

Cholesterin - Interaktion mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und intrazelluläre Verteilung

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie und Pharmazie der
Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Volker Wiegand
geboren in Frankfurt am Main

Mainz 2002

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung.....	3
2.1. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	3
2.1.1. Struktur der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	3
2.1.2. Ligandenbindung	5
2.1.3. Signaltransduktion	7
2.1.4. Signalabschaltung und Internalisierung.....	8
2.2. Das Oxytocin-Rezeptor-System	10
2.2.1. Die Neurohypophysenhormone Oxytocin und Vasopressin.....	10
2.2.2. Der Oxytocinrezeptor	12
Struktur	12
Funktion	14
2.3. Cholesterin.....	15
2.3.1. Struktur und Eigenschaften des Cholesterins	15
2.3.2. Intrazellulärer Cholesterintransport	17
2.3.3. Cholesterin in biologischen Membranen	19
2.3.4. Einfluss auf Membranproteine.....	21
Rhodopsin	22
Der Oxytocinrezeptor	22
Der Cholecystokininrezeptor	24
2.4. Ziele der Arbeit	25
3. Material und Methoden	27
3.1. Chemikalien und Geräte	27
Allgemeine Laborchemikalien.....	27
Enzyme und Kitsysteme	29
Zellkulturmedien und Zusätze	29
Isotopenmarkierte Substanzen	30
Peptidhormone	30
Laborgeräte	30
Plasmide.....	32
Oligonukleotide	32
Zelllinien.....	33
3.2. Häufig benutzte Puffer und Zellkulturmedien	34
3.2.1. Puffer	34
3.2.2. Zellkulturmedien.....	35
3.3. Allgemeine Methoden	36

3.3.1. Absorptionsmessungen im visuellen und im UV-Bereich.....	36
3.3.2. Fluoreszenzmessungen.....	36
3.3.3. Bestimmung von Proteinkonzentrationen (Proteinbestimmung).....	36
3.3.4. Lipidextraktion.....	37
3.3.5. Cholesterinbestimmung.....	38
3.4. Molekularbiologische Methoden.....	39
3.4.1. Kultivierung von <i>E. coli</i> DH5 α	39
3.4.2. Herstellung kompetenter Zellen von <i>E. coli</i> DH5 α	39
3.4.3. Transformation von <i>E. coli</i> DH5 α	40
3.4.4. Isolierung von Plasmid-DNA.....	40
Minipräparation von Plasmid-DNA.....	40
Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	42
3.4.5. Reinigung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten.....	43
Phenolextraktion.....	43
Ethanol-fällung.....	43
3.4.6. Restriktionshydrolyse.....	44
3.4.7. Phosphorylierung von DNA.....	44
3.4.8. Auffüllreaktion 5'-überhängender Enden mit T4-DNA-Polymerase.....	44
3.4.9. Ligation von DNA-Fragmenten.....	44
3.4.10. Adapterligation.....	45
3.4.11. DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	45
3.4.12. PCR-Mutagenese.....	46
3.4.13. Agarosegelelektrophorese von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten.....	46
3.4.14. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	46
3.4.15. Alkalische Denaturierung doppelsträngiger DNA.....	47
3.4.16. Bestimmung von DNA-Konzentrationen.....	47
3.5. Zellkultur.....	47
3.5.1. Kultivierung von Säugetierzellen.....	48
3.5.2. Bestimmung von Zelldichten.....	48
3.5.3. Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung).....	48
3.5.4. Stabile Transfektion von Säugerzellen.....	49
3.5.5. Klonierung von transfizierten Zellen.....	49
3.5.6. Differenzierung von 3T3-L1-Zellen zu Adipozyten.....	50
3.6. Zellernte und Membranpräparationen.....	50
3.6.1. Ernte von Säugetierzellen.....	50
3.6.2. Membranpräparation.....	50
3.7. Veränderung der Steroidzusammensetzung von Zellen, Membranen oder solubilisierten Proben.....	51
3.7.1. Herstellung von Steroid/Methyl- β -Cyclodextrin-Komplexen.....	51
Cholesterin/Methyl- β -Cyclodextrin-Komplexe (10 mM).....	52
Steroid/Methyl- β -Cyclodextrin-Komplexe (3 mM).....	52
3.7.2. Veränderung des Steroidgehaltes lebender Zellen.....	52
Entfernung von Cholesterin aus lebenden Zellen.....	52
Anreicherung lebender Zellen mit Steroiden durch Cholesterin/Methyl- β -Cyclodextrin-Komplexe.....	52
3.7.3. Veränderung des Steroidgehaltes biologischer Membranen.....	53
Entfernung von Cholesterin aus biologischen Membranen.....	53

Anreicherung biologischer Membranen mit Steroiden durch Steroid/Methyl- β -Cyclodextrinkomplexe.....	53
Anreicherung biologischer Membranen mit Steroiden durch Ethanollösungen.....	53
Behandlung von Membranen mit Cholesterinoxidase.....	54
3.8. Internalisierungsexperimente	54
3.9. Ligandenbindungsstudien	55
3.9.1. Sättigungsexperimente.....	55
3.9.2. Hormonbindungsstudien an Oxytocinrezeptor- bzw. Vasopressinrezeptor-haltigen Zellmembranen	56
3.10. „Computer-Modeling“	56
3.11. Chemische Synthesen	58
3.11.1. Synthese von Fluochol.....	58
3.11.2. Synthese von Dithioarsolanyl-Fluoreszein (Flash).....	59
3.12. Methoden zur Untersuchung des fluoreszierenden Cholesterinanalogs	60
3.12.1. Veresterung von Fluochol durch ACAT.....	60
3.12.2. Efflux des Fluochols aus Zellen in Suspension	61
3.12.3. Konfokale Mikroskopie an fixierten Zellen.....	62
3.12.4. Fluoreszenzmikroskopie an lebenden Zellen.....	62
3.12.5. Fluoreszenzmarkierung von Zellen.....	63
4. Ergebnisse.....	65
4.1. Cholesterinabhängigkeit der Neurohypophysenrezeptoren	65
4.1.1. Einfluss der Cholesterinoxidation auf die Dissoziation der AVP-Bindung in Plasmamembranen	65
4.1.2. Vergleich der Cholesterinabhängigkeit zwischen den Neurohypophysenrezeptoren und dem CCK _B R.....	67
4.2. Versuche zur Lokalisierung der Cholesterinbindungsstelle des OTR.....	69
4.2.1. OTR-CCK _B R-Chimäre I	69
Klonierung	70
Stabile Expression von pfmOTCCK1 in HEK293-Zellen.....	71
Sättigungsexperiment mit [³ H]OT an HEKOTCCK1-Membranen.....	72
Oxidasetests	73
Einfluss von verschiedenen Steroiden auf die Ligandenbindung der OTR-CCK _B R-Chimäre.....	74
Vergleich der Internalisierung der Chimäre mit dem OTR	76
4.2.2. OTR-CCK _B R-Chimäre II.....	78
Klonierung der OTR-CCK _B R-Chimäre II	78
Untersuchungen zur Expression der OTR-CCK _B R-Chimäre II	79
4.2.3. Punktmutante W203L	80
Klonierung	81
Stabile Expression von pfmOTREGFP_W203L in HEK-Zellen	81
4.2.4. Versuch der Lokalisierung der Cholesterinbindungsstelle durch „molekulares Modeling“	82
Eingesetzte Steroide beim „Computer-Modeling“	83

Oxytocinrezeptor.....	90
Cholecystkininrezeptor	90
Mutante	90
4.2.5. Spezifische kovalente Markierung des OTR durch ein modifiziertes Fluoreszeinderivat.....	91
Synthese	92
Klonierung des Vektors pfmOTFlash.....	92
Stabile Expression von pfmOTFlash in HEK293-Zellen	93
Untersuchungen zur Bindung von Flash an HEKOTFlash-Zellen	93
4.3. Mikroskopische Untersuchungen zur Aufnahme und Transport von Cholesterin in der Zelle.....	94
4.3.1. Synthese und Eigenschaften eines fluoreszierenden Cholesterinderivats.....	95
4.3.2. Vergleich der Veresterungskinetiken von Fluochol und [³ H]-Cholesterin.....	97
4.3.3. Vergleich des Efflux von Fluochol und [³ H]Cholesterin.....	99
4.3.4. Aufnahme und Transport von Fluochol in der Zelle.....	100
4.3.5. Speicherung von Fluochol in Lipidtröpfchen	103
5. Diskussion	107
5.1. Cholesterinabhängigkeit der Neurohypophysenhormone	107
5.2. Lokalisierung der Cholesterinbindungsstelle.....	109
5.3. Charakterisierung des fluoreszierenden Cholesterin-derivats (Fluochol)	111
5.4. Aufnahme von Cholesterin.....	113
5.5. Speicherung von freiem Cholesterin in der Zelle.....	115
5.6. Ausblick	117
6. Anhang	119
6.1. Klonierungsschemata.....	119
6.1.1. Schema der Einfügung der <i>Eco</i> RI-Schnittstelle in den OTR.....	119
6.1.2. Klonierung der kodierenden Sequenzen für den C-Terminus des CCK _B R in den Expressionsvektor pcDNA3.....	120
6.1.3. Klonierung der Sequenz für den GFP-getaggten OTR in den Expressionsvektor pcDNA3	121
6.2. Sequenzvergleich zwischen Rezeptoren	122
6.3. Abbildungsverzeichnis.....	124
6.4. Tabellenverzeichnis.....	125
7. Literaturverzeichnis.....	127

Abkürzungsverzeichnis

ABC	<u>A</u> TP- <u>B</u> inding- <u>C</u> assette Transporter
ACAT	<u>A</u> cy-CoA: <u>C</u> holesterin- <u>A</u> cy <u>l</u> transferase
amp	Ampicillin-Resistenzgen
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
AVP	[<u>A</u> rg ⁸]- <u>V</u> asopressin
B _{max}	Rezeptordichte
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
CCK _B R	<u>C</u> holecystokininrezeptor Typ <u>B</u>
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CHO	Zelllinie aus Ovarien von <i>Cricetulus griseus</i> (<u>C</u> hinese <u>h</u> amster <u>o</u> vary)
d. h.	das heißt
DHE	<u>D</u> ehydroergosterol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<u>D</u> esoxyribonukleinsäure (<i>-acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDT	Ethandithiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
Flash	<u>F</u> luoreszein- <u>A</u> rsen- <u>H</u> elix- <u>B</u> inder
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (<i>G-protein coupled receptor</i>)
GRK	<u>G</u> -Protein-gekoppelte <u>R</u> ezeptor- <u>P</u> rotein <u>k</u> inase
GTP	Guanosintriphosphat

h	Stunde(n)
HBS	Hepes-gepufferte Salzlösung (<i>hepes buffered saline</i>)
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (<i>high density lipoprotein</i>)
HEK293-Zellenhuman	menschliche Nierenzelllinie (<i>human embrionic kidney</i>)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HMG-CoA-Reduktase	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
Kap.	Kapitel
K _D	Dissoziationskonstante
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte (<i>low density lipoprotein</i>)
MβCD	Methyl-β-Cyclodextrin
MEM	Minimum Essential Medium
min	Minuten
M _r	relative Molekülmasse
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
NPC	Niemann-Pick-Protein Typ C
OT	Oxytocin
OTR	Oxytocinrezeptor
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polythylenglykol
PLC	Phospholipase C
RNA	Ribonukleinsäure (<i>-acid</i>)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SCAP	<u>S</u> REBP- <u>c</u> leavage <u>a</u> ctivating <u>p</u> rotein
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SREBP	<i>sterol regulatory element binding protein</i>
SSD	<i>sterol sensing domaine</i>
StAR	<i>sterol acute regulatory protein</i>
TLC	Dünnschochtchromatographie (<i>thin layer chromatography</i>)
TM	<u>T</u> rans <u>m</u> embrandomäne
U	Enzymeinheiten (<i>units</i>)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen

V _{1a} -, V ₂ -R	Vasopressinrezeptor 1a bzw. 2
w/v	Gewicht pro Volumen
YFP	Gelb-fluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent protein</i>)
2OHp β CD	2-Hydroxy-Propyl- β -Cyclodextrin

1. Zusammenfassung

Eine Reihe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren werden in ihrer Ligandenbindung von Cholesterin beeinflusst. Für den Oxytocinrezeptor war eine spezifische Interaktion mit dem Cholesterin der Plasmamembran bekannt. In dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass auch die anderen Rezeptoren der Familie der Neurohypophysenhormone, die Vasopressinrezeptoren, in der gleichen Weise in ihren Bindungseigenschaften von Cholesterin beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu zeigt der Cholecystokininrezeptor Typ B keine direkte Wechselwirkung mit Cholesterin. Durch Austausch der Transmembranhelices 6 und 7 des Oxytocinrezeptors mit entsprechenden Bereichen des Cholecystokininrezeptors wurde ein Rezeptor erzeugt, der bezüglich Bindungsverhalten und Cholesterinabhängigkeit keine Unterschiede zu dem Wildtyp-Oxytocinrezeptor zeigte. Durch den Einsatz von computergestütztem „Modeling“ wurde für die Interaktion des Oxytocinrezeptors mit Cholesterin eine Stelle zwischen den Transmembranhelices 5 und 6 vorgeschlagen. Weitere Computermodelle unterstützten die Befunde einer spezifischen Cholesterinbindungsstelle zwischen diesen beiden Transmembranhelices.

Die intrazellulären Transportwege und Interaktionspartner des Cholesterins sind noch weitgehend unbekannt. Um die Verteilung des Cholesterins in der Zelle zu untersuchen, wurde ein selbst synthetisiertes Cholesterinderivat (Fluochol) eingesetzt. In verschiedenen Experimenten verhielt sich dieses Derivat wie tritiiertes Cholesterin und konnte somit als geeignetes Cholesterinanalogen charakterisiert werden. Die Komplexierung in Cyclo-dextrinen ermöglichte die Einlagerung von Fluochol in die Plasmamembran von Zellen. Der Transport des Derivats in die Zelle konnte daraufhin im Mikroskop verfolgt werden. Der Einstrom des Fluochol in das ER erfolgte innerhalb von Minuten und war energieunabhängig. Schließlich wurde Fluochol in Lipidtröpfchen transportiert, die in fast allen Zellen für die Speicherung überschüssiger intrazellulärer Lipide dienen. Die Tröpfchen werden aus dem endoplasmatischen Retikulum gebildet und enthalten neben Phospholipiden auch Cholesterin, das durch das Enzym ACAT mit langkettigen Fettsäuren verestert wird.

Mit dem synthetisierten Cholesterinanalogen Fluochol sind zahlreiche Untersuchungen möglich, die in Zukunft auch den Mechanismus der Wechselwirkung des Cholesterins mit Membranproteinen (insbesondere dem Oxytocinrezeptor) enthüllen können. Die Beteiligung des Cholesterins an zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen (Morbus Alzheimer, Niemann-Pick-Krankheit, etc.) zeigen zudem die

Bedeutung, die ein funktionelles fluoreszierendes Cholesterinderivat in der Aufklärung des intrazellulären Cholesterintransports erlangen kann.

2. Einleitung

2.1. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G-Protein coupled receptors, GPCRs) stellen mit weit über 2000 Mitgliedern die größte Klasse membranständiger Proteine im menschlichen Genom. Sie vermitteln physiologische Antworten auf eine Vielzahl von Stimulantien. Dazu gehören Hormone, Neurotransmitter, kleine Peptide, Proteine und sensorische Stimuli (Geruch, Geschmack, Licht). Die Hälfte der GPCRs sind dabei Rezeptoren für Geruchsstoffe im olfaktorischen Sinnessystem. Über 5 % der Gene bei *Caenorhabditis elegans* kodieren für GPCRs (Bargmann, 1998), wodurch die große Bedeutung dieser Superfamilie und ihre Konservierung während der Evolution deutlich wird. Das Studium dieser ubiquitären und vielseitigen Rezeptormoleküle wurde zu einem der beherrschenden Themen gegenwärtiger biochemischer Forschung.

2.1.1. Struktur der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

GPCRs bestehen aus einem extrazellulären N-Terminus, sieben hydrophoben α -helikalen Transmembrandomänen (TM), die alternierend über jeweils drei extrazelluläre und intrazelluläre Schleifen verbunden sind, und einem intrazellulären C-Terminus (Abbildung 1). Durch diesen charakteristischen Aufbau werden die GPCRs auch als „heptahelikale Rezeptoren“ oder „Serpentinrezeptoren“ bezeichnet.

Zumindest bei Rhodopsin (Unger et al., 1997), dem Photorezeptor der Sehzellen, und beim β -adrenergen Rezeptor (Mizobe et al., 1996) sind die TM1 bis TM7 als geschlossener Kreis gegen den Uhrzeigersinn (bei Blick auf die extrazelluläre Seite der Membran) angeordnet.

Durch neueste Röntgenstrukturanalysen von Rhodopsinkristallen konnte erstmalig eine dreidimensionale Struktur eines GPCR mit einer Auflösung von 2,8 Å ermittelt werden (Palczewski et al., 2000). Darin weisen die Helices 1, 4, 6 und 7 erwartete Neigungen an Prolinresten auf. Helix 3 penetriert außerdem zwischen die Helices 2 und 4. Eine mögliche Bindungsstelle für G-Proteine wird durch hydrophobe Regionen der Helices 2, 5 und 6 gebildet, zusammen mit der zweiten intrazellulären Schleife (Abbildung 1).

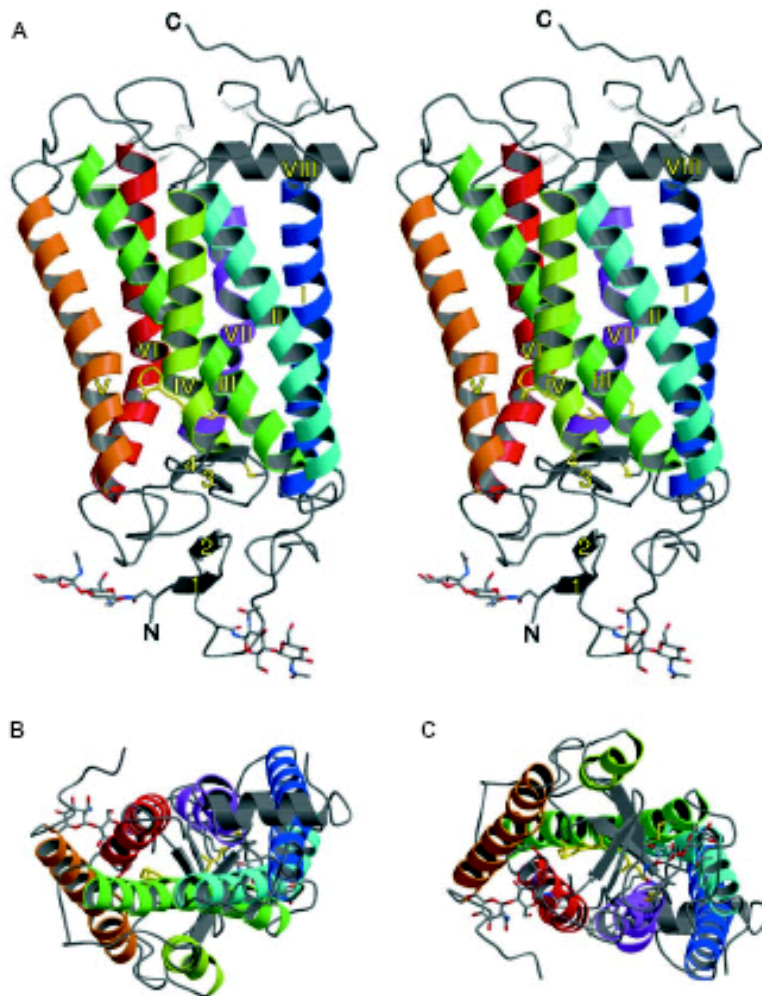


Abbildung 1: Bändermodell des Rhodopsins

A Die sieben α -Helices des Rhodopsins durchqueren die Lipiddoppelschicht (die cytoplasmatische Seite befindet sich oben) und sind durch Schleifen (loops) verbunden. Blick in die Membranebene **B** von der cytoplasmatischen Seite und **C** von der intradiscalen Seite (entspricht der extrazellulären Seite bei plasmamembranständigen GPCRs). Abbildung aus (Palczewski et al., 2000).

Überraschenderweise decken sich besonders die Transmembranhelices mit berechneten Computermodellen (Baldwin et al., 1997; Herzyk and Hubbard, 1998; Pogozheva et al., 1997), die von einer zuvor durch Kryoelektronenmikroskopie ermittelten Struktur niedriger Auflösung ausgingen. Die relative Lage der Transmembrandomänen ist wichtig für die Liganden-induzierte Rezeptoraktivierung (s. S. 5).

Weitere häufige Merkmale vieler GPCRs sind (Krauss, 1999):

- extrazelluläre Konsensussequenzen für die Asparagin-verknüpfte Glycosylierung (Asn-X-Ser/Thr),

- konservierte Cysteinreste in der ersten und zweiten extrazellulären Schleife, die durch Bildung einer Disulfidbrücke den Rezeptor stabilisieren,
- Cysteinreste am C-Terminus für eine Palmitoylierung, die wahrscheinlich eine zusätzliche Membranverankerung bietet,
- intrazelluläre Konsensussequenzen für Phosphorylierungen (z. B. SXX/R, K/RXS u. a.), die bei der Desensibilisierung und Internalisierung eine Rolle spielen (S. 7).

Abbildung 4 auf S. 13 zeigt diese Merkmale am Beispiel des Oxytocinrezeptors (OTR), der Grundlage vieler Experimente der vorliegenden Arbeit war.

Die Bindung eines Agonisten an den extrazellulären Teil des GPCRs induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors, die eine Kopplung eines heterotrimeren Guanosinnukleotid-bindenden Proteins (G-Protein) an den intrazellulären Teil des Rezeptors ermöglicht (Vaughan, 1998). Hierdurch werden intrazelluläre Signalkaskaden induziert (s. unten).

2.1.2. Ligandenbindung

Die GPCRs können durch eine Vielzahl unterschiedlicher Liganden aktiviert werden. Neben dem Photorezeptor Rhodopsin, der durch Photonen aktiviert wird, gibt es Rezeptoren für biogene Amine, Ca^{2+} , Nukleotide, Eicosanoide, Peptide, Proteine und Glycoproteine. Die folgende Abbildung 2 zeigt die Ligand-Rezeptor-Interaktionen für eine Reihe verschiedener Ligandenklassen.

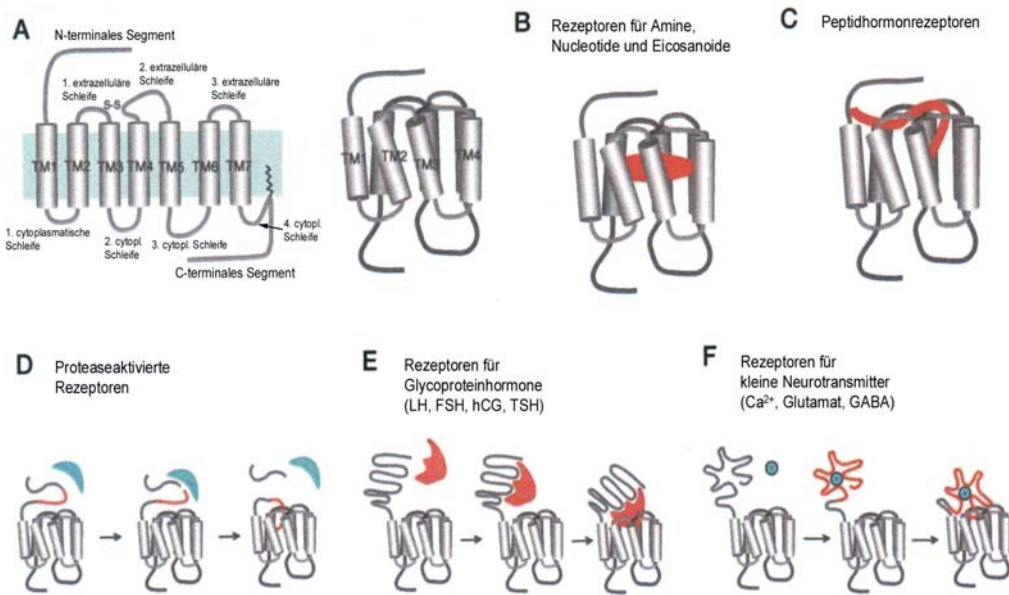


Abbildung 2: Schematische Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und Ligand-Rezeptor-Interaktionen

(A) Membrantopologie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR). (B) Biogene Amine, Nucleotide und Eicosanoide binden ausschließlich im Kern der Transmembrandomänen. (C) Peptide mit weniger als 40 Aminosäuren binden zusätzlich an extrazelluläre Schleifen und an das N-terminale Segment. (D) Bei einigen Rezeptoren bindet eine Protease (z. B. Thrombin) an den Rezeptor und spaltet das N-terminale Segment. Das neue N-terminale Segment interagiert als intramolekularer Ligand mit den extrazellulären Schleifen, wohingegen das abgespaltene Peptid im Falle des Thrombinrezeptors die Blutplättchenaggregation stimuliert. (E) Glycoprotein hormone binden an Rezeptoren mit großen (~ 350 Aminosäuren) N-terminalen Segmenten, die dann mit den extrazellulären Schleifen wechselwirken. (F) Kleine Neurotransmitter binden an sehr große (~ 600 Aminosäuren) N-terminale Segmente, die daraufhin mit membranassozierten Domänen interagieren können. Abkürzungen: LH = Luteinisierendes Hormon, FSH = Follikel-stimulierendes Hormon, hCG = humanes Choriogonadotropin, TSH = Thyreoida-stimulierendes Hormon, GABA = γ -Aminobuttersäure (-acid). Abbildung aus (Ji et al., 1998)).

Beim Modell der Ligand-Rezeptor-Interaktion geht man von mindestens drei verschiedenen Rezeptorkonformationen aus (Gether and Kobilka, 1998): dem nicht mit einem Liganden besetzten Rezeptor (R), dem mit einem Agonisten besetzten und stabilisierten Rezeptor (R^*) und dem durch einen inversen Agonisten stabilisierten Rezeptor (R^0). Inverse Agonisten sind Antagonisten, die gleichzeitig die basale Aktivität des Rezeptors reduzieren. Die basale Aktivität kommt dadurch zustande, dass der unbesetzte Rezeptor instabil ist und spontan in den aktiven Zustand (R^*) übergehen kann. Bindung eines Agonisten führt über mehrere Übergangszustände zu R^* . Diese Übergangszustände können durch sogenannte partielle Agonisten stabilisiert werden, die den Rezeptor nur zu einem gewissen Grade aktivieren, bzw. durch G-Proteine, welche

dann sowohl die Affinität für Agonisten als auch die Kinetik der Konformationsänderungen beeinflussen.

2.1.3. Signaltransduktion

Wird der Rezeptor durch Ligandenbindung aktiviert, so führt dies zu Änderungen in der relativen Orientierung der Transmembranhelices, wodurch Bindungsstellen für G-Proteine freigelegt werden. Beim Rhodopsin und dem β -adrenergen Rezeptor ist die Rezeptoraktivierung von einer kleinen Drehung von TM3 und einer großen Drehung von TM6 begleitet (gegen den Uhrzeigersinn, von der extrazellulären Seite aus gesehen). Dadurch entfernt sich das cytoplasmatische Ende von TM6 von TM3 (Farrens et al., 1996). An der cytoplasmatischen Seite befindet sich bei Rezeptoren der Rhodopsin-Familie ein hochkonserviertes DRY-Motiv (im OTR: DRC) (Probst et al., 1992). Das Arginin dieses Motivs wird im inaktiven Rezeptor durch eine hydrophile Tasche aus polaren Resten von TM1, 2 und 7 festgehalten (Abbildung 4). Die Rezeptoraktivierung führt zu einer Protonierung des Aspartats, wodurch das Arginin aus der polaren Tasche verdrängt wird. Infolgedessen werden Sequenzen der zweiten und dritten cytoplasmatischen Schleife freigelegt, die dann mit heterotrimeren G-Proteinen interagieren können.

Die G-Proteine gehören zu der großen Familie der regulatorischen GTPasen, die GTP binden und hydrolysieren und dabei eine Schalterfunktion bei zentralen zellulären Prozessen ausüben. Die Familie der regulatorischen GTPasen wird auch als GTPase-Superfamilie bezeichnet. Die Unterfamilie der heterotrimeren G-Proteine besitzt einen gemeinsamen Bauplan und besteht aus einer größeren α -Untereinheit mit variablem Molekulargewicht und zwei kleineren, aneinandergeschlossenen Untereinheiten, der β -Kette und der γ -Kette. G_{α} -Untereinheiten enthalten zwei Domänen, eine GTP-bindende und –hydrolysierende Domäne (G-Domäne) und eine helicale Domäne, die das GTP im Kern des Proteins bedeckt (Coleman et al., 1994; Noel et al., 1993). Die β -Untereinheit formt eine siebenblättrige Propellerstruktur mit einer wassergefüllten Pore (Sondek et al., 1996), die γ -Untereinheit besitzt α -helicale Struktur.

Ein durch einen Agonisten aktivierter Rezeptor interagiert mit der α -Untereinheit eines inaktiven G-Proteins. Hierdurch kommt es zum Austausch von an die α -Untereinheit gebundenem GDP gegen GTP und zur Dissoziation des G-Proteins in die α - und die $\beta\gamma$ -Untereinheit. Sowohl $G_{\alpha}\bullet GTP$ als auch $G_{\beta\gamma}$ können die verschiedensten Effektoren

aktivieren oder inaktivieren. Die Hydrolyse des gebundenen GTPs durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit inaktiviert diese schließlich und führt zu einer erneuten Assoziation mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit (Hamm, 1998).

Wesentliche Funktionen der Signalübertragungen werden von den α -Untereinheiten wahrgenommen. Anhand der Sequenzen der α -Untereinheiten lassen sich die G-Proteine in vier Familien einteilen (Hepler and Gilman, 1992), die sich in ihren Vorkommen in den verschiedenen Geweben und vor allem in ihrer Wirkung auf die verschiedenen Effektorproteine unterscheiden.

Durch verschiedene G-Proteine können im Verlauf der Signalübertragung unterschiedliche Effektormoleküle moduliert werden (Evans and Graham, 1989):

- Eine Adenylat-Cyclase, welche die Bildung von cAMP als second messenger katalysiert, kann entweder stimuliert (z. B. β -adrenerger Rezeptor) oder gehemmt werden (z. B. Serotoninrezeptor).
- Eine Phospholipase C kann stimuliert werden, welche die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) katalysiert. IP₃ und DAG können als second messenger fungieren (z. B. beim Angiotensin-II-Rezeptor).
- Das G-Protein steuert einen membrangebundenen Ionenkanal, was zur Änderung des Membranpotentials und des Ionenmilieus führen kann (z. B. beim muskarinischen Acetylcholinrezeptor).
- Das G-Protein aktiviert eine cGMP-Phosphodiesterase, welche die Hydrolyse von cGMP katalysiert (Rhodopsin).

Doch auch der $\beta\gamma$ -Komplex kann eine Vielzahl von Effektoren aktivieren: PLC β 2, PLC β 3, Adenylatcyclase, einige Kinasen (z. B. PI3-Kinase, Raf1 Proteinkinase) sowie Ionenkanäle (bestimmte K⁺-, Ca²⁺-, vielleicht auch Na⁺-Kanäle).

2.1.4. Signalabschaltung und Internalisierung

Der Prozess zur Beendigung der Signalübertragung wird auch als Desensibilisierung bezeichnet. Innerhalb von Sekunden bzw. Minuten nach der Aktivierung kommt es durch

verschiedene regulatorische Moleküle zur Unterbrechung der Kopplung zwischen Rezeptor und G-Protein und die anschließende Internalisierung des Rezeptors wird eingeleitet.

Ein möglicher Verlauf der Signalabschaltung ist die Agonist-spezifische Desensibilisierung der GPCRs, die wahrscheinlich aus folgenden Schritten besteht. Aktiviertes $G_{\beta\gamma}$, das über Prenylierung am C-Terminus der γ -Untereinheit Lipid-verankert ist, rekrutiert wahrscheinlich zusammen mit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) eine cytosolisch lokalisierte G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Proteinkinase (GRK) zu ihrem Substrat, dem Agonist-besetzten Rezeptor. Dieser wird durch GRKs an Ser/Thr-Resten im C-terminalen Bereich phosphoryliert (Inglese et al., 1993; Pitcher et al., 1995). Daraufhin kommt es zur Bindung des Proteins Arrestin an die dritte intrazelluläre Schleife sowie an membrannahe C-terminale Bereiche des Rezeptors. Da in diesem Bereich auch die Bindung der G-Proteine erfolgt, wird so eine Kopplung des Rezeptors mit weiteren G-Proteinen sterisch verhindert.

Die Arrestine wiederum können direkt, stöchiometrisch und mit hoher Affinität an Clathrin binden und fungieren somit als Adaptoren, die die Internalisierung der GPCRs durch Endocytose via Clathrin-bedeckter (clathrin-coated) Vesikel beschleunigen (Goodman, Jr. et al., 1996). Es kommt dabei zunächst zu einer Cluster-Bildung der Rezeptoren durch den Aufbau einer über den Adapter Arrestin vermittelten Clathrinhülle. Die Funktion von β -Arrestin 1 bei der Sequestrierung der GPCRs wird durch deren Phosphorylierung/Dephosphorylierung reguliert. Cytoplasmatisches Arrestin ist an einem Ser-Rest konstitutiv phosphoryliert und wird nach Rekrutierung zur Plasmamembran sehr schnell dephosphoryliert. Diese Dephosphorylierung ist eine Voraussetzung für die Rezeptor-Endocytose. Der Internalisierungsprozess erfolgt für die meisten bisher untersuchten GPCRs Clathrin-abhängig (Bohm et al., 1997). Darüber hinaus wurde auch die Internalisierung des muskarinischen Acetylcholinrezeptors M2 in Caveolae (Feron et al., 1997) sowie die des Cholecystokininrezeptors Typ A in glatten vesikulären Kompartimenten beschrieben (Roettger et al., 1995).

Weitere Möglichkeiten der Signalabschaltung führen über die second-messenger-regulierten Proteinkinasen A (PKA, cAMP-abhängig) und C (PKC, aktiviert durch Diacylglycerol und Ca^{2+}). Diese sind nicht rezeptorspezifisch und phosphorylieren GPCRs an Ser-/Thr-Resten, die sich von denen der GRKs unterscheiden.

Nach neueren Erkenntnissen dienen Phosphorylierung und Internalisierung von aktivierten GPCRs nicht nur der Signalabschaltung, sondern sind selbst Ausgangspunkt weiterer Signaltransduktionswege (Lefkowitz, 1998). Ein Beispiel ist das „signal switching“ des β_2 -

adrenergen Rezeptors, der im Herzgewebe nach der PKA-katalysierten Phosphorylierung nicht mehr an G_s sondern an G_i koppelt. Hier liegt eine Rückkopplungsschleife vor: G_s aktiviert die Adenylatcyclase, es kommt zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration der Zelle, wodurch die PKA aktiviert wird. Diese phosphoryliert den Rezeptor, der dann an G_i koppelt, das wiederum die Adenylatcyclase hemmt, aber auch weitere Signaltransduktionswege, wie z. B. den MAP-Kinase-Weg (Mitogen-aktiviere Proteinkinase-Weg), aktiviert. Für die Aktivierung von MAP-Kinasen durch Signalkaskaden, in die $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G_i involviert sind, ist die Endocytose des Rezeptors essentiell (Daaka et al., 1998; Luttrell et al., 1997).

Die einfache Trennung zwischen Aktivierung und Abschaltung von Signalkaskaden kann somit nicht mehr aufrechterhalten werden. Im Gegenteil: Signaltransduktionswege sind vielfach miteinander vernetzt, und die Abschaltung des einen Signals kann zur Aktivierung anderer Signalketten führen.

2.2. Das Oxytocin-Rezeptor-System

2.2.1. Die Neurohypophysenhormone Oxytocin und Vasopressin

Die Neurohypophysenhormone Oxytocin (OT) und Vasopressin sind cyclische Nonapeptide, die zwischen ihren Cysteinen an Position 1 und 6 eine Disulfidbrücke besitzen (Abbildung 3). Bislang wurden mehrere Neurohypophysenhormone gleicher Grundstruktur gefunden, die sich nur in den Aminosäuren der Positionen 3, 4 und 8 unterscheiden. Befinden sich in den Positionen 3 und 8 Aminosäuren mit aliphatischer Seitenkette, so zählt man die Hormone zur Oxytocinreihe, bei basischen Aminosäuren in Position 8 zählt man sie zur Vasopressinreihe. Beide Hormone werden in den magnozellulären Neuronen des supraoptischen und paraventriculären Kerns des Hypothalamus gebildet. Von dort wandern sie durch die neurosekretorischen Nervenbahnen in den Hinterlappen der Hirnanhangdrüse (Neurohypophyse) und werden dort durch Exocytose nach Reizung der hypothalamischen Neuronen oder durch osmotische Stimulation des supraoptischen Kerns kontrolliert ausgeschüttet (Mason, 1980). OT wird zusätzlich auch im Gelbkörper (Fehr et al., 1987) und in der Plazenta (Miller et al., 1993) gebildet. Die Expression beider Hormone wurde auch in Rattenhoden nachgewiesen (Foo et al., 1991).

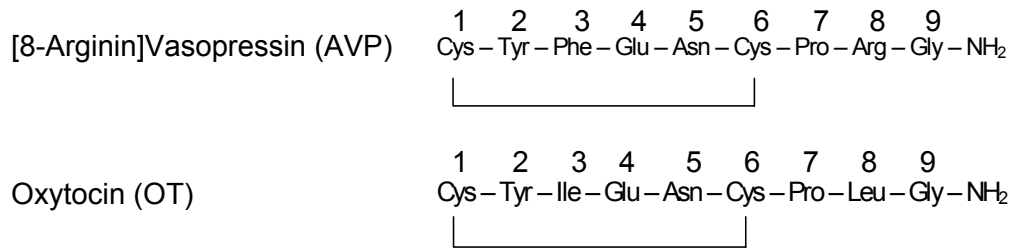


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hormone [8-Arginin]Vasopressin (AVP) und Oxytocin (OT)

Die zyklischen Nonapeptide sind C-terminal amidiert und besitzen eine Disulfidbrücke zwischen Cystein 1 und Cystein 6.

Die Gene von OT und AVP sind direkt benachbart auf dem Chromosom 20 des Menschen, aber in entgegengesetzter Transkriptionsorientierung angeordnet (Sausville et al., 1985). Beide Hormone werden als Präproproteine gebildet und erst während ihres axonalen Transports enzymatisch prozessiert, so dass OT und AVP frei werden (Gainer and Wray, 1994). Das 21 kDa-Präproprotein von OT besteht aus einem Signalpeptid, Oxytocin und Neurophysin I, die Vorstufe von AVP aus einem Signalpeptid, Vasopressin, Neurophysin II und einem zusätzlichen Glykoprotein.

Die beiden klassischen Funktionen des Oxytocins beim Geburtsvorgang und beim Stillen sind schon sehr lange bekannt. Die Oxytocinsekretion in der Neurohypophyse wird während des Geburtsvorgangs durch nervale Afferenzen aus dem Uterus und der Vagina deutlich stimuliert. Durch Oxytocin kommt es in dieser Phase zu heftigen Kontraktionen der Uterusmuskulatur, die als Wehen bekannt sind (Dale, 1906). In der Laktationsphase führt der mechanische Saugreiz an der Mamille zu einem neurohumoralen Reflex, bei dem durch Oxytocin die Muskulatur der Milchgänge kontrahiert wird, was zur Ejektion von Milch führt (Ott and Scott, 1910). Oxytocin findet deshalb klinische Verwendung zur Einleitung der Wehen und zur Promotion der Laktation.

Oxytocin ist auch auf anderen Ebenen der sexuellen Reproduktion wichtig. Es fördert die Fähigkeit, Paarbeziehungen einzugehen und ist an der Erektion und der Ejakulation beteiligt. Andere Funktionen sind die Kontrolle der Länge des Östruszyklus, der Follikelluteinisierung und der Steroidogenese der Ovarien. Nach der Geburt fördert Oxytocin die Beziehung zwischen Eltern und ihrem Nachwuchs (Carter et al., 1992; Insel and Shapiro, 1992; Pedersen et al., 1992).

Vasopressin spielt eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle des Wasserhaushalts. Die nicht ordnungsgemäße Synthese oder Ausschüttung im Gehirn führt zum Krankheitsbild des Zentralnervösen Diabetes Insipidus (CDI), der durch die Ausscheidung großer Mengen niedrigosmolaren Harns gekennzeichnet ist. In höheren Konzentrationen stimuliert Vasopressin unter anderem die Kontraktion glatter Gefäßmuskeln.

2.2.2. Der Oxytocinrezeptor

Struktur

Grundlage der Strukturaufklärung des Oxytocinrezeptors war die Expressionsklonierung des humanen Rezeptors aus dem Myometrium (Kimura et al., 1992). Es handelt sich um ein Protein mit 389 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 42.716 Da. Das hydrophatische Profil der Aminosäuresequenz lässt auf sieben mögliche Transmembrandomänen schließen, die zu 20-30 % identisch sind mit entsprechenden Domänen anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren des Rhodopsintyps (s. S. 3). Das Protein enthält mehrere Stellen für mögliche posttranslationale Modifikationen. Es gibt drei potentielle N-Glykosylierungsstellen (Hubbard and Ivatt, 1981) im N-terminalen Bereich der extrazellulären Domäne. Weiterhin enthält das Molekül mögliche Phosphorylierungsstellen (Kennelly and Krebs, 1991) in der dritten cytoplasmatischen Schleife und im carboxyterminalen Bereich. Zwischen den Cysteinen 112 und 187 in der ersten bzw. zweiten extrazellulären Schleife findet man eine Disulfidbrücke.

Photoaffinitätsmarkierungen des Rezeptors aus dem Myometrium des Meerschweinchens zeigten, dass der Rezeptor ein mehrfach glykosyliertes Protein mit einer relativen Molekülmasse von 65 bis 80 kDa ist (Kojro et al., 1991). Durch enzymatische Deglykosylierung erhält man das Protein mit einer Molekülmasse $M_r = 38$ kDa, welche dem berechneten Molekulargewicht des klonierten Rezeptors entspricht.

Der OTR zeigt in seiner abgeleiteten Proteinsequenz große Ähnlichkeit zu den Vasopressin V_{1a} -, V_{1b} - und V_2 -Rezeptoren und bildet mit diesen eine neue Unterfamilie. Die Homologie des OTRs in Säugern mit den Sequenzen der Vasopressinrezeptoren beträgt 50 % bei den V_1 - und 40 % bei den V_2 -Rezeptoren. Damit spiegelt die Homologie der Rezeptoren die Homologie der Peptidhormone wider, die sich lediglich in zwei Aminosäuren unterscheiden.

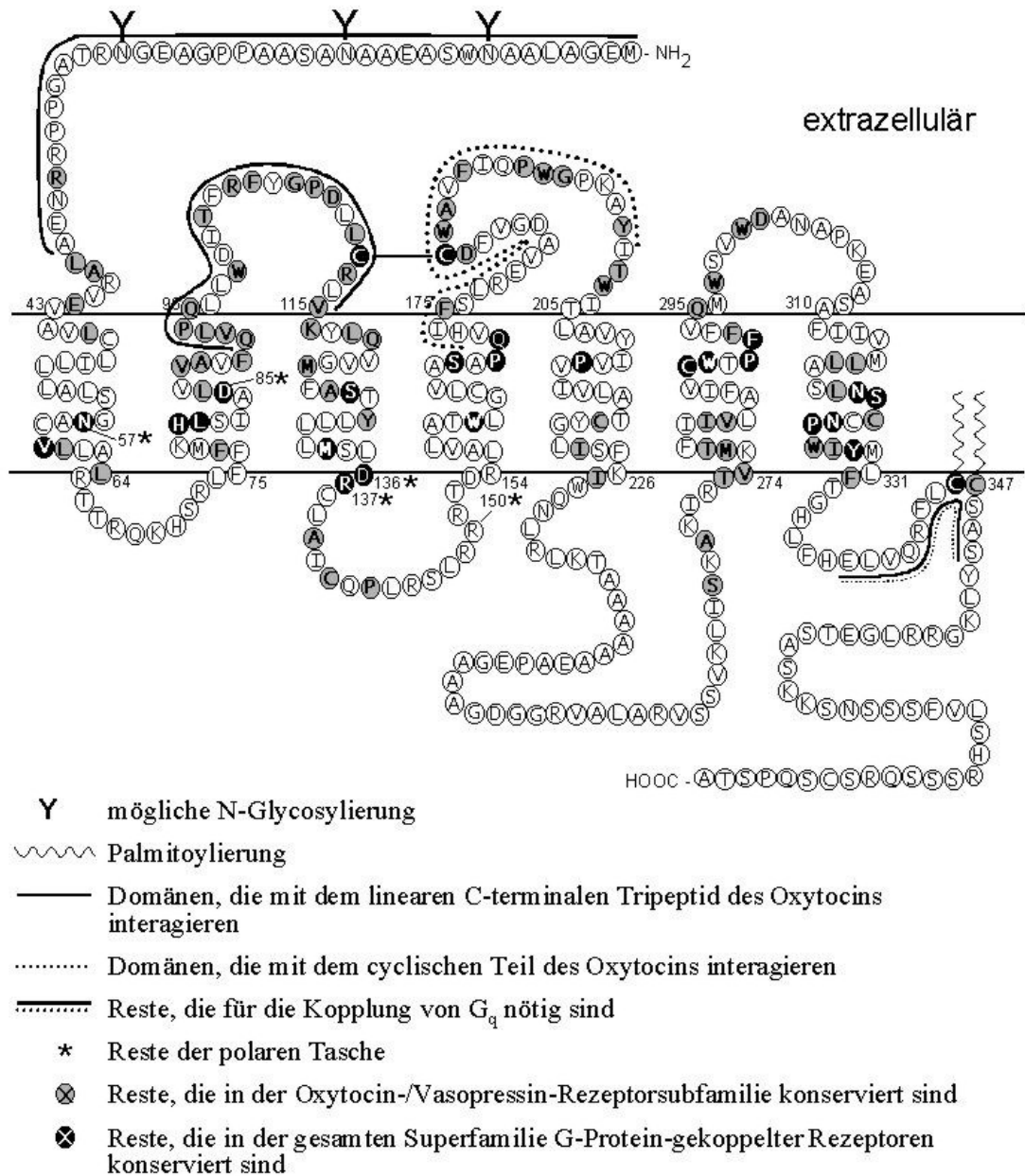


Abbildung 4: Struktur des OTR

Die Aminosäuresequenz des menschlichen OT-Rezeptors ist hier im Einbuchstaben-Code wiedergegeben. Die Bedeutung der Markierungen ist in der Abbildung angegeben. In der inaktiven Rezeptorkonformation ist das konservierte Arginin 137 in einer polaren Bindungstasche maskiert (*). Nach Agonistenbindung wird die Arginin-Seitenkette aus dieser Tasche verschoben und dabei eine Bindungsstelle für G-Proteine freigelegt (Fanelli et al., 1999). Abbildung aus (Gimpl and Fahrenholz, 2001)), verändert.

Funktion

Die halbmaximale Bindung von [^3H]Oxytocin an Plasmamembranen aus dem Uterus erfolgt im Bereich nanomolarer Konzentrationen des Peptids ($K_D = 1\text{-}2\text{ nM}$), in Übereinstimmung mit der Konzentration, die den halbmaximalen biologischen Effekt *in vitro* bedingt (Soloff and Swartz, 1974).

Für die Wirkung des Oxytocins im Uterus sind zweiwertige Metallkationen unverzichtbar (Krejci and Polacek, 1968). Auch in Plasmamembranen steigern divalente Kationen wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} im Puffer die Affinität des Agonisten zum Rezeptor. Eine entsprechende Inhibierung der Hormonwirkung kann durch Zugabe von EDTA erreicht werden (Soloff and Swartz, 1974). Dagegen wird die Bindung von Oxytocin-Antagonisten weder durch zweiwertige Metallkationen noch durch EDTA beeinflusst (Antoni and Chadio, 1989). Der Mechanismus der Wirkungsweise der Kationen ist dabei allerdings noch ungeklärt. Zu vermuten ist aber eine Wechselwirkung mit der Bindungsstelle des Hormons zur Stabilisierung einer Konformation, die eine hochaffine und spezifische Bindung der Agonisten ermöglicht (Antoni and Chadio, 1989; Pliska and Kohlhauf, 1991).

Die Signalweiterleitung des aktivierten OT-Rezeptors erfolgt über G-Proteine der Klasse G_q . Die G_α -Untereinheit dieser heterotrimeren G-Proteine aktiviert die Phospholipase C β , welche daraufhin Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat der Plasmamembran in die sekundären Botenstoffe 1,2-Diacylglycerin und Inositol-1,4,5-Trisphosphat spaltet. Diacylglycerin verbleibt als hydrophobes Molekül in der Plasmamembran und stimuliert die Proteinkinase C, ist aber auch Ausgangspunkt für die Prostaglandinsynthese. Substrate der Proteinkinase C sind die GPCRs (s. Desensibilisierung, S. 8), die Raf-Kinase, die den MAP-Kinaseweg (Regulation von Wachstums- und Differenzierungsprozessen) aktiviert und weitere Proteine, die so umfassende Prozesse wie die Zellmotilität und den Membrantransport beeinflussen.

Der sekundäre Botenstoff Inositol-1,4,5-Trisphosphat ist wasserlöslich und führt zur Öffnung von Calciumionenkanälen des endoplasmatischen Retikulums und der Plasmamembran. Da die Ca^{2+} -Ionenkonzentration im endoplasmatischen Retikulum und außerhalb der Zelle mit 10^{-3} M 10000-mal höher als im Cytosol ist, kommt es zu einem Anstieg der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Diese Calciumionen aktivieren wiederum die Phospholipase C und kontrollieren gleichzeitig die Inositol-1,4,5-Trisphosphat-vermittelte Calciumfreisetzung. Im Cytosol werden die Calciumionen rasch durch Ca^{2+} -bindende Proteine wie Calmodulin abgefangen. Ein Effekt von Calcium/Calmodulin-Komplexen in glatten Muskelzellen (z. B. Myoepithelzellen der

Brustdrüse oder myometriale Zellen des Uterus) ist die Aktivierung der sogenannten Leicht-Ketten-Kinase des Myosins. Das phosphorylierte Myosin kann dann mit dem Cytoskelettprotein Aktin interagieren, was zur Kontraktion der Muskelzelle führt.

Die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion. Effektorproteine der $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit sind z. B. K^+ -Kanäle, bestimmte Isoformen der Phospholipase $C\beta$ und wahrscheinlich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (Clapham and Neer, 1993).

2.3. Cholesterin

Cholesterin ist ein wichtiger Bestandteil der Membranen der meisten eukaryontischen Zellen und beeinflusst in hohem Maße deren physikalische Eigenschaften. Es ist das Edukt für die Biosynthese von Steroidhormonen, wie z. B. von Gestagenen und Mineralokortikoiden. Cholesterin ist außerdem in der Lage, durch seine besonderen Strukturmerkmale die Wirkung von integralen Membranproteinen zu modulieren. Durch die Balance zwischen Aufnahme, Synthese, Speicherung und Abgabe wird die zelluläre Cholesterinhomöostase streng kontrolliert.

2.3.1. Struktur und Eigenschaften des Cholesterins

Cholesterin (Cholest-5-en-3 β -ol) enthält ein tetracyclisches Ringsystem in *trans*-Konfiguration, welches ihm seine fast planare Struktur verleiht (Abbildung 5). Die Seitenkette an C-Atom 17 gibt dem Molekül eine gewisse konformelle Flexibilität. Durch die 3 β -Hydroxylgruppe und die Doppelbindung zwischen C5 und C6 ist Cholesterin eigentlich ein ungesättigter Alkohol. Die OH-Gruppe (das Sauerstoffatom stammt aus O_2) stellt auch die einzige polare Stelle des Moleküls dar und verleiht ihm einen amphiphilen Charakter. Sowohl die 3-OH-Gruppe, die beiden Methylgruppen als auch die Seitenkette befinden sich auf derselben Seite der Ringebene (β -Konfiguration).

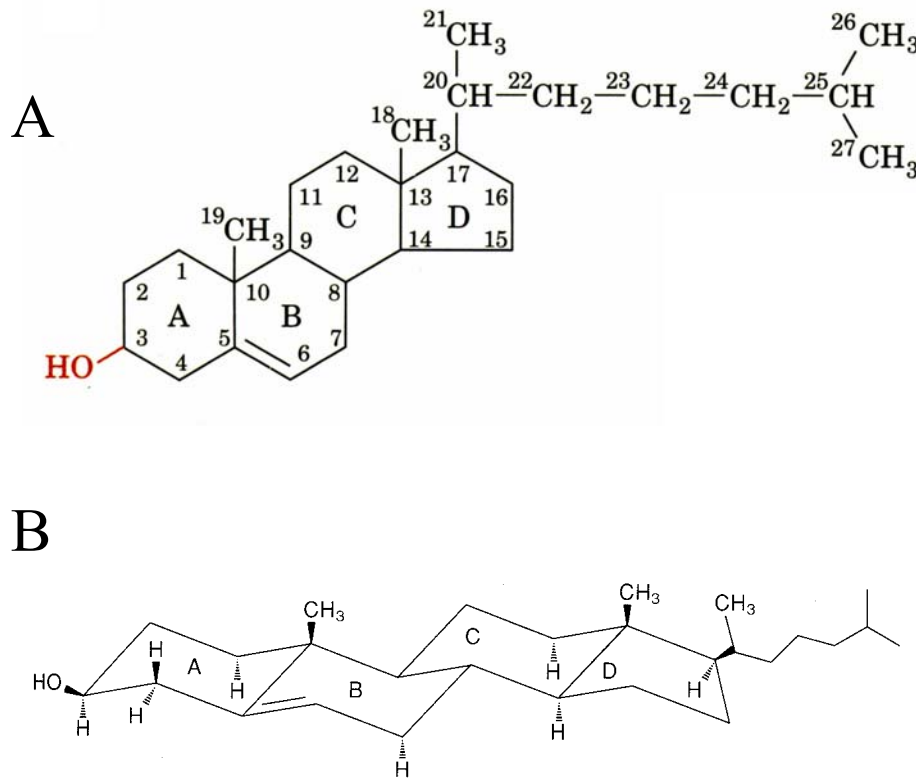


Abbildung 5: Struktur des Cholesterins

A Strukturmodell, **B** Skelettmodell

Durch den amphipathischen Charakter lagert sich Cholesterin mit seiner Längsachse senkrecht zur Membranebene in Lipiddoppelschichten ein, so dass die polare 3β -OH-Gruppe in Kontakt mit dem wässrigen Milieu steht, und die Kohlenwasserstoffkette im Zentrum der Lipiddoppelschicht liegt. Durch Interaktion der Kohlenwasserstoffketten zweier Cholesterinmoleküle, die sich in den gegenüberliegenden Hälften der Lipiddoppelschicht befinden, könnte es zur Dimerbildung kommen (Harris et al., 1995). Die 3β -OH-Gruppe hingegen interagiert wahrscheinlich mit dem Carbonylsauerstoffatom von Phospholipidkopfgruppen.

Cholesterin beeinflusst viele physikalische Parameter biologischer Membranen. Am bekanntesten ist sein Einfluss auf die Membranfluidität. Cholesterin verhindert durch seine Einlagerung zwischen die Fettsäureketten anderer Lipide deren Kristallisation und somit

Phasenübergänge der Lipiddoppelschicht. Darüber hinaus vermindert Cholesterin die Fluidität der Membran, indem es größere Bewegungen der Fettsäureketten verhindert. Das planare Ringsystem von Cholesterin ermöglicht eine geordnetere und dichtere Packung der Kohlenwasserstoffketten von Lipiden, so dass die Dicke der Membran erhöht und die Permeabilität für kleinere Moleküle vermindert wird (Bretscher and Munro, 1993). Durch seine flexiblere Kohlenwasserstoffkette hat Cholesterin hingegen einen geringeren Einfluss auf das Zentrum der Lipiddoppelschicht.

2.3.2. Intrazellulärer Cholesterintransport

Zellen haben prinzipiell zwei Cholesterinquellen. Sie können einerseits über plasmamembranständige LDL (low density lipoprotein)-Rezeptoren extrazelluläre Cholesterinester aufnehmen und zum anderen Cholesterin *de novo* aus Acetyl-CoA synthetisieren.

Ort der Cholesterinsynthese in der Zelle ist das endoplasmatische Retikulum (ER). Einer der ersten Schritte ist die Bildung von Mevalonat aus 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA. Diese Reaktion wird durch 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase katalysiert, das Schrittmacherenzym der Cholesterinsynthese. Durch zahlreiche weitere Reaktionen erfolgt über die Zwischenstufen Squalen und Lanosterol die Synthese des Cholesterinmoleküls.

Der Transport des endogen synthetisierten Cholesterins zur Plasmamembran erfolgt in einem schnellen (Halbwertszeit \approx 10 Minuten) und energieabhängigen Prozess (DeGrella and Simoni, 1982; Lange et al., 1991; Lange, 1991; Urbani and Simoni, 1990). Bei Temperaturen von unter 15 °C akkumuliert naszierendes Cholesterin im ER und in lipidreichen Vesikeln, die für den Transport verantwortlich sein sollen (Kaplan and Simoni, 1985; Urbani and Simoni, 1990). Eine Blockade des sekretorischen Transportweges durch Substanzen, die das Cytoskelett (z. B. Cytochalasin, Colchicin) oder den Golgi-Apparat (z. B. Brefeldin A) zerstören, vermindern allerdings nicht die Transportrate des Cholesterins zur Membran, was auf einen unabhängigen Weg schließen lässt (Fielding and Fielding, 1995; Smart et al., 1996). Mögliche Mechanismen sind also sowohl ein vesikulärer Transport, als auch Diffusion oder die Beteiligung von löslichen Carrierproteinen. Diese Mechanismen können einzeln oder zusammen zum Cholesterintransport beitragen (Reinhart, 1990). Uittenbogard *et al.* beschreiben zudem einen cytosolischen Komplex aus Caveolin, Hitzeschockprotein 56, Cyclophilin 40, Cyclophilin A und naszierendem Cholesterin, der für einen Transport zu Caveolae sorgt

(Uittenbogaard et al., 1998). Auf die Beteiligung der Caveolae am Cholesterintransport wird später noch näher eingegangen.

Exogenes Cholesterin wird durch die Endocytose von LDL-Partikeln aufgenommen. Der LDL-Rezeptor erkennt die Proteinhülle des LDL-Partikels, die hauptsächlich aus ApoB-100 besteht. Die Endocytose erfolgt durch Clathrin-coated Vesikel (Brown and Goldstein, 1986). Die LDL-Rezeptoren und ihre Liganden werden zu den frühen Endosomen transportiert, wo LDL von seinem Rezeptor dissoziiert und über die späten Endosomen zu Lysosomen weitersortiert wird. Die darin enthaltenen Cholesterinester werden dort zu freiem Cholesterin hydrolysiert. Der Großteil (70 %) dieses Cholesterins wird dann innerhalb kurzer Zeit zur Plasmamembran transportiert (Brasaemle and Attie, 1990; Johnson et al., 1990), doch auch ein direkter Weg von den Lysosomen zum ER wurde beschrieben (Neufeld et al., 1996; Spillane et al., 1995; Underwood et al., 1996; Underwood et al., 1998).

Das Cholesterin der Plasmamembran erfährt einen kontinuierlichen Austausch mit intrazellulärem Cholesterin. Innerhalb einer Stunde kann das gesamte Cholesterin der Plasmamembran ausgetauscht werden (Lange et al., 1993). Über den Weg des Cholesterins in das Zellinnere gibt es unterschiedliche Untersuchungsergebnisse. Da die Membranen der im Kontakt mit der Plasmamembran stehenden Endosomen auch viel Cholesterin enthalten, kommt es wahrscheinlich durch ständige Endocytose zu einem regen Austausch. Cholesterin gelangt aber auch durch nicht-vesikuläre Prozesse zum ER und zu anderen Organellen, wo es verestert oder für die Synthese von Gallensäuren und Steroidhormonen bereitgestellt wird. Ob dieser Transport durch spezielle Proteine, wie das Sterol-Carrier-Protein oder durch Diffusion geschieht, ist noch weitgehend ungeklärt. Das Steroidhormon Progesteron übt auf noch unbekannte Weise einen Einfluss auf die intrazellulären Transportwege des Cholesterins aus. Es inhibiert unter anderem die Aufnahme des Cholesterins aus der Plasmamembran in das ER und verhindert somit auch die Veresterung des Cholesterins. Der Austausch von Cholesterinmolekülen zwischen Lysosomen und der Plasmamembran scheint jedoch unbeeinflusst (Lange *et al.*, 1997).

Zellen besitzen die Möglichkeit, überschüssiges Cholesterin durch reversen Cholesterintransport wieder an das Blut und schließlich an die Leber zurückzugeben. In einem ersten Schritt muss dazu das intrazelluläre Cholesterin aus dem Golgi, dem ER und den Speichervesikeln an die Plasmamembran gebracht werden. Das Protein mit einer Schlüsselrolle in diesem Prozess ist das ABCA1 (ATP-Binding-Cassette Transporter A1). ABC Transporter sind eine Superfamilie von Proteinen, die unter ATP-Verbrauch den

Transfer unterschiedlicher Substrate zwischen Zellkompartimenten und aus der Zelle heraus bewerkstelligen. ABCA1 transportiert Cholesterin und Phospholipide (meist Phosphatidylcholin) zu Apolipoproteinen, die an der Zelloberfläche gebunden sind (Oram, 2000; Oram and Yokoyama, 1996; Rothblat et al., 1999; Yokoyama, 1998).

Das von der Leber gebildete lipidarme Apolipoprotein (apo)A-I zirkuliert zu peripheren Zellen und nimmt dort Cholesterin und Phospholipide auf. In einer komplexen Serie von Schritten, in denen weitere Lipide und Proteine aufgenommen werden und Cholesterin verestert wird, reift das apoA-I zu sphärischen Partikeln, die den Hauptbestandteil der HDLs (high density lipopreins) ausmachen. Unter der gemeinsamen Beteiligung von Cholesterinester-Transferprotein, Phospholipid-Transferprotein, Scavengerrezeptor B1 und hepatischer Lipase werden diese Partikel prozessiert und umgeformt. Die HDL-Cholesterinester werden dabei auf andere Lipoproteine und Zellen übertragen und lipidarmes apoA-I wieder regeneriert (Oram and Yokoyama, 1996; Silver and Tall, 2001; Terpstra et al., 2000).

2.3.3. Cholesterin in biologischen Membranen

Die Verteilung von Cholesterin in der Zelle ist sehr heterogen. Den höchsten Gehalt an Cholesterin besitzt die Plasmamembran. Hier reichen die Schätzungen des Gehalts von 40 % (van Meer, 1989) bis über 90 % (Lange et al., 1989), je nach angewandeter Untersuchungsmethode. Der Cholesteringehalt intrazellulärer Membranen ist dagegen weitaus geringer. Während Membranen mit vesikulärem Austausch mit der Plasmamembran noch relativ viel Cholesterin besitzen, ist der Anteil in Mitochondrien- und ER-Membranen nur noch gering ($\leq 12\%$) (Liscum and Munn, 1999; Yeagle, 1985).

Doch auch der Aufbau der Lipiddoppelschicht ist von der asymmetrischen Verteilung der Lipidklassen in den beiden Hälften geprägt (Op den Kamp, 1979). In der extrazellulären Hälfte sind cholinhaltige Lipide (Phosphatidylcholin und Sphingomyelin) sowie Glycosphingolipide angereichert, wohingegen in der intrazellulären Hälfte aminhaltige Lipide (Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin) dominieren. Diese Lipidasymmetrie wird durch eine Aminophospholipidtranslokase aufrechterhalten, die Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin zwischen den beiden Hälften transportiert (Devaux, 1991). Die Verteilung des Cholesterins in den einzelnen Hälften ist jedoch noch umstritten (Boesze-Battaglia et al., 1996; Schroeder et al., 1990). Da Cholesterin gut mit Sphingomyelin interagiert, Phosphatidylethanolamin hingegen eine thermodynamisch

ungünstige Umgebung für Cholesterin bietet, ist eine Anreicherung in der äußeren Hälfte wahrscheinlich (Boesze-Battaglia and Schimmel, 1997). Diese Anreicherung könnte passiv alleine durch die Verteilung der Phospholipide erfolgen, da Cholesterin durch seinen überwiegend hydrophoben Aufbau sehr leicht zwischen den Hälften der Lipiddoppelschicht hin- und herwechseln kann (sogenannter „flip-flop“) (Backer and Dawidowicz, 1981).

Das „fluid mosaic model“ biologischer Membranen beinhaltet eine freie Diffusion der Proteine und Lipide in der Membranebene und impliziert deren gleichmäßige Verteilung. Proteine und Lipide sind jedoch auch lateral sehr heterogen in der Plasmamembran verteilt. Sie bilden Mikrodomänen, die sich auch in ihrer Cholesterinzusammensetzung stark unterscheiden. Besondere Bedeutung hat die Hypothese über die Bildung sogenannter „Rafts“ (engl. für „Floß“) erlangt (Harder and Simons, 1997; Simons and Ikonen, 1997). Hier wird die Existenz von kleinen ($\varnothing \approx 70$ nm), dynamischen Domänen mit erhöhtem Cholesterin- und Sphingolipidgehalt postuliert, die durch ihren speziellen Lipidgehalt mit bestimmten Proteinen assoziieren, während andere Proteine ausgeschlossen werden. „Rafts“ werden als Plattformen gesehen, die sich schon im Golgi ausbilden und als Sortiereinheiten für Membranproteine dienen. Durch die Rekrutierung entsprechender Proteine wird auch eine Beteiligung an der Signaltransduktion angenommen. Eine andere Bezeichnung dieser Domänen ist „DIGs“ (detergent-insoluble glycolipid-enriched membrane domains), was auf die Methode der Isolierung dieser Mikrodomänen zurückzuführen ist. Hierzu werden Zellen mit nicht-ionischen Detergenzien wie Triton X-100 bei niedriger Temperatur (4 °C) inkubiert, und der Extrakt wird anschließend in einem Dichtegradient fraktioniert. Die Cholesterin-Sphingolipid-Rafts sind in dem Detergenz bei 4 °C unlöslich und bilden darin Glycolipid-angereicherte Komplexe aus. Aufgrund ihres hohen Lipidgehalts werden die „DIGs“ im Gradienten bei niedriger Dichte isoliert. Nachdem sich „Rafts“ lange Zeit nur durch die Methode ihrer Isolierung definierten, lässt die Entwicklung neuer Techniken auch die Identifikation in lebenden Zellen zu (Kenworthy et al., 2000; Pralle et al., 2000; Schutz et al., 2000; Varma and Mayor, 1998). Als eine spezielle Form von „Rafts“ können Caveolae angesehen werden, kleine Einstülpungen der Plasmamembran, die das Cholesterin-bindende Strukturprotein Caveolin enthalten (Murata et al., 1995). Caveolae haben einen Durchmesser von etwa 50 – 100 nm und enthalten ca. 3000 Sphingosinmoleküle. Die zumeist flaschenförmigen Clathrin-freien Einstülpungen kommen in mehr oder weniger ausgeprägter Form in den meisten Zellen höherer Eukaryonten vor (Okamoto et al., 1998). Die Funktionen der Caveolae liegen

wahrscheinlich in der Beteiligung an der Signaltransduktion, bei der Transcytose und/oder Endocytose von Molekülen und der intrazellulären Cholesterinhomöostase. Die Beteiligung von Caveolin am Cholesterintransport wird durch einige Befunde unterstützt: (1.) Caveolin ist ein Cholesterin-bindendes Protein (Murata et al., 1995). (2.) Neusynthetisiertes Cholesterin erscheint zuerst in den Caveolae der Plasmamembran (Fielding and Fielding, 1995; Smart et al., 1996). (3.) die Inhibierung des Cholesterintransports durch Progesteron führt zur Akkumulation von Caveolin im ER (Smart et al., 1996). (4.) Oxidation des Cholesterins in Caveolae führt zur Verteilung des Caveolins zuerst im ER und dann im Golgi (Smart et al., 1994). (5.) Die Konzentration von Caveolin mRNA korreliert mit derjenigen von freiem Cholesterin in der Zelle (Bist et al., 1997; Fielding et al., 1997).

Durch die hohe Cholesterinkonzentration ($> 300 \mu\text{g}/\text{mg}$ Protein) in den Caveolae und die Cholesterin-bindenden Eigenschaften von Caveolin ist es nicht überraschend, dass diese Strukturen wichtig für den intrazellulären Cholesterintransport (Smart et al., 1996; Uittenbogaard et al., 1998) und für den Cholesterinefflux zu extrazellulären Lipoproteinen sind (Fielding and Fielding, 1997).

2.3.4. Einfluss auf Membranproteine

Die Rolle der Membranlipide geht weit über die einfache Kompartimentierung und Abgrenzung der Zelle hinaus. In den letzten zwanzig Jahren wurde entdeckt, dass insbesondere Cholesterin die funktionellen Eigenschaften einiger Membranproteine beeinflusst. Darunter sind auch Rezeptoren, wie der Transferrinrezeptor (Nunez and Glass, 1982), der nikotinische Acetylcholinrezeptor (Dreger et al., 1997; Fernandez-Ballester et al., 1994; Narayanaswami and McNamee, 1993), der Oxytocinrezeptor (Gimpl et al., 1995; Klein et al., 1995a) und Rhodopsin (Albert et al., 1996b). Vielfach ist die genaue Wirkungsweise des Cholesterins auf die Proteine allerdings noch unbekannt. Im folgenden werden die Untersuchungen an drei GPCRs vorgestellt, bei denen die vielfältigen Wirkungsweisen des Cholesterins verdeutlicht werden. Am genauesten untersucht ist der dabei das Rhodopsin, da es in hohen Dichten in natürlichem Gewebe vorkommt und deshalb leicht zu reinigen ist. Im Anschluss daran wird der Unterschied der Wirkungsweise des Cholesterins an OTR und CCKR dargestellt.

Rhodopsin

Der Photorezeptor Rhodopsin aktiviert nach Lichtabsorption eine Signalkaskade, in deren Folge die Sehzelle hyperpolarisiert wird. Licht induziert eine Reihe von Konformationsänderungen des Rhodopsins, wobei die Umwandlung von Metarhodopsin I zu Metarhodopsin II die aktivierte Form des Rezeptors erzeugt (Stryer, 1986). Durch hohe Cholesterinmengen wird das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Konformationen in Richtung des Metarhodopsin I verschoben (Mitchell et al., 1990; Straume and Litman, 1987; Straume and Litman, 1988). Dadurch wird die Aktivierung des Rhodopsins durch Licht verhindert (Boesze-Battaglia and Albert, 1990).

Im Falle des Rhodopsins werden sowohl direkte als auch indirekte Wirkungsmechanismen des Cholesterins diskutiert. Eine indirekte Wirkung wird bei Rekonstitutionsexperimenten vermutet, indem Cholesterin das freie Volumen für molekulare Bewegungen in der Lipiddoppelschicht reduziert. Da die Umwandlung von Metarhodopsin I in Metarhodopsin II von einer Volumenexpansion begleitet wird, könnte Cholesterin die Bildung des aktiven Rhodopsins verhindern (Attwood and Gutfreund, 1980; Mitchell et al., 1990). Im Gegensatz dazu finden Alberts *et al.* in FRET-Experimenten mit fluoreszierenden Sterolen eine direkte Interaktion im Verhältnis 1:1 (Albert et al., 1996b). Darüber hinaus hat Cholesterin eine protektive Wirkung auf Rhodopsin, indem es das Protein vor thermischer Denaturierung schützt (Albert et al., 1996a).

Der Oxytocinrezeptor

Durch Rekonstitutionsexperimente wurde gezeigt, dass Cholesterin essentiell für die hochaffine Ligandenbindung ist ($K_D = 1-2$ nM). Durch Entzug des Cholesterins aus der Plasmamembran von Meerschweinchen durch Cyclodextrin stieg die Dissoziationskonstante des Rezeptors für Oxytocin auf $K_D = 131$ nM an, ohne dass sich die Anzahl der Bindungsstellen änderte ($B_{\max} = 1,7$ pmol/mg) (Klein et al., 1995b). Dieser Effekt war durch Wiederanreicherung der Membranen mit Cholesterin-Cyclodextrin-Komplexen völlig reversibel. Wurde nur ein Teil des Cholesterins aus den Membranen entfernt, so führte dies zu einem Gleichgewicht zwischen Rezeptoren mit hoher und Rezeptoren mit niedriger Affinität. Rezeptoren mit mittlerer Affinität wurden nicht beobachtet. Da der Zusatz von Cholesterin zu Detergegensolubilisiertem Rezeptor ähnliche Effekte hervorrief, deutete dies auf eine direkte Interaktion zwischen Cholesterin und dem OTR hin.

Die Experimente von Gimpl *et al.* (Gimpl *et al.*, 1997) bestätigten diese Hypothese der direkten Interaktion. Dabei konnte der Cholesteringehalt der Plasmamembran durch verschiedenen Methoden ohne Beeinflussung der Fluidität verändert werden. Hier zeigte sich schon eine entscheidende Verminderung der OT-Ligandenbindung. Nach Ersatz des Cholesterins durch eine Vielzahl unterschiedlicher Steroide wurde deren Fähigkeit, die hochaffine Ligandenbindung des Rezeptors wiederherzustellen, ermittelt. Aus den jeweiligen Veränderungen gegenüber Cholesterin und den entsprechenden Bindungswerten konnte ein Zusammenhang zwischen Strukturelementen des Cholesterins und deren Wirkung auf den OTR hergestellt werden (Abbildung 6).

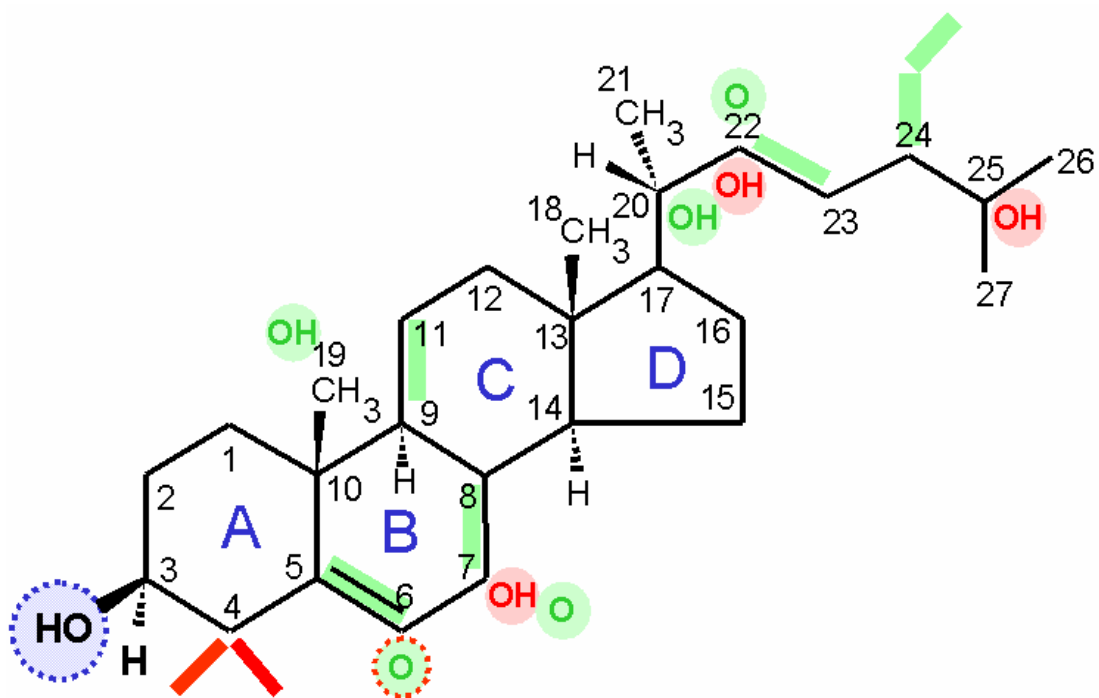


Abbildung 6: Strukturelle Merkmale von Cholesterin, die für den hochaffinen Zustand des Oxytocinrezeptors wichtig sind

Steroide haben „verbotene“ Modifikationen (rot), wenn sie die Ligandenbindung des OT-Rezeptors nur in geringem Maße im Vergleich zu Cholesterin wiederherstellten, und „erlaubte“ Modifikationen (grün) wenn sie die Ligandenbindung zu mehr als 50 % wiederherstellten. Blau gekennzeichnet ist die 3 β -OH-Gruppe, die für den hochaffinen Zustand des OT-Rezeptors absolut notwendig ist, grün mit rotem Rand ist die C6-Ketogruppe von 6-Ketocholestanol dargestellt, dieses Steroid zeigte 23 % Wirksamkeit. Abbildung aus (Gimpl, 2000).

Durch den sigmoidalen Zusammenhang zwischen Cholesteringehalt und OT-Bindung in OTR-haltigen Membranen (Abbildung 7) kann auf einen kooperativer Zusammenhang geschlossen werden. Eine von Frau Dr. K. Burger durchgeführte Hill-Analyse lieferte

einen Hill-Koeffizienten von 5,7, was die Bindung von fünf bis sechs Cholesterinmoleküle vermuten lässt (Burger, 2000).

Zu erwähnen ist zudem auch hier die schützende Wirkung des Cholesterins auf den OTR gegen die thermische Denaturierung (Gimpl and Fahrenholz, 2000).

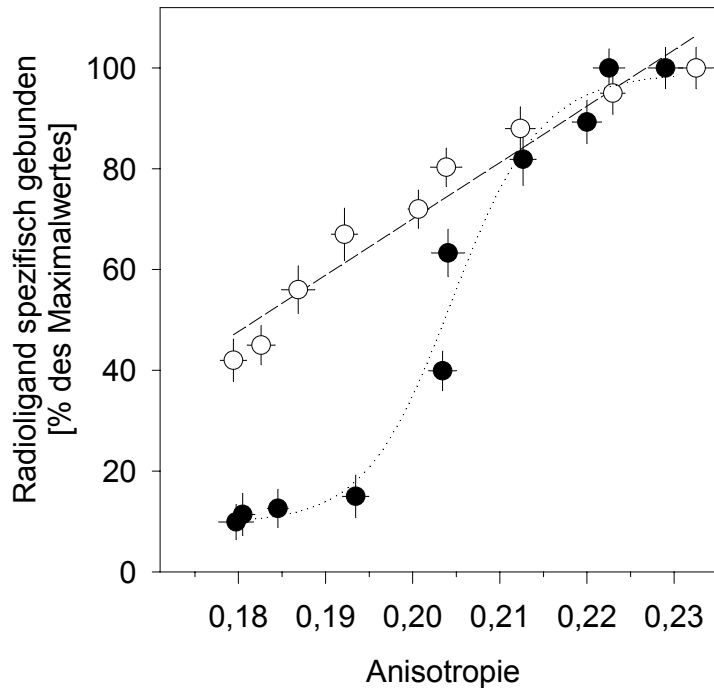


Abbildung 7: Ligandenbindung des Oxytocinrezeptors (●) und des Cholecystokinrezeptors (○) in Abhängigkeit von der Anisotropie der Membranen

Membranen aus Zellen, die den OTR bzw. CCKR exprimierten, wurden durch Behandlung mit Cyclodextrinen unterschiedliche Mengen an Cholesterin entzogen. Durch Messung der Anisotropie und der Ligandenbindung wurde für die beiden Rezeptoren eine unterschiedliche Korrelation gefunden (die Anisotropie von Membranen nimmt proportional zur verminderten Cholesterinmenge ab). Abbildung aus (Burger, 2000).

Der Cholecystokinrezeptor

Cholesterin kann durch seinen Einfluss auf die Membranfluidität die direkte Umgebung des Membranrezeptors verändern. So wurde für den Cholecystokinrezeptor eine hohe Korrelation zwischen der Agonistenbindung und der Fluidität der Plasmamembran gefunden.

Folgende Beobachtungen (Burger, 2000; Gimpl et al., 1997) demonstrierten, dass der CCK-Rezeptor indirekt über die Membranfluidität durch Cholesterin beeinflusst wird: (1) Die Ligandenbindung des CCK-Rezeptors wurde nicht durch Oxidation des Cholesterins zu 4-Cholesten-3-on beeinflusst (keine Änderung der Membranfluidität). (2) Substitution

von Cholesterin durch verschiedene Steroide zeigte, dass die Ligandenbindung des CCK-Rezeptors nicht von der Struktur des Steroids, sondern von der resultierenden Membranfluidität abhängt. (3) Die Ligandenbindung des CCK-Rezeptors ist direkt proportional zur Anisotropie der Membran.

Beispiele für Rezeptoren, die ebenfalls über die Membranfluidität reguliert werden, sind neben dem menschlichen CCK-Rezeptor der β -adrenerge Rezeptor und der Serotoninrezeptor (Cimino et al., 1984; Heron et al., 1980).

Zusammenfassend kann man feststellen, dass Cholesterin die Funktion von Membranproteinen sowohl indirekt über Änderungen der biophysikalischen Parameter der Membran als auch durch direkte Interaktion beeinflussen kann. Cholesterin kann, wie im Falle des OT-Rezeptors und des CCK-Rezeptors, die Funktion von Membranproteinen unterstützen oder, wie am Beispiel des Rhodopsins gezeigt, zu einer Inhibierung der Signaltransduktion führen. Cholesterin scheint darüber hinaus die thermische Stabilität von Rezeptoren zu erhöhen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die spezifische Interaktion zwischen Cholesterin und Membranproteinen am Beispiel G-Protein-gekoppelter Rezeptoren aufzuklären. Krankheiten, deren Ursache in einem gestörten Cholesterinmetabolismus oder -transport liegt, wie das Smith-Lemli-Opitz-Syndrom (Kelley and Hennekam, 2000), die Niemann-Pick-Krankheit Typ C (Morris and Carstea, 1998) oder die Tangier-Krankheit (Gura, 1999; Scott, 1999), verdeutlichen die Notwendigkeit, auch den Zusammenhang zwischen der intrazellulären Verteilung des Cholesterins und seiner Wirkung auf Membranproteine zu erforschen.

2.4. Ziele der Arbeit

Der Oxytocinrezeptor wird durch Cholesterin in seiner Ligandenaffinität moduliert. Dies geschieht durch eine spezifische Interaktion mit dem Cholesterin der Plasmamembran. Dadurch kann der Rezeptor seinen Liganden in einem hochaffinen Zustand binden. Mit Erniedrigung des Cholesteringehalts der Plasmamembran verliert der Rezeptor diese hochaffine Bindung und geht in einen niederaffinen Zustand über (Klein et al., 1995b).

Zu Beginn dieser Arbeit sollten diese Befunde auch für die dem OTR verwandten Vasopressinrezeptoren untersucht werden, um zu überprüfen, ob es sich bei der

spezifischen Cholesterinabhängigkeit um ein allgemeingültiges Prinzip der Unterfamilie der Rezeptoren der Neurohypophysenhormone handelt.

Ein Ziel dieser Arbeit war dann die Identifizierung der potentiellen Cholesterinbindungsstelle(n) im OTR. Dazu wurden drei Strategien gewählt. Zum ersten sollten schrittweise die Transmembranbereiche des OTRs durch die entsprechenden Bereiche des CCK_BR substituiert werden. Der CCK_BR wird von Cholesterin nur über die Modulierung der Membranfluidität beeinflusst (Gimpl et al., 1997). Diese OTR-CCK_BR-Chimären sollten noch zur Bindung des Liganden Oxytocin befähigt sein, um ihre Cholesterinabhängigkeit in Radioligandenstudien zu überprüfen. Bei entsprechenden Hinweisen auf bestimmte Aminosäuren, die an der Wechselwirkung mit Cholesterin beteiligt sind, waren Punktmutationen zur Überprüfung dieser Befunde geplant.

Als zweiter Ansatz zur Eingrenzung der Wechselwirkungsbereiche wurde computergestütztes „Modeling“ durchgeführt. Hieraus sollten Hinweise auf mögliche Interaktionsbereiche gewonnen werden. Zudem können Ergebnisse, die durch diese theoretischen Berechnungen gefunden werden, mit den erhaltenen experimentellen Daten verglichen werden.

FRET-Messungen (Fluorescence Resonance Energy Transfer) bieten eine weitere Möglichkeit der Untersuchung molekularer Wechselwirkung. Bei dieser Methode handelt es sich um einen strahlungslosen Energietransfer (Förster-Transfer), bei dem es zwischen zwei Fluoreszenzfarbstoffen zu einem abstandsabhängigen Übergang der Anregungsenergie von einem Donor zu einem Akzeptor kommt. Zu diesem Zweck sollte ein selbst synthetisiertes fluoreszierendes Cholesterinderivat eingesetzt werden, das durch vorherige Untersuchungen bereits gute Interaktionseigenschaften beim OTR aufweisen konnte (Wiegand, 1998). Durch das Werkzeug des fluoreszierenden Cholesterinderivats eröffnete sich eine weitere Perspektive für diese Arbeit. Nach der Charakterisierung des Derivats als guter Substituent für Cholesterin konnte es in der Mikroskopie eingesetzt werden, um die Eigenschaften und den Transport zellulären Cholesterins zu beobachten. Mit Hilfe von Cyclodextrinen als Donormoleküle gelang es, das Molekül in die Plasmamembran einzulagern und seinen Weg durch die Zelle zu verfolgen. Durch den Einsatz verschiedener Zelllinien und Wirkstoffe, die einen Einfluss auf die Cholesterinverteilung in der Zelle haben, sollte ein Einblick auf die zellulären Verteilungs- und Transportmechanismen des Cholesterins gewonnen werden.

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien und Geräte

Allgemeine Laborchemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ameisensäure	AppliChem, Darmstadt
Ampicillin (Natriumsalz)	Roth, Karlsruhe
Bactoagar	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BES	Sigma, Deisenhofen
BSA	Roth, Karlsruhe
BSA (fettsäurefrei)	Sigma, Deisenhofen
CaCl ₂	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Dansylhydrazin	Sigma, Deisenhofen
Deoxyglukose	Sigma, Deisenhofen
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen
Diethylether	Roth, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DNA-Marker (Längenstandards)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
dNTPs	Sigma, Deisenhofen
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Epicholesterol	Steraloids, Wilton (NH, USA)
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethandithiol (EDT)	Merck, Darmstadt
Ethylacetat	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylenglykolmonomethylether	Serva, Heidelberg
Filipin	Sigma, Deisenhofen

Filter-Count Szintillationscocktail	Packard, Groningen (Niederlande)
GF/C-Glasfaserfilter, Whatman	Bender & Hohbein, Bruchsal
Glukose	AppliChem, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
Hepes	Sigma, Deisenhofen
Heptan	Aldrich, Taufkirchen
IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin)	Sigma, Deisenhofen
Insulin	Sigma, Deisenhofen
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Kieselgel 60 (40-63 µm)	Merck, Darmstadt
Kieselgel 60 (HPTLC Fertigplatten F ₂₅₄)	Merck, Darmstadt
KOAc	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs (Schweiz)
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Methyl-β-Cyclodextrin	Sigma, Deisenhofen
Molekularsieb 3 Å	Merck, Darmstadt
Mowiol	Calbiochem, Bad Soden
NaCl	Roth, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
NaOAc	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Polyethylenglykol	Roth, Karlsruhe
Poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Rotiphenol	Roth, Karlsruhe
Rotiszint eco plus	Roth, Karlsruhe

Saccharose	Sigma, Deisenhofen
Steroide (außer Epicholesterol)	Sigma, Deisenhofen
Toluol	Fluka, Buchs (Schweiz)
Tris	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypton	AppliChem, Darmstadt
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

Enzyme und Kitsysteme

Bradford Protein Assay Kit	Roth, Karlsruhe
Cholesterinoxidase	Sigma, Deisenhofen
Cholesterinbestimmungskit	Boehringer, Mannheim
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
Restriktionsenzyme	Pharmacia Biotech, Freiburg
Restriktionsenzyme	Gibco BRL, Eggenstein
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Sigma, Deisenhofen
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Trypsin	PAA, Linz (Österreich)
Vent-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
Plasmid Midi/Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Nucleo Spin Kit 2 in 1 Extract	Macherey-Nagel, Düren
Nucleo Spin Kit Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
QIAquick Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden

Zellkulturmedien und Zusätze

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	PAA, Linz (Österreich)
Dulbecco's modified Eagle medium	Sigma, Deisenhofen
DMEM (ohne Phenolrot)	Sigma, Deisenhofen

Fötale Kälberserum	PAA, Linz (Österreich)
Geneticin (G418-Sulfat)	PAA, Linz (Österreich)
Glutamin (100x)	PAA, Linz (Österreich)
Minimum essential medium (MEM)	Sigma, Deisenhofen
Serum Plus Serum Supplement (Nu-Serum)	JRH Biosciences, Andover (England)
Penicillin/ Streptomycin (100x)	PAA, Linz (Österreich)

Isotopenmarkierte Substanzen

[<i>tyrosyl</i> -2,6- ³ H]Oxytocin (NET-858, 44 Ci/mmol)	NEN Du Pont de Nemours, Bad Homburg
D(CH ₂) ₅ [D-Tyr(Et) ² , Val ⁴ , Lys ⁸ , Tyr-NH ₂ ⁹]AVP	Dr. M. Manning, Toledo (OH,USA)
[1,2- ³ H(N)]-Cholesterin(NET-135, 48,3 Ci/mmol)	NEN Du Pont de Nemours, Bad Homburg

Peptidhormone

Oxytocin	Bachem, Heidelberg
Arginin-Vasopressin	Bachem, Heidelberg

Laborgeräte

Acryl-Halbmikroküvetten	Sarstedt, Nürnberg
Analysenwaage	Mettler-Toledo GMBH, Gießen
Bildplatte BAS-MP 2025	Fujifilm, Düsseldorf
Bio-Imaging Analyzer BAS-1800 (Fuji)	raytest, Straubenhardt
Brandel Cell Harvester	Brandel, Gaithersburg (USA)
CCD-Kamera	raytest, Straubenhardt
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Osterode
Doppelstrahlphotometer U-2000	Hitachi (Japan)
Evaporationsapparatur Reacti Therm	Pierce, Rockford (USA)
Flachbettgelapparatur für DNA	Eigenbau
Fluoreszenzspektrometer Quantamaster	Photon Technology Int., NJ (USA)
Flüssigkeitsszintillationszähler Tri-carb 2100R	Canberra Packard, Dreieich
Elektrophorese-Apparatur	Biometra, Göttingen
Gewebekulturschalen	Sarstedt, Nürnberg
Gewebekulturschalen	Greiner, Kremsmünster (Österreich)

Glaspotter (Homogenisatoren)	GLW, Würzburg
Glaszentrifugenröhrchen	DuPont, Bad Homburg
Heizblock	Bioblock Scientific, Illkirch Cedex (Frankreich)
Inkubationsschüttler	Multitron Infors GmbH, Bottmingen (Schweiz)
Kühlzentrifuge J2-21	Beckmann, München
Kunststoffspritzen (10 und 50 ml)	Braun, Melsungen
Kunststoffzentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Mikrofilter (0,2 und 0,4 µm)	Sarstedt, Nürnberg
Mikrotiterplatte (6-, 24- und 96-Napf)	Greiner, Kremsmünster (Österreich)
Mikrotiterplatten (12-Napf)	Nunc, Wiesbaden
Phasenkontrast-Mikroskop CK 2	Olympus, Hamburg
PCR-Reaktionsgefäße	peq Lab, Erlangen
Peristaltikpumpe P1	LKB, Bromma (Schweden)
Petrischalen	Sarstedt, Nürnberg
pH-Meter	WTW, Weilheim
Polystyrolküvetten	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Rotationsverdampfer Rotavapor R-134	Büchi, Flawil (Schweiz)
Scanner BAS-1800	Fujifilm, Düsseldorf
Spannungsquelle Power-All	Serva, Heidelberg
Speed-Vac Vakuumzentrifuge	Savant Instruments, Farmingdale, NY (USA)
Sterilwerkbank Hera Safe HS 12	Heraeus, Hanau
Szintillationsröhrchen	Canberra Packard, Dreieich
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thoma-Zählkammer (0,1 mm x 0,04 mm ²)	Brandt, Wertheim
Tischzentrifuge Sorvall Technospin	DuPont, Wilmington, DE (USA)
Tischzentrifuge (5415C)	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge (5415R)	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator 4000	Stratagene, Heidelberg
Thermocycler	Perkin-Elmer, Norwalk, CT (USA)

Thoma-Zählkammer (0,1 mm x 0,04 mm ²)	Brandt, Wertheim
Ultraschallgerät Branson Sonifier Cell	Heinemann, Schwäbisch-Gmünd
Disruptor B15 mit Mikrospritze	
Ultrazentrifuge L7-65	Beckman, München
Vortexer	Janke und Kunkel, Heitersheim
Wasserbad	BFL, Burgwedel
Zellkulturbrutschrank	Heraeus, Hanau
Zentrifugenbecher (50 und 250 ml)	Beckmann, München
Zentrifugenrotoren JA14 und JA20	Beckmann, München

Plasmide

pcDNA3-Vektor

Der Firma Invitrogen, Leek (Niederlande). Dieser eukaryontische Expressionsvektor trägt den Cytomegalovirus (CMV)-Promotor, der eine hohe transiente und stabile Expression von Genen in vielen eukaryontischen Zellen ermöglicht. Er trägt außerdem den SV40-Origin, ein Polyadenierungssignal und das Neomycin-Resistenzgen zur Selektion von Transformanten mit Geneticin (G418).

Oligonukleotide

Die Sequenzen aller Oligonukleotide sind in 5'- → 3'-Orientierung aufgeführt. Fehlpaarungen der DNA-Basen sind unterstrichen, neu eingefügte Restriktionsschnittstellen sind fettgedruckt und das dazugehörige Enzym ist hinter der DNA-Sequenz angeführt.

Oligonukleotid für OTR-Mutagenese:

hOT_Not_Eco: GCG **GCG GCC GCC** GAG GCG CCA **GAA TTC** GCG GCG
GCT G *NotI, EcoRI*

pcDNA3_Seq_rev: ACT AGA AGG CAC AGT CGA G

Oligonukleotide für OTR-CCK_BR-Chimäre1:

CCKR_Eco: CGC CGG AAT TCC TGG AGC TGA CGG CG *EcoRI*

CCKR_Stopp_Xba: AGC TAG TCT AGA TCA GCC AGG GCC CAG *XbaI*

Oligonukleotide für OTR-CCK_βR-Chimäre2:

pcDNA3_Pst_rev: CCT CGT CCT GCA GTT CAT TC

Chim2_Stu_blunt: CCT ACA TCA CCT GGT CCG TAC TGC TG

Oligonukleotide für Punktmutante W203L:

hOT_W203L_rev: GTA GAC AGC TAG CGT GAT CAG TGT GAT GTA GGC CTT
GGG

pcDNA3_seq: AGC AGA GCT CTC TGG CTA

Oligonukleotide für Adaterligation:

FLASH_Eco_1: AAT TCA AGC TTT GGG AGG CCG CAG CCA GGG AGG CCT
GTT GCC GCG AGT GTT GCG CAC GCG CCG *EcoRI*

FLASH_Eco_2: AAT TCG GCG CGT GCG CAA CAC TCG CGG CAA CAG GCC
TCC CTG GCT GCG GCC TCC CAA AGC TTG *EcoRI*

Zelllinien

- Bakterienzelllinie *Escherichia coli* **DH5α** ($\phi 80\delta lacZ\Delta M15$, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* ($r_k^- m_k^+$), *supE44*, *relA1*, *deoR*, $\Delta(lacZYA-argFV169)$, F^- , λ^-): Clontech, Heidelberg
- **HEK293** (menschliche embryonale Nierenzelllinie): ATCC, Rockville (USA), Nr. CRL-1573
 - **HEK-OTRHis** (HEK293 stabil transfiziert mit einem menschlichen Oxytocinrezeptor-Konstrukt (N-terminales FLAG-Epitop, gefolgt von einem c-myc-Epitop und ein C-terminales Dekahistidin-tag): Dr. G. Gimpl (Universität Mainz)
 - **HEK-V₁R** (HEK293 stabil transfiziert mit dem menschlichen Vasopressinrezeptor Typ V_{1a}): Dr. M. Thibonnier, Ohio (USA)
 - **HEK-V₂R** (HEK293 stabil transfiziert mit dem menschlichen Vasopressinrezeptor Typ V₂): Dr. S. Gilbert (Universität Mainz)
- **COS-7** (Nierenzellen aus African green monkey): ATCC, Rockville (USA), Nr. CRL-165
- **CHO-K1** (Chinese hamster ovary-Zellen): ATCC, Rockville (USA), Nr. CCL-61
 - **25RA** (CHO-Zellen mit erhöhter Akkumulation von Cholesterinestern in Lipidtröpfchen): Prof. T.Y. Chang, Hanover (USA)

- **CHO-AC29** (CHO-Zellen, deren ACAT-Aktivität weniger als 1 % beträgt):
Prof. T.Y. Chang, Hanover (USA)
- **3T3-L1** (Präadipozyten): ATCC, Rockville (USA), Nr. CL-173

3.2. Häufig benutzte Puffer und Zellkulturmedien

Zur Zubereitung aller Puffer und Bakterienmedien wurde gereinigtes Wasser aus einer Millipore Milli Q-Wasserreinigungsanlage verwendet.

3.2.1. Puffer

Auftragspuffer: 0,4 % (w/v) Bromphenolblau, 0,4 % (w/v) Xylencyanol, 50 % (w/v) Glycerin

BBS-Puffer: 50 mM BES; 1,5 mM Na₂HPO₄; 280 mM NaCl; pH 6,95 exakt einstellen, steril filtrieren

Bindungspuffer (für OT-Rezeptor): 20 mM HEPES/NaOH (pH = 7,4); 5 mM MgCl₂

Bindungspuffer (für V₁- und V₂-Rezeptor): 50 mM HEPES/NaOH (pH = 7,4); 5 mM MgCl₂

Filtrationspuffer (für OT-Rezeptor): 10 mM Tris/HCl (pH = 7,4); 5 mM MgCl₂

Filtrationspuffer (für V₁- und V₂-Rezeptor): 15 mM Tris/HCl (pH = 7,4); 5 mM MgCl₂

HBS: 10 mM HEPES (pH = 7,4); 140 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,5 mM MgCl₂

Hypotonischer Lysispuffer: 10 mM HEPES/NaOH (pH = 7,4); 5 mM EDTA; 10 µg/ml Leupeptin; 0,1 mg/ml Pefabloc; 0,1 mg/ml Bacitracin; 5 µg/ml Pepstatin A

MES-Puffer: 3 mM MES (2-(N-Morpholin)ethansulfonsäure), pH = 6,2, 3 M NaCl

Mikroskopiepuffer: 145 mM NaCl; 4,5 mM KCl; 1,2 mM MgCl₂; 1,2 mM CaCl₂; 10 mM Hepes/NaOH (pH = 7,4)

PBS: 137 mM NaCl; 27 mM KCl; 7,1 mM NaH₂PO₄ x 2 H₂O; 1,5 mM KH₂PO₄ (pH = 7,4 mit 2 N NaOH eingestellt)

STET-Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 8 % (w/v) Saccharose, 5 % (w/v) Triton X-100, 50 mM EDTA

50 x TAE-Puffer: 242 g Tris; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA; pH = 8,0 in 1 Liter Wasser

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH = 8,0); 1 mM EDTA

3.2.2. Zellkulturmedien

DMEM-Komplettmedium (für HEK293-Zellen): DMEM-Flüssigmedium wurde durch Zusatz von 5 ml 200 mM L-Glutamin, 5 ml P/S und 50 ml FCS pro 500 ml Medium supplementiert. Alle Medien wurden nach der Supplementierung im Dunkeln bei 4 °C gelagert und innerhalb von 14 Tagen verbraucht.

DMEM Nutrient Mixture F-12 HAM-Komplettmedium (für CHO-K1-Zellen): DMEM Nutrient Mixture F-12 HAM-Flüssigmedium wurde durch Zusatz von 5 ml 200 mM L-Glutamin, 5 ml P/S und 50 ml FCS pro 500 ml Medium supplementiert.

MEM (für Transfektionen): Zugabe von 5 ml 200 mM L-Glutamin und 5 ml P/S

LB-Medium: 10 g Bactotryptone, 5 g Bacto Yeast Extract, 10 g NaCl in 1 l Wasser, pH = 7,0 eingestellt und autoklaviert

LB Amp-Medium: Wie LB-Medium. Dem nach dem Autoklavieren abgekühlten Medium wurden 200 mg/l Ampicillin zugesetzt.

LB Amp-Agar: Wie LB-Medium, jedoch zusätzlich 15 g/l Difco-Agar. Nach dem Autoklavieren wurde dem im Wasserbad auf 60 °C temperierten LB Amp-Agar 200 mg/l Ampicillin zugesetzt.

SOB-Medium: 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 18,7 g KCl in 1 l Wasser, pH = 7,0 eingestellt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen des Mediums wurden 5 ml 1 M MgSO₄ und 5 ml 1 M MgCl₂ (0,2 µm sterilfiltriert) pro Liter zugesetzt.

SOC-Medium: Wie SOB-Medium, zusätzlich wurden nach dem Abkühlen des Mediums 20 ml 1 M Glucose (0,2 µm sterilfiltriert) pro Liter zugesetzt.

3.3. Allgemeine Methoden

3.3.1. Absorptionsmessungen im visuellen und im UV-Bereich

Absorptionsmessungen wurden in einem Hitachi-Spektralphotometer U2000 durchgeführt. Die zu messende Lösung wurde luftblasenfrei in eine Küvette überführt, der Messwert wurde nach 15 s Wartezeit abgelesen. Während der Messung wurde gegen Puffer abgeglichen. Für Messungen bei Wellenlängen < 300 nm wurden Quarzküvetten, für Messungen bei Wellenlängen > 300 nm Acrylhalbmikroküvetten verwendet.

3.3.2. Fluoreszenzmessungen

Fluoreszenzmessungen wurden in einem Quantamaster-Fluoreszenzspektrometer durchgeführt, das mit einem thermostatisierbaren und mit einer Magnetrührereinrichtung versehenen Küvettenhalter ausgerüstet war. Für sämtliche Messungen wurden Quarzküvetten verwendet. Die Auswertung der Signale erfolgte mit dem Programm *Felix* des Geräteherstellers.

3.3.3. Bestimmung von Proteinkonzentrationen (Proteinbestimmung)

Zur quantitativen Bestimmung des Proteingehalts einer Probe wurde die Methode von Bradford verwendet, die auf der nichtkovalenten Bindung des Farbstoffes Coomassie Blue (Natriumanazolen) an Proteine beruht (Bradford, 1976). Die Komplexierung von

Coomassie Blue an das Protein überführt den Farbstoff vom kationischen (rot) in den anionischen Zustand (blau), wobei sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von $\lambda = 465$ nm nach $\lambda = 595$ nm verschiebt. Durch Vergleich mit den Absorptionswerten einer BSA-Eichkurve bei $\lambda = 595$ nm kann die Proteinkonzentration einer Probe berechnet werden. Substanzen wie Detergenzien oder basische Puffersubstanzen stören das Protonierungsgleichgewicht durch direkte Bindung an den Farbstoff oder durch pH-Änderung und müssen daher zuvor durch Proteinfällung entfernt werden.

Eichkurve: 50 μ l einer wässrigen Lösung mit 0 bis 10 μ g BSA wurden 10 min lang mit 50 μ l Ameisensäure (100 %) bei RT inkubiert. Anschließend wurden 900 μ l 1:5 verdünntes Roti[®]-Quant (Färbelösung der Firma Roth, enthält Coomassie Brilliant Blue-G250) dazugegeben. Die Ansätze wurden gut durchmischt und 30 min bei RT inkubiert. Die Absorption wurde in einem Photometer bei $\lambda = 595$ nm gemessen.

Proben: 50 μ l Membransuspension wurde mit 50 μ l Ameisensäure (100 %) gemischt. Die Proteinmenge sollte hierbei im Bereich der Eichkurve liegen, so dass bei Bedarf eine Verdünnungsreihe angesetzt wurde. Die weitere Behandlung der Proben erfolgte wie bei den Ansätzen der Eichkurve.

3.3.4. Lipidextraktion

Zur Extraktion von Gesamtlipiden aus Proben wurde die Methode von Bligh und Dyer (1959) in leicht modifizierter Form verwendet. Die Probe wird hierbei in einem Einphasen-System aus Chloroform : Methanol : H₂O (1 : 2 : 0,8 (v/v/v)) homogenisiert. Die Wassermenge beinhaltet dabei den Wassergehalt der Probe. Weiterer Zusatz von Chloroform und H₂O führt zu einem Zweiphasensystem der Zusammensetzung Chloroform : Methanol : H₂O (2 : 2 : 1,8 (v/v/v)). Lipide gehen in die untere Chloroform-Phase, die restliche Probe geht in die obere Methanol-Wasser-Phase über.

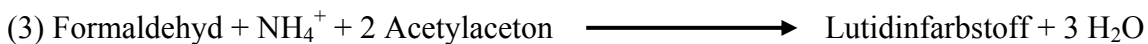
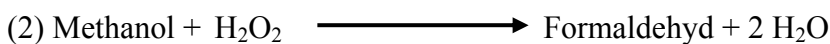
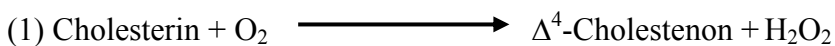
Durchführung:

300 μ l wässrige Probe (bis zu 1 mg Protein) wurden mit 375 μ l Chloroform und 750 μ l Methanol gut gemischt. Anschließend wurde der Ansatz bei RT für 10 min bei 20.000 x g in einer Mikroliterzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 375 μ l Chloroform und 375 μ l H₂O vermischt. Der

Ansatz wurde bei RT für 30 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und verworfen, das Chloroform der unteren lipidhaltigen Phase wurde durch N₂ evaporiert (Reacti Therm-Apparatur). Bis zur weiteren Analyse wurden die Lipide bei -20 °C aufbewahrt.

3.3.5. Cholesterinbestimmung

Der Cholesteringehalt der Plasmamembranen wurde mittels eines Enzymtests der Firma Boehringer Mannheim bestimmt (Beutler and Michal, 1976). Cholesterin wird dabei von einer Cholesterin-Oxidase zu Cholestenon oxidiert (1). Das bei dieser Reaktion entstehende Wasserstoffperoxid oxidiert Methanol in Gegenwart von Katalase zu Formaldehyd (2). Formaldehyd bildet mit Acetylaceton in Gegenwart von NH₄⁺-Ionen einen gelben Lutidin-Farbstoff (3).



Die Konzentration des entstehenden Lutidin-Farbstoffes (3,5-Diacetyl-1,4-dihydrolutidin) ist der Menge an Cholesterin äquivalent und wird aufgrund seiner Absorption im sichtbaren Bereich bei 405 nm gemessen.

Durchführung:

Die aus einer Probe extrahierten Lipide (S. 37) wurden in Isopropanol aufgenommen, wobei die geschätzte Cholesterinkonzentration zwischen 1,5 – 40 µg pro 80 µl Isopropanol liegen sollte. 80 µl der Probe in Isopropanol wurden mit 1 ml der auf RT gebrachten Reaktionslösung des Enzymtests gemischt. Hiervon wurden 500 µl abgenommen und in einem zweiten Reaktionsgefäß mit 4 µl der Cholesterinoxidaselösung gemischt. Der Ansatz ohne Enzymlösung diente bei der photometrischen Analyse als Referenz. Beide Ansätze wurden bei 37 °C im Wasserbad eine Stunde lang inkubiert. Nach Abkühlen auf RT wurde die Extinktion des enzymhaltigen Ansatzes bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ gegen die Referenz bestimmt.

Die Cholesterinkonzentration in der Isopropanollösung berechnet sich wie folgt:

$$c = \frac{V \cdot M}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E [\mu\text{g}/\mu\text{l}], \text{ wobei}$$

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

M = molare Masse von Cholesterin [g/mol]

d = Schichtdicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient des Lutidinfarbstoffes bei $\lambda = 405 \text{ nm}$

= $7,4 [\text{l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$

3.4. Molekularbiologische Methoden

3.4.1. Kultivierung von *E. coli* DH5 α

Zur Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α verwendete hitzestabile Lösungen wurden bei 120 °C, 2 bar für 20 min autoklaviert, hitzeempfindliche Lösungen durch einen 0,2 μm -Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert. Glasgeräte wurden für 2 Stunden bei 180 °C, Zentrifugenbecher mit 80 % Ethanol sterilisiert.

Zur Plasmid-Mini-Schnellpräparation wurden 5 ml LB Amp-Medium mit einer sauber getrennten Einzelkolonie des gewünschten Klons angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Zur Plasmid-Maxi-Präparation wurden 3 ml LB-Amp-Medium mit einem Klon plasmidtransformierter *E.coli* DH5 α angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Übernachtskultur wurde in 400 ml LB-Amp-Medium überführt und für weitere 18 Stunden bei 37 °C geschüttelt.

3.4.2. Herstellung kompetenter Zellen von *E.coli* DH5 α

In einem 12 ml-Zentrifugenröhrchen wurden 3 ml LB-Medium mit Bakterien angeimpft und für 18 Stunden bei 37 °C im Bakterieninkubator geschwenkt. Die Übernachtskultur wurde in 200 ml SOB-Medium überführt und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 – 0,7 bei einer Wellenlänge von 600 nm bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Dann

wurden die Bakterien bei 3500 x g und 4 °C für 10 min in der Kühlzentrifuge sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert und für 15 min in Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien erneut unter gleichen Bedingungen sedimentiert, in 20 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂/10 % (w/v) Glycerin resuspendiert und für 2 Stunden in Eis inkubiert. Die kompetenten Bakterien wurden in 200 µl-Portionen bei –70 °C gelagert.

3.4.3. Transformation von *E.coli* DH5α

Zur Transformation von *E.coli* DH5α wurde eine 200 µl-Portion kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 10 ng Plasmid-DNA oder 100 ng DNA aus einem Ligationsansatz vermenget. Die Bakteriensuspension wurde 20 min auf Eis inkubiert, dann für 90 s auf 42 °C erwärmt und anschließend für 3 min auf Eis abgekühlt. Nach Zusatz von 2 ml SOC-Medium wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 3500 x g und 4 °C für 5 min in der Tischzentrifuge sedimentiert. Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Amp-Agar ausgestrichen und bis zur Sichtbarkeit von Kolonien bei 37 °C inkubiert.

3.4.4. Isolierung von Plasmid-DNA

Minipräparation von Plasmid-DNA

2 ml einer plasmidtragenden Bakterien-Übernachtskultur wurden 10 min bei RT und 3500 x g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und Mediumreste mit einer Pasteurpipette entfernt. Die Methoden 1 und 2 wurden zur schnellen Analyse mehrerer Einzelklone angewendet, während Methode 3 zur Isolierung von Plasmiden in größerer Reinheit diente.

Methode 1:

Nach Zugabe von 300 µl P1 (50 mM Tris/HCl (pH = 8,0); 10 mM EDTA und 100 µg/ml RNase A) wurde das Zellpellet klumpenfrei homogenisiert. Anschließend wurden 300 µl P2 (200 mM NaOH; 1 % SDS) zugesetzt. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und bei RT 5 min inkubiert. Anschließend wurden 300 µl P3 (3,0 M KOAc, pH = 5,5) dazugegeben, der Ansatz wurde wieder vorsichtig gemischt und bei RT 15 min in einer

Mikroliterzentrifuge bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben und nochmals wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben, und die DNA wurde mit 55 % (v/v) Isopropanol bei RT eine Stunde lang gefällt. Der Ansatz wurde bei RT 30 min lang in der Mikroliterzentrifuge bei 20.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, nach dem Trocknen in H₂O suspendiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Methode 2:

Bei dieser Präparationsmethode wird zunächst die Bakterienzellwand durch Lysozym zerstört und anschließend die Zellmembran durch Hitzeeinwirkung aufgelöst.

Das Bakterienpellet wird in ein mit 350 µl STET-Puffer (S. 34) befülltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und durch Vortexen suspendiert. Nach Zugabe von 25 µl Lysozym (20 mg/ml in Wasser) und anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min erfolgte der Zellaufschluss durch Erhitzen für 50 s im kochenden Wasserbad. Der Zelldebris wurde nach Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 38 µl 3 M KOAc pH 4,8 und 400 µl Isopropanol aus der Lösung gefällt. Im Anschluss daran wurde die präzipitierte DNA durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 15 min sedimentiert und, um das Pellet von Salzen zu befreien, mit 70% (v/v) Ethanol überschichtet und nochmals zentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 60 µl sterilem Wasser aufgenommen. Für die analytische Restriktion wurde etwa ein Sechzigstel der Plasmid-DNA dieser DNA-Lösung verwendet. Vorhandene RNA konnte vorher durch den Verdau mit 1 µl RNaseA-Lösung (1mg/ml, DNase- frei) bei 37°C für 10 min entfernt werden.

Methode 3:

Für Klonierungen, Transfektionen und Sequenzierungen wurde die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* bei Bedarf kleiner Mengen über käufliche Silicagelmatrix-Säulen ausgeführt (Kap. 3.1). Die Durchführung der Präparation erfolgte hierbei nach Vorschrift des Herstellers (Qiagen oder Macherey-Nagel).

Maxipräparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von DNA-Mengen von 1 – 2 mg wurde eine Plasmid-Maxipräparation durchgeführt. Die Bakterien einer 400 ml LB-Amp-Kultur wurden bei 3500 x g und 4 °C für 10 min in der Kühlzentrifuge sedimentiert.

Alkalische Lyse der Zellen

Das Zellpellet wurde in 6 ml P1 (50 mM Tris/HCl (pH = 8,0), 10 mM EDTA) resuspendiert und für 15 min bei RT inkubiert. Dann wurden 6 ml P2 (0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS) zugesetzt und die Mischung wurde zur Lyse der Bakterien sehr vorsichtig für 5 min bei RT geschwenkt. Anschließend wurde 6 ml eiskalter P3 (3 M KOAc, pH 4,8) zugesetzt, und die Probe wurde für 5 min in Eis inkubiert. Die lysierten Bakterien wurden bei 21000 x g und 4 °C für 40 min in der Kühlzentrifuge sedimentiert.

Isopropanolfällung der dsDNA

Die im Überstand der Zentrifugation enthaltene DNA wurde durch Zusatz von 10,8 ml Isopropanol für 10 min bei RT präzipitiert und durch 20-minütige Zentrifugation wie oben sedimentiert. Das Pellet wurde in 1 ml 70 % (v/v) Ethanol resuspendiert und die obige Zentrifugation wurde für 5 min wiederholt.

NH₄Ac-Fällung der RNA

Das Pellet wurde in 6 ml Wasser gelöst und die als Verunreinigung enthaltene RNA wurde durch Zusatz von 5 ml 10 M NH₄Ac und 20-minütige Inkubation auf Eis präzipitiert. Die RNA wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 17000 x g und 4 °C in der Kühlzentrifuge sedimentiert.

Isopropanolfällung der Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA im Überstand wurde durch Zusatz von 6,6 ml Isopropanol und Inkubation für 30 min auf Eis präzipitiert und durch Zentrifugation bei 17000 x g für 20 min bei 4 °C in der Kühlzentrifuge sedimentiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen.

RNase-Behandlung

Das DNA-Pellet wurde in 0,5 ml Wasser gelöst. Reste kontaminierender RNA wurden durch Zusatz von 4 µl DNase-freier RNase (10 mg/ml in Wasser) und Inkubation für 30 min bei 37 °C entfernt.

PEG-Fällung der Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde durch Zusatz von 0,5 ml 13 % (w/v) PEG 8000, 1,6 M NaCl und Inkubation für 20 min auf Eis gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 4000 x g in der Mikroliterzentrifuge bei RT für 10 min sedimentiert.

Reinigung der DNA

Die DNA wurde durch Phenolextraktion (s. unten) und Ethanol-fällung (s. unten) gereinigt. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurden photometrisch bestimmt (S. 36).

3.4.5. Reinigung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten

Phenolextraktion

Zur Entfernung von Proteinverunreinigungen der DNA wurde die Phenolextraktion durchgeführt. Die Probe wurde mit dem gleichen Volumen an TE-Puffer-gesättigtem Phenol versetzt und kräftig durchmischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation in der Mikroliterzentrifuge bei 20.000 x g für 5 min bei RT. Die obere Phase wurde mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 vermengt und kräftig durchmischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Wiederholung der obigen Zentrifugation. Phenolreste in der oberen Phase wurden durch Extraktion mit Chloroform (3 x 1 ml) entfernt. Zuletzt wurden Reste des Chloroforms durch Abdampfen bei 60 °C (eine Stunde) entfernt.

Ethanol-fällung

Zur Konzentrierung von verdünnten DNA-Lösungen nach der Phenolextraktion wurde die DNA durch Ethanol präzipitiert. Zu 0,5 ml der verdünnten DNA-Lösung wurden 50 µl 3 M NaOAc (pH = 5,4) und 1 ml Ethanol (100 %) zugesetzt. Die DNA wurde mindestens eine Stunde bei -20 °C präzipitiert und durch Zentrifugation bei 20.000 x g in der Mikroliterzentrifuge für 5 min bei 4 °C sedimentiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Ethanolreste wurden für 30 min bei 37 °C abgedampft und die DNA in einem angepassten Volumen an Wasser gelöst. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurden wie auf S. 47 beschrieben bestimmt, und die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.4.6. Restriktionshydrolyse

Angewandt wurde die Restriktionshydrolyse zur Überprüfung von Plasmid-DNA aus Schnell- und Großpräparationen, zur molekularen Klonierung von cDNAs sowie zur Kontrolle von PCR-Amplifikaten. Bei Verwendung der Restriktions-Endonukleasen wurde darauf geachtet, dass mindestens 2 U Enzymaktivität für je 1 µg Nukleinsäure eingesetzt wurde und dass das Volumen der glyzerinhaltigen Enzymlösung nicht ein Zehntel des Gesamtvolumens überschritt.

3.4.7. Phosphorylierung von DNA

Zur Ligation mussten Oligonukleotide am 5'-Ende phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung wurde mit dem Enzym T4-Polynukleotid-Kinase durchgeführt. 12 µl DNA-Lösung (150 pmol/µl in Wasser) wurden mit 4 µl 5 x Reaction Forward buffer (Gibco BRL), 1 µl 10 mM dATP, 2 µl Wasser und 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase (Gibco BRL, 6 U/µl) versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde das Enzym für 20 min bei 70 °C im Wasserbad hitzeinaktiviert.

3.4.8. Auffüllreaktion 5'-überhängender Enden mit T4-DNA-Polymerase

Zur Erzeugung von stumpfen Enden an DNA-Fragmenten wurde eine Auffüllreaktion mit T4-DNA-Polymerase durchgeführt. 24 µl DNA-Lösung in Wasser wurden mit 2 µl 15 x Annealing-Puffer (0,2 M Tris/HCl (pH = 7,5); 0,5 M NaCl; 0,1 M MgCl₂), 3 µl 10 x Synthese-Puffer (0,1 M Tris/HCl (pH = 7,5); 10 mM ATP; 20 mM DTT; je 5 mM dNTP) und 1 µl T4-DNA-Polymerase (NEB, 3 U/µl) versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde die DNA durch Phenolextraktion (s. oben) und Ethanol-fällung (s. oben) gereinigt.

3.4.9. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation eines DNA-Inserts mit linearisierter Vektor-DNA wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Es wurde ein drei- bis zehnfacher molarer Überschuss des Inserts gegenüber der Plasmid-DNA eingesetzt. 1 µl Insert-DNA in Wasser, 11 µl linearisierte Vektor-DNA in H₂O, 1,5 µl 10 x Ligase-Puffer und 1,5 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) wurden vermengt, und der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 14 °C inkubiert. Zur Kontrolle auf

Selbstligation der Vektor-DNA wurde ein Ansatz ohne Insert-DNA pipettiert und wie der Ligationsansatz behandelt. 5 µl Ligationsansatz oder Kontrollansatz wurden anschließend zur Transformation (S. 40) von *E.coli* DH5α eingesetzt und durch Plasmid-Minipräparation (S. 40) und analytische Restriktionshydrolyse (S. 44) charakterisiert.

3.4.10. Adapterligation

Zwei komplementäre Oligonukleotide mit überhängenden Enden konnten durch Denaturierung bei 70 °C und langsames Abkühlen aneinandergelagert werden. Ein etwa 1000-facher Überschuss dieses Adapters wurde mit dem geschnittenen Plasmid dann in einer Ligation eingesetzt und somit die gewünschte Nukleotidsequenz in einen vorhandenen Vektor integriert.

3.4.11. DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion bietet eine einfache Möglichkeit, um DNA-Segmente *in vitro* spezifisch zu vervielfältigen. Sie wird eingeleitet, indem man die als Matrize dienende, denaturierte DNA mit DNA-Polymerase und zwei Primern inkubiert. Während der multiplen Zyklen erfolgt dann die Synthese der komplementären Stränge. Die PCR-Ansätze enthielten 20 ng Plasmid-DNA als Matrize, 50 pmol von jedem Primer, 200 mM von jedem Nukleotid und 2 U der thermostabilen Vent-DNA-Polymerase. Ausgeführt wurde die Reaktion in Vent-PCR-Reaktionspuffer in einem Reaktionsvolumen von 100 µl. Jeder Reaktionsansatz wurde vor dem Reaktionsstart im Thermocycler mit Paraffinöl überschichtet, um den Flüssigkeitsverlust durch Verdampfen und die dadurch bedingten Konzentrationsveränderungen im PCR-Ansatz zu mindern.

Der Thermocycler war so programmiert, dass die DNA zuerst für 3 min bei 95°C denaturiert und dann in 25 bis 30 Zyklen amplifiziert wurde. Der verwendete Programmzyklus war:

Denaturierung: 1 min bei 95°C

Anlagern der Primer: 2 min bei variabler Temperatur (meist ca. 60 °C)

Polymerisation: 2 min bei 72°C

Abschließend erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 72°C bevor die Reaktion schließlich durch eine Abkühlung auf 4°C gestoppt wurde. Alle aus Polymerase-Kettenreaktionen hervorgegangenen Sequenzen wurden nach der Klonierung durch DNA-Sequenzierung überprüft.

3.4.12. PCR-Mutagenese

Das Einbringen von Mutationen in kodierende DNA-Sequenzen erfolgte unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (s. oben). Hierbei trugen die als Primer verwendeten Oligonukleotide die geänderten Sequenzen. Im Anhang (Kap. 6.1) sind die verschiedenen Mutagenese-Schemata dargestellt. Alle mutierten Sequenzen wurden durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

3.4.13. Agarosegelelektrophorese von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente nach analytischen und präparativen Restriktionsansätzen wurden in 1 %igen Agarosegelen getrennt. 1 g Agarose wurde in 100 ml TAE-Puffer suspendiert und im Mikrowellenofen geschmolzen. Nach dem Abkühlen auf 60 °C wurden 5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml in Wasser) zugesetzt und die Agaroselösung wurde in eine vertikale Gelkammer der Dimension 8 x 9,5 cm² gegossen. Die Taschen wurden durch Einstecken eines Kammes geformt, für präparative Trennungen nach Restriktionsansätzen wurden die Taschen des Geles durch Überkleben von Zähnen des Kammes vergrößert. Die DNA-Proben wurden im gleichen Volumen an Auftragspuffer (S. 34) aufgenommen. In die Anodenkammer wurden 5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml in Wasser) zugesetzt. Die Elektrophorese wurde in TAE bei konstant 60 mA durchgeführt, bis die untere Farbstoffbande etwa 1 cm vom unteren Rand des Gels entfernt war. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Banden im UV-Durchlicht bei 312 nm visualisiert.

3.4.14. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das entsprechende Agarosestück wurde mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten und in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit TE-Puffer-gesättigtem Phenol vollständig überschichtet. Die Probe wurde in flüssigem N₂ gefroren und anschließend in

der Mikroliterzentrifuge bei 19.000 x g für 10 min bei RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, die untere Phase wurde mit 200 µl TE-Puffer-gesättigtem Phenol vermengt. Die Probe wurde erneut eingefroren und wie oben zentrifugiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt, mit 0,5 ml TE-gesättigtem Phenol vermengt und 1 min wie oben zentrifugiert. Die DNA wurde durch Phenolextraktion (S. 43) und Ethanol-fällung (S. 43) aus der wässrigen Phase gereinigt.

3.4.15. Alkalische Denaturierung doppelsträngiger DNA

Zur alkalischen Denaturierung wurden 2 µg DNA in 18 µl H₂O mit 2 µl 2 M NaOH, 2 mM EDTA versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die DNA nach Zusatz von 6 µl 10 M NH₄OAc und 80 µl Ethanol ÜN bei -20 °C präzipitiert. Nach der Zentrifugation für 10 min bei 18000 x g und RT in der Mikroliterzentrifuge wurde das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und durch Zentrifugation in der Vakuumzentrifuge bei RT getrocknet.

3.4.16. Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Konzentration und Reinheit präparierter DNA wurde durch Messung der Extinktionen bei $\lambda = 260$ und $\lambda = 280$ nm im Spektrophotometer bestimmt. Der Quotient E_{260}/E_{280} stellt ein Maß für die Reinheit der DNA in Bezug auf Proteinverunreinigungen dar und sollte für proteinfreie Lösungen zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Eine E_{260} -Einheit entspricht 50 µg/ml DNA.

3.5. Zellkultur

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden in einer sterilen Werkbank der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt, nachdem die verwendeten Geräte vor dem Einbringen mit 70 % (v/v) Ethanol desinfiziert worden waren. Glasgeräte wurden bei 180 °C im Trockenschrank über Nacht hitzesterilisiert. Hitzestabile Lösungen wurden bei 120 °C und 2 bar für 20 min autoklaviert, hitzeempfindliche Lösungen wurden durch einen 0,2 µm-Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert.

3.5.1. Kultivierung von Säugetierzellen

Die Kultivierung aller Säugetierzellen erfolgte bei 37 °C in einem CO₂-begasten Brutschrank in einer Atmosphäre von 95 % Luft, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 100 %. Die Zellen wurden in DMEM-Komplettmedium (HEK293 und COS-7) bzw. DMEM Nutrient Mixture F-12 HAM-Komplettmedium (CHO-K1) in Gewebekulturschalen mit Durchmessern von 3,5, 6 oder 10 cm kultiviert. In 3,5 cm-Schalen wurden 1,5 ml Medium verwendet, in 6 cm-Schalen 3 ml und in 10 cm-Schalen 10 ml. Zur Passage wurde das überstehende Medium vorsichtig mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt, und die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % (w/v) Trypsin, 0,6 mM EDTA in PBS) überschichtet und 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit der Pipette im dreifachen Volumen an PBS suspendiert, bei 800 x g für 5 min bei RT in der Tischzentrifuge sedimentiert, im entsprechenden Medium resuspendiert und auf neue Gewebekulturschalen verteilt.

3.5.2. Bestimmung von Zelldichten

Zur Bestimmung von Zelldichten wurden die Zellen im Medium suspendiert und zum Auszählen der Zellen in eine Thoma-Zählkammer überführt. Die Grundfläche des Zählrasters der verwendeten Kammer bestand aus einem großen Quadrat, das 16 mittlere Quadrate enthielt, welche wiederum in je 16 kleinere Quadrate unterteilt waren. Die Zellsuspension wurde durch Kapillarkräfte zwischen Deckglas und Zählraster eingesaugt. Die Zellen innerhalb fünf mittlerer Quadrate wurden unter dem Umkehr-Phasenkontrastmikroskop gezählt. Aus dem Ergebnis wurde das arithmetische Mittel für die Zellzahl innerhalb eines mittleren Quadrats gebildet und mit dem Faktor $2,5 \cdot 10^5$ multipliziert, um die Zelldichte in Zellen/ml zu erhalten. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

3.5.3. Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden Zellen eines konfluenten Zellrasens suspendiert und in der Tischzentrifuge 10 min bei 200 x g und Raumtemperatur sedimentiert. Das Zellsediment wurde im entsprechenden frischen Medium (10 % DMSO) bei einer Dichte von $0,5 \times 10^8$ Zellen/ml suspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml-Portionen in

Kryoröhrchen überführt und über Nacht bei -80 °C vorgefroren. Anschließend wurden die Dauerkulturen in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.5.4. Stabile Transfektion von Säugerzellen

Die durch Calciumphosphat vermittelte Transfektion kann neben der transienten auch zur stabilen Expression von Proteinen in den transfizierten Zellen verwendet werden. Das Protokoll beruht auf der Methode von Chen und Okayama (Chen and Okayama, 1988).

Vor der Transfektion wurden die Zellen passagiert und auf 10 cm-Schalen ausgesät. Bei HEK293- und COS-7-Zellen wurden die Schalen vorher mit Polylysin beschichtet, um ein Ablösen bei der Transfektion zu verhindern. Für die Beschichtung wurden die Kulturschalen mit Polylysinlösung bedeckt, nach zwei Stunden wurde die Lösung wieder abgenommen und die Schalen über Nacht in der Sterilbank getrocknet.

Die Zellen wurden transiziert, sobald sie etwa 50 % konfluent waren. Dabei wurde das alte Kulturmedium von den Zellen gesaugt und ohne Waschen durch das Transfektionsmedium (s. u.) ersetzt. Die Zellen wurden 4,5 h bei 3 % CO_2 bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernen des Transfektionsmediums wurden die Zellen 3 min mit PBS/10 % (v/v) Glycerin behandelt, dreimal mit PBS gewaschen und bei 5 % CO_2 weiterkultiviert.

Herstellen des Transfektionsmediums:

10-25 μg Expressionsplasmid wurden in 750 μl H_2O gelöst, dann 250 μl einer 1 M CaCl_2 -Lösung zugegeben, 1 ml BBS-Puffer zugegeben, kräftig gemischt und nach drei Minuten 8 ml MEM zugegeben.

3.5.5. Klonierung von transfizierten Zellen

Die Vereinzelung stabil transfizierter Zellen erfolgte in 96-Napf-Platten. Die zu klonierenden Zellen wurden dafür mit Trypsin/EDTA von der Gewebekulturschale abgelöst, durch Zentrifugation (5 min, RT 800 x g) pelletiert und in einem geeigneten Volumen Kulturmedium suspendiert. Die Anzahl der Zellen pro ml Kulturmedium wurde mit Hilfe einer Zählkammer ermittelt und 150 Zellen in 10 ml Kulturmedium mit Selektionssubstanz (G418) pipettiert und gemischt. Die 96 Vertiefungen einer Platte wurden mit 100 μl -Aliquots dieser Zellsuspension gefüllt und die 96-Napf-Platte anschließend zum Anheften der Zellen 24 h in den Brutschrank gestellt. Am folgenden Tag

wurden mit Hilfe des Lichtmikroskops die 96 Vertiefungen auf das Vorhandensein von nur einer Zelle pro Vertiefung untersucht. Die vereinzelt Zellen erhielten alle 5 Tage neues Kulturmedium. Eine Einzelzelle wuchs in ca. zwei Wochen zu einem Zellklon heran, der dann auf eine 24-Napf-Platte überführt werden konnte.

3.5.6. Differenzierung von 3T3-L1-Zellen zu Adipozyten

3T3-L1-Zellen wurden bis zur Konfluenz in DMEM-Medium kultiviert. Zwei Tage später wurde das Kulturmedium ersetzt durch DMEM + 0,5 mM IBMX + 0,25 μ M Dexamethason + 1 μ g/ml Insulin (optional). Nach weiteren zwei Tagen erfolgte die Kultivierung in DMEM + 1 μ g/ml Insulin, dabei wurde das Medium jeden Tag gewechselt. Etwa 95 % der Zellen differenzieren nach diesem Protokoll zu Adipozyten. Die Zellanzahl nimmt dabei zu, das Verhältnis Protein/DNA bleibt etwa gleich. Die Lipidtröpfchen der Zellen nehmen an Zahl und Größe zu und füllen schließlich die gesamte Zelle aus.

3.6. Zellernte und Membranpräparationen

3.6.1. Ernte von Säugetierzellen

Die Zellen konfluent bewachsener Gewebekulturschalen wurden mit eiskaltem PBS/10 mM EDTA überschichtet. Die Gewebekulturschalen wurden zum Ablösen der Zellen für fünf Minuten bei RT geschaukelt. Die Zellen wurden mit einer Pipette suspendiert und durch Zentrifugation für 10 min in der Tischzentrifuge bei 400 x g und RT sedimentiert.

3.6.2. Membranpräparation

Um Reste des Mediums wegzuwaschen, wurden die Zellen erneut in PBS/10 mM EDTA resuspendiert und unter gleichen Bedingungen sedimentiert. Das gewaschene Zellpellet wurde durch 10 Schübe mit einem eingeschliffenen Glaspotter bei einer Zelldichte von $0,5 \times 10^8$ Zellen/ml im zwanzigsten Teil des ursprünglichen Kulturvolumens an eiskaltem hypotonischem Lysispuffer (S. 34) resuspendiert. Die Suspension wurde für 15 min bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Die lysierten Zellen wurden durch 2 x 30 s Polytron UltraThorax bei maximaler Leistung unter Eiskühlung homogenisiert. Anschließend wurden die Membranen durch Zentrifugation bei 40000 x g für 30 min bei 4 °C isoliert.

Das Membranpellet wurde mit Bindungspuffer gewaschen und anschließend in diesem Puffer resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.7. Veränderung der Steroidzusammensetzung von Zellen, Membranen oder solubilisierten Proben

3.7.1. Herstellung von Steroid/Methyl- β -Cyclodextrin-Komplexen

Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide aus α -1,4-verknüpften Glucosebausteinen und bestehen aus 6, 7 oder 8 Glucoseuntereinheiten (α -, β - oder γ -Cyclodextrine). In den hydrophoben Hohlraum eines Cyclodextrins können hydrophobe Gastmoleküle, wie z. B. Steroide, eingelagert werden. In dieser Arbeit wurde M β CD verwendet, bei dem die freien Hydroxylgruppen teilweise durch Methylgruppen substituiert sind. Durch die Modifizierung liegt ein Gemisch aus verschiedenen substituierten Molekülen vor, die nicht mehr so leicht kristallisieren und somit besser wasserlöslich sind als die ursprünglichen Cyclodextrine. M β CD bildete den stabilsten Komplex mit Cholesterin, bei dem außerdem das Verhältnis Cholesterin:Cyclodextrin am größten war (Lange et al., 2002).

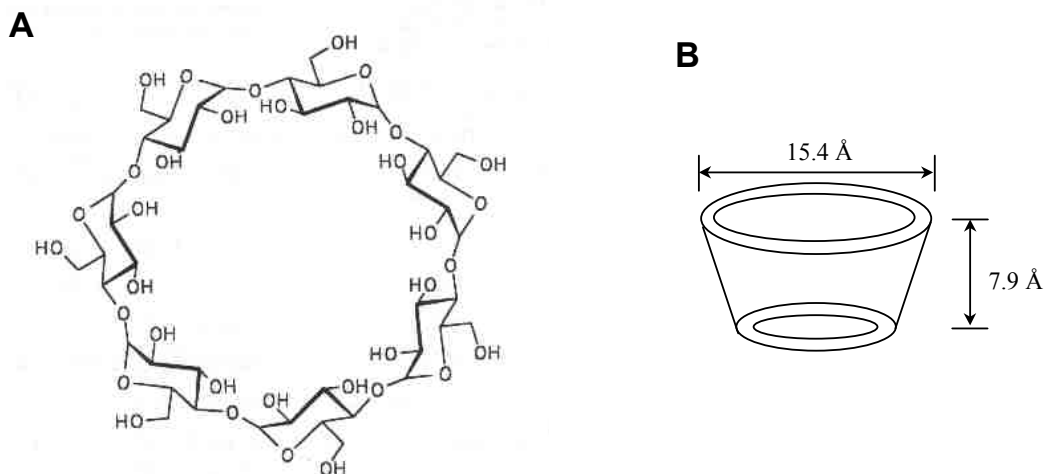


Abbildung 8: Strukturformel und Form von β -Cyclodextrinen

β -Cyclodextrin ist ein zyklisches Molekül aus sieben Glucoseuntereinheiten (A). Der hydrophobe Hohlraum im Inneren des torusförmigen Moleküls (B) kann hydrophobe Gastmoleküle wie z. B. Cholesterin aufnehmen. Abbildung aus (Luong et al., 1995).

Cholesterin/Methyl- β -Cyclodextrin-Komplexe (10 mM)

10 g M β CD wurden in 50 ml H₂O gelöst und auf 60 °C erwärmt. 300 mg Cholesterin wurden bei 60 °C in 6 ml Isopropanol gelöst und tropfenweise unter Rühren zur M β CD-Lösung gegeben. Nach fünfstündigem Rühren bei 60 °C wurde die klare Lösung mit H₂O auf 78 ml aufgefüllt, durch einen 0,2 μ m-Filter sterilfiltriert und bei -20 °C aufbewahrt. Die fertige Lösung hatte eine Cholesterinkonzentration von 10 mM und eine M β CD-Konzentration von 100 mM (Lange et al., 2002).

Steroid/Methyl- β -Cyclodextrin-Komplexe (3 mM)

M β CD in H₂O (40 mg/ml bzw. 30 mM) wurde mit der entsprechenden Menge Steroid vermischt, um eine Endkonzentration des Steroids von 3 mM zu erhalten. Die Suspension wurde mit N₂ überschichtet und 24 Stunden lang bei 30 °C unter Lichtausschluss auf einem Schüttler inkubiert. Die fertige Lösung wurde durch einen 0,2 μ m-Filter filtriert und bei -20 °C aufbewahrt.

3.7.2. Veränderung des Steroidgehaltes lebender Zellen

Entfernung von Cholesterin aus lebenden Zellen

Adhärente Säugetierzellen einer konfluent bewachsenen Zellkulturschale wurden mit 10 ml FCS-freiem Medium gewaschen und mit 10 ml FCS-freiem Medium (mit 10 mM M β CD) überschichtet. Die Zellen wurden je nach Versuch bis zu 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Medium (mit 10 % FCS) gewaschen.

Anreicherung lebender Zellen mit Steroiden durch Cholesterin/Methyl- β -Cyclodextrin-Komplexe

Zellen wurden durch Inkubation mit Steroid/M β CD-Komplexen (S. 51) mit Cholesterin angereichert. Die Inkubationsdauer und -temperatur sind bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

3.7.3. Veränderung des Steroidgehaltes biologischer Membranen

Entfernung von Cholesterin aus biologischen Membranen

Der Cholesteringehalt von Membranen kann durch Behandlung mit β -Cyclodextrinen erniedrigt werden. Dazu werden die Membranen in Bindungspuffer (S. 34) suspendiert und mit einer 200 mM Methyl- β -Cyclodextrinlösung versetzt (finale Konzentration 30mM) und für 30 Minuten bei 30 °C auf dem Thermoschüttler inkubiert. Unter diesen Bedingungen werden über 80 % des Cholesterins aus der Zellmembran extrahiert (Gimpl et al., 1997). Nach erfolgter Zenrifugation für 30 Minuten bei 14000 rpm erfolgt noch ein Waschschrift mit Bindungspuffer, um die mit Cholesterin beladenen Cyclodextrine zu entfernen.

Diese Membranen wurden als „Cholesterin-abgereichert“ bezeichnet. Durch Variation der Inkubationszeit und/oder der Temperatur konnten unterschiedliche Cholesterinmengen aus den Membranen entfernt werden.

Anreicherung biologischer Membranen mit Steroiden durch Steroid/Methyl- β -Cyclodextrinkomplexe

Cholesterin-abgereicherte Membranen (235 μ g/210 μ l in Bindungspuffer) wurden mit 105 μ l Steroid/M β CD-Lösung (3 mM Stammlösung) versetzt und 30 Minuten bei 30 °C auf einem Thermoschüttler inkubiert.

An die Inkubationen schloß sich ein Waschschrift mit Bindungspuffer an, um nicht eingelagerte Steroide zu entfernen.

Anschließend wurden die Membranen wieder in 325 μ l Bindungspuffer aufgenommen oder solubilisiert.

Anreicherung biologischer Membranen mit Steroiden durch Ethanollösungen

Ethanollösungen des entsprechenden Steroids wurden mit Membransuspensionen gemischt und bei 30 °C für 10 min auf einem Thermoschüttler inkubiert. Die finale Ethanolkonzentration betrug 1 % (v/v).

Behandlung von Membranen mit Cholesterinoxidase

Das Enzym Cholesterinoxidase (*Brevibacterium* sp.) oxidiert Cholesterin zu 4-Cholesten-3-on. In Membransuspensionen können so innerhalb einer Stunde ca. 25-30 % des Cholesteringehalts der Zelle oxidiert werden (el Yandouzi and Le Grimellec, 1992; Gimpl et al., 1997).

7,5 mg Membranen wurden mit 1 ml Enzympuffer bei 30 °C inkubiert (Dauer: 0 – 120 min). Der Puffer hatte folgende Zusammensetzung: 20 mM HEPES (pH = 7,0), 5 mM MgCl₂, 10 mM Mannitol und 1,5 % (v/v) Cholesterinoxidase (50 U/ml in 3 mM MES-Puffer (S. 34)). Kontrolle: Puffer ohne Enzyme. Die Reaktion wurde durch Abkühlen der Ansätze auf 0 °C abgestoppt. Die Membranen wurden pelletiert, mit Bindungspuffer gewaschen und für den Ligandenbindungstest (S.56) in Bindungspuffer resuspendiert.

3.8. Internalisierungsexperimente

Um die Kinetik der Liganden-induzierten Internalisierung von Rezeptoren (OTR und OTR-CCK_BR-Chimäre I) in transfizierten Zellen zu bestimmen, wurden Ansätze zum Teil einer sauren Waschung unterzogen, durch die oberflächengebundenes Hormon abgelöst wird (Ullian and Linas, 1990).

80 bis 90 % konfluente Zellen wurden mit PBS/5 mM EDTA abgelöst, zweimal in DMEM (25 mM HEPES/NaOH pH = 7,4; 5 mM MgCl₂) gewaschen und in 2 ml des gleichen Kulturmediums resuspendiert. Nach Kühlung auf Eis wurde [³H]OT zu 100 nM zugesetzt und 1,5 h bei 4 °C belassen. Die Zellen wurden dann zweimal mit kaltem PBS/5 mM MgCl₂ gewaschen, in DMEM (s. o.) inkubiert und auf 6 Aliquots für jeden Zeitpunkt verteilt. Die Zellen wurden dann für 0 bis 60 min auf 37 °C erwärmt, um die Rezeptorinternalisierung zu induzieren. Nach erneutem Kühlen auf Eis wurde mit der Hälfte der Ansätze jedes Zeitpunkts eine saure Waschung durchgeführt, indem die Zellen in eiskalter 5 mM Essigsäure (pH = 4,5)/ 150 mM NaCl suspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Zur Bestimmung des auf der Zelloberfläche verbleibenden radioaktiven Hormons wurden die drei anderen Ansätze jedes Zeitpunkts zweimal mit eiskaltem PBS/5 mM EDTA gewaschen. Zwischen den Waschungen wurden die Zellen jeweils durch Zentrifugation für 3 min bei 3000 rpm (4 °C, Mikroliterkühlzentrifuge) pelletiert. Am Ende erfolgte die Zelllyse in 80 µl 1 % Triton X-100/10 mM EDTA und die Bestimmung der Radioaktivität nach Mischen mit 3 ml Szintillationscocktail (Rotiszint eco plus).

Der Anteil an internalisiertem [³H]OT in bezug auf das insgesamt gebundene [³H]OT wurde als Quotient aus der Radioaktivität nach einer sauren Waschung, die dem internalisierten Rezeptor entspricht, und der Radioaktivität ohne saure Waschung (insgesamt gebundenes Hormon) berechnet.

3.9. Ligandenbindungsstudien

3.9.1. Sättigungsexperimente

Durch Sättigungsexperimente wurden Dissoziationskonstanten (K_D) und Rezeptordichten (B_{\max}) ermittelt. Hierbei wird die spezifische Bindung eines radioaktiven Liganden an den Rezeptor bei konstanter Rezeptorkonzentration als Funktion der Ligandenkonzentration bestimmt. Aus dem Massenwirkungsgesetz folgt nach Umformung:

$$B = B_{\max} \cdot F / (K_D + F)$$

und in der linearisierten Form die Scatchard-Gleichung

$$B / F = B / K_D + B_{\max} / K_D ,$$

wobei B der Konzentration des gebundenen Liganden und F der des ungebundenen Liganden entspricht. Bei der Auftragung von B gegen B/F kann aus der Steigung der Geraden die Dissoziationskonstante (K_D) und aus dem Schnittpunkt mit der Abszisse die Anzahl der Bindungsstellen (B_{\max}) ermittelt werden. Moderne Auswertungsverfahren (hier: Programmpaket Radlig 4.0, Biosoft, Cambridge, UK) verzichten auf die Transformation der Bindungsdaten zu linearen Abhängigkeiten und bestimmen über eine iterative Kurvenanpassung direkt aus den Messdaten die Bindungsparameter K_D und B_{\max} . Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm SigmaPlot (Jandel Scientific).

3.9.2. Hormonbindungsstudien an Oxytocinrezeptor- bzw. Vasopressinrezeptor-haltigen Zellmembranen

Rezeptorhaltige Membranen wurden 30 min bei 30 °C in Bindungspuffer (S. 34) mit tritiiertem Hormon (10 nM [*tyrosyl*-2,6-³H]Oxytocin bzw. 10 nM [³H]AVP) inkubiert. Die Membranmenge wurde so gewählt, dass im Gleichgewichtszustand höchstens 10 % des eingesetzten Hormons durch Rezeptoren gebunden wurde. Die Bindungsreaktion wurde durch Zugabe von 2 ml eiskaltem Filtrationspuffer (S. 34) gestoppt. Die Trennung von freiem und gebundenem Hormon erfolgte durch rasche Filtration über GF/C-Glasfaserfilter, die vorher eine halbe Stunde in eiskaltem Filtrationspuffer eingelegt worden waren. Die Filter wurden zweimal mit Filtrationspuffer gespült, in Szintillationsröhrchen gegeben und mit 3 ml Ethylenglycolmonomethylether transparent gemacht. Nach 10 min wurden 7 ml Szintillationscocktail (Rotiszint eco plus) dazugegeben. Nach guter Durchmischung der Probe wurde die Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

Die Menge des spezifisch an die Rezeptoren gebundenen radioaktiven Liganden wurde aus der Differenz der Gesamtbindung (rezeptorgebundene und unspezifisch gebundene Liganden) und der unspezifischen Bindung ermittelt. Unspezifische Bindungsstellen befinden sich sowohl am Glasfaserfilter als auch an den Zellmembranen. Sie sind niederaffin und im Vergleich zu den Rezeptorbindungsstellen in wesentlich größerer Zahl vorhanden. Die unspezifische Bindung wurde durch einen 500fachen molaren Überschuss an nichttritiiertem Liganden in einem Parallelexperiment bestimmt. Bei den verwendeten Mengen an nichttritiiertem Ligand werden die Rezeptoren weitgehend mit unmarkiertem Hormon beladen. Bei den unspezifischen Bindungsstellen ist aufgrund ihrer großen Anzahl nicht mit einer Kompetition der markierten durch nichttritiierten Liganden zu rechnen.

3.10. „Computer-Modeling“

Mit dem Computerprogramm AutoDock v. 2.4 (Morris et al., 1996) wurde die Bindung verschiedenener Steroide an Rezeptoren untersucht. AutoDock ermöglicht das anlagern („docking“) eines flexiblen Liganden (hier: die Steroide) an einen starren Protein (die Rezeptoren) innerhalb eines vorher definierten rechteckigen Würfels, der die möglichen Bindungsstellen der Proteine einschließt (Abbildung 9). Für das „docking“ werden nur nicht-bindende (van-der-Waals und elektrostatische) Wechselwirkungen berücksichtigt (Slusarz et al., 2001). Mit dem Programm wurden für jedes Steroid 4000 Docking-

Prozeduren durchgeführt. Durch den Einsatz eines rudimentären Kraftfeldes während des „dockings“ liefert das Programm zunächst recht wahllose Konfigurationen der Bindungspartner. Zu diesem Zweck wurde ein Filterprogramm von Dr. Kazmierkiewicz (Universität Danzig, Polen) eingesetzt. Dieses Programm filtert diejenigen Steroide heraus, bei denen mehr als 25 % aller Atome weiter als 4 Å von der Oberfläche des Rezeptors entfernt sind.

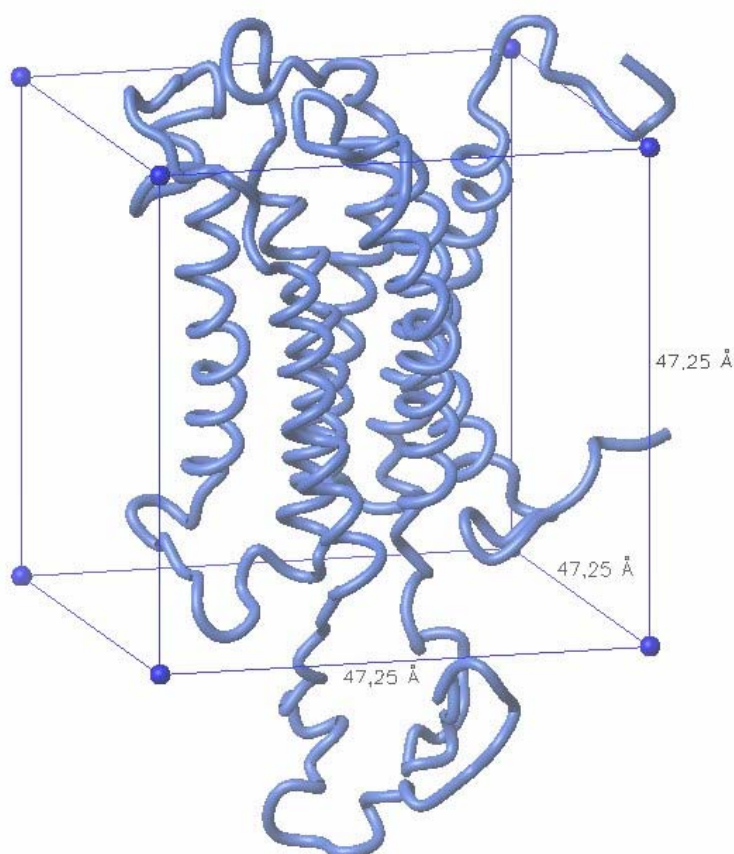


Abbildung 9: Größe und Orientierung des definierten Würfels um einen Rezeptor

Um den Rezeptor wird ein rechteckiger Würfel definiert, der die möglichen Bindungsstellen der Steroide am Rezeptor einschliesst. Innerhalb dieses Würfels werden die Steroide dann „angedockt“. Abbildung aus (Politowska et al., 2001).

Die Rechnungen wurden auf einem Sun UltraSpark 10 Computer durchgeführt. Die Bilder zur Präsentation der Ergebnisse wurden mit dem Programm MolMol (Koradi et al., 1996) erstellt.

3.11. Chemische Synthesen

3.11.1. Synthese von Fluochol

Zur Synthese eines fluoreszierenden Cholesterinderivates wurde das Fluorophor Dansylhydrazon mit der Ketogruppe von 6-Ketocholestanol verbunden. Die Synthese erfolgte wie beschrieben (Wiegand, 1998) in Abänderung der Vorschrift nach Kawasaki *et al.* (1982):

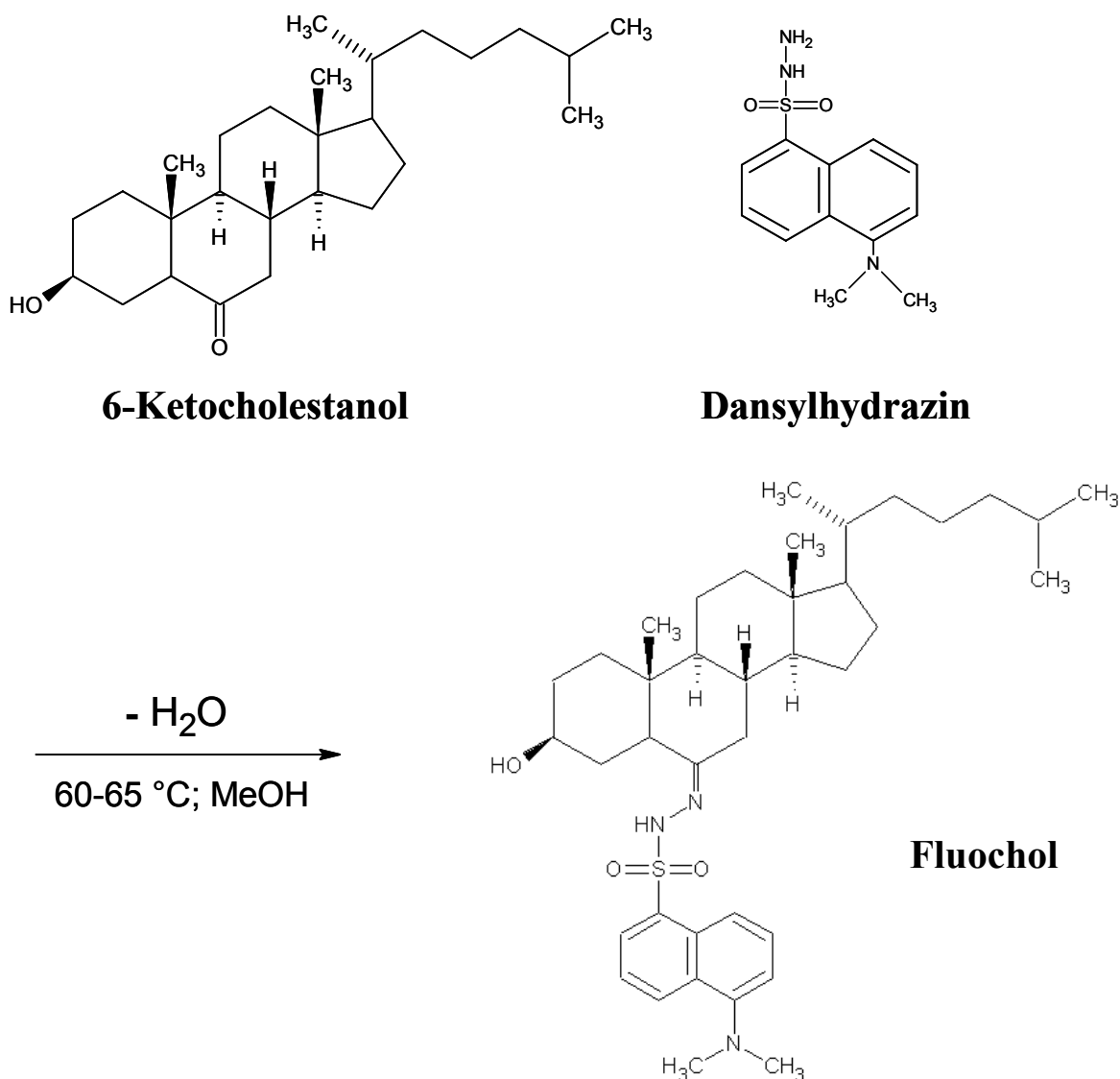


Abbildung 10: Reaktionschema zur Synthese von Fluochol

Durchführung:

68 mg (169 μmol) 6-Ketocholestanol wurde mit 135 mg (509 μmol) Dansylhydrazin in 120 ml trockenem Methanol für 5-6 Stunden bei 60-65°C gerührt. Als Katalysator dienten dabei wenige Tropfen konzentrierte Salzsäure, die der Reaktion anfangs zugesetzt wurden. Um überschüssiges Dansylhydrazin zu entfernen und die Endprodukte besser trennen zu können, wurde danach mit 0,5 ml Aceton bei Raumtemperatur gerührt (1-2 h). Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Im Anschluss an die Reaktion erfolgte eine säulenchromatographische Trennung über Kieselgel (Säulengröße 35x3 cm). Als Laufmittel wurde Chloroform-Ethanol 95:5 (v/v) verwendet. Bei unzureichender Trennleistung auf der Säule wurde die Trennung per Dünnschichtchromatographie (TLC) mit präparativen Kieselgelplatten bei gleichem Laufmittel durchgeführt (R_f -Wert von Fluochol $\approx 0,35$). Aufgrund der Reinigungsschritte, die teilweise mehrfach durchgeführt wurden, lag die Ausbeute bei 38 mg (35 %). Zur Überprüfung der erfolgten Synthese und der Reinheit der Produktes wurde die aufgereinigte Substanz massenspektrometrisch untersucht und erhielt die Bezeichnung Fluochol (Molekulargewicht 649,5). Fluochol-M β CD-Komplexe wurden analog den Steroid-M β CD-Komplexen hergestellt (S.51).

3.11.2. Synthese von Dithioarsolanyl-Fluoreszein (Flash)

Die Synthese erfolgte nach der Vorschrift von Griffin *et al.* (Griffin *et al.*, 1998):

500 mg Fluorescein-Quecksilberacetat (Sigma, Deisenhofen) wurde mit dem zwanzigfachen molaren Überschuss Arsen-trichlorid (AsCl_3 , Dr. Braun, Universität Marburg) und dem achtfachen molaren Überschuss Diisopropylethylamin (Fluka, Buchs (Schweiz)) in trockenem N-Methylpyrrolidion (Aldrich, Taufenkirchen) für vier Stunden bei RT gerührt, eine Spatelspitze Palladiumacetat (Merck, Darmstadt) diente als Katalysator (Abbildung 11).

Die Reaktion wurde abgebrochen durch Zugabe von 15 ml Tris-Puffer (pH = 7), der 1,2-Ethandithiol ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$, EDT) im Überschuss enthielt. Das Produkt wurde mit Chloroform ausgeschüttelt und per Dünnschichtchromatographie mit präparativen Kieselgelplatten im Laufmittel Ethylacetat-Toluol 1:9 (v/v) abgetrennt.

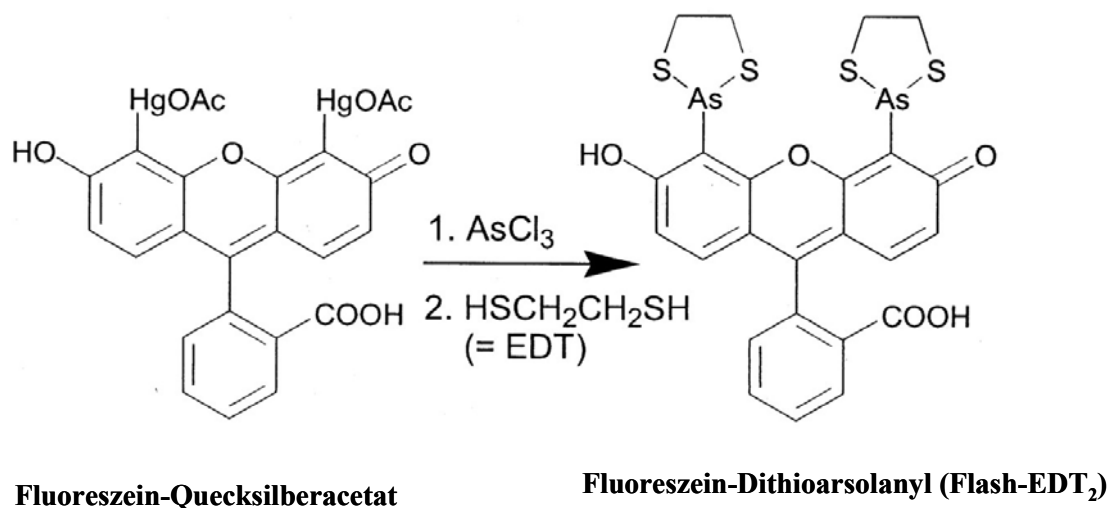


Abbildung 11: Synthese von 4',5'-bis(1,3,2-dithioarsolan-2-yl)fluorescein

Die Verbindung wurde von den Autoren mit Flash bezeichnet; EDT = Ethandithiol. Genauere Angaben über die Synthese im Text. Abbildung aus (Griffin et al., 1998), verändert.

Durch die TLC konnte eine bei der Reaktion auftretende Fraktion mit einem R_f -Wert von 0,39 isoliert und gereinigt werden. Diese rote Substanz war nicht fluoreszierend, die Ausbeute betrug etwa 21 mg. Zur Überprüfung der erfolgten Synthese und der Reinheit der Produktes wurde die aufgereinigte Substanz massenspektrometrisch untersucht.

3.12. Methoden zur Untersuchung des fluoreszierenden Cholesterinanalogs

3.12.1. Veresterung von Fluochol durch ACAT

Die Zellen wurden in 6 cm Kulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert. Die Inkubation für eine Stunde bei 37 °C in Kulturmedium, das 7,5 μM Fluochol/M β CD oder 24 μM [^3H]-Cholesterin/M β CD enthielt. Die Zellen wurden gewaschen und in Kulturmedium weiterinkubiert. In einigen Experimenten wurde der ACAT-Inhibitor 58-035 (Konzentration 400 mg/ml in DMSO) oder reines DMSO als Kontrolle zugesetzt. Nach verschiedenen Zeiten erfolgte die Ernte der Zellen und eine Lipidextraktion (S. 37). Die Lipide wurden in Chloroform aufgenommen und durch TLC auf Kieselgelplatten mit dem Laufmittel Heptan-Diethylether-Methanol-Essigsäure (80:35:3:2, v/v/v/v) getrennt. Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgte durch UV-Belichtung (Wellenlänge 312 nm) und

Detektion mit einer CCD-Kamera Diana II (Raytest). Das radioaktive [³H]-Cholesterin wurde mit dem Bio-Imaging Analysator Bas-1800 quantifiziert.

3.12.2. Efflux des Fluochols aus Zellen in Suspension

CHO-Zellen in drei 10 cm-Schale wurden für 18 h mit 6 μ M Fluochol, 6 μ M [³H]Cholesterin und ACAT-Inhibitor (400ng/ml) in Kulturmedium inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und 2 h mit ACAT-Inhibitor in Kulturmedium mit 20 mM HEPES (pH = 7,4) weiterkultiviert, um eine Verteilung der Steroide in der gesamten Zelle zu gewährleisten. Durch Inkubation mit Trypsin (2,5 ml) bei 37 °C für 5 Minuten wurden die Zellen abgelöst und nach Zugabe von 7 ml PBS abzentrifugiert (1000 rpm, 5 Minuten, RT). Durch zweimaliges Resuspendieren mit 9 ml DMEM/20 mM HEPES wurden Reste von Trypsin entfernt. Die Zellen wurden dann in 1,8 ml DMEM/20 mM HEPES resuspendiert und je 50 μ l in Eppendorfgläser aliquotiert. Die Zellen wurden bei 37 °C geschüttelt und 250 μ l einer Akzeptorlösung, die ebenfalls auf 37 °C temperiert war, zu jedem Aliquot gegeben. Die Akzeptorlösung bestand aus 50 mM M β CD, die teilweise (molekulares Verhältnis 80:1) mit Cholesterin gesättigt war, um die Depletion der Zellen zu verhindern und einen Austausch der Steroide, mit denen die Zellen vorher beladen worden waren, mit Cholesterin zu ermöglichen. Während des Experiments wurden die Zellen auch weiterhin bei 37 °C geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Einstellen in Eis und sofortiges Zentrifugieren bei 2 °C (30 Sekunden, 5000 rpm) gestoppt. Pellet und Überstand wurden getrennt und analysiert. Das Pellet wurde in einem Endvolumen von 300 μ l H₂O resuspendiert. Jeweils die Hälfte des Überstandes und der Pelletlösung wurde direkt für die Radioaktivitätsmessung verwendet, die andere Hälfte diente zur Fluoreszenzmessung. Um die Fluoreszenz zu messen wurde durch Zugabe von 1 ml Chloroform-Methanol (1:2, v/v) ein Einphasensystem erzeugt, ungelöste Bestandteile durch Zentrifugation (30 Minuten, 14.000rpm) entfernt und der Überstand vermessen. Der Hintergrund der Fluoreszenzmessungen wurde in Versuchen ermittelt, in denen die Zellen vorher nicht mit Fluochol beladen worden waren. Das Ausmaß des Efflux wurde ausgedrückt durch den Anteil des in der Zelle verbliebenen Steroids an der Gesamtfluoreszenz (Pellet und M β CD-Lösungen). Der für t = 0 erhaltene Wert diente dabei als Ausgangspunkt und wurde auf 1 gesetzt. Der zeitliche Verlauf des Efflux wurde durch nichtlineare Regression an eine biexponentielle Zerfallskurve angepasst, um einen Efflux aus zwei unabhängigen Pools zu beschreiben:

$$Y = Ae^{-k(1)t} + Be^{-k(2)t}$$

Y: Anteil des in der Zelle verbliebenen Fluochols
t: Zeit
A: Größe des Fluochol-Pools 1
B: Größe des Fluochol-Pools 2

Durch $t_{1/2} = \ln(2/k)$ erhält man die Halbwertszeiten für den Efflux aus den jeweiligen Pools 1 und 2 (Mahlberg and Rothblat, 1992; Yancey et al., 1996).

3.12.3. Konfokale Mikroskopie an fixierten Zellen

Die Zellen wurden auf Polylysin-beschichteten Deckgläschen ($\varnothing = 9$ mm) in 24-Napf-Schalen ausgesät und bis ca. 50 % Konfluenz kultiviert. Die Fixierung erfolgte mit 3,7 % (w/v) Paraformaldehyd (mind. 20 min, RT) fixiert und in Mowiol (s. u.) eingebettet. Die Mikroskopie wurde an einem Leica-TC LSP konfokalem Laserscan-Mikroskop durchgeführt.

Herstellung der Mowiollösung: 9,6 g Mowiol und 24 g Glycerin in 24 ml H₂O 2 h bei RT ohne Schäumen rühren, 8 ml 0,2 M Tris/HCl (pH = 8,5) zugeben und 45 min bei 85 °C im Wasserbad weiterrühren, bis alles gelöst ist. Nach 10 min Zentrifugation bei 17.000 x g wird der zähflüssige Überstand aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.12.4. Fluoreszenzmikroskopie an lebenden Zellen

Die Zellen wurden auf Deckgläschen ($\varnothing = 12$ mm) in 12-Napf-Schalen kultiviert und unmittelbar vor der Mikroskopie in spezielle Mikroskopkammern (Life imaging service, Olten (Schweiz)) überführt. Die Kammern wurden auf dem Mikroskoptisch in einen Adapter (Eigenbau) eingesetzt, der mit einem Peltierelement temperaturgeregelt war. Für die Zeit der Beobachtung auf dem Mikroskop wurden die Zellen mit einem CO₂-unabhängigen Mikroskopiepuffer (S. 34, mit und ohne 10 % FCS) überschichtet. Die Mikroskopie erfolgte mit einem Zeiss Axiovert 100 mit 100x/1,30 Fluar-Objektiv und einer MicroMax CCD-Kamera (Princeton Instruments, Trenton, NJ (USA)). Die Steuerung des Mikroskops und die Auswertung der Bilder erfolgte durch die Software MetaView Imaging System (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA (USA)). Für die

Fluoreszenzaufnahmen der verschiedenen Substanzen wurden die entsprechenden Filter verwendet.

3.12.5. Fluoreszenzmarkierung von Zellen

Um die Aufnahme und den zellulären Transport von fluoreszierenden Cholesterinanaloga zu untersuchen wurden die Zellen mit den entsprechenden Steroid/M β CD-Lösungen inkubiert. Die unterschiedlichen Konzentrationen, Zeiten und Temperaturen sind zu den jeweiligen Experimenten angegeben. Nicht aufgenommenes Fluochol wurde mit Mikroskopiepuffer gewaschen und die Zellen im gleichen Puffer unter verschiedenen Bedingungen beobachtet. Die Anregung des Fluochol erfolgte meist bei 395 nm. Bei gleichzeitiger Verwendung des Lysosensors wurde Fluochol bei 360 nm angeregt, um eine Trennung der Signale zu gewährleisten. Der Lysosensor (LysoSensor™ Green DND-189, Molecular Probes, Leiden (Niederlande)) ist ein Marker für Kompartimente mit einem niedrigen pH-Wert wie späte Endosomen und Lysosomen. Bei neutralem pH zeigt der Lysosensor keine Fluoreszenz. Die Markierung der Lipidtröpfchen erfolgte durch Nile Red (Phenoxazinderivat, Molecular Probes, Leiden (Niederlande)). 1 μ l der Stammlösung (1 mg/ml in Aceton) wurde zu 1 ml PBS gegeben, vermischt und nochmals 1:30 mit PBS verdünnt (Volumen 1 ml, Endkonzentration 100 nM). Der Pufferüberstand in der Mikroskopiekammer wurde abgenommen und durch die hergestellte Lösung ersetzt. Die Verwendung und Anregung von DIOC₆, BODIPY™-TR-Ceramid, Nile Red und Lysosensor erfolgte nach den Spezifikationen des Herstellers (Molecular Probes, Leiden (Niederlande)).

Um die Energieabhängigkeit des Fluochol-Transports zu untersuchen wurden die Zellen für 30 Minuten mit 5 μ M Natriumazid und 50 mM 2-Deoxyglucose vorinkubiert. Natriumazid entkoppelt die oxidative Phosphorylierung, Deoxyglucose inhibiert die Glykolyse. Beide Substanzen zusammen führen zu einer kompletten ATP-Depletion der Zellen. Nach Inkubation mit Fluochol bei 4 °C wurden die Zellen gewaschen und in weiterer Anwesenheit von Natriumazid/Deoxyglucose beobachtet.

4. Ergebnisse

4.1. Cholesterinabhängigkeit der Neurohypophysenrezeptoren

Cholesterin kann Membranproteine prinzipiell auf zwei unterschiedliche Arten beeinflussen. Einmal kann sich dieser Einfluss über die Modulierung der biophysikalischen Eigenschaften der Plasmamembran bemerkbar machen, wie z. B. die Veränderung der Membranfluidität. Es kommt dabei also zu einer indirekten Beeinflussung der Membranproteine, wie es z. B. für den Cholecystokininrezeptor Typ B (CCK_BR) gezeigt wurde (Gimpl et al., 1997).

Die zweite Möglichkeit, wie Cholesterin auf integrale Membranproteine wirkt, ist eine direkte Interaktion zwischen Steroid und Protein. Aus vorherigen Arbeiten war bekannt, dass der Oxytocinrezeptor in seiner Ligandenbindung eine spezifische Abhängigkeit von Cholesterin aufweist (Gimpl et al., 1997). Das endogene Cholesterin der Plasmamembran kann dabei den Rezeptor in einem hochaffinen Bindungszustand halten. Diese Wechselwirkung hängt von den spezifischen Strukturmerkmalen des Cholesterins ab und korreliert nicht mit der Fluidität der Plasmamembran.

Der OTR gehört zur Unterfamilie der Rezeptoren der Neurohypophysenhormone (S. 10). Um zu prüfen, ob es sich bei der spezifischen Interaktion mit Cholesterin um ein allgemeingültiges Prinzip dieser Unterfamilie handelt, wurden die Vasopressinrezeptoren V_{1a}R und V₂R auf ihre Cholesterinabhängigkeit untersucht.

4.1.1. Einfluss der Cholesterinoxidation auf die Dissoziation der AVP-Bindung in Plasmamembranen

Durch die Behandlung von Membransuspensionen mit Cholesterinoxidase wird das in der Plasmamembran enthaltene Cholesterin zu 4-Cholesten-3-on oxidiert. Dabei wird die Hydroxylgruppe an Position 3 zu einer Ketogruppe oxidiert und die Doppelbindung zwischen die Positionen 4 und 5 verschoben. Dies führt zu einer schonenden Veränderung der Zusammensetzung der Plasmamembran, wobei sich Eigenschaften wie die Membranfluidität nur geringfügig ändern. Das Oxidationsprodukt des Cholesterins wäre nicht in der Lage, den hochaffinen Bindungszustand eines Rezeptors zu stabilisieren, wenn dieser eine dem OTR vergleichbare Abhängigkeit von Cholesterin aufwiese. Ein Rückgang

der spezifischen Bindung ihres Liganden AVP bei den untersuchten Rezeptoren $V_{1a}R$ und V_2R würde also bestätigen, dass sie eine mit dem OTR identische Cholesterinabhängigkeit aufweisen.

Die für die folgenden Versuche verwendeten Membransuspensionen wurden aus HEK293-Zelllinien präpariert, welche jeweils die Rezeptoren $V_{1a}R$ bzw. V_2R stabil exprimierten. Diese Zelllinien wurden von Frau Dr. Gilbert (Universität Mainz) zur Verfügung gestellt.

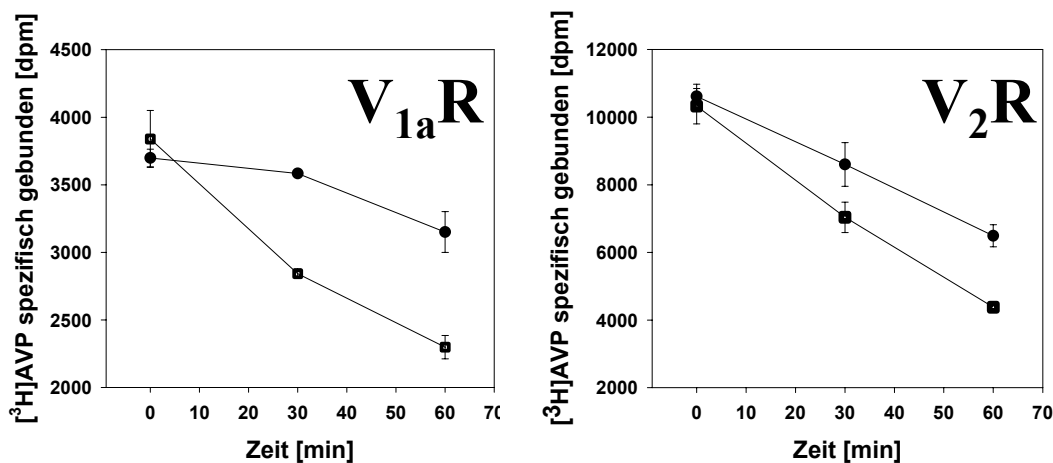


Abbildung 12: Einfluss der Cholesterinoxidase auf die Dissoziation der Vasopressinbindung

Suspensionen von Membranpräparationen, die den V_{1a} - bzw. den V_2 -Rezeptor enthielten, wurden für 30 Minuten bei 30 °C mit $[^3H]AVP$ inkubiert, bis sich das Bindungsgleichgewicht eingestellt hatte. Während der Behandlung mit Cholesterinoxidase (S. 54) wurde die Ligandenbindung zu den angegebenen Zeiten bestimmt (■). Als Kontrolle dienten Membranen, die ohne Zusatz von Oxidase inkubiert wurden (●). Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen eines repräsentativen Experiments.

Die Behandlung mit Cholesterinoxidase zeigte sowohl bei $V_{1a}R$ -Membranen, als auch bei V_2R -Membranen einen signifikanten Einfluss auf die Dissoziation der Ligandenbindung. Abbildung 12 zeigt, dass auch bei den Kontrollen (Membranen, die ohne den Zusatz von Oxidase inkubiert wurden) ein Rückgang der Bindung des Radioliganden beobachtet werden konnte. Dieser Rückgang ist zumeist auf die Denaturierung der Membranproteine während der Inkubation zurückzuführen. Aber auch andere Einflüsse, wie z. B. die Wirkung von Proteasen, die zum Verdau der Rezeptoren führen, können die Bindung zwischen Protein und Ligand vermindern. Die Dissoziation der Ligandenbindung der Kontrollmembranen war beim V_2R stärker ausgeprägt. Hier kam es zu einem Verlust von ca. einem Drittel der Ligandenbindung. Die Ursache für den stärkeren Bindungsrückgang

lag möglicherweise in einem geringeren Cholesteringehalt der V_2R -Membranen (16 $\mu\text{g}/\text{mg}$, $V_{1a}R$ -Membranen: 22 $\mu\text{g}/\text{mg}$), denn Cholesterin ist in der Lage, den OTR vor Denaturierung zu schützen (Gimpl and Fahrenholz, 2000) und hat beim Vasopressinrezeptor offenbar die gleichen protektiven Eigenschaften. Die insgesamt höhere Ligandenbindung des V_2R lässt sich durch die verstärkte Expression dieses Proteins in den Zellen erklären (V_2R : 5 pmol/mg, $V_{1a}R$: 1 pmol/mg).

Insgesamt können also mehrere Einflüsse die Dissoziation der Ligandenbindung verursachen. Um die Wirkung der Cholesterinoxidase auf den Verlust der AVP-Bindung bei beiden Rezeptoren zu vergleichen, wurden die experimentellen Werte zu jedem Zeitpunkt mit den gleichzeitig ermittelten Kontrollwerten verglichen. Wird die Ligandenbindung der Rezeptoren in den unbehandelten Kontrollmembranen als maximal angesehen (= 100%), so zeigten beide Rezeptoren eine vergleichbare Dissoziation ihrer Ligandenbindung. Der $V_{1a}R$ besaß nach 30 Minuten noch 79 % seiner maximalen Ligandenbindung, nach 60 Minuten war dieser Wert auf 73 % gesunken. Die Werte für den V_2R lagen bei 86 % (nach 30 Minuten) bzw. 67 % (nach 60 Minuten). Somit ist der Einfluss der Cholesterinoxidase durch die Oxidation des Cholesterins bei beiden Rezeptoren vergleichbar stark ausgeprägt.

4.1.2. Vergleich der Cholesterinabhängigkeit zwischen den Neurohypophysenrezeptoren und dem CCK_BR

Die Behandlung von Membransuspensionen mit Cholesterinoxidase führte bei den Neurohypophysenrezeptoren $V_{1a}R$ und V_2R zu einem spezifischen Rückgang der Ligandenbindung. Die fehlende Fähigkeit von 4-Cholesten-3-on, die hochaffinen Bindungszustände der Rezeptoren aufrecht zu erhalten, bedeutet eine hinreichende Bestätigung einer spezifischen Cholesterinabhängigkeit, wie sie auch der OTR aufweist. In Abbildung 13 ist der Einfluss der Cholesterinoxidase auf die Neurohypophysenrezeptoren im Vergleich zum CCK_BR dargestellt.

Die untersuchten Neurohypophysenrezeptoren $V_{1a}R$ und V_2R zeigen nach der Behandlung mit Cholesterinoxidase eine Dissoziation ihrer Ligandenbindung, deren Werte mit den für den OTR gefundenen Ergebnissen übereinstimmt. Die spezifische Interaktion mit dem Cholesterin der Plasmamembran scheint somit ein allgemeingültiges Prinzip der Neurohypophysenrezeptoren zu sein. Obwohl die Sequenzhomologien des OTR zu den

Vasopressinrezeptoren nur 50 % ($V_{1a}R$) bzw. 40 % (V_2R) betragen (S. 12), finden sich die größten Gemeinsamkeiten der Rezeptorfamilie in den Transmembrandomänen, wo auch die Interaktion mit dem Cholesterin der Plasmamembran zu erwarten ist.

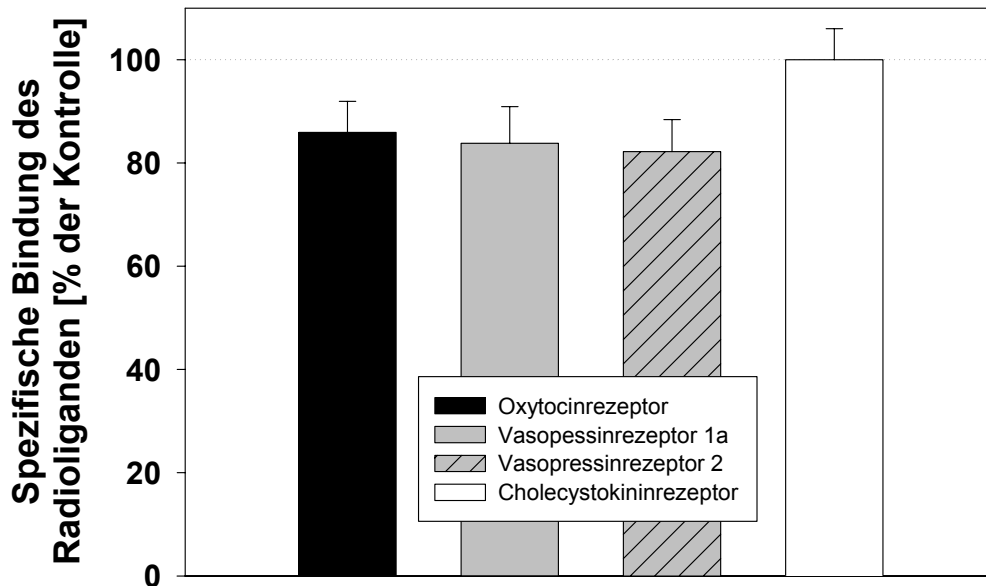


Abbildung 13: Cholesterinoxidase-Sensitivität der Ligandenbindung der Neurohypophysenrezeptoren $V_{1a}R$, V_2R , OTR und des $CCK_B R$

Spezifische Bindung der Radioliganden der Rezeptoren OTR, $V_{1a}R$, V_2R und $CCK_B R$ im Vergleich zu Kontrollen nach Behandlung mit Cholesterinoxidase nach 30 Minuten (Einzelheiten siehe S. 66). Die Daten für die Vasopressinrezeptoren sind aus Abbildung 12, die Daten für OTR und $CCK_B R$ stammen aus der Literatur (Gimpl et al., 1997).

Im Gegensatz dazu zeigt der $CCK_B R$, dessen Ligandenbindung exakt mit der Fluidität der Membran korreliert, keine Sensitivität gegenüber der Behandlung mit Cholesterinoxidase. Da der Einfluss des Cholesterins auf den $CCK_B R$ über die Modulierung der Fluidität der Plasmamembran zustande kommt, handelt es sich hier um zwei unterschiedliche Mechanismen, über die Cholesterin integrale Membranproteine regulieren kann.

4.2. Versuche zur Lokalisierung der Cholesterinbindungsstelle des OTR

Potentielle Cholesterinbindungsstellen des OTR sind wahrscheinlich in den Transmembrandomänen zu finden. Zur Lokalisierung der Bindungsstellen wurden mehrere Ansätze gewählt. Eine Möglichkeit besteht darin, innerhalb der Transmembrandomänen des Rezeptors einen Austausch kleiner Bereiche oder einzelner Aminosäuren vorzunehmen, um so eine Änderung in der Cholesterinabhängigkeit herbeizuführen. Der Austausch zwischen nah verwandten Rezeptoren wäre wünschenswert, jedoch musste die Verwendung der Vasopressinrezeptoren durch die in Kapitel 4.1 gezeigten Ergebnisse ausgeschlossen werden. Da für die Modulation der Ligandenbindung des CCK_BR durch Cholesterin keine direkte Wechselwirkung nachgewiesen wurde, konnte dieser Rezeptor für die Bildung von sogenannten Rezeptorchimären verwendet werden. Zunächst erfolgte ein sukzessiver Austausch der Transmembrandomänen. Beginnend vom C-Terminus wurden dabei immer größere Teile des OTR durch die entsprechenden Bereiche des CCK_BR ersetzt. Das Ziel dieser Versuche war, die spezifische Interaktion des OTR mit Cholesterin auszuschalten oder zu vermindern, und die Fähigkeit der Ligandenbindung dabei zu erhalten.

Der Einsatz von computergestütztem „Modeling“ ermöglichte einen theoretischen Ansatz zur Detektion möglicher Cholesterinbindungsstellen. Dabei wurden verschiedene Rezeptormodelle erstellt und auf deren Cholesterinabhängigkeit untersucht. Die Beteiligung einzelner Aminosäuren an der Interaktion mit Cholesterin sollte durch ortsspezifische Mutagenese verifiziert werden.

4.2.1. OTR-CCK_BR-Chimäre I

Für die erste Chimäre wurde der Bereich der letzten beiden Transmembrandomänen (TM VI und TM VII) des OTR durch die entsprechenden Domänen des CCK_BR ersetzt (Abbildung 14). Die Grenze lag in der Mitte der dritten intrazellulären Schleife. In diesem Bereich besitzt der OTR die größte Varianz zwischen den Spezies. Eine Veränderung dieser Schleife sollte sich deshalb nur gering auf Struktur und Eigenschaften des Rezeptors auswirken. Ausschlaggebend für die Wahl der C-terminalen Bereiche, die im OTR ersetzt wurden, waren die aus der Literatur bekannten Bindungsdomänen des Rezeptors. Wichtig für die Ligandenbindung des OTR sind vor allem der N-Terminus und die beiden ersten extrazellulären Schleifen (Hawtin et al., 2001; Postina et al., 1996; Wesley et al., 2002). Da

diese Bereiche unverändert blieben, sollte die OT-Bindung der generierten Chimäre gewährleistet sein.

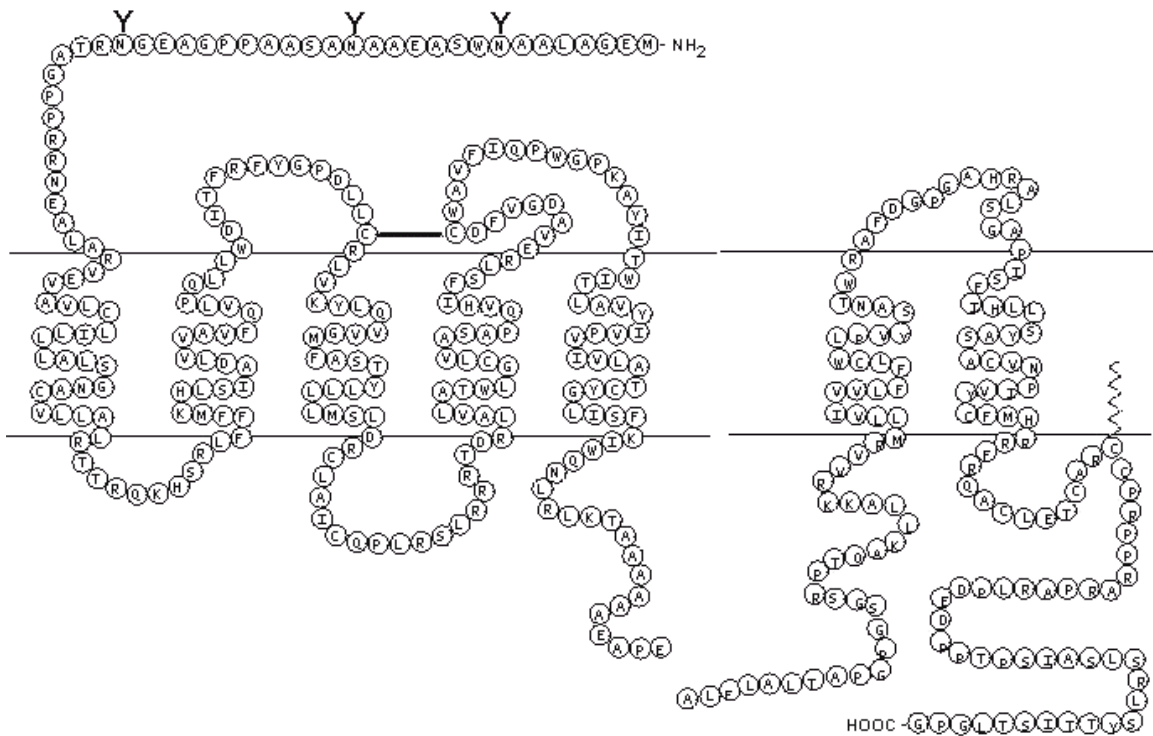


Abbildung 14: Aminosäuresequenzen für OTR-CCK_BR-Chimäre I

Schematische Strukturen des OTR (links) und des CCK_BR (rechts). Es sind nur die Aminosäuren des jeweiligen Rezeptors gezeigt, die in der erzeugten Chimäre enthalten sind.

Klonierung

Zur Klonierung der Chimäre musste zuerst eine *Eco*RI-Schnittstelle in die OTR-DNA eingebaut werden (Klonierungsschema 6.1.1). Für die weitere Verwendung dieses Konstruktes sollte außerdem noch eine *Not*I-Schnittstelle im gleichen Bereich eingefügt werden. Dies erfolgte durch PCR-Mutagenese mit dem Oligonukleotid hOT_Not_Eco, welches durch PCR mit dem reversen Primer pcDNA3_Seq_rev eingesetzt wurde. Das erhaltene Amplifikat aus 603 bp wurde nach seiner Reinigung in einer zweiten PCR als Primer eingesetzt und der vordere Teil der OTR-DNA amplifiziert. Das 1572 bp-Fragment hOT_Eco wurde mit den Restriktionsnukleasen *Nhe*I und *Kpn*I in das Ursprungsplasmid pfmOTRHis ligiert.

Durch analytische Restriktionen und Sequenzierung musste jedoch festgestellt werden, dass das mutierte Plasmid pfmOTRHis_Eco keine *NotI*-Schnittstelle besitzt, was offenbar durch einen Fehler im Primer zustande kam. Für die Klonierung der Rezeptorchimäre war die bestehende *EcoRI*-Schnittstelle jedoch ausreichend.

Durch PCR wurde mit den Primern CCKR_Eco und CCKR-Stop_Xba ein Amplifikat des CCK_BR erzeugt, welches dem Bereich des zu ersetzenden Teils im OTR entspricht. Gleichzeitig wurde dabei hinter dem Stopp-Codon eine *XbaI*-Schnittstelle eingefügt. Mit den Restriktionsnukleasen *EcoRI* und *XbaI* wurde das Amplifikat geschnitten und anschließend gereinigt. Das Plasmid pfmOTRHis_Eco wurde ebenfalls mit *EcoRI* und *XbaI* geschnitten, die beiden Fragmente elektrophoretisch getrennt und das 6264 bp-Fragment mit dem N-Terminus des OTR isoliert. Durch Ligation wurde das 441 bp-Fragment des CCK_BR eingefügt (Klonierungsschema 6.1.2). Das resultierende Plasmid wurde zur Amplifikation in *E.coli* transformiert und durch Plasmidgroßpräparation (S. 42) gereinigt.

Durch analytische Restriktionen und Sequenzierung wurde die Sequenz überprüft. Das Plasmid wurde als pfmOTCCK1 bezeichnet.

Stabile Expression von pfmOTCCK1 in HEK293-Zellen

Die Zelllinie HEK293 stammt aus menschlichem embryonalen Nierengewebe (human embryonic kidney) und wird in vielen Laboratorien verwendet, da sie einfach transfizierbar ist, einen raschen Zellzyklus (ca. 24 Stunden) besitzt und leicht zu kultivieren ist. Dr. G. Gimpl erzeugte bereits eine transfizierte Zelllinie (HEKOTRHis), die den menschlichen OTR mit N-terminalem flag-Epitop, gefolgt von einem c-myc-Epitop und C-terminalem Dekahistidin-tag exprimiert (Gimpl et al., 1997).

Zur Herstellung einer die Chimäre stabil exprimierenden Zelllinie wurden HEK293-Zellen mittels der Calciumphosphat-Methode mit dem Vektor pfmOTCCK1 transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurde mit der Selektion transfizierter Zellen durch Zugabe von 1000 µg/ml G418 ins Medium begonnen. Nach etwa zwei Wochen wurden die Zellen vereinzelt und unter ständigem G418-Selektionsdruck herangezogen. Der Einzelklon wurde als HEKOTCCK1 bezeichnet

Sättigungsexperiment mit [³H]OT an HEKOTCCK1-Membranen

Durch Radioligandenbindungstest mit [³H]-OT wurde die Expression der Chimäre untersucht (Gleichgewichts-Dissoziationskonstante $K_D = 5,0 \pm 1,1$ nM (Abbildung 15)). Für den ebenfalls Epitop-markierten Klon HEKOTRHis, der zusätzlich am C-Terminus noch ein Histidin-Tag trägt, beträgt dieser Wert 3,3 nM (Burger, 2000). Damit scheint der Austausch der C-terminalen Transmembranbereiche nur einen geringen Einfluss auf die OT-Bindungsfähigkeit zu haben. Die Scatchard-Analyse der Bindungsdaten ergibt eine Rezeptordichte von $B_{\max} = 1,2 \pm 0,1$ pmol Rezeptor/mg Membranprotein.

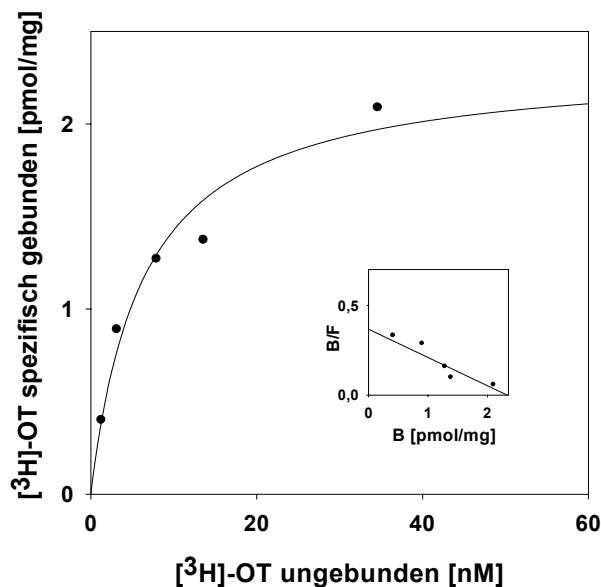


Abbildung 15: Sättigungsexperiment mit [³H]-OT an HEKOTCCK1-Zellmembranen

Die Konzentration von [³H]-OT betrug 0,15 bis 30 nM, die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart eines 500-fachen Überschusses an nichtradioaktivem OT bestimmt. Die eingefügte Grafik zeigt die Scatchard-Auftragung. Die ermittelte Dissoziationskonstante beträgt $5,0 \pm 1,0$ nM, die Rezeptordichte $1,2 \pm 0,1$ pmol/mg Membranprotein ($r^2 = 0,9486$).

Durch den Austausch der Transmembranregionen 6 und 7 inklusive der dritten extrazellulären Schleife kommt es zu keiner nennenswerten Beeinflussung der Ligandenbindung. Das Sättigungsexperiment bestätigt somit Befunde, dass die Bindung des Hormons OT im N-terminalen Bereich seines Rezeptors erfolgt (Hawtin et al., 2001; Postina et al., 1996; Wesley et al., 2002). Dadurch besteht die Möglichkeit, mit dieser Chimäre die Cholesterinabhängigkeit der OT-Bindung zu untersuchen.

Oxidasetests

Durch Cholesterinoxidase wird das endogene Cholesterin der Plasmamembranen in sein Oxidationsprodukt 4-Cholesten-3-on überführt. Dies führt zur Dissoziation des Radioliganden von seinem Rezeptor (s. auch Kap. 4.1.1).

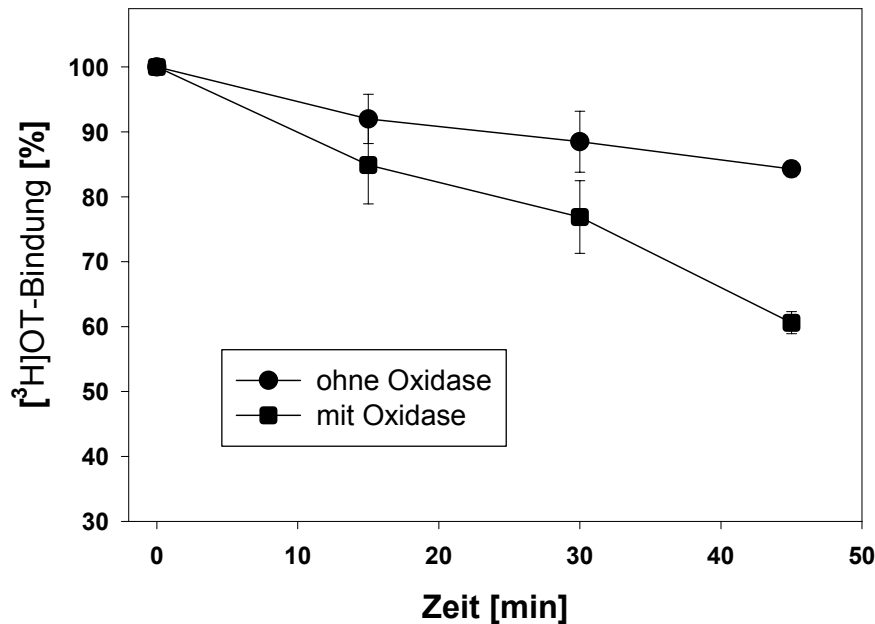


Abbildung 16: Einfluss der Cholesterinoxidase auf die OT-Bindung der OTR-CCK_BR-Chimäre

HEKOTCCK1-Membransuspensionen wurden für 30 Minuten bei 30 °C mit 10 nM (final) [³H]-OT inkubiert, so dass sich das Bindungsgleichgewicht eingestellt hatte. Der Einfluss der Cholesterinoxidase wurde durch Messung der Bindung zu den angegebenen Zeiten bestimmt (■). Als Kontrolle dienten Membranen, die ohne Zusatz von Oxidase inkubiert wurden (●). Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten mit Dreifachbestimmung.

Im Vergleich zu Kontrollmembranen, bei denen nach 45 Minuten die Ligandenbindung nur auf 84 % zurückgeht, zeigt die Oxidation des Cholesterins doch eine erhebliche stärkere Wirkung auf die Ligandenbindung der Chimäre. In den Membranen, die für 45 Minuten mit Cholesterinoxidase behandelt wurden, reduzierte sich die Ligandenbindung bis auf 60 %. Ein Vergleich mit den für die Vasopressinrezeptoren und den OTR ermittelten Werte aus Abbildung 13 zeigt eine deutliche Übereinstimmung. Wird die Ligandenbindung in den Kontrollmembranen zum Zeitpunkt nach 30 Minuten auf 100 % gesetzt, so errechnet sich für die Chimäre eine verminderte OT-Bindung von 72 %. Damit liegen die Ergebnisse für die Chimäre exakt im Bereich der Werte, die für OTR, V1aR und V2R erhalten wurden (s. S. 67). Es lässt sich dadurch schon vermuten, dass die

Cholesterinabhängigkeit des OTRs durch den Austausch der TMs 6 und 7 nicht verändert wurde.

Einfluss von verschiedenen Steroiden auf die Ligandenbindung der OTR-CCK_BR-Chimäre

In Cholesterinsubstitutionsexperimenten unterstützten verschiedene Steroide die hochaffine Ligandenbindung des OTR in unterschiedlichem Umfang (Burger, 2000; Gimpl et al., 1997). Aus diesen Experimenten konnte auf notwendige Strukturmerkmale des Cholesterins geschlossen werden (s. Abbildung 6, S. 23). Im Rahmen meiner Arbeit führte ich vergleichbare Experimente durch, um die Cholesterinabhängigkeit der OTR-CCK_BR-Chimäre zu überprüfen. Membransuspensionen aus HEKOTCCK1-Zellen wurde mit M β CD das endogene Cholesterin bis auf 15 % entzogen. Anschließend wurden sie mit verschiedenen Steroiden mittels Steroid/M β CD-Komplexen wiederangereichert (S. 51). In Radioligandenbindungstests (S. 53) wurden die Steroide auf ihre Fähigkeit überprüft, die hochaffine Ligandenbindung der Chimäre aufrecht zu erhalten. Ausgewählt wurden dabei fünf Steroide, die unterschiedliche Wirkungen auf die Ligandenbindung des OTR besitzen und sich sehr gut in die Membran einlagern lassen (Gimpl et al., 1997). Die maximale Wirkung der Wiederherstellung der Ligandenbindung wurde dabei von Cholesterin erzielt, dessen Wert bei den Experimenten auf 100 % gesetzt wurde. Die vier anderen Steroide waren 4-Cholesten-3-on, Dihydrocholesterol, Coprostanol und 6-Ketocholestanol. Beeinflussten diese Steroide in ähnlicher Weise die Bindungsaffinität der Chimäre, wäre dies ein Hinweis auf die gleiche Cholesterinwirkung bei der Chimäre.

Die verwendeten Steroide zeigen auch bei der Chimäre unterschiedliche Fähigkeiten zur Wiederherstellung der Bindungsaffinität. Dabei nimmt die Ligandenbindung der Chimäre in der gleichen Reihenfolge wie beim OTR ab, nämlich von Dihydrocholesterin über Coprostanol und 6-Ketocholestanol bis hin zum Oxidationsprodukt des Cholesterins, 4-Cholesten-3-on. Ein Vergleich dieser Werte mit den Ergebnissen, die für den OTR ermittelt wurden, zeigt eine gute Korrelation zwischen der Chimäre und dem OTR (Abbildung 17).

Tabelle 1: Wiederherstellung der Bindungsaffinität der OTR-CCK_βR-Chimäre durch verschiedene Steroide

HEKOTCCK1-Membranen wurden mit M β CD behandelt, um das endogene Cholesterin zu entfernen (bis auf ca. 15 %). Danach erfolgte die Wiederanreicherung mit Steroid/M β CD-Komplexen und die Bestimmung der Ligandenbindung. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen zweier unabhängiger Experimente mit Dreifachbestimmung. Die Bindung der mit Cholesterin wieder angereicherten Membranen wurde auf 100 % gesetzt.

Steroid	[³H]-OT-Bindung (% der maximalen Bindung)
Cholesterin	100,0 \pm 4,1
Dihydrocholesterin	68,3 \pm 10,0
Coprostanol	47,2 \pm 13,6
6-Ketocholestanol	16,4 \pm 2,8
4-Cholesten-3-on	7,8 \pm 1,3

Der Vergleich in Abbildung 17 zeigt, dass die Chimäre in ihrer spezifischen Abhängigkeit von Cholesterin von den Strukturmerkmalen der Steroide abhängig ist wie der OTR. Zwar zeigen die Werte für das Steroid Dihydrocholesterin eine kleine Diskrepanz bezüglich der Ligandenbindung, die Werte für die anderen Steroide stimmten jedoch gut überein. Das Ergebnis bekräftigt so den Befund der Gemeinsamkeit der beiden Rezeptoren in ihrer spezifischen Interaktion mit Cholesterin.

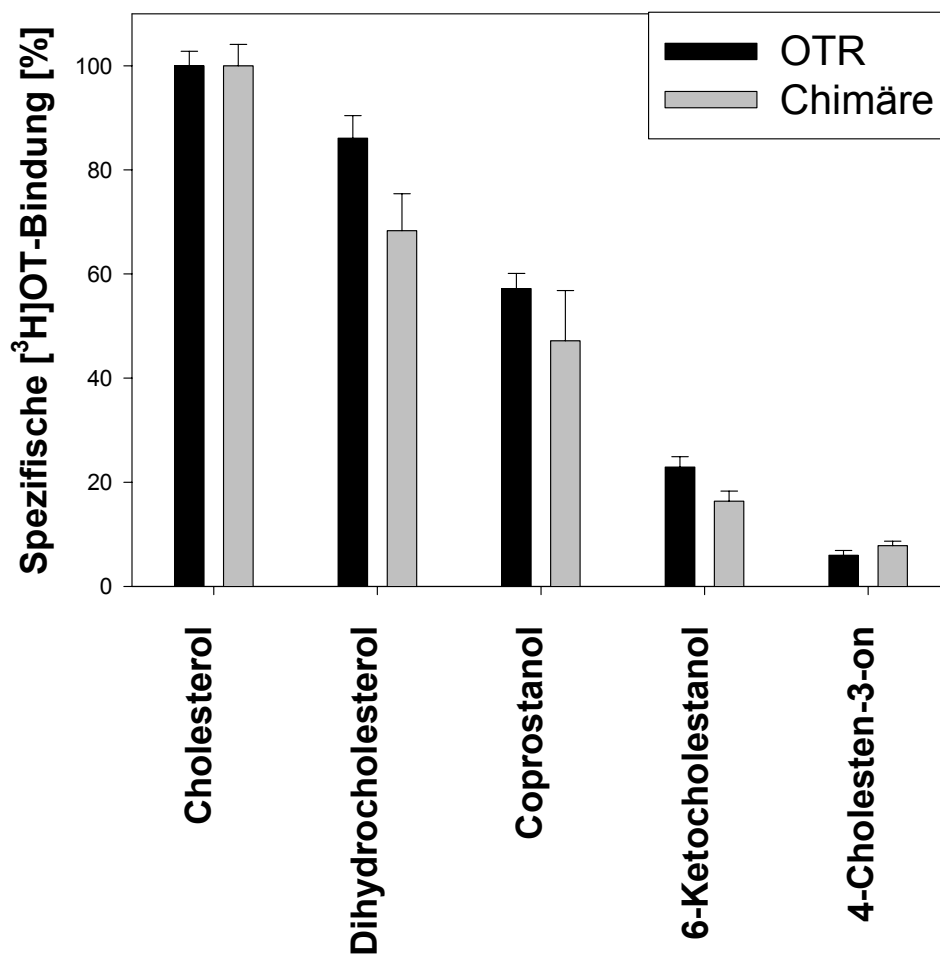


Abbildung 17: Vergleich der Wiederherstellung der Ligandenbindung beim OTR und der OTR-CCK_BR-Chimäre.

Vergleich der Fähigkeiten von fünf Steroiden, die hochaffine Ligandenbindung des OTRs und der generierten OTR-CCK_BR-Chimäre wiederherzustellen (Erläuterungen siehe Text). Die Werte der Chimäre sind Tabelle 1 entnommen, die Werte für den OTR stammen aus (Gimpl et al., 1997).

Vergleich der Internalisierung der Chimäre mit dem OTR

Nach Bindung ihrer Liganden kommt es bei den GPCRs zu einer Abschaltung des Signals. Die Rezeptoren werden dabei von Rezeptorkinasen phosphoryliert. Die anschließende Bindung von Arrestinen verhindert eine weitere Interaktion der Rezeptoren mit G-Proteinen und beendet das Signal. Durch Wechselwirkung der Arrestine mit Clathrin internalisieren die Rezeptoren. Sie werden anschließend abgebaut oder kehren zur Plasmamembran zurück.

Um die erzeugte Chimäre weiter zu charakterisieren und eventuell bestehende Unterschiede herauszufinden, die der Austausch der beiden C-terminalen Transmembrandomänen mit sich bringen, wurde die Internalisierung des Rezeptors

untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen HEKOTCCK1 und HEKOTRHis für verschieden lange Zeiten mit [^3H]OT inkubiert und die Radioaktivität des mit dem Rezeptor internalisierten [^3H]OT nach Entfernung des überschüssigen und oberflächengebundenen [^3H]OT bestimmt. Diese Werte wurden durch die Gesamtradioaktivität von oberflächengebundenem und internalisiertem [^3H]OT geteilt.

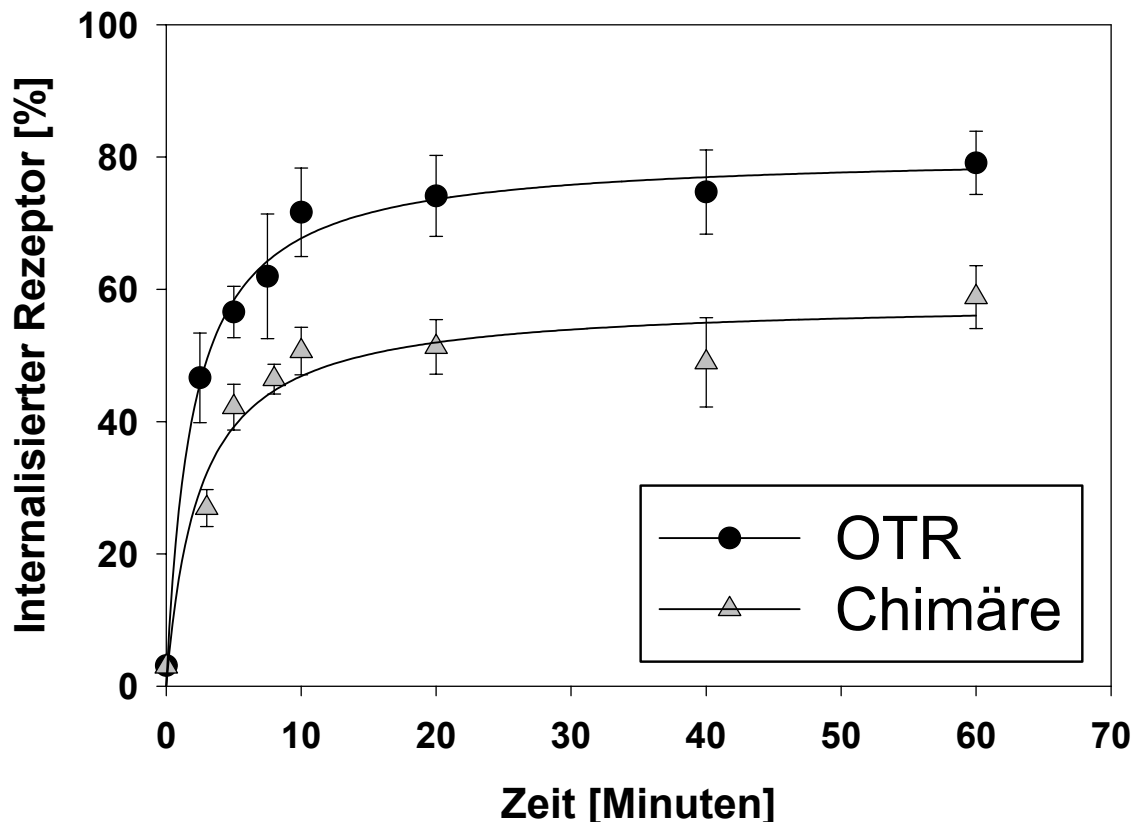


Abbildung 18: Vergleich der Internalisierung zwischen der Chimäre und dem OTR

Mit Zellen, die den OTR bzw. die Chimäre exprimierten, wurden Internalisierungsexperimente mit [^3H]OT durchgeführt (S. 55). Dabei zeigten die Rezeptoren eine unterschiedliche Kinetik. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten mit Dreifachbestimmung. Die Daten wurden hyperbolischen Kurven angepasst ($r^2 = 0,9906$ (OTR) bzw. $r^2 = 0,9528$ (Chimäre)), und die Halbwertszeiten und Grenzwerte wurden für $t \rightarrow \infty$ ermittelt (siehe Text).

Abbildung 18 zeigt die Internalisierungskinetiken der OTR-CCK_BR-Chimäre I und des OTRHis-Rezeptors. OTR und Chimäre weisen unterschiedliche Internalisierungskinetiken auf und werden in einer unterschiedlichen Menge internalisiert. Die Halbwertszeit der Internalisierung beträgt beim OTR unter 2 Minuten, der Anteil des internalisierten Rezeptors beträgt nach 60 Minuten 80 ± 2 %. Die Internalisierung der Chimäre ist dagegen langsamer, die Halbwertszeit beträgt ca. 2,5 Minuten. Auch der Anteil des internalisierten

Rezeptors ist geringer. Die Internalisierung der Chimäre beträgt nach 60 Minuten $58 \pm 3 \%$.

Diese Versuche zeigen, dass die Einführung der beiden Transmembrandomänen des CCK_BR im OTR kaum Einfluss auf die Ligandenbindung hatte. Auch bezüglich der Sensitivität der Chimäre gegenüber Cholesterin waren keine Unterschiede zum OTR zu beobachten. Die unterschiedliche Internalisierung jedoch zeigt, dass die OTR-CCK_BR-Chimäre I sich vom wt-OTR in ihrer Signalweiterleitung und -abschaltung unterschied.

4.2.2. OTR-CCK_BR-Chimäre II

Durch die Untersuchung der ersten Chimäre aus OTR und CCK_BR konnten die Transmembranhelices 6 und 7 des OTR als mögliche Bereiche der Interaktion mit Cholesterin ausgeschlossen werden. Um zu überprüfen, ob die fünfte Transmembranhelix mit Cholesterin interagiert, wurde eine weitere Chimäre erzeugt, die bis zu TM 5 aus der Aminosäuresequenz des OTR besteht und ab dort aus der Aminosäuresequenz des CCK_BR. Als Schnittstelle zwischen OTR und CCK_BR wurde nun der Übergang der zweiten extrazellulären Schleife zur Transmembranhelix 5 gewählt. Die Sequenz des OTR reicht dabei bis einschließlich Aminosäure W203 (Abbildung 19), da die zweite extrazelluläre Schleife möglicherweise an der Ligandenbindung beteiligt ist (s. Kap. 4.2.1). Die Arbeiten zur Klonierung und Expression der zweiten Chimäre wurden zum Teil von Herrn Julian Reitz im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt.

Klonierung der OTR-CCK_BR-Chimäre II

Durch PCR mit den Primern Chim2_Stu_blunt und pcDNA3_Pst_rev wurde ein 2785 bp großes Fragment des CCK_BR amplifiziert, das für die Transmembranhelices 5 bis 7 kodiert. Mit den Restriktionsnukleasen *Pst*I und *Stu*I wurde dieses Amplifikat in das Plasmid pfmOTRHis ligiert (Reitz, 2001). Das erhaltene Plasmid wurde als pfmOTCCK2 bezeichnet.

Die korrekte Sequenz des Amplifikats und die Integrität der Schnittstellen wurde durch analytische Restriktionen und Sequenzierung bestätigt.

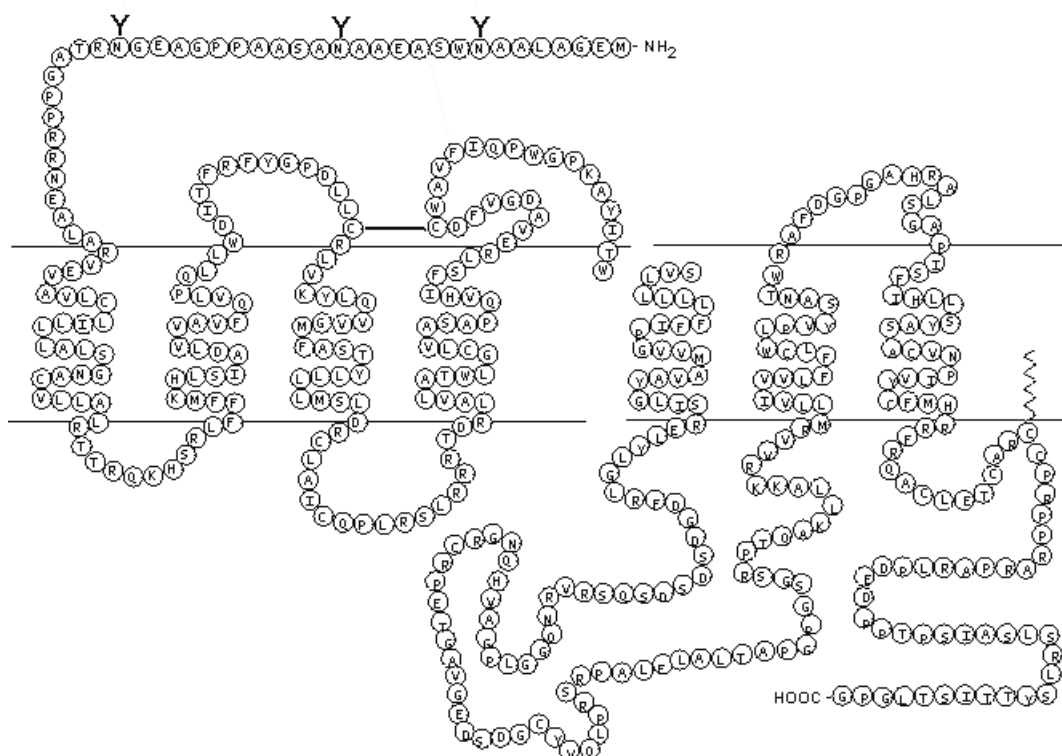


Abbildung 19: Aminosäuresequenz für OTR-CCK_BR-Chimäre II

Schematische Darstellung des OTR (links) und des CCK_BR (rechts). Es sind nur diejenigen Aminosäuren des jeweiligen Rezeptors gezeigt, die in der erzeugten Chimäre enthalten sind.

Untersuchungen zur Expression der OTR-CCK_BR-Chimäre II

Die Expression der neuen Chimäre wurde durch Radioligandenbindungstests untersucht. Leider konnte hier keine spezifische OT-Bindung festgestellt werden. Daraufhin sollte der Nachweis durch Western-Blots erfolgen. Doch auch hier konnte keine Expression der Chimäre nachgewiesen werden (Beobachtungen von Herrn Julian Reitz, Ergebnisse nicht gezeigt). Kontrolltransfektionen mit dem Plasmid pfmOTRHis zeigten bei Bindungstests und Western-Blots positive Ergebnisse. Trotz mehrfacher Transfektionsversuche konnte eine Expression der Chimäre in HEK-Zellen nicht nachgewiesen werden. Da das Konstrukt vorher überprüft wurde und die Kontrolltransfektionen positiv waren, musste die fehlende Expression andere Ursachen haben (s. S. 109).

4.2.3. Punktmutante W203L

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor J. Ciarkowski (Universität Danzig, Polen) wurde durch computergestütztes „Modeling“ ein theoretischer Ansatz zur Identifizierung von möglichen Cholesterinbindungsstellen im OTR verwendet. In einer Arbeit von Frau Politowska wurde eine mögliche Cholesterinbindungsstelle zwischen den Transmembranhelices 5 und 6 am Übergang zwischen Membran und extrazellulären Domänen (Abbildung 20) vorgeschlagen. In der Umgebung des Cholesterins dieser möglichen Bindungsstelle finden sich fünf Aminosäuren: P197, Y200 und W203 in der Transmembranhelix 5 und M296 und W297 in Transmembranhelix 6. Das inaktive Cholesterinderivat 4-Cholesten-3-on konnte in diesem Modell nicht eingepasst werden, was auf eine Spezifität dieser möglichen Cholesterinbindungsstelle hinweist.

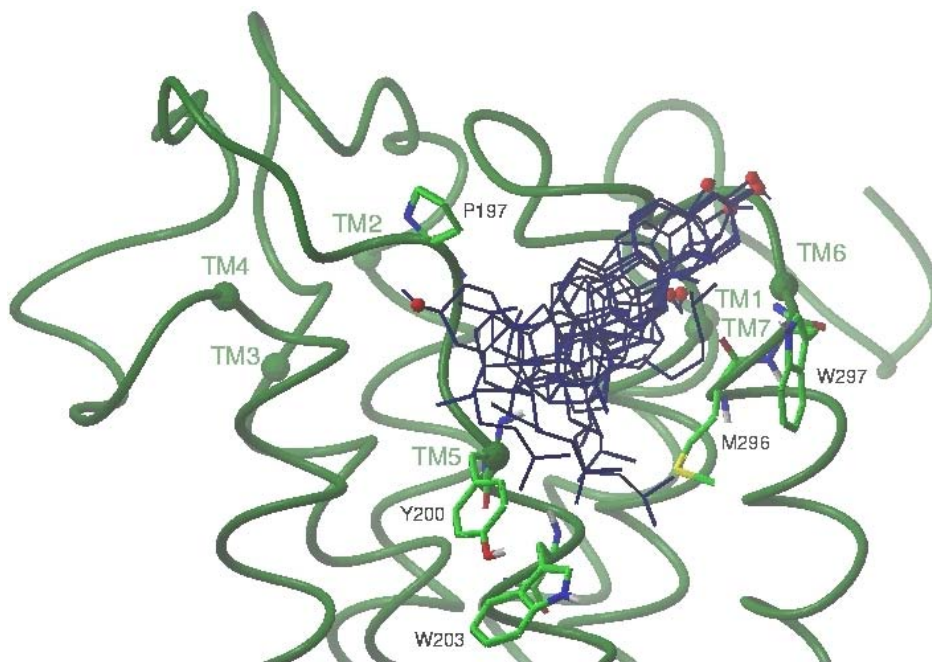


Abbildung 20: Computergestütztes Modeling einer Cholesterinbindungsstelle im humanen OTR.

Die Aminosäurereste P197, Y200 und W203 sind in der Transmembranhelix 5 (TM5), die Aminosäurereste M296 und W297 in der Transmembranhelix 6 (TM6) lokalisiert. Abbildung aus (Gimpl et al., 2000).

Das Ergebnis des Computer-Modeling sollte nun durch ortsspezifische Mutagenese einer der vorgeschlagenen Aminosäuren überprüft werden. Nach den Ergebnissen, die mit der ersten Chimäre zwischen OTR und CCK_BR erzielt wurden, konnte eine Beteiligung der beiden Aminosäuren der sechsten Transmembranhelix (M296 und W297) an der Bindung

von Cholesterin ausgeschlossen werden. Als geeignetste Stelle einer Mutation wurde W203 betrachtet, da diese Aminosäure am tiefsten in der Membran liegt. Zudem sind aus der Literatur einige Beispiele bekannt, in denen eine Interaktion von Cholesterin mit Tryptophan vermutet wird (Alouf, 2000; Palmer et al., 1998; Peterson et al., 1995; Shimada et al., 1999).

Nach Sequenzvergleich der Rezeptoren (Anhang, S. 121) wurde das Tryptophan gegen ein Leucin ausgetauscht, da diese Aminosäure an der entsprechenden Stelle im CCK_BR vorkommt. Um die Expression des mutierten Rezeptors besser verfolgen zu können, wurde dem humane OTR noch das grün-fluoreszierende Protein (GFP) angehängt. Durch vorherige Arbeiten konnte Dr. G. Gimpl zeigen, dass die Verknüpfung des OTR mit dem GFP keine Änderungen seiner pharmakologischen Eigenschaften und seiner Wechselwirkung mit Cholesterin bewirkt (Gimpl and Fahrenholz, 2000).

Klonierung

Die Sequenz des OTR-GFP-Konstrukts wurde durch die Restriktionsnukleasen *HindIII* und *NotI* aus dem Vektor pfmOTGFP (im Expressionsvektor pEGFP-N3 von Clontech, von Dr. G. Gimpl) in den Expressionsvektor pcDNA3 eingefügt (Klonierungsschema 6.1.3). Das entstandene Plasmid wurde als pfmOTREGFP bezeichnet, und die Integrität der Schnittstellen wurde überprüft. Die Mutation wurde mit dem Primer hOT_W203L_rev durch PCR-Mutagenese erzeugt (S. 46). Die amplifizierte Sequenz und die verwendeten Schnittstellen wurden durch analytische Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft. Das Konstrukt wurde als pfmOTREGFP_W203L bezeichnet.

Stabile Expression von pfmOTREGFP_W203L in HEK-Zellen

Die Transfektion des Konstrukts pfmOTREGFP_W203L erfolgte durch die Calciumphosphatmethode. Durch Selektion mit dem Antibiotikum G418 (1 mg/ml) wurde ein stabil exprimierender Mischklon erzeugt. Durch Ligandenbindungstest an transfizierten Zellen und mit Membransuspensionen konnte nur eine geringe spezifische Bindung des Hormons OT gemessen werden. Aus diesem Grund wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abbildung 21).

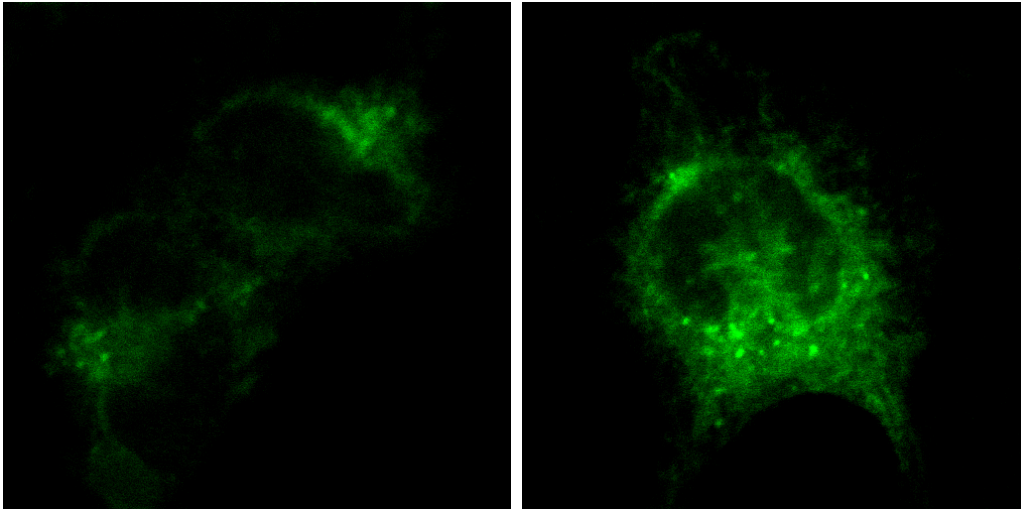


Abbildung 21: Konfokalaufnahmen der Punktmutante W203L in HEK-Zellen

Der stabil exprimierende Mischklon wurde auf Deckgläschen kultiviert, fixiert und in Mowiol eingebettet. Die Abbildung zeigt verschiedene Zellen, in denen die Fluoreszenz des Rezeptor-GFP-Konstrukts ausschließlich im Zellinneren zu beobachten ist. Das Konstrukt gelangt nicht zur Plasmamembran, sondern wird in meist vesikulären Strukturen innerhalb der Zelle zurückgehalten.

Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen, dass das Konstrukt exprimiert wird. Allerdings gelangt das Protein nicht an seinen Bestimmungsort, die Plasmamembran. Es kommt zu einer Rückhaltung des Rezeptors in intrazellulären, meist vesikulären Strukturen. Es ist zu vermuten, dass das Protein im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat verbleibt, auch ein Abbau der Punktmutante kann nicht ausgeschlossen werden (vergl. Kap. 5.2).

4.2.4. Versuch der Lokalisierung der Cholesterinbindungsstelle durch „molekulares Modeling“

Computergestütztes „Modeling“ bietet eine theoretische Methode zur Untersuchung der Wechselwirkung von Molekülen. Durch das Modeling sollten die biochemischen Ergebnisse zur unterschiedlichen Wirkung des Cholesterins auf die beiden Rezeptoren OTR und CCK_BR unterstützt werden. Nach ersten Ergebnisse bei der Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor Ciarkowski wurde bereits eine mögliche Cholesterinbindungsstelle im OTR vorgeschlagen (S. 80). Für weitergehende Analysen wurden von Frau Politoska und Dr. Kazmierkiewicz drei Rezeptormodelle entwickelt:

- Modell des OTR, das bereits zur Detektion einer möglichen Interaktionsstelle mit Cholesterin verwendet worden war
 - Modell des CCK_BR
 - Eine Mutante, bei der die in Abbildung 20 vorgeschlagenen Aminosäuren mit Kontakt zu Cholesterin durch die entsprechenden Aminosäurereste des CCK_BR ersetzt wurden
- Ausgehend vom bereits etablierten Modell des δ -Opiatrezeptors (Pogozheva et al., 1998) wurde ein Sequenzvergleich mit den oben genannten Modellen durchgeführt. Alle nicht-identischen Aminosäuren wurden dann durch die entsprechenden Aminosäuren des OTR bzw. CCK_BR ersetzt und die Modelle durch Energieminimierung verfeinert. Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden in *Acta Biochimica Polonica* veröffentlicht (Politowska et al., 2001).

Eingesetzte Steroide beim „Computer-Modeling“

Um die Spezifität einer möglichen Bindungsstelle zu verifizieren, wurden acht verschiedene Steroide eingesetzt, die die hochaffine OT-Bindung des OTRs in unterschiedlicher Weise unterstützen. Jedes dieser Steroide wurde unabhängig als Bindungspartner für die Rezeptoren untersucht (Tabelle 2).

Tabelle 2: Eingesetzte Steroide beim „Computer-Modeling“

Für die Studie wurden sechs verschiedene Steroide ausgewählt und durch Konformationsanalyse *in vacuo* (1991) berechnet. Die Seitenkette der Steroide erwies sich dabei in einer angewinkelten Konformation als energieminiert. Cholesterin und Epicholesterol wurden zusätzlich noch mit gerader Seitenkette eingesetzt (s. Abbildung 22). Die unterschiedliche Fähigkeit der Steroide, die hochaffine Ligandenbindung des OTR zu unterstützen, ist in Spalte 2 angegeben. Jeweils drei Steroide erwiesen sich als gute, bzw. als schlechte Cholesterinsubstituenten.

^aWerte entnommen aus (Gimpl et al., 1997).

Steroid	[³H]-OT-Bindung (% der Kontrolle)^a	Merkmale der Steroide
Cholesterin	100,0 ± 2,8	Jeweils zwei Konformationen (mit gerader und angewinkelter Seitenkette)
Epicholesterol	10,1 ± 1,4	Epicholesterol besitzt eine α-OH-Gruppe an Position 3
Campesterol	97,0 ± 3,8	Zusätzliche Methylgruppe an Position 24
7-Dehydrocholesterol	91,5 ± 3,1	Zweite Doppelbindung zwischen 7 und 8
25-Hydroxycholesterol	13,2 ± 1,5	OH-Gruppe an Position 25
4-Cholesten-3-on	6,0 ± 0,9	Oxidationsprodukt des Cholesterins Ketogruppe an Position 3; Doppelbindung zwischen 4 und 5

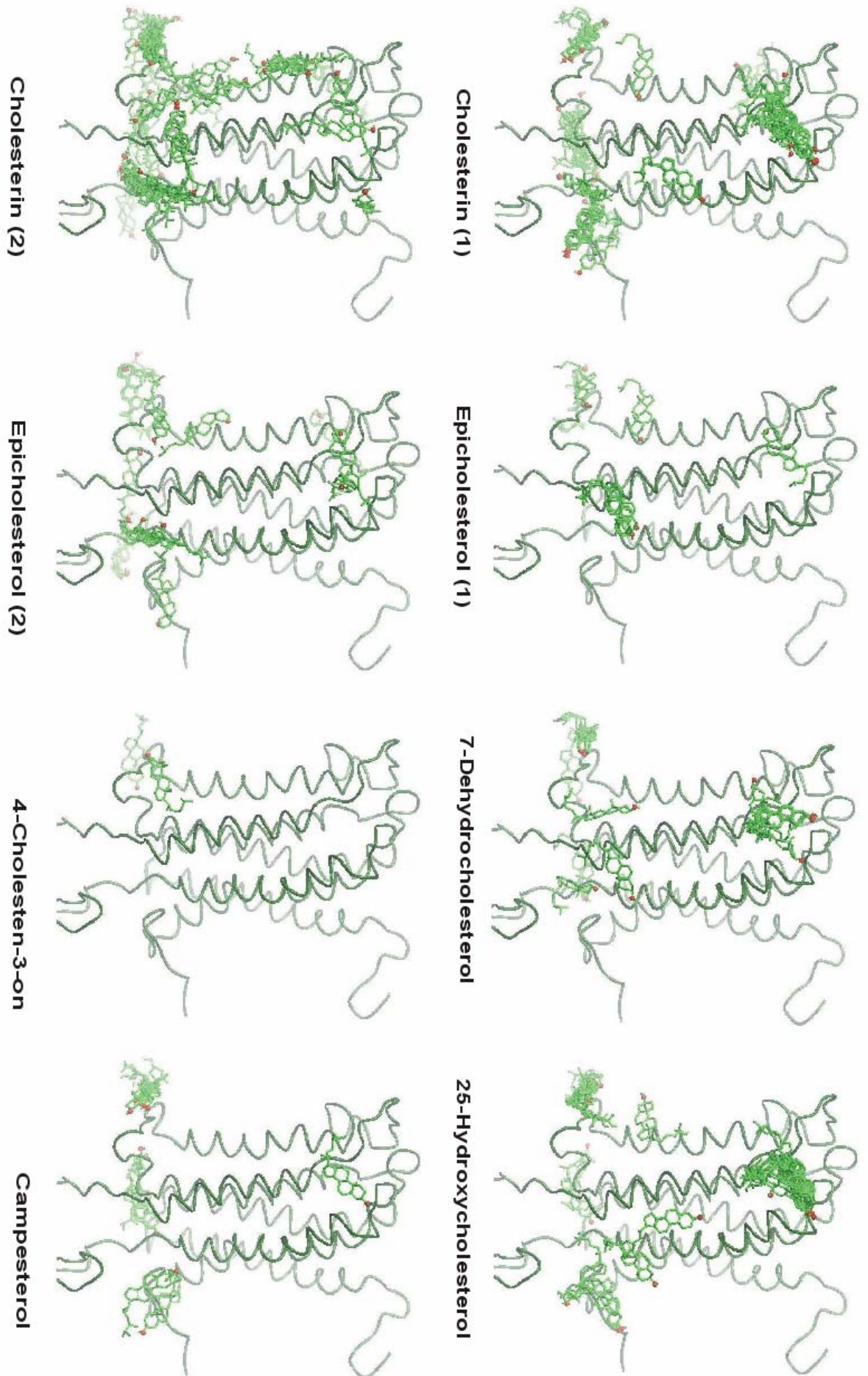
**Cholesterin (1)****Cholesterin (2)****Epicholesterol (1)****Epicholesterol (2)****7-Dehydrocholesterol****4-Cholesten-3-on****25-Hydroxycholesterol****Campesterol****Abbildung 22: Startkonformationen der eingesetzten Steroide**

Cholesterin und Epicholesterin wurden in zwei unterschiedlichen Konformationen eingesetzt (mit angewinkelter (1) und gerader (2) Seitenkette). Für die anderen Steroide wurde die aus den Konformationsanalysen berechnete Konformation (s. Tabelle 2) verwendet. Während des „Andockens“ waren die Seitenketten konformell flexibel. Abbildung aus (Politowska et al., 2001).

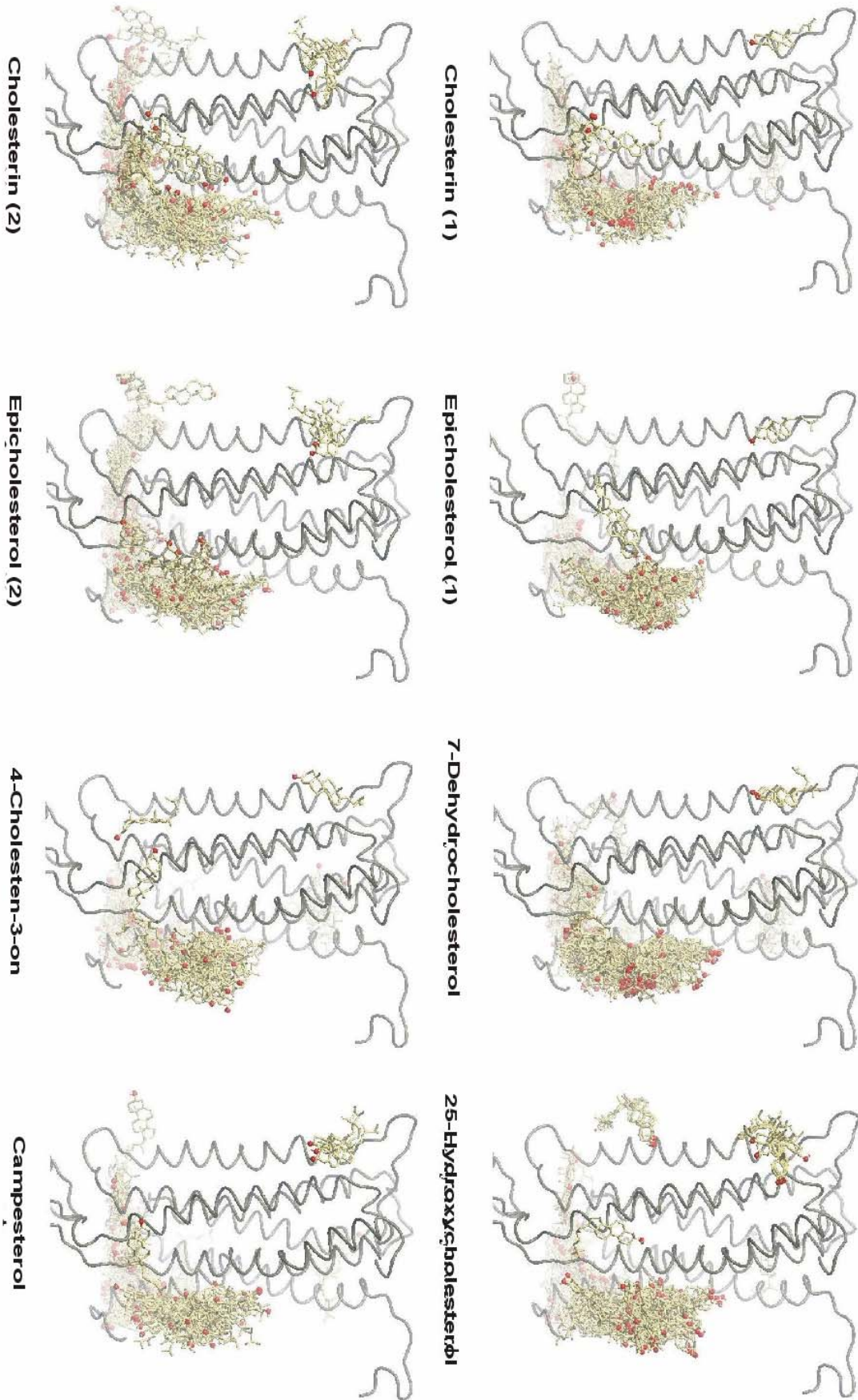
Um Wechselwirkungen der Steroide mit den Rezeptoren herauszufinden, wurde das Computerprogramm AutoDock verwendet. Das Programm versucht, die Steroide an verschiedenen Stellen der Rezeptoren anzulagern („anzudocken“). Nach Filtern ungeeigneter Ergebnisse (s. S. 56) liefert das Programm für jeden Rezeptor und jedes Steroid eine unterschiedliche Anzahl geeigneter Konfigurationen (Abbildung 23).

Abbildung 23: Verteilung der Steroide um die Rezeptoren: A OTR (S. 87); B CCKR (S. 88); C Mutante (S. 89)

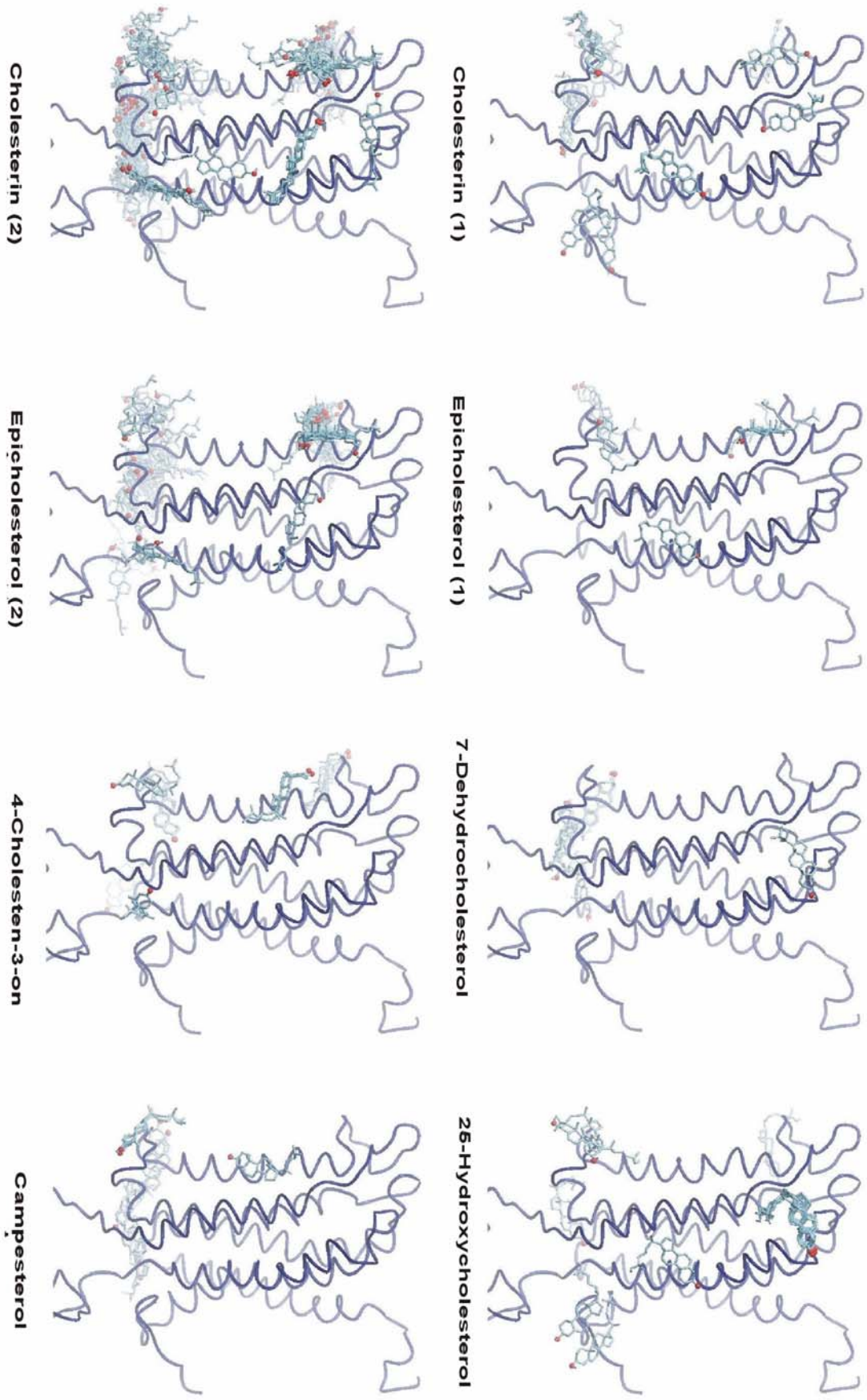
Ergebnisse des „Andockens“ der verschiedenen Steroide an die drei Rezeptoren. Erläuterungen zu den Abbildungen im Text. Abbildung aus (Politowska et al., 2001).



A



B



Oxytocinrezeptor

Jede Kombination aus Steroid und Rezeptor lieferte mehrere Steroidcluster an der Oberfläche des OTR. Allerdings enthielt nur ein Cluster die Steroide in einer Position, die für eine mögliche Bindung an den Rezeptor in Frage kam. An dieser Stelle zwischen TM5 und TM6 kommt es zu einer Anlagerung („Docking“) der Steroide im hydrophoben Transmembranbereich des Rezeptors, wobei sich die Steroide mit ihrer hydrophilen OH-Gruppe zur extrazellulären Seite des Rezeptors und dem aliphatischen Teil in Richtung der Membrandoppelschicht orientieren. Da sich hierbei die Steroide mit geringer Fähigkeit zur Unterstützung der hochaffinen Ligandenbindung des OTR nicht andocken ließen, wurde diese Stelle bereits als mögliche Cholesterinbindungsstelle vorgeschlagen (S. 80, (Gimpl et al., 2000)). Besonders der Unterschied zwischen Cholesterin und Epicholesterol, die sich nur in der Konfiguration ihrer 3-OH-Gruppe unterscheiden, legen eine spezifische Steroid-Rezeptor-Interaktion nahe. 25-Hydroxycholesterol bildet eine Ausnahme, da sich trotz geringer Wirkung auf den OTR eine Reihe von Molekülen in der Bindungstasche anlagerten. Die Moleküle lagerten sich dabei allerdings oft mit ihrer 25-OH-Gruppe zur extrazellulären Seite in diese Tasche ein oder zeigten substantielle Abweichungen von der Lage senkrecht zur Membranebene.

Cholecystokininrezeptor

Wenn die gleichen Steroide an den CCK_BR andockt wurden, ergab sich ein völlig anderes Bild. In der beim OTR ermittelte Bindungsregion konnten keine Steroide angelagert werden. Obwohl es um den Rezeptor einige Cluster von Molekülen gab, konnte hier keine Spezifität der einzelnen Steroide erkannt werden. In diesen Clustern verteilten sich die andockten Steroide willkürlich. Der ausgedehnte Bereich an TM7 ließ keine einheitliche Orientierung der Moleküle erkennen. Dieser gänzlich verschiedene Befund untermauert die fehlende Spezifität des CCK_BR in seiner Interaktion mit Cholesterin.

Mutante

Die Mutante bestand aus dem OTR, in dem vier Aminosäuren durch die entsprechenden Reste des CCK_BR ausgetauscht worden waren (P197R, Y200W, W203L, M296T). In der mutierten Bindungstasche ließen sich keine Steroide mehr andocken. Nur ein Molekül Dehydrocholesterol und eine Reihe 25-Hydroxycholesterol-Moleküle konnten sich hier

anlagern. Die Moleküle waren hier jedoch parallel zur Membranebene angeordnet und ragten etwas aus der Transmembranregion heraus.

Durch den Austausch der Aminosäuren wurde die für den OTR vorgeschlagene Bindungstasche für Cholesterin zwischen TM5 und TM6 also eliminiert. Diese Befunde verstärken die Vermutung einer Cholesterinbindungsstelle in dieser Region.

4.2.5. Spezifische kovalente Markierung des OTR durch ein modifiziertes Fluoreszeinderivat

Zur Bestimmung einer Cholesterinbindungsstelle im OTR wurde eine Methode aufgegriffen, die es ermöglichen sollte, einen fluoreszierenden Farbstoff an einer genau festgelegten Stelle im Rezeptor zu binden (Griffin et al., 1998). Dabei kann ein modifiziertes Fluoreszeinderivat (4',5'-bis(1,3,2-Dithioarsolan-2-yl)fluoreszein, bzw. Flash-EDT₂: Fluoreszein-Arsen-Helix-Binder, bis-EDT) an eine bestimmte Peptidsequenz (CCXXCC) binden und das Protein spezifisch markieren (Abbildung 24).

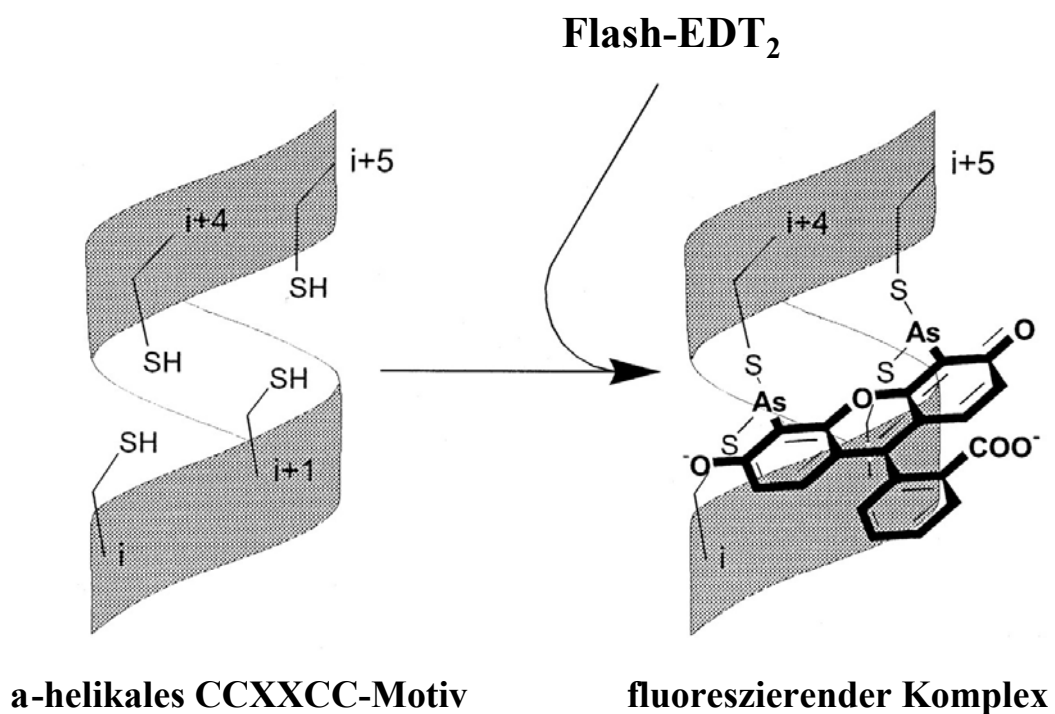


Abbildung 24: Bindung von Flash an die Erkennungssequenz einer α -Helix

Durch Bindung von Flash-EDT₂ an das helikale CCXXCC-Motiv entsteht ein fluoreszierender Komplex. Die Bindung von Flash an das Protein kann durch millimolare Mengen EDT (Ethandithiol) unterdrückt werden. Abbildung aus (Griffin et al., 1998).

Durch die Modifikation von Fluoreszein-4,5-bis-Quecksilberacetat zu Fluoreszein-4',5'-bis-Dithioarsolan kann der nichtfluoreszierende Farbstoff die Plasmamembran lebender Zellen durchdringen und sich an eine spezifische Bindungssequenz anlagern. Die Komplexierung der Arsenatome des Farbstoffs durch die Thiolgruppen von vier Cysteinen des Peptids führt zur Fluoreszenz. Dies bedeutet einen großen Vorteil gegenüber einer Markierung mit anderen Proteinen (GFP, YFP), die bedeutend größer sind. Durch die Komplexität der Bindungssequenz des Proteins ist die Markierung nur an spezifischen Stellen gewährleistet.

Die in der Literatur verwendete Peptidsequenz, eine aus 17 Aminosäuren bestehende α -Helix (WEAAAREACCRECCARA), wurde über eine Adapterligation auf DNA-Ebene in die Sequenz des OTR eingefügt. Durch die Modifikation des Fluoreszeinderivates und dessen Bindung an das Protein emittiert es Fluoreszenz, die dann zu Energieübertragungen (FRET) mit anderen Farbstoffen benutzt werden kann. In Verbindung mit einem fluoreszierenden Cholesterinderivat sollte es mit FRET-Messungen möglich sein, Abstände zwischen Cholesterin und Fluoreszeinfarbstoff zu messen, um dadurch mögliche Cholesterinbindungsstellen im OTR zu lokalisieren.

Synthese

Die Synthese wurde wie beschrieben durchgeführt (S. 59) und dünnschichtchromatographisch verfolgt. Das entstandene Produkt hatte einen Rf-Wert $\approx 0,39$ und die entsprechende Fraktion wurde durch präparative TLC im System Chloroform-Ethanol 95:5 (v/v) isoliert. Die Identifikation des Produkts erfolgte durch Massenspektrometrie. Die Fluoreszenz des Farbstoffs wird zunächst durch Komplexierung des Arsens durch die beiden Dithiole verhindert, bis diese durch die Thiolgruppen der Cysteine des Peptids verdrängt werden. Das Bindungsgleichgewicht Flash-Peptid bzw. Flash-Protein liegt dabei im Bereich weniger Mikromole. Die Fluoreszenz kann durch Zugabe von millimolaren Mengen Dithioethanols wieder unterdrückt werden.

Klonierung des Vektors pfmOTFlash

Das Flash-Epitop wurde über eine Adapterligation eingefügt (S. 45). Der Adapter enthielt an beiden Enden eine *EcoRI*-Schnittstelle. Das mit *EcoRI* geschnittene Plasmid pfmOTRHis_Eco wurde mit den Adapteroligonukleotiden Flash_Eco_1 und Flash_Eco_2 ligiert. Durch Restriktionsverdau mit *HindIII* wurde die richtige Orientierung des Inserts

überprüft. Die korrekte Sequenz des Adapters und die Integrität der Klonierungsstellen wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft.

Stabile Expression von pfmOTFlash in HEK293-Zellen

Durch Calciumphosphat-vermittelte Transfektion von HEK293-Zellen mit dem pfmOTFlash-Vektor und anschließende Selektion mit 1000 $\mu\text{g/ml}$ G418 wurde eine stabile Zelllinie generiert (HEKOTFlash). In Radioligandenbindungstests konnte eine Expression des Konstrukts mit einer Rezeptordichte von $B_{\text{max}} \approx 0,5 \text{ pmol/mg}$ Membranprotein (in verschiedenen Experimenten wurde ein $K_D = 1\text{-}5 \text{ nM}$ ermittelt) festgestellt werden. Die Einfügung der 14 Aminosäuren im Bereich der dritten intrazellulären Schleife übte somit keinen negativen Einfluss auf die Ligandenbindung des Rezeptors aus.

Untersuchungen zur Bindung von Flash an HEKOTFlash-Zellen

HEKOTFlash-Zellen wurden auf Deckgläschen bis zu ca. 50 % Konfluenz kultiviert. Kurz vor der Mikroskopie wurden die Deckgläschen in temperierbare Kammern eingesetzt und bei 37 °C in Mikroskopiepuffer beobachtet.

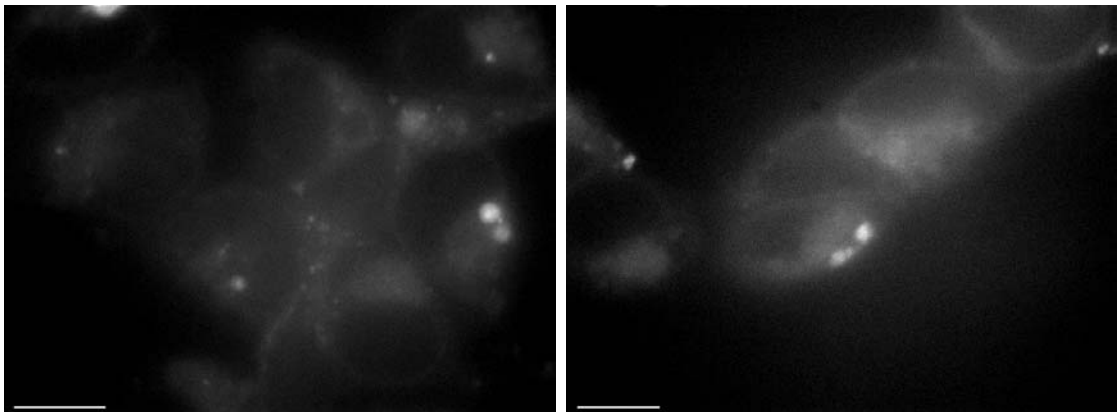


Abbildung 25: Mikroskopie von HEKOTFlash-Zellen nach Inkubation mit Flash-EDT₂

HEKOTFlash-Zellen (A) und als Kontrolle HEKOTRHis-Zellen (B) wurden mit 10 μM Flash-EDT₂ inkubiert. Auch nach über 30 Minuten konnte keine spezifische Fluoreszenz bei den HEKOTFlash-Zellen beobachtet werden. Die auftretende Markierung kann durch Reste des Fluoreszein-Ausgangsfarbstoffs erklärt werden. Es bestand zu keiner Zeit während der Beobachtung ein Unterschied zu den Kontrollzellen. Größe der Balken 5 μm

Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, zeigten die transfizierten HEKOTFlash-Zellen keinen Unterschied zu den Kontrollzellen (HEKOTRHis). In den Zellen ist keine spezifische Fluoreszenz der Plasmamembran zu sehen, die auftretende Fluoreszenz ist auf Reste des Ausgangsfarbstoffes zurückzuführen. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an Flash-EDT₂ inkubiert, beginnend bei 1 µM. Die Konzentration wurde bis auf 100 µM erhöht, ohne eine spezifische Markierung der Zellen zu beobachten. Auch durch Zugabe eines Überschusses an Ethandithiol (1 mM), welches die spezifische Fluoreszenz von Flash verhindern soll, war keine Veränderung der Zellen zu beobachten. Ein Unterschied zu Kontrollzellen wurde bei keiner Konzentration und zu keiner Zeit während der Beobachtung festgestellt.

Nach Zugabe von Flash-EDT₂ zu Membransuspensionen aus HEKOTFlash-Zellen wurde selbst nach über einer Stunde kein Anstieg der Fluoreszenz beobachtet (Ergebnisse nicht gezeigt). Somit konnte weder an lebenden Zellen noch an Membranen eine spezifische Flash-Markierung erreicht werden.

Dieses in der Literatur beschriebene System einer spezifischen Markierung einer Proteinsequenz durch einen derivatisierten Fluoreszeinfarbstoff konnte weder in eigenen Experimenten erreicht werden, noch liegen aus der Literatur weitere Beispiele einer positiven Markierung von Proteinen mit diesem System vor. Zusammengenommen legen diese Befunde den Schluss nahe, dass eine spezifische Markierung von Proteinen mit diesem System wenig erfolgversprechend ist.

4.3. Mikroskopische Untersuchungen zur Aufnahme und Transport von Cholesterin in der Zelle

Das meiste Wissen über den intrazellulären Transport des Cholesterins stammt aus biochemischen Studien mit radiomarkiertem Cholesterin oder dessen Vorläufer. Die Verteilung des Cholesterins in der Zelle wird meist durch die Verwendung des Cholesterin-bindenden Fluorochroms Filipin untersucht. Filipin ist jedoch cytotoxisch und kann nur an fixierten Präparaten eingesetzt werden. Eine Untersuchung der Bewegung an lebenden Zellen ist somit nicht möglich. Unklar ist auch, ob die Markierung durch Filipin die tatsächliche Verteilung des Cholesterins widerspiegelt, da es durch die Fixierung besonders zu intrazellulären Artefakten kommen kann (Pelletier and Vitale, 1994; Steer et al., 1984).

Durch die Synthese eines fluoreszierenden Cholesterinderivats ergibt sich die Möglichkeit, die Transportwege und die Verteilung des Cholesterins in lebenden Zellen zu verfolgen. Um eine Verwendung als Cholesterinanalogen zu erreichen, muss die Substanz sich sowohl wie natürliches Cholesterin verhalten, als auch in ihren spektroskopischen Eigenschaften für die Anwendung in lebenden Systemen geeignet sein. In der Literatur gibt es nur wenige Beispiele, die diesen Anforderungen annähernd entsprechen. Dazu gehören Dehydroergosterol, ein natürliches fluoreszierendes Cholesterinderivat, jedoch mit unvorteilhaften spektroskopischen Eigenschaften durch Anregung im UV-Bereich und geringer Quantenausbeute (Fischer et al., 1984; Fischer et al., 1985; Rogers et al., 1979; Schroeder et al., 1995). Durch chemische Derivatisierung des Cholesterins wurde eine Reihe weitere Analoga synthetisiert (Craig et al., 1981; Grechishnikova et al., 1999; Kao et al., 1978; Kao et al., 1986). Angriffspunkte für alle diese Synthesen waren jedoch entweder die aliphatische Seitenkette oder die 3-OH-Gruppe, die beide für die strukturellen Eigenschaften des Cholesterins und sein natürliches Verhalten wichtig sind (S. 15).

Schon im Rahmen meiner Diplomarbeit synthetisierte ich ein fluoreszierendes Cholesterinderivat, das mit seinen spektroskopischen Eigenschaften für eine Verfolgung in lebenden Zellen geeignet schien. Ich konnte zudem zeigen, dass es einen positiven Einfluss auf die Ligandenbindung des OTR besitzt (Wiegand, 1998). Dies machte es zu einem guten Kandidaten für eine Verwendung als Cholesterinanalogen in der Fluoreszenzmikroskopie.

4.3.1. Synthese und Eigenschaften eines fluoreszierenden Cholesterinderivats

Zur Synthese eines fluoreszierenden Cholesterinderivats wurde das dem Cholesterin sehr ähnliche Cholestanol verwendet. Dieses Steroid besitzt keine Doppelbindung zwischen C5 und C6. Für die Derivatisierung wurde ein Cholestanol mit einer Ketofunktion an Position 6 eingesetzt. In dieser Position wurde es mit einem fluoreszierenden Dansylhydrazin verknüpft. Durch die Einführung einer photoreaktiven Azogruppe in das Cholestanolmolekül konnte in mehreren Untersuchungen gezeigt werden, dass diese Position für die Untersuchung von Cholesterin-Protein-Interaktionen geeignet ist (Burger, 2000; Thiele et al., 2000). Die Dansylgruppe wurde verwendet, da sie eine der kleinsten fluoreszierenden Gruppen darstellt, deren Fluoreszenzeigenschaften für Untersuchungen an lebenden Systemen geeignet sind (s.unten). Die Verwendung als Hydrazin ermöglicht eine

einfache Verknüpfung mit der Ketogruppe des Cholestanols. Das resultierende Cholestanol-6-Dansylhydrazon wurde als Fluochol bezeichnet, seine Struktur ist in Abbildung 10 (S. 58) zu sehen.

Das Fluoreszenzspektrum von Fluochol (Abbildung 26) zeigt einen breiten Anregungspeak von 290 bis 420. In den meisten Experimenten erfolgte die Anregung auf der langwelligen Seite des Peaks bei 390 nm, um eine Schädigung der Zellen durch energiereiche UV-Strahlung zu vermeiden. Ausserdem konnte dadurch das Ausbleichen des Farbstoffs reduziert werden, was eine längere Beobachtungszeit ermöglichte. Die Fluoreszenzemission von Fluochol ist stark abhängig von der Polarität der Umgebung (Abbildung 26 B). Mit steigender Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels nimmt die Emission des Fluochols ab und die Emissionsspektren zeigen eine Rotverschiebung.

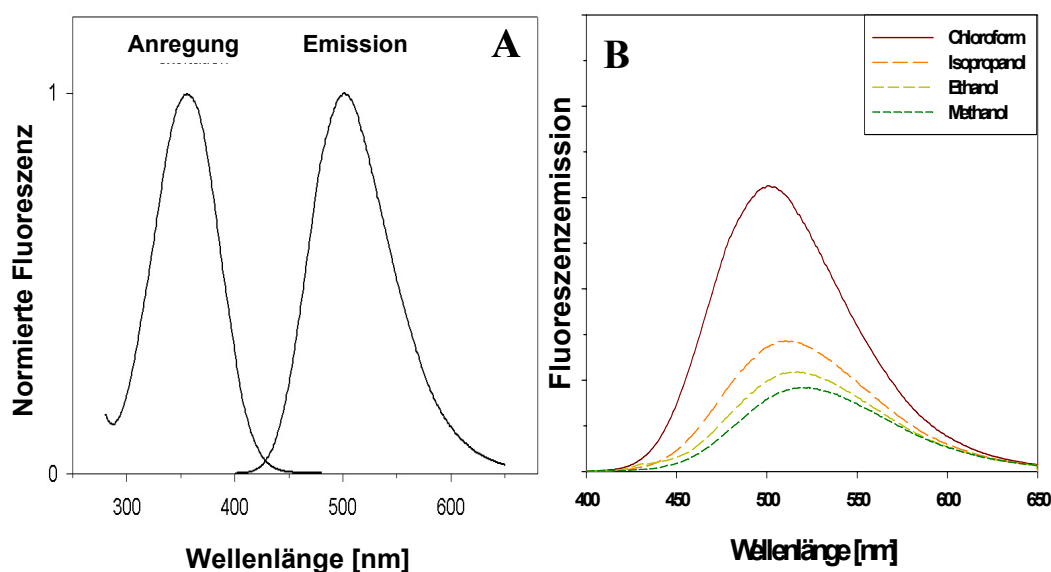


Abbildung 26: Anregungs- und Emissionsspektrum von Fluochol (A) und Emissionsspektren in verschiedenen Lösungsmitteln (B)

A Fluoreszenzanregung und –emission von Fluochol in Chloroform.

B Die Anregung des Fluochol erfolgte bei 360 nm, alle Messungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

4.3.2. Vergleich der Veresterungskinetiken von Fluochol und [³H]-Cholesterin

In Säugern wird freies Cholesterin durch das Enzym Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) verestert. Da freies Cholesterin für die Zellen toxisch ist, wird es mit langkettigen Fettsäuren verknüpft und in intrazellulären Lipidtröpfchen gespeichert. Bisher wurden zwei ACAT-Gene (ACAT1 und ACAT2) identifiziert (Anderson et al., 1998; Cases et al., 1998; Chang et al., 1993; Oelkers et al., 1998). Beide Enzyme sind wahrscheinlich an der Speicherung der Cholesterinester in Lipidtröpfchen, Aufnahme des Cholesterins aus der Nahrung und der Bildung von Lipoproteinen beteiligt (Übersichtsartikel (Buhman et al., 2000; Chang et al., 1997; Chang et al., 2000; Joyce et al., 1999; Sturley, 1997).

Um die Verwendung von Fluochol als geeignetes Cholesterinanalogon zu prüfen, wurde dessen Veresterung durch ACAT *in vivo* untersucht. Als Vergleich diente dabei radioaktiv markiertes Cholesterin. Die Zellen wurden bei diesen Experimenten mit Steroid/M β CD-Komplexen inkubiert, und die Kinetik der Veresterung wurde über 24 h gemessen (Abbildung 27). Die Kinetik der Veresterung gleicht über den angegebenen Zeitraum derjenigen des radioaktiven Cholesterins. Nach 24 h liegen beide Cholesterinanaloga zu etwa 45 % verestert in der Zelle vor. Bei längerer Inkubation der Zellen bis zu 48 h erhöht sich der Anteil veresterten Fluochols (Ergebnisse nicht gezeigt). Bei gleichzeitiger Zugabe des ACAT-Inhibitors 58-035 (400 ng/ml) kommt es zu keiner Veresterung der zugegebenen Steroide.

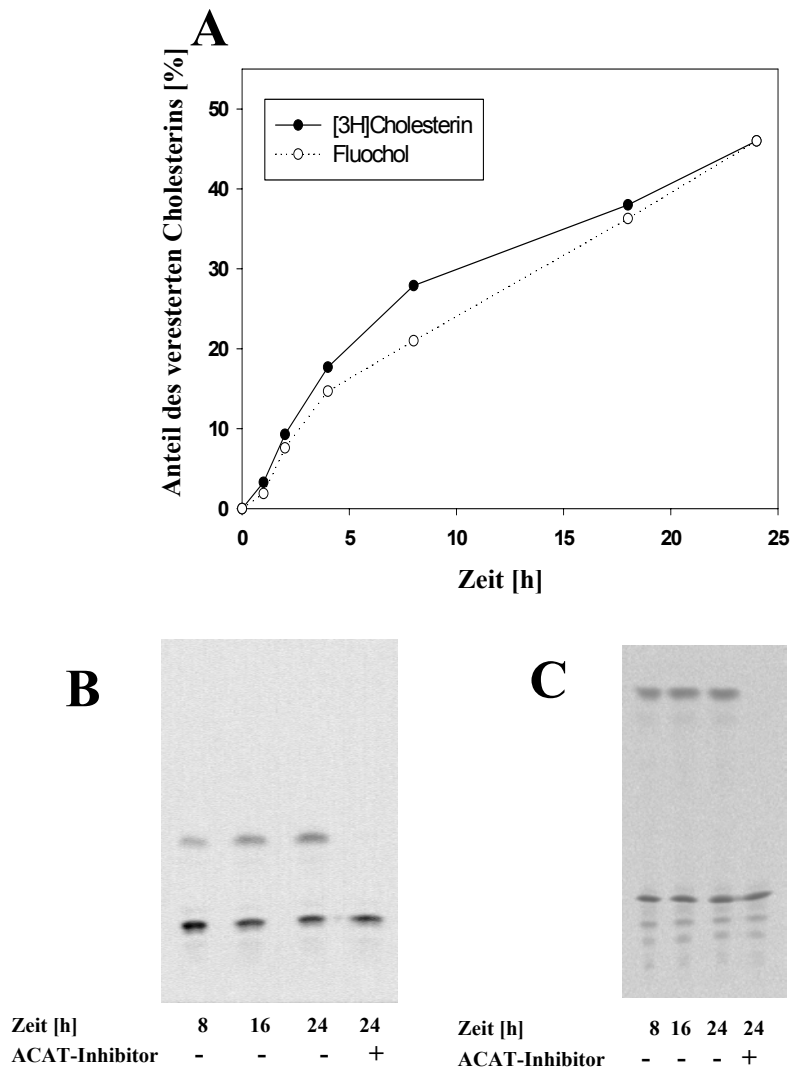


Abbildung 27: Veresterung von Fluochol und [³H]Cholesterin durch ACAT in CHO-Zellen

CHO-Zellen wurden 1 h mit Fluochol (7,5 μ M) und [³H]Cholesterin (24 μ M) inkubiert, gewaschen und in Kulturmedium weiterinkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und die Lipide extrahiert. Die Auftrennung der Lipide und die Quantifizierung sind im Methodenteil beschrieben (S. 60). **A** Die Veresterung von [³H]Cholesterin und Fluochol wurde über einen Zeitraum von 24 h verglichen. Der Anteil des veresterten Cholesterins ist in Prozent des Gesamtcholesterins (frei und verestert) angegeben. **B** Fluoreszenzaufnahme einer TLC nach 8, 16 und 24 h Inkubation mit und ohne ACAT-Inhibitor 58-035. Die oberen und unteren Banden entsprechen jeweils verestertem und freiem Fluochol. **C** Veresterung von [³H]Cholesterin im gleichen Experiment wie B.

Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Fluochol ein Substrat für ACAT ist und mit der gleichen Geschwindigkeit verestert wird wie Cholesterin. Durch den Einsatz eines spezifischen Inhibitors (Ross et al., 1984) lässt sich die Veresterung verhindern.

4.3.3. Vergleich des Efflux von Fluochol und [³H]Cholesterin

Zelluläres Cholesterin existiert in mehreren variablen zellulären Pools sowohl in der Plasmamembran als auch in intrazellulären Membranen (Schroeder et al., 1996). Der erste Schritt im reversen Cholesterintransport ist der Efflux von freiem Cholesterin aus diesen Pools zu einem extrazellulären Akzeptor (Rothblat et al., 1999). Als physiologische Akzeptoren für die Cholesterinaufnahme im Organismus fungieren die HDLs (s. S. 17).

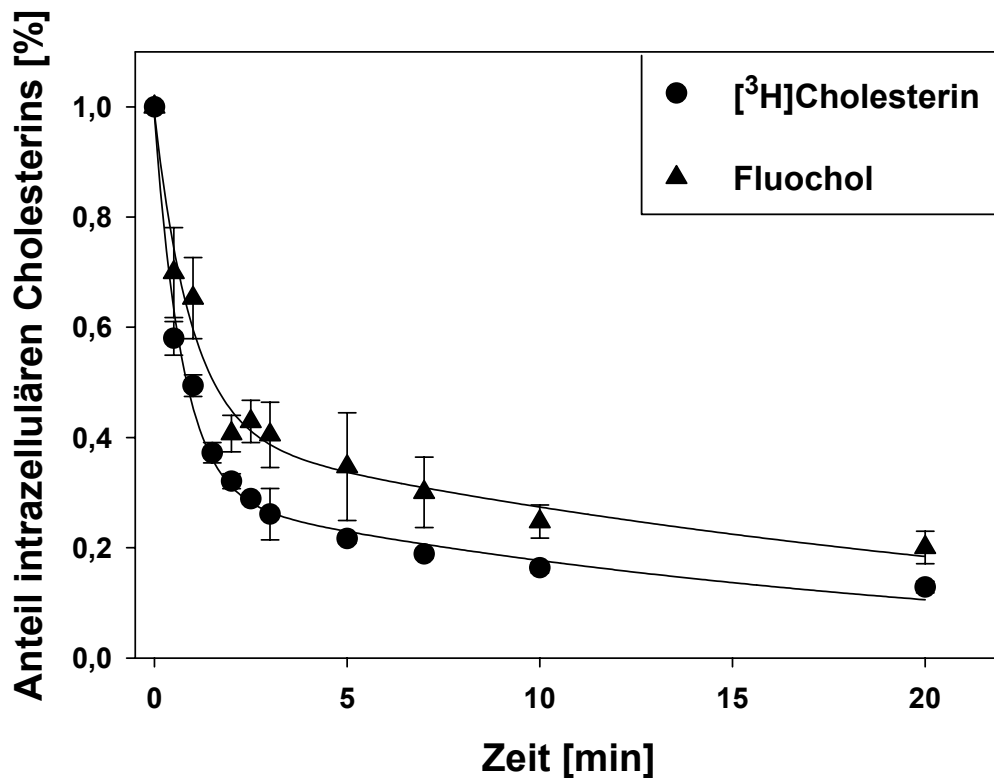


Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf des Efflux von Fluochol und [³H]Cholesterin aus CHO-Zellen

Die Zellen wurden für 18 h mit Fluochol, [³H]Cholesterin und ACAT-Inhibitor beladen und weitere 2 h in Gegenwart des ACAT-Inhibitors weiterinkubiert. Nach Ablösen mit Trypsin, Waschen und Resuspendieren der Zellen in Puffer wurde der Efflux zu M β CD untersucht (S. 61). Der Efflux von Fluochol und [³H]Cholesterin ist dargestellt als Anteil des Steroids, das (im Vergleich zu t = 0) zum jeweiligen Zeitpunkt in der Zelle noch zurückgeblieben ist. Die Werte wurden einer Kurve für biexponentiellen Zerfall angeglichen ($r^2=0,9839$) (S. 61). Die Auswertung der Kurvenanpassung ist in Tabelle 3 zu sehen. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung eines repräsentativen Experiments mit Dreifachbestimmung.

In diesem Experiment wurde M β CD für die Aufnahme des zellulären Cholesterins eingesetzt, da Cyclodextrine effizientere Akzeptoren darstellen (Rothblat et al., 1999;

Yancey et al., 1996). Für die Untersuchung des Efflux wurden auch hier Fluochol und tritiiertes Cholesterin im Experiment gleichzeitig untersucht (vergl. Kap. 4.3.2). CHO-Zellen wurden für 18 h mit Fluochol und tritiiertem Cholesterin in Gegenwart eines ACAT-Inhibitors beladen und der Efflux zu M β CD gemessen. Die Verwendung eines ACAT-Inhibitors gewährleistete, dass sich eine Verteilung der Steroide in der gesamten Zelle einstellt. Die M β CD-Lösung wurde teilweise mit Cholesterin gesättigt, um eine Depletion des zellulären Cholesterins zu verhindern und den Austausch der Steroide zu messen (s. Methode S. 61). Der Großteil der beiden Steroide, mit denen die Zellen vorher beladen worden waren, konnte in diesen Experimenten durch den Akzeptor M β CD wieder entfernt werden. Bei Verwendung des effizienten Cholesterinakzeptors M β CD wurden zwei kinetische Cholesterin-pools ermittelt. Das Auftreten zweier unterscheidbarer kinetischer Pools wurde von Yancey *et al.* bereits beschrieben (Yancey et al., 1996). Abbildung 28 zeigt den zeitlichen Verlauf des Efflux von Fluochol und tritiiertem Cholesterin. Beide Kurven zeigen einen ähnlichen Verlauf und die Ausbildung der zwei kinetischen Pools. Anzumerken bleibt, dass die Größe der beiden Pools in den Experimenten stark variierte. Die Halbwertszeiten für beide Pools blieben dabei aber konstant.

Tabelle 3: Vergleich der kinetischen Pools des Cholesterinefflux

Fluochol und [^3H]-Cholesterin bilden zwei kinetische Pools, aus denen sie mit Cyclodextrinen extrahiert werden können (siehe Text).

	schneller Pool		langsamer Pool	
	Halbwertszeit	Größe [%]	Halbwertszeit	Größe [%]
Fluochol	39 s \pm 11 s	68,9 \pm 4,1	3 min 39 s \pm 19 s	29,6 \pm 3,3
[^3H]-Cholesterol	22 s \pm 8 s	58,1 \pm 5,1	3 min 55 s \pm 20 s	40,7 \pm 4,5

4.3.4. Aufnahme und Transport von Fluochol in der Zelle

Aufnahme und Transport des Fluochols wurden in verschiedenen Zelllinien untersucht. Um den Weg des Fluochols in der Zelle zu beobachten, wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und zur Beobachtung im Mikroskop in temperierbare Kammern

eingesetzt (genaue Angaben s. S. 62). Die Beladung der Zellen erfolgte durch Cyclodextrinkomplexe, die dem Kulturmedium oder dem Puffer zugesetzt wurden (Endkonzentration 1-5 μM). Die Aufnahme und die Verteilung des Fluochols sind in Abbildung 29 zu sehen.

Nach Inkubation von Zellen bei tiefen Temperaturen (0 – 4 °C) war eine zunehmende Fluoreszenz in der Plasmamembran zu beobachten. Zellkompartimente innerhalb der Zellen zeigten dabei fast keine Fluoreszenz (Abbildung 29 A). Bei steigenden Temperaturen wurde die Fluoreszenz in der Plasmamembran stärker und Fluochol konnte jetzt auch im ER nachgewiesen werden (B und D).

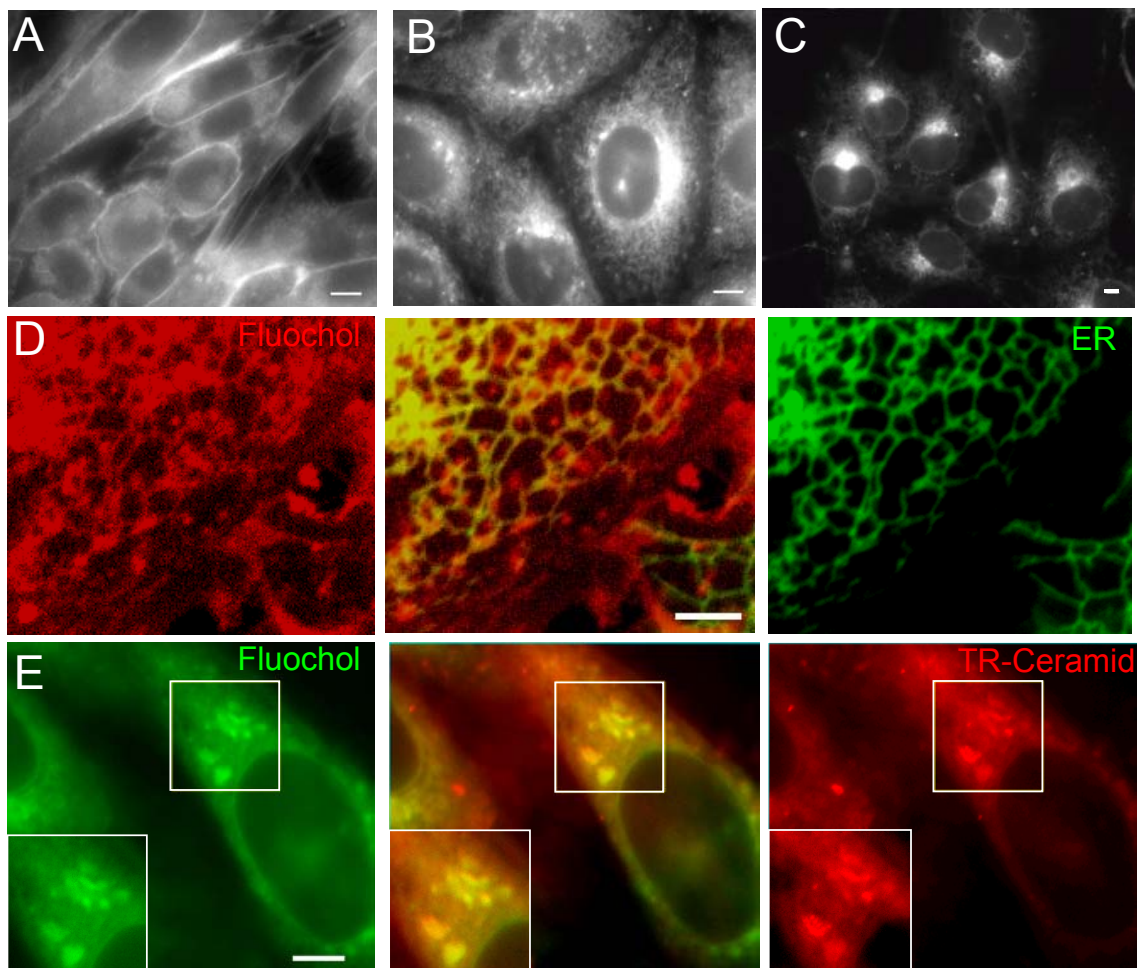


Abbildung 29: Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von Fluochol in CHO-Zellen

CHO-Zellen (A, B, D, E) bzw. COS-7-Zellen (C) wurden bei 4 °C für 10 Minuten mit Fluochol-M β CD beladen (5 μM) und bei 37 °C verfolgt: 0 min (A), 20 min (B, D), 30 min (C, E). Bild D zeigt die Kolokalisierung (Mitte) von Fluochol (rot) mit dem ER-Marker DIOC₆ (grün). Bild E zeigt die Kolokalisierung (Mitte) von Fluochol (grün) mit dem ER/trans-Golgi-Marker BODIPY-TR-Ceramid (rot). Die Größe der Balken beträgt 5 μm (A-C, E) bzw. 3 μm (D).

Um den Transport des Fluochols in den Zellen zu beobachten, wurden die Zellen für 10 Minuten bei 4 °C vorinkubiert, gewaschen und in Mikroskopiepuffer bei 37 °C verfolgt. Der Transport von Fluochol in das ER erfolgte in CHO-Zellen sehr schnell. Schon bei frühestmöglichen Aufnahmen nach der Inkubation der Zellen konnte Fluochol im ER detektiert werden (die Temperaturstabilisierung und die Einstellung des Fokus dauerten etwa eine Minute). Kolokalisierungen mit dem ER-Marker DIOC₆ zeigten, dass innerhalb von 10-20 Minuten das gesamte ER-Netzwerk markiert wurde (Abbildung 29 D). Nach weiteren 10-20 Minuten konnte Fluochol bei vielen der CHO-Zellen im Trans-Golgi-Netzwerk beobachtet werden. Der Anteil der Zellen, der dabei mit dem Trans-Golgi-Marker BODIPY-TR-C5-Ceramid (Caloca et al., 2001) kolokalisierte lag bei 20-40 % (Abbildung 29 E). Der Aufenthalt des Fluochols im Golgi variierte allerdings erheblich zwischen den verschiedenen Zelllinien. Besonders COS-7-Zellen zeigten eine starke transiente Markierung des Golgis in über 60 % aller Zellen (Abbildung 29 C).

Fluochol wurde auch in vesikulären und tubulären Strukturen beobachtet (Abbildung 29 D, Abbildung 32 A und B). Die ersten fluoreszierenden vesikulären Strukturen waren bereits nach wenigen Minuten zu sehen. Hierbei könnte es sich um vesikuläre Transportvesikel des ER und/oder Golgi handeln, möglicherweise auch endocytotische Vesikel (durch konstitutive Endocytose). Nach Markierung mit einem Lysosensor, der saure Kompartimente anfärbt, konnten nur wenige Vesikel als Lysosomen/späte Endosomen identifiziert werden (Abbildung 30).

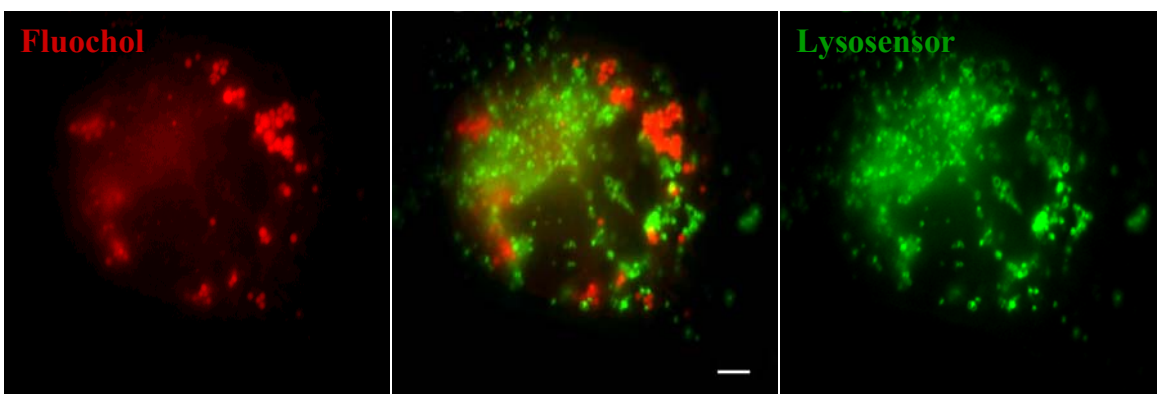


Abbildung 30: Kolokalisierung von Fluochol mit Lysosomen

CHO-Zellen wurde über Nacht mit 2 mM Fluochol inkubiert (links) und 5 Minuten mit Lysosensor (rechts, finale Konzentration 12,5 µM). Die Kolokalisierung (Mitte) zeigt keinen Aufenthalt von Fluochol in Lysosomen oder späten Endosomen. Balken 5 µM.

Um den Influx des Fluochols weiter zu charakterisieren, wurde die Energieabhängigkeit dieses Transports untersucht. Dazu wurden die Zellen vor der Beladung mit Fluochol mit Natriumazid (5 mM) und Deoxyglukose (50 mM) inkubiert. In den so behandelten Zellen konnten jedoch keine Unterschiede in Aufnahme und Transport festgestellt werden. Die Markierung der einzelnen Zellkompartimente erfolgte im gleichen Zeitrahmen wie in den vorherigen Untersuchungen. Der Influx des Fluochols in das ER ist somit energieunabhängig.

4.3.5. Speicherung von Fluochol in Lipidtröpfchen

Nach 1-2 h war eine beginnende Verteilung des Fluochols in Tröpfchen, in denen die Zellen überschüssiges Cholesterin ablagern, zu beobachten (Abbildung 31 A). Mit fortschreitender Inkubationsdauer nahm der Anteil dieser Strukturen an der Gesamtfluoreszenz stetig zu. Die Kolokalisierung dieser Strukturen mit dem Marker Nile Red zeigt, dass es sich dabei um die Lipidtröpfchen handelt, in denen die Zellen verestertes Cholesterin speichern (Abbildung 32 C).

Um den Einfluss von ACAT auf die Verteilung des Fluochols zu untersuchen, wurden die Zellen gleichzeitig mit dem ACAT-Inhibitor 58-035 inkubiert.

Abbildung 31 B zeigt, dass die Inhibierung von ACAT die Veresterung des Fluochols verhinderte. Gleichzeitig wurde die Lokalisierung des Fluochols in Lipidtröpfchen unterdrückt. Selbst nach 24 h konnte keine Verteilung in Tröpfchen beobachtet werden. Stattdessen kam es zu einer verstärkten Verteilung im ER-Netzwerk in der gesamten Zelle. Um die Möglichkeit eines unspezifischen Einflusses des Inhibitors auf die Verteilung von Fluochol auszuschließen, wurde das Verteilungsmuster auch in AC29-Zellen untersucht (Abbildung 31 D). Diese Zelllinie wurde von Cadigan *et al.* aus CHO-Zellen generiert und besitzt weniger als 1 % ACAT-Aktivität (Cadigan *et al.*, 1988). Auch in diesen Zellen kam es zur Verteilung von Fluochol im ER-Netzwerk der Zelle, wohingegen keine Fluoreszenz in Lipidtröpfchen detektiert werden konnte.

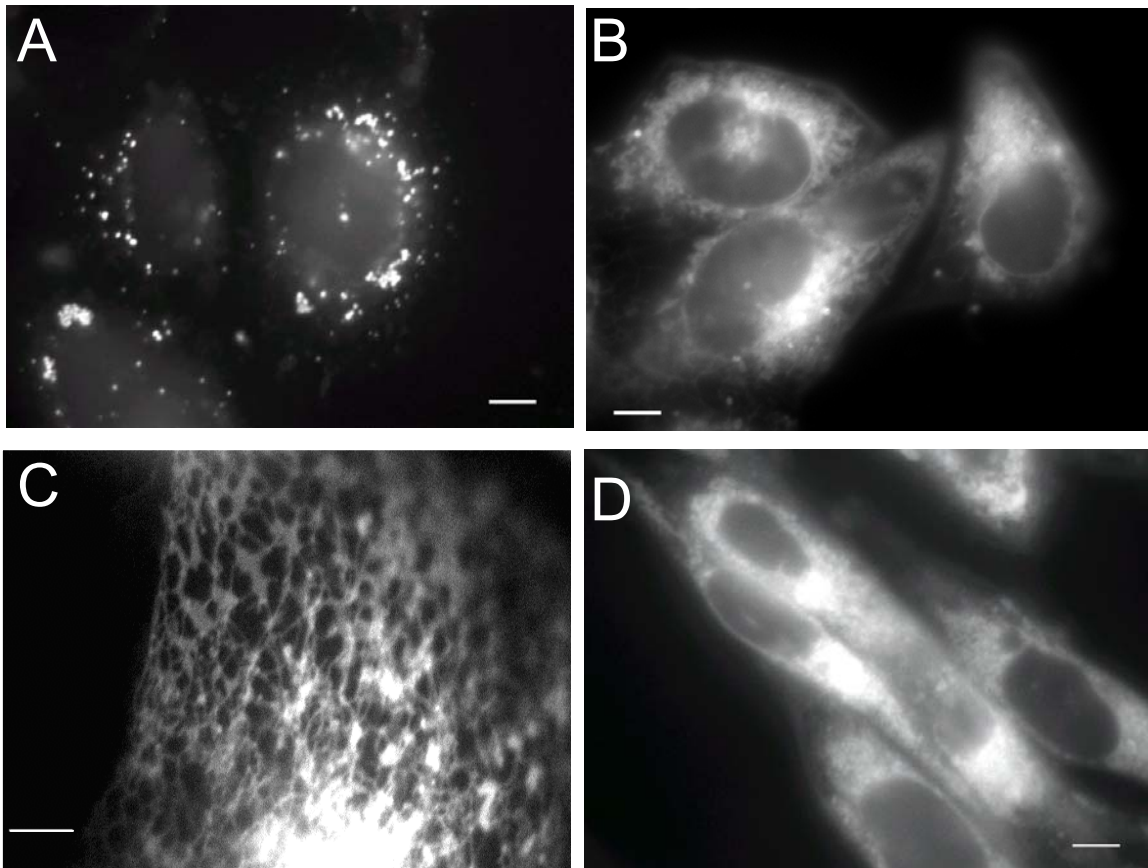
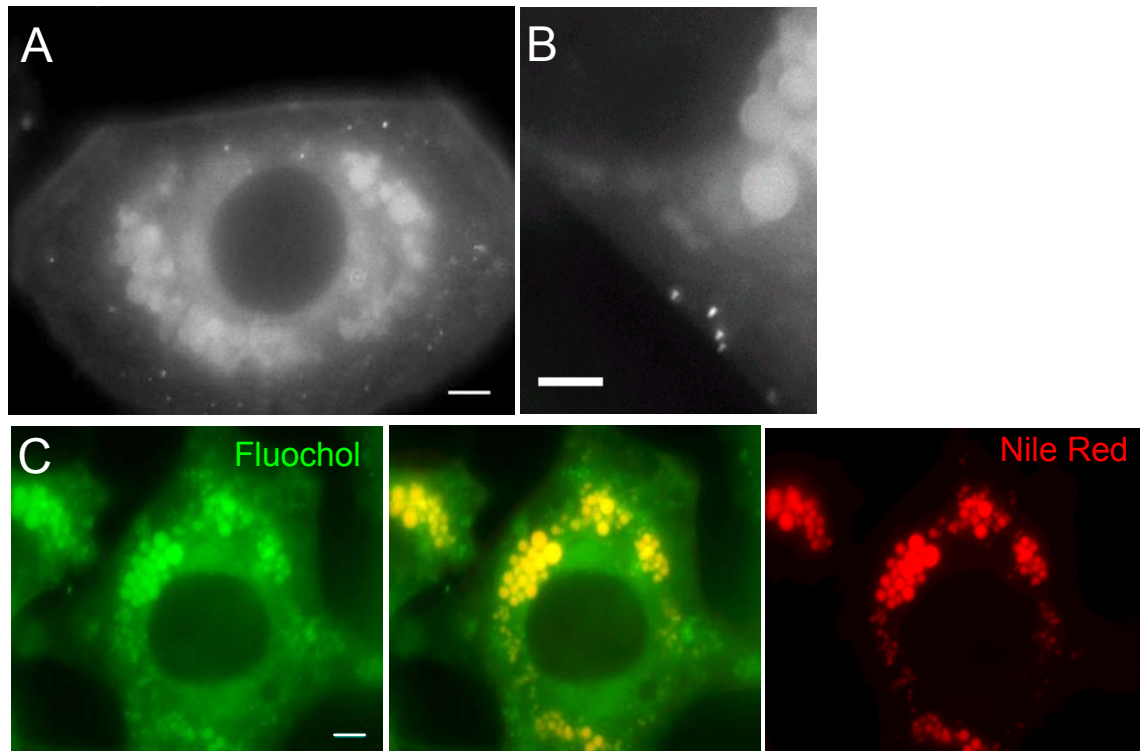


Abbildung 31: Einfluss der ACAT-Aktivität auf die Verteilung von Fluochol

CHO-Zellen (A-C) bzw. ACAT-defiziente AC29-Zellen (D) wurden für 10 Minuten bei 37 °C mit Fluochol/M β CD (3 μ M) beladen und 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen blieben unbehandelt (A, D) oder wurden vorher 12 h mit dem ACAT-Inhibitor 58-035 inkubiert (B, C). Die Größe der Balken beträgt 5 μ m.

Die Lokalisierung des Fluochols in den Tröpfchen wurde auch in Zellen untersucht, in denen diese Speicher schon in hohem Umfang vorlagen. Dazu wurden 3T3 Fibroblasten zur Differenzierung zu Präadipozyten (Vorläufer von Fettzellen) angeregt (s. Methodenteil S. 50). Nach 3-4 Tagen Inkubation mit Insulin und Dexamethason beginnen in den Fibroblasten sich diese Lipidspeicherkompartimente zu entwickeln. Bei Inkubation mit Fluochol war ein rascher Transport vom ER in die Tröpfchen zu beobachten. Schon nach zehnmütiger Inkubation bei 19 °C erfolgte eine starke Markierung der Strukturen (Abbildung 32 A und B).

**Abbildung 32: Speicherung des Fluochols in Lipidtröpfchen**

Differenzierte 3T3-L1-Fibroblasten wurden für 20 Minuten bei 19 °C (A, B) oder für 40 Minuten bei 37 °C (C) mit Fluochol/M β CD (3 μ M) inkubiert. Bild C zeigt die Kolo-kalisierung von Fluochol (grün) mit dem Marker der Lipidtröpfchen Nile Red (rot). Die Größe der Balken beträgt 5 μ m (A, C) bzw. 3 μ m (B).

5. Diskussion

5.1. Cholesterinabhängigkeit der Neurohypophysenhormone

Es existieren eine Reihe von Proteinen, deren Eigenschaften durch Cholesterin reguliert werden. Auch für viele GPCRs sind in den letzten Jahren Wechselwirkungen mit Cholesterin bekannt geworden. Umfangreiche Untersuchungen am OTR zeigten, dass dieser Rezeptor eine Interaktion mit Cholesterin eingeht, die ganz spezifisch von den strukturellen Eigenschaften des Cholesterinmoleküls abhängt. Der Rezeptor reagiert sowohl empfindlich gegenüber Veränderungen des Cholesteringehalts der Plasmamembran, als auch auf den Ersatz des Cholesterins durch andere Steroide. Die strukturellen Anforderungen an die Steroide für eine Stabilisierung der hochaffinen Ligandenbindung des OTR sind in Abbildung 6 (S. 23) in einem Modell zusammengefasst. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei der spezifischen Wechselwirkung mit Cholesterin um ein allgemeingültiges Prinzip in der Unterfamilie der Rezeptoren der Neurohypophysenhormone handelt. Hier zeigten sich sowohl in den Experimenten mit Cholesterinoxidase, als auch bei der Behandlung mit Steroid-Cyclodextrin-Komplexen (durch Diplom-Biologe J. Reitz, Ergebnisse nicht gezeigt), dass die Vasopressinrezeptoren sich durch Cholesterin in ihrer Ligandenbindung in der gleichen Weise beeinflussen lassen wie der OTR.

Bei Untersuchungen zur Expression des humanen μ -Opiatrezeptors in Hefe beobachteten Lagane *et al.*, dass durch Ergosterol, dem natürlichen Membransteroid der Hefen, der Rezeptor in einem niederaffinen Bindungszustand gehalten wird. (Lagane et al., 2000). Erst der Ersatz des Ergosterols durch Cholesterin wandelte den Rezeptor in einen hochaffinen Zustand um. In Untersuchungen der Fluoreszenzanisotropie der Membranen zeigten beide Steroide keine Unterschiede, worauf die Autoren einen Einfluss der Membranfluidität auf die Ligandenbindung ausschlossen.

Pang *et al.* führten Experimente mit dem Galaninrezeptor 2 (GalR2) durch, in denen sie auch für diesen Rezeptor eine spezifische Interaktion mit Cholesterin nachweisen konnten (Pang et al., 1999). Nach Wiederanreicherung von Cholesterin-abgereicherten Membranen mit verschiedenen Steroiden (5-Cholesten, Pregnenolon, 4-Cholesten-3-on, 5-Cholesten-3-on) wurde deutlich, dass für die Spezifität der Rezeptor-Steroid-Interaktion Unterschiede zwischen OTR und GalR2 bestehen. Das Steroid 5-Cholesten-3-on, nicht aber

4-Cholesten-3-on, konnte die Ligandenbindung des GalR2 wiederherstellen. Dies bedeutet, dass bei diesem Rezeptor im Gegensatz zum OTR (Klein et al., 1995b) die 3 β -Hydroxylfunktion des Cholesterins durch eine 3-Ketofunktion substituiert werden darf, ohne dass die Ligandenbindung beeinträchtigt wird. Die Δ^5 -Doppelbindung im Ringsystem darf hingegen nicht durch eine Δ^4 -Doppelbindung ersetzt werden. Ähnlich wie der OT-Rezeptor benötigt der GalR2 wahrscheinlich die aliphatische Seitenkette des Cholesterins, da Pregnenolon ein inaktives Steroid darstellt.

Zwar konnte bisher für mehrere GPCRs eine spezifische Interaktion mit Cholesterin gezeigt werden, jedoch sind die strukturellen Anforderungen an Cholesterin nur für den OTR ausführlich untersucht (Gimpl et al., 1997). Dennoch lässt sich vermuten, dass neben der Oxytocin-Vasopressin-Rezeptorfamilie, deren Cholesterinabhängigkeit in dieser Arbeit gezeigt wurde, auch andere GPCRs in ihrer Ligandenbindung von Cholesterin ganz spezifisch beeinflusst werden.

Was die physiologische Bedeutung dieser Interaktion anbetrifft, so lassen sich vorerst nur Vermutungen anstellen. Cholesterinreiche Mikrodomänen in der Plasmamembran spielen aller Wahrscheinlichkeit nach eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung extrazellulärer Hormonsignale. Die Beteiligung von Caveolae und „Rafts“ an der Signaltransduktion konnte gezeigt werden (Simons and Ikonen, 1997; Simons and Toomre, 2000). Aufgrund ihrer Wechselwirkung mit Cholesterin ist es möglich, dass nur die Rezeptoren in den cholesterinreichen Domänen genügend Ligandenaffinität besitzen, um für eine Vermittlung des extrazellulären Signals bereitzustehen. Rezeptoren in cholesterinarmen Domänen könnten ihre Liganden nur mit niedriger Affinität binden und würden nur als Reservoir für bereits besetzte und internalisierte Rezeptoren dienen. Dieses System würde die Effektivität der Signaltransduktion erhöhen und die Ligandenbindung auf kleinere Bereiche der Plasmamembran konzentrieren.

Beim OTR ist eine weitere physiologische Bedeutung der Wechselwirkung mit Cholesterin denkbar. Einige Tage vor der Geburt wird die Progesteronkonzentration in der Plazenta in vielen Spezies herunterreguliert. Bereits vorher sind die Konzentrationen von OT und seinem Rezeptor erhöht. Progesteron inhibiert viele Schritte des intrazellulären Cholesterintransports (Butler et al., 1992; Lange, 1994). Der Cholesteringehalt cholesterinreicher Mikrodomänen der Plasmamembran nimmt ab, wohingegen sich Cholesterinvorläufer in der Membran anreichern. Die sinkende Progesteronkonzentration könnte zur Wiederherstellung der zellulären Cholesterinverteilung und damit auch wieder zur Ausbildung cholesterinreicher Mikrodomänen führen. Nach dieser Hypothese würde

der OTR daraufhin wieder zur Wechselwirkung mit Cholesterin befähigt und die Ligandenbindung könnte für das Einsetzen der Wehen sorgen.

5.2. Lokalisierung der Cholesterinbindungsstelle

Mehrere Proteine, die an der Cholesterinhomöostase beteiligt sind, besitzen eine sogenannte „sterol sensing domain“ (SSD) vorgeschlagen. Diese Domäne, die für die Sensitivität der Proteine gegenüber Cholesterin verantwortlich gemacht wird, besteht aus fünf Transmembrandomänen, die Teil eines größeren Proteins mit einer Reihe weiterer Transmembrandomänen sind. Zu diesen Proteinen gehört die HMG-CoA-Reduktase (S. 17), Niemann-Pick Typ C-Protein (NPC1) und Patched (Übersichtsartikel Hahn et al., 1999). Im Falle des Enzyms HMG-CoA-Reduktase fördert Cholesterin den Abbau des Proteins (Hua et al., 1996; McGee et al., 1996; Roitelman et al., 1992). Das NPC1-Protein ist am Transport des Cholesterins aus LDL-Partikeln beteiligt (Blanchette-Mackie, 2000; Mukherjee und Maxfield, 1999). Patched ist zusammen mit den Proteinen Hedgehog und Smoothed an zahlreichen Vorgängen in der Embryonalentwicklung beteiligt. In welcher Weise die gemeinsame „sterol sensing domain“ dieser Proteine an der Cholesterinhomöostase mitwirkt, ist noch nicht geklärt. Auch die Frage, ob Cholesterin direkt mit der für die Sensitivität verantwortlichen Domäne interagiert, oder mit einem Adapterprotein, das dann an diese Domäne bindet, ist noch Gegenstand aktueller Forschung.

Li und Papadopoulos führten Experimente mit dem peripheren Benzodiazepinrezeptor (PBR) durch (Li und Papadopoulos, 1998), der am Cholesterintransport in die Mitochondrien beteiligt sein könnte (Krueger und Papadopoulos, 1990). Der Rezeptor besitzt fünf Transmembranhelices und ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert. Computermodelle weisen dem PBR eine Kanalfunktion für den Import von Cholesterin in Mitochondrien zu (Bernassau et al., 1993; Papadopoulos, 1996). Auf der Basis von Modeling-Studien und Mutagenese-Untersuchungen schlagen die Autoren eine Cholesterinbindungssequenz vor, die in vielen Proteinen vorkommt, bei denen eine Cholesterinwechselwirkung bekannt ist (z. B. ACAT (Maus), StAR (Kaninchen)). Die vorgeschlagene Sequenz besteht aus mehreren Aminosäuren (-L/V-(X)₁₋₅-Y-(X)₁₋₅-R/K-) mit einem zentralen Tyrosin, flankiert von je einer hydrophoben (Leucin oder Valin) und einer basischen (Arginin oder Lysin) Aminosäure. Obwohl diese Sequenz in vielen

Proteinen mit Cholesterinwechselwirkung vorkommt, darf bezweifelt werden, ob alle Proteine mit diesem Sequenzmotif eine spezifische Cholesterinwechselwirkung besitzen.

Eine Bindung bakterieller Toxine (z. B. Perfringolysin O, Streptolysin O) an Cholesterin in der Plasmamembran scheint durch viele Untersuchungen bestätigt (Alouf, 2000; Bernassau et al., 1993; Palmer et al., 1998; Shimada et al., 1999). Die Toxine binden als Monomere an die Membran und bilden durch Oligomerisierung große Poren von bis zu 30 nm Durchmesser. Die Proteine bestehen aus vier Domänen, von denen Domäne 4, die eine Tryptophan-reiche Sequenz besitzt, für die Bindung an Cholesterin mit verantwortlich gemacht wird. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung von hydrophoben Aminosäuren, insbesondere des Tryptophans, an der möglichen Wechselwirkung mit Cholesterin untersucht. Im OTR konnte die spezifische Interaktion der beiden C-terminalen Transmembrandomänen mit Cholesterin ausgeschlossen werden (S. 69), da der Ersatz mit entsprechenden Sequenzen des CCK_BR keine Änderungen in der Sensitivität gegenüber Cholesterin mit sich brachte. Dennoch kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass dieser Bereich des Rezeptors stabilisierend oder unterstützend in die Bindung von Cholesterinmolekülen eingreift.

Durch „Computer-Modeling“ wurde eine Bindungsstelle für Cholesterin im OTR zwischen TM5 und TM6 vorgeschlagen (S. 80). Durch „Computermutation“ wurde die vorgeschlagene Cholesterinbindungsstelle dahingehend verändert, dass kein aktives Steroid mehr in die Bindungstasche eingefügt werden konnte. Auch mit biochemischen Versuchen sollte diese Region zwischen TM5 und TM6 als Cholesterinbindungsstelle charakterisiert werden. Die erste Chimäre konnte erfolgreich exprimiert werden. Der Austausch zweier Transmembranhelices hatte nur geringe Auswirkungen auf die OT-Bindung und Cholesterinsensitivität, doch können die Auswirkungen des Austauschs einer weiteren Helix nicht vorhergesagt werden. Leider konnten die beiden generierten Rezeptoren OTR-CCK_BR-Chimäre II und Punktmutante W203L nicht zur funktionellen Expression gebracht werden. Es kann nur spekuliert werden, warum diese Rezeptoren nicht exprimiert werden konnten. Der Aufbau der Chimäre aus OTR und CCKBR führte vielleicht zu einem nicht-funktionellen Rezeptor, der daraufhin schneller abgebaut wurde. Wie aus bestehenden Datenbanken (GRAP 2002b) hervorgeht, gibt es bislang auch nur wenige exprimierte Rezeptoren, in denen hydrophobe Aminosäuren aus Transmembranregionen mutiert wurden. Bei der Faltung und Expression der Proteine spielen diese Aminosäuren offenbar eine große Rolle.

In beiden Rezeptoren wurde die fünfte Transmembrandomäne verändert, und die fehlende Interaktion mit Cholesterin kann durchaus der Grund für eine nicht-funktionelle Expression sein. Eventuell ist die Wechselwirkung mit Cholesterin bereits für die Faltung des OTRs notwendig, so dass eine fehlende Cholesterinbindungsstelle bereits bei der Entstehung des Proteins eine korrekte Faltung nicht mehr ermöglicht. Vielleicht ist die Wechselwirkung des OTR mit Cholesterin nötig, um funktionell an die Zelloberfläche gebracht zu werden. Sollte die Wechselwirkung fehlen, könnte dies in der Rückhaltung des Rezeptors im ER oder im Golgi-Apparat resultieren. In diesem Fall müssten jedoch andere Experimente konzipiert werden, um eine Interaktion mit Cholesterin zu detektieren, z. B. die Markierung mit einem photoaktivierbarem Cholesterinderivat.

5.3. Charakterisierung des fluoreszierenden Cholesterinderivats (Fluochol)

An ein funktionelles fluoreszierendes Cholesterinderivat werden hohe Anforderungen gestellt. Die Einführung von fluoreszierenden Gruppen darf die strukturellen Grundmotive des Cholesterins (3-OH-Gruppe, planares Ringsystem, aliphatische Seitenkette) nicht verändern, da diese für die Verteilung und die Funktion des Cholesterins in der Zelle essentiell sind (Schroeder et al., 1995; Yeagle et al., 1990). Eine Modifizierung der Hydroxylgruppe verhindert die Interaktion mit den Kopfgruppen der Phospholipide. Die Seitenkette ist wahrscheinlich wichtig für die Wechselwirkung der Seitenketten aus gegenüberliegenden Hälften der Lipiddoppelschicht (Transdimere) und den flip-flop des Moleküls in der Plasmamembran (s. Kap. 2.3.1). Die bisher als Cholesterinanaloga eingesetzten Steroidderivate 25- und 22-NBD-Cholesterol besitzen ihre fluoreszierende Gruppe am aliphatischen Rest, was evtl. auch der Grund für ihre Fehllokalisierung zu Mitochondrien sein kann (Mukherjee et al., 1998). Auch die Kinetik der Veresterung von 25-NBD ist gegenüber Cholesterin deutlich beschleunigt (Sparrow et al., 1999).

Dehydroergosterol ist ein natürlich fluoreszierendes Steroid, das im Vergleich zu Cholesterin zwei zusätzliche Doppelbindungen besitzt. Durch seine strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit Cholesterin fand es als Cholesterinanalogen schon oft Verwendung (Fischer et al., 1984; Fischer et al., 1985; Rogers et al., 1979; Schroeder et al., 1995). Seine spektroskopischen Eigenschaften mit der Anregung im UV-Bereich schränken seine Verwendung jedoch stark ein. UV-Anregung ist zellschädigend und die rasche Ausbleichung des Chromophors erschweren viele mikroskopische Anwendungen.

Außerdem sind die damit erzielten Ergebnisse teilweise recht widersprüchlich. Frolov *et al.* (Frolov *et al.*, 2000) beobachteten in L-Fibroblasten aus Mäusen einen schnellen Transport des DHE in Lipidtröpfchen. Die Kinetik dieses Transports ist in Zellen mit bereits existierenden Lipidtröpfchen offenbar beschleunigt, was durch die Experimente in dieser Arbeit bestätigt wurde (S. 103). Zusätzlich kann die schnellere Veresterung des DHE, die nach 24 h mehr als 7-fach erhöht ist gegenüber Cholesterin (Frolov *et al.*, 2000), diesen Prozess noch verstärken.

Im Gegensatz dazu zeigten Hao *et al.* (Hao *et al.*, 2001), dass die Beladung von Zellen mit DHE durch Cyclodextrinkomplexe eine bevorzugte Verteilung im endocytotischen Recyclingkomplex (ERC) bewirkt. In pulse-chase-Experimenten wird DHE nach wenigen Minuten im ERC beobachtet und verweilt über mehrere Stunden in diesem Komplex. Die hohe Konzentration, die zum Beladen der Zellen verwendet wird (0,5-1 mM), kann jedoch die Verteilung des DHE im Recyclingkomplex forcieren. Die von Hao *et al.* verwendete Konzentration, die für die Visualisierung des Steroids benötigt wird, liegt um einen Faktor >100 über der Konzentration, die für die Anwendung von Fluochol nötig ist und in den meisten Experimenten von mir verwendet wurde.

Die Eignung von Fluochol als Cholesterinsubstituent wurde in mehreren Experimenten bekräftigt. Die Kinetik der Veresterung von Fluochol in den Zellen durch ACAT korreliert mit derjenigen von radioaktivem Cholesterin über den gesamten Zeitraum (0-24 h), in dem die Experimente in dieser Arbeit durchgeführt wurden. Fluochol und [³H]Cholesterin zeigten im Efflux-Experiment einen ähnlichen Verlauf (S. 99). Beide Steroide bildeten zwei kinetische Pools, wodurch sich der Efflux an eine biexponentielle Zerfallskurve angleichen ließ. Haynes *et al.* (Haynes *et al.*, 2000) führten die Effluxexperimente in CHO-Zellen mit tritiiertem Cholesterin und 2-Hydroxyl- β -Cyclodextrin (2OH β CD) als Akzeptor durch. Durch den biexponentiellen Verlauf konnten sie die Existenz von zwei kinetischen Cholesterin-pools (schneller und langsamer Pool) nachweisen. Die Größen der Cholesterin-pools von Haynes *et al.* (25 % und 75 % für den schnellen bzw. den langsamen Pool) zeigen erhebliche Unterschiede zu den von mir bestimmten Cholesterin-pools (69 % und 30 % ([³H]Cholesterin) bzw. 59 % und 41 % (Fluochol). In den Studien von Haynes *et al.* variierte die Größen der Pools in verschiedenen Zelllinien, wohingegen die Halbwertszeiten insbesondere des schnellen Pools konstant blieben. In eigenen Experimenten konnte ich in verschiedenen Experimenten in CHO-Zellen eine Varianz der Poolgrößen feststellen, die wahrscheinlich auch vom Zustand der Zellen abhing. Im Vergleich zu 2OH β CD führte die Verwendung von M β CD als Akzeptor in eigenen

Experimenten zu einem verstärkten Efflux. Dies hängt damit zusammen, dass M β CD ein besserer Akzeptor für Steroide darstellt (eigene Beobachtung, Ergebnisse nicht gezeigt). Die unterschiedliche Affinität der Cholesterinderivate für Cyclodextrine führt wahrscheinlich auch zu den geringen Abweichungen zwischen den Poolgrößen und den Halbwertszeiten für Fluochol und [³H]Cholesterin (s. Tabelle 3, S. 100). Aus den Daten zur Charakterisierung der Pools lassen sich außerdem Rückschlüsse auf deren Lokalisierung ziehen. Die relativ kurzen Halbwertszeiten lassen auf das Vorhandensein des schnellen Pools in der Plasmamembran vermuten. Auch die Größe des Pools (60-70 %) korreliert mit den Befunden, dass die Plasmamembran den Großteil des zellulären Cholesterins beinhaltet (Lange et al., 1989; Lange, 1991; Liscum and Munn, 1999; Underwood et al., 1998). Für die Lokalisierung des langsamen kinetischen Pools gibt es mehrere Möglichkeiten. Für den Fall der Lokalisierung ebenfalls in der Plasmamembran könnten die beiden Pools die innere und äußere Membranhälfte, oder verschiedene Cholesterindomänen innerhalb der Plasmamembran repräsentieren. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass der langsame Pool die intrazellulären Membranen beinhaltet, was die Größe des Pools (30-40 %) und die Halbwertszeit (ca. 4 Minuten) erklären würde. Eine genaue Lokalisation dieser Pools ist mit diesem Experiment nicht möglich.

Schließlich steht die Beobachtung, dass der Influx von Fluochol über einen energieunabhängigen Mechanismus über das ER verläuft, in Einklang mit den meisten biochemischen Studien, die mit tritiiertem Cholesterin durchgeführt wurden (Übersichtsartikel Liscum and Munn, 1999). Die Verwendung des ACAT-Inhibitors führt zu einer veränderten Verteilung des Fluochols. Durch die pharmakologische Inhibierung von ACAT wird aus LDL-Partikeln aufgenommenes Cholesterin nicht in Fetttropfen gespeichert. Stattdessen akkumuliert unverestertes Cholesterin im ER (Butler et al., 1992), das normalerweise einen niedrigen Cholesteringehalt besitzt (Blanchette-Mackie, 2000; Butler et al., 1992). Diese Akkumulierung finde ich auch für Fluochol, sowohl in Zellen, die mit ACAT-Inhibitor behandelt wurden, als auch in ACAT-defizienten Zellen. (S. 103).

5.4. Aufnahme von Cholesterin

Ausgehend von der Plasmamembran wird Fluochol umgehend in das ER transportiert. In einer Subpopulation von Zellen kann der Farbstoff einige Minuten später im Golgi-Apparat beobachtet werden. Welche Faktoren diesen transienten Aufenthalt im Golgikomplex beeinflussen ist unbekannt. Die Beteiligung des Golgi am Transport von

Cholesterin wird kontrovers diskutiert. In einigen Studien wird die Beteiligung des Golgi an der Aufrechterhaltung der intrazellulären Cholesterinverteilung beschrieben (Coxey et al., 1993; Mendez, 1995; Neufeld et al., 1996). Andererseits wird durch die Zerstörung des Golgi der intrazelluläre Cholesterintransport nicht blockiert. Der Hauptanteil des neusynthetisierten Cholesterin wird ohne Beteiligung des Golgi-Apparats zur Plasmamembran transportiert (Heino et al., 2000, S. 17).

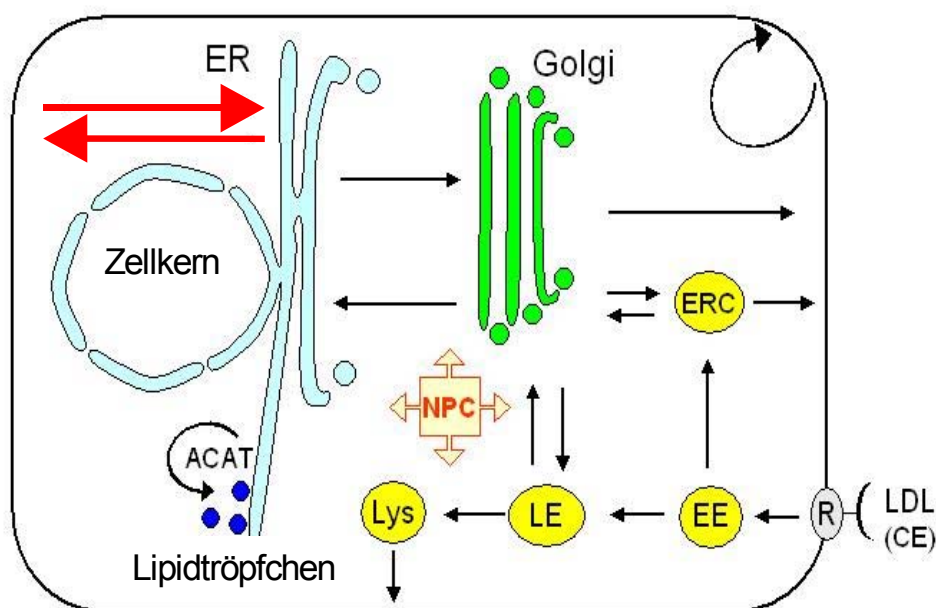


Abbildung 33: Zelluläre Transportwege des Cholesterins

LDL-Cholesterin wird über frühe und späte Endosomen aufgenommen (gelb). Danach wird es entweder über Lysosomen zur Membran transportiert oder direkt zum Golgi-Apparat verteilt. Im ER wird überschüssiges Cholesterin verestert und in Lipidtröpfchen gespeichert (s. Kap. 5.5). Ein Großteil des Transports zwischen ER und Plasmamembran geschieht direkt (rot, vgl. Text, s. S. 17). Eine zentrale Rolle im intrazellulären Cholesterintransport spielt das NPC1-Protein. Ly: Lysosomen, LE: späte (late) Endosomen; EE: frühe (early) Endosomen; ERC: Endocytotisches Recycling-Kompartiment; R: LDL-Rezeptor; CE: Cholesterinester.

Für den Transport des Cholesterins von der Plasmamembran ins Zellinnere werden zwei unterschiedliche Transportwege beschrieben, nämlich der Transport über das ER und der endozytotische Weg (s. Abbildung 33). In den hier verwendeten Zellen wird der Influx über das ER bevorzugt. Durch Energiedepletion wird der Cholesterintransport in die Zelle nicht inhibiert (S. 100), was einen vesikulären Transport ausschließt. Auch Skiba *et al.*

finden einen Influxweg des Cholesterins, der energieunabhängig ist und sich vom üblichen vesikulären Transport in der Zelle unterscheidet (Skiba et al., 1996). Der Mechanismus dieses Transports bleibt aber ungeklärt. Eine Beteiligung von noch unbekanntem Shuttlemolekülen kann zudem nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse dieser Experimente legen den Schluss nahe, dass der Influx des Cholesterins verstärkt den direkten Weg in das ER einnimmt. In Abbildung 33 ist dieser Weg des intrazellulären Cholesterintransports rot hervorgehoben.

Nach Inhibierung von ACAT ist eine deutliche Präsenz von Fluochol im ER zu beobachten. Die Effluxexperimente zeigen jedoch, dass ein großer Teil des Fluochols sich immer noch in der Plasmamembran befindet. Die Abhängigkeit der Fluoreszenzemission des Fluochols von seiner Umgebung kann dazu führen, dass der Anteil des Fluochols im ER überschätzt wird. Eine überwiegend hydrophobe Umgebung könnte die Fluoreszenzausbeute erhöhen und das Signal verstärken. Eine Kolokalisierung von Fluochol mit einem Lysosensor, der Lysosomen und späte Endosomen mit niedrigem pH markiert, konnte nicht beobachtet werden. Obwohl der Gehalt dieses Kompartiments 6-10 % des intrazellulären Cholesterins besitzt (Lange et al., 1998), war die Konzentration von Fluochol für eine Detektion offenbar zu gering. In Studien mit DHE, in denen eine Markierung von Lysosomen und späten Endosomen in polarisierten Leberzellen (HepG2) durchgeführt wurde, konnte ebenso keine Kolokalisierung mit DHE beobachtet werden (Wustner et al., 2002).

5.5. Speicherung von freiem Cholesterin in der Zelle

Die Zellen speichern überschüssiges Cholesterin in veresterter Form in intrazellulären Tröpfchen. Kleine Lipidtröpfchen mit einem Durchmesser von ca. 0,5 µm werden in fast allen Säugerzellen gefunden und dienen wahrscheinlich der Energieversorgung und/oder als Reservoir für Membranmaterial. Über die Struktur und die Dynamik der Lipidtröpfchen ist erst sehr wenig bekannt. Besonders die Beteiligung von Proteinen an der Struktur und der Funktion der Tröpfchen ist weitgehend spekulativ. Brasaemle *et al.* fanden eine Funktion für Perilipine, das Hauptprotein in Lipidtröpfchen von Adipozyten und steroidogenen Zellen (Brasaemle et al., 2000). Hier scheint das Protein vor allem für die Dynamik der Tröpfchen verantwortlich zu sein. Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass auch Caveolin an der Oberfläche von Lipidtröpfchen zu finden ist (Brasaemle et al., 2000; Ostermeyer et al., 2001; Pol et al., 2001). Offenbar ist aber erst die Akkumulation

von Caveolin im ER (durch Überexpression) die Grundlage für den Transport des Proteins zu den Tröpfchen (Ostermeyer et al., 2001). Lipidtröpfchen werden von einem Membran-Monolayer umschlossen, den sie durch Knospung aus dem ER erhalten (Londos et al., 1999) (Abbildung 34). Eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Tröpfchen nimmt das Enzym ACAT ein, das freies Cholesterin und Fettsäureketten zu Cholesterinestern verbindet (Chang et al., 1997). Für die Entstehung der Tröpfchen ist die Veresterung des Cholesterins Voraussetzung. Bei Experimenten mit Fluochol, in denen die Aktivität von ACAT durch einen Inhibitor unterdrückt wird oder in Zellen, die fast keine ACAT-Aktivität besitzen, ist keine Fluoreszenz in Lipidtröpfchen zu beobachten. Stattdessen kann hier der Großteil der Fluoreszenz im ER nachgewiesen werden.

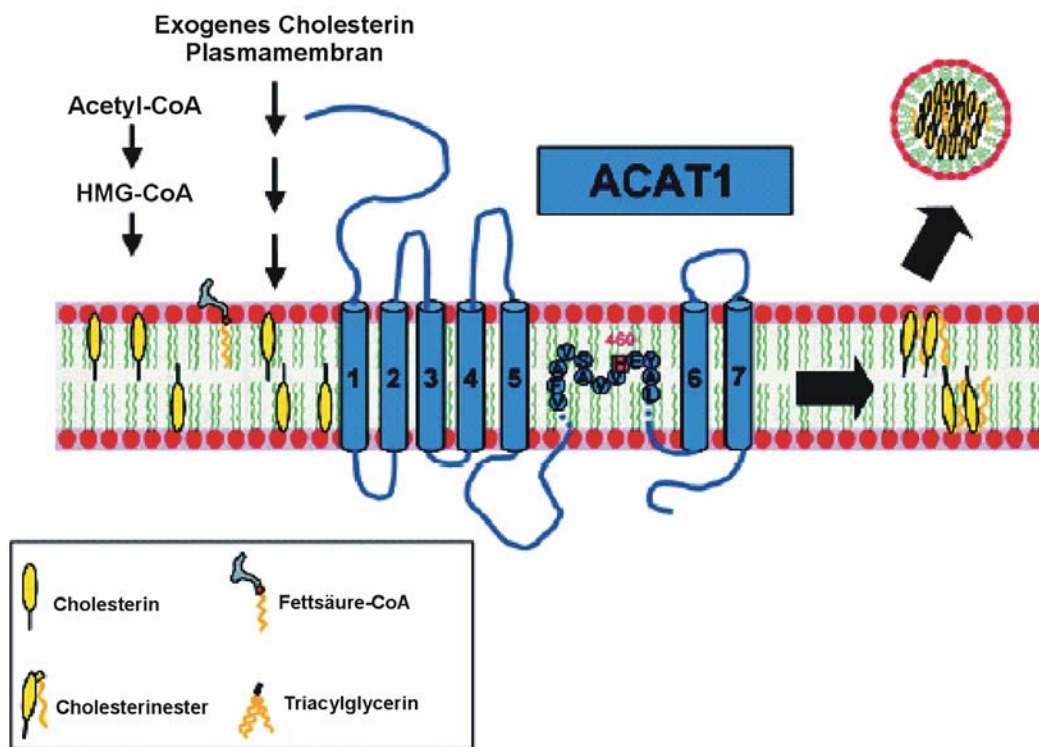


Abbildung 34: Entstehung der Lipidtröpfchen in der ER-Lipiddoppelschicht.

Hypothetisches Modell zur Beteiligung von ACAT1 an der Bildung der Lipidtröpfchen aus dem ER. Die Lokalisierung des katalytischen Zentrums (mit His460) in der Lipiddoppelschicht ermöglicht dem Enzym die Bildung von Cholesterinestern innerhalb der Membran des ER. ACAT ist dargestellt mit sieben Transmembranhelices (nach (Lin et al., 1999)), es wird ebenfalls diskutiert, dass das Enzym nur aus fünf Transmembranhelices besteht (Joyce et al., 2000). Wie im Bild gezeigt, kann ACAT das Cholesterin aus der Plasmamembran verestern, ebenso wie exogenes oder endogen synthetisiertes Cholesterin. Abbildung aus (Chang et al., 2001b), verändert.

Zur Zeit sind zwei ACAT-Proteine bekannt (ACAT1 und ACAT2), die für unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Geweben sorgen (Chang et al., 2001a; Chang et al., 2001b). In Hepatozyten und in intestinalen Enterozyten (Darmzellen), die für

die Assemblierung und Sekretion von Lipoproteinen verantwortlich sind, werden die von ACAT2 produzierten Cholesterinester in den Kern der Lipoproteinen integriert. In den meisten anderen Zelltypen ist ACAT1 für die Entstehung der Lipidtröpfchen verantwortlich. Das im ER enthaltene Cholesterin wird durch ACAT sowohl in cytoplasmatische Lipidtröpfchen gespeichert, als auch in Lipoproteinpartikel gebracht. Diese Partikel bilden sich im Lumen des ERs.

Die Veresterung von Cholesterin ist für die Ausbildung der Lipidtröpfchen notwendig. Fluochol kann in CHO-Zellen aber bereits nach 30 Minuten in den Lipidtröpfchen detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt sind aber erst minimale Mengen des Fluochols verestert (s. Abbildung 27). Somit besteht der Großteil der Fluoreszenz in den Lipidtröpfchen zumindest am Anfang aus unverestertem Fluochol.

Prattes *et al.* finden zudem in Adipozyten eine hohe Konzentration an freiem Cholesterin in den Tröpfchen (Prattes et al., 2000). Dies konnte durch eigene Experimente bestätigt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Auffällig ist der schnelle Transport des Fluochols zu den Lipidtröpfchen in 3T3-L1-Adipozyten. Die hohe Geschwindigkeit ist angesichts der enormen Menge an Phospholipiden und Cholesterin, die zum Füllen der riesigen Tropfen benötigt werden, nicht verwunderlich. Adipozyten stellen das größte Reservoir an freiem Cholesterin im Körper dar (Kraemer et al., 1994; Krause and Hartman, 1984). Entgegen dem üblicherweise geringen Cholesteringehalt der intrazellulären Membranen konnten Prattes *et al.* außerdem zeigen, dass die Lipidtröpfchen von differenzierten Adipozyten ca. ein Drittel der Gesamtmenge des freien Cholesterins enthalten. Das freie Cholesterin ist dabei ausschließlich in der Membran der Tröpfchen zu finden. Abbildung 32 zeigt, dass auch in den Lipidtröpfchen von differenzierten 3T3-Fibroblasten die Fluoreszenz zu beobachten ist. Obwohl der Gehalt an freiem Cholesterin wesentlich größer ist, so zeigen die Experimente, dass die Lipidtröpfchen sowohl freies Cholesterin in ihren Membranen, als auch verestertes Cholesterin im Inneren speichern.

5.6. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass alle Rezeptoren der Neurohypophysenhormone spezifisch mit Cholesterin interagieren. In den letzten Jahren konnte auch für viele andere GPCRs ein Zusammenhang zwischen Cholesterin und der Ligandenaffinität gezeigt werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sind ein erster wichtiger Schritt zur Identifikation einer Cholesterinbindungsstelle im OTR. Ein Teil des OTR konnte bereits als möglicher Angriffspunkt für Cholesterin ausgeschlossen werden. Weitere Experimente zur genaueren Lokalisierung der Cholesterinbindungsstelle lieferten Ergebnisse, die schwierig zu interpretieren sind. Da eine Veränderung in der Cholesterinbindungsstelle eventuell die funktionelle Expression des Rezeptors verhindert, müssten in Zukunft andere Methoden für eine Identifikation einer Bindungsstelle verwendet werden. Studien mit einem photoreaktiven Cholesterinderivat zeigten bereits vielversprechende Ergebnisse (Burger, 2000). Die funktionelle Reinigung des Rezeptors würde Möglichkeiten zu FRET-Untersuchungen eröffnen und die Identifizierung einer Cholesterinbindungsstelle erleichtern.

Mit der Synthese des Cholesterinderivats Fluochol steht mir ein vielseitiges Werkzeug zur Verfügung. Nachdem ich zeigen konnte, dass damit zahlreiche Untersuchungen zum intrazellulären Cholesterintransport möglich sind, sollen nun weitere Experimente einen detaillierteren Einblick geben. Zunächst soll der Einfluss des Niemann-Pick Proteins auf den intrazellulären Cholesterintransport untersucht werden. Hier wurden bereits erste Ergebnisse mit verschiedenen Zelllinien durchgeführt.

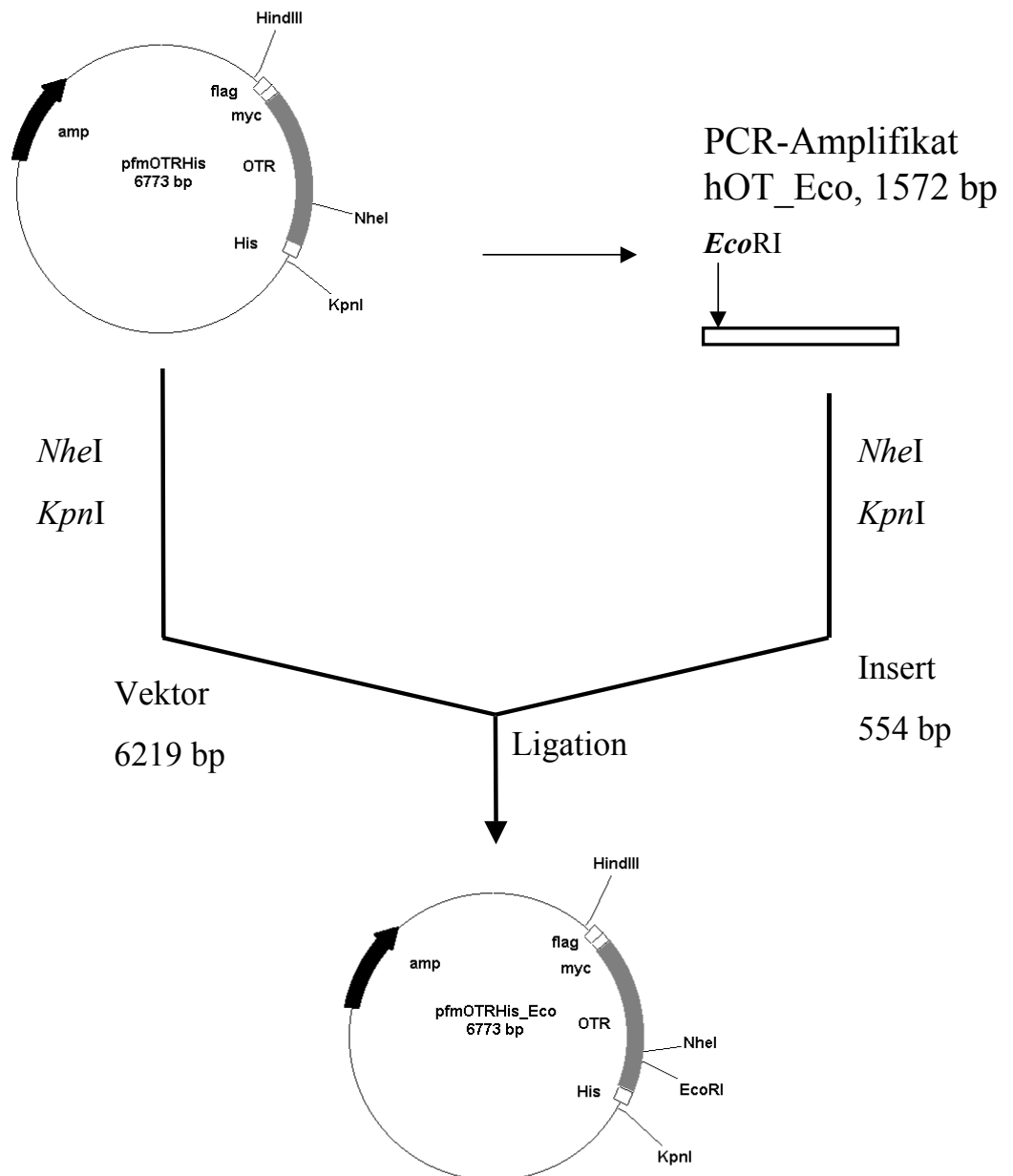
Als nächstes Ziel ist der Einsatz des veresterten Fluochols geplant. Durch die Verwendung von LDL-Partikeln, die mit diesem fluoreszierenden Cholesterinderivat beladen werden, soll ein weiterer Aufnahmeweg der Zellen untersucht werden. Obwohl die spektroskopischen Eigenschaften des Fluochols für mikroskopische Untersuchungen an lebenden Zellen geeignet sind, ist die Synthese eines weiteren fluoreszierenden Derivats bereits durchgeführt worden. Durch den Einsatz einer fluoreszierenden Gruppe mit einer längerwelligen Anregung und einer geringeren Ausbleichung sind längere Beobachtungszeiten möglich.

Durch eine genauere Aufklärung der Lipidverteilung in der Plasmamembran sind auch Rückschlüsse auf die Wirkung des Cholesterins auf Membranproteine möglich. Hier bleibt weiterhin das Ziel, einen Zusammenhang zwischen den Cholesterindomänen der Plasmamembran und dem OTR zu finden, um den Mechanismus der Rezeptor-Cholesterin-Wechselwirkung aufzuklären. Die Beteiligung des Cholesterins an zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen (Morbus Alzheimer, Niemann-Pick-Krankheit, etc.) zeigen die Bedeutung, die ein funktionelles fluoreszierendes Cholesterinderivat in der Aufklärung des intrazellulären Cholesterintransports erlangen kann.

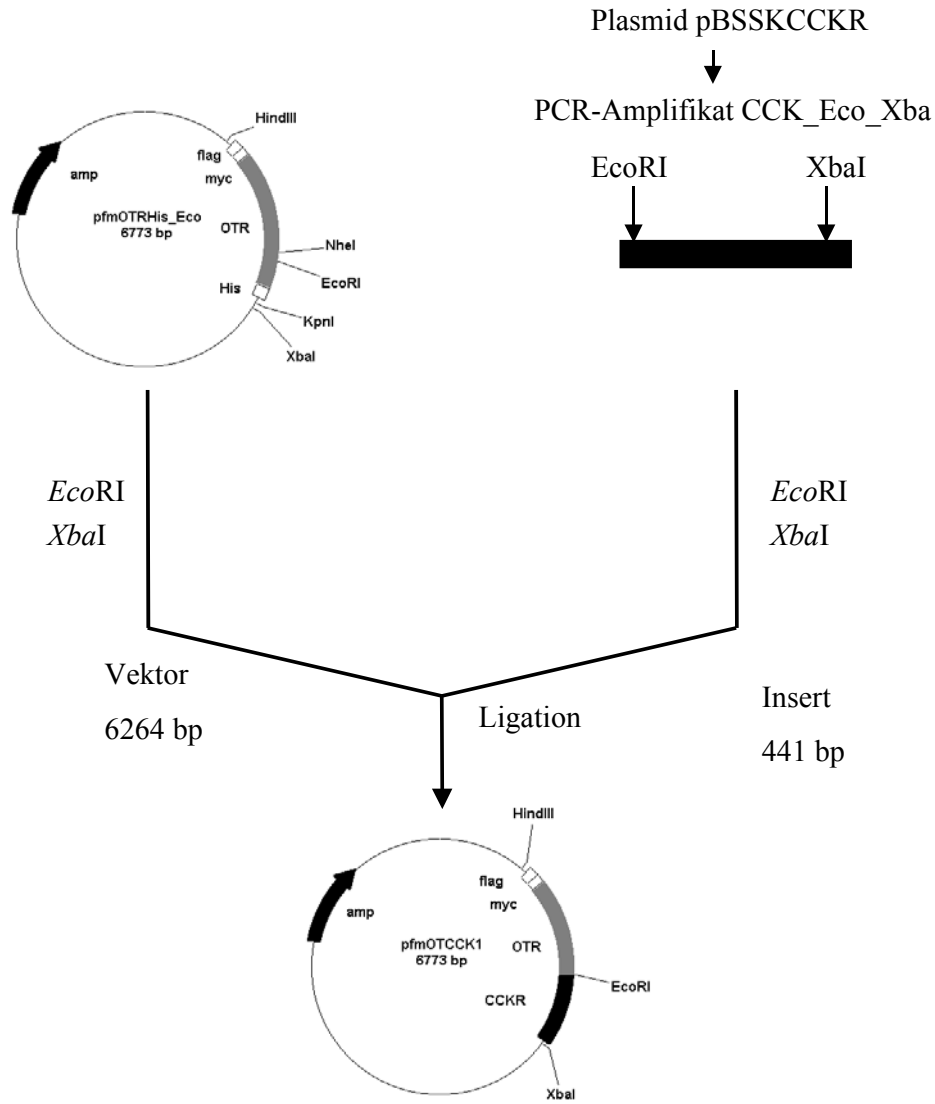
6. Anhang

6.1. Klonierungsschemata

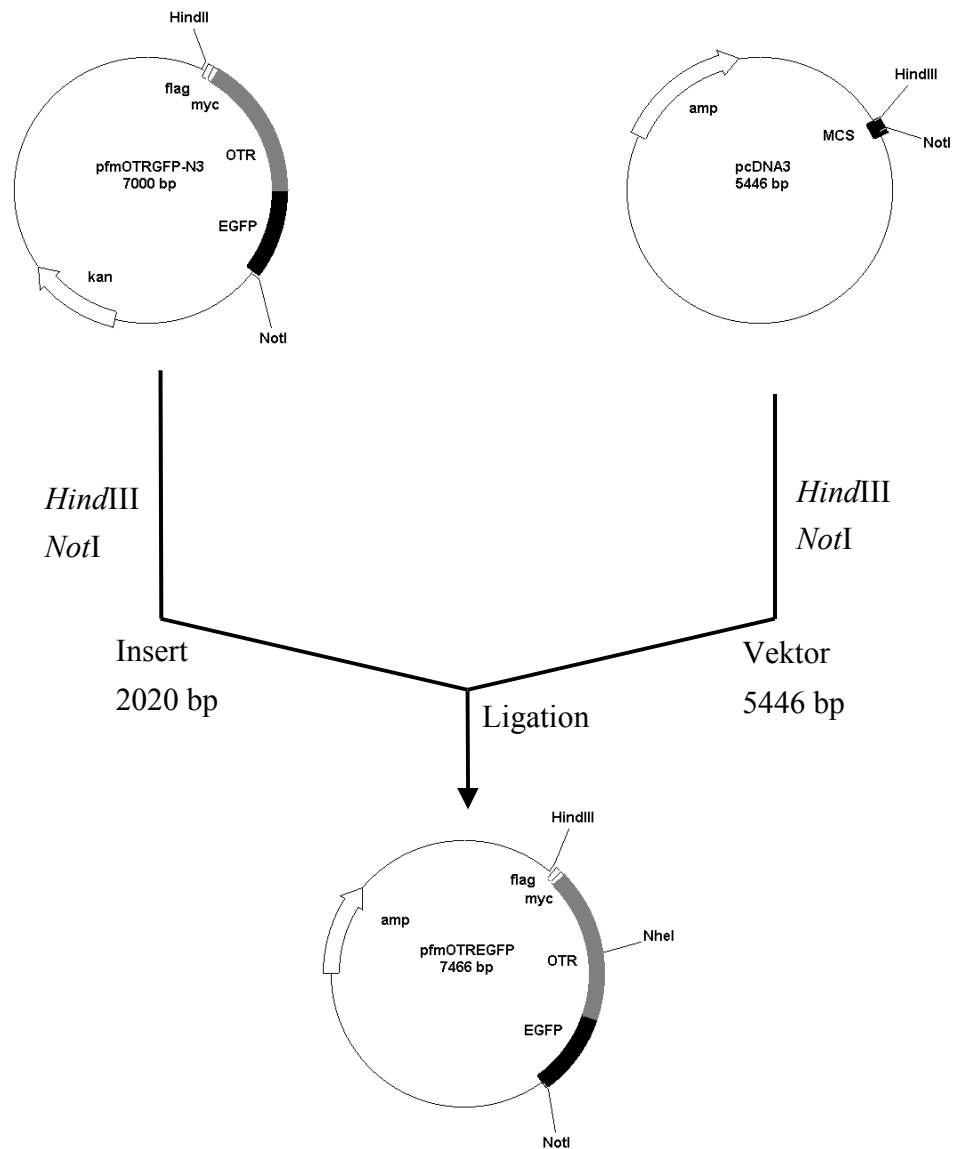
6.1.1. Schema der Einfügung der *EcoRI*-Schnittstelle in den OTR



6.1.2. Klonierung der kodierenden Sequenzen für den C-Terminus des CCK_BR in den Expressionsvektor pcDNA3



6.1.3. Klonierung der Sequenz für den GFP-getaggen OTR in den Expressionsvektor pcDNA3



Die Mutation W203L wurde mit den Primern *hOT_W203L_rev* und *pcDNA3_seq* eingeführt (PCR-Mutagenese). Die Einklonierung in den Vektor *pfmOTREGFP* erfolgte mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *NheI*.

6.2. Sequenzvergleich zwischen Rezeptoren

Sequenzvergleich zwischen den Rezeptoren OTR, V_{1a}R, V₂R und CCK_BR (human). Identische Aminosäuren in allen Sequenzen sind mit * gekennzeichnet, Substitutionen durch ähnliche Aminosäuren mit : bzw. . (vergl. (2002a)).

```

OTR_hum      -----MEGALAAN---WSAEAAANASAAPPGAEGN-RTAGPPR--RNEALARVEVAV--- 45
V1aR_hum     MRLSAGPDAGPSGNSSPWVPLATGAGNTSREAEALGEGNGPPRDVRNEELAKLEIAV--- 57
V2R_hum      -----MLMAS-----TTSAVPGHPSLPSLPSNSSQERPLDTRDPLLARAELAL--- 43
CCKBR_hum    -MELLKLNRSVQGTGPGPGASLCRPGAPLLNSSSVGNLSCEPPRIRGAGTRELELAIRIT 59
              ..      .      . . .      :      *      * .      . * : :

OTR_hum      -LCLILLLALSGNACVLLALRTRQK--HSRLFFFMKHLSIADLVVAVFQVLPQLLWDIT 102
V1aR_hum     -LAVTFAVAVLGNSSVLLALHRTPRK--TSRMHLFIRHLSLADLAVAFFQVLPQMCWDIT 114
V2R_hum      -LSIVFVAVALSNGLVLAALARRGRRGHWAPIHVFIGHLCLADLAVALFQVLPQLAWKAT 102
CCKBR_hum    LYAVIFLMSVGGNMLIIVVLGLSRRLR--TVTNAFLLSLAVSDLLLAVACMPFTLLPNLM 117
              . : :      . * : : . * : : :      * : * . : : * * : : .

OTR_hum      FRFYGPDLLCRLVKYLQVVGMAFASTYLLLLMSLDRCLAICQPLRSLRR---RTDRLAVLA 159
V1aR_hum     YRFRGPDWLRCRVVKKLQVFGMFASAYMLVMTADRYIAVCHPLKTLQQPA--RRSRLMIAA 173
V2R_hum      DRFRGPDALCRAVKYLQVMGYASSYMLAMTLDRHRAICRPLAYRHGSGAHWNRVPLV 162
CCKBR_hum    GTFIFGTVICKAVSYLMGVSVSVSTLSLVAIALERYSAICRPLQARVWQTRSHAARVIVA 177
              *      : * : * . : : . * : : : : * * : : * : : : : : .

OTR_hum      TWLGCLVASAPQVHIFSLREVADG--VFDCWAVFIQPWGPKAYITWITLAVYIVPVIVLA 217
V1aR_hum     AWVLSFVLSTPQYFVFSMIEVNNVTKARDCWATFIQPWGSRAYVTWMTGGIFVAPVVILG 233
V2R_hum      AWAFSLLSLPQLFIFAQRNVEGGSGVTDCWACFAEPWGRRTYVTWIALMVFAVPTLGLIA 222
CCKBR_hum    TWLLSGLLMVPYPVYTVVQPVGPR--VLQCVHRWPSARVRQTWSVLLLLLLLLFFIPGVVMA 235
              : * . :      *      . : * : : . : : : : : : . : : .

OTR_hum      TCYGLISFKIWQNLRLKTAATAAAAEAEPEGAAAGDGGRVAL----- 257
V1aR_hum     TCYGFICYNIWCNVRGKTASRQSKGAEQAGVAFQKGFLLA----- 273
V2R_hum      ACQVLIFREIHASLVPGPSERPG-GRRRGRRTGSPG----- 257
CCKBR_hum    VAYGLISRELYLGLRFDGSDSDSQRVNRNQGGLPGAVHQNGRCRPETGAVGEDSDGCYV 295
              .. : * : :      . :      *

OTR_hum      -----ARVSSVKLISKAKIRTVKMTFIIIVLAFIVCWTPFFVQMW 297
V1aR_hum     -----PCVSSVKSISRKAKIRTVKMTFVIVTAYIVCWAPFFIIQMW 313
V2R_hum      -----EGAHVSAAVAKTVRMTLVIVVVYVLCWAPFFLVQLW 293
CCKBR_hum    QLPRSRPALELTALTAPGPGSGSRPTQAKLLAKKRVRMLLVIVVLFFLCWLPVYSANTW 355
              *      . : * : : * * : : : * * : : : *

```

```
OTR_hum      SVWDAN---APKEASAFIIVMLLASLNSCCNPWIYMLFTGHLFHELVQRFLCCSASYLKG 354
V1aR_hum    SVWDPMSVWTESENPTITITALLGSLNSCCNPWIYMFSGHLLQDCVQSFPCQNMKEKF 373
V2R_hum     AAWDPE---APLEGAPFVLLMLLASLNSCTNPWIYASFSSSVSSELRS-LLCCARGRTPP 349
CCKBR_hum   RAFDGPGAHRALSGAPISFIHLLSYASACVNPLVYCFMHRFRQACLETCCARCCPRPPRA 415
           .:*          . . . : : ** . .:* ** :* : . . *
```

```
OTR_hum      RRLGETSASKK-----SNSSSFVLSHRSSSQRSCSQPSTA 389
V1aR_hum    NKEDTDSMSRRQTFYSNNRSPNTSTGMWKDSPKSSKSIKIFPVST 418
V2R_hum     SLGPQDESECT-----TASSSLAKDTSS----- 371
CCKBR_hum   RPRALPDEDPP-----TPSIASLSRLSYTTISTLGGP- 447
           .                :...:
```

6.3. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Bändermodell des Rhodopsins	4
Abbildung 2: Schematische Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und Ligand-Rezeptor-Interaktionen.....	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hormone [8-Arginin]Vasopressin (AVP) und Oxytocin (OT).....	11
Abbildung 4: Struktur des OTR.....	13
Abbildung 5: Struktur des Cholesterins	16
Abbildung 6: Strukturelle Merkmale von Cholesterin, die für den hochaffinen Zustand des Oxytocinrezeptors wichtig sind	23
Abbildung 7: Ligandenbindung des Oxytocinrezeptors (●) und des Cholecystininrezeptors (○) in Abhängigkeit von der Anisotropie der Membranen.....	24
Abbildung 8: Strukturformel und Form von β -Cyclodextrinen.....	51
Abbildung 9: Größe und Orientierung des definierten Würfels um einen Rezeptor	57
Abbildung 10: Reaktionsschema zur Synthese von Fluochol.....	58
Abbildung 11: Synthese von 4',5'-bis(1,3,2-dithioarsolan-2-yl)fluoreszein.....	60
Abbildung 12: Einfluss der Cholesterinoxidase auf die Dissoziation der Vasopressinbindung.....	66
Abbildung 13: Cholesterinoxidase-Sensitivität der Ligandenbindung der Neurohypophysenrezeptoren $V_{1a}R$, V_2R , OTR und des $CCK_B R$	68
Abbildung 14: Aminosäuresequenzen für OTR- $CCK_B R$ -Chimäre I	70
Abbildung 15: Sättigungsexperiment mit [3H]-OT an HEKOTCCK1-Zellmembranen	72
Abbildung 16: Einfluss der Cholesterinoxidase auf die OT-Bindung der OTR- $CCK_B R$ -Chimäre.....	73
Abbildung 17: Vergleich der Wiederherstellung der Ligandenbindung beim OTR und der OTR- $CCK_B R$ -Chimäre.	76
Abbildung 18: Vergleich der Internalisierung zwischen der Chimäre und dem OTR.....	77
Abbildung 19: Aminosäuresequenz für OTR- $CCK_B R$ -Chimäre II	79
Abbildung 20: Computergestütztes Modeling einer Cholesterinbindungsstelle im humanen OTR.....	80
Abbildung 21: Konfokalaufnahmen der Punktmutante W203L in HEK-Zellen	82
Abbildung 22: Startkonformationen der eingesetzten Steroide	85

Abbildung 23: Verteilung der Steroide um die Rezeptoren: A OTR (S. 87); B CCKR (S. 88); C Mutante (S. 89)	86
Abbildung 24: Bindung von Flash an die Erkennungssequenz einer α -Helix	91
Abbildung 25: Mikroskopie von HEKOTFlash-Zellen nach Inkubation mit Flash-EDT ₂ ..	93
Abbildung 26: Anregungs- und Emissionsspektrum von Fluochol (A) und Emissionsspektren in verschiedenen Lösungsmitteln (B)	96
Abbildung 27: Veresterung von Fluochol und [³ H]Cholesterin durch ACAT in CHO-Zellen	98
Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf des Efflux von Fluochol und [³ H]Cholesterin aus CHO-Zellen	99
Abbildung 29: Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von Fluochol in CHO-Zellen....	101
Abbildung 30: Kollokalisierung von Fluochol mit Lysosomen	102
Abbildung 31: Einfluss der ACAT-Aktivität auf die Verteilung von Fluochol	104
Abbildung 32: Speicherung des Fluochols in Lipidtröpfchen	105
Abbildung 33: Zelluläre Transportwege des Cholesterins	114
Abbildung 34: Entstehung der Lipidtröpfchen in der ER-Lipiddoppelschicht.....	116

6.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wiederherstellung der Bindungsaffinität der OTR-CCK _B R-Chimäre durch verschiedene Steroide	75
Tabelle 2: Eingesetzte Steroide beim „Computer-Modeling“	84
Tabelle 3: Vergleich der kinetischen Pools des Cholesterinefflux	100

7. Literaturverzeichnis

- Albert,A.D., Boesze-Battaglia,K., Paw,Z., Watts,A., und Epanand,R.M. (1996a). Effect of cholesterol on rhodopsin stability in disk membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1297, 77-82.
- Albert,A.D., Young,J.E., und Yeagle,P.L. (1996b). Rhodopsin-cholesterol interactions in bovine rod outer segment disk membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1285, 47-55.
- Alouf (2000). Cholesterol-binding cytolytic protein toxins. *Int J Med Microbiol* 290, 351-356.
- Anderson,R.A., Joyce,C., Davis,M., Reagan,J.W., Clark,M., Shelness,G.S., und Rudel,L.L. (1998). Identification of a form of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase specific to liver and intestine in nonhuman primates. *J Biol. Chem.* 273, 26747-26754.
- Antoni,F.A. und Chadio,S.E. (1989). Essential role of magnesium in oxytocin-receptor affinity and ligand specificity. *Biochem. J* 257, 611-614.
- Attwood,P.V. und Gutfreund,H. (1980). The application of pressure relaxation to the study of the equilibrium between metarhodopsin I and II from bovine retinas. *FEBS Lett.* 119, 323-326.
- Backer,J.M. und Dawidowicz,E.A. (1981). Transmembrane movement of cholesterol in small unilamellar vesicles detected by cholesterol oxidase. *J. Biol. Chem.* 256, 586-588.
- Baldwin,J.M., Schertler,G.F., und Unger,V.M. (1997). An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *J Mol Biol.* 272, 144-164.
- Bargmann,C.I. (1998). Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* 282, 2028-2033.
- Bernassau,J.M., Reversat,J.L., Ferrara,P., Caput,D., und Lefur,G. (1993). A 3D model of the peripheral benzodiazepine receptor and its implication in intra mitochondrial cholesterol transport. *J Mol Graph.* 11, 236-44, 235.
- Beutler,H.O. und Michal,G. (1976). Eine Eigengehaltsbestimmung für die Routineanalytik: Enzymatische Bestimmung von Cholesterin. *Getreide Brot Mehl* 30, 215-222.
- Bist,A., Fielding,P.E., und Fielding,C.J. (1997). Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 10693-10698.
- Blanchette-Mackie,E.J. (2000). Intracellular cholesterol trafficking: role of the NPC1 protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1486, 171-183.

- Bligh, E.G. und Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- Boesze-Battaglia, K. und Albert, A.D. (1990). Cholesterol modulation of photoreceptor function in bovine retinal rod outer segments. *J Biol. Chem.* 265, 20727-20730.
- Boesze-Battaglia, K., Clayton, S.T., und Schimmel, R.J. (1996). Cholesterol redistribution within human platelet plasma membrane: evidence for a stimulus-dependent event. *Biochemistry* 35, 6664-6673.
- Boesze-Battaglia, K. und Schimmel, R. (1997). Cell membrane lipid composition and distribution: implications for cell function and lessons learned from photoreceptors and platelets. *J. Exp. Biol.* 200 (Pt 23), 2927-2936.
- Bohm, S.K., Grady, E.F., und Bunnett, N.W. (1997). Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* 322 (Pt 1), 1-18.
- 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.
- Brasaemle, D.L. und Attie, A.D. (1990). Rapid intracellular transport of LDL-derived cholesterol to the plasma membrane in cultured fibroblasts. *J Lipid Res.* 31, 103-112.
- Brasaemle, D.L., Rubin, B., Harten, I.A., Gruia-Gray, J., Kimmel, A.R., und Londos, C. (2000). Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem.* 275, 38486-38493.
- Bretscher, M.S. und Munro, S. (1993). Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science* 261, 1280-1281.
- Brown, M.S. und Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34-47.
- Buhman, K.F., Accad, M., und Farese, R.V. (2000). Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta* 1529, 142-154.
- Burger, K. (2000). Cholesterin und Progesteron - Modulatoren G-Protein-gekoppelter Signaltransduktionswege. Dissertation Universität Mainz.
- Butler, J.D., Blanchette-Mackie, J., Goldin, E., O'Neill, R.R., Carstea, G., Roff, C.F., Patterson, M.C., Patel, S., Comly, M.E., und Cooney, A. (1992). Progesterone blocks cholesterol translocation from lysosomes. *J Biol Chem.* 267, 23797-23805.
- Cadigan, K.M., Heider, J.G., und Chang, T.Y. (1988). Isolation and characterization of Chinese hamster ovary cell mutants deficient in acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase activity. *J Biol Chem.* 263, 274-282.
- Caloca, M.J., Wang, H., Delemos, A., Wang, S., und Kazanietz, M.G. (2001). Phorbol Esters and Related Analogs Regulate the Subcellular Localization of beta 2-Chimaerin, a Non-protein Kinase C Phorbol Ester Receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 18303-18312.

- Carter,C.S., Williams,J.R., Witt,D.M., und Insel,T.R. (1992). Oxytocin and social bonding. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 652, 204-211.
- Cases,S., Novak,S., Zheng,Y.W., Myers,H.M., Lear,S.R., Sande,E., Welch,C.B., Lusi,A.J., Spencer,T.A., Krause,B.R., Erickson,S.K., und Farese,R.V., Jr. (1998). ACAT-2, a second mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. Its cloning, expression, and characterization. *J Biol. Chem.* 273, 26755-26764.
- Chang,C.C., Huh,H.Y., Cadigan,K.M., und Chang,T.Y. (1993). Molecular cloning and functional expression of human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 268, 20747-20755.
- Chang,T.Y., Chang,C.C., und Cheng,D. (1997). Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 613-638.
- Chang,T.Y., Chang,C.C., Lee,O., und Cruz,J.C. (2000). ACAT genes and proteins in humans. In *Lipoprotein metabolism and atherogenesis*, T.Kita und M.Yokode, eds. (Tokyo: Springer-Verlag), 124-129.
- Chang,T.Y., Chang,C.C., Lin,S., Yu,C., Li,B.L., und Miyazaki,A. (2001a). Roles of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 and -2. *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 289-296.
- Chang,T.Y., Chang,C.C.Y., Lu,X., und Lin,S. (2001b). Catalysis of ACAT may be completed within the plane of the membrane: a working hypothesis. *J. Lipid Res.* 42, 1933-1938.
- Chen,C.A. und Okayama,H. (1988). Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6, 632-638.
- Cimino,M., Vantini,G., Algeri,S., Curatola,G., Pezzoli,C., und Stramentinoli,G. (1984). Age-related modification of dopaminergic and beta-Adrenergic receptor system: restoration to normal activity by modifying membrane fluidity with S-adenosylmethionine. *Life Sci.* 34, 2029-2039.
- Clapham,D.E. und Neer,E.J. (1993). New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature* 365, 403-406.
- ClustalW Sequence Alignment. <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html> (2002).
- Coleman,D.E., Berghuis,A.M., Lee,E., Linder,M.E., Gilman,A.G., und Sprang,S.R. (1994). Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* 265, 1405-1412.
- Coxey,R.A., Pentchev,P.G., Campbell,G., und Blanchette-Mackie,E.J. (1993). Differential accumulation of cholesterol in Golgi compartments of normal and Niemann-Pick type C fibroblasts incubated with LDL: a cytochemical freeze-fracture study. *J Lipid Res.* 34, 1165-1176.
- Craig,I.F., Via,D.P., Mantulin,W.W., Pownall,H.J., Gotto,A.M., Jr., und Smith,L.C. (1981). Low density lipoproteins reconstituted with steroids containing the nitrobenzoxadiazole fluorophore. *J Lipid Res.* 22, 687-696.

- Daaka, Y., Luttrell, L.M., Ahn, S., Della Rocca, G.J., Ferguson, S.S., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1998). Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* *273*, 685-688.
- Dale, H.H. (1906). On some physiological actions of ergot. *J. Physiol. Lond.* *34*, 163-205.
- DeGrella, R.F. und Simoni, R.D. (1982). Intracellular transport of cholesterol to the plasma membrane. *J Biol. Chem.* *257*, 14256-14262.
- Devaux, P.F. (1991). Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* *30*, 1163-1173.
- Dreger, M., Krauss, M., Herrmann, A., und Hucho, F. (1997). Interactions of the nicotinic acetylcholine receptor transmembrane segments with the lipid bilayer in native receptor-rich membranes. *Biochemistry* *36*, 839-847.
- el Yandouzi, E.H. und Le Grimellec, C. (1992). Cholesterol heterogeneity in the plasma membrane of epithelial cells. *Biochemistry* *31*, 547-551.
- Evans, W.H. und Graham, J.M. (1989). *Membrane structure and function.* (Oxford: IRL Press).
- Fanelli, F., Barbier, P., Zanchetta, D., de Benedetti, P.G., und Chini, B. (1999). Activation Mechanism of Human Oxytocin Receptor: A Combined Study of Experimental and Computer-Simulated Mutagenesis. *Mol Pharmacol* *56*, 214-225.
- Farrens, D.L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W.L., und Khorana, H.G. (1996). Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* *274*, 768-770.
- Fehr, S., Ivell, R., Koll, R., Schams, D., Fields, M., und Richter, D. (1987). Expression of the oxytocin gene in the large cells of the bovine corpus luteum. *FEBS Lett.* *210*, 45-50.
- Fernandez-Ballester, G., Castresana, J., Fernandez, A.M., Arrondo, J.L., Ferragut, J.A., und Gonzalez-Ros, J.M. (1994). A role for cholesterol as a structural effector of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* *33*, 4065-4071.
- Feron, O., Smith, T.W., Michel, T., und 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, C.J., Bist, A., und Fielding, P.E. (1997). Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 3753-3758.
- Fielding, C.J. und Fielding, P.E. (1997). Intracellular cholesterol transport. *J. Lipid Res.* *38*, 1503-1521.
- Fielding, P.E. und Fielding, C.J. (1995). Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry* *34*, 14288-14292.

- Fischer,R.T., Cowlen,M.S., Dempsey,M.E., und Schroeder,F. (1985). Fluorescence of delta 5,7,9(11),22-ergostatetraen-3 beta-ol in micelles, sterol carrier protein complexes, and plasma membranes. *Biochemistry* 24, 3322-3331.
- Fischer,R.T., Stephenson,F.A., Shafiee,A., und Schroeder,F. (1984). delta 5,7,9(11)-Cholestatrien-3 beta-ol: a fluorescent cholesterol analogue. *Chem. Phys. Lipids* 36, 1-14.
- Foo,N.C., Carter,D., Murphy,D., und Ivell,R. (1991). Vasopressin and oxytocin gene expression in rat testis. *Endocrinology* 128, 2118-2128.
- Frolov,A., Petrescu,A., Atshaves,B.P., So,P.T., Gratton,E., Serrero,G., und Schroeder,F. (2000). High density lipoprotein-mediated cholesterol uptake and targeting to lipid droplets in intact L-cell fibroblasts. A single- and multiphoton fluorescence approach. *J Biol Chem.* 275, 12769-12780.
- Gainer,H. und Wray,S. (1994). Cellular and molecular biology of oxytocin and vasopressin. In *The Physiology of Reproduction*, E.Knobel und J.D.Neill, eds. (Raven, New York: pp. 1099-1129.
- Gether,U. und Kobilka,B.K. (1998). G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol. Chem.* 273, 17979-17982.
- Gimpl, G.(2000). Funktionelle Wechselwirkung des humanen Oxytocin-Rezeptors mit Cholesterin. Habilitationsschrift, Universität Mainz.
- Gimpl,G., Burger,K., und Fahrenholz,F. (1997). Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry* 36, 10959-10974.
- Gimpl,G., Burger,K., Politowska,E., Ciarkowski,J., und Fahrenholz,F. (2000). Oxytocin receptors and cholesterol: interaction and regulation. *Exp. Physiol* 85 *Spec No*, 41S-49S.
- Gimpl,G. und Fahrenholz,F. (2000). Human oxytocin receptors in cholesterol-rich vs. cholesterol-poor microdomains of the plasma membrane. *Eur. J. Biochem.* 267, 2483-2497.
- Gimpl,G. und Fahrenholz,F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81, 629-683.
- Gimpl,G., Klein,U., Reilander,H., und Fahrenholz,F. (1995). Expression of the human oxytocin receptor in baculovirus-infected insect cells: high-affinity binding is induced by a cholesterol- cyclodextrin complex. *Biochemistry* 34, 13794-13801.
- Goodman,O.B., Jr., Krupnick,J.G., Santini,F., Gurevich,V.V., Penn,R.B., Gagnon,A.W., Keen,J.H., and Benovic,J.L. (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2- adrenergic receptor. *Nature* 383, 447-450.
- GRAP Mutant Database. <http://tinyGRAP.uit.no/> (2002).

- Grechishnikova, I.V., Bergstrom, F., Johansson, L.B., Brown, R.E., und Molotkovsky, J.G. (1999). New fluorescent cholesterol analogs as membrane probes. *Biochim. Biophys. Acta* 1420, 189-202.
- Griffin, B.A., Adams, S.R., und Tsien, R.Y. (1998). Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* 281, 269-272.
- Gura, T. (1999). Gene linked to faulty cholesterol transport. *Science* 285, 814-815.
- Hahn, H., Wojnowski, L., Miller, G., und Zimmer, A. (1999). The patched signaling pathway in tumorigenesis and development: lessons from animal models. *J Mol Med* 77, 459-468.
- Hamm, H.E. (1998). The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* 273, 669-672.
- Hao, M., Lin, S.X., Karylowski, O.J., Wustner, D., McGraw, T.E., und Maxfield, F.R. (2001). Vesicular and Non-vesicular Sterol Transport in Living Cells. THE ENDOCYTIC RECYCLING COMPARTMENT IS A MAJOR STEROL STORAGE ORGANELLE. *J. Biol. Chem.* 277, 609-617.
- Harder, T. und Simons, K. (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 534-542.
- Harris, J.S., Epps, D.E., Davio, S.R., und Kezdy, F.J. (1995). Evidence for transbilayer, tail-to-tail cholesterol dimers in dipalmitoylglycerophosphocholine liposomes. *Biochemistry* 34, 3851-3857.
- Hawtin, S.R., Howard, H.C., und Wheatley, M. (2001). Identification of an extracellular segment of the oxytocin receptor providing agonist-specific binding epitopes. *Biochem. J.* 354, 465-472.
- Haynes, M.P., Phillips, M.C., und Rothblat, G.H. (2000). Efflux of cholesterol from different cellular pools. *Biochemistry* 39, 4508-4517.
- Heino, S., Lusa, S., Somerharju, P., Ehnholm, C., Olkkonen, V.M., und Ikonen, E. (2000). Dissecting the role of the golgi complex and lipid rafts in biosynthetic transport of cholesterol to the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 97, 8375-8380.
- Hepler, J.R. und Gilman, A.G. (1992). G proteins. *Trends Biochem. Sci* 17, 383-387.
- Heron, D.S., Shinitzky, M., Hershkowitz, M., und Samuel, D. (1980). Lipid fluidity markedly modulates the binding of serotonin to mouse brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77, 7463-7467.
- Herzyk, P. und Hubbard, R.E. (1998). Combined biophysical and biochemical information confirms arrangement of transmembrane helices visible from the three-dimensional map of frog rhodopsin. *J Mol Biol.* 281, 741-754.
- Hua, X., Nohturfft, A., Goldstein, J.L., und Brown, M.S. (1996). Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell* 87, 415-426.

- Hubbard,S.C. und Ivatt,R.J. (1981). Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev Biochem.* 50, 555-583.
- Inglese,J., Freedman,N.J., Koch,W.J., und Lefkowitz,R.J. (1993). Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.* 268, 23735-23738.
- Insel,T.R. und Shapiro,L.E. (1992). Oxytocin receptor distribution reflects social organization in monogamous and polygamous voles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 5981-5985.
- Ji,T.H., Grossmann,M., und Ji,I. (1998). G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* 273, 17299-17302.
- Johnson,W.J., Chacko,G.K., Phillips,M.C., und Rothblat,G.H. (1990). The efflux of lysosomal cholesterol from cells. *J Biol. Chem.* 265, 5546-5553.
- Joyce,C., Skinner,K., Anderson,R.A., und Rudel,L.L. (1999). Acyl-coenzyme A:cholesteryl acyltransferase 2. *Curr Opin Lipidol.* 10, 89-95.
- Joyce,C.W., Shelness,G.S., Davis,M.A., Lee,R.G., Skinner,K., Anderson,R.A., und Rudel,L.L. (2000). ACAT1 and ACAT2 membrane topology segregates a serine residue essential for activity to opposite sides of the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* 11, 3675-3687.
- Kao,Y.J., Doody,M.C., und Smith,L.C. (1986). Transfer of cholesterol and a fluorescent cholesterol analog, 3'- pyrenylmethyl-23,24-dinor-5-cholen-22-oate-3 beta-ol, between human plasma high density lipoproteins. *J Lipid Res.* 27, 781-785.
- Kao,Y.J., Soutar,A.K., Hong,K.Y., Pownall,H.J., und Smith,L.C. (1978). N-(2-Naphthyl)-23,24-dinor-5-cholen-22-amin-3beta-ol, a fluorescent cholesterol analogue. *Biochemistry* 17, 2689-2696.
- Kaplan,M.R. und Simoni,R.D. (1985). Transport of cholesterol from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *J Cell Biol.* 101, 446-453.
- Kawasaki,T., Maeda,M., und Tsuji,A. (1982). Determination of 17-hydroxycorticosteroids in urine by fluorescence high-performance liquid chromatography using Dns-hydrazine as a pre- column labeling reagent. *J Chromatogr.* 232, 1-11.
- Kelley,R.I. und Hennekam,R.C. (2000). The Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet.* 37, 321-335.
- Kennelly,P.J. und Krebs,E.G. (1991). Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol. Chem.* 266, 15555-15558.
- Kenworthy,A.K., Petranova,N., und Edidin,M. (2000). High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI- anchored proteins in cell plasma membranes. *Mol Biol. Cell* 11, 1645-1655.

- Kimura,T., Tanizawa,O., Mori,K., Brownstein,M.J., und Okayama,H. (1992). Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 356, 526-529.
- Klein,U., Gimpl,G., und Fahrenholz,F. (1995b). Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* 34, 13784-13793.
- Klein,U., Gimpl,G., und Fahrenholz,F. (1995a). Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* 34, 13784-13793.
- Kojro,E., Hackenberg,M., Zsigo,J., und Fahrenholz,F. (1991). Identification and enzymatic deglycosylation of the myometrial oxytocin receptor using a radioiodinated photoreactive antagonist. *J Biol. Chem.* 266, 21416-21421.
- Koradi,R., Billeter,M., und Wuthrich,K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph.* 14, 51-32.
- Kraemer,F.B., Laane,C., Park,B., und Sztalryd,C. (1994). Low-density lipoprotein receptors in rat adipocytes: regulation with fasting. *Am. J Physiol* 266, E26-E32.
- Krause,B.R. und Hartman,A.D. (1984). Adipose tissue and cholesterol metabolism. *J Lipid Res.* 25, 97-110.
- Krauss,G. (1999). *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation.* (Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH).
- Krejci,I. und Polacek,I. (1968). Effect of magnesium on the action of oxytocin and a group of analogues on the uterus in vitro. *Eur. J Pharmacol* 2, 393-398.
- Krueger,K.E. und Papadopoulos,V. (1990). Peripheral-type benzodiazepine receptors mediate translocation of cholesterol from outer to inner mitochondrial membranes in adrenocortical cells. *J Biol Chem.* 265 , 15015-15022.
- Lagane,B., Gaibelet,G., Meilhoc,E., Masson,J.M., Cezanne,L., und Lopez,A. (2000). Role of sterols in modulating the human mu-opioid receptor function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275, 33197-33200.
- Lange,Y. (1991). Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts. *J Lipid Res.* 32, 329-339.
- Lange,Y. (1994). Cholesterol movement from plasma membrane to rough endoplasmic reticulum. Inhibition by progesterone. *J. Biol. Chem.* 269, 3411-3414.
- Lange,Y., Echevarria,F., und Steck,T.L. (1991). Movement of zymosterol, a precursor of cholesterol, among three membranes in human fibroblasts. *J Biol. Chem.* 266, 21439-21443.
- Lange,Y., Strebel,F., und Steck,T.L. (1993). Role of the plasma membrane in cholesterol esterification in rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 268, 13838-13843.

- Lange, Y., Swaisgood, M.H., Ramos, B.V., und Steck, T.L. (1989). Plasma membranes contain half the phospholipid and 90% of the cholesterol and sphingomyelin in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *264*, 3786-3793.
- Lange, Y., Ye, J., und Chin, J. (1997). The fate of cholesterol exiting lysosomes. *J. Biol. Chem.* *272*, 17018-17022.
- Lange, Y., Ye, J., und Steck, T.L. (1998). Circulation of cholesterol between lysosomes and the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* *273*, 18915-18922.
- Lange, Y., Ye, J., Rigney, M., und Steck, T.L. (2002). Dynamics of lysosomal cholesterol in Niemann-Pick type C and normal human fibroblasts. *J. Lipid Res.* *43*, 198-204.
- Lefkowitz, R.J. (1998). G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem.* *273*, 18677-18680.
- Li, H. und Papadopoulos, V. (1998). Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor Function in Cholesterol Transport. Identification of a Putative Cholesterol Recognition/Interaction Amino Acid Sequence and Consensus Pattern. *Endocrinology* *139*, 4991-4997.
- Lin, S., Cheng, D., Liu, M.S., Chen, J., und Chang, T.Y. (1999). Human acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 in the endoplasmic reticulum contains seven transmembrane domains. *J. Biol. Chem.* *274*, 23276-23285.
- Liscum, L. und Munn, N.J. (1999). Intracellular cholesterol transport. *Biochim. Biophys. Acta* *1438*, 19-37.
- Londos, C., Brasaemle, D.L., Schultz, C.J., Segrest, J.P., und Kimmel, A.R. (1999). Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* *10*, 51-58.
- Luong, J.H., Brown, R.S., Male, K.B., Cattaneo, M.V., und Zhao, S. (1995). Enzyme reactions in the presence of cyclodextrins: biosensors and enzyme assays. *Trends Biotechnol.* *13*, 457-463.
- Luttrell, L.M., Daaka, Y., Della Rocca, G.J., und Lefkowitz, R.J. (1997). G protein-coupled receptors mediate two functionally distinct pathways of tyrosine phosphorylation in rat 1a fibroblasts. Shc phosphorylation and receptor endocytosis correlate with activation of Erk kinases. *J. Biol. Chem.* *272*, 31648-31656.
- Mahlberg, F.H. und Rothblat, G.H. (1992). Cellular cholesterol efflux. Role of cell membrane kinetic pools and interaction with apolipoproteins AI, AII, and Cs. *J Biol Chem.* *267*, 4541-4550.
- Mason, W.T. (1980). Supraoptic neurones of rat hypothalamus are osmosensitive. *Nature* *287*, 154-157.
- McGee, T.P., Cheng, H.H., Kumagai, H., Omura, S., und Simoni, R.D. (1996). Degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in endoplasmic reticulum membranes is

- accelerated as a result of increased susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem.* 271, 25630-25638.
- Mendez,A.J. (1995). Monensin and brefeldin A inhibit high density lipoprotein-mediated cholesterol efflux from cholesterol-enriched cells. Implications for intracellular cholesterol transport. *J Biol Chem.* 270, 5891-5900.
- Miller,F.D., Chibbar,R., und Mitchell,B.F. (1993). Synthesis of oxytocin in amnion, chorion and decidua: a potential paracrine role for oxytocin in the onset of human parturition. *Regul. Pept.* 45, 247-251.
- Mitchell,D.C., Straume,M., Miller,J.L., und Litman,B.J. (1990). Modulation of metarhodopsin formation by cholesterol-induced ordering of bilayer lipids. *Biochemistry* 29, 9143-9149.
- Mizobe,T., Maze,M., Lam,V., Suryanarayana,S., und Kobilka,B.K. (1996). Arrangement of transmembrane domains in adrenergic receptors. Similarity to bacteriorhodopsin. *J Biol. Chem.* 271, 2387-2389.
- Morris,G.M., Goodsell,D.S., Huey,R., und Olson,A.J. (1996). Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: parallel applications of AutoDock 2.4. *J. Comput. Aided Mol Des* 10, 293-304.
- Morris,J.A. und Carstea,E.D. (1998). Niemann-Pick C disease: cholesterol handling gone awry. *Mol Med Today* 4, 525-531.
- Mukherjee,S. und Maxfield,F.R. (1999). Cholesterol: stuck in traffic. *Nat. Cell Biol.* 1, E37-E38.
- Mukherjee,S., Zha,X., Tabas,I., und Maxfield,F.R. (1998). Cholesterol distribution in living cells: fluorescence imaging using dehydroergosterol as a fluorescent cholesterol analog. *Biophys. J.* 75, 1915-1925.
- Murata,M., Peranen,J., Schreiner,R., Wieland,F., Kurzchalia,T.V., und Simons,K. (1995). VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 10339-10343.
- Narayanaswami,V. und McNamee,M.G. (1993). Protein-lipid interactions and Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor function. 2. Membrane fluidity and ligand-mediated alteration in the accessibility of gamma subunit cysteine residues to cholesterol. *Biochemistry* 32, 12420-12427.
- Neufeld,E.B., Cooney,A.M., Pitha,J., Dawidowicz,E.A., Dwyer,N.K., Pentchev,P.G., und Blanchette-Mackie,E.J. (1996). Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *J Biol. Chem.* 271, 21604-21613.
- Noel,J.P., Hamm,H.E., und Sigler,P.B. (1993). The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP gamma S. *Nature* 366, 654-663.
- Nunez,M.T. und Glass,J. (1982). Reconstitution of the transferrin receptor in lipid vesicles. Effect of cholesterol on the binding of transferrin. *Biochemistry* 21, 4139-4143.

- Oelkers,P., Behari,A., Cromley,D., Billheimer,J.T., und Sturley,S.L. (1998). Characterization of two human genes encoding acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase-related enzymes. *J Biol. Chem.* 273, 26765-26771.
- Okamoto,T., Schlegel,A., Scherer,P.E., und Lisanti,M.P. (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 273, 5419-5422.
- Op den Kamp,J.A. (1979). Lipid asymmetry in membranes. *Annu. Rev Biochem.* 48, 47-71.
- Oram,J.F. (2000). Tangier disease and ABCA1. *Biochim. Biophys. Acta* 1529, 321-330.
- Oram,J.F. und Yokoyama,S. (1996). Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J Lipid Res.* 37, 2473-2491.
- Ostermeyer,A.G., Paci,J.M., Zeng,Y., Lublin,D.M., Munro,S., und Brown,D.A. (2001). Accumulation of caveolin in the endoplasmic reticulum redirects the protein to lipid storage droplets. *J Cell Biol* 152, 1071-1078.
- Ott,I. und Scott,J.C. (1910). The action of infundibulin upon the mammary secretion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 8, 48-49.
- Palczewski,K., Kumasaka,T., Hori,T., Behnke,C.A., Motoshima,H., Fox,B.A., Trong,I.L., Teller,D.C., Okada,T., Stenkamp,R.E., Yamamoto,M., und Miyano,M. (2000). Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* 289, 739-745.
- Palmer,M., Vulicevic,I., Saweljew,P., Valeva,A., Kehoe,M., und Bhakdi,S. (1998). Streptolysin O: a proposed model of allosteric interaction between a pore-forming protein and its target lipid bilayer. *Biochemistry* 37, 2378-2383.
- Pang,L., Graziano,M., und Wang,S. (1999). Membrane cholesterol modulates galanin-GalR2 interaction. *Biochemistry* 38, 12003-12011.
- Papadopoulos,V. (1996). Pharmacologic influence on androgen biosynthesis. In *The Leydig Cell*, A.H.Payne, M.P.Hardy, und L.D.Russel, eds. (Vienna, IL: Cache River Press), pp. 598-628.
- PCModel (1991). Bloomington, IN (USA), Serena Software.
- Pedersen,C.A., Caldwell,J.D., Peterson,G., Walker,C.H., und Mason,G.A. (1992). Oxytocin activation of maternal behavior in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 652, 58-69.
- Pelletier,R.M. und Vitale,M.L. (1994). Filipin vs enzymatic localization of cholesterol in guinea pig, mink, and mallard duck testicular cells. *J Histochem. Cytochem.* 42, 1539-1554.
- Peterson,B.R., Mordasini-Denti,T., und Diederich,F. (1995). Cavity depth and width effects on cyclophane-steroid recognition: molecular complexation of cholesterol and progesterone in aqueous solution. *Chem. Biol* 2, 139-146.

- Pitcher, J.A., Touhara, K., Payne, E.S., und Lefkowitz, R.J. (1995). Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid. *J. Biol. Chem.* 270, 11707-11710.
- Pliska, V. und Kohlhauf, A.H. (1991). Effect of Mg²⁺ on the binding of oxytocin to sheep myometrial cells. *Biochem. J* 277 (Pt 1), 97-101.
- Pogozheva, I.D., Lomize, A.L., und Mosberg, H.I. (1997). The transmembrane 7-alpha-bundle of rhodopsin: distance geometry calculations with hydrogen bonding constraints. *Biophys. J* 72, 1963-1985.
- Pogozheva, I.D., Lomize, A.L., und Mosberg, H.I. (1998). Opioid receptor three-dimensional structures from distance geometry calculations with hydrogen bonding constraints. *Biophys. J* 75, 612-634.
- Pol, A., Luetterforst, R., Lindsay, M., Heino, S., Ikonen, E., und Parton, R.G. (2001). A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J Cell Biol* 152, 1057-1070.
- Politowska, E., Kazmierkiewicz, R., Wiegand, V., Fahrenholz, F., und Ciarkowski, J. (2001). Molecular modelling study of the role of cholesterol in the stimulation of the oxytocin receptor. *Acta Biochim. Pol.* 48, 83-93.
- Postina, R., Kojro, E., und Fahrenholz, F. (1996). Separate agonist and peptide antagonist binding sites of the oxytocin receptor defined by their transfer into the V2 vasopressin receptor. *J. Biol. Chem.* 271, 31593-31601.
- Pralle, A., Keller, P., Florin, E.L., Simons, K., und Horber, J.K. (2000). Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* 148, 997-1008.
- Prattes, S., Horl, G., Hammer, A., Blaschitz, A., Graier, W.F., Sattler, W., Zechner, R., und Steyrer, E. (2000). Intracellular distribution and mobilization of unesterified cholesterol in adipocytes: triglyceride droplets are surrounded by cholesterol-rich ER-like surface layer structures. *J Cell Sci* 113 (Pt 17), 2977-2989.
- Probst, W.C., Snyder, L.A., Schuster, D.I., Brosius, J., und Sealfon, S.C. (1992). Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol.* 11, 1-20.
- Reinhart, M.P. (1990). Intracellular sterol trafficking. *Experientia* 46, 599-611.
- Reitz, J. Synthese und funktionelle Charakterisierung eines fluoreszierenden Cholesterin-Analogons. 2001. Diplomarbeit Universität Mainz.
- Roettger, B.F., Rentsch, R.U., Pinon, D., Holicky, E., Hadac, E., Larkin, J.M., und Miller, L.J. (1995). Dual pathways of internalization of the cholecystokinin receptor. *J. Cell Biol.* 128, 1029-1041.
- Rogers, J., Lee, A.G., und Wilton, D.C. (1979). The organisation of cholesterol and ergosterol in lipid bilayers based on studies using non-perturbing fluorescent sterol probes. *Biochim. Biophys. Acta* 552, 23-37.

- Roitelman,J., Olender,E.H., Bar-Nun,S., Dunn,W.A., Jr., und Simoni,R.D. (1992). Immunological evidence for eight spans in the membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: implications for enzyme degradation in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 117, 959-973.
- Ross,A.C., Go,K.J., Heider,J.G., und Rothblat,G.H. (1984). Selective inhibition of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase by compound 58-035. *J Biol. Chem.* 259, 815-819.
- Rothblat,G.H., Llera-Moya,M., Atger,V., Kellner-Weibel,G., Williams,D.L., und Phillips,M.C. (1999). Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J Lipid Res.* 40, 781-796.
- Sausville,E., Carney,D., und Battey,J. (1985). The human vasopressin gene is linked to the oxytocin gene and is selectively expressed in a cultured lung cancer cell line. *J. Biol. Chem.* 260, 10236-10241.
- Schroeder,F., Butko,P., Nemezc,G., und Scallen,T.J. (1990). Interaction of fluorescent delta 5,7,9(11),22-ergostetraen-3 beta-ol with sterol carrier protein-2. *J. Biol. Chem.* 265, 151-157.
- Schroeder,F., Frolov,A.A., Murphy,E.J., Atshaves,B.P., Jefferson,J.R., Pu,L., Wood,W.G., Foxworth,W.B., und Kier,A.B. (1996). Recent advances in membrane cholesterol domain dynamics and intracellular cholesterol trafficking. *Proc. Soc. Exp. Biol Med* 213, 150-177.
- Schroeder,F., Woodford,J.K., Kavecansky,J., Wood,W.G., und Joiner,C. (1995). Cholesterol domains in biological membranes. *Mol Membr. Biol.* 12, 113-119.
- Schutz,G.J., Kada,G., Pastushenko,V.P., und Schindler,H. (2000). Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J.* 19, 892-901.
- Scott,J. (1999). Heart disease. Good cholesterol news. *Nature* 400, 816-7, 819.
- Shimada,Y., Nakamura,M., Naito,Y., Nomura,K., und Ohno-Iwashita,Y. (1999). C-terminal amino acid residues are required for the folding and cholesterol binding property of perfringolysin O, a pore-forming cytolysin. *J Biol Chem.* 274, 18536-18542.
- Silver,D.L. und Tall,A.R. (2001). The cellular biology of scavenger receptor class B type I. *Curr Opin Lipidol.* 12, 497-504.
- Simons,K. und Ikonen,E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Simons,K. und Toomre,D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39.
- Skiba,P.J., Zha,X., Maxfield,F.R., Schissel,S.L., und Tabas,I. (1996). The Distal Pathway of Lipoprotein-induced Cholesterol Esterification, but Not Sphingomyelinase-induced Cholesterol Esterification, Is Energy-dependent. *J. Biol. Chem.* 271, 13392-13400.

- Slusarz,R., Kazmierkiewicz,R., Gieldon,A., Lammek,B., und Ciarkowski,J. (2001). Molecular docking-based test for affinities of two ligands toward vasopressin and oxytocin receptors. *Acta Biochim. Pol.* *48*, 131-135.
- Smart,E.J., Foster,D.C., Ying,Y.S., Kamen,B.A., und Anderson,R.G. (1994). Protein kinase C activators inhibit receptor-mediated potocytosis by preventing internalization of caveolae. *J. Cell Biol.* *124*, 307-313.
- Smart,E.J., Ying,Y., Donzell,W.C., und Anderson,R.G. (1996). A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J. Biol. Chem.* *271*, 29427-29435.
- Soloff,M.S. und Swartz,T.L. (1974). Characterization of a proposed oxytocin receptor in the uterus of the rat and sow. *J Biol. Chem.* *249*, 1376-1381.
- Sondek,J., Bohm,A., Lambright,D.G., Hamm,H.E., und Sigler,P.B. (1996). Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution. *Nature* *379*, 369-374.
- Sparrow,C.P., Patel,S., Baffic,J., Chao,Y.S., Hernandez,M., Lam,M.H., Montenegro,J., Wright,S.D., und Detmers,P.A. (1999). A fluorescent cholesterol analog traces cholesterol absorption in hamsters and is esterified in vivo and in vitro. *J Lipid Res.* *40*, 1747-1757.
- Spillane,D.M., Reagan,J.W., Jr., Kennedy,N.J., Schneider,D.L., und Chang,T.Y. (1995). Translocation of both lysosomal LDL-derived cholesterol and plasma membrane cholesterol to the endoplasmic reticulum for esterification may require common cellular factors involved in cholesterol egress from the acidic compartments (lysosomes/endosomes). *Biochim. Biophys. Acta* *1254*, 283-294.
- Steer,C.J., Bisher,M., Blumenthal,R., und Steven,A.C. (1984). Detection of membrane cholesterol by filipin in isolated rat liver coated vesicles is dependent upon removal of the clathrin coat. *J Cell Biol.* *99*, 315-319.
- Straume,M. und Litman,B.J. (1987). Influence of cholesterol on equilibrium and dynamic bilayer structure of unsaturated acyl chain phosphatidylcholine vesicles as determined from higher order analysis of fluorescence anisotropy decay. *Biochemistry* *26*, 5121-5126.
- Straume,M. und Litman,B.J. (1988). Equilibrium and dynamic bilayer structural properties of unsaturated acyl chain phosphatidylcholine-cholesterol-rhodopsin recombinant vesicles and rod outer segment disk membranes as determined from higher order analysis of fluorescence anisotropy decay. *Biochemistry* *27*, 7723-7733.
- Stryer,L. (1986). Cyclic GMP cascade of vision. *Annu. Rev Neurosci.* *9*, 87-119.
- Sturley,S.L. (1997). Molecular aspects of intracellular sterol esterification: the acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase reaction. *Curr Opin Lipidol.* *8*, 167-173.
- Terpstra,V., Van Amersfoort,E.S., van Velzen,A.G., Kuiper,J., und Van Berkel,T.J.C. (2000). Hepatic and Extrahepatic Scavenger Receptors : Function in Relation to Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* *20*, 1860-1872.

- Thiele,C., Hannah,M.J., Fahrenholz,F., und Huttner,W.B. (2000). Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat. Cell Biol.* 2, 42-49.
- Uittenbogaard,A., Ying,Y., und Smart,E.J. (1998). Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J. Biol. Chem.* 273, 6525-6532.
- Ullian,M.E. und Linas,S.L. (1990). Angiotensin II surface receptor coupling to inositol trisphosphate formation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 265, 195-200.
- Underwood,K.W., Andemariam,B., McWilliams,G.L., und Liscum,L. (1996). Quantitative analysis of hydrophobic amine inhibition of intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res.* 37, 1556-1568.
- Underwood,K.W., Jacobs,N.L., Howley,A., und Liscum,L. (1998). Evidence for a cholesterol transport pathway from lysosomes to endoplasmic reticulum that is independent of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 273, 4266-4274.
- Unger,V.M., Hargrave,P.A., Baldwin,J.M., und Schertler,G.F. (1997). Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. *Nature* 389, 203-206.
- Urbani,L. und 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.
- van Meer,G. (1989). Lipid traffic in animal cells. *Annu. Rev Cell Biol.* 5, 247-275.
- Varma,R. und Mayor,S. (1998). GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* 394, 798-801.
- Vaughan,M. (1998). G protein-coupled receptors minireview series. *J Biol. Chem.* 273, 17297.
- Wesley,V.J., Hawtin,S.R., Howard,H.C., und Wheatley,M. (2002). Agonist-specific, high-affinity binding epitopes are contributed by an arginine in the N-terminus of the human oxytocin receptor. *Biochemistry* 41, 5086-5092.
- Wiegand, V. (1998). Fluoreszierende Cholesterinderivate und ihre Wirkung auf die Agonistenbindung des Oxytocinrezeptors. Diplomarbeit Universität Mainz.
- Wustner,D., Herrmann,A., Hao,M., und Maxfield,F.R. (2002). Rapid nonvesicular transport of sterol between the plasma membrane domains of polarized hepatic cells. *J. Biol. Chem.* M202626200.
- Yancey,P.G., Rodriguez,W.V., Kilsdonk,E.P., Stoudt,G.W., Johnson,W.J., Phillips,M.C., und Rothblat,G.H. (1996). Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration Of kinetic pools and mechanism of efflux. *J Biol Chem.* 271, 16026-16034.
- Yeagle,P.L. (1985). Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 822, 267-287.

- Yeagle, P.L., Albert, A.D., Boesze-Battaglia, K., Young, J., und Frye, J. (1990). Cholesterol dynamics in membranes. *Biophys. J* 57, 413-424.
- Yokoyama, S. (1998). Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *Biochim. Biophys. Acta* 1392, 1-15