgG-Kontrolle), danach erfolgte für beide Ansätze eine Inkubation mit Donorendosomen (Ac-Tfn-markierte Endosomen) bei 37°C für 30 min, d.h. unter identischen Bedingungen. Die Ergebnisse zeigten eine hohe Spezifität der Fusion. Lediglich 7% Fusion war bei dem Kontrollansatz zu ermitteln (Abb. 8A). Trotz dieser niedrigen, unspezifischen Fusion, wurden bei allen nachfolgend beschriebenen

Experimenten neben der Immunisolierung mit anti-Rab11-Antikörpern jeder Versuchspunkt zudem mit einem Ansatz ohne anti-Rab11-Antikörper (IgG Kontrolle) durchgeführt, diese dann von dem jeweiligen Versuchspunkt abgezogen. Mit dieser Methode wurde die tatsächliche Fusion mit Rab11-positiven Recycling-Endosomen dargestellt (als % maximale Fusion) und nicht die Fusion von Donormembran mit unspezifisch an den magnetischen Partikeln haftenden Membranen.

Zur weiteren Charakterisierung des Transportassays wurden zunächst zwei -für den vesikulären Transport *in vivo*- essentielle Faktoren getestet. Bei diesen Faktoren handelt es sich um die Temperatur und um Energie in Form von ATP (Woodman and Warren, 1988; Wessling-Resnick and Braell, 1990). Die Temperatur ist ein wesentlicher Faktor, der den intrazellulären, vesikulären Transport beeinflusst. Bei 20°C werden beispielsweise Proteine, die zur Sekretion bestimmt sind, im TGN zurückgehalten, bei 4°C kommt hingegen der gesamte Transport zum Erliegen. Eine Charakterisierung und Etablierung des Transportassays sollte daher auch eine Untersuchung bei 4°C beinhalten. Die Inkubation von Donor- und immunoadsorbierter Akzeptormembran in Fusionspuffer, Rattenlebercytosol und ATP-regenerierendem System wurde hierbei in zwei identischen Reaktionsansätzen untersucht, die für jeweils 30 Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad bzw. in eiskaltem Wasser (4°C) inkubiert wurden. Die Ergebnisse nach Auswertung mittels Luminometer zeigten eine Reduktion des Transportes in diesem System auf etwa 10% (Abb. 8B). Die Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass es sich bei dem Transfer von Acridinium-Transferrin in immunisierte Recycling-Endosomen um einen aktiven, temperaturabhängigen Prozess handelt.

Der intrazelluläre, vesikuläre Transport *in vivo* ist energieabhängig, d.h. es ist ein ATP-verbrauchender Prozess. Dies zeigt sich auch in der Rolle der Rab-Proteine in diesen Prozessen. Rab-Proteine sind GTPasen und ihr Zyklus (GTP-gebunden, membranständig und aktiv, bzw. GDP-gebunden, cytosolisch, inaktiv) ist ein energieverbrauchender Vorgang. Um den Aspekt der Energieabhängigkeit zu untersuchen, wurden neben den Proben, die ein ATP-regenerierendes System enthielten, Fusionsexperimente mit ATP-erschöpfendem System (Zugabe von Hexokinase und Glucose) durchgeführt. Die Inkubationszeit lag wiederum bei 30 Minuten, die Experimente wurden bei 37°C durchgeführt. Bei dem *in vitro*-Assay zur Rekonstitution des Transportes von Endosomen zu Recycling-Endosomen senkte die ATP-verbrauchende enzymatische Reaktion der Hexokinase die Transportrate für Acridinium-Transferrin auf etwa 50% des entsprechenden Vergleichswertes (Abb. 8C), es handelte sich bei dem beobachteten

Transfer des Markerproteins aus der Donorfraktion zu der partikelgebundenen Akzeptorfraktion also um einen ATP-abhängigen, aktiven Prozess.

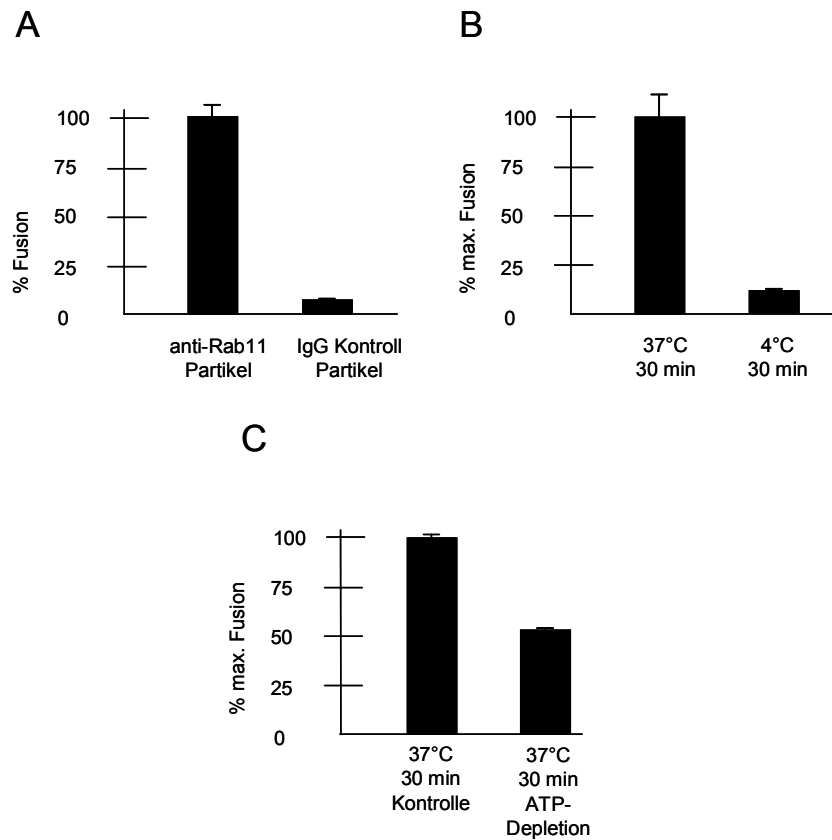


Abb. 8: Vesikulärer Transport zu immunisolierten Recycling-Endosomen.

Rekonstitution des *in vitro*-Transportes erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. (A) Immunisierte Recycling-Endosomen (anti-Rab11) wurden mit Ac-Tfn-Endosomen für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle für die Spezifität wurden magnetische Partikel ohne anti-Rab11-Antikörper mit Akzeptorfraktion inkubiert (IgG-Kontrolle) und dann dem gleichen Protokoll unterzogen. Die unspezifische Bindung betrug 7% gegenüber dem Kontrollwert.

Temperaturabhängige Fusion wurde durch jeweilige Inkubation von Akzeptor- und Donorfraktion bei 37°C bzw. 4°C untersucht (B). Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten, Transfer von Ac-Tfn zu Recycling-Endosomen bei 4°C erreichte 10% des Wertes im Vergleich zu den Ergebnissen bei 37°C.

(C) zeigt die ATP-Abhängigkeit des *in vitro*-Transportes. Akzeptor- und Donormembranen wurden jeweils für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Um ATP aus dem System zu erschöpfen, wurde dem Ansatz das Enzym Hexokinase, sowie als Substrat Glucose hinzugegeben. Fusion wurde auf etwa 50% des Kontrollwertes (mit ATP-regenerierendem System) inhibiert. Das ATP-regenerierende System bestand aus einer Mischung aus ATP, Kreatinkinase und Kreatinphosphat.

3.7 Zeitkinetik der Fusion sowie Wirkung von GDI und Cytochalasin D auf den Transport

Nach charakterisierenden Experimenten, die essentielle Faktoren endosomalen Transportes untersuchen sollten, wurde als nächstes eine Charakterisierung des Transportassays mittels Zeitverlaufsstudien durchgeführt, zum einen um die Schnelligkeit und die Nachhaltigkeit des Transportes zu analysieren, zum anderen aber auch um den Zeitpunkt maximalen Transportes zu ermitteln. Hierbei wurden Donor- und immunoadsorbierte Akzeptormembran in Anwesenheit von Rattenlebercytosol, ATP-regenerierendem System und Fusionspuffer miteinander für definierte Zeiten inkubiert. Bei der Messung des zeitlichen Verlaufes des Transportes wurden die Messpunkte 0 Minuten, sowie 15, 30 und 60 Minuten gewählt. Die Fusionsrate verzeichnete bis zu einem Zeitpunkt von 30 Minuten einen starken Anstieg und erreichte auch zu diesem Zeitpunkt ihr Maximum und blieb in der nachfolgenden Plateauphase auch nach 60 min weitgehend konstant (Abb. 9A).

3.7.1 GDI

Rab-GDI (Rab-GDP dissociation inhibiting factor) ist ein mit allen Rab-Proteinen interagierendes Protein, welches direkt den Rab-GTP/GDP-Zyklus beeinflusst. GDI ist in der Lage Rab-Proteine von ihren spezifischen Membranen zu extrahieren. Die Rab-Proteine liegen dann in einem Komplex mit GDI im Cytosol vor (Segev, 2001; Ullrich et al., 1993). Vermutlich verhindert GDI eine Dissoziation des GDP von Rab-Proteinen durch die Stabilisierung des Komplexes. Aufgrund der Eigenschaft Rab-Proteine von ihren Membranen zu extrahieren wurde GDI in verschiedenen *in vivo*- und *in vitro*-Studien zur Inhibierung der Rab-Funktionen genutzt (Holttä-Vuori et al., 2000). Bei der Etablierung des *in vitro*-Transportassays wurde daher auch die Rolle von GDI in dem System untersucht, da die Immunisolierung ja mit anti-Rab11-Antikörpern erfolgte und ein möglicher Einfluss von Rab-Proteinen in diesem System untersucht werden sollte. Bei der Untersuchung des Faktors wurde rekombinantes His₆-GDI verwendet, welches gegen Hepes-Puffer dialysiert vorlag. Es wurden wiederum Akzeptor- und Donormembranen in der bereits beschriebenen Fusionsmischung für 30 Minuten inkubiert, die Inkubationstemperatur betrug 37°C. Der GDI-Ansatz wurde bei den Experimenten mit 10 µM GDI versetzt, die Kontrollpunkte mit gleichem Volumen Hepes-Puffer. Die Proben, die das GDI enthielten zeigten einen stark verminderten Transport des Ac-Tfn zu den Recycling-Endosomen, bei dem beobachteten Transfer handelte es also um einen Rab-abhängigen Prozess (Abb. 9B).

3.7.2 Cytochalasin D

Beide Cytoskelett-Arten Aktin-Filamente und Mikrotubuli spielen eine Rolle im vesikulären Proteintransport, indem sie als Schienen für die Bewegung von Organellen und Vesikeln dienen, dies vermutlich unter Beteiligung von Kinesin- oder Myosin-Motorproteinen. Die Vermutung, dass Rab-Proteine in diesen Prozessen involviert sein könnten, wird durch zwei Befunde unterstützt. Zum einen ist ein Kinesin-ähnliches Protein, Rabkinesin-6, als Rab6-Effektorprotein in Membrantransportereignissen beteiligt (Hill et al., 2000), zum anderen reguliert Rab5 die gerichtete Bewegung von Frühen-Endosomen entlang von Mikrotubuli (Nielsen et al., 1999). Trischler et al. (1999) konnten zudem zeigen, dass β -Aktin auf immunisolierten Recycling-Endosomen zu finden war, während auf mit Rab5-Antikörpern isolierten Frühen-Endosomen dieses Protein nicht zu finden war. Intrazelluläre Prozesse, die auf ein intaktes Aktingerüst angewiesen sind, werden häufig durch eine Substanz inhibiert, die aus dem Pilz aus *Zygosporium mansonii* gewonnen wird: Cytochalasin D. Cytochalasin D ist eine Droge, welches nach Zugabe die „Plus“-Enden der Aktin-Fiber blockiert, somit auf das ganze Gerüst depolymerisierend wirkt. Bei der Untersuchung der Substanz auf den *in vitro*-Transportassay wurde Cytochalasin D in einer Konzentration von 20 μ M durch Zugabe in die Fusionsreaktion eingesetzt. Bei Kontrollansätzen wurde gleiches Volumen DMSO hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde ein stark verminderter Transfer der Markerproteine in die Akzeptorfraktion gegenüber der Kontrolle beobachtet, es ergab sich somit der Hinweis eines Aktin-abhängigen Transportes (Abb. 9C).

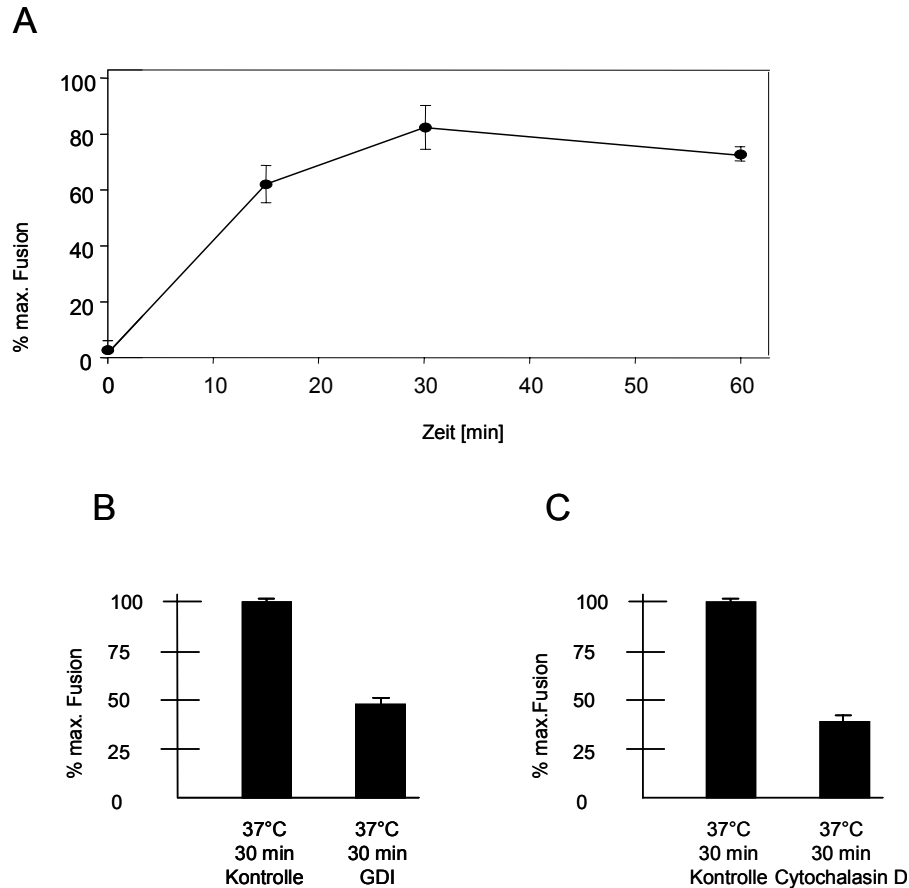


Abb. 9: Einfluss von GDI und Cytochalasin D, sowie der zeitliche Verlauf der *in vitro*-Fusion. *In vitro*-Transfer von Ac-Tfn wurde zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht und zeigte einen kontinuierlichen Anstieg des Transportes. Nach 30 Minuten wurde das Maximum der Fusion erreicht, die Fusion blieb nachfolgend auf einem annähernd konstanten Niveau (A). Die Zugabe von 10 μ M GDI in das *in vitro*-System führte zu einer Inhibierung der Fusion auf etwa 50% gegenüber des Kontrollwertes (B). Eine Inhibierung der Fusion wurde auch durch Zugabe von Cytochalasin D erreicht. Gegenüber dem Kontrollwert mit DMSO inhibierte 20 μ M Cytochalasin D den Transport auf etwa 30% (C). Die Experimente mit GDI und Cytochalasin D wurden jeweils bei 37°C und einer Inkubationszeit von 30 Minuten durchgeführt.

3.8 Affinitätschromatographische Aufreinigungen von Rab11-interagierenden Proteinen

Neben der Charakterisierung des *in vitro*-Assays und Analyse von bekannten Drogen und Proteinen in diesem Transportsystem sollten parallel dazu neue, bisher unbekannte, Rab11-interagierende Proteine identifiziert werden, die dann auch in den Transportversuchen eingesetzt und so getestet werden konnten. Da der Transport zu immunisolierten Recycling-Endosomen erfolgte und diese Fällung mit anti-Rab11-Antikörpern durchgeführt wurde, sollte eine Konzentration auf mit Rab11-interagierenden

Proteinen erfolgen. Um diese interagierenden Proteine zu identifizieren, wurde die Methodik der Affinitätschromatographischen Aufreinigung verwendet. Dieses in der Biochemie häufig verwendete Trennverfahren basiert auf der Wechselwirkung zwischen Makromolekülen. Wie bei allen anderen chromatographischen Trennverfahren besteht diese Wechselwirkung zwischen einer stationären, sowie einer mobilen Phase, wobei die stationäre Phase häufig aus Biopolymeren oder auch Polysacchariden besteht. Bei der hier vorgestellten Aufreinigung wurden CnBr-aktivierte Sepharosepartikel verwendet, die eine durchschnittliche Größe von 45-165 µm besaßen. An diese stationäre Phase wurde das Molekül Rab11 gebunden, welches für die spezifische Affinität bei der Aufreinigung verantwortlich war. Die Bindung erfolgte hierbei kovalent an die Aminogruppen des Proteins. Diese Bindung erlaubte es, das Protein in verschiedenen räumlichen Orientierungen zu fixieren, und so auch eine Vielzahl an Interaktionsmöglichkeiten mit dem Substrat zu ermöglichen. Das gekoppelte, rekombinante Rab11 lag in einer hohen Reinheit vor, um so eine sehr spezifische Interaktion mit der mobilen Phase zu gewährleisten. Das Substrat, d.h. die potenziellen Rab11-interagierenden Proteine lagen in Rattenlebercytosol vor (mobile Phase). Bei der Beschickung der Sepharose-Säule mit Rattenlebercytosol wurde zunächst der Durchfluss mit allen, ungebundenen Molekülen aufgefangen. Um solche Moleküle, die aufgrund einer geringen Wechselwirkung mit der mobilen Phase in der Säule verblieben waren von dieser zu entfernen, wurden verschiedene Waschschriffe durchgeführt die eine Salzkonzentration von bis zu 0,5 M NaCl aufwiesen. Die abschließende Elution spezifisch gebundener Proteine geschah bei einer Konzentration von 1,5 M NaCl. Proteine, die selbst bei dieser hohen Salzkonzentration immer noch an immobilisiertes Rab11 gebunden vorlagen, wurden durch Aufkochen in SDS-haltigem Probenpuffer von den Partikeln entfernt.

Die im Eluat vorhandenen Proteine wurden durch TCA-Präzipitation gefällt und mittels SDS-PAGE und anschließender Proteindetektion durch Silberfärbung visualisiert. Das Eluat, sowie die aufgekochten Partikel zeigten in der Silberfärbung eine stärkere Interaktion mit verschiedenen Proteinen, als die im Vergleich und zur Kontrolle mit aufgetragenen und der identisch behandelten, jedoch ungekoppelten Partikel (Abb. 10A). Eine Proteinbande bei etwa 42 kDa, die verstärkt in den eluierten Fraktionen der Rab11-gekoppelten Partikel auftrat, erschien hierbei besonders interessant. Untersuchungen mittels Western-Blot und Immundetektion ergaben, dass es sich bei diesem Protein um Aktin handelte (Abb. 10B), welches sowohl in den eluierten Fraktionen, als auch in den Fraktionen der mittels SDS-Probenpuffer aufgekochten, stark interagierender Proteine zu finden war. Der Vergleich zu den Eluaten, bzw. an den Partikeln verbliebenen Fraktionen der Kontrolle (ungekoppelte Partikel) zeigte hier kein Vorhandensein von Aktin, sowohl in der Silberfärbung als auch in der Western-Blot Analyse.

Die durch Affinitätschromatographie gewonnenen Fraktionen der mit Rab11 interagierenden Proteine sollten in weiteren Experimenten auf ihren Einfluss auf den vesikulären Transport zu Recycling-Endosomen hin untersucht werden. Hierbei diene der bereits erläuterte und charakterisierte *in vitro*-Transportassay als Testsystem. Eluierte Fraktionen der mit Rab11 gekoppelten Partikel und der ungekoppelten Partikel wurden hierzu jeweils gegen Fusionspuffer dialysiert um die hohe Salzkonzentration, die den *in vitro*-Transport ebenfalls beeinflussen könnte, zu entfernen. Identische Volumina beider Ansätze wurden zu dem Fusionansatz hinzugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zugabe des Eluates von der mit His₆-Rab11 gekoppelten Säule zeigte hierbei eine Stimulierung des Transportes um etwa 40% im Vergleich zu dem Ansatz mit dem Eluat der ungekoppelten Partikeln (Abb. 10C). Die in den eluierten Fraktionen enthaltenen Proteine sind somit an dem *in vitro*-Transport beteiligt.

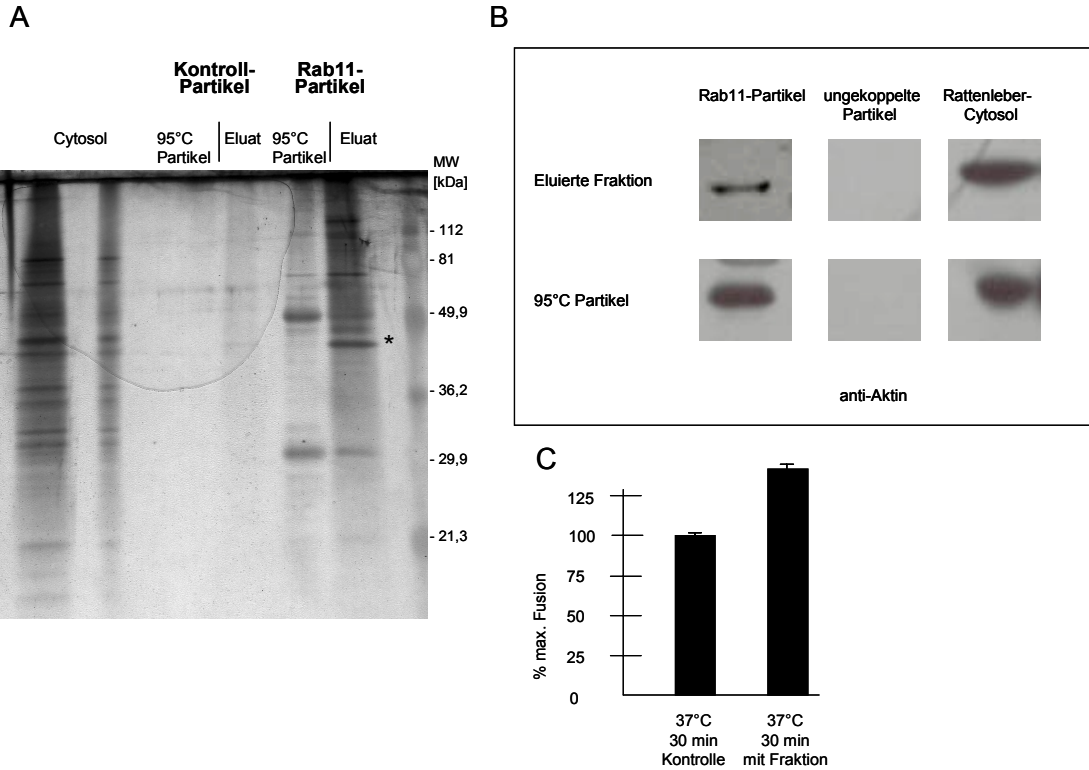


Abb. 10: Proteindetektion mittels Silberfärbung und Western-Blot nach Affinitätschromatographie und Untersuchung der eluierten Fraktionen in dem *in vitro*-Assay.

His₆-Rab11 wurde kovalent an Sepharose-Partikel gekoppelt und anschließend mit Rattenlebercytosol bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Unspezifisch an Rab11 gebundene Proteine wurden durch Waschen entfernt, spezifisch interagierende Proteine anschließend durch Inkubation mit Lösungen hoher Salzkonzentration eluiert. Das Eluat wurde präzipitiert und auf ein SDS-PAGE geladen (mit anschließender Silberfärbung, (A)) bzw. einem Western-Blot unterzogen. Die Detektion erfolgte mit einem anti-Aktin Antikörper (B). Neben der Untersuchung des präzipitierten Eluates wurden auch die Sepharose-Partikel in Probenpuffer aufgekoht und so stark interagierende Proteine von den Partikeln gelöst. Bei Silberfärbung und Western-Blot wurden sowohl Rab11-Partikel als auch Kontrollpartikel auf die jeweiligen Gele aufgetragen, beim Western-Blot zusätzlich Rattenlebercytosol (15 µg) als Kontrolle des Antikörpers. Die jeweiligen Eluate (Rab11-Partikel, bzw. Partikel ohne gekoppeltes Protein) wurden zusätzlich gegen Fusionspuffer dialysiert und in gleichen Volumina zu dem bereits beschriebenen *in vitro*-Fusionssystem gegen. Zugabe von His₆-Rab11 Eluat ergab eine Stimulation der Fusion um etwa 30% gegenüber des Kontrollwertes.

3.9 Transiente Transfektion von Cav-1 in LNCaP-Zellen

Da bei der Untersuchung von Cav-1-Partikeln, die von LNCaP-Zellen sekretiert wurden, lediglich Zellen höherer Passagen (Tahir et al., 2001) Cav-1 exprimierten und sekretierten, wurde in die Zellen die c-DNA von Cav-1 transportiert. Bei dem Transfer von DNA in Zellen gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten:

- a) die Infektion durch virale Systeme
- b) die Transfektion, d.h. das Einschleusen von DNA in Säugetierzellen durch biochemische oder physikalische Verfahren

Bei der Infektion werden die Zielzellen mit Viren behandelt, die eine klonierte DNA-Sequenz des zu exprimierenden Proteins in ihrem viralen Genom tragen. Die Einschleusung von DNA mit dieser Methodik ist jedoch generell schwieriger als die transiente Transfektion, da neben Sicherheitsaspekten auch die Effizienz der Infektion stark von den Zielzellen abhängt. So ist die Aufnahme von Viren bei Zellen, die an ihrer Oberfläche keinen Rezeptor für diesen Virus besitzen sehr gering.

Die Transfektion hingegen ist in der Regel schneller und einfacher zu handhaben, sie zeigt auch oftmals eine höhere Effizienz. Bei der Transfektion gibt es unterschiedliche Methoden der DNA-Einschleusung, so z.B. über die Calcium-Phosphat-Methode oder die physikalische Einschleusung über Mikroinjektion. Eine weitere Möglichkeit ist die DNA-Transfektion über kommerziell erhältliche, kationische Lipidreagenzien. Diese Reagenzien bilden in wässriger Lösung kleine (durchschnittlich 100-400 nm), unilamellare Liposomen. Die Oberfläche dieser Liposomen ist positiv geladen und zeichnet sich daher sowohl durch eine elektrostatische Affinität zum negativ geladenen Phosphatgerüst von DNA-Molekülen wie zur ebenfalls negativ geladenen Zellmembran aus (Gershon et al., 1993). Durch die Inkubation des Transfektionsreagenz mit der zu transfizierenden DNA bilden sich spontan Komplexe, wobei vermutlich bis zu vier Liposomen mit einem DNA-Molekül assoziiert vorliegen (Felgner et al., 1987). Die vorliegenden Komplexe werden dann zu den Zielzellen gegeben, und die DNA wird aufgenommen, eventuell über endocytotische Aufnahme (Coonrod et al., 1997). Die so beschriebene Transfektion ist jedoch auch nicht immer problemlos durchzuführen, so gibt es je nach Zelltyp und DNA bzw. verwendeten Reagenzien Schwankungen in der Transfektionseffizienz, auf einige Zellen wirken sich Transfektionen sogar cytotoxisch aus. Um eine mögliche toxische Wirkung des hier verwendeten Lipofectamine-Transfektionsreagenz zu untersuchen, sowie generell die Transfektionseffizienz zu ermitteln, wurden LNCaP-Zellen mit c-DNA des lacZ-Genes aus *Escherichia coli* transfiziert, welches für das Protein β -Galactosidase codiert. Nach Zugabe von Substrat (X-gal) katalysierte das Enzym eine chemische Reaktion und es kam zu einem blauen Niederschlag in den Zellen. Transfizierte Zellen konnten nun

einfach im Lichtmikroskop von ungefärbten, nicht-transfizierten Zellen unterschieden werden (Abb. 11). Die so ermittelte, durchschnittliche Transfektionseffizienz lag bei etwa 60%.

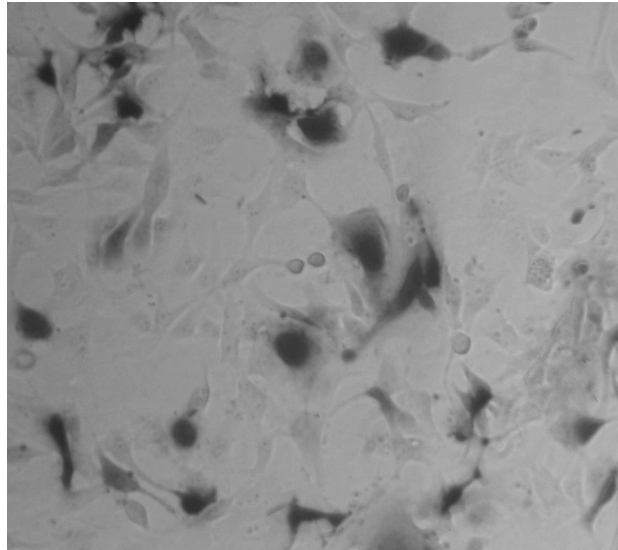


Abb. 11: Transfizierte und nicht-transfizierte LNCaP-Zellen.

LNCaP-Zellen mit etwa 60-80% iger Konfluenz wurden zur Kontrolle der Transfektionseffizienz mit dem für die β -Galactosidase codierendem lacZ-Gen transfiziert. Nach Inkubation in serumhaltigem Medium, wurden die Zellen mit X-Gal Substratlösung versetzt. Das durch die β -Galactosidase umgesetzte Substrat nimmt eine dunkle Färbung an. Aufgrund des Vergleiches von gefärbten (d.h. transfizierten Zellen) mit ungefärbten (nicht-transfizierten) Zellen lässt sich die Transfektionseffizienz ermitteln. In der Abbildung liegt die ermittelte Transfektionseffizienz bei etwa 60%.

Mit Cav-1 c-DNA transfizierte Zellen wurden nun auf ihre Sekretion von Cav-1-Partikeln untersucht. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h mit serumfreiem Medium inkubiert. Das so gewonnene, konditionierte Medium wurde anschließend für 1,5 h bei 4°C und 200.000 x g_{av} zentrifugiert, um so eventuelle Kontaminationen mit membrangebundenem Cav-1 aus Zelltrümmern zu minimieren. Die Western-Blot Analysen dieser konditionierten Medien ergaben eine Sekretion von Cav-1, während nicht-transfizierte Zellen (Transfektion des leeren Vektors) niedriger Passagen, bzw. gleiche Zellen nach Transfektion mit lacZ-DNA keinerlei Sekretion zeigten (Abb. 12).

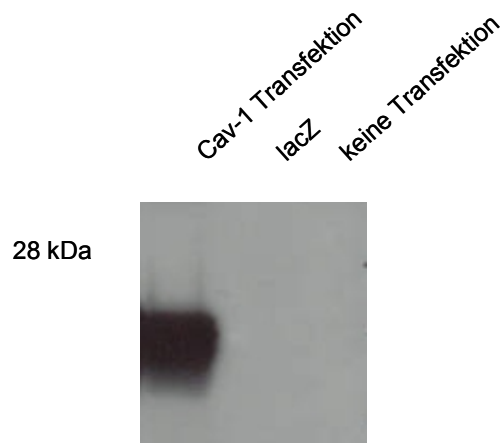


Abb. 12: Vergleich konditionierter Medien nach Transfektion.

LNCaP-Zellen wurden mit etwa 60-80% iger Konfluenz mit für Cav-1-c-DNA, lacZ-c-DNA und Vektor (pcDNA 3.1) unter Verwendung identischer Reagenzien transfiziert. Nach Transfektion erfolgte die Gewinnung konditionierter Medien wie in Material und Methoden beschrieben. Gleiche Volumina der konditionierten Medien wurden nach TCA-Präzipitation und SDS-PAGE im Western-Blot auf Cav-1 hin detektiert. Die Abbildung zeigt, dass lediglich die mit Cav-1 transfizierten Zellen auch Cav-1 sekretierten. Bei identischen Zellen nach Transfektion mit pcDNA 3.1 bzw. lacZ war eine solche Sekretion nicht zu detektieren.

Bei der Charakterisierung des von transfizierten Zellen sekretierten Cav-1-Partikels wurden verschiedene Ziele verfolgt: es sollte eine Größenbestimmung des Partikels über gelchromatographische Trennung, sowie über native Blau-Gelelektrophorese erfolgen. Weiterhin sollte die Dichte dieser Partikel analysiert werden. Schließlich sollte untersucht werden, ob die sekretierten Partikel neben Cav-1 noch weitere Proteine enthielten. Dabei sollten mögliche Proteinkandidaten nach Aufreinigung über massenspektroskopische Analysen identifiziert werden. Abb. 13 zeigt die Übersicht der Charakterisierung.

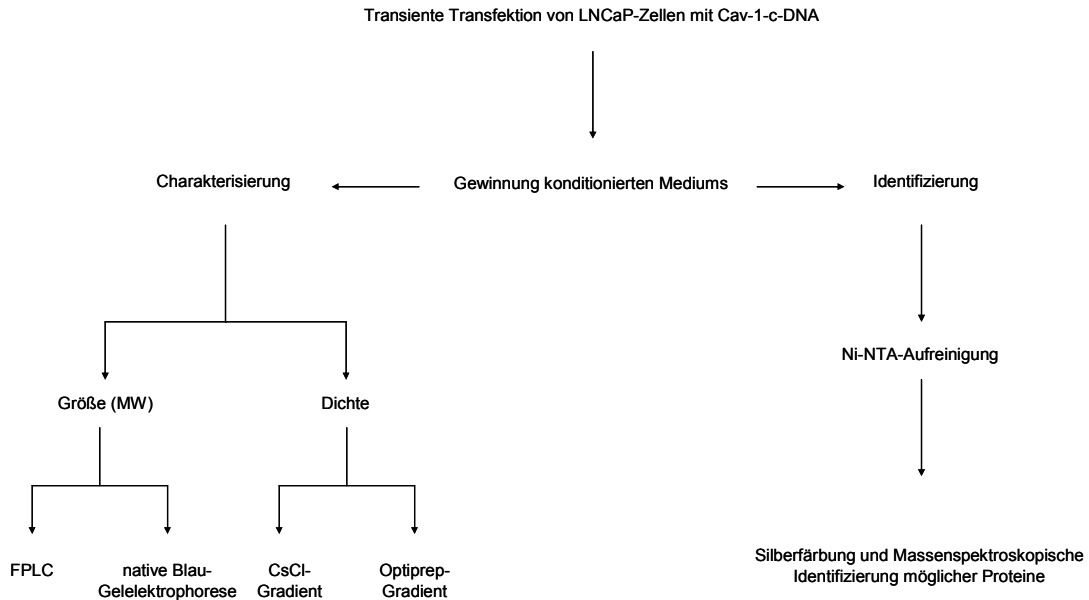


Abb. 13: Übersicht zur Charakterisierung sekretierter Cav-1-Partikel.

3.10 Bestimmung der Größe sekretierter Cav-1-Partikel

Die Charakterisierung der sekretierten Cav-1-Partikel sollte zuerst mit der Bestimmung des Molekulargewichtes beginnen. Hierbei wurde ein häufig verwendetes Analyseverfahren zur Trennung von Molekülen in wässriger Lösung nach ihrer Größe, die Gelfiltration eingesetzt. Die gelchromatographische Trennung wurde in der Vergangenheit häufig bei der Niederdrucksäulenchromatographie eingesetzt, die hier vorgestellte Methode ist aufgrund der Verwendung hochwertiger Trennmaterialien die effektivere High Performance Liquid Chromatography (HPLC), die aufgrund des hohen Verwendeten Drücke (bis zu 12 bar) auch High Pressure Liquid Chromatography genannt wird. Das Prinzip der HPLC ist wie bei allen chromatographischen Trennmethoden die Wechselwirkung zwischen einer mobilen, sowie einer stationären Phase. Die mobile Phase besteht aus vernetzten Polysacchariden (Agarose; Markenname Superose6), was zur Bildung eines dreidimensionalen Netzwerkes in der Säule führt. Die Partikeldurchmesser bestehen im Falle der Superose6 dabei bei etwa 11-15 μm . Durch diese Porengröße ist gleichzeitig definiert, ob ein Molekül einer bestimmten Größe in das Gel diffundieren kann, ist das Molekül zu groß, werden diese ausgeschlossen und diffundieren ohne Interaktion mit der stationären Phase durch das Gel. Je kleiner ein Molekül ist, desto größer ist das zugängliche Porenvolumen und die Verweilzeit des Moleküls der mobilen Phase in der Säule ist länger, diese Moleküle verlassen die Säule also zu einem späteren Zeitpunkt.

Bei einer Gelfiltration können die zu trennenden Moleküle nicht vor einem bestimmten Elutionsvolumen die Säule passieren, dieses Volumen wird als äußeres Volumen der

Gelmatrix oder auch Ausschlussvolumen genannt. Sehr große Moleküle (die keinerlei Zugang zu der Gelmatrix haben) passieren direkt nach Elution des Ausschlussvolumens die Gelsäule. Zur Bestimmung dieses Ausschlussvolumens V_0 wurde die Säule daher mit dem sehr großen Molekül Dextran Blau (Molekulargewicht 2.000.000 Da) beschickt. Das so ermittelte Ausschlussvolumen lag bei 9,5 ml (Abb. 14A). Das Flüssigkeitsvolumen in den Gelpartikeln wird als Inneres Volumen definiert, d.h. kleinere Moleküle treten mit der Elution des inneren Volumens aus der Säule aus. Alle auf die Säule aufgetragenen Substanzen liegen somit im Eluat vor, wenn die Summe aus Ausschlussvolumen und Innerem Volumen die Säule passiert hat. Gelfiltrationen werden häufig zu Bestimmung von Molekulargewichten nativer Proteine eingesetzt, da das Elutionsvolumen der Proteine proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes ist. Das Molekulargewichte unbekannter Proteine kann daher bei vorheriger Kalibrierung der Säule mit Standardproteinen bekannten Molekulargewichtes bestimmt werden. Bei den Kalibrierungen der Superose6-Säulen wurden die Proteine Thyroglobulin mit 660.000 Da, sowie Katalase mit 232.000 Da verwendet (Abb. 14A). Konzentriertes, konditioniertes Medium wurde auf die Säule gegeben und nachfolgend mit HEPES-gepufferter Lösung eluiert. Die einzelnen Fraktionen (jeweils 1 ml) wurden nach TCA-Präzipitation und SDS-PAGE im Western-Blot mit anti-Caveolin-Antikörper detektiert. Die Elution ergab einen flachen Kurvenverlauf, erst ab Fraktion 21 stieg die Proteinkonzentration im Eluat an und erreichte ihr Maximum bei Fraktion 24. Cav-1 war in den Fraktionen 11-13 zu finden, dies entsprach einem kalkulierten Molekulargewicht von etwa 900 kDa (Abb. 14B).

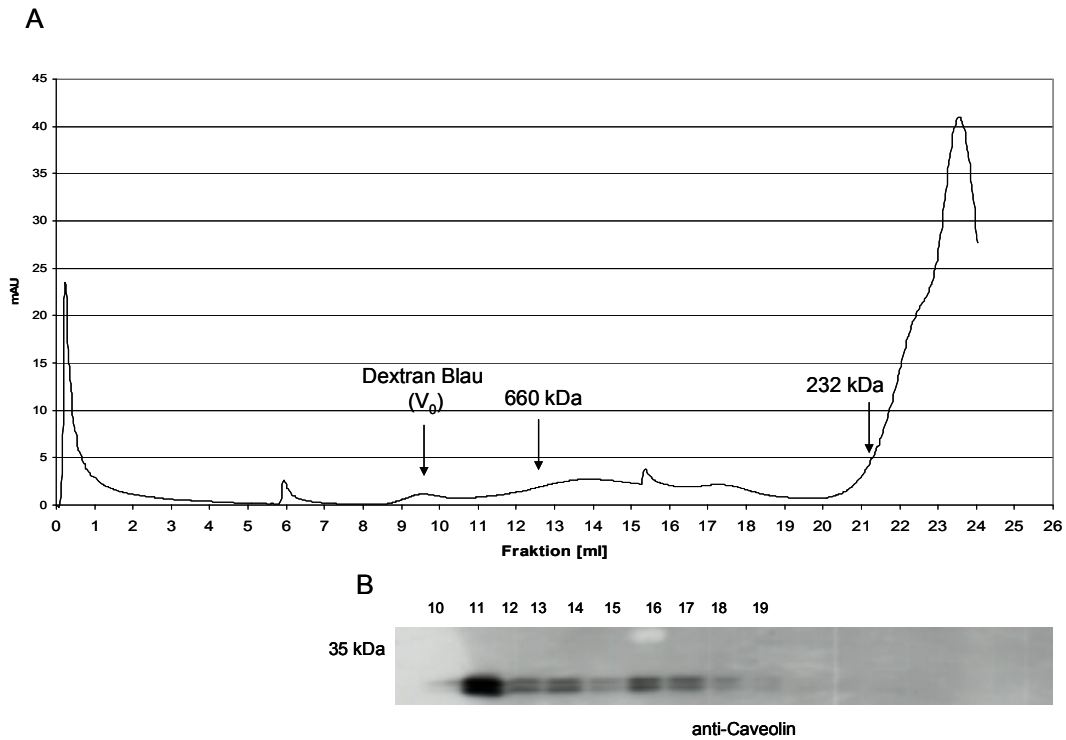


Abb. 14: FPLC und Immunodetektion konditionierter LNCaP-Überstände.

LNCaP-Zellen wurden mit Cav-1-c-DNA transient transfiziert, und zentrifugiertes, konditioniertes Medium wurde anschließend konzentriert und auf eine Superose6-FPLC-Säule gegeben. Das Medium wurde mit HEPES-Puffer eluiert. 26 Fraktionen von jeweils 1 ml wurden gesammelt und jeweils TCA-präzipitiert. Die Abbildung zeigt eine graphische Darstellung der Elution, wobei die Proteinkonzentration (y-Achse) gegen die Fraktionsnummer (x-Achse) aufgetragen ist (A), sowie die Immunodetektion von Caveolin-1 in den Fraktionen. Die Chromatographie-Säule wurde vor Gebrauch kalibriert um eine Molekulargewichtsabschätzung der Fraktionen durchführen zu können. Die Proteine des Mediums finden sich mehrheitlich in den späteren Fraktionen mit einem Molekulargewicht von >232.000 Da. Caveolin-1 ist, wie in dem Western-Blot ersichtlich, (B) dagegen hauptsächlich in den Fraktionen unmittelbar nach dem Leervolumen der Säule (9,5 ml) in der Fraktion 11 zu finden, was einem Molekulargewicht zwischen 2.000.000 und 660.000 Da entspricht. Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit Dextranblau (ca. 2.000.000 Da, Ausschlußvolumen der Säule), Thyroglobulin (ca. 660.000 Da), sowie Katalase (ca. 232.000 Da). FPLC: flowrate ~0.4 ml/ min 1,5 MPA Druck

In einem alternativen Ansatz zur Bestimmung des Molekulargewichtes von sekretiertem Cav-1-Partikeln wurde die native Blau-Gelelektrophorese verwendet (Schägger et al., 1988). Diese Methodik erlaubt es, Proteinkomplexe nach ihrer Größe aufzutrennen, ohne diese Komplexe wie in SDS-PAGE-Systemen zu denaturieren. Konditionierte, konzentrierte Medien wurden vor der elektrophoretischen Auftrennung in einem Coomassie-Probenpuffer aufgenommen. Dabei bindet der Coomassie-Farbstoff spezifisch an Proteine und verleiht ihnen (ähnlich dem SDS) eine negative Gesamtladung, ohne Protein-Protein-Wechselwirkungen innerhalb von Proteinkomplexen zu stören oder aufzuheben. Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 4-16%-Gradientengel in ebenfalls Detergent-freien Laufpuffern für 12 h bei 4°C und 200 V. Nach dem Lauf erfolgte

eine Transfer auf eine Membran mit anschließender Detektion von Cav-1. Abb. 15 zeigt die Ergebnisse der Detektion mit unterschiedlichen Expositionen des gleichen Western-Blots. Caveolin zeigt eine starke Verteilung im Gel, scheint also in unterschiedlich großen Proteinkomplexen vorzuliegen. Die heterogene Distribution bewegt sich dabei in einem Molekulargewichtsbereich von etwa 800-500 kDa.

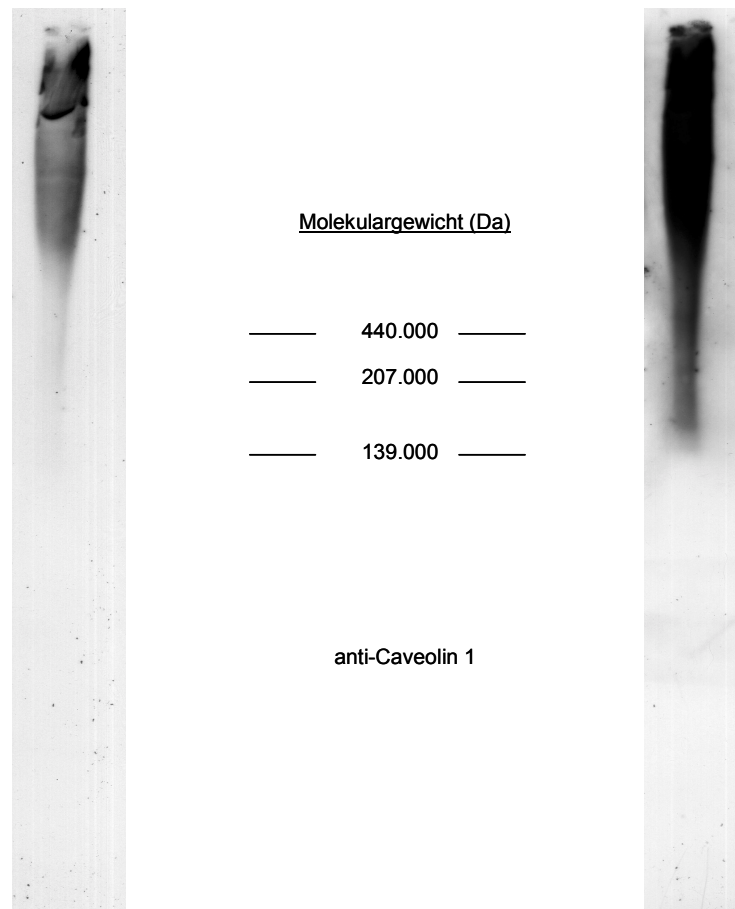


Abb. 15: Native Blau-Elektrophorese.

Konzentriertes, konditioniertes Medium von transient transfizierten (mit Cav-1) LNCaP-Zellen wurde durch native Blau-Elektrophorese (4-16% Gradientengel) aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen und dann mit anti-Caveolin-Antikörpern nachgewiesen. Die Detektion zeigt Caveolin-1 heterogener Größe (unterschiedlicher Verteilung im Gel) mit einem Molekulargewicht größer als 440.000 Da.

3.11 Bestimmung der Dichte sekretierter Cav-1-Partikel

Neben der Bestimmung des Molekulargewichtes sollte die Dichte sekretierter, Cav-1-haltiger Partikel ermittelt werden. Dabei dienten zwei alternative Methoden der Dichtezentrifugation zur Ermittlung der Dichte, die sich in ihren jeweiligen Lösungen unterschieden. Dieses Medium war zum einen Cäsiumchlorid (CsCl), zum anderen wurde eine Optiprep-Lösung verwendet. Beide Dichtezentrifugationen erfolgten prinzipiell ähnlich

wie die oben aufgeführte Sucrose-Dichtezentrifugation, da es sich jedoch im Gegensatz zu der präparativen Anreicherung von Endosomen um eine analytische Aufreinigung handelte, wurde bei der Untersuchung der Cav-1-Partikel keine Sucrose verwendet.

Bei der CsCl-Dichtezentrifugation wurde ein diskontinuierlicher, dreistufiger Gradient hergestellt. CsCl der höchsten Dichte (1,35 g/ml) wurde in den Boden des Zentrifugenröhrchens vorgelegt und anschließend mit CsCl-Lösungen geringerer Dichte (1,21 g/ml bzw. 1,063 g/ml) überschichtet. Der Gradient wurde durch die Überschichtung mit Cav-1 enthaltendem, konditioniertem Medium abgeschlossen und bei 220.000 g_{av} für 21-24 h bei 4°C zentrifugiert. Nach Einsammeln der Fraktionen, TCA-Präzipitation, SDS-PAGE und Western-Blot zeigte sich eine Aufreinigung von Cav-1 in dem Gradienten, wobei eine Konzentration in den Fraktionen 9-11 zu beobachten war. Da sich eine Abschätzung der Dichte aufgrund der eingesammelten Fraktionen im Vergleich mit der kalkulierten Dichte der CsCl-Fraktion durch Schwankungen in der Beladung, bzw. in der Abnahme des Gradienten als schwierig erwies, wurde parallel zu jeder Zentrifugation ein identischer Stufengradient mit HDL in serumfreien Zellkulturmedium (identisch dem verwendeten Medium zur Gewinnung konditionierter Medien) analysiert, die Detektion des HDL erfolgte mit ApoA1-Antikörpern. Wie in Abb. 16 zu sehen ist, überlappt die Verteilung des Cav-1 im Vergleich mit dem HDL-Marker ApoA1, jedoch ist diese Überlappung nur partiell; ApoA1 ist dabei im wesentlichen auf die Fraktionen 7-10 beschränkt.

1,063 g/ml \Rightarrow 1,35 g/ml CsCl (Stufengradient)

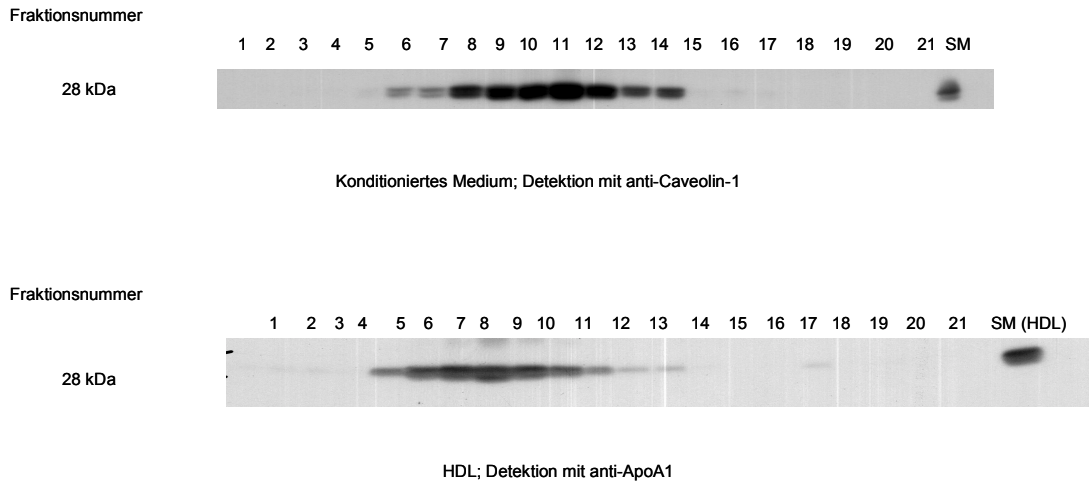


Abb. 16: Dichteverteilung von Caveolin-1 im CsCl-Dichtegradienten.

Konditioniertes Medium mit Cav-1-Partikeln wurde auf einen CsCl-Stufengradienten (1,063-1,35 g/ml CsCl) gegeben und für 21 Stunden bei $200.000 \times g_{av}$ zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurden 21 Fraktionen mit jeweils 750 μ l abgesammelt und TCA-präzipitiert. Fraktionen wurden auf ein SDS-PAGE geladen und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mit anti-Caveolin-Antikörpern. Als Kontrolle wurden in einem identischen Gradienten HDL geladen. Die Detektion erfolgte hier mit anti-ApoA1-Antikörpern.

Um mögliche Effekte des hohen Salzgehaltes bei der CsCl-Zentrifugation auszuschließen, wurden die Experimente unter Verwendung des Optiprep-Mediums wiederholt. Der ebenfalls diskontinuierliche Gradient der Stufen 40%, 20%, 10% sowie 5% wurde durch die Verdünnung der 60% Optiprep-Stammlösung mit HEPES-gepufferter Lösung erstellt. Prinzipiell ähnlich dem CsCl-Gradienten wurden die Proben (konditioniertes Medium und HDL) dem Gradienten überschichtet. Die Zentrifugationszeit und alle sonstigen Bedingungen waren gleich. Abb. 17 zeigt, dass HDL in den Optiprep-Gradienten eine stärkere Konzentration auf wenige Fraktionen (8-10) aufweist. Die Überlappung mit Cav-1 ist mit diesem System zugleich größer, jedoch ist die Verteilung im Gradienten größer als die des HDL.

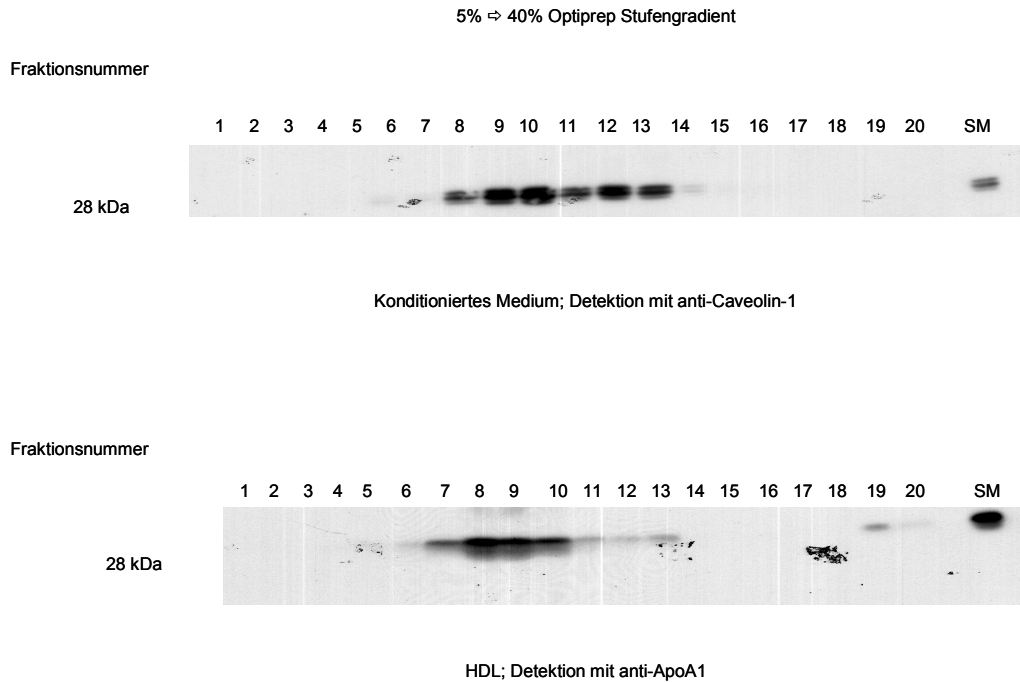


Abb. 17: Dichteverteilung von Caveolin-1 in einem OptiPrep-Gradienten.

Konditioniertes Medium mit Cav-1-Partikeln wurde auf einen Stufengradienten mit 5-40%-Optiprep-Medium gegeben und für 21 Stunden bei $200.000 \times g_{av}$ zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurden 21 Fraktionen mit jeweils 750 μ l abgesammelt und TCA-Präzipitiert. Fraktionen wurden auf ein SDS-PAGE geladen und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mit anti-Caveolin-Antikörpern. Als Kontrolle wurden in einem identischen Gradienten HDL geladen. Die Detektion erfolgte hier mit anti-ApoA1-Antikörpern.

Beide Gradienten zeigen eine ähnliche Dichteverteilung von Cav-1 und HDL (ApoA1), jedoch ist die Überlappung der Fraktionen in Optiprep-Gradienten schärfer. Cav-1 zeigt generell eine größere Verteilung in beiden Gradienten.

3.11.1 Aufreinigung sekretierter Cav-1-Partikel durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Neben den charakterisierenden Experimenten zur Dichte- und Molekulargewichtsbestimmung sekretierter Cav-1-haltiger Lipoproteinpartikel sollte parallel auch eine Identifizierung eventueller Proteine, die sich neben Cav-1 auf den Partikeln befinden, vorgenommen werden (Abb. 13). Da die oben beschriebenen analytischen Methoden sich für eine quantitativ hohe Aufreinigung der Partikel als zu ungenügend erwiesen, wurde ein affinitätschromatischer Ansatz durch Ni-NTA-Agarose gewählt. Dies war möglich, denn die in LNCaP-Zellen transfizierte Cav-1-c-DNA codierte auch für 6 Aminosäuremoleküle Histidin an ihrem N-Terminus (His₆-tag).

Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie wurde von Porath and Olin, (1983) erstmalig eingesetzt. Die hier verwendete Ni-NTA-Chromatographie basiert auf kovalent

an Agarose gekoppelte Nitrilo-Essigsäure (Nitriloacetic Acid, NTA). NTA bildet einen sehr festen Chelatkomplex mit 4 von 6 Ligandenbindestellen eines Nickel-Ions, die zwei verbleibenden Bindungsstellen können wiederum mit basischen Aminosäuren komplexieren (Abb. 18). Durch den His₆-tag des Cav-1 bindet das Protein bevorzugt an die Ni-NTA Agarose. Die gesamte chromatographische Aufreinigung wurde unter nativen Bedingungen durchgeführt, eine Zerstörung eventueller Proteinkomplexe fand somit nicht statt. Die Elution erfolgte ebenfalls unter nativen Bedingungen durch kompetitive Elution mit dem Histidin chemisch ähnlichen Imidazol.

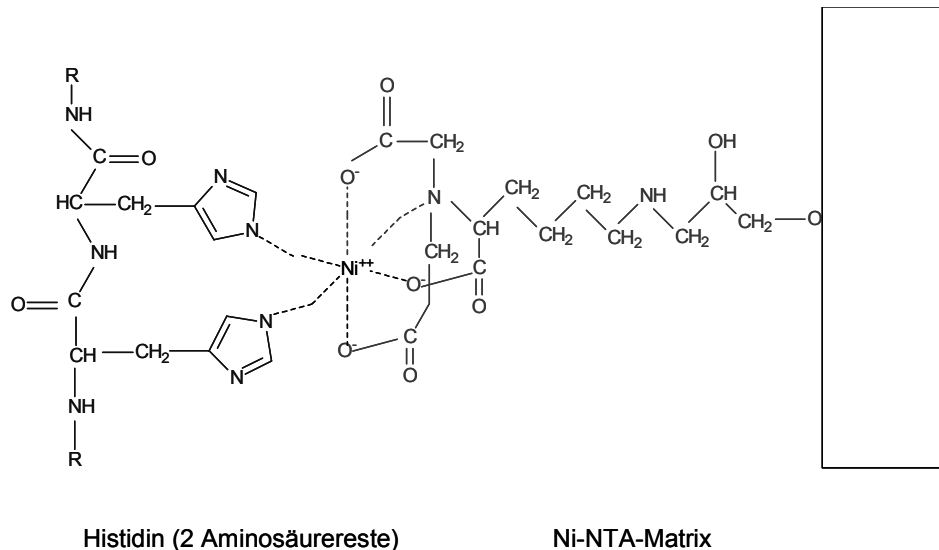


Abb. 18: Interaktion von Ni-NTA mit Histidinresten.

NTA bildet mit Nickel einen starken Chelatkomplex an 4 Bindestellen. Die 2 verbleibenden Bindestellen des Nickels binden dabei bevorzugt an basische Aminosäuren wie Histidin. Die Abbildung zeigt auf der rechten Seite die immobilisierte NTA und auf der linken Seite zwei Aminosäurereste des Histidins.

Konditionierte Medien wurden bei der Aufreinigung mit Ni-NTA-Agarose versetzt und mit dieser bei 4°C in einem Drehschüttler inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Suspension auf eine Chromatographiesäule gegeben, und der Durchfluss gesammelt. Unspezifisch mit der Ni-NTA-Agarose interagierende Proteine wurden durch Waschen mit hohen Salzkonzentrationen (0,5 M NaCl) von der Säule entfernt. Die Elution erfolgte in Stufen (10, 150 und 250 mM Imidazol im Elutionspuffer) um möglichst sehr stark interagierende Proteine (Cav-1) in einer sehr hohen Reinheit zu erhalten. Vergleichbare Volumina der verschiedenen Wasch- und Elutionsfraktionen wurden mittels TCA präzipitiert und nach SDS-PAGE und Transfer auf eine PVDF-Membran auf ihren Gehalt an Cav-1 hin detektiert. Abb. 19 zeigt die typische Verteilung von Cav-1 nach einer solchen Aufreinigung: Cav-1 ist in geringen Mengen im Durchfluss, sowie in der 10 mM Imidazol-Fraktion zu erkennen, während durch 0,5 M NaCl-Waschschritt keinerlei Cav-1

von den Partikeln entfernt wird. Cav-1 wird hauptsächlich von den Elutionsfraktionen mit 150, bzw. 250 mM Imidazol kompetitiv von der Säule eluiert. Da die bestimmte Proteinkonzentrationen in beiden Fraktionen sehr gering war (ca. 10 µg/ml), wurden beide Fraktionen miteinander vermischt, und so für weitere Experimente verwendet.

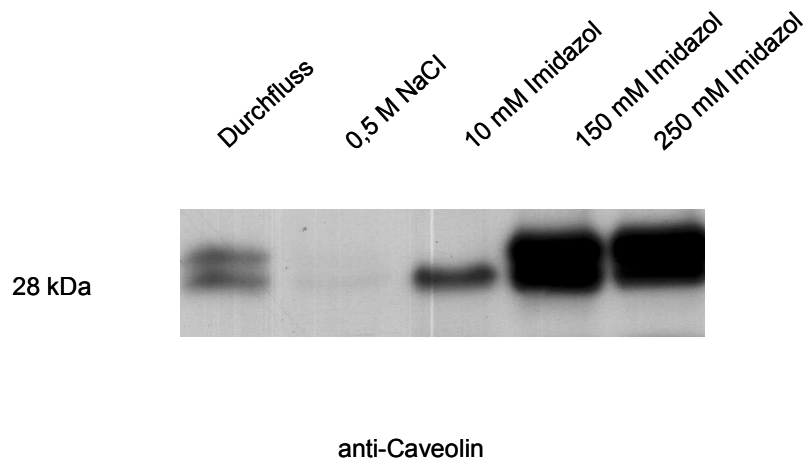


Abb. 19: Anreicherung von Cav-1-Partikeln aus konditioniertem Medium.

LNCaP-Zellen wurden nach transients Transfektion mit Cav-1c-DNA (mit His₆-tag) in serumfreiem Medium inkubiert. Das konditionierte Medium wurde nach Zentrifugation von Zelldebris mit Ni-NTA-Agarose (2 ml Partikel mit 40 ml Medium) für 1,5 Stunden bei 4°C auf einem Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Die Suspension wurde anschließend auf eine Säule gegeben. Nach Abnehmen des Überstandes und dem Waschen der Partikel mit einer 0,5 M NaCl-Lösung, wurden Cav-1-Partikel durch Beschickung der Säule mit Elutionspuffern und verschiedenen Imidazolkonzentrationen (10, 150 und 250 mM) eluiert. Alle Fraktionen wurden gesammelt und vergleichbare Volumina TCA-präzipitiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt sowie anschließend auf eine Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mittels anti-Caveolin-Antikörpern.

Da bei der Aufreinigung durch die Ni-NTA-Affinitätschromatographie die Cav-1-Partikel neben einer hohen Imidazolkonzentration von bis zu 250 mM auch einer 0,5 M NaCl-Konzentration ausgesetzt wurden, war die Frage nach der chemischen Stabilität dieser Partikel gegeben. Eine CsCl-Dichtezentrifugation der eluierten Fraktionen (150 mM und 250 mM) ergab hierbei eine identische Verteilung in diesen Gradienten wie vor der Chromatographie, d.h. Cav-1-haltige Fraktionen befanden sich in den Fraktionen 9-11 (Abb. 20). Durch diese Überprüfung wurde sichergestellt, daß die chemischen Eigenschaften der Cav-1-Partikel vor- und nach Ni-NTA-Chromatographie identisch waren. Dies war wichtig, denn eventuell auf diesen Partikeln befindliche Proteine durften für weitere Analysen nicht abgelöst werden.

1,063 g/ml \Rightarrow 1,35 g/ml CsCl (Stufengradient)

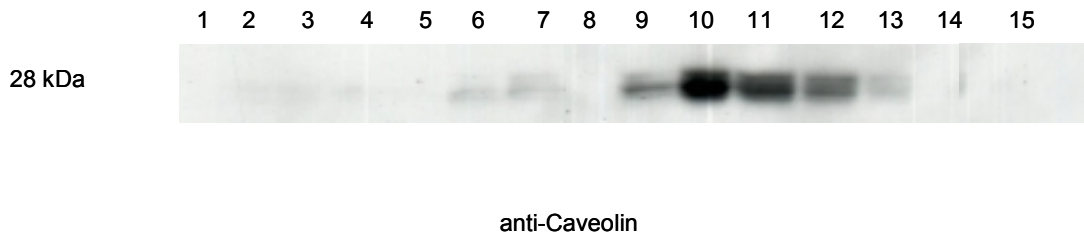
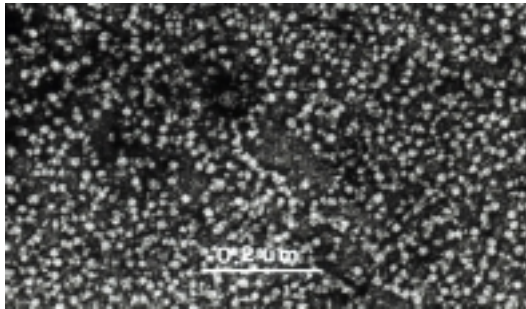


Abb. 20: Dichteverteilung von Cav-1 in CsCl-Gradienten nach Ni-NTA-Aufreinigung.

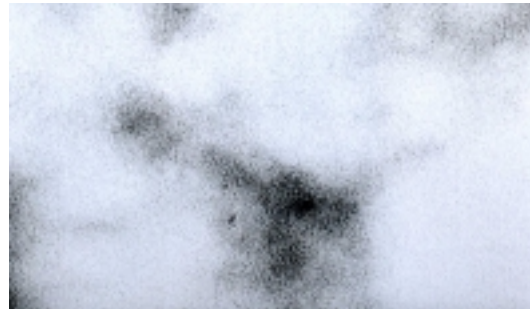
Cav-1-Lipoproteinpartikel wurden nach Aufreinigung mit Ni-NTA-Agarose erneut in CsCl-Gradienten getestet. Die Elutionsfraktionen (150 und 250 mM Imidazol) wurden kombiniert und auf einen CsCl-Stufengradienten (1,063-1,35 g/ml CsCl) gegeben und für 21 Stunden bei $200.000 \times g_{av}$ zentrifugiert. Nach Abnehmen der Fraktionen erfolgte eine TCA-Präzipitation, sowie SDS-PAGE und Transfer auf eine Membran. Die Detektion erfolgte mit anti-Caveolin-Antikörpern.

3.12 Elektronenmikroskopische Untersuchung von aufgereinigten Cav-1-Partikeln

Die affinitätschromatographisch aufgereinigten Cav-1-Partikel wurden nach Aufkonzentrierung (bis zu 1,5 mg/ml) morphologisch untersucht. In Zusammenarbeit mit Dr. Yunshu Ying (UTSW, Dallas, USA) wurden dabei elektronenmikroskopische Aufnahmen unter Verwendung der sog. Negativkontrastierung erstellt (Abb. 21 und 22). Die Proben wurden auf ein Nickel-Gitter gegeben und anschließend mit 1% Uranylacetat (in wässriger Lösung) gefärbt. Als Kontrolle eventueller, unspezifischer Färbungen wurde identischer Elutionspuffer parallel dazu untersucht. Die so eluierten Cav-1-Fractionen waren als Partikel heterogener Struktur und unterschiedlicher Größe erkennbar, die Größe betrug dabei durchschnittlich 15-34 nm. Im Kontrollpuffer war keiner dieser Strukturen sichtbar, was die Spezifität der Färbung, bzw. Aufreinigung belegt. Eine stärkere Vergrößerung der elektronenmikroskopischen Aufnahme (Abb. 21) zeigt die runde Morphologie der einzelnen Partikel, zudem ist eine Gitterstruktur auf diesen Partikeln erkennbar. Auffallend ist auch die hohe Dichte der einzelnen Partikel.



Angereicherte Fraktionen nach Ni-NTA-Aufreinigung



Pufferkontrolle

Abb. 21: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Cav-1-Partikel.

Negativkontrastierung von angereicherten Cav-1-Lipoproteinpartikeln nach Ni-NTA-Aufreinigung. Kombinierte 150 und 250 mM Imidazol-Elutionsfraktionen wurden kombiniert und konzentriert (A). Als Kontrolle wurde Puffer nach dem gleichen Protokoll behandelt (B). Balken: 0,2 µm.

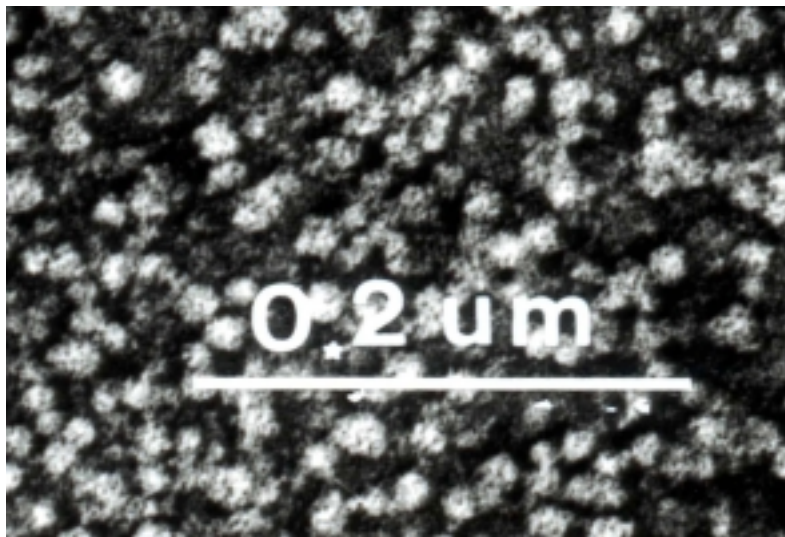


Abb. 22: Stärkere Vergrößerung der Cav-1-Partikel.

Ausschnitt aus Abb. 21 A mit stärkerer Vergrößerung. Balken: 0,2 µm.

3.13 Identifizierung von Proteinen in sekretierten Cav-1-Partikeln

Mit den oben vorgestellten Methoden wurde gezeigt, dass sekretierte Cav-1-Partikel durch kombinierte Aufreinigungsmethoden aus konditioniertem Medium von LNCaP-Zellen angereichert werden konnten. Elektronenmikroskopische Aufnahmen ermöglichten es sogar, diese Partikel zu visualisieren und ihre Morphologie zu analysieren. Für diese Analysen wurde konditioniertes Medium einer sequentiellen Aufreinigung unterzogen. Diese Aufreinigung bestand aus der Ni-NTA-Affinitätschromatographie, gefolgt von einer CsCl-Dichtezentrifugation. Nach der Dichtezentrifugation wurden die Fraktionen abgesammelt und nach TCA-Präzipitation in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Jeweils die Hälfte der Probe wurde auf ein SDS-PAGE aufgetragen, ein Gel diente der

Immunodetektion der Cav-1-Fractionen, das andere Gel wurde für eine Proteinfärbung mit Silber verwendet. Die in Abb. 23 mit (*) markierten Fractionen, d.h. 8-10, waren die Fractionen mit dem stärksten Cav-1-Anteil. Das Proteinmuster wurde mit dem Muster des Ausgangsmaterials, d.h. konditioniertem Medium verglichen, um Anreicherungen verschiedener Proteine in den Cav-1 Fractionen zu erkennen. Das Proteinmuster war dem des Ausgangsmaterials ähnlich, einige Proteine schienen jedoch relativ zum konditionierten Medium angereichert zu sein. Zwei der Proteinbanden wurden für eine weitere Charakterisierung ausgewählt.

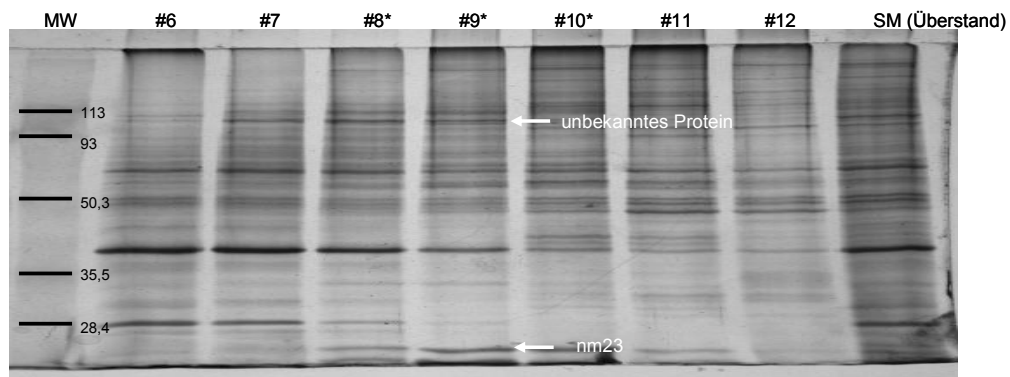


Abb. 23: Silber-Proteinfärbung angereicherter Proteine.

Konditionierter LNCaP-Überstand wurde in zwei Stufen über Ni-NTA-Chromatographie und CsCl-Dichtezentrifugation auf Cav-1-Partikel hin angereichert. Fraction 9 mit der höchsten Konzentration an Caveolin (durch Immunodetektion ermittelt) wurde in der Silberfärbung mit dem Ausgangsmaterial verglichen. Zwei angereicherte Banden wurden durch Massenspektroskopie identifiziert. Es waren ein bisher noch unbekanntes Protein sowie nm23, eine Proteinphosphodikinase.

Da die Proteinmenge sehr gering war, wurde für eine Identifikation der Proteine eine Massenspektroskopie angewandt. Hierbei wurden zunächst die zu identifizierenden Probenproteine aus dem Gel herausgeschnitten und über Nacht mit Trypsin (Spaltungsstelle Lysin und Arginin) proteolytisch verdaut. Nach Auftrag auf eine geeignete Matrix wurden die Peptide in einer Hochvakuumapparatur verdampft, der Dampf anschließend ionisiert (Elektrospraymethode, ES). Die erzeugten Ionen beschleunigten in einem elektrischen Feld und durchflogen eine feldfreie Strecke (Driftstrecke) und wurden durch elektrische und magnetische Felder so abgelenkt, dass Ionen unterschiedlicher Masse (genauer: Verhältnis Masse/Ladung (m/e)) unterschiedliche Flugbahnen durchliefen. Bei geeigneter Wahl der Ablenkmfelder wird erreicht, dass nur Ionen mit einem bestimmten Verhältnis m/e den Detektor erreichen. Werden die Ablenkmfelder zeitlich variiert, erscheinen die Ionen mit unterschiedlichem m/e zeitlich nacheinander am Detektor. Die Abhängigkeit des Ionenstromes von der Ionenmasse (bzw. von (m/e)) wird als Massenspektrum bezeichnet.

Durch das aufgenommene Massenspektrum lassen sich die einzelnen Peptide identifizieren, dabei werden in Datenbanken gespeicherte Proteinsequenzen mit den Spektren verglichen. Die Proteinsequenzen sind dabei so gespeichert, wie die Fragmente nach Trypsin-Verdau entstehen würden. Des Weiteren sind Aminosäuremodifikationen der einzelnen Proteine wie Isotopenverteilung ebenfalls in diesen Datenbanken gesichert. Durch spezielle Rechenoperationen, sowie Suchalgorithmen wurden die berechneten Fragmentmassen tryptisch verdauter -bekannter- Proteine mit den massenspektroskopisch ermittelten Massen der unbekannt Peptide verglichen, so ließen sich die errechneten und die gemessenen Werte einander zuordnen. Da jedoch bedingt durch methodische Schwankungen beispielsweise bei Verwendung unterschiedlicher Geräte o.Ä., diese Zuordnung niemals exakt ist, wurden mehrere Proteinkandidaten nach ihrer Wahrscheinlichkeit aufgelistet. Zudem ist eine gewählte Proteinbande aus einem Protein nie homogen zusammengesetzt, viele Proteine gleichen Molekulargewichtes sind in dieser Bande enthalten. Weiterhin können Datenbanksequenzen aus anderen Spezies wie beispielsweise Maus oder Ratte selbst bei existierenden Homologien zu falschen Identifikationen von Proteinen führen, die dann ebenfalls ausgeschlossen werden können. Problematisch ist ebenfalls ein fehlender Datenbankeintrag eines ermittelten Proteins. Solche Proteine können massenspektroskopisch natürlich nicht identifiziert werden, und es muss ein alternativer Ansatz über die Identifizierung des Genes gewählt werden.

Die beiden gewählten Proteinbanden (etwa bei 100 kDa, sowie 20 kDa) wurden aus dem SDS-PAGE vorsichtig herausgeschnitten, tryptisch verdaut, und massenspektroskopisch untersucht. Für das höhermolekulare Protein lag nach Datenbanksuche (Sonar Database (GenomicSolutions, Inc.) mittels NCBI-nr Protein Sequenz Datenbanken) kein Eintrag vor. Für das kleinere Protein ergab sich mit hoher Wahrscheinlichkeit als mögliches Protein die nm23- Nukleosid-diphosphat-kinase. Die Proteinsequenz der Datenbank wies dabei humanes nm23 als identifiziertes Protein aus, was mit dem aus konditioniertem Medium angereicherten Protein aus humanen LNCaP-Zellen übereinstimmte.

4 Diskussion

Der intrazelluläre, vesikuläre Transport zu den Recycling-Endosomen, sowie die Funktion dieser Endosomen-Population ist bisher in vielen Teilen unverstanden. Am Beispiel des Transferrin-Rezeptors, der nach Aufnahme seines Liganden Transferrin verschiedene Kompartimente wie Frühe-Endosomen, und auch Recycling-Endosomen sequentiell durchläuft, konnte die Verschiedenheit dieser Kompartimente in Morphologie, Proteinkomposition und intrazellulärer Lokalisation bestimmt werden, die exakte Rolle des Recycling-Endosoms und seines Markerproteins Rab11 ist jedoch immer noch unklar.

Um neue Erkenntnisse bezüglich dieses Kompartimentes zu gewinnen, sollte in der vorliegenden Arbeit versucht werden, den Transport zu Rab11-positiven Recycling-Endosomen *in vitro* zu rekonstituieren. Dabei wurden Frühe- und Recycling-Endosomen mit internalisiertem Ac-Tfn als Markerprotein (Donormembranen) mit immunisolierten Recycling-Endosomen (Akzeptor) in der Gegenwart von Cytosol inkubiert. Die Spezifität des Akzeptors sollte dabei durch die Verwendung von Antikörpern, die gegen das Markerprotein Rab11 (Ullrich et al., 1996) gerichtet waren, gewährleistet werden. Transport wurde als Transfer von Ac-Tfn zu immunisolierten Recycling-Endosomen definiert.

Die Verwendung eines *in vitro*-Transportsystems sollte aus mehreren Gründen erfolgen:

- a) Durch die *in vitro*-Analyse war es möglich einen definierten Transportschritt (Transport zu Recycling-Endosomen) isoliert zu beobachten.
- b) *In vitro*-Transport-Assays bieten die Möglichkeit einer Analyse frei von „störenden“ und schlecht definierbaren Bedingungen, wie sie bei *in vivo*-Systemen auftreten.
- c) Durch die hohe Reproduzierbarkeit bei zellfreien *in vitro*-Transportsystemen können bestimmte Substanzen (beispielsweise Drogen) und andere Parameter gezielt eingesetzt, und so deren Einfluss auf den Transport untersucht werden.

Bei der Etablierung des *in vitro*-Transportassays sollte zuerst die Spezifität der Immunisolierung, und damit die Spezifität des Transportes zu Recycling-Endosomen analysiert werden. Hierbei wurden *in vitro*-Fusionen zu Endosomen durchgeführt, die mit Rab11 gefällt wurden (Recycling-Endosomen), oder aber magnetische Partikel, die nicht mit Rab11-Antikörpern inkubiert wurden, (IgG-Kontrolle) dienten als „Akzeptor“. Die Ergebnisse zeigten eine hohe Spezifität der Fällung, bzw. des Transportes. Lediglich 7% dieses Hintergrundwertes der Fusion konnten detektiert werden. Mit diesen Experimenten, konnte die Stringenz des Transportes gezeigt werden. Um aber gänzlich diese unspezifischen Werte auszuschließen wurden parallel zu allen folgenden

Experimenten diese Hintergrundwerte gemessen und von dem jeweiligen Versuchspunkt subtrahiert, und dann als „% maximale Fusion“ dargestellt.

4.1 Temperatur und ATP

Vesikulärer Transport in lebenden Zellen ist temperaturabhängig. So verbleiben bei 20°C Proteine, die für die Sekretion bestimmt sind im Golgi-Apparat, bei 4°C kommt der gesamte Transport zum Erliegen (Matlin and Simons, 1983). Bei der Analyse des rekonstituierten *in vitro*-Transportes ergab sich eine Inhibierung des Transfers von Ac-Tfn zu Recycling-Endosomen auf unter 10%. Die sehr effektive Reduzierung *in vitro* zeigt die Vergleichbarkeit dieses Systems mit *in vivo*-Ereignissen. Als ein weiterer Faktor wurde bei der Inkubation von Akzeptor- und Donormembranen Energie in Form von ATP durch Zugabe eines ATP-erschöpfenden Systems dem Fusionsansatz entzogen. Hierbei ergab sich eine Inhibierung des Transportes um etwa 50%, fiel also im Gegensatz zur Temperatur-abhängigen Inhibierung schwächer aus. Diese Beobachtung erlaubt folgende Hypothesen:

einzelne Prozesse des vesikulären Transportes kommen ohne die Bereitstellung von Energie in Form von ATP aus. Dabei ist insbesondere an Vesikel auf den Donormembranen zu denken, die sich bereits im Prozess der Vesikelabspaltung („Budding“) befinden. Basierend auf dieser Hypothese würden frühe Prozesse während dieser Ablösung (Formierung der Membranen, Abschürungseignisse) Energie in Form von ATP-benötigen, während die eigentliche Ablösung von einzelnen Vesikeln und die nachfolgende Fusion mit der Akzeptormembran hingegen ein Prozess ist, der kein ATP benötigt. Möglich wären auch bereits in den Donorfraktionen vorkommende, abgeschnürte Vesikel, die mit internalisiertem Ac-Tfn frei vorliegen und anschließend mit den Akzeptormembranen fusionieren. Interessant in diesem Zusammenhang ist der in einigen Modellen diskutierte Nukleotid-Austausch von Rab-Proteinen, der Parallelitäten zu den oben beschriebenen Hypothesen aufweist (Jones et al., 1998): so liegen Rab-Proteine an der Donormembran in der GTP-gebundenen Form vor (nach Rekrutierung durch GEF), während die Fusion mit der Akzeptormembran während der Hydrolyse von GTP zu GDP geschieht (katalysiert durch GAP). D.h. die Rekrutierung von Energie findet (in diesem Fall durch GTP) findet an den Donormembranen vor den Fusionsereignissen statt. In wie weit Konversionen der verschiedenen Nukleotide (z.B. ATP zu GTP) in diesem System stattfinden ist jedoch unklar.

Eine experimentell bedingte, unspezifische Bindung („Docking“) von Donormembran an die Akzeptormembranen, die ebenfalls ATP-unabhängig verlaufen könnte wäre im Prinzip möglich, ist jedoch wegen der bereits oben beschriebenen Kontrollen (Abzug eventueller Hintergrundwerte) und der stringenten Waschschriffe unwahrscheinlich. Als weitere

Hypothese wären unterschiedliche Verläufe einer homotypischen, bzw. heterotypischen Fusion zu nennen. D.h. die homotypische Fusion ist unter Umständen von einem ATP-Gehalt unabhängig, während für eine heterotypische Fusion ATP essentiell ist. Die Unterscheidung einer homotypischen bzw. heterotypischen Fusion ist jedoch in diesem System nicht zu unterscheiden.

Bei der Untersuchung des zeitlichen Verlaufs vesikulären Transportes galt es neben der Charakterisierung dieses Transportes auch den Zeitpunkt einer maximalen Fusion zu ermitteln. Dieser Zeitpunkt war für nachfolgende Experimente von Wichtigkeit, da bei zu diesem Zeitpunkt zugegebene Reagenzien, die einen endosomal Transport zu Recycling-Endosomen beeinflussen könnten, hier einen maximalen Effekt entwickeln könnten. Bei der Analyse des Transportes zu verschiedenen Zeitpunkten zeigte sich ein stark zunehmender Anstieg dieses Transportes bis 30 min. Nach diesem Zeitpunkt erreichte der Transport eine Plateauphase bzw. eine leichte Inhibierung. Das Erreichen einer Plateauphase läßt folgende Vermutungen zu: zum einen hat der Transport zu diesem Zeitpunkt aufgrund von erschöpften Komponenten sein Maximum erreicht. Diese Komponenten könnten für den Transport essentielle Faktoren sein, die im Cytosol vorliegen. Das es sich bei einem dieser Faktoren um ATP handelt ist unwahrscheinlich, denn durch Zugabe eines ATP-regenerierenden Systemes wird Transport wohl nicht von diesem Faktor (in diesem Transport-Assay) limitiert. Es sind ein, oder mehrere, unbekannte Faktoren zu vermuten die hierbei eine Rolle spielen. Dies können Proteine oder andere Moleküle sein, aber auch eine Erschöpfung der Donorfraktion ist denkbar. Es ist zudem wahrscheinlich, dass das Erschöpfen dieser Faktoren ein systemimantes Problem darstellt, da in dem geschlossenen *in vitro*-System eine solche Erschöpfung eher denkbar ist als in einen offenen *in vivo*-System, wo beispielsweise niedrige Konzentrationen von Proteinen durch verstärkte Expression kompensiert werden können. Diese „Schwäche“ des *in vitro*-Assays birgt jedoch gleichzeitig den Vorteil, dass solche Faktoren/ Proteine durch die relativ rasche Erschöpfung leichter identifiziert werden können als in Experimenten mit lebenden Zellen. Diese Faktoren könnten durch Zugabe in das System zu einer Verlängerung der Plateauphase führen, das Entfernen dieser Faktoren hingegen könnte den Transport schon zu früheren Zeitpunkten inhibieren.

Das Erreichen einer Plateauphase in den vorgestellten Experimenten zur Zeitkinetik vesikulären Transportes läßt jedoch noch eine weitere Möglichkeit zu: es ist denkbar, dass sich zu dem Zeitpunkt von 30 min ein Gleichgewicht des Transportes eingestellt hat. Damit ist gemeint, dass der Transfer von Ac-Tfn zu immunisolierten Recycling-Endosomen die ganze Zeit in einer mehr oder weniger konstanten Rate verläuft. Neben diesem Transport zu Recycling-Endosomen ist aber auch ein Austransport von Ac-Tfn

aus eben diesen Recycling-Endosomen vorstellbar. Bis zu einem Zeitpunkt von 30 min ist der Transport zu Recycling-Endosomen höher als der Austransport. Erst ab diesen 30 min egalisieren sich Ein- bzw. Austransport, es kommt zu einer Stagnation, eben zu einer Plateauphase. Die sich andeutende Abnahme des Transportes läge dieser Hypothese zu Folge an einem verstärkten Austransport von Ac-Tfn aus Recycling-Endosomen bzw. einem geringeren Transport zu diesen Endosomen. Eine Kombination beider Möglichkeiten, d.h. die Egalisierung von Ein- und Austransport, sowie die Erschöpfung von für *in vitro*-Fusion essentieller Faktoren ist dabei ebenfalls denkbar, ist durch den hier vorgestellten experimentellen Ansatz nicht zu klären.

4.2 GDI

Bei der Rekonstitution vesikulären Transportes zu Recycling-Endosomen sollte auch die Rolle der Rab-Proteine in diesen Prozessen untersucht werden. Dies lag nahe, denn neben der Funktion dieser Proteine als Schlüsselregulatoren vesikulären Transportes wurden die Recycling-Endosomen durch den für diese Kompartimente spezifischen Marker Rab11 isoliert. Bei dieser Analyse bot sich die Zugabe von GDI zu dem System an. GDI ist aufgrund seiner Fähigkeit Rab-Proteine (GDP-gebunden) von ihren spezifischen Membranen zu extrahieren, und im Cytosol als Rab-GDP-GDI zu komplexieren ein gut etablierter Inhibitor von Rab-Funktion *in vitro* und *in vivo* (Chen et al., 1998; Pfeffer et al., 1995). GDI wurde in rekombinanter Form (His₆-GDI) aufgereinigt und gegen Fusionspuffer dialysiert in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt (Ullrich et al., 1993). Die Verwendung des Faktors zeigte eine Inhibierung des Transportes um etwa 50%. Da es zu keiner vollständigen Inhibierung des Transportes kam, könnte an der Eigenschaft der GDI's liegen lediglich Rab-Proteine in GDP-gebundener Form zu binden. Rab-Proteine in der GTP-gebundenen, „aktiven“ Form wären weiterhin in der Lage Fusionsprozesse zu katalysieren. Ähnlich wie bei der Inhibierung durch ATP-Erschöpfung könnten auch hier bereits „geprimte“ Vesikel bzw. Membrandomänen an der Donormembran vorliegen, die reguliert durch Rab-Proteine spezifisch an der Akzeptormembran andocken und dann mit dieser fusionieren. Erst nach diesen Fusionsprozessen, die mit einer GTP-Hydrolyse des Rab-gebundenen Nukleotids verbunden sind, könnten Rab-Proteine durch GDI extrahiert werden und als Komplex im Cytosol verbleiben und so für einen neuen Zyklus nicht mehr zur Verfügung stehen.

Durch die Inhibierung des Transfers von Ac-Tfn durch GDI zeigt sich, dass es sich bei den Transportschritten vermutlich um einen Rab-katalysierten Prozess handelt, durch die promiskuitive Bindung von GDI an unterschiedliche Rab-Proteine lässt sich im vorgestellten *in vitro*-Fusionsassay jedoch keinerlei Aussage darüber machen, welches Rab-Protein bzw. Rab-Proteine für die Limitierung des Transportes verantwortlich sind. Es

könnte Rab11 sein, dessen Extraktion zu dieser Inhibierung führt oder aber auch andere Rab-Proteine. Zudem ist es durch die Heterogenität der Donormembranen möglich, dass unterschiedliche Fusionsereignisse unterschiedlich von der Regulation durch Rab-Proteine abhängig sind. So ist vorstellbar, dass bei einer homotypischen Fusion von Recycling-Endosomen Rab-Proteine essentiell sind, bei einer heterotypischen Fusion von Frühen-Endosomen mit Recycling-Endosomen jedoch nicht. Dieses Modell ist natürlich auch umgekehrt denkbar. Eine weitere Möglichkeit wäre eine basale Verringerung des Transportes von Ac-Tfn zu Recycling-Endosomen, während der Austransport von Ac-Tfn aus diesen konstant bleibt. Dies würde bedeuten, dass verschiedene Ereignisse des vesikulären Transportes verschieden stark von Rab-Proteinen reguliert werden würden, bzw. von Rab-Proteinen in unterschiedlichen Nukleotid-Bindekonformationen. Während entsprechend dieser Theorie das Loslösen von Vesikeln (Budding) nicht von Rab-Proteinen reguliert werden würde, wäre diese Regulation jedoch beim Andocken und der Fusion von Vesikeln essentiell. Vergleiche mit anderen Publikationen zeigen zudem, dass auch in diesen Experimenten eine Inhibierung vesikulären Transportes durch GDI niemals vollständig erfolgen konnte (Ikonen et al. 1995).

4.3 Cytochalasin D

Das Aktin-Cytoskelett spielt eine wichtige Rolle in intrazellulären Transportmechanismen. Um diesem Aspekt hinsichtlich seiner Bedeutung in dem vorgestellten *in vitro*-Transportassay gerecht zu werden, wurde Cytochalasin D in den Experimenten getestet. Cytochalasin D ist ein Pilzalkaloid aus *Zygosporium mansonii* und hemmt viele intrazelluläre Prozesse, die auf intakte Aktinfilamente angewiesen sind, wie den vesikulären Transport aber auch Muskelbewegungen. Bei Zugabe von Cytochalasin D werden die Aktinfilamente jedoch nicht zerstört, vielmehr wird ihre Assoziation durch so genanntes „capping“ unterbunden. Dabei bindet das Alkaloid an die „Plus“-Enden der Aktinfilamente, eine Dissoziation kann demnach weiter stattfinden, nicht jedoch ein Neuaufbau der Filamente. Bei der Zugabe von Cytochalasin D wurde eine Inhibierung des Transportes von etwa 50% beobachtet. Diese Inhibierung lässt einen direkten Zusammenhang zwischen dem Transport und dem Aktin-Cytoskelett vermuten. Worin dieser Zusammenhang besteht ist jedoch durch den hier verwendeten Transport-Assay nicht exakt zu klären. Vorstellbar wäre eine Rolle des Aktins bei der Abschnürung von Vesikeln der Donormembran. So wurde bei A431-Zellen beobachtet, dass nach Aktin-Depolymerisation durch Latrunculin zwar Membraninvaginationen (Clathrin-umhüllte Invaginationen) erfolgten, eine Abschnürung dieser Invaginationen („membrane fission“) jedoch unterblieb (Lamaze et al., 1997). Die Autoren postulierten eine gerichtete Kraftbewegung mittels Aktinfilamenten die diese Membranabschnürung gewährleistete.

Die Inhibierung des vorgestellten *in vitro*-Transportes wäre beispielsweise in einem Verbleiben von Donormembranen im Stadium des Abschnürens zu erklären, d.h. eine Loslösung von Vesikeln und eine anschließende Fusion mit der Akzeptormembran und damit ein Transfer von Ac-Tfn zu diesen Membranen wäre nicht möglich. Neben einer Funktion des Aktins bei der Abschnürung von Vesikeln wäre eine Aufgabe bei dem gerichteten Transport denkbar. Bei dem intrazellulären Transport von alpha-2-Makroglobulin und Transferrin (Durrbach et al., 1996) konnte gezeigt werden, dass Aktinfilamente nicht nur die Aufnahme dieser Proteine, sondern auch den Weitertransport in die Lysosomen (für alpha-2-Makroglobulin), bzw. das Recycling zur Plasmamembran (Transferrin) erhöht (Durrbach et al., 1996).

Die Inhibierung des Transfers von Ac-Tfn zu immunisolierten Recycling-Endosomen durch Cytochalasin D ergab erste Hinweise auf eine Interaktion von Aktinfilamenten mit diesem definierten Transportschritt. Zur Untersuchung einer eventuellen, direkten Interaktion von Rab11 und Aktin wurde mittels Affinitätschromatographie durch Inkubation von immobilisiertem Rab11 und Rattenlebercytosol nach dieser Wechselwirkung gesucht. Das Ergebnis dieser Experimente ergab starke Interaktionen einzelner, cytosolischer Proteine mit Rab11. Durch Immunodetektion konnte eines dieser Proteine als Aktin identifiziert werden. Die eluierten Fraktionen der Affinitätschromatographie, die nach Dialyse zu den *in vitro*-Fusionsexperimenten zugegeben wurden, stimulierten zusätzlich den Transfer von Ac-Tfn zu Recycling-Endosomen. Die Resultate dieser Experimente sind schlüssig zu Ergebnissen anderer Autoren, so konnten Trischler et al. (1999) in Immunisierungsexperimenten eine Lokalisation von Aktin auf Recycling-Endosomen nachweisen. In identischen Experimenten, bei denen mittels anti-Rab-5 Antikörpern eine Immunisierung von Frühen-Endosomen durchgeführt wurde konnte eine solche Lokalisation nicht festgestellt werden. Die hier beschriebene Interaktion von Rab11 und Aktin unterstützt dabei diese Ergebnisse. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen Rab11 und Aktin ist durch die Zugabe von Cytochalasin D (Inhibierung des *in vitro*-Transportes) bzw. durch die Zugabe der eluierten Fraktionen, die Aktin enthalten (Stimulation des Transportes) wahrscheinlich. Da jedoch die eluierten Fraktionen ein heterogenes Proteingemisch darstellen, ist jedoch ohne weitere, eingehender Analysen auch eine Beteiligung anderer, zusätzlicher Fraktionen möglich. Ebenfalls unklar ist, ob es sich bei der Rab11-Aktin-Interaktion um eine direkte oder aber um eine indirekte Interaktion über weitere Proteine (als Proteinkomplex handelt).

4.4 Myosin-Motorproteine als mögliche Interaktionspartner zu Rab11 und Aktin

Der Transport entlang von Aktinfilamenten wurde *in vitro* bei der Beobachtung von Organellen und Vesikeln in Axoplasma festgestellt, dieser Transport kam durch die Zugabe von Aktin-depolymerisierenden Reagenzien zum Erliegen (Mermall and Miller., 1995). Die Autoren postulierten eine Beteiligung von Proteinen der Myosin-Superfamilie, Aktin-Motorproteine. Von diesen Proteinen wurden im Menschen bisher 40 verschiedene Proteine identifiziert (Sellers, 2000), die sich in 18 verschiedene Klassen unterordnen lassen. Myosine der Klassen VI und IX sind dabei die einzigen, die sich in Richtung „Minus“-Ende der Filamente bewegen, während alle anderen eine Bewegung in Richtung „Plus“-Ende zeigen (Wells et al., 1999; Inoue et al., 2002). Myosine sind in den intrazellulären, vesikulären Transport involviert, wie Untersuchungen an Hefen zeigten. *Saccharomyces cerevisiae* besitzt insgesamt 5 Myosin-codierende Gene, wobei jeweils zwei für die Myosine der Klasse V bzw. I codieren, während eines für ein Myosin der Klasse II codiert. Temperatur-sensitive Mutationen in den Genen für Myosin V führten zu Desorganisation des Aktin-Cytoskeletts, und Akkumulationen von sekretorischen Vesikeln (Johnston et al., 1991). Vesikel erreichten bei diesen Mutationen nicht ihre Zielmembranen, vermutlich durch fehlende Aktinfilamente, die als Schienen bei einem gerichteten Transport nicht mehr zur Verfügung standen. Auch beim Säugetieren führen Mutationen in Myosinen der Klasse V zu Fehlfunktionen vesikulären Transportes: bei Menschen mit dem so genannten Griscelli-Syndrom fehlt Patienten eine Pigmentierung der Haut, und sie leiden an Immunologischen, und Neurologischen Fehlfunktionen (Pastural et al., 1997). Bei bestimmten Mäusen haben Mutationen auf dem Myosin V Gen ebenfalls Neuronale Defekte und sie besitzen anstelle der normalen schwarzen Fellfarbe eine braune bis weiße Fellfärbung (Mercer et al., 1991). Bei beiden Organismen ist die Ursache für die fehlende Pigmentierung ähnlich: Transportvesikel für den Farbstoff (Melanosomen) die normalerweise in die dendritischen Ausläufer der Zellen (Melanocyten) transportiert werden, verbleiben im Zentrum dieser Zellen (Pastural et al., 1997; Provance et al., 1996). Myosin V liegt normalerweise an diesen Melanosomen assoziiert vor, und der Verlust des Proteins beeinträchtigt vermutlich einen gerichteten Transport zu den Zielkompartimenten dieser Vesikel.

Bei dem intrazellulären, vesikulären Transport, der durch Rab-Proteine und zahlreiche an diese Proteine bindende Moleküle reguliert wird, gehören auch Myosine zu diesen Effektoren. Als erstes wurde eine solche Verbindung zwischen Rab27 und einem Myosin der Klasse V (Va) entdeckt (bisher alle Myosine, die als Effektoren Rab-Proteine binden gehören der Klasse V an). Tatsächlich wurden bei den meisten Patienten mit dem oben beschriebenen Griscelli-Syndrom keine Genveränderung auf den Myosin-Genen entdeckt, sondern Mutationen auf dem Gen für Rab27 (Menasche et al., 2000).

Neben der hier vorgestellten Interaktion von Rab11 und Aktin, konnte in anderen Publikationen eine solche Wechselwirkung ebenfalls festgestellt werden, dabei wurden nicht Bindungen von Rab11 direkt an Aktin sondern über Myosin-Motorproteine beobachtet. So zeigte sich in Hefe Two-Hybrid-Systemen eine Interaktion zwischen Rab11 und Myosinen (Lapierre et al., 2001). Die Autoren zeigen, dass ein Teil des Myosins Vb (ein 60 kDa Abschnitt vom C-Terminus des Proteins) direkt mit Rab11 interagiert. Myosin Vb -GFP zeigte in MDCK- und HeLa-Zellen zudem eine Kolo-kalisation mit endogenem Rab11, sowie dem Transferrin-Rezeptor. Alle drei Proteine waren zudem in der perinukleären Region des Recycling-Endosoms lokalisiert wie Immunfluoreszenzaufnahmen ergaben. Bei Experimenten mit GFP-Myosin Vb-Schimären, die keine Motordomäne besaßen, konnte in HeLa-Zellen ein verminderter Transport von Transferrin durch das Recycling-Endosom, bei polarisierten Epithelzellen (MDCK) dagegen eine verminderte Transcytose von plgR beobachtet werden (Lapierre et al., 2001)

4.5 Cytoskelett und intrazellulärer Transport

Die in dieser Arbeit gezeigten Hinweise auf eine Beteiligung des Aktin-Cytoskeletts an intrazellulärem, vesikulären Transport *in vitro* durch Inhibierung des Transportes mittels Cytochalasin D, der Nachweis einer Interaktion von Rab11 und Aktin, sowie die Stimulation des Transfers von Ac-Tfn zu immunisolierten Recycling-Endosomen durch die Aktin-enhaltende Fraktion der Affinitätschromatographie werden durch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen unterstützt, die eine Interaktion von Rab11 mit Aktin-Motorproteinen (Myosinen) detektierten (Lapierre et al., 2001). Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung des Aktin-Cytoskeletts und eventueller Motorproteine könnte der reduzierte Transport in dem in dieser Arbeit vorgestellten *in vitro*-System unter ATP-erschöpfenden Bedingungen sein. Beim Aufbau von Aktinfilamenten ist Energie in Form von ATP nötig, und auch die Myosine, die an Aktin binden haben spezielle ATP-Bindedomänen. Die Umwandlung von chemischer Energie in mechanische Energie (ATP-Hydrolyse) gewährleistet den Transport entlang von Filamenten. Allerdings scheint der Transport entlang von Aktinfilamenten kein generell gültiges Prinzip vesikulären Transportes zu sein. So wurden -ebenfalls durch affinitätschromatographische Aufreinigungen- Interaktionen von Rab5 mit Tubulin-Proteinen entdeckt (Christoforidis et al., 1999). Trischler et al. (1999) fanden diese Proteine auf immunisolierten Frühen-Endosomen, nicht jedoch auf Recycling-Endosomen, auch konnte beobachtet werden, wie sich Rab5-positive Frühe-Endosomen entlang von Mikrotubuli bewegen (Nielsen et al., 1999). Worin die exakten Unterschiede zwischen einem Transport entlang von Aktin-

bzw. Tubulinfilamenten bestehen ist bisher unklar, jedoch scheint im Gegensatz zu den frühen Prozessen des endocytotischen Transportes beim Recycling von Molekülen durch das Recycling-Endosom eher ein Transport entlang von Aktinfilamenten stattzufinden. Es sind weitere, nachfolgende Experimente nötig, um die eine Interaktion von Rab11 und Aktin über eventuelle Motorproteine zu verifizieren, zudem müssen weitere Proteine, die mit Rab11 in der Affinitätschromatographie stark interagierten identifiziert, und ihre Stellung im vesikulären Transport bestimmt werden. Weitere Aspekte wären Analysen bezüglich einer Binde-Präferenz dieser interagierenden Proteine bezüglich der Nukleotid-Bindung von Rab11 (GTP- bzw. GDP-gebunden). Diese Analysen könnten beispielsweise durch massenspektrometische Identifizierung der Proteine erfolgen, ein Ansatz der auch bisher unbekannte, oder in diesen Transportwegen unerwartete Interaktionspartner identifizieren würde, oder aber durch den Einsatz von Antikörpern die gegen bestimmte, im vesikulären Transport vermutete Proteine gerichtet wären. Hierbei wären insbesondere die bereits oben erwähnten Myosine zu nennen.

4.6 Sekretiertes Caveolin-1

Caveolin-1 ist bisher als integrales Membranprotein auf der Innenseite der Plasmamembran in Caveolae bekannt. Durch die Entdeckung, dass dieses Protein überraschenderweise auch von exokrinen Zellen sekretiert wurde, stellte sich die Frage nach der Funktion eines solchen sekretierten Proteins, der Transportroute des Proteins aus der Zelle, sowie nach der Beschaffenheit dieses sekretierten Proteins, denn aufgrund der hydrophoben Membrandomäne war eine Sekretion als Lipoproteinpartikel wahrscheinlich (Liu et al., 1999). Daneben konnte Cav-1 auch in anderen Kompartimenten wie dem Cytosol oder den Mitochondrien entdeckt werden (Li et al., 2001).

Die Sekretion wurde erstmalig bei exokrinen, pankreatischen Zellen entdeckt (Liu et al., 1999). Tahir et al., (2001) entdeckten, dass diese Sekretion auch bei Tumorgewebe von Patienten mit Prostatakrebs beobachtet werden konnte. Diese Sekretion war nicht nur in dem originären Tumor, sondern auch in Metastasen wie in den Lymphknoten oder dem Knochenmark zu detektieren. Auch in der Zellkultur mit den Prostatakrebs-Zellen LNCaP konnte diese Sekretion unter bestimmten Bedingungen beobachtet werden. In den von den Autoren definierten LNCaP-Zellen mit einer hohen Passagenzahl gab es eine Expression von Cav-1 und auch eine Sekretion eines Cav-1 Partikels. Behandlung mit den Steroidhormonen Dihydroxytestosteron (DHT) und Dexamethasone (Dex) führten zu einer Steigerung der Sekretion *in vitro*. In Experimenten mit Rattenpankreas *in vivo* konnten durch Perfusionen mit Dex ebenfalls Steigerungen der Sekretion erzielt werden (Liu et al., 1999). Interessanterweise sind LNCaP-Zellen niedriger Passagenzahl nicht in der Lage Cav-1 zu exprimieren und können daher auch keine Cav-1-Partikel sekretieren. Der Grund für dieses unterschiedliche Verhalten könnte vielleicht in der zunehmenden Differenzierung der Krebszellen liegen, da die Autoren jedoch keine konkreten Passagenzahlen angeben, bzw. Passagen definieren, ist eine Aussage darüber nicht zu treffen. ES wurde daher hier der Weg einer transienten Transfektion gewählt. Die in dieser Arbeit gewonnenen Cav-1-Partikel wurden von den LNCaP-Zellen niedriger Passagen exprimiert und auch sekretiert, während das bei Kontrolltransfektionen mit lacZ-c-DNA nicht der Fall war. Bei diesen sekretierten Partikeln war davon auszugehen, dass sie gleiche oder ähnliche Eigenschaften wie sekretiertes Cav-1 endogener Expressionen beispielsweise von Rattenpankreaszellen besaßen. Die Sekretion von Cav-1 in transient transfizierten Zellen zeigte ebenfalls eine Steigerung der Sekretion nach Behandlung mit Dex bzw. DHT (Tahir et al., 2001).

Es konnte bei der Verwendung sekretierter Cav-1-Partikel transient transfizierter Zellen davon ausgegangen werden, dass diese die gleichen Eigenschaften wie sekretierte Partikel von endogen exprimierten Zellen besaßen. Als eine erste Charakterisierung sollte eine Definition der Größe dieser Partikel vorgenommen werden. In zwei alternativen Ansätzen, der FPLC, sowie der nativen Blau-Gelelektrophorese konnte ein ungefähres Molekulargewicht von etwa 900 kDa ermittelt werden. Die Ergebnisse aus den FPLC-Analysen konnten hierbei zu etwas exakteren Bestimmungen des Molekulargewichtes führen, da die Verwendung der nativen Blau-Gelelektrophorese systemimmanent eine nicht so scharfe Bestimmung erlaubt. In den FPLC-Analysen zeigte sich eine Trennung von Cav-1-Partikeln von der Hauptmasse anderer sekretierter Proteine. Es erwies sich jedoch (ebenso wie in der nativen Blau-Gelelektrophorese) eine recht unscharfe Verteilung der Proteine. Diese Beobachtung lässt mehrere Vermutungen zu: Es könnte sich bei diesen Partikeln um Teilchen heterogener Größe handeln, d.h. Caveolin wird als integraler Bestandteil verschiedener, in der Größe divergierender Lipidpartikel sekretiert. Dabei könnte die heterogene Größe aufgrund unterschiedlicher Lipidzusammensetzung, bzw. unterschiedlicher Proteinkomposition definiert sein. Alternativ dazu könnte die Lipidzusammensetzung prinzipiell identisch sein, und ein unterschiedlicher Anteil von Caveolin-1 in diesen Partikeln wäre für eine solche Heterogenität verantwortlich. So wären Partikel, die 10 Moleküle Cav-1 enthielten um etwa 300 kDa leichter. Aufgrund der FPLC-Analysen wären solche kleineren Partikel jedoch Subpopulationen, der großen Hauptpopulation mit etwa 900 kDa. Die Heterogenität könnte schließlich in experimentell bedingten Disruptionen der Partikel liegen, d.h. während der Probenpräparation behandelte Partikel zerfallen und treten als entsprechend kleinere „Subpopulationen“ auf. Da dies in zwei unterschiedlichen Experimenten zu beobachten ist, würden dieser Zerfall im Rahmen der Zellkulturbedingungen zu suchen sein. So könnten die transienten Transfektionen zu einer solchen Zerstörung führen oder aber sekretierte Partikel degradieren mit der Zeit und haben so ein entsprechend kleineres Molekulargewicht.

4.7 Dichtebestimmung

Als ein nächster Punkt sollte die Dichte der sekretierten Partikel untersucht werden. Hierbei wurden Dichtezentrifugationen mit zwei unterschiedlichen Medien (CsCl und Optiprep) durchgeführt. Da bei den Partikeln aufgrund der hydrophoben Membrandomäne des Cav-1 eine Sekretion als hydrophobes Membranprotein postuliert wurde, wurde im Vergleich in identischen Gradienten ApoA1 aufgetragen. ApoA1 ist ein Hüllprotein des High-Density-Lipoproteins (HDL). HDL-Partikel besitzen eine Dichte von $> 1,06 \text{ g/cm}^3$ und sie bestehen hauptsächlich aus Cholesterin in ihrem Kern, umgeben von eben diesen

Hüllproteinen. Ihre Aufgabe ist die Aufnahme von Cholesterin im Blut (beispielsweise von absterbenden Zellen und abgebauten Membranen). In beiden Gradienten zeigte sich eine partielle Überlappung von Cav-1 und ApoA1, was die Annahme eines Lipoprotein-Charakters der sekretierten Partikel unterstützt, denn freie Proteine oder auch Proteinaggregationen von Cav-1 würden sich am Boden des Gradienten finden. Die Verteilung von Cav-1 im Gradienten ist jedoch bei den CsCl-basierenden Medien recht groß. Neben der heterogenen Größe zeigt sich also auch eine heterogene Dichte der Partikel. Neben dem bereits erwähnten, experimentell bedingten Zerfall der Partikel, der eine solche Verteilung verursachen könnte, wären auch unterschiedliche Lipid-Protein-Anteile denkbar. Zudem ist die Überlappung mit ApoA1 in den CsCl-Gradienten geringer. Bei der Verwendung von Optiprep-Medien hingegen zeigt sich zum einen eine schärfere Verteilung im Gradienten und zum anderen eine größere Überlappung mit ApoA1. Dies lässt vermuten, dass bei der Verwendung von Optiprep-Medien eine schonendere Behandlung und damit einer bessere Auftrennung der Partikel möglich war. Optiprep wird mit isoosmotischen Hepes-Puffern verdünnt und gilt im Gegensatz zu der Verwendung von CsCl mit seinen hohen Salzkonzentrationen als schonender (Houghton et al., 2000).

Die Verteilung von Cav-1 in den CsCl-Gradienten im Vergleich mit Ergebnissen aus der Literatur (Liu et al., 1999), zeigt, dass auch die transient transfizierten Zellen Cav-1-Partikel sekretieren, dem in Überständen von löslichen Rattenpankreaszellen sezernierten Cav-1-Partikeln hinsichtlich der Dichte sehr ähnlich sind (Liu et al., 1999). „Natürlich“ sekretiertes Cav-1 zeigt ebenfalls eine ähnliche Verteilung wie ApoA1 in diesen Gradienten, jedoch ist die Streuung in den Gradienten geringer als in LNCaP-Zellen. Dies könnte in der unterschiedlichen Handhabung der Proben liegen, die zu einer stärkeren Zerstörung von Partikeln in LNCaP-Zellen beispielsweise durch Degradation führt, könnte aber auch an den unterschiedlichen Zellarten liegen, d.h. die professionell sekretierenden Pankreaszellen der Ratte zeigen ein anderes Sekretionsspektrum als die humanen Prostatakrebszellen, vielleicht auch bedingt durch die Induktion der Expression durch Transfektion. Hier wären für die Zukunft weitere Experimente sinnvoll, die unterschiedliche Zellen miteinander vergleichen würden, und neue Erkenntnisse über eventuelle Unterschiede und Gemeinsamkeiten hinsichtlich der sekretierten Partikel erbringen würden. Vorstellbar wären auch verschiedene Kategorien hinsichtlich der Sekretion, so ob beispielsweise Krebszellen eine andere Population von Partikeln (vielleicht sogar mit einer unterschiedlichen Lipid-/ Proteinkomposition) sekretieren als Pankreaszellen oder Zellen der Leber, falls in diesen Zellen überhaupt eine Sekretion stattfindet.

4.8 Aufreinigung von Partikeln durch Ni-NTA-Chromatographie

Beide Methoden, FPLC und Dichtezentrifugationen, erwiesen sich für die Aufreinigung sekretierter Cav-1-Partikel als zu ungenügend. Durch die Verwendung von Cav-1-c-DNA mit Sequenz für 6 angefügte Histidine am N-Terminus des Proteins ergab sich Möglichkeit einer Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose. N- und C-Terminus des Cav-1 befinden sich normalerweise im Cytosol, während die hydrophobe Membrandomäne zwischen beider Termini lokalisiert ist. In sekretierten Lipoproteinpartikeln sollte Cav-1 demnach mit der Membrandomäne in diesen verankert sein, während die Termini nach außen in das Medium ragen, und somit für Aufreinigungen zugänglich wären. Konditioniertes Medium, das nach Inkubation mit Ni-NTA-Partikeln auf eine Säule gegeben wurde, wurde anschließend eluiert. Die Aufreinigung erfolgte dabei so schonend wie möglich und wurde durch kompetitive Elution mit steigenden Imidazol-Gradienten durchgeführt. Cav-1-Partikel zeigten eine starke Interaktion mit der Matrix und konnten erst mit einer Imidazol-Konzentration von 150 mM eluiert werden. Aber auch bei Konzentrationen von 250 mM Imidazol wurden noch Partikel von der Säule eluiert. In der Tat ergaben Immunodetektionen der Eluate eine annähernd gleiche Menge Cav-1-Partikel mit einer Gesamt-Proteinkonzentration von bis zu 20 µg/ ml. Es wurden aufgrund dieser niedrigen Proteinkonzentration daher beide Fraktionen für nachfolgende Analysen verwendet. Keine Elution erfolgte hingegen bei einer Konzentration von 10 mM Imidazol und auch bei Waschschritten mit einer Salzkonzentration von 0,5 M NaCl ließ sich keine Elution von Cav-1 Partikeln feststellen.

Bevor die durch Ni-NTA-Chromatographie aufgereinigten Lipoproteinpartikel für die weitere, charakterisierende Experimente verwendet wurden, sollte zunächst überprüft werden, ob die biochemischen Eigenschaften der Partikel durch diese Anreicherung verändert wurde. Hierbei wurden die eluierten Fraktionen der Chromatographie in CsCl-Dichtegradienten auf ihre Dichte hin überprüft. In gleichen Experimenten konnte dabei eine ähnliche Verteilung in den Gradienten wie vor der Aufreinigung durch Ni-NTA-Partikel erzielt werden. Es war zu beobachten, dass Cav-1 in gleichen Fraktionen zu finden war, zudem war die Verteilung in den Gradienten geringer. Das könnte dadurch zu erklären sein, dass eventuell aufgebrochene, bzw. zerstörte Lipoproteinpartikel durch die Waschschrritte (10 mM Imidazol) entfernt wurden, und nicht mehr auf die Gradienten aufgetragen wurden. Insgesamt lässt sich jedoch sagen, dass eine Anreicherung der Partikel durch die Chromatographie die biochemischen Eigenschaften hinsichtlich der Dichte nicht beeinflusst.

Die angereicherten Cav-1-Partikel der Ni-NTA-Affinitätschromatographie sollten in einem ersten Schritt morphologisch analysiert werden. Dies war insbesondere daher von großer Wichtigkeit, da über die Morphologie neben einer Bestimmung der Struktur der Partikel zudem auch eine Aussage über die in den vorangegangenen Experimenten gezeigte Heterogenität hinsichtlich der Größe gemacht werden sollte. Für die Bestimmung der Morphologie wurden aufgereinigte Partikel durch die Negativkontrastierung elektronenmikroskopisch beobachtet. Im Vergleich zu identisch behandelten Elutionspuffer (Kontrollansatz) zeigte sich eine hohe Anzahl der Partikel in einer großen Dichte. Die Morphologie dieser Partikel war kreisrund und sie besaßen eine Größe von 15-35 nm.

Die durch Elektronenmikroskopie erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass die Partikel sich durch eine Heterogenität in der Größe auszeichneten, wie durch die vorangegangenen Experimente bereits vermutet. Es ist jedoch auch mit dieser Methodik nicht festzustellen, ob diese Heterogenität durch eine eventuelle Zerstörung der Partikel herbeigeführt wurde, oder ob dies natürliche Schwankungen, bzw. unterschiedliche Partikel-Populationen sind. Die runde Morphologie der Partikel unterstützt jedoch die Annahme, dass sekretiertes Cav-1 in Form eines Lipoproteinpartikels vorliegt. Es ist jedoch unklar, und mit dieser Methodik nicht zu untersuchen, wie viele Moleküle Cav-1 sich auf den Partikeln befinden. Weitere Analysen beispielsweise durch Immunfluoreszenzmikroskopie oder durch Elektronenmikroskopie mit Immunogold (unter Verwendung von Gold-gekoppelten Cav-1 Antikörpern) könnten diese Unklarheiten beseitigen, zudem könnte so festgestellt werden, ob die Größe der Partikel mit dem Cav-1 Anteil korrespondiert.

Auffallend waren auch die gitterartigen Strukturen, die auf den einzelnen Partikeln nach stärkerer Vergrößerung sichtbar waren. Ob diese Strukturen auf Cav-1 zurückzuführen sind ist unklar. *In vivo* bildet Cav-1 jedoch als Hüllprotein bei invaginierten Caveolae ein filamentöses Netzwerk, das in elektronenmikroskopischen Aufnahmen eben diese Gitterstruktur aufweist (Anderson, 1998). Diese Filamente können sich auch spontan *in vitro* bilden: so wurde bei GST-Fusionsproteinen mit dem cytoplasmatischen N-Terminus (Aminosäure 1-101) eine spontane Bildung von Oligomeren (Sargiacomo et al., 1995). Wurden das Fusionsprotein um die Aminosäuren 81-101 verkürzt, so wurde diese Oligomerisierung aufgehoben. *In vivo* wird die Bildung von Komplexen zudem durch Palmitolierung bestimmter (Cystin-) Aminosäuren stabilisiert, daneben sind diese Modifikationen essentiell für den Transport des Proteins vom ER an die Plasmamembran (Machleidt et al., 2000). Durch die hier vorgestellten Methoden lässt sich nicht sagen, ob Cav-1 auf diesen Partikeln Oligomere formt, und diese die netzartige Struktur darstellen, oder ob dies mit anderen Proteinen zusammen oder gänzlich unabhängig von Cav-1

geschieht. Es ist jedoch anzunehmen, dass Strukturen, wie sie sich an der Plasmamembran bei invaginierten Caveolae darstellen, durchaus auch auf diesen Partikeln zu finden sind, da Cav-1 wahrscheinlich in einer hydrophoben Umgebung integriert vorliegt, wie dies ja auch in der Plasmamembran stattfindet. Hohe räumliche Nähe könnte dann zu einer solchen Oligomerisierung führen.

Eines der Ziele der Arbeit war es neben Cav-1 noch weitere, auf den Lipoproteinpartikeln befindliche Proteine zu identifizieren. Durch kombinierte Ni-NTA-Chromatographie und CsCl-Dichtezentrifugationen konnten Cav-1-haltige Fraktionen in einer Proteinfärbung mit Silber visualisiert werden, und nach Vergleich mit dem Ausgangsmaterial bestimmte angereicherte Proteine durch Massenspektroskopie identifiziert werden. Die Silberfärbung zeigte eine Vielzahl von Banden in den Cav-1 Fraktionen, viele davon waren auch in dem Ausgangsmaterial zu finden. Dies bedeutet, dass die Aufreinigung trotz der hohen Stringenz der Ni-NTA-Chromatographie noch nicht so ausreichend war, um ausschließlich Proteine die sich auf den Partikeln befinden anzureichern. Es war jedoch zu erkennen, dass die Gesamtzahl der Banden (und damit der Proteine) geringer war als im Ausgangsmaterial. Bei höheren Proteinkonzentrationen der Cav-1-Fraktionen könnten in Zukunft sicher weitere Aufreinigungsschritte unternommen werden, dies war jedoch in den hier vorgestellten Arbeiten aufgrund der bereits beschriebenen, geringen Proteinkonzentration nicht möglich.

4.9 Nm23

Als eines der Proteine in den Cav-1-Fraktionen gegenüber dem Ausgangsmaterial wurde die Nukleosid-diphosphat-kinase nm23 identifiziert. Nukleosid-diphosphat-kinase 23 (nm23) ist Teil einer kleinen Genfamilie mit drei anderen Homologen Genen (H1, H2 und H3) zu diesem etwa 20 kDa großem Protein. Die Gene dieser Familie gehören zu den sog. „Krebs-Kritischen“ Genen, nach denen entweder zu hohe, oder zu geringe Genaktivität zu Krebs führen kann. Ist die Genaktivität erhöht, so führt das bei den Onkogenen zu einer erhöhten Krebsgefahr. Bei ???dien ist genau gegenteilig bei geringer oder keiner Genaktivität die Gefahr eines Krebs gegeben. Die Gene der nm23 Genfamilie gehören zu der Klasse der Tumor-Suppressor-Gene (nm steht für „nicht-metastasierend“). Verminderte Expression führt bei Tumorbildung, verstärktem Tumorwachstum und einer vermehrten Metastasenbildung (Leone et al., 1991; Fukuda et al., 1996). Neben der bisherigen Vermutung von nm23 als Tumor-Suppressor gibt es jedoch auch Publikationen, die neben verminderter Genexpression von nm23 auch eine verstärkte Produktion von nm23 als Ursache von Tumoren bei bestimmten Zellen sehen (Huer et al., 1997). Generell lässt sich jedoch sagen, dass Tumorpatienten mit einer erhöhten

nm23-Expression eine bessere Prognose im Krankheitsverlauf haben als Patienten deren Expression niedriger ist.

Neben einer Expression von nm23 ist bei einigen Tumorarten auch eine Sekretion des Proteins zu beobachten. Nm23 war beispielsweise in Überständen kultivierter Maus-Blutkrebszellen zu detektieren, das Protein hatte in diesen Überständen noch eine vollständige Kinase-Funktion (Okabe-Kado et al., 1995). Auch in Lungenkrebszellen des Menschen war eine solche Sekretion zu beobachten (Huwer et al., 1994; Engel et al., 1995). Eine Co-Sekretion eines Tumor-Suppressor-Genes mit Cav-1 in Prostatakrebszellen weist auf die Möglichkeit von sekretiertem Cav-1 als autokrinen/parakrinen Faktor hin, der unter Umständen Krebswachstum verringert. Die Möglichkeit dieser Inhibierung ist jedoch eher unwahrscheinlich, da Cav-1 Partikel zum einen auch von normal teilenden Zellen sekretiert wird (Liu et al., 1999), zum anderen sekretiertes Cav-1 von anderen Autoren eher als stimulierender bei der Metastasenbildung, und Tumorwachstum vermutet wird (Tahir et al., 2001). In der Tat zeigen mit Cav-1 Antikörpern inkubierte Überstände mit sekretierten Lipoproteinpartikeln *in vivo* und *in vitro* ein reduziertes Tumorwachstum und auch die Metastasenbildung ist geringer (Tahir et al., 2001). Bei der Sekretion beider Proteine sind daher andere Funktionen zu vermuten, die Unabhängig von Tumorverbreitung und Tumorentstehung zu vermuten sind. In weiteren Experimenten wird daher zu prüfen sein, ob beide Proteine auch in Nicht-Tumorzellen weiterhin eine Co-Sekretion zeigen. Zudem ist es von großer Bedeutung, die anderen, noch nicht identifizierten Proteine, die sich ebenfalls auf den Lipoproteinpartikeln befinden zum einen zu bestimmen, und zum anderen in den Kontext ihrer Funktion mit möglichen Funktionen sekretierten Cav-1 zu stellen.

4.10 Mögliche Funktionen von sekretiertem Cav-1

Die Funktion des sekretierten, Cav-1-enthaltenden Lipoproteinpartikels ist zu Zeit ebenso unklar wie der Weg der Sekretion. Möglich wäre eine Transportweg, nachdem Cav-1 nach Membraninsertion in Caveolae die Plasmamembran verlässt und zunächst als Lipoproteinpartikel im Cytosol vorliegt. Tatsächlich wurden diese Lipoproteinpartikel im Cytosol gefunden (Uittenbogaard et al., 1998; Ito et al., 2002). Vom Cytosol könnten die Partikel im ER über den Golgi-Apparat in sekretorische Vesikel integriert werde und anschließend die Zelle verlassen. Bei diesem Modell müsste aber ein Rücktransport an die Plasmamembran unterbunden werden.

Es ist jedoch unklar, ob neben dem postulierten Transportweg noch weitere Funktionen für cytosolisches, als Lipoproteinpartikel vorliegendes, Cav-1 möglich sind. Diese

Möglichkeit wird durch Experimente unterstützt, die Cav-1 auch in Mitochondrien nachweisen konnten.

Eine mögliche Funktion für sekretiertes Cav-1 wäre die Rolle als extrazellulärer Lipidtransporter.

Intrazellulär ist Cav-1 an dem Transport speziell von Cholesterol beteiligt. Der Cholesterol-Spiegel in der Zelle muss weitgehend konstant bleiben, da beispielsweise GPI-Proteine nicht in Caveolae verbleiben (Chang et al., 1992), des weiteren verlieren Caveolae ihre Integrität und Membraninvaginationen sind verringert. Die Effekte sind ähnlich denen, wenn Cholesterol-Transport durch Reagenzien inhibiert wird (Smart et al., 1996). Da die Integrität von Caveolae und damit verschiedene Funktionen im Zusammenhang mit Caveolae stark von dem Cholesterolgehalt in diesen Membrandomänen abhängt, wird ein Transport-System vermutet, dass diese Funktionen übernimmt. Der Transport von neu synthetisiertem Cholesterol an die Plasmamembran ist ein sehr rascher Prozess, der wahrscheinlich direkt vom ER zur Plasmamembran, d.h. nicht über den Golgi-Apparat verläuft (Urbani and Simoni 1990). Werden Proteine und Lipide in Zellen durch Inkubation bei 14°C im ER zurückgehalten und danach die Temperatur rasch auf 37°C erhöht, so findet sich Cholesterol sehr rasch in den Caveolae (Smart et al., 1996). Caveolae scheinen jedoch nicht nur aus neu synthetisiertem Cholesterol zu bestehen, auch über LDL aufgenommenes Cholesterol befindet sich in Caveolae (Fielding and Fielding, 1995; Fielding and Fielding, 1996). Da Zellen ständig Cholesterol in das extrazelluläre Medium hin abgegeben, wird vermutet, dass dieses Efflux über Caveolae erfolgt. Der Transport von Cholesterol vom ER scheint dabei durch Caveolin-1 zu geschehen. Bei Experimenten, die Cholesterol in Caveolae durch Enzyme oxidierten, war Cav-1 kurze Zeit später im ER zu detektieren, wurde das Enzym wieder entfernt, und es fand keine Oxidation von Cholesterol mehr statt, erschien das Protein wieder in Caveolae (Smart et al., 1995). Bei Experimenten, die Cav-1 in Zellen überexprimierten zeigte sich ein stärkerer Cholesterol-Gehalt in Caveolae als in Zellen ohne eine solche Überexpression. Je nach Cholesterol-Gehalt könnte das Cholesterol-bindende Protein Caveolin-1 Lipide vom ER an die Plasmamembran transportieren. Die Funktion eines intrazellulären, Cholesterol-Transportproteines ist auch bei der sekretierten Form des Cav-1 denkbar, und wird durch die Vermutung unterstützt, dass die Sekretion als Lipoproteinpartikel erfolgt. Ein solcher Cholesterol-Transporter könnte unter Umständen nicht über rezeptorvermittelte Endocytose (wie beim LDL), sondern direkt durch Bindung über Caveolae erfolgen. Hierbei wäre ein extrazellulärer Rezeptor denkbar, der an ein Protein des Partikels bindet, und Cholesterol direkt in Caveolae integriert. Dieser Transport wäre schneller und gerichteter als über herkömmliche

Lipidtransporter und könnte Caveolae, deren Integrität durch Cholesterol-Mangel beeinträchtigt ist, sofort stabilisieren.

Zukünftige Aufgaben, um diese Hypothese zu unterstützen oder aber auch um sie zu widerlegen wären eine Identifikation der weiteren Proteine, die sich auf den Partikeln befinden. Daneben sollten in Bindungsstudien eventuelle Interaktionen mit Oberflächenrezeptoren ermittelt werden, die Hinweise auf eine Funktion des Partikels als Lipidtransporter ergeben könnten. Auch die Analyse der Lipidkomposition der Partikel könnte dabei hilfreich sein zu bestimmen, ob ein Transport z.B. von Cholesterol tatsächlich möglich ist. Daneben könnte diese Funktion im Zusammenhang der Wirkung des Cav-1 als autokriner/ parakriner Faktor untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Der Transferrin-Zyklus ist ein wichtiges Modell für den intrazellulären Transport, daher sollten in der vorliegenden Arbeit einzelne, immer noch unverstandene Prozesse des vesikulären, intrazellulären Transportes durch die Charakterisierung eines *in vitro*-Transportassays untersucht werden. Der Ansatz eines *in vitro*-Systems wurde deshalb gewählt, um mit Experimenten in denen einzelne Faktoren und bestimmte Konditionen untersucht werden sollten, diese unter definierten, reproduzierbaren Konditionen durchzuführen, die in einem *in vivo*-System kaum zu gewährleisten sind. Ohne den Einfluss von „störenden“, weil unkontrollierten Faktoren, wie es bei *in vivo*-Systemen der Fall ist, konnte im vorliegenden Ansatz der Transport zu immunisolierten Recycling-Endosomen (die Isolierung erfolgte hierbei mit anti-Rab11-Antikörpern, einem Marker für Recycling-Endosomen) unter bestimmten Bedingungen untersucht werden. Dabei wurde als Marker Acridinium-markiertes Transferrin gewählt, welches in Zellen internalisiert wurde. Die Spezifität des Transportes in dem zellfreien System war hierbei sehr hoch, wie Kontrollexperimente in Immunisierungsansätzen ohne Rab11-Antikörper zeigten. Im Rahmen einer ersten Charakterisierung des Transportassays wurden essentielle, für den *in vivo*-Transport essentielle Parameter auch in den *in vitro*-Experimenten untersucht. Hierbei wurde zum einen der Faktor Temperatur gewählt, da Transport in Zellen bei 4°C in der Regel zum Erliegen kommt. Dies konnte auch in dem vorgestellten System gezeigt werden. Ein weiterer, essentieller Faktor ist Energie in Form von ATP. ATP-Depletion wurde in den Experimenten durch Hinzugabe eines ATP-erschöpfenden Systems erzielt. Auch hier zeigte der Transport von Ac-Tfn zu Recycling-Endosomen eine starke Inhibierung.

Mit Hilfe des so charakterisierten Assays konnten anschließend weitere Experimente durchgeführt werden, die den Einfluss von bestimmten Reagenzien und Konditionen auf den Transport untersuchten. So zeigte der Transport in Zeitverlaufsexperimenten einen Anstieg des Transportes bis 30 Minuten, bei 30 Minuten wurde ein Maximum erreicht. Nach Erreichen dieses Maximums war nachfolgend eine leichte Abnahme des Transfers von Ac-Tfn zu den Recycling-Endosomen zu beobachten. Da Rab-Proteine als Schlüsselregulatoren für den intrazellulären, vesikulären Transport gelten, und die Immunisolierungen mit anti-Rab11-Antikörpern durchgeführt wurden, wurde somit auch der Einfluss dieser GTPasen auf das Transportsystem untersucht. Zugegebenes GDI, welches in der Lage ist Rab-Proteine in GDP-gebundener Form von spezifischen Membranen zu extrahieren, und daher ein gut untersuchter Inhibitor von Rab-Funktionen ist, konnte auch in diesem Transportassay den Transport von Transferrin inhibieren. Ein weiterer Aspekt war die Rolle des Cytoskelettes im intrazellulären Transport. Da in

früheren Untersuchungen (Trischler et al., 1999) Aktin auf Recycling-Endosomen gefunden wurde, erfolgte in diesen Arbeiten eine Konzentration auf die Rolle des Aktin in diesen Transportprozessen. Durch die Zugabe von Cytochalasin D, das einen Aufbau von Aktingerüsten verhindert, wurde der Transport ebenfalls inhibiert.

Durch affinitätschromatographische Aufreinigungen konnte eine starke Interaktion von Aktin an immobilisiertes Rab11 gezeigt werden. Die eluierten Fraktionen, die neben Aktin noch weitere, jedoch unbekannte Proteine enthielten, konnten in dem *in vitro*-Fusionsassay eingesetzt werden und führten dort zu einer Stimulation des Transportes. Neben dem gefundenen Aktin, könnten somit noch weitere, unbekannte Proteine in dem Proteingemisch wichtige Funktionen im intrazellulären, vesikulären Transport übernehmen. Eine Identifizierung dieser Proteine ist dabei für weiterführende Arbeiten essentiell.

Caveolin-1, Markerprotein für die Caveolae-Membrandomäne wird überraschenderweise von verschiedenen Zellen sekretiert. Da Caveolin-1 normalerweise ein integrales Membranprotein ist, wird von einer Sekretion als Lipoproteinpartikel ausgegangen. Die Rolle dieses sekretierten Partikels ist unbekannt, wobei einige Autoren eine Funktion als autokrinen/ parakrinen Faktor vorschlagen (Tahir et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit sollten diese Partikel daher aufgereinigt und erstmals charakterisiert werden. Die Partikel wurden aus transient transfizierten LNCaP-Zellen gewonnen, die Cav-1 in das serumfreie Medium abgaben. In einer ersten Größenuntersuchung durch FPLC konnte ein Molekulargewicht zwischen 2.000.000 Da und 660.000 Da bestimmt werden. Diese Resultate konnten durch den Ansatz der nativen Blau-Gelelektrophorese bestätigt werden. In einem weiteren Ansatz, der die Dichte der Partikel charakterisieren sollte, wurde in zwei unterschiedlichen Ansätzen (CsCl-, sowie Optiprep Dichtezentrifugation) eine ähnliche Dichte des Partikels wie HDL ermittelt. Um eine stärkere Aufreinigung der Partikel zu erzielen, wurde eine Aufreinigung mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose durchgeführt. Dies war möglich, denn die bei der Transfektion verwendete C-DNA trug einen His₆-tag. Die so aufgereinigten Partikel verloren auch nach der Ni-NTA-Chromatographie nicht ihre biochemischen Eigenschaften, wie in überprüfenden CsCl-Gradienten zu sehen war. Die Partikel konnten anschließend zum ersten Mal in elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Negativkontrastierung) visualisiert werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen ob auf Cav-1 Lipoproteinpartikeln noch weitere Proteine zu finden waren. Durch eine kombinierte Aufreinigung über Ni-NTA Chromatographie und CsCl-Dichtezentrifugation und im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial konnten in der Silberfärbung Proteinbanden erkannt werden, die wie Cav-1 in den Fraktionen angereichert vorlagen. Eine massenspektroskopische Identifikation einer der Banden

ergab, dass es sich hierbei um nm 23 (Nukleosid-diphosphat-kinase) handelte, einem Protein das ebenfalls von verschiedenen Tumoren sekretiert wird.

6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
2-ME	2-Mercaptoethanol
Ac	Acridinium-NHS Ester
AK	Antikörper
Apo	Apolipoprotein
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
av	Average, Durchschnittlich
BSA	Rinderserumalbumin
Cav	Caveolin
CHO	Chinese Hamster Ovary
Dex	Dexamethasone
DHT	Dihydroxytestosteron
ddH ₂ O	aqua bidestillata
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA1	Early Endosome Autoantigen 1
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fe	Eisen
FKS	Fötales Kälberserum
FPLC	Fluid Phase Liquid Chromatography
g	Gramm
g _{av}	Erdbeschleunigung (Durchschnitt)
GAP	GTPase Activating Proteins
GDF	GDI Displacement Factor
GDI	Guanyl-nucleotide-dissociation-inhibitor
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guanin Nucleotide Exchange Factor
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HDL	High Density Lipoprotein
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure

His	Histidin
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDL	Low density Lipoprotein
M	Molar
MEM	Minimal Essential Medium
min	Minute(n)
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molekulargewichtsausschluss
Ni	Nickel
NSF	<i>N</i> -Ethylmaleimide Sensitive Fusion Protein
NTA	Nitrilo-Essigsäure
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
PNS	Postnuklearer Überstand
RLC	Rattenlebercytosol
Rpm	Rounds per Minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SNAP	Soluble NSF Attachment Protein
SNARE	SNAP-Rezeptor
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Tf	Transferrin
TfR	Transferrin-Rezeptor
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
Tris	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht

7 Literatur

- Alexandrov, K., Horiuchi, H., Steele-Mortimer, O., Seabra, M., and Zerial, M.** (1994). Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes. *EMBO J.* **13**, 5262-5273.
- Anderson, H. A., Chen, Y. and Norkin, L. C.** (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**, 1825-34.
- Anderson, R. G.** (1998). The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 199-225.
- Anderson, R. G., Kamen, B. A., Rothberg, K. G. and Lacey, S. W.** (1992). Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* **255**, 410-411.
- Band, A. M., Ali, H., Vartiainen, M. K., Welti, S., Lappalainen, P., Oikkonen, V. M. and Kuismanen, E.** (2002). Endogenous plasma membrane t-SNARE syntaxin 4 is present in rab11 positive endosomal membranes and associates with cortical actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* **531**, 513-519.
- Bartz, R.** (1999). Herstellung und Charakterisierung eines polyklonalen Antikörpers gegen Rab11 zur Analyse von Recycling-Endosomen. *Diplomarbeit Universität Mainz*.
- Berg, J. S., Powell, B. C. and Cheney, R. E.** (2001). A millennial myosin census. *Mol. Biol. Cell* **12**, 780-794.
- Bleil, J. D. and Bretscher, M.S.** (1982). Transferrin receptor and its recycling in HeLa cells. *EMBO J.* **1**, 351-355.
- Bock, J. B., Matern, H. T., Peden, A. A. and Scheller, R. H.** (2001). A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* **409**, 839-841.
- Bourne, H., Sanders, D. and McCormick, F.** (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**, 117-127.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brown, M. S. and Goldstein, J.L.** (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**, 34-47.
- Chang, W. J., Rothberg, K. G., Kamen, B. A. and Anderson R. G.** (1992) Lowering the cholesterol content of MA104 cells inhibits receptor-mediated transport of folate. *J. Cell Biol.* **118**, 63-69.
- Chang, W. J., Ying, Y. S., Rothberg, K. G., Hooper, N. M., Turner, A. J., Gambliel, H. A., DeGunzburg, J., Mumby, S. M., Gilman, A. G. and Anderson, R. G.** (1994). Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. *J. Cell Biol.* **126**, 127-138.
- Chen, W., Feng, Y., Chen, D. and Wandinger-Ness, A.** (1998). Rab11 is required for trans-Golgi network-to-plasma membrane transport to a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Mol. Biol. Cell* **9**, 3241-3257.

- Christoforidis, S., McBride, H. M., Burgoyne, R. D. and Zerial, M.** (1999A). The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* **397**, 621-625.
- Conrad, P.A, Smart, E.J., Ying Y. S., Anderson, R. G. and Bloom, G. S.** (1995). Caveolin cycles between plasma membrane caveolae and the Golgi complex by microtubule-dependent and microtubule-independent steps. *J. Cell Biol.* **131**, 1421-1433.
- Coonrod, A., Li, F. Q. and Horwitz, M.** (1997). On the mechanism of DNA transfection: efficient gene transfer without viruses. *Gene Ther.* **12**, 1313-1321.
- Dever, T. E., Glynias, M. J. and Merrick, W. C.** (1987). GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **84**, 1814-1818.
- Dirac-Svejstrup, A. B., Sumizawa, T. and Pfeffer, S. R.** (1997). Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab-GTPases from Rab-GDI. *EMBO J.* **16**, 465-472.
- Dunn, K. W., McGraw, T. E. and Maxfield, F. R.** (1989). Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. *J. Cell Biol.* **109**, 3303-3314.
- Dupree, P., Parton, R. G., Raposo, G., Kurzchalia, T. V. and Simons, K.** (1993). Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J.* **12**, 1597-1605.
- Durrbach, A., Collins, K., Matsudaira, P., Louvard, D. and Coudrier, E.** (1996). Brush border myosin-I truncated in the motor domain impairs the distribution and the function of endocytic compartments in an hepatoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 7053-7058.
- Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapere, J. J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I. and Goud, B.** (1998). Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* **279**, 580-585.
- Engel, M., Veron, M., Theisinger, B., Lacombe, M. L., Seib, T., Dooley, S. and Welter, C.** (1995). A novel serine/threonine-specific protein phosphotransferase activity of Nm23/nucleoside-diphosphate kinase. *Eur. J. Biochem.* **234**, 200-207.
- Escola, J. M., Grivel, J. C., Chavrier, P. and Gorvel, J. P.** (1995). Different endocytic compartments are involved in the tight association of class II molecules with processed hen egg lysozyme and ribonuclease A in B cells. *J. Cell Sci.* **108**, 2337-2345.
- Evans, H. W.** (1992). Isolation and characterization of membranes and cell organelles. *In Preparative centrifugation: a practical approach* (Ed. D. Rickwood), 233-270. Oxford, Oxford University Press.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M. and Danielsen, M.** (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **84**, 7413-7417.
- Feron, O., Smith, T. W., Michel, T. and Kelly, R. A.** (1997). Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 17744-17748.

- Fielding, P. E. and Fielding, C. J.** (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, P. E., Fielding, C. J.** (1995). Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry* **34**, 14288-14292.
- Fuchs, H., Lucken, U., Tauber, R., Engel, A. and Gessner, R.** (1998). Structural model of phospholipid-reconstituted human transferrin-receptor derived by electron microscopy. *Structure* **6**, 1235-1243.
- Gershon, H., Ghirlando, R., Guttman, S. B. and Minsky, A.** (1993). Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry* **28**, 7143-7151.
- Ghosh, R. N., Gelman, D. L. and Maxfield F. R.** (1994). Quantification of low density lipoprotein and transferrin endocytic sorting in HEp2 cells using confocal microscopy. *J. Cell Sci.* **107**, 2177-2189.
- Gorvel, J. P., Chavier, P., Zerial, M. and Gruenberg, J.** (1991). Rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* **64**, 915-925.
- Gruenberg, J. and Maxfield, F. R.** (1995). Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 552-563.
- Hay, J. and Scheller, R.** (1997). SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 505-512.
- Hill, E., Clarke, M. and Barr, F. A.** (2000). The Rab6-binding kinesin, Rab6-KIFL, is required for cytokinesis. *EMBO J.* **21**, 5711-5719.
- Hoffenberg, S., Liu, X., Nikolova, L., Hall, H. S., Dai, W., Baughn, R. E., Dickey, B. F., Barbieri, M. A., Aballay, A., Stahl, P. D. and Knoll, B.J.** (2000). A novel membrane-anchored Rab5 interacting protein required for homotypic endosome fusion. *J. Biol. Chem.* **32**, 24661-24669.
- Holtta-Vuori, M., Maatta, J., Ullrich, O., Kuismanen, E. and Ikonen, E.** (2000). Mobilization of late-endosomal cholesterol is inhibited by Rab guanine nucleotide dissociation inhibitor. *Curr. Biol.* **2**, 95-98.
- Hopkins, C. R.** (1983). Intracellular routing of transferrin and transferrin receptors in epidermoid carcinoma A431 cells. *Cell* **35**, 321-330.
- Hopkins, C. R., Gibson, A., Shipman, M. and Miller, K.** (1990). Movement of internalized ligand-receptor complexes along a continuous endosomal reticulum. *Nature* **346**, 335-339.
- Hopkins, C. R., Gibson, A., Shipman, M., Strickland, D. K. and Towbridge I. S.** (1994). In migrating fibroblasts, recycling receptors are concentrated in narrow tubules in the pericentriolar area, and then routed to the plasma membrane of the leading lamella. *J. Cell Biol.* **125**, 1265-1274.
- Hunziker, W. and Peters, P. J.** (1998). Rab17 localizes to recycling endosomes and regulates receptor-mediated transcytosis in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 15734-15741.

- Huwer, H., Engel, M., Welter, C., Dooley, S., Kalweit, G., Feindt, P. and Gams, E.** (1994). Squamous cell carcinoma of the lung: does the nm23 gene expression correlate to the tumor stage? *Thorac. Cardiovasc. Surg.* **5**, 298-301.
- Huwer, H., Kalweit, G., Engel, M., Welter, C., Dooley, S. and Gams, E.** (1997). Expression of the candidate tumor suppressor gene nm23 in the bronchial system of patients with squamous cell lung cancer. *Eur. J. Cardiothorac Surg.* **2**, 206-209.
- Ikonen, E., Tagaya, M., Ullrich, O., Montecucco, C. and Simons, K.** (1995). Different requirements for NSF, SNAP, and Rab proteins in apical and basolateral transport in MDCK cells. *Cell* **4**, 571-580.
- Inoue, A., Saito, J., Ikebe, R. and Ikebe, M.** (2002). Myosin IXb is a single-headed minus-end-directed processive motor. *Nat. Cell Biol.* **4**, 302-306.
- Jahn, R. and Südhof, T.C.** (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 863-911.
- Johnston, G. C., Prendergast, J. A. and Singer, R. A.** (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. *J. Cell Biol.* **3**, 539-551.
- Jones, S., Richardson, C. J., Litt, R. J. and Segev, N.** (1998). Identification of regulators for Ypt1 GTPase nucleotide cycling. *Mol. Biol. Cell.* **9**, 2819-37.
- Klausner, R. D., Harford, J. and van Renswoude, J.** (1984). Rapid internalization of the transferrin receptor in K562 cells is triggered by ligand binding or treatment with a phorbol ester. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3005-3009.
- Lamaze, C., Fujimoto, L. M., Yin, H. L. and Schmid, S.** (1997). The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 20332-20335.
- Lämmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lapierre, L. A., Kumar, R., Hales, C. M., Navarre, J., Bhartur, S. G., Burnette, J. O., Provance, D. W. Jr., Mercer, J. A., Bahler, M. and Goldenring, J. R.** (2001). Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems. *Mol. Biol. Cell.* **6**, 1843-1857.
- Lee, S. W., Reimer, C. L., Oh, P., Campbell, D. B. and Schnitzer, J. E.** (1998). Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene* **16**, 1391-1397.
- Leone, M., Cucuccio, S., Venturini, P. L., Valenzano-Menada, M., Messeni Leone, M. and De Cecco, L.** (1991). Immunohistochemical localization of epidermal growth factor receptor in leiomyomas from women treated with goserelin depot. *Horm. Metab. Res.* **23**, 442-445.
- Li, W. P., Liu, P., Pilcher, B. K. and Anderson, R. G.** (2001). Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria. *J. Cell Sci.* **114**, 1397-1408.
- Liu, P., Li, W. P., Machleidt, T. and Anderson, R. G.** (1999). Identification of caveolin-1 in lipoprotein particles secreted by exocrine cells. *Nat. Cell Biol.* **6**, 369-375.

- Lutcke, A., Parton, R. G., Murphy, C., Olkkonen, V. M., Dupree, P., Valencia, A., Simons, K. and Zerial, M.** (1994). Cloning and subcellular localization of novel rab proteins reveals polarized and cell type-specific expression. *J. Cell Sci.* **107**, 3437-48.
- Machleidt, T., Li, W. P., Liu, P. and Anderson, R. G.** (2000). Multiple domains in caveolin-1 control its intracellular traffic. *J. Cell Biol.* **148**, 17-28.
- Marsh, M., Griffiths, G., Dean, G. E., Mellman, I. and Helenius, A.** (1986). Three-dimensional structure of endosomes in BHK-21 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2899-2903.
- Mastick, C. C., Brady, M. J. and Saltiel, A. R.** (1995). Insulin stimulates the tyrosine phosphorylation of caveolin. *J. Cell Biol.* **129**, 1523-1531.
- Mastick, C. C. and Saltiel, A. R.** (1997). Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of caveolin is specific for the differentiated adipocyte phenotype in 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 20706-29714.
- Matlin, K. S. and Simons, K.** (1983). Reduced temperature prevents transfer of a membrane glycoprotein to the cell surface but does not prevent terminal glycosylation. *Cell* **34**, 233-243.
- McBride, H. M., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Teasdale, R. and Zerial M.** (1999). Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell* **98**, 377-386.
- Menasche, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F. and de Saint Basile, G.** (2000). Mutations in Rab27a cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat. Genet.* **25**, 173-176.
- Mermall, V. and Miller, K. G.** (1995). The 95F unconventional myosin is required for proper organization of the Drosophila syncytial blastoderm. *J. Cell Biol.* **129**, 1575-1588.
- Mercer, J. A., Seperack, P. K., Strobel, M. C., Copeland, N. G., Jenkins, N. A.** (1991). Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature* **349**, 709-713.
- Monier, S., Parton, R. G., Vogel, F., Behlke, J., Henske, A. and Kurzchalia, T. V.** (1995). VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell* **7**, 911-927.
- Morgan, E. H.** (1981). Inhibition of reticulocyte iron uptake by NH₄Cl and CH₃NH₂. *Biochem. Biophys. Acta* **642**, 119-134.
- Murphy, R. F.** (1991). Maturation models for endosome and lysosome biogenesis. *Trends Cell Biol.* **1**, 77-82.
- Nielsen, E., Severin, F., Backer, J. M., Hyman, A. A. and Zerial, M.** (1999). Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nature Cell Biol.* **1**, 376-382.
- Novick, P. and Zerial, M.** (1997). The diversity of rab proteins in vesicle transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 496-504.
- Palade, G. E.** (1953). Fine structure of blood capillaries, *J. Appl. Physics* **24**, 368-384.

- Palade, G. E.** (1975). Intracellular aspects of the process of protein secretion. *Science* **189**, 347-358.
- Parton, R. G.** (1994). Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. *J. Histochem. Cytochem.* **42**, 155-166.
- Pastural, E., Barrat, F. J., Dufourcq-Lagelouse, R., Certain, S., Sanal, O., Jabado, N., Seger, R., Griscelli, C., Fischer, A. and de Saint Basile, G.** (1997) Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nat. Genet.* **16**, 289-292.
- Pearse, B. M.** (1982). Coated vesicles from human placenta carry ferritin, transferrin and immunoglobulin G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 451-455.
- Pelham, P. R.** (1990). The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 483-486.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J. and Helenius, A.** (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* **3**, 473-483.
- Pfeffer, S. R., Dirac-Svejstrup, A. B. and Soldati, T.** (1995). Rab GDP dissociation inhibitor: putting rab GTPases in the right place. *J. Biol. Chem.* **270**, 17057-17059.
- Porath, J. and Olin, B.** (1983). Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry* **29**, 1621-1630.
- Provance, D. W. Jr, Wei, M., Ipe, V. and Mercer, J.A.** (1996) Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 14554-14558.
- Rao, K., van Renswoude, J., Kempf, C. and Klausner, R.D.** (1983). Separation of transferrin in endocytosis. Role of the acidic endosome. *FEBS Lett.* **160**, 213-216.
- Roettger, B. F., Rentsch, R. U., Pinon, D., Holicky, E., Hadac, E., Larkin, J. M. and Miller, L. J.** (1995). Dual pathways of internalization of the cholecystokinin receptor. *J. Cell Biol.* **128**, 1029-1041.
- Rothman, J. E. and Sollner, T. H.** (1997). Throttles and dampers: controlling the engine of membrane fusion. *Science* **276**, 1212-1213.
- Salminen, A. and Novick, P. J.** (1987). A *ras*-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell* **49**, 527-538.
- Sargiacomo, M., Scherer, P. E., Tang, Z., Kubler, E., Song, K. S., Sanders, M. C. and Lisanti, M. P.** (1995). Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 9407-9411.
- Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z. and Lisanti, M. P.** (1993). Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **122**, 789-807.
- Schagger, H., Aquila, H. and von Jagow, G.** (1988). Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal. Biochem.* **173**, 201-205.

- Segev, N.** (2001). Ypt/rab Gtpases: regulators of protein trafficking. *Sci. STKE* **18**, RE11.
- Segev, N., Mulholland, J. and Botstein, D.** (1988). The yeast GTP-binding YPT1 protein and a mammalian counterpart are associated with the secretion machinery. *Cell* **52**, 915-24.
- Sellers, J. R.** (2000). Myosins: a diverse superfamily. *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 3-22.
- Simons, K. and Ikonen, E.** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **6633**, 569-572.
- Simonsen, A., Gaullier, J. M., D'Arrigo, A. and Stenmark, H.** (1999). The Rab5 effector EEA1 interacts directly with syntaxin-6. *J. Biol. Chem.* **274**, 28857-28860.
- Sipe, D. M. and Murphy, R. F.** (1987). High-resolution kinetics of transferrin acidification in BALB/c 3T3 cells: exposure to pH 6 followed by temperature-sensitive alkalization during recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7119-7123.
- Smart, E. J., Ying, Y. S., Conrad, P. A. and Anderson R. G.** (1994). Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J. Cell Biol.* **127**, 1185-1197.
- Smart, E. J., Ying, Y. S., Mineo, C. and Anderson, R. G.** (1995). A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 10104-10108.
- Smart, E. J., Ying, Y., Donzell, W. C. and Anderson, R.G.** (1996). A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **271**, 29427-29435.
- Somsel Rodman, J. and Wandinger-Ness, A.** (2000). Rab GTPases coordinate endocytosis. *J. Cell Sci.* **113**, 183-192.
- Sonnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J. and Zerial, M.** (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J. Cell Biol.* **149**, 901-914.
- Stan, R. V., Roberts, W. G., Predescu, D., Ihida, K., Saucan, L., Ghitescu, L. and Palade, G. E.** (1997). Immunolocalization and partial characterization of endothelial plasmalemmal vesicles (caveolae). *Mol. Biol. Cell* **8**, 595-605.
- Stenmark, H., Valencia, A., Martinez, A., Ullrich, O., Goud, B. and Zerial, M.** (1994). Distinct structural elements of Rab5 define its functional specificity. *EMBO J.* **13**, 575-583.
- Stoorvogel, W., Oorshot, V. and Geuze, H. J.** (1996). A novel class of clathrin coated vesicles budding from endosomes. *J. Cell Biol.* **132**, 21-33.
- Tahir, S. A., Yang, G., Ebara, S., Timme, T. L., Satoh, T., Li, L., Goltsov, A., Ittmann, M., Morrisett, J. D. and Thompson, T.C.** (2001). Secreted caveolin-1 stimulates cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen-insensitive prostate cancer. *Cancer Res.* **61**, 3882-3885.

- Tang, Z., Scherer, P. E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D. S., Nishimoto, I., Lodish, H. F. and Lisanti, M. P.** (1996). Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J. Biol. Chem.* **271**, 2255-2261.
- Tooze, J. and Hollinsheads, M.** (1991). Tubular early endosomal networks in AtT20 and other cells. *J. Cell Biol.* **115**, 635-654.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Trischler, M.** (2000). Biochemische und funktionelle Charakterisierung von Kompartimenten des Rezeptor-Recyclingweges. *Doktorarbeit Universität Mainz*.
- Trischler, M., Stoorvogel, W. and Ullrich, O** (1999). Biochemical analysis of distinct Rab5- and Rab11-positive endosomes along the transferrin pathway. *J. Cell Sci.* **112**, 4773-4783.
- Uittenbogaard, A., Ying, Y. and Smart, E. J.** (1998). Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J. Biol. Chem.* **273**, 6525-6532.
- Ullrich, O., Reinsch, S., Urbé, S., Zerial, M. and Parton R. G.** (1996). Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell Biol.* **135**, 913-924.
- Ullrich, O., Stenmark, H., Alexandrov, K., Huber, L. A., Kaibuchi, K., Sasaki, T., Takai, Y. and Zerial, M.** (1993). Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator of the membrane association of rab proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 18143-18150.
- Urbani, L and Simoni, R. D.** (1990). Cholesterol and vesicular stomatitis virus G protein take separate routes from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **265**, 1919-1923.
- Ushio-Fukai, M., Hilenski, L., Santanam, N., Becker, P. L., Ma, Y., Griendling, K. K. and Alexander, R. W.** (2001). Cholesterol depletion inhibits epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II in vascular smooth muscle cells: role of cholesterol-rich microdomains and focal adhesions in angiotensin II signaling. *J. Biol. Chem.* **276**, 48269-48275.
- Way, M. and Parton, R. G.** (1995). M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett.* **376**, 108-112.
- Wells, A. L., Lin, A. W., Chen, L. Q., Safer, D., Cain, S. M., Hasson, T., Carragher, B. O., Milligan, R. A., Sweeney, H. L.** (1999). Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* **401**, 505-508.
- Wessling-Resnick, M. and Braell, W. A.** (1990). Characterization of the mechanism of endocytic vesicle fusion in vitro. *J. Biol. Chem.* **265**, 16751-16759.
- Wilcke, M., Johannes, L., Galli, T., Mayau, V., Goud, B. and Salamero, J.** (2000). Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *J. Cell Biol.* **151**, 1207-1220.

Willingham, M. C., Hanover, J. A., Dickson, R. B. and Pastan, I. (1984). Morphologic characterization of the pathway of transferrin endocytosis and recycling in human KB cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, USA 175-179.

Woodman, P. G. and Warren, G. (1988). Fusion between vesicles from the pathway of receptor mediated endocytosis in a cell free system. *Eur. J. Biochem.* **173**, 101-108.

Yamashiro, D. J. and Maxfield, F. R. (1987). Kinetics of endosome acidification in mutant and wild-type Chinese hamster ovary cells. *J. Cell Biol.* **105**, 2713-2721.

Yamashiro, D. J. Tycko, B., Fluss, S. R. and Maxfield S. R. (1984). Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway. *Cell* **37**, 789-800.

Zacchi, P., Stenmark, H., Parton, R. G., Orioli, D., Lim, F., Giner, A., Mellman, I., Zerial, M. and Murphy, C. (1998). Rab17 regulates membrane trafficking through apical recycling endosomes in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* **140**, 1039-1053.

Zerial, M. and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107-117.

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.