

**Untersuchungen zur Interaktion von Cholesterin mit
cholesterinbindenden Proteinen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

Julian Reitz

geboren in Idar-Oberstein

Mainz 2006

Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 12. 2006

Inhalt

1 Zusammenfassung.....	8
2 Einleitung.....	9
2.1 Cholesterin.....	9
2.1.1 Eigenschaften und Struktur des Cholesterins.....	9
2.1.2 Intrazellulärer Cholesterintransport.....	10
2.1.3 Cholesterin in biologischen Membranen.....	16
2.1.4 Einfluss auf Membranproteine.....	19
2.1.5 Die Regulation der Cholesterinbiosynthese.....	20
2.1.6 Die Rolle von SCAP und SREBPs bei der Regulation der Cholesterinbiosynthese.....	22
2.1.7 Die Rolle von 25-Hydroxycholesterin bei der Regulation der Cholesterinbiosynthese.....	26
2.1.8 Die Rolle der HMG-CoA-Reduktase bei der Regulation der Cholesterinbiosynthese.....	27
2.2 Steroidhormone.....	28
2.2.1 Die Steroidbiosynthese.....	28
2.2.2 Die Rolle des StAR-Proteins bei der Biosynthese von Steroiden.....	30
2.2.3 Die Rolle des MLN 64-Proteins bei der Biosynthese von Steroiden.....	39
2.3 G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	40
2.3.1 Funktion und Struktur der G-Protein gekoppelten Rezeptoren.....	40
2.3.2 Der Oxytocinrezeptor.....	44
2.3.3 Regulation der Affinität des Oxytocinrezeptors durch Cholesterin.....	47
2.4 Ziele der Arbeit.....	51
3 Material und Methoden.....	52

3.1 Chemikalien und Geräte.....	52
3.1.1 Chemikalien für molekularbiologische Arbeiten.....	52
3.1.2 Reagenzien und Geräte für Western-Blots.....	53
3.1.3 Chemikalien und Geräte für Radioliganden-Bindungstests.....	53
3.1.4 Geräte, Chemikalien und Medien für die Kultur eukaryotischer Zellen.....	53
3.1.5 Geräte und Chemikalien für die Bakterienkultur.....	54
3.1.6 Zentrifugen.....	54
3.1.7 Chromatographie.....	54
3.1.8 Sonstige Materialien und Geräte.....	54
3.1.9 Häufig verwendete Puffer.....	55
3.1.10 Plasmide.....	56
3.1.11 Zelllinien.....	56
3.1.12 Bakterien.....	57
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	57
3.2.1 Kultivierung von <i>E.coli</i> DH5 α	57
3.2.2 Herstellung von kompetenten DH5 α - <i>E.coli</i> -Zellen.....	58
3.2.3 Transformation von <i>E.coli</i> DH5 α	58
3.2.4 Plasmid isolation aus Bakterienzellen.....	59
3.2.5 Ethanol fällung.....	61
3.2.6 Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA.....	61
3.2.7 Restriktion von Plasmid-DNA.....	62
3.2.8 Ligation von Plasmid-DNA.....	62
3.2.9 Agarose-Gelelektrophorese.....	62
3.2.10 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	63

3.3 Proteinexpression in Bakterienzellen.....	64
3.4 Proteinbestimmung.....	66
3.5 Proteinfällung.....	66
3.6 Zellkultur.....	66
3.6.1 Transiente Transfektion von SRD13A-Zellen.....	67
3.6.2 Stabile Transfektion von HEK-Zellen mit dem Flp-In-System.....	68
3.6.3 Anlegen von Dauerkulturen.....	69
3.7 Zellernte und Membranpräparationen.....	70
3.7.1 Präparation von HEK-OTR-Membranen.....	70
3.7.2 Präparation von Membranen aus SRD13A- und CHO-Zellen.....	70
3.7.3 Dichtegradientenzentrifugation zur Reinigung von Plasmamembranen.....	71
3.8 Veränderung der Steroidzusammensetzung von Zellen oder Membranen.....	71
3.8.1 Herstellung von Cyclodextrin-Komplexen.....	72
3.8.2 Veränderung des Steroidgehalts lebender Zellen.....	72
3.8.3 Veränderung des Steroidgehalts von Membranen.....	72
3.9 Radioliganden-Bindungstests.....	73
3.9.1 Bindungstest an Zellmembranen.....	73
3.9.2 Bindungstest an solubilisierten Zellmembranen.....	74
3.10 Synthese des fotoreaktiven Cholesterin-Analogons.....	75
3.11 Fotoaffinitätsmarkierungen.....	76
3.12 Chemische Spaltung von Proteinen mit Cyanbromid.....	78
3.13 Enzymatische Spaltung von Proteinen.....	78
3.14 Gelelektrophorese.....	79
3.14.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	79

3.14.2 Tricingele.....	80
3.14.3 Schäggergele.....	81
3.14.4 Röhrchengele.....	81
3.14.5 Blue Native Gele.....	82
3.15 Coomassie-Färbung.....	83
3.16 Western-Blot.....	83
3.17 Immunpräzipitierung.....	85
3.18 Reinigung des Oxytocinrezeptors mittels WGA-Agarose.....	85
3.19 Isolierung von SCAP-TM1-6 mit Anti-Flag-Affinitätsmatrix und Calmodulin-Affinitätsmatrix.....	86
3.20 Fluoreszenzspektroskopie.....	87
3.21 Massenspektrometrie.....	87
4 Ergebnisse.....	89
4.1 Charakterisierung der Cholesterinbindungsstelle des StAR-Proteins.....	89
4.2 Charakterisierung der Cholesterinbindungsstelle des MLN64-Proteins.....	114
4.3 Charakterisierung der Cholesterinbindungsstelle des Oxytocinrezeptors.....	120
4.4 Charakterisierung der Cholesterinbindungsstelle des SCAP-Proteins.....	128
4.5 Untersuchungen zur Regulation der SCAP-Insig-Interaktion durch Cholesterin und 25-Hydroxycholesterin.....	136
5 Diskussion.....	146
5.1 Charakterisierung der Cholesterinbindungsstelle des StAR-Proteins.....	146
5.2 Charakterisierung der Cholesterinbindungsstelle des MLN 64-Proteins.....	153
5.3 Charakterisierung der Cholesterinbindungsstelle des Oxytocinrezeptors.....	157

5.4 Charakterisierung der Cholesterinbindungsstelle des SCAP-Proteins.....	160
5.5 Untersuchungen zur Regulation der SCAP-Insig-Interaktion durch Cholesterin und 25-Hydroxycholesterin.....	161
6 Anhang.....	163
6.1 Literaturverzeichnis.....	163
6.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	178
6.3 Abkürzungsverzeichnis.....	183

1. Zusammenfassung

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Biosynthese von Steroidhormonen ist der Transport von Cholesterin von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran, wo es zu dem Steroid Pregnenolon umgewandelt wird. Für diesen Transport ist das StAR-Protein (**S**teroidogenic **A**cute **R**egulatory **P**rotein) notwendig. Ein weiteres an der Bildung von Steroidhormonen beteiligtes Protein ist das MLN64-Protein. Beide Proteine besitzen so genannte START-Domänen (**StAR** related **L**ipid **T**ransfer-Domänen), die Cholesterin binden können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die START-Domänen von StAR und MLN64 Cholesterin auf unterschiedliche Weise binden. Es ist noch nicht geklärt, auf welche Weise das StAR-Protein den Cholesterintransport in die Mitochondrien bewirkt. Das StAR-Protein könnte Cholesterin binden und als Cholesterintransporter zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran fungieren. Nach einer anderen Hypothese wirkt das StAR-Protein ausschließlich an der äußeren Mitochondrienmembran. Es wird auch postuliert, dass das StAR-Protein in einem teilweise entfalteten Zustand vorliegen muss, um seine Funktion erfüllen zu können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass StAR ein fotoreaktives Cholesterinderivat bindet. Die Cholesterinbindungsstelle des StAR-Proteins konnte eingegrenzt werden. Es wurden Experimente durchgeführt, um zu überprüfen, ob das Protein tatsächlich nur in teilweise entfaltetem Zustand aktiv ist. Die Cholesterinbindung des MLN64-Proteins wurde ebenfalls mit dem fotoreaktiven Cholesterinderivat untersucht. Dabei zeigte sich, dass MLN64 offenbar mehrere Bindungsstellen für Cholesterin besitzt. Weitere Experimente beschäftigten sich mit der Charakterisierung der Cholesterinbindungsstelle des humanen Oxytocinrezeptors, eines G-Protein gekoppelten Hormonrezeptors, der durch Cholesterin reguliert wird. Dabei kam auch wieder das fotoreaktive Cholesterinderivat zum Einsatz. Außerdem wurden in dieser Arbeit Experimente durchgeführt, die sich mit der Regulation der Cholesterinbiosynthese befassten. Die Biosynthese des Cholesterins wird reguliert, indem in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums verankerte Transkriptionsfaktoren proteolytisch freigesetzt werden. Das passiert nur dann, wenn der zelluläre Cholesterinspiegel niedrig ist. Bei diesem Regulationsmechanismus spielt das Protein SCAP eine zentrale Rolle (**S**terol responsive element binding protein **C**leavage **A**ctivating **P**rotein). SCAP bindet Cholesterin spezifisch und wird dadurch reguliert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Bereich von SCAP eingegrenzt werden, der Cholesterin bindet. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von SCAP mit einem anderen, als Insig bezeichneten Protein indirekt durch das Cholesterinderivat 25-Hydroxycholesterin reguliert wird.

2 Einleitung

2.1 Cholesterin

2.1.1 Eigenschaften und Struktur des Cholesterins

Cholesterin beeinflusst die Eigenschaften eukaryotischer Membranen und auch Membranproteine in ihrer Funktion. Es ist außerdem die Vorstufe für die Biosynthese von Steroidhormonen wie Progesteron, Testosteron, Östradiol und Cortisol. Auch Gallensäuren leiten sich vom Cholesterin ab. Aus Gallensteinen ist das Cholesterin 1784 auch zum ersten Mal isoliert worden. Die Bezeichnung Cholesterin stammt von den beiden griechischen Wörtern Cholé für Galle und stear: Fett.

Cholesterin (Cholest-5-en-3 β -ol) enthält ein tetrazyklisches Ringsystem in trans-Konfiguration, welches ihm seine fast planare Struktur verleiht (Abb. 1). 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 O₂) stellt auch die einzige polare Stelle des Moleküls dar. Sowohl die 3-OH-Gruppe, die beiden Methylgruppen als auch die Seitenkette befinden sich auf derselben Seite der Ringebene (β -Konfiguration).

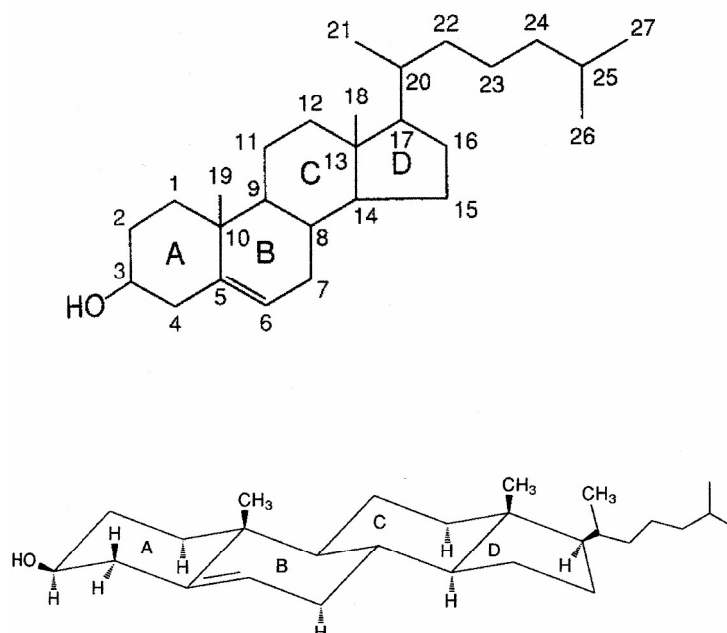


Abbildung 1 : Struktur des Cholesterins.

2.1.2 Cholesterintransport

Da Cholesterin in Wasser unlöslich ist, muss es im Körper und innerhalb der Zellen an Proteine gebunden transportiert werden. Innerhalb der Zelle besteht außerdem noch die Möglichkeit, dass durch Membrankontakte der Zellorganellen ein Cholesterinfluss von cholesterinreichen Organellen zu cholesterinärmeren Zuständen kommen kann.

Die wichtigsten Cholesterin-Transportermoleküle im Blut sind die LDL-Partikel (Low Density-Lipoproteins). LDL-Partikel haben einen Durchmesser von 22 nm und eine Masse von circa drei Millionen Dalton. Sie bestehen aus einem Kern von etwa 1500 veresterten Cholesterinmolekülen; als häufigste Fettsäurekette in diesen Estern findet man Linolat, eine mehrfach ungesättigte Fettsäure. Dieser stark hydrophobe Kern ist von einer Hülle aus Phospholipiden und unverestertem Cholesterin umgeben. Die Hülle enthält außerdem ein einziges B-100-Molekül, ein Proteinmolekül mit einer Masse von 514 kDa. Die Funktion der LDL-Partikel besteht darin, Cholesterin zu peripheren Geweben zu transportieren und dort die *de novo*-Synthese von Cholesterin zu kontrollieren. Die Cholesterinaufnahme und der intrazelluläre Cholesterintransport verlaufen nach folgendem Schema (Abb. 2): Die B-100-Proteinkomponente des LDL bindet an ein spezifisches Rezeptorprotein auf der Plasmamembran. Diese LDL-Rezeptoren befinden sich in spezialisierten Membranbereichen. Aus diesen Membranbereichen können coated pits entstehen, die Clathrin enthalten. Der Rezeptor-LDL-Komplex wird durch Endocytose aufgenommen; die Plasmamembran in der Nähe des Komplexes stülpt sich ein und verschmilzt zu einem Endocytosevesikel. Die LDL-haltigen Vesikel verschmelzen schließlich mit Lysosomen, die zahlreiche Verdauungsenzyme enthalten. Die Proteinkomponente des LDL wird zu freien Aminosäuren hydrolysiert. Die Cholesterinester werden durch eine lysosomale saure Lipase hydrolysiert. Das unveresterte Cholesterin kann von dort zur Plasmamembran zurücktransportiert werden. Der LDL-Rezeptor selbst kehrt meistens unversehrt zur Plasmamembran zurück. Der Umlauf eines Rezeptors dauert etwa zehn Minuten; während seiner Lebensdauer von einem Tag kann er viele LDL-Partikel in die Zelle bringen. Ein Teil des Cholesterins wird von den Lysosomen zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert. Vom ER, wo auch die Neusynthese stattfindet, wird Cholesterin zur Plasmamembran transportiert. Das unveresterte Cholesterin kann für die Membransynthese verwendet oder zur Speicherung in der Zelle erneut verestert werden. Die erneute Veresterung wird durch das im ER lokalisierte Enzym Acyl-Coenzym A: Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) katalysiert.

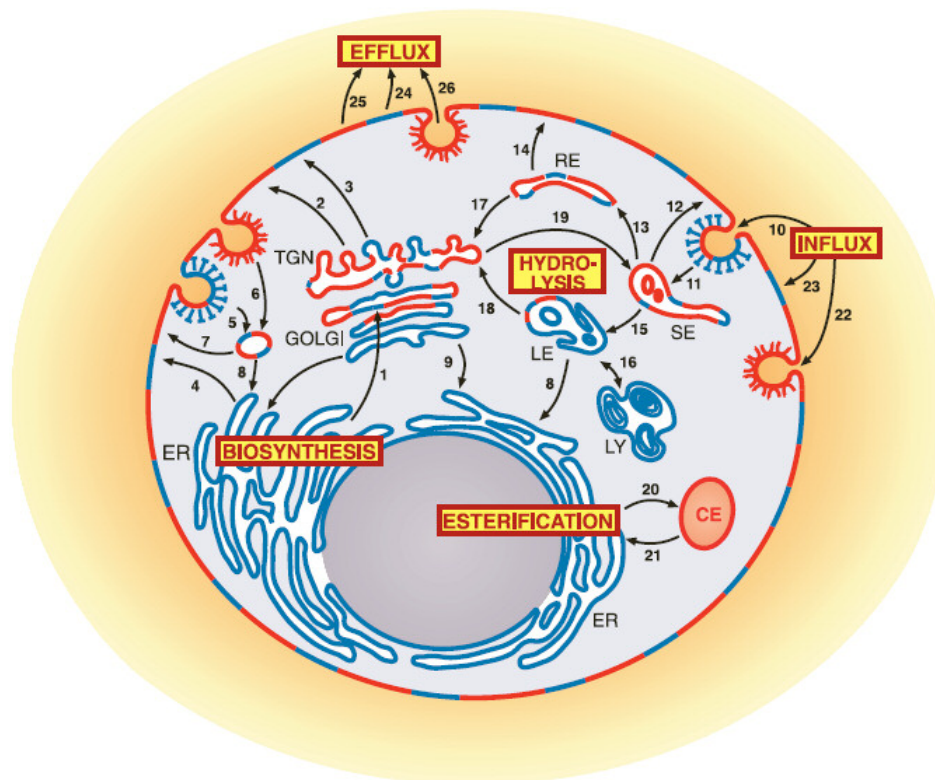


Abbildung 2: Cholesterinbiosynthese, Aufnahme von Cholesterin in die Zelle und intrazellulärer Transport. Die Biosynthese des Cholesterins findet im Endoplasmatischen Retikulum (ER) statt. Ein Teil des neu synthetisierten Cholesterins wird über den Golgi Apparat und das Trans Golgi Netzwerk (TGN) zur Plasmamembran transportiert (1). In der Plasmamembran verteilt es sich auf cholesterinreiche (2, rot) und cholesterinarme (3, blau) Bereiche. Der größere Teil des Cholesterins wird direkt zur Zellmembran transportiert (4). Cholesterin kann durch Endocytose in die Zelle aufgenommen werden. Die an die LDL-Rezeptoren gebundenen LDL-Partikel werden über einen Clathrin-abhängigen Mechanismus endocytiert (5 und 10). Die LDL-Rezeptoren sind in den Bereichen der Plasmamembran konzentriert, die Clathrin enthalten und die arm an Sphingolipiden und Cholesterin sind. HDL-Partikel (High-Density-Lipoproteins) können auch in Zellen aufgenommen werden und zwar über den Scavenger-Rezeptor Typ B1 (SRB1). Der SRB1 ist in den cholesterin- und sphingolipidreichen Caveolae, die das cholesterinbindende Protein Caveolin enthalten, lokalisiert (6 und 22). Endocytiertes Cholesterin gelangt in die frühen Endosomen (sorting endosomes, SE, 11), die nahe der Zellperipherie gelegen sind und von dort entweder über Recycling-Endosomen (RE, 13) zur Plasmamembran zurück (14) oder es gelangt in die weiter zelleinwärts gelegenen späten Endosomen (LE, 15) und Lysosomen (LY, 16). Von den Endosomen und Lysosomen kann das Cholesterin direkt zur Plasmamembran zurücktransportiert werden (12 und 7) oder indirekt über Recycling Endosomen (RE, 13 und 14). Möglicherweise ist der Golgi-Apparat an diesem Transport beteiligt (18 und 3). Das in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisierte Protein ACAT (Acyl-CoA: Cholesterin Acyltransferase) katalysiert die Veresterung des aus den späten Endosomen/Lysosomen stammenden und des im ER neu synthetisierten Cholesterins. Das veresterte Cholesterin kann in intrazellulären Lipidtröpfchen gespeichert werden (CE, 20). Cholesterin kann von den späten Endosomen/Lysosomen zur Plasmamembran zurück transportiert werden. Abbildung aus Simons and Ikonen (2000).

ACAT wird durch unverestertes Cholesterin aktiviert. Wiederverestertes Cholesterin enthält hauptsächlich die einfach ungesättigten Fettsäuren Oleat und Palmitoleat - im Gegensatz zu den Cholesterinestern der LDL-Partikel, die viel Linolat, eine mehrfach ungesättigte Fettsäure, enthalten (Berg et al., 2002). Die Abgabe von Cholesterin an das Blutplasma kann durch die Lipoproteine hoher Dichte (HDL) erfolgen. Eine Acyltransferase der HDL-Partikel verestert dieses Cholesterin, das dann von einem Transferprotein an LDL-Partikel weitergegeben werden kann (Berg et al., 2002). Da Cholesterin wegen seiner geringen Wasserlöslichkeit praktisch nicht frei in der Zelle diffundieren kann, haben sich Transportmechanismen entwickelt. Im Prinzip lassen sich diese Transportmechanismen in drei Klassen einteilen (Abb. 3): Cholesterin kann in Vesikeln zwischen Membranen transportiert werden. Dazu ist ATP notwendig. Cholesterin kann auch an Transportproteine gebunden durch das Cytoplasma diffundieren. Wegen der Wasserunlöslichkeit des Cholesterins diffundiert nur ein sehr kleiner Teil auch ungebunden durch das Cytosol. Eine weitere Möglichkeit ist die Ausbildung von Membrankontakten, wodurch ein Cholesterinfluss von einem Zellorganell zu einem anderen stattfinden kann. Innerhalb der Membranen kann Cholesterin sowohl lateral als auch transversal, d.h. von der einen zur anderen Hälfte der Membran, diffundieren.

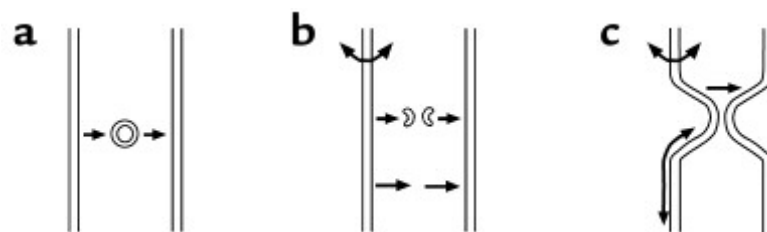


Abbildung 3: Drei grundlegende Mechanismen des intrazellulären Cholesterintransports: (a) vesikulärer Transport, (b) Cholesterintransport mittels Transportproteinen und (c) durch Ausbildung von Membrankontakten. Abbildung aus Maxfield und Wüstner (2001).

Der Cholesterintransport von Lysosomen zur Plasmamembran und von Lysosomen in das Zellinnere findet auf folgende Art und Weise statt: Die in LDL-Partikeln endocytiierten Cholesterinester werden in den Lysosomen hydrolysiert und ein Teil des dabei entstehenden freien Cholesterins taucht nach kurzer Zeit in den Caveolae der Plasmamembran auf, später auch in den anderen, cholesterinärmeren Membranbereichen (Fielding und Fielding, 1996). Ein anderer Teil des Cholesterins wird zum ER transportiert. Im ER wird ein Teil des Cholesterins von der ACAT wieder neu verestert. Man geht davon aus, dass aus den Lysosomen 70 % des Cholesterins zur Plasmamembran und 30 % zum ER transportiert

werden (Spillane et al., 1995; Neufeld et al., 1996; Underwood et al., 1996). Der Mechanismus des Transports vom Lysosom zur Plasmamembran ist dabei ein anderer als der des Transports vom Lysosom zum ER, weil sich der Transport vom Lysosom zum ER selektiv hemmen lässt (Underwood et al., 1998; Liscum, 1990). Der Transport vom Lysosom zum ER ist energieabhängig und durch N-Ethylmaleimid inhibierbar, was darauf hinweist, dass Vesikel beteiligt sind. Außerdem sind Aktinfilamente daran beteiligt. Der Golgi-Apparat spielt hier keine Rolle. Im Gegensatz dazu findet der Transport vom Lysosom zur Plasmamembran nur dann statt, wenn der Golgi-Apparat intakt ist. Ein intaktes Cytoskelett ist nicht notwendig. An Cholesterin- und Glykolipidtransport aus den Lysosomen hinaus ist das NPC1-Protein beteiligt (Niemann Pick C1-Protein). Ist das NPC1-Protein durch eine Mutation funktionsunfähig, wie z. B. bei der „Niemann Pick-Typ C“-Krankheit, so hat dies zur Folge, dass Cholesterin in der Zelle in späten Endosomen oder Lysosomen akkumuliert. Bekannt ist, dass es sich beim NPC1-Protein um ein Transmembranprotein aus 1278 Aminosäuren mit 13 bis 16 Transmembransegmenten handelt, das eine Sterol-sensitive Domäne und ein Leucin-Zipper-Motiv besitzt. Das Leucin-Zipper-Motiv hat möglicherweise die Funktion Wechselwirkungen mit anderen Proteinmolekülen zu vermitteln. Möglicherweise ist das NPC1-Protein für den zielgerichteten Transport von cholesterinhaltigen Vesikeln nötig, die sich von Lysosomen abschnüren (Liscum und Munn, 1999). Der Transport von Cholesterin aus den Lysosomen heraus lässt sich auch durch Progesteron inhibieren. Die Gabe von Progesteron bewirkt, dass Cholesterin in den Lysosomen akkumuliert. Dies hat dann zur Folge, dass weniger Cholesterin zum ER transportiert wird. Dadurch wiederum wird dann auch der Cholesterintransport vom ER zur Plasmamembran sowie die Veresterung und Speicherung in Lipidvesikeln eingeschränkt. Obwohl die letzten Schritte der Cholesterinbiosynthese von ER-Enzymen katalysiert werden, befindet sich mehr als die Hälfte des zellulären Cholesterins in der Plasmamembran (Liscum und Munn, 1999). Das neu synthetisierte Cholesterin wird schnell aus dem ER hinaus transportiert ($t_{1/2} = 10$ min). Wenn das Cholesterin die Plasmamembran erreicht, taucht es zuerst in den Caveolae-Domänen und danach erst in den anderen Membranbereichen auf (Fielding und Fielding, 1995; Smart et al., 1996). Für den Transport ist Energie in Form von ATP notwendig (DeGrella und Simoni, 1982; Kaplan und Simoni, 1985). An dem Transport sind das Protein Caveolin, das ABC-Translocator-Protein, die Proteine Cyclophilin 40 und Cyclophilin A, das HSP56-Protein sowie Caveolae in der Plasmamembran beteiligt. Möglicherweise wird das Cholesterin dabei an Proteine gebunden transportiert und nicht in Vesikeln (Uittenbogaard et al., 1998). Das Cytoskelett und der Golgi-Apparat sind an diesem

Transport nicht beteiligt. Dieser findet nämlich auch dann noch statt, wenn man diese beiden Organellen experimentell ausschaltet. Anderen Beobachtungen zufolge kann ein kleiner Teil des Cholesterins auch über den Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert werden. Für den Cholesterintransport vom ER zur Plasmamembran ist es nicht erforderlich, dass gleichzeitig Cholesterin von der Plasmamembran zum ER geliefert wird. Bei Gabe von Progesteron wird weniger Cholesterin vom ER zur Plasmamembran transportiert. Vom ER werden auch Zwischenprodukte der Cholesterinbiosynthese wie z. B. Lanosterol zur Plasmamembran transportiert. Von dort werden sie dann zu den Mitochondrien, zum Golgi-Apparat oder zurück zum ER transportiert (Lange et al., 1991). Im ER kann Cholesterin auch durch die ACAT verestert werden und dann in Form von Lipidtröpfchen in der Zelle gespeichert werden (Norum et al., 1977; Civen et al., 1984). Dieser Effekt tritt möglicherweise dann auf, wenn die Zellen einem Überangebot von Cholesterin ausgesetzt sind. Verestert wird das Cholesterin wahrscheinlich deshalb, weil zuviel freies Cholesterin eine toxische Wirkung auf Zellen hat.

Es findet ein ständiger Transport von Cholesterin aus der Plasmamembran in das Zellinnere und aus dem Zellinneren zurück zur Plasmamembran statt (Lange et al., 1993). In diesen Transportweg sind das Cytoskelett und Lysosomen involviert (Lange und Steck, 1994; Sarria et al., 1991; Evans, 1994). Diesen Transportweg blockieren Progesteron, hydrophobe Amine und Sphingosin (Lange, 1994; Harmala et al., 1994; Harmala et al., 1993). Man geht davon aus, dass das Cholesterin auf diesem Weg in Vesikeln transportiert wird. Das P-Glykoprotein, das in den Caveolae der Plasmamembran lokalisiert sein kann, ist möglicherweise an diesem Transportweg beteiligt, da eine erhöhte Expression dieses Proteins von einem erhöhten Cholesterintransport von der Plasmamembran zum ER begleitet wird (Luker, 1999).

In den Mitochondrien findet der erste Schritt der Steroidhormon-Biosynthese statt. Die Steroidhormone werden aus Cholesterin hergestellt. Man geht davon aus, dass in Steroidhormon produzierenden Zellen das für die Produktion der Hormone benötigte Cholesterin nicht in Vesikeln durch das Cytosol transportiert wird, da eine Fusion von Vesikeln mit der Mitochondrienmembran unwahrscheinlich ist. Ein alternativer Transportmechanismus besteht darin, dass Kontakte zwischen späten Endosomen und Mitochondrienmembran ausgebildet werden (Abb. 4). Solche Kontakte konnten von Zhang et al., (2002) beobachtet werden. Für den Cholesterintransport von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran ist das StAR Protein (Steroidogenic Acute Regulatory protein) nötig (Arakane et al., 1998, Stocco et al., 1996). Der Cholesterintransport in steroidogenen Zellen verläuft nach dem in Abb. 5 gezeigten Schema.

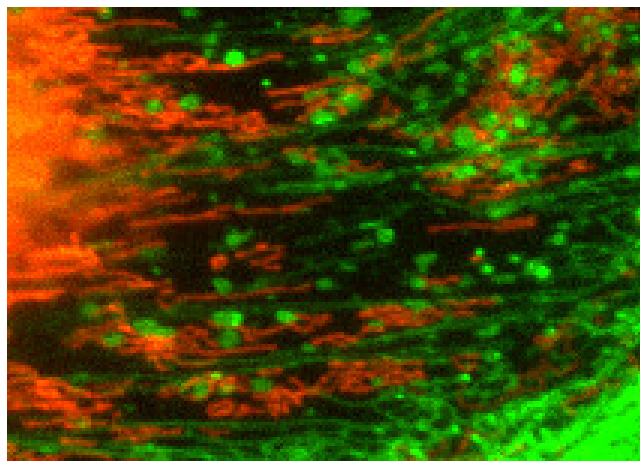


Abbildung 4: Endosomen- und Mitochondrienmembranen kommen in engen räumlichen Kontakt. CHO Zellen wurden mit einem MLN64-GFP Konstrukt und einem StAR-RFP Konstrukt kotransfiziert. Das MLN64-GFP wird in späten Endosomen, das StAR-RFP in Mitochondrien exprimiert. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zeigt, dass die späten Endosomen (grün) in engen räumlichen Kontakt mit den Mitochondrien (rot) kommen. Membrankontakte zwischen dem ER und den Mitochondrien könnten einen Fluss von Cholesterin von Endosomen zu Mitochondrien ermöglichen. Abbildung aus Zhang et al. (2002).

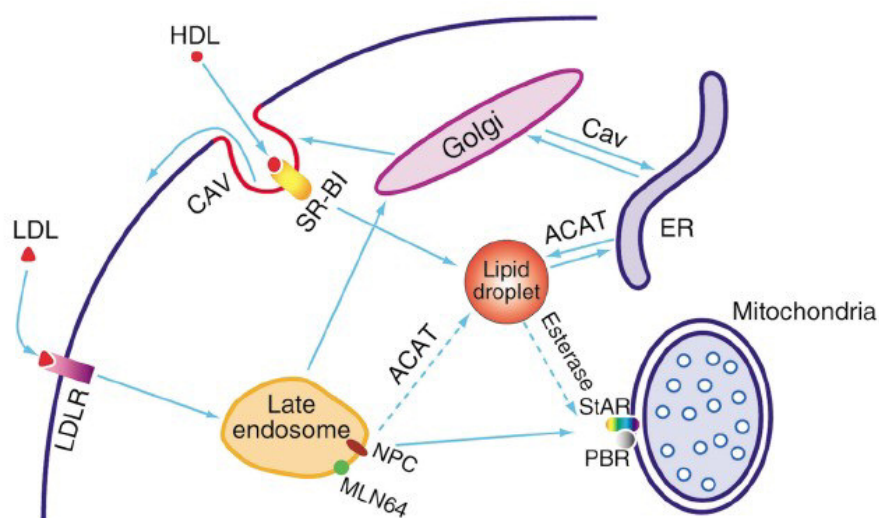


Abbildung 5: Cholesterintransport in steroidogenen Zellen. Cholesterin wird in Form von LDL Partikeln über den LDL Rezeptor oder auch in Form von HDL Partikeln über den Scavenger Rezeptor BI in die Zelle aufgenommen. Das NPC1 Protein ist für den Cholesterintransport aus den späten Endosomen/Lysosomen heraus notwendig. Möglicherweise ist auch das MLN64 Protein an diesem Transportprozess beteiligt. Ein Teil des Cholesterins wird von den Lysosomen zum ER transportiert. Das in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisierte Protein ACAT (Acyl-CoA: Cholesterin Acyltransferase) katalysiert die Veresterung des aus den späten Endosomen/Lysosomen stammenden und des im ER neu synthetisierten Cholesterins. Das veresterte Cholesterin kann in intrazellulären Lipidtröpfchen gespeichert werden. Das StAR-Protein ist notwendig für den Cholesterintransport von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran, wo Cholesterin zu dem Steroidhormon Pregnenolon umgewandelt wird. Es interagiert dabei wahrscheinlich mit dem peripheren Benzodiazepinrezeptor (PBR) an der äußeren Mitochondrienmembran. Abbildung (modifiziert) aus Jefcoate (2000).

Für den Cholesterinefflux aus der Zelle heraus sind zwei mögliche Mechanismen beschrieben worden: Zum einen kann das Cholesterin aus der Plasmamembran herausdiffundieren. Diese Diffusion findet vorzugsweise in den sphingolipidarmen Membranbereichen statt, da das Cholesterin dort wegen der fehlenden Interaktion mit den Sphingolipiden nicht so stark in der Membran gebunden ist. Das Cholesterin diffundiert dann in der wässrigen extrazellulären Phase zu HDL-Partikeln und wird von diesen aufgenommen (Phillips et al., 1987; Johnson et al., 1991). Zum anderen können HDL-Partikel an den Scavenger-Rezeptor B1 binden und Cholesterin aufnehmen. Da Cholesterin in Wasser nur schlecht löslich ist, wird der zweite Mechanismus einen größeren Anteil am Cholesterinefflux haben. Es ist beobachtet worden, dass vermehrt Cholesterin aus dem Zellinneren zur Zellmembran transportiert wird, wenn HDL-Partikel an die Zelle binden (Slotte et al., 1987; Oram et al., 1991). Ebenso ist beobachtet worden, dass die Proteinkinase C aktiviert wird, wenn HDL-Partikel an die Zellmembran binden (Mendez et al., 1991). Dementsprechend lässt sich der Cholesterinefflux durch Phorbol ester stimulieren bzw. durch Inhibitoren der PKC inhibieren (Li und Yokoyama, 1995; Li et al., 1997). Ob die PKC tatsächlich direkt in den Cholesterintransport involviert ist, ist noch unklar. Ein Effektor der PKC, der den Cholesterintransport stimuliert, ist unbekannt. Eine erhöhte Aktivität der Proteinkinase A hat ebenso einen verstärkten Cholesterinefflux zur Folge. Man geht davon aus, dass die PKA das am Cholesterintransport beteiligte ABC-Transporter Protein phosphoryliert (Becq, 1997). Das ABC-Transporter Protein ist wahrscheinlich in den Caveolae der Plasmamembran lokalisiert (Lavie et al., 1999). Bei der so genannten Tangier-Krankheit ist das ABC1-Protein durch eine Mutation funktionsunfähig geworden. Das hat zur Folge, dass weniger Cholesterin aus der Zelle heraustransportiert wird und dass Cholesterin in der Zelle in Form von Lipidtröpfchen akkumuliert. Die Caveolae und die HDL-Partikel spielen also sowohl bei der Cholesterinaufnahme als auch beim Cholesterinefflux eine Rolle.

2.1.3 Cholesterin in biologischen Membranen

Cholesterin ist ein essentieller Bestandteil der Plasmamembranen der meisten eukaryotischen Zellen. In Zellen von Säugetieren befinden sich mehr als die Hälfte des unveresterten Cholesterins in der Plasmamembran (Liscum und Munn, 1999). In Lipiddoppelschichten lagert sich das Cholesterin mit seiner Längsachse senkrecht zur Membranebene ein, so dass die polare β -Hydroxylgruppe in Kontakt mit dem wässrigen Milieu steht, und die Kohlenwasserstoffkette im Zentrum der Lipiddoppelschicht liegt. Das unpolare tetrazyklische

Ringsystem des Cholesterins liegt direkt den Kohlenwasserstoffketten der Sphingolipide und Phosphoglyceride an (Abb. 6). Durch diese Orientierung vermindert Cholesterin die trans-gauche Isomerisierung um die C-C-Bindungen in den Ketten. Die Segmente, die dabei beeinflusst werden, liegen meist zwischen dem zweiten und siebten bis zehnten Kohlenstoffatom (Davies et al., 1990). Dadurch werden die Knicke in der Kette reduziert, die Dicke der Membran erhöht und die Permeabilität für Ionen vermindert (Brown, 1998). Durch NMR-Analysen wurde die effektive Länge des Cholesterins in Phospholipid-Doppelschichten mit etwa 1,75 nm bestimmt, eine Länge, die einer all-trans-Seitenkette entspricht (Wu und Chi, 1991). Die Tiefe, mit der das Molekül in die Doppelschicht eindringt, ist jedoch abhängig von den Seitenketten der Phospholipide (Sankaram und Thompson, 1991). Möglicherweise können zwei Cholesterinmoleküle, die sich in den gegenüberliegenden Hälften der Lipiddoppelschicht befinden, durch Interaktion ihrer Kohlenwasserstoffketten Dimere bilden (Harris et al., 1995). Die 3 β -OH-Gruppe eines Cholesterinmoleküls in der Plasmamembran interagiert wahrscheinlich mit dem Carbonylsauerstoffatom einer Phospholipidkopfgruppe. In den Membranen eukaryotischer Zellen ist Cholesterin ungleichmäßig in strukturellen und kinetischen Bereichen verteilt (Liscum und Underwood, 1995; Schroeder et al., 1991). In der Membranebene existieren Mikrodomänen, die sich in ihrem Cholesteringehalt und auch in ihrem Sphingolipid- und Glykolipidgehalt sowie ihrer Proteinzusammensetzung von den anderen Membranbereichen unterscheiden. Bei der Interaktion zwischen integralen Membranproteinen, wie z. B. dem Oxytocinrezeptor und Cholesterin spielen wahrscheinlich so genannte „Rafts“ (engl.: Flöße) eine Rolle. Rafts sind cholesterin- und sphingolipidreiche Mikrodomänen mit einem Durchmesser von etwa 70 nm. In ihnen sind Proteine angereichert, die bei der Signaltransduktion eine Rolle spielen (Simons und Ikonen, 1997; Harder und Simons, 1997; Kurzchalia, 1999). Aus den Rafts können sich so genannte Caveolae bilden. Caveolae sind kleine Einstülpungen der Plasmamembran (Durchmesser 50 bis 100 nm), die das Cholesterin bindende Protein Caveolin enthalten (Murata et al., 1995). In den Caveolae sind verschiedene Rezeptoren angereichert, wie z. B. der Cholecystokininrezeptor (Shaul und Anderson, 1998). Charakteristisch für diese cholesterinreichen Membranbereiche ist, dass sie in Detergenzien bei 4° C schlechter löslich sind als andere Membranbereiche. In der äußeren Hälfte der Lipiddoppelschicht der Plasmamembran ist möglicherweise ein größerer Anteil an Cholesterin enthalten als in der inneren Hälfte, weil das Cholesterin gut mit dem Phospholipid Sphingomyelin interagiert, das in der äußeren Membranhälfte angereichert ist.

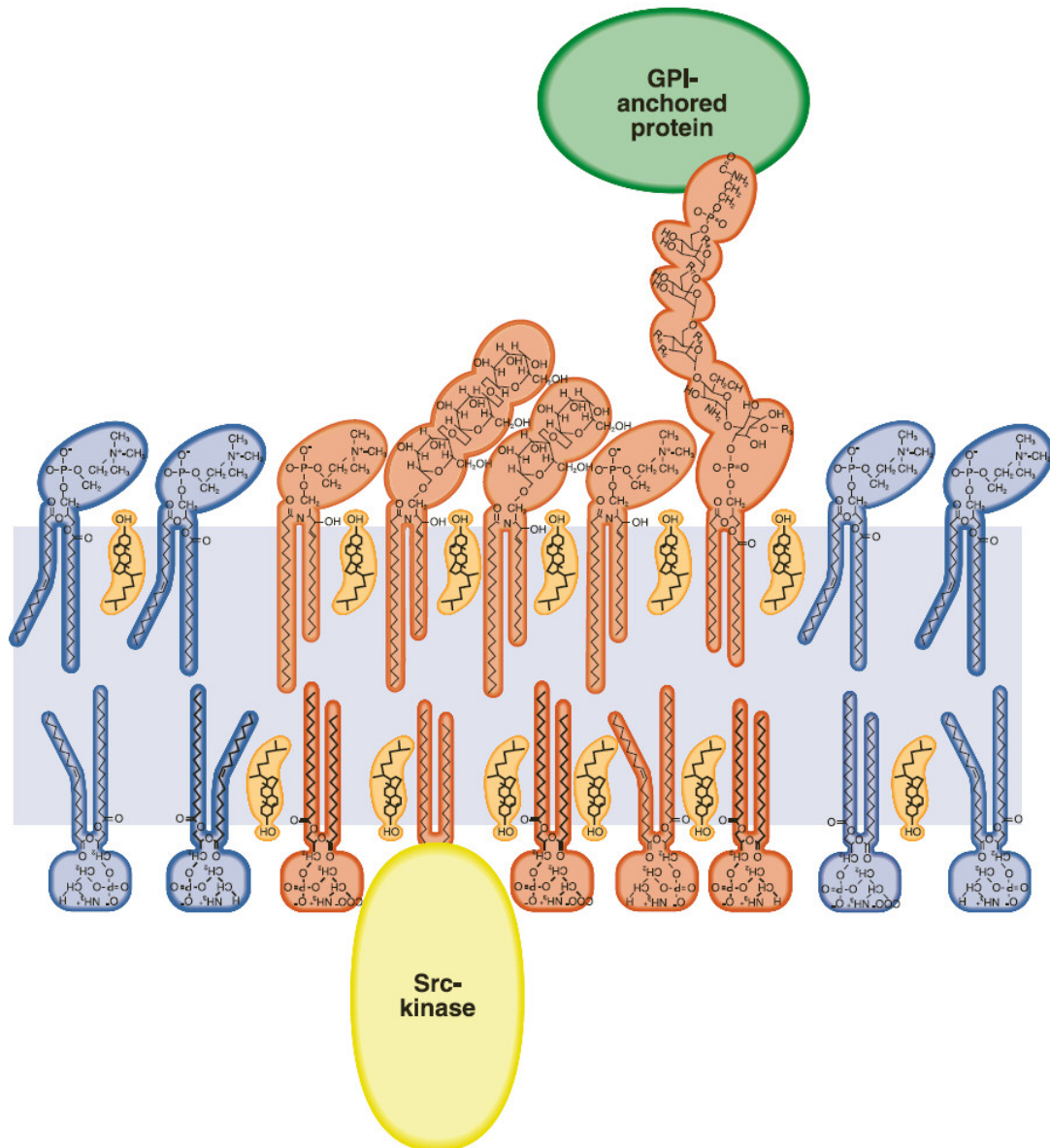


Abbildung 6: Wechselwirkung zwischen Cholesterin (orange) und Membran-Phospholipiden. Die polare OH-Gruppe des Cholesterins ist nach außen orientiert, die planare Steroidringstruktur liegt in der Mittelzone der Lipidschicht und versteift sie somit. Die rot gezeichneten Phospholipide bilden zusammen mit dem Cholesterin eine Raft Domäne in der Membran. In der Abbildung sind auch zwei Proteine mit Lipidankern zu sehen. Abbildung aus Simons und Ikonen (2000).

Das Phosphatidylcholin, das in der inneren Membranhälfte stärker vertreten ist, bietet eine thermodynamisch ungünstige Umgebung für Cholesterin (Boesze-Battaglia und Schimmel, 1997). Da Cholesterin wegen seines hydrophoben Charakters leicht zwischen den beiden Hälften der Lipiddoppelschicht hin- und herwechseln kann, könnte die Anreicherung des Cholesterins in der äußeren Hälfte alleine durch die asymmetrische Verteilung dieser beiden Phospholipide zu Stande kommen (Backer und Dawidowicz, 1981). Der Anteil an Cholesterin in den verschiedenen Membranen einer Zelle schwankt sehr stark. So ist es im Vergleich zu

anderen Lipiden in den Plasmamembranen bis zu einem molaren Verhältnis von eins zu eins enthalten (Cooper, 1978; Lange et al., 1989). Dagegen besitzen die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums nur einen Cholesterin-Anteil von zehn bis zwölf Prozent, obwohl sie der Ort der Cholesterinbiosynthese sind. In den inneren und äußeren Membranen der Mitochondrien ist der Anteil sogar noch geringer. Bei den Eukaryoten ist Cholesterin der Hauptregulator der Membranfluidität. Es hemmt die Kristallisation der Fettsäuren, indem es sich zwischen sie lagert, und verhindert somit den Phasenübergang von Lipiddoppelschichten. Andererseits hemmt es größere Bewegungen der Fettsäureketten sterisch und macht die Membran somit weniger flüssig. Cholesterin schränkt also auf diese Weise die Membranfluidität ein (Berg et al, 2002).

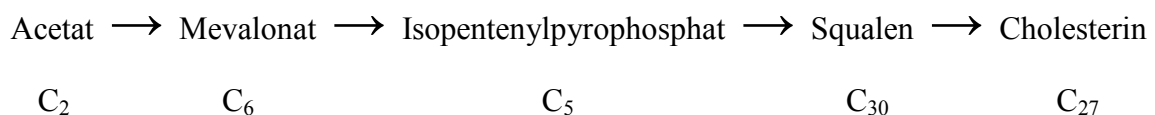
2.1.4 Einfluss auf Membranproteine

Neben den strukturellen Effekten des Cholesterins auf die Phospholipid-Doppelschicht nimmt das Molekül auch Einfluss auf die Aktivität verschiedener Membranproteine (Yeagle, 1991). Darunter sind auch Rezeptoren, wie z. B. der Transferrinrezeptor (Nunez und Glass, 1982), der nikotinische Acetylcholinrezeptor (Narayanaswami und McNamee, 1993; Fernandez-Ballester et al., 1994; Dreger et al., 1997), der Oxytocinrezeptor (Klein et al., 1995; Gimpl et al., 1995) und Rhodopsin (Albert et al., 1996). Die lateralen Mikrodomänen des Cholesterins in der Plasmamembran - die Rafts - wie auch die unterschiedliche Verteilung in den beiden Doppelschichthälften können dabei die strukturelle Voraussetzung für die Cholesterin-Rezeptor-Interaktion sein (Liscum und Underwood, 1995; Schröder, 1991). Cholesterin beeinflusst die Funktion von Rezeptoren auf zwei unterschiedliche Weisen, wie an zwei strukturverwandten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, dem Cholecystokininrezeptor und dem Oxytocinrezeptor gezeigt wurde (Gimpl et al., 1997). Durch seinen Einfluss auf die Membranfluidität kann das Cholesterin die Eigenschaften von Membranrezeptoren verändern. So wurde für den Cholecystokininrezeptor eine hohe Korrelation zwischen der Agonistenbindung und der Fluidität der Plasmamembran gefunden. Dagegen ist die Wirkung des Cholesterins auf den Oxytocinrezeptor spezifischerer Art, da selbst geringfügige Änderungen des Cholesteringehalts der Membran bei gleichbleibender Fluidität die Ligandenbindung des Oxytocinrezeptors stark beeinflussen (Klein und Fahrenholz, 1994). Ein stärkerer Entzug des Cholesterins führt zu einem niedrigeren Affinitätszustand des Rezeptors mit einem hundertfach erhöhten K_D -Wert. Cholesterin zeigt hier also eine positive allosterische Regulation des Rezeptors. Dieser Effekt ist reversibel; erhöht man den

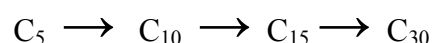
Cholesteringehalt der Plasmamembran wieder, so kann der hohe Affinitätszustand vollständig wiederhergestellt werden. Der Effekt konnte auch bei detergenssolubilisierten Oxytocinrezeptoren beobachtet werden, die mit Cholesterin/M β CD-Komplexen inkubiert worden waren. Dies spricht dafür, dass es eine direkte Interaktion des Oxytocinrezeptors mit Cholesterin gibt, da hier indirekte Einflüsse durch die Beschaffenheit der Plasmamembran entfallen. Es besteht eine große Abhängigkeit zwischen den strukturellen Eigenschaften des Cholesterins und seiner Analoga und der Affinität des Oxytocinrezeptors. So zeigte sich, dass zum Beispiel das Vorhandensein der β -Hydroxyfunktion an Position 3 und der aliphatischen Seitenkette an Position 17 für die Wirkung des Cholesterins auf den Oxytocinrezeptor unbedingt erforderlich sind (Gimpl et al., 1997). Ein anderes Steroidhormon, Progesteron, inhibiert die Oxytocinbindung (Burger et. al., 1999). Charakteristisch für diese nicht-genomische Wirkung des Progesterons ist, dass der Effekt bei Zellen innerhalb weniger Minuten einsetzt und zwar auch dann, wenn die Proteinbiosynthese inhibiert ist.

2.1.5 Die Regulation der Cholesterinbiosynthese

Cholesterin wird aus Acetyl-Coenzym A synthetisiert (Abb. 7). Die Synthese verläuft nach folgendem Schema:



Die Synthese von Mevalonat ist die Schrittmacherreaktion der Cholesterinsynthese. Das Enzym, das diesen irreversiblen Vorgang katalysiert, die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase, ist ein wichtiger Kontrollpunkt der Cholesterinproduktion. Das Mevalonat (C₆) wird durch ATP-abhängige Reaktionen in 3-Isopentenylpyrophosphat (C₅) umgewandelt. Aus Isopentenylpyrophosphat wird nach folgendem Schema Squalen (C₃₀) synthetisiert:



Die weiteren Reaktionsschritte der Cholesterinbiosynthese beginnen mit der Zyklisierung des Squalens. Dabei entsteht Squalenepoxid als reaktives Zwischenprodukt. Das Squalenepoxid wird durch eine Cyclase in Lanosterin umgeformt. Das Lanosterin wird in einer Reihe von

Reaktionen in Cholesterin überführt. Cholesterin kann mit der Nahrung aufgenommen werden oder *de novo* im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert werden. Die Hauptsyntheseorte bei Säugern sind Leber und Darm. Ein Erwachsener synthetisiert bei cholesterinreicher Ernährung etwa 800 mg am Tag. Das Ausmaß der Synthese hängt stark von der Cholesterinmenge ab, die in der Nahrung enthalten ist. Diese Rückkoppelungsreaktion wird durch Änderungen in der Aktivität der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase vermittelt. Dieses Enzym katalysiert die Mevalonatsynthese, die Schrittmacherreaktion der Cholesterinbiosynthese. Nahrungscholesterin hemmt die Synthese der Reduktase in der Leber und führt zur Inaktivierung bereits vorhandener Enzymmoleküle (Berg et al., 2002).

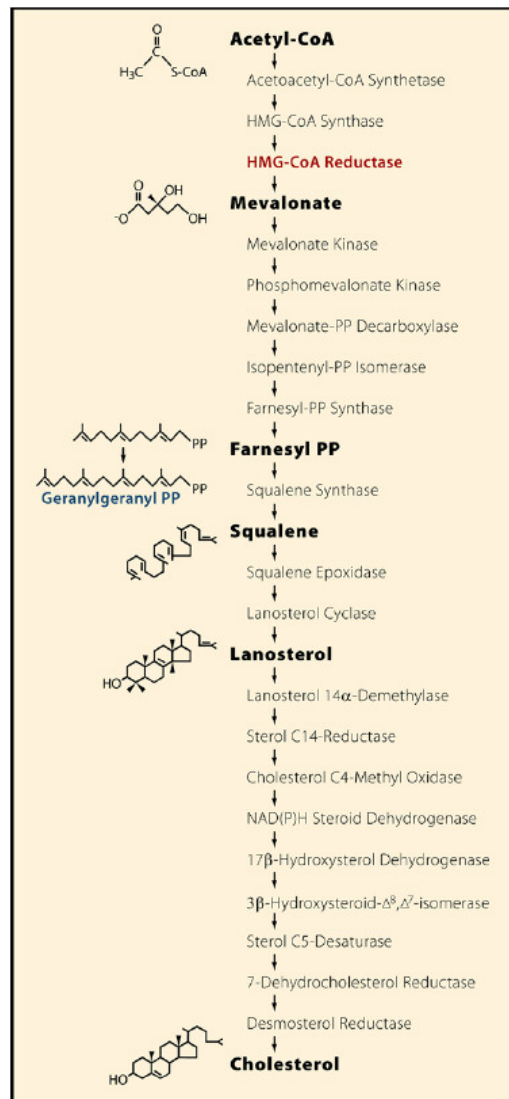


Abbildung 7: Die Cholesterinbiosynthese. Abbildung aus Goldstein et al. (2006).

2.1.6 Die Rolle von SCAP, Insig 1 und 2 und SREBPs bei der Regulation der Cholesterinbiosynthese und der Cholesterinaufnahme in die Zelle

In der Membran des Endoplasmatischen Retikulums sind Transkriptionsfaktoren gebunden, die Gene aktivieren, die an der Aufnahme und Synthese von Cholesterin und Fettsäuren beteiligt sind (Brown and Goldstein, 1997). Diese Transkriptionsfaktoren werden SREBPs genannt (Sterol Regulatory Element Binding Proteins, Abb. 8). Ein SREBP ist mit zwei Transmembrandomänen in der ER Membran verankert. Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus befinden sich auf der cytosolischen Seite. Die N-terminale Domäne kann als Transkriptionsfaktor wirken.

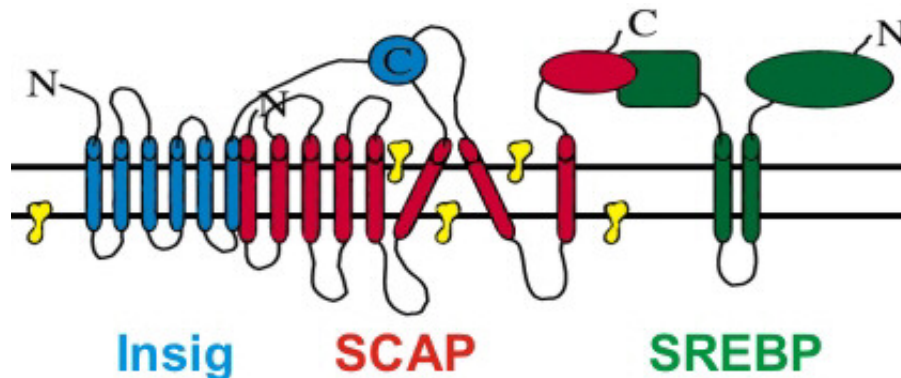


Abbildung 8: In der Membran des Endoplasmatischen Retikulums befindet sich ein Proteinkomplex aus SCAP und SREBP, der mit Insig interagieren kann. Das SREBP Protein besitzt am N-Terminus eine Domäne, die als Transkriptionsfaktor wirken kann. Bei hohem Cholesteringehalt in der Membran interagiert der SCAP-SREBP-Komplex mit dem Protein Insig (Cholesterinmoleküle sind in der Abbildung gelb dargestellt). Die Interaktion mit Insig verhindert, dass der SCAP-SREBP Komplex vom ER zum Golgi-Apparat gelangt. Abbildung (modifiziert) aus McPherson und Gauthier (2004).

Bei niedrigem zellulären Cholesterinspiegel wird das SREBP vom ER zum Golgi-Apparat transportiert, und dort wird durch zwei proteolytische Spaltungen die N-terminale Domäne freigesetzt (Abb. 9). An dem Transport des SREBPs vom ER zum Golgi Apparat ist das SCAP Protein beteiligt (SREBP Cleavage Activating Protein). Das SCAP Protein besitzt acht Transmembrandomänen. Die Transmembranhelices zwei bis sechs bilden eine Sterol-sensitive Domäne (Hua et al, 1996; Nohturfft et al, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass SCAP Cholesterin binden kann (Radhakrishnan et al., 2004). Wenn der Cholesteringehalt in der ER Membran abnimmt, dann ändert das SCAP Protein seine Konformation so, dass es nicht mehr mit dem Protein Insig interagieren kann. Die Bindung an Insig bei hohem

Cholesteringehalt in der ER Membran verhindert, dass der SREBP-SCAP Komplex mit dem COP II Komplex wechselwirken kann. Der COP II Komplex ist für Vesikelbildung und Vesikeltransport notwendig. Der SREBP-SCAP Komplex kann also nur bei niedrigem Cholesterinspiegel vom ER zum Golgi Apparat transportiert werden, wo die erste proteolytische Spaltung stattfindet (Abb. 10). Durch die zweite proteolytische Spaltung wird der Transkriptionsfaktor freigesetzt und diffundiert in den Zellkern (Brown and Goldstein, 1999). Auf diese Weise hemmt Cholesterin die Transkription des Gens für die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase und anderer an der Cholesterin- und Lipidsynthese beteiligter Gene. So wird die *de novo* Synthese des Cholesterins verhindert. Zweitens unterliegt der LDL Rezeptor selbst einer Rückkopplungsreaktion.

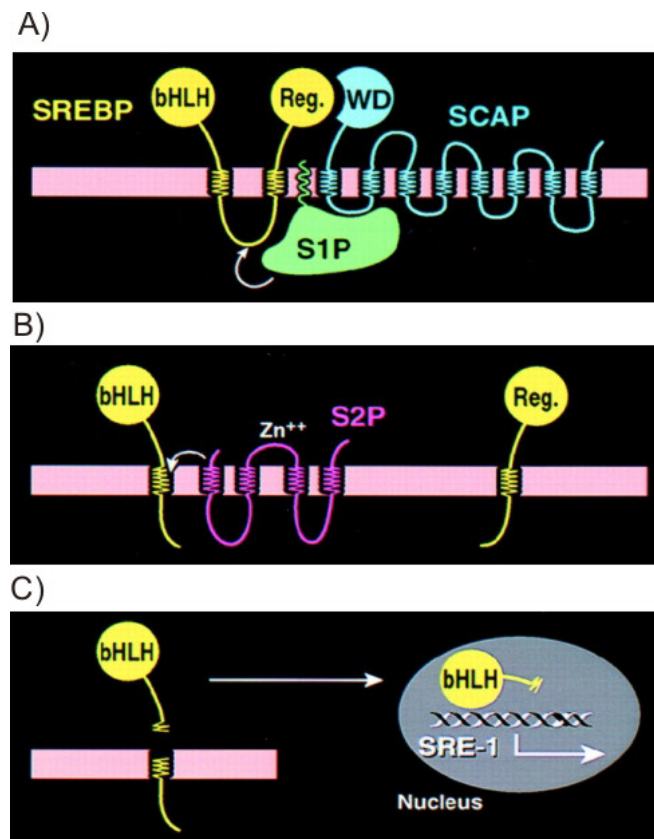


Abbildung 9: Proteolytische Spaltung des SREBPs. In der Membran des Golgi-Apparates befinden sich zwei Proteasen (S1P und S2P). Die Site 1 Protease führt die erste proteolytische Spaltung durch (A). Die Site 2 Protease spaltet das SREBP-Fragment innerhalb der Transmembrandomäne (B). Der so freigesetzte Transkriptionsfaktor (bHLH, basisches Helix-Loop-Helix-Motiv) kann in den Zellkern diffundieren und die Transkription von Genen aktivieren, die ein Sterol-Responsives Element (SRE) besitzen (C). Abbildung (modifiziert) aus Brown und Goldstein (1999).

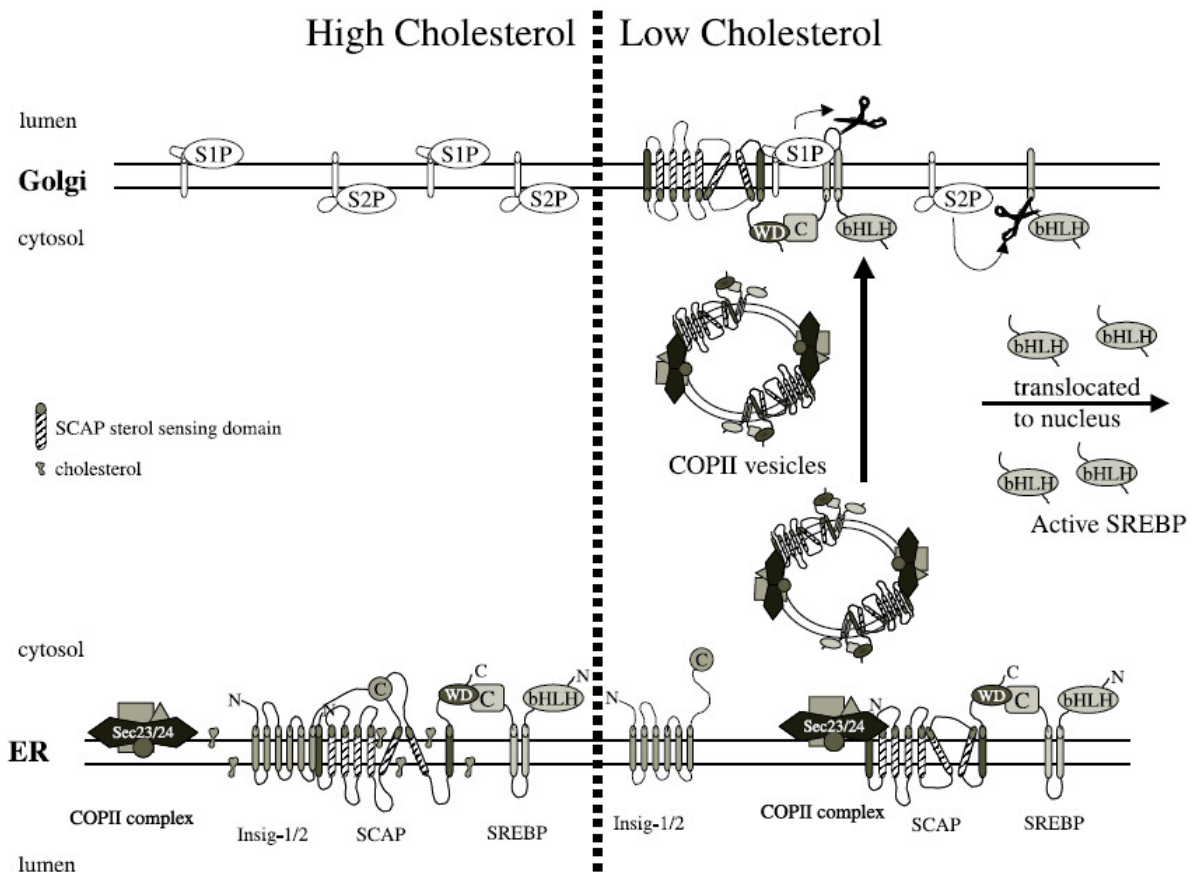


Abbildung 10: Transport des SCAP-SREBP Komplexes vom ER zum Golgi und proteolytische Prozessierung des SREBPs. SCAP und SREBP bilden in der ER Membran einen Proteinkomplex (Interaktion über die C-Termini der beiden Proteine – SCAP enthält dazu am C-Terminus ein WD Motiv. Wenn der Cholesteringehalt in der ER Membran hoch ist, dann nimmt SCAP eine Konformation ein, in der es mit Insig interagieren kann. Insig verhindert, dass SCAP mit dem COP II-Komplex interagieren kann und bewirkt somit, dass der SCAP-SREBP Komplex nicht vom ER zum Golgi Apparat transportiert werden kann. Erniedrigt sich der Cholesteringehalt in der ER Membran, dann geht die Interaktion von SCAP und Insig verloren, und SCAP kann an den COP II Komplex binden. Der COP II Komplex bewirkt, dass sich vom ER Vesikel abschnüren und zum Golgi Apparat gelangen, wo der SCAP-SREBP Komplex in die Membran integriert wird. In der Golgi Membran befinden sich die beiden Proteasen S1P und S2P, die dafür sorgen, dass die bHLH Domäne vom N-Terminus des SREBP abgespalten wird. Die freigesetzte bHLH Domäne kann in den Zellkern diffundieren und die Transkription von Genen stimulieren, die an der Cholesterinbiosynthese beteiligt sind. Abbildung aus McPherson und Gauthier (2004).

Bei Cholesterinüberschuss innerhalb der Zelle werden keine neuen LDL Rezeptoren synthetisiert, die Aufnahme weiteren Cholesterins aus dem Plasma ist also blockiert. Da sowohl die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase als auch die SREBPs in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind, kann man davon ausgehen, dass die Biosynthese und die Aufnahme des Cholesterins vom ER aus gesteuert werden. Vom

Insig Protein gibt es zwei Isoformen: Insig 1 und Insig 2. Beide Isoformen haben sieben Transmembrandomänen (Feramisco et al., 2004). Insig 1 (277 Aminosäuren) ist 52 Aminosäuren größer als Insig 2 (225). Beide Isoformen binden an SCAP und halten den SCAP-SREBP Komplex im ER zurück (Yabe et al., 2002; Adams et al., 2004). Überexpression von Insig 1 oder 2 erniedrigt die Menge an Cholesterin, die nötig ist, um die Änderung in der Konformation von SCAP auszulösen (Feramisco et al. (2005). Insig 1 und Insig 2 unterscheiden sich darin, dass ihre Expression unterschiedlich reguliert wird.

Insig 2 wird - in geringer Menge - immer exprimiert, Insig 1 dagegen nur dann, wenn proteolytisch gespaltenes SREBP in den Zellkern gelangt (Yabe et al., 2002). Durch die konstitutive Expression von Insig 2 wird wahrscheinlich folgende für die Zelle ungünstige Situation vermieden: Bei einem Anstieg der Cholesterinkonzentration nimmt die Menge des prozessierten SREBPs ab. Dadurch verringert sich auch die Menge an Insig 1, dessen Expression über SREBPs gesteuert wird. Als Folge davon könnte die Menge an Insig 1 die Menge an SCAP unterschreiten. Das überschüssige SCAP könnte dann mit SREBP Proteinkomplexe ausbilden. So würde dann trotz hoher Cholesterinkonzentration ein SREBP-Transport vom ER zum Golgi-Apparat, SREBP Prozessierung und Stimulation der Cholesterinbiosynthese stattfinden. Die Verringerung der Cholesterinbiosynthese bei hohem zellulären Cholesterinspiegel durch Insig 1 wäre dann nur von kurzer Dauer (Yabe et al., 2002). Außerdem kann Insig 1 im Unterschied zu Insig 2 bei hoher Expressionsrate den Transport des SCAP-SREBP Komplexes auch unabhängig vom Cholesteringehalt der ER Membran verhindern – Insig 2 kann das nicht. Durch diese unterschiedliche Regulation von Insig 1 und Insig 2 ist es möglich, dass die Cholesterinbiosynthese über einen weiten Bereich von intrazellulären Cholesterinkonzentrationen reguliert werden kann.

Von den SREBPs gibt es ebenfalls mehrere Isoformen: SREBP 1a, SREBP 1c und SREBP 2 (Yokoyama et al., 1993; Hua et al., 1993). Die Isoformen 1a und 1c werden beide vom SREBP 1 Gen codiert, das zwei Promoter enthält. Das SREBP 2 wird von einem anderen Gen codiert. Man geht davon aus, dass die beiden SREBP 1 Isoformen vor allem in die Aktivierung von Genen der Fettsäurebiosynthese involviert sind, während SREBP 2 vor allem bei der Cholesterinbiosynthese eine Rolle spielt (Abb. 11). Die aminoterminal Domäne von allen drei Isoformen bildet einen basischen Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor (bHLH). Beim SREBP 1c ist diese Domäne kürzer als bei der SREBP 1a Isoform. Dies hat zur Folge, dass SREBP 1c ein schwächerer Aktivator der Transkription ist als SREBP 1a (Shimano et al., 1997; Horton et al., 1998; Pai et al., 1998).

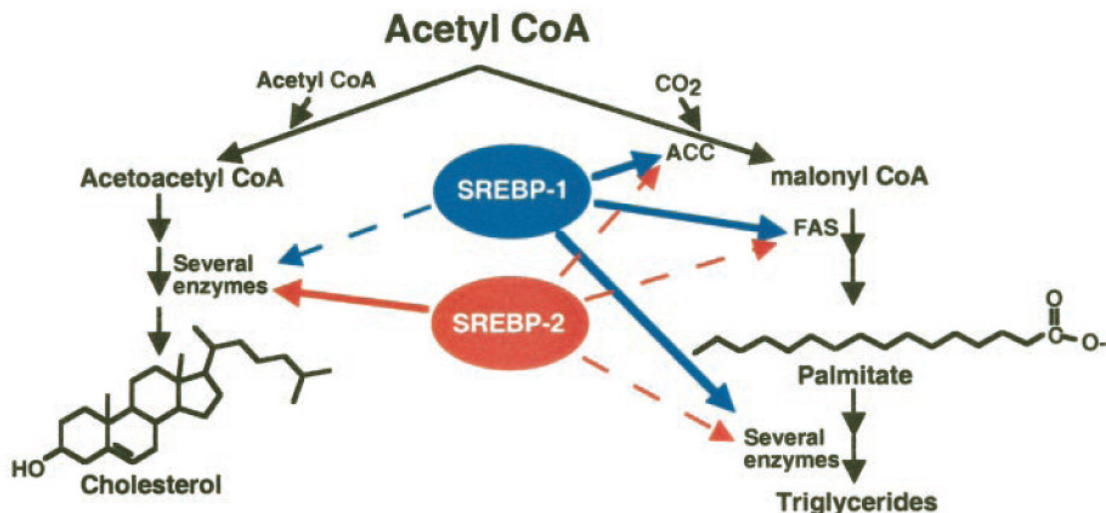


Abbildung 11: Die SREBP Isoformen haben unterschiedliche Funktionen. Die beiden SREBP 1-Isoformen aktivieren vor allem Gene, die für die Fettsäurebiosynthese benötigt werden. SREBP 2 aktiviert hauptsächlich Gene, die bei der Cholesterinbiosynthese eine Rolle spielen (ACC: Acetoacetyl-CoA, FAS: Fatty Acid Synthesis). Abbildung aus Osborne (2000).

2.1.7 Die Rolle von 25-Hydroxycholesterin bei der Regulation der Cholesterinbiosynthese

Die Cholesterinbiosynthese wird außer durch den Cholesteringehalt in der Zelle auch noch durch das Steroid 25-Hydroxycholesterin reguliert (Kandutsch et al., 1974). 24-, 25- und 27-Hydroxycholesterin werden in geringer Konzentration in einer Vielzahl von Geweben gebildet (Russell, 2000). Die Bildung von Oxysterolen findet vor allem dann statt, wenn der Cholesterinspiegel in der Zelle hoch ist. Die Cholesterinkonzentration ist dabei in der Zelle 10^3 bis 10^6 mal so hoch wie die der Oxysterole. Behandelt man Zellen in Kultur mit 25-Hydroxycholesterin, so kann man dadurch die Interaktion von SCAP mit Insig induzieren (Adams et al., 2004) und die Cholesterinbiosynthese inhibieren. 25-Hydroxycholesterin hat einen mehr als fünfzigmal so starken Effekt auf die Inhibierung der Cholesterin Biosynthese als Cholesterin. Man geht davon aus, dass 25-Hydroxycholesterin – anders als Cholesterin – nicht direkt an SCAP bindet und nicht direkt dessen Konformation ändert. Die Interaktion mit Insig müsste dann durch ein weiteres, bisher noch nicht identifiziertes 25-Hydroxycholesterin bindendes Protein vermittelt werden. Die Aussage, dass SCAP Cholesterin direkt bindet, wird vor allem durch zwei experimentelle Befunde gestützt: Zum einen konnte gezeigt werden, dass SCAP seine Konformation ändert, wenn man den Cholesteringehalt von ER Membranen erhöht. Dazu wurden isolierte Membranen mit der Protease Trypsin behandelt. Die dabei entstehenden Fragmente von SCAP unterscheiden sich zwischen cholesterinarmen Membranen und Membranen, bei denen der Cholesteringehalt experimentell erhöht wurde

(Brown et al., 2002) – die Konformation von SCAP ändert sich bei Zugabe von Cholesterin also so, dass andere Trypsin Schnittstellen für diese Protease angreifbar werden. Zum anderen konnte mit in Insektenzellen überexprimiertem, isoliertem und mit einem Detergens solubilisiertem SCAP ein Bindungstest mit radioaktiv markiertem Cholesterin durchgeführt werden (Radhakrishnan et al., 2004). Während für Cholesterin so eine direkte Interaktion mit SCAP nachweisbar war, konnte für 25-Hydroxycholesterin und andere Steroide keine Bindung an SCAP gemessen werden (Abb. 12).

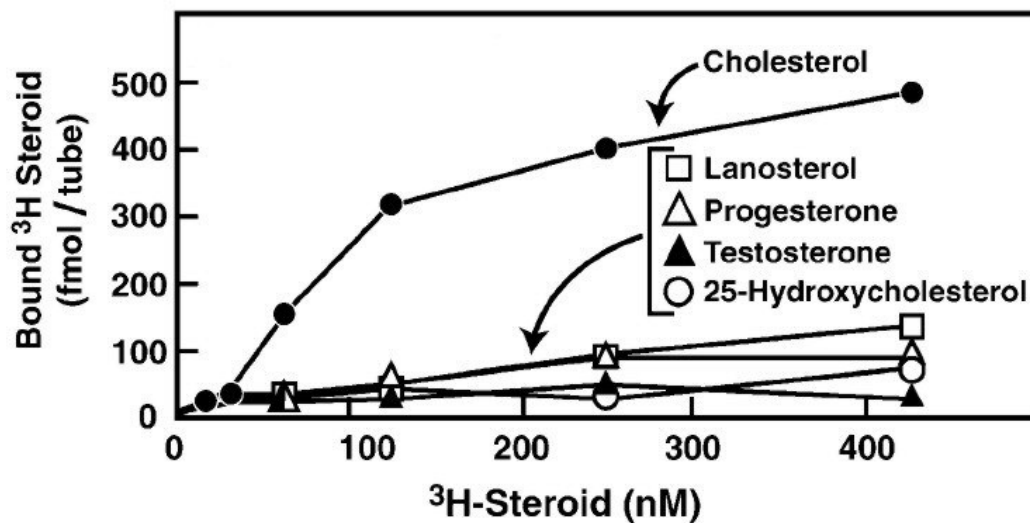


Abbildung 12: Cholesterin bindet an SCAP. SCAP wurde in Insektenzellen überexprimiert, mit einem His-Tag gereinigt und mit einem Detergens solubilisiert. Bei Cholesterin konnte eine Sättigungskurve gemessen werden, bei 25-Hydroxycholesterin sowie Testosteron, Progesteron und Lanosterol konnte keine spezifische Bindung an SCAP beobachtet werden. Abbildung aus Radhakrishnan et al. (2004)

2.1.8 Die Rolle der HMG-CoA-Reduktase bei der Regulation der Cholesterinbiosynthese

Die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) spielt auch eine wichtige Rolle bei der Cholesterinbiosynthese (Goldstein and Brown, 1990). Dieses Enzym ist der Angriffspunkt vieler Medikamente, die einen krankhaft erhöhten Cholesterinspiegel senken. Ihre Transkription wird ebenfalls durch SREBPs gesteuert. Bei hohem Cholesterinspiegel wird ihre Expression also verringert. Die HMG-CoA-Reduktase besitzt acht Transmembrandomänen und ist in der ER Membran lokalisiert. Die Transmembranhelices zwei bis sechs bilden eine Sterol-sensitive Domäne. Ebenso wie SCAP kann sie mit Insig einen Proteinkomplex bilden. Die Bindung an Insig führt dazu, dass Ubiquitin an die HMG-CoA-Reduktase gebunden wird, und diese dann abgebaut wird (Sever

et al., 2003). Außer durch einen hohen zellulären Cholesterinspiegel und dem damit verbundenen hohen Cholesteringehalt der ER Membran kann die Interaktion mit Insig auch durch das Steroid Lanosterin ausgelöst werden (Song et al., 2005). Lanosterin ist ein Zwischenprodukt bei der Cholesterin-Biosynthese.

2.2 Steroidhormone

Die Steroidhormone sind eine wichtige Klasse von Botenstoffen. Ihre Struktur leitet sich von der des Cholesterins ab. Die in der Nebennierenrinde gebildeten Steroidhormone wirken auf den Kohlenhydrathaushalt (Glucocorticoide), Na^+/K^+ -Haushalt (Mineralcorticoide) und auf die Sexualorgane (Sexualhormone). Der größte Teil der Sexualhormone wird jedoch in den Hoden, in den Ovarien und in der Plazenta gebildet. Außerdem gibt es noch Neurosteroiden, die im Gehirn produziert werden und dort z.B. eine neuroprotektive Funktion haben können. Bei Arthropoden spielt das Steroidhormon Ecdyson eine wichtige Rolle bei der Häutung. Auch bei Mikroorganismen und Pflanzen kommen Steroide vor.

Steroidhormone können durch die Zellmembran diffundieren und binden erst im Zellinneren an Rezeptoren, die sie zum Zellkern transportieren. Dort entfalten sie ihre Wirkung, indem sie die Transkription beeinflussen. Außer diesen genomischen Wirkungen der Steroidhormone gibt es auch noch nichtgenomische Wirkungen, bei denen die Steroidhormone wahrscheinlich an Rezeptoren an der Zelloberfläche binden.

2.2.1 Die Steroidbiosynthese

Die Biosynthese von allen Steroidhormonen beginnt mit der enzymatischen Abspaltung der Seitenkette des Cholesterins. Das dazu benötigte Enzymsystem befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran (Abb. 13). Wie das Cholesterin von der äußeren Mitochondrienmembran zur inneren Mitochondrienmembran transportiert wird, ist noch nicht bekannt. Die innere Mitochondrienmembran enthält natürlicherweise kein Cholesterin. Das wasserunlösliche Cholesterin kann kaum durch das wässrige Milieu des Intermembranraums diffundieren. Das Produkt, das beim ersten Schritt der Steroidogenese gebildet wird, ist das Pregnenolon. Aus ihm können eine Reihe weiterer Steroidhormone gebildet werden (siehe Abbildung 14), es kann jedoch auch selbst eine hormonelle Wirkung entfalten. Man geht davon aus, dass es im Gehirn eine neuroprotektive Funktion hat (Maggi et al., 2004; Stoffel-Wagner, 2003).

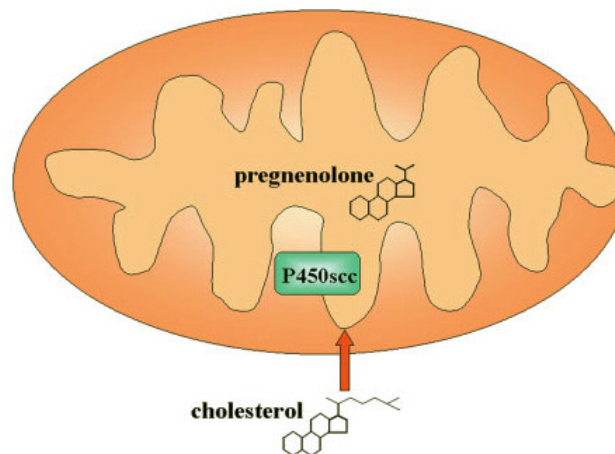


Abbildung 13: Der erste Schritt der Synthese von Steroidhormonen findet in den Mitochondrien Steroidhormon produzierender Zellen statt. Cholesterin muss dazu von der äußeren Mitochondrienmembran zur inneren transportiert werden. In der inneren Membran ist das Cytochrom p450 side chain cleavage Enzymsystem (p450scc) lokalisiert, das die Abspaltung der Seitenkette vom Cholesterin durchführt. Dabei wird das Steroid Pregnenolon gebildet. Abbildung aus Thomson (2003).

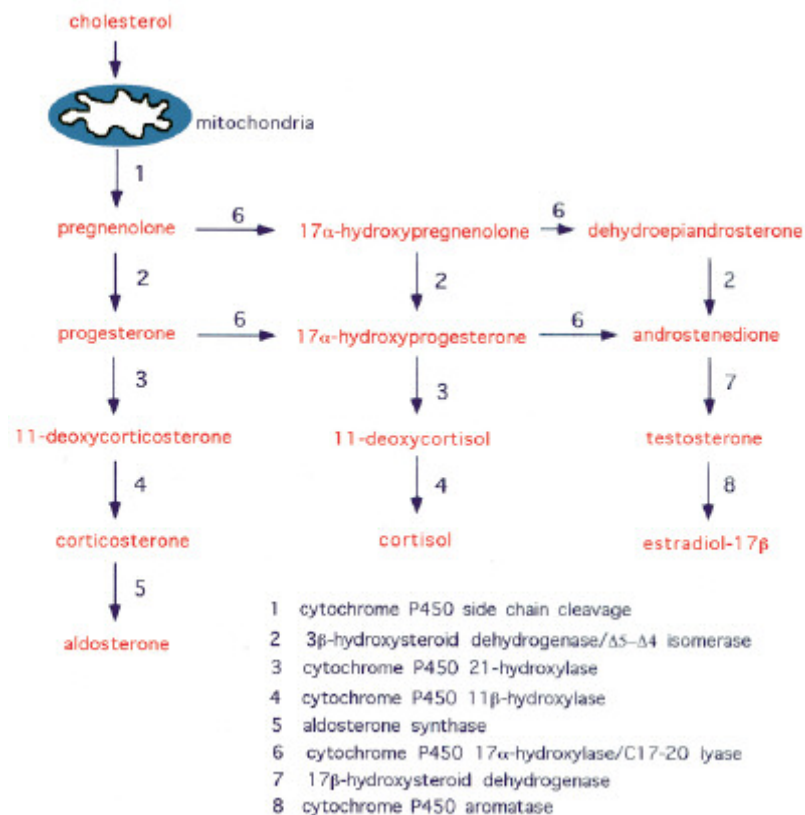


Abbildung 14: Die Bildung verschiedener Steroidhormone aus Cholesterin. Das Pregnenolon entsteht in den Mitochondrien in drei Schritten aus Cholesterin durch Hydroxylierungen und eine Spaltung in der Seitenkette. Das aus Cholesterin gebildete Pregnenolon kann durch eine Reihe weiterer enzymkatalysierter Reaktionen in die anderen Steroidhormone umgewandelt werden. Abbildung aus Stocco (2001).

2.2.2 Die Rolle des StAR Proteins bei der Biosynthese von Steroiden

Der Transport von Cholesterin von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Bildung von Steroidhormonen. Das StAR-Protein (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) ist essentiell notwendig für diesen Transport. Das StAR-Protein ist ein mitochondriales Protein, das im Cytoplasma von steroidogenen Zellen als 37 kDa Präprotein gebildet wird. Durch eine N-terminale Leitsequenz wird es zu den Mitochondrien dirigiert (Abb. 15).

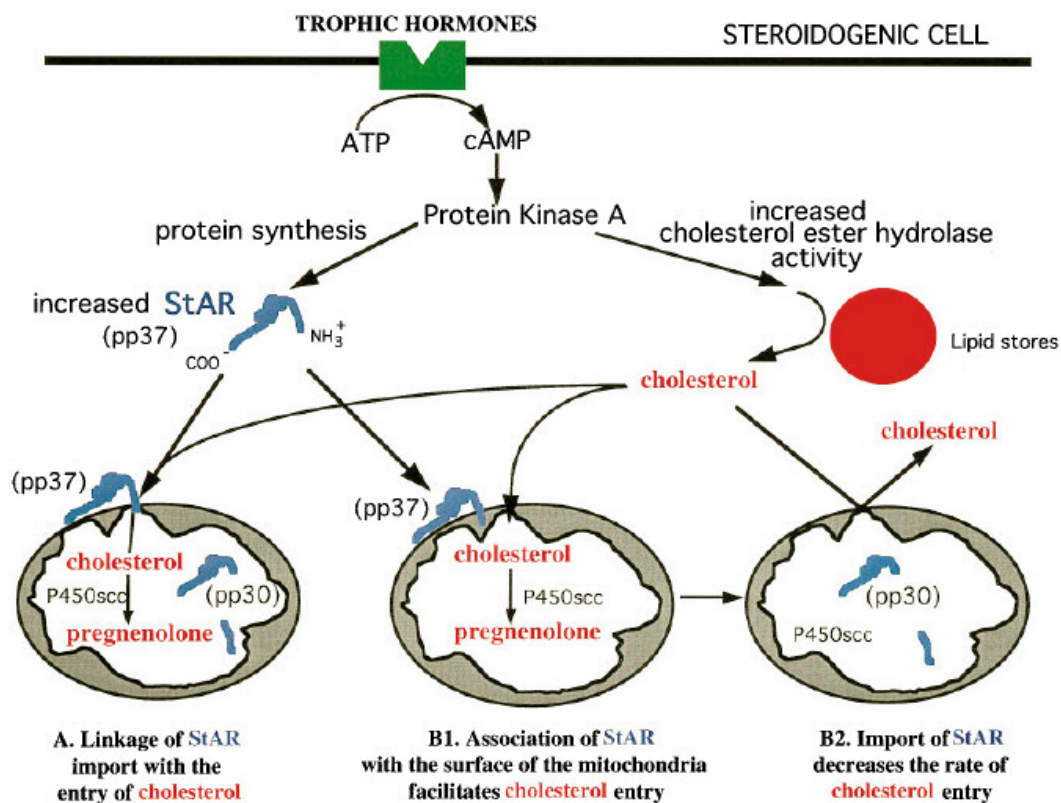


Abbildung 15: Regulation der Steroidogenese. Die hormonelle Stimulierung der Zelle führt dazu, dass über ein G-Protein die Adenylatcyclase aktiviert wird und cAMP gebildet wird. Dadurch wird die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Die PKA phosphoryliert bestimmte Transkriptionsfaktoren. Dies führt dazu, dass innerhalb von Minuten das StAR Protein exprimiert wird. Das StAR Protein wird dann ebenfalls durch die PKA phosphoryliert. Durch die PKA wird auch eine Lipase aktiviert, die Cholesterinester aus intrazellulären Lipidtröpfchen in freies Cholesterin umwandelt. Das so freigesetzte Cholesterin gelangt – wahrscheinlich durch Anlagerung der Lipidtröpfchen an die äußere Mitochondrienmembran – zu den Mitochondrien. Das StAR Protein wird durch eine N-terminale Leadersequenz zu den Mitochondrien dirigiert (A). Dort sorgt es dafür, dass Cholesterin von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran gelangen kann, wo das Cholesterin in Pregnenolon umgewandelt wird (B1). Das StAR Protein wird dann in die Mitochondrien importiert und proteolytisch prozessiert: zuerst wird es von der 37 kDa Form in ein 30 kDa Protein umgewandelt, das dann von Proteasen abgebaut wird. Wahrscheinlich dient der proteolytische Abbau dazu, die Produktion von Steroidhormonen wieder zu beenden (B2). Abbildung aus Estabrook und Rainey (1996).

Das StAR-Protein enthält eine so genannte START-Domäne. START-Domänen bestehen aus etwa 210 Aminosäuren und zeichnen sich dadurch aus, dass sie Lipide binden können (Soccio und Breslow, 2003; Alpy und Tomasetto, 2005). Bei Säugetieren sind zurzeit sechzehn Proteine bekannt, die eine START-Domäne besitzen. Das StAR-Protein wird nach Stimulierung der Zellen mit einem Peptidhormon wie zum Beispiel Adrenocorticotropin in kurzer Zeit gebildet (Clark et al., 1995). In den Mitochondrien wird StAR proteolytisch zu einem 30 kDa Protein prozessiert. Es ist noch nicht geklärt, auf welche Weise StAR den Cholesterintransport von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran bewirkt. Nachfolgend soll die Entdeckung des StAR-Proteins kurz nachgezeichnet werden, und die derzeit existierenden Hypothesen zur Funktion des StAR-Proteins sollen kurz dargestellt werden.

Bei den ersten Experimenten, die zur Untersuchung der Steroidbiosynthese durchgeführt wurden, zeigte sich, dass Steroidhormone innerhalb kurzer Zeit gebildet werden können. Aus Nebennieren isolierte Zellen, die mit dem Peptidhormon Adrenocorticotropin (Adrenocorticotropes Hormon, ACTH) stimuliert worden waren, bildeten innerhalb von drei Minuten Kortikosteroide (Farese, 1971; Kloppenborg et al., 1968). Wurden die Zellen mit Cycloheximid - einem Inhibitor der Proteinbiosynthese - inkubiert, wurden keine Steroide mehr gebildet (Garren et al., 1965). Es konnte daraufhin gezeigt werden, dass Cycloheximid den Transport von Cholesterin von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran blockiert (Privalle et al., 1983). Es konnte auch gezeigt werden, dass Cycloheximid keinen inhibierenden Effekt auf das p450_{sc}-Enzymsystem hat, das die Umwandlung von Cholesterin in Pregnenolon katalysiert (Arthur und Boyd, 1974). Krueger und Orme-Johnson (1983) entdeckten ein Protein, das von isolierten Ratten-Nebennierenzellen gebildet wurde, nachdem diese mit ACTH stimuliert worden waren. Nachfolgende Arbeiten zeigten, dass bei Stimulierung der Steroidogenese eine Gruppe von Proteinen gebildet wird, die von einem 37 kDa Vorläuferprotein stammten (Epstein und Orme-Johnson, 1991). Außerdem konnte gezeigt werden, dass dieses Vorläuferprotein direkt nach seiner Bildung phosphoryliert und bei seinem Import in Mitochondrien proteolytisch gespalten wird. Stocco und Kilgore (1988) fanden in murinen Leydig-Tumorzellen, die sie zur Bildung von Steroidhormonen stimuliert hatten, vier neu synthetisierte 30 kDa-Proteine, die sich nur durch den Grad ihrer Phosphorylierung unterschieden (Stocco und Chen, 1991). Das 30 kDa Protein konnte von Clark et al. (1994) gereinigt werden, und seine Aminosäuresequenz konnte ermittelt werden. Dadurch wurde die Klonierung der StAR-cDNA ermöglicht (Sugawara et al., 1995). Die Transfektion der Leydig-Tumorzellen mit dieser DNA reichte aus, um auch ohne hormonelle

Stimulierung die Bildung von Steroidhormonen auszulösen. Lin et al. (1995) entdeckten bei drei Patienten, die an Congenitaler Adrenaler Hyperplasie (CAH) litten, dass deren StAR-Protein mutiert und damit nicht funktional war. CAH ist eine unbehandelt schon kurz nach der Geburt tödlich endende Krankheit, und zeichnet sich dadurch aus, dass im Körper keine Steroidhormone gebildet werden können. Bei StAR-Knockout-Mäusen zeigten sich dieselben Symptome wie bei Menschen, die an CAH leiden (Caron et al., 1997). Durch In-Situ-Hybridisierung konnte das StAR-Gen auf Chromosom 8p11.2 lokalisiert werden. Ein StAR-Pseudogen befindet sich auf Chromosom 13. Menschliche StAR-mRNA konnte hauptsächlich in den steroidogenen Geweben nachgewiesen werden: in den Nebennieren, den Hoden den Nieren und den Ovarien - allerdings nicht in der Plazenta (Sugawara et al., 1995). In den Nieren könnte StAR an der Hydroxylierung von Vitamin D beteiligt sein. StAR konnte auch im Gehirn nachgewiesen werden (Lavaque et al., 2005). Dort ist es an der Synthese von Neurosteroiden beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass der Promoter des StAR-Gens durch cAMP stimuliert wird (Stocco, 2001; Sandhoff et al., 1998). Durch Kotransfektion mit der StAR-cDNA und der c-DNA für das p450_{scc}-Enzymsystem konnten auch Zellen, die normalerweise keine Steroidhormone produzieren, dazu gebracht werden, Cholesterin in Pregnenolon umzuwandeln (Harikrishna et al., 1993).

Das StAR-Protein besitzt elf mögliche Phosphorylierungsstellen. Arakane et al. (1997) konnten durch Transfektion von Zellen mit StAR-cDNAs zeigen, dass bei Austausch von Serin 195 gegen Alanin die Bildung von Pregnenolon deutlich abnahm. Für einige weitere der auf diese Weise ausgeschalteten Phosphorylierungsstellen war ebenfalls eine Abnahme der Steroidogenese zu verzeichnen, bei einigen anderen war jedoch keine Änderung zu beobachten. Unter natürlichen Bedingungen wird StAR also nicht an allen elf möglichen Positionen phosphoryliert (LeHoux et al., 2003). Durch die Phosphorylierung kann StAR möglicherweise besser mit der äußeren Mitochondrienmembran interagieren.

Inkubation von aus steroidogenen Zellen isolierten Mitochondrien mit einem rekombinanten, aus Bakterienzellen gewonnenem StAR-Protein zeigten, dass durch das StAR-Protein auch *in vitro* die Bildung von Steroidhormonen ausgelöst werden kann (Arakane et al., 1998). Führt man diese *in vitro* Experimente mit einer StAR-Punktmutante (A218V) durch, die bei Patienten vorkommt, die an Congenitaler Adrenaler Hyperplasie leiden, so war damit eine stark verminderte Bildung von Steroidhormonen zu beobachten. Spektroskopische Messungen mit Circular dichroismus (CD) zeigten, dass die StAR-Mutante anders gefaltet ist als das native StAR-Protein (Bose et al., 1998). Weitere CD-Messungen zeigten, dass StAR seine Konformation änderte, wenn es Cholesterin gebunden hatte (Petrescu et al., 2001).

Die bisher gewonnenen experimentellen Daten ließen sich bisher noch nicht zu einer schlüssigen, einheitlichen Theorie zur Funktion des StAR-Proteins vereinigen. Es gibt zurzeit mindestens drei verschiedene Hypothesen, denen unterschiedliche Annahmen zugrunde liegen. Die eine Hypothese besagt, dass durch das StAR-Protein die Bildung von Kontakten zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran initiiert werden könnte. An diesen Kontaktstellen könnte das Cholesterin von der äußeren zur inneren Membran fließen. Nach der anderen Hypothese wird das StAR-Protein von der äußeren Membran in den Intermembranraum transportiert. Dort wirkt es dann als Cholesterintransporter, d.h. es nimmt Cholesterin von der äußeren Mitochondrienmembran auf und gibt es an der inneren Mitochondrienmembran wieder ab (Abb.16). Die „Molten Globule-Hypothese“ wiederum fundiert auf der Annahme, dass durch den Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran die Kopfgruppen der Membranphospholipide protoniert sind. Dadurch könnte das StAR-Protein sich besser an die Membran anlagern. Durch den erniedrigten pH-Wert könnte sich das StAR-Protein teilweise entfalten - so dass seine Tertiärstruktur also unter Beibehaltung der Sekundärstruktur teilweise verloren geht. Mit dieser geänderten Tertiärstruktur könnte es möglicherweise besser Cholesterin aufnehmen oder abgeben oder auch besser mit der äußeren Mitochondrienmembran wechselwirken. Für die Membrankontakt-Hypothese spricht die Tatsache, dass StAR schnell in die Mitochondrien importiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass sich dort, wo Proteine in die Mitochondrien importiert werden, die äußere und die innere Mitochondrienmembran zusammenlagern und Kontaktstellen ausbilden (Abb. 17 und siehe bei Schwaiger et al., 1987; Pon et al., 1989). Bei Mitochondrien von Hefe- und Leberzellen konnte beobachtet werden, dass Phospholipide über Kontaktstellen von der einen zur anderen Membran transportiert werden (Simbeni et al., 1990; Ardail et al., 1991). Für diese Hypothese sprechen auch theoretische Überlegungen von Petrescu et al. (2001). Demnach würde die Menge des im Corpus Luteum gebildeten StAR-Proteins nicht ausreichen, um für die Menge des dort synthetisierten Progesterons per Shuttle-Transport genug Cholesterin in die Mitochondrien zu transportieren. Experimente, die von Artemenko et al. (2001) durchgeführt wurden, zeigten, dass nur eine relativ kleine Menge an StAR-Protein an der Synthese einer relativ großen Menge von Pregnenolon beteiligt ist. Ein Molekül StAR würde demnach innerhalb einer Minute für den Transport von 400 Molekülen Cholesterin sorgen.

Ein gewichtiger Einwand gegen die Membrankontakt-Hypothese sind Experimente, die von Arakane et al. (1998) durchgeführt wurden.

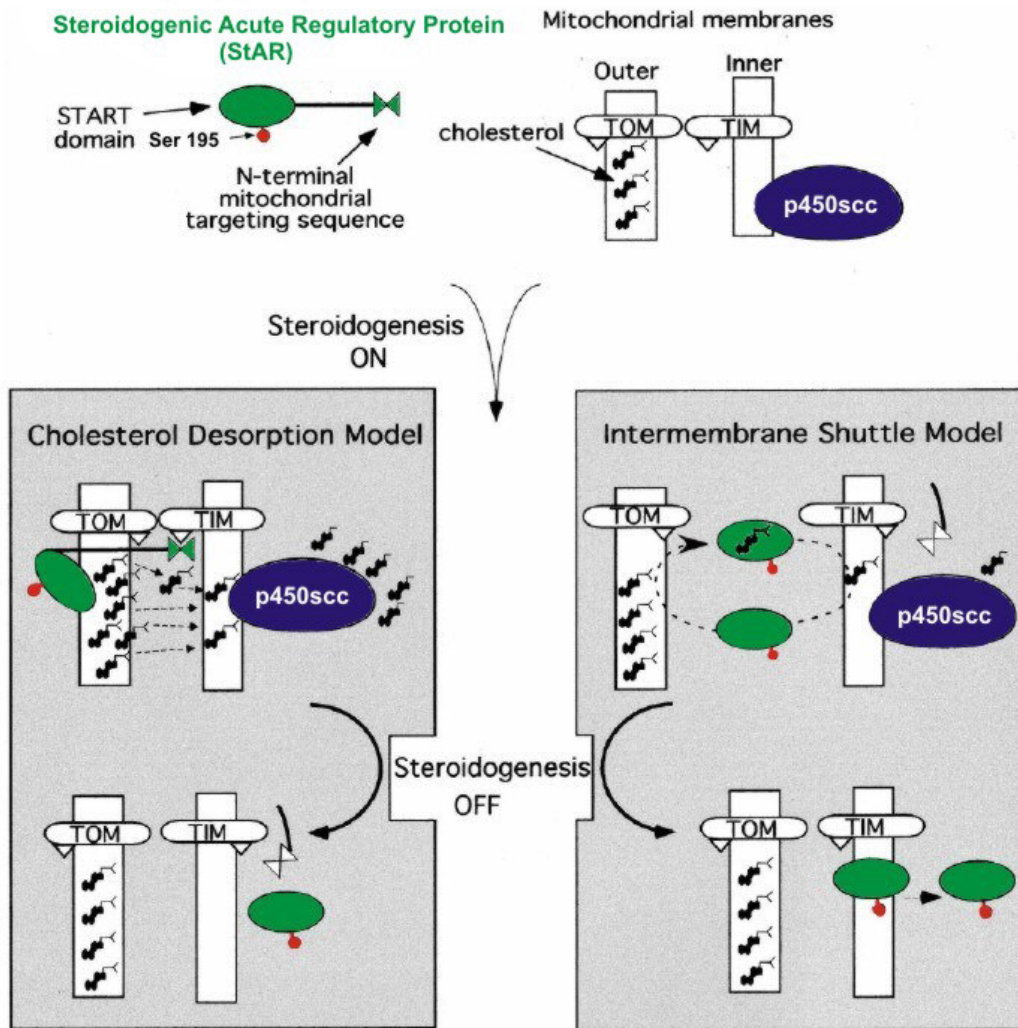


Abbildung 16: Zwei verschiedene Modelle zur Funktion des StAR-Proteins. Das „Cholesterol Desorption-Modell“ (links) besagt, dass StAR (grün markiert) während des Imports in die Mitochondrien die Ausbildung von Kontaktstellen zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran initiiert. Das StAR-Protein bindet über seine N-terminale Leadersequenz an die Proteinkomplexe TOM (Transporter of the Outer Membrane) und TIM (Transporter of the Inner Membrane). Die Phosphorylierung am Serinrest 195 (rot markiert) soll dabei die Interaktion des StAR-Proteins mit der äußeren Mitochondrienmembran verbessern. Beim Import des Proteins bilden sich Kontaktstellen zwischen äußerer und innerer Membran aus. Dadurch kann die innere Membran Cholesterin direkt von der äußeren aufnehmen. In der inneren Membran diffundiert das Cholesterin zu dem p450scc-Enzymkomplex (blau dargestellt). In der Mitochondrienmatrix angekommen wird das StAR-Protein proteolytisch abgebaut. Bei dem „Intermembrane Shuttle-Modell“ (rechts) wird das StAR-Protein nicht direkt in die Mitochondrienmatrix transportiert, sondern verbleibt zunächst im Intermembranraum. Dort nimmt es Cholesterin von der äußeren Membran auf (StAR besitzt eine cholesterinbindende START-Domäne), transportiert es durch den Intermembranraum und gibt es an der inneren Membran wieder ab. Auch bei diesem Modell dient der Import in die Mitochondrienmatrix dazu, die Steroidogenese wieder zu beenden. Abbildung (modifiziert) aus Christenson et al. (2000).

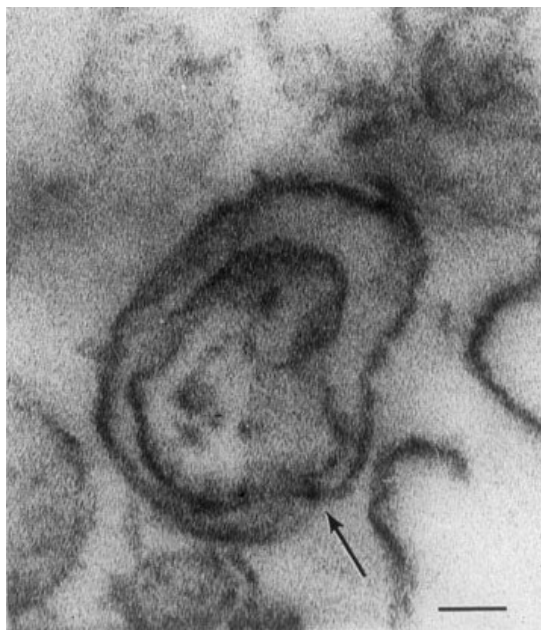


Abbildung 17: Bildung eines Membrankontakts zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme des Mitochondriums einer steroidogenen Zelle. Die Kontaktstelle ist mit dem Pfeil gekennzeichnet. Der Balken entspricht einer Länge von 50 nm. Abbildung aus Thomson (2003).

Sie konnten zeigen, dass bei Transfektion von Zellen mit einer N-62-StAR-cDNA, einem StAR-Protein, dem die N-terminale Importsequenz fehlt, genauso Steroide gebildet werden wie mit dem nativen StAR Protein. Bei Deletionen am C-Terminus hingegen geht die steroidogene Aktivität verloren (Arakane et al., 1996). Der Import von StAR in die Mitochondrien oder die Ausbildung von Kontaktstellen zwischen den Mitochondrienmembranen wären demnach nicht nötig, um die Steroidogenese auszulösen. Mit einem anderen experimentellem Ansatz konnten Bose et al. (2002) ebenfalls zeigen, dass StAR schon an der äußeren Mitochondrienmembran seine Aktivität entfalten kann. Sie exprimierten dazu Fusionsproteine, bei denen StAR entweder an ein Protein der äußeren Mitochondrienmembran oder an eins der inneren Membran gekoppelt war. StAR befand sich dann also konstitutiv entweder auf der cytoplasmatischen Seite der äußeren Mitochondrienmembran oder auf der dem Intermembranraum zugewandten Seite der inneren Membran - wurde also nicht in die Mitochondrien importiert. Das an der äußeren Membran befindliche StAR löste die Bildung von Steroidhormonen aus, das im Intermembranraum lokalisierte jedoch nicht. Diese Beobachtungen unterstützen auch die Theorie, dass der Import von StAR in die Mitochondrien dazu dient, die Bildung von Steroidhormonen wieder zu beenden. Durch Bindungstests mit radioaktivem Cholesterin und durch spektroskopische Messungen mit einem fluoreszierendem Cholesterinderivat konnte gezeigt werden, dass StAR

Cholesterin binden kann (Tsuji-shita und Hurley, 2000; Petrescu et al., 2001). Diese Beobachtungen sprechen für die Hypothese, dass StAR ein Cholesterintransporter ist, der im Intermembranraum der Mitochondrien wirkt. Mit einem *in vitro*-Experiment konnten Kallen et al. (1998) zeigen, dass StAR Cholesterin aus Lipidvesikeln aufnehmen und zu Mitochondrien transportieren kann – also in der Lage ist einen Cholesterintransport von Membran zu Membran durchzuführen. Zu der Cholesterin-Shuttle-Hypothese passen auch die Experimente von Tsuji-shita und Hurley (2000). Sie konnten mittels Röntgenspektroskopie die dreidimensionale Struktur der START-Domäne des MLN64-Proteins bestimmen, das eine ähnliche Primärstruktur wie das StAR-Protein hat. Für das StAR-Protein selbst konnte bisher noch keine Strukturanalyse durchgeführt werden, da es sich nicht kristallisieren ließ. Die Strukturanalyse zeigte, dass in der START-Domäne ein von hydrophoben Aminosäureresten gebildeter Hohlraum existiert. Dieser auch als hydrophober Tunnel bezeichnete Hohlraum wird durch ein U-förmiges beta-Faltblatt gebildet, das mit einer alpha-Helix abgeschlossen ist. Der Hohlraum ist groß genug, um ein Molekül Cholesterin aufnehmen zu können. Es gibt die Hypothese, dass dieser Hohlraum für den Cholesterintransport zuständig ist. Das StAR-Protein müsste sich dazu, nachdem es in den Intermembranraum transportiert wurde, an die äußere Membran anlagern oder einlagern und mit der anderen Seite in Kontakt mit der inneren Membran treten. Möglicherweise findet dies in der Nähe der Kontaktstellen zwischen äußerer und innerer Membran statt, weil dort der Abstand zwischen beiden Membranen nur gering ist. Das Cholesterin könnte dann von der äußeren zur inneren Membran transportiert werden (Abb. 18). Es ist noch wenig darüber bekannt, mit welchen Proteinen StAR wechselwirkt. Fest steht nur, dass die N-terminale Leitsequenz mit der Importmaschinerie der äußeren und inneren Mitochondrienmembran interagiert. Kallen et al. (1998) konnten mit einem *in vitro* Experiment zeigen, dass StAR Cholesterin aus Liposomen zu hitzedenaturierten und mit Trypsin behandelten Mitochondrien transportieren kann. Demnach wären keine mitochondrialen Proteine für diesen Cholesterintransport nötig. Es gibt allerdings Untersuchungen, die den peripheren Benzodiazepinrezeptor (PBR) als möglichen Interaktionspartner des StAR-Proteins nennen (Lacapère et al., 2003). Der PBR ist ein in der äußeren Mitochondrienmembran exprimiertes Protein mit fünf Transmembranhelices und einer Masse von 18 kDa. Es konnte gezeigt werden, dass der PBR Cholesterin spezifisch bindet (Li et al., 2000). Papadopoulos et al. (1997) schalteten in einer steroidogenen Zelllinie das PBR-Gen durch homologe Rekombination aus. Als Folge davon bildeten die Zellen fast keine Steroide mehr.

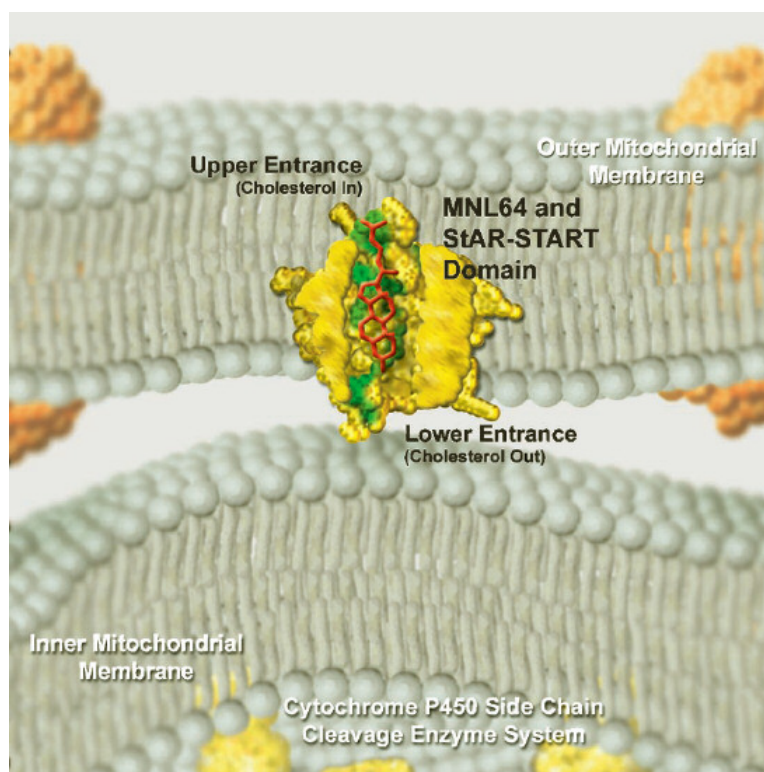


Abbildung 18: Ein möglicher Mechanismus des Cholesterintransports in Mitochondrien. Das StAR-Protein wird in den Intermembranraum transportiert und lagert sich in die äußere Mitochondrienmembran ein. Durch eine Änderung in seiner Konformation wird der hydrophobe Tunnel im Inneren des Proteins für Cholesterin zugänglich. In der Nähe der Kontaktstellen zwischen äußerer und innerer Membran könnte das StAR-Protein mit beiden Membranen in Kontakt treten und den Intermembranraum überbrücken. Alternativ dazu könnte es sich, nachdem es Cholesterin (rot dargestellt) gebunden hat, von der äußeren Membran lösen, zur inneren Membran diffundieren, sich an diese anlagern und das Cholesterin dort wieder abgeben. Abbildung aus Stocco (2001)

Darauf, dass der PBR an der Steroidogenese beteiligt ist, weist auch die Beobachtung hin, dass Benzodiazepine, die Liganden des PBR sind, die Konzentration von Glucocorticoiden im Blutplasma erhöhen (Keim et al., 1976). Durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Messungen konnten West et al. (2001) zeigen, dass der PBR und das StAR-Protein an der äußeren Mitochondrienmembran in engen räumlichen Kontakt kommen (Abb. 19). Einen weiteren möglichen Interaktionspartner des StAR-Proteins identifizierten Sugawara et al. (2003). Mit einem Hefe Two-Hybrid-Experiment fanden sie ein Protein, das mit dem StAR-Protein interagiert. Sie nannten das Protein StAR Binding Protein (SBP). Es handelt sich dabei um ein Protein mit 657 Aminosäuren. Sie konnten zeigen, dass SBP in menschlichen Geweben exprimiert wird.

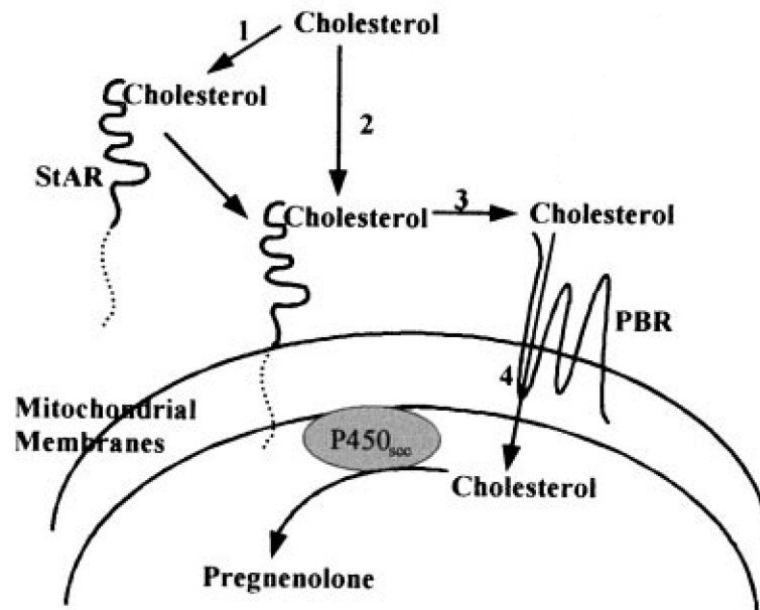


Abbildung 19: Der periphere Benzodiazepinrezeptor (PBR) ist möglicherweise am Cholesterintransport in Mitochondrien beteiligt. Nach dieser Hypothese bindet StAR im Cytoplasma Cholesterin (1) und transportiert es zu den Mitochondrien. Oder StAR nimmt Cholesterin auf das sich schon in der äußeren Mitochondrienmembran befindet (2). Das Cholesterin wird vom StAR-Protein zum PBR transferiert (3). Der PBR transportiert das Cholesterin zur inneren Mitochondrienmembran (4). Möglicherweise bilden die fünf Transmembrandomänen dazu einen hydrophoben Tunnel. Abbildung (modifiziert) aus West et al. (2001)

Transfektionsexperimente mit SBP-cDNA und RNAi-Experimente zeigten, dass SBP tatsächlich an der Synthese von Steroidhormonen beteiligt ist. Darüber hinaus führte die Arbeitsgruppe fluoreszenzmikroskopische Studien mit SBP und StAR durch. So konnte gezeigt werden, dass SBP und StAR in der Zelle an Mitochondrien kolokalisieren. Die Funktion, die SBP bei der Steroidogenese hat, ist noch nicht bekannt. Auch die Hormonsensitive Lipase (HSL) interagiert mit StAR. Dies konnte von Shen et al. (2003) mittels GST-Pull-Down-Experimenten gezeigt werden. Die HSL hydrolysiert die Cholesterinester der intrazellulären Lipidspeichertröpfchen, die bei steroidogenen Zellen besonders häufig vorkommen. Das dadurch frei werdende Cholesterin wird für die Steroidsynthese genutzt.

2.2.3 Die Rolle des MLN64-Proteins bei der Biosynthese von Steroiden

Das MLN64-Protein ist ebenfalls an der Bildung von Steroidhormonen beteiligt. Es ist in den Membranen von späten Endosomen lokalisiert und am Cholesterintransport von den späten Endosomen zu den Mitochondrien beteiligt. Es besitzt am N-Terminus vier Transmembrandomänen und eine carboxyterminale, ins Cytoplasma ragende START-Domäne, die Cholesterin binden kann und 35 Prozent Sequenzhomologie zu StAR besitzt. (Abb. 20). Tsujishita et al. (2000) konnten mittels Röntgenstrukturanalyse die Tertiärstruktur der START-Domäne aufklären und konnten auch zeigen, dass sie Cholesterin binden kann. Entdeckt wurde das MLN64-Protein, weil es in verschiedenen Brustkrebstumoren überexprimiert wird - MLN steht für Metastatic Lymph Node (Moog-Lutz et al., 1997; Alpy et al., 2003).

Die genaue Funktion, die MLN64 bei der Bildung von Steroidhormonen hat, ist noch nicht bekannt. Da MLN64 im Gegensatz zu StAR in der Plazenta exprimiert wird, besteht die Möglichkeit, dass es dort die Funktion von StAR übernimmt (Watari et al., 1997; Furukawa et al., 1998). Eventuell vermittelt das MLN64 Protein den Transport von Cholesterin aus späten Endosomen/Lysosomen, die ja über LDL-Rezeptoren aufgenommenes Cholesterin enthalten, zu den Mitochondrien steroidogener Zellen der Plazenta. Experimente, die von Holttä-Vuori et al. (2005) durchgeführt wurden, weisen darauf hin, dass MLN64 an der Interaktion von späten Endosomen mit dem Cytoskelett beteiligt ist. Möglicherweise ist das MLN64-Protein also kein Cholesterintransporter, sondern vermittelt die Interaktion von späten Endosomen mit dem Cytoskelett. Die Synthese von Steroidhormonen in der Plazenta könnte so zum Beispiel durch MLN64 vermittelte Kontakte der cholesterinhaltigen späten Endosomen mit den Mitochondrien zustande kommen.

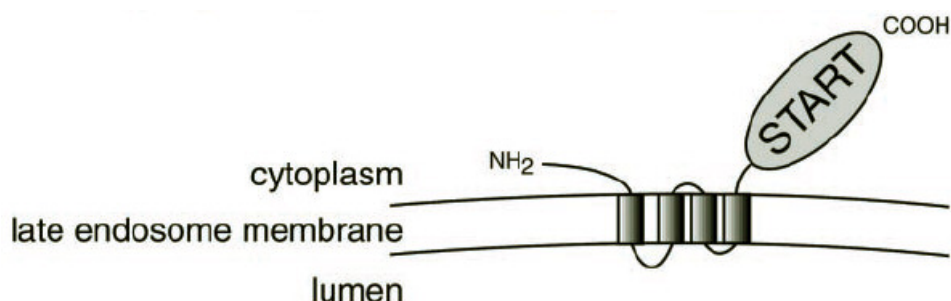


Abbildung 20: Das MLN 64-Protein. Es besitzt vier Transmembrandomänen und eine cytoplasmatische START-Domäne, die Cholesterin binden kann und zu 35 Prozent mit der Aminosäuresequenz des StAR-Proteins übereinstimmt. Abbildung aus Alpy et al. (2001).

Tuckey et al. (2004) haben die MLN64-START-Domäne in Bakterienzellen überexprimiert (N218-MLN64). Sie konnten damit zeigen, dass diese Domäne Cholesterin zwischen künstlich hergestellten Lipidvesikeln transportieren kann und auch, dass sie isolierte Mitochondrien zur Bildung von Steroidhormonen anregen kann. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Domäne bei niedrigem pH-Wert genauso wie StAR eine teilweise entfaltete Konformation annehmen kann. Transfizierte man nicht-steroidogene Zellen mit der START-Domäne von MLN64 und der p450scc-cDNA, dann produzierten diese Zellen Pregnenolon (Bose et al., 2000). Die Expression des kompletten MLN64-Proteins führte jedoch zu keiner Steigerung der Steroidsynthese. Kishida et al. (2004) erzeugten eine MLN64-Knock-out-Maus. Bei dieser war die Bildung von Steroidhormonen gegenüber dem Wildtyp vermindert. Die Mäuse waren allerdings lebensfähig und konnten auch Nachkommen zeugen. Möglicherweise hat das MLN64-Protein nur eine unterstützende Funktion beim intrazellulären Lipidtransport, und dessen Funktion wird bei Ausfall des MLN64-Proteins vom NPC1-Protein übernommen. Das NPC1-Protein ist ebenfalls in der Membran von späten Endosomen/Lysosomen lokalisiert und spielt eine wichtige Rolle beim intrazellulären Lipidtransport (Zhang et al., 2002).

2.3 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

2.3.1 Struktur und Funktion der G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (G-Protein Coupled Receptors, GPCRs) ist die größte Gruppe von membranständigen Rezeptoren beim Menschen. Die GPCRs lösen physiologische Reaktionen auf eine Vielzahl von Stimuli aus. Dazu gehören Hormone, Neurotransmitter, kleine Peptide, Proteine und auch sensorische Stimuli wie Geruch, Geschmack und Licht. Die Hälfte der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind Rezeptoren für Geruchsstoffe im olfaktorischen Sinnessystem. Über fünf Prozent der Gene bei *Caenorhabditis elegans* codieren für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Bargmann, 1998). Bisher sind rund 2000 Mitglieder dieser Rezeptorfamilie identifiziert worden (Ji et al., 1998). Dreißig Prozent aller Arzneistoffe wirken über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Hill, 2006). Gemeinsames Strukturmerkmal dieser Rezeptoren sind sieben Transmembranhelices. Sie werden deshalb auch als Familie der Sieben-Helix-Transmembranrezeptoren bezeichnet. G-Proteine sind regulatorische GTPasen. Die Wechselwirkung des G-Proteins mit dem Rezeptor führt dazu, dass GDP gegen GTP ausgetauscht und das G-Protein somit aktiviert wird (Abb. 21). Das aktivierte G-Protein dissoziiert in die alpha-GTP- und die beta/gamma-

Untereinheit. Die alpha-Untereinheit hydrolysiert GTP zu GDP, wird dadurch inaktiviert und reassoziert mit dem beta/gamma-Komplex; der Ausgangszustand ist so wieder erreicht (Hamm, 1998; Lambright, 1996). Die Signalweiterleitung erfolgt durch die aktivierte alpha-Untereinheit oder auch durch den beta/gamma-Komplex (Clapham und Neer, 1997). Solange sie GTP gebunden haben, sind die G-Proteine aktiv, sobald das GTP zu GDP hydrolysiert worden ist, sind sie wieder inaktiv. Die G-Proteine üben dadurch eine Schalterfunktion bei zentralen zellulären Prozessen aus. Durch G-Proteine können unterschiedliche Effektormoleküle moduliert werden (Evans und Graham, 1989), so zum Beispiel:

- Eine Adenylat-Cyclase, die 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. Diese katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ und DAG können als second messenger fungieren (z. B. beim Oxytocinrezeptor).
- Ein membrangebundener Ionenkanal kann durch ein G-Protein gesteuert werden. Dies kann zur Änderung des Membranpotentials führen (z. B. beim muskarinischen Acetylcholinrezeptor).
- Das G-Protein des Rhodopsins aktiviert eine Phosphodiesterase, welche die Hydrolyse von cGMP katalysiert.

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind integrale Membranproteine mit sieben hydrophoben, antiparallelen α -Helices, die als Transmembrandomänen die Membran durchdringen. Die sieben Transmembranhelices werden durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden (Abb. 22). Die Strukturmodelle der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren lehnen sich sehr stark an die Struktur des Bakteriorhodopsins an, die durch Röntgenspektroskopie aufgeklärt werden konnte (Palczewski et al., 2000). Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren können durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Liganden aktiviert werden. Neben dem Rhodopsin, das durch Photonen aktiviert wird, gibt es Rezeptoren für biogene Amine wie z. B. Adrenalin, für Eicosanoide, für Nukleotide und für bestimmte Lipidbestandteile wie zum Beispiel Lysophosphatidsäure. Diese Liganden binden in der Transmembranregion der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Abb. 23). Bei größeren Liganden, Peptiden mit bis zu vierzig Aminosäuren, sind außer der Transmembranregion auch die extrazellulären Schleifen und das N-terminale Segment an der Bindung beteiligt.

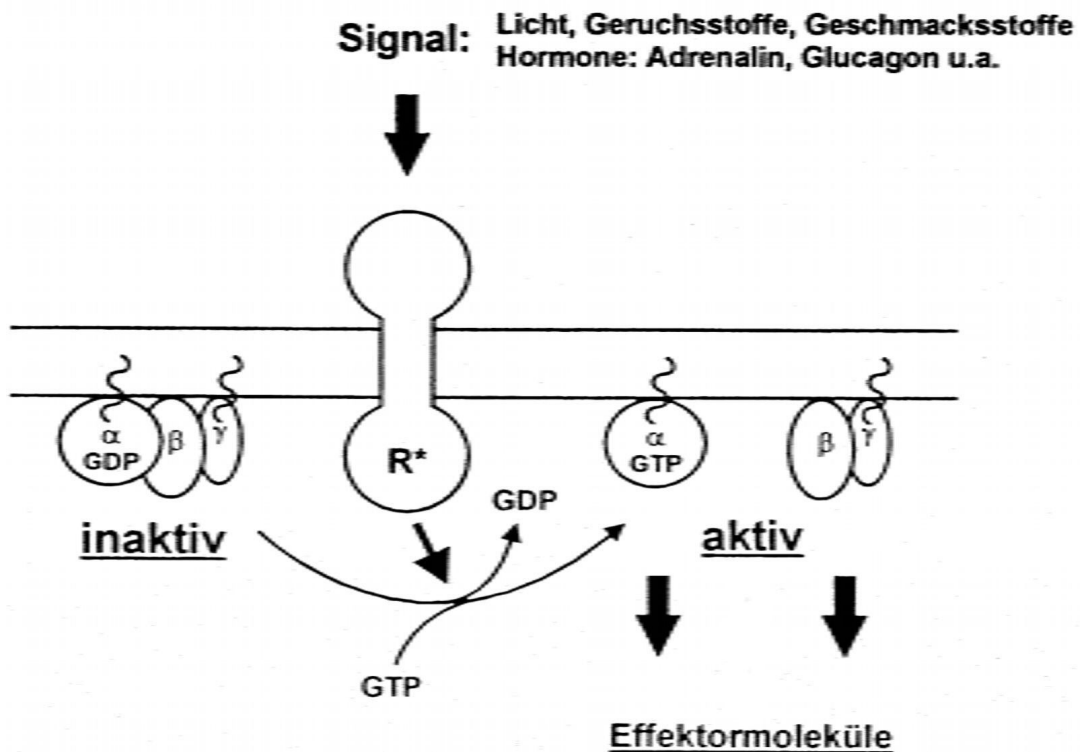


Abbildung 21: Signaltransduktion durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Bei Bindung des Liganden nimmt der Rezeptor eine aktivierte Konformation an (R*). Der aktivierte Rezeptor interagiert mit der alpha-Untereinheit des G-Proteins. Als Folge davon diffundiert an die alpha-Untereinheit gebundenes GDP ab, und GTP bindet. Die alpha-Untereinheit und die beta/gamma-Untereinheit diffundieren auseinander. Sowohl alpha- als auch beta/gamma-Untereinheit können innerhalb der Zelle Effektormoleküle aktivieren. Abbildung aus Krauss (2002).

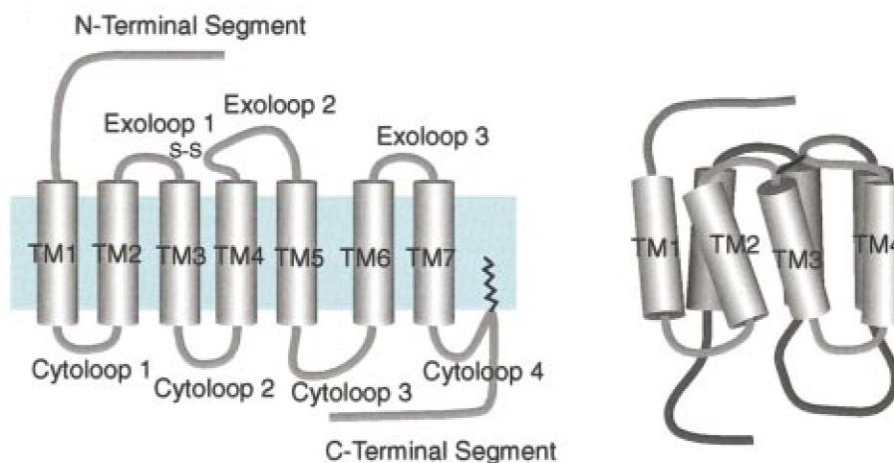


Abbildung 22: Aufbau G-Protein gekoppelter Rezeptoren. GPCRs bestehen aus sieben Transmembrandomänen, die durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Der Rezeptor kann durch Lipidanker zusätzlich in der Membran verankert werden. Die sieben Transmembran-domänen bilden einen geschlossenen Kreis. Die Konformation des Rezeptors kann durch Disulfidbindungen stabilisiert werden. Abbildung aus Ji et al. (1998)

Bei der Aktivierung eines Rezeptors durch seinen Liganden geht man von mindestens drei verschiedenen Rezeptorkonformationen aus (Gether und Kobilka, 1998): dem nicht mit einem Liganden besetzten Rezeptor (R), dem mit einem Agonisten besetzten und dadurch stabilisierten Rezeptor (R*) und dem mit einem inversen Agonisten besetzten Rezeptor (R⁰). Ein inverser Agonist ist ein Antagonist, der die basale Aktivität des Rezeptors reduziert. Die basale Aktivität kommt dadurch zustande, dass der unbesetzte Rezeptor instabil ist und spontan in den aktiven Zustand übergehen kann. Wird der Rezeptor durch Ligandenbindung aktiviert, so führt dies zu Änderungen in der relativen Orientierung der Transmembranhelices. Beim Rhodopsin und bei dem beta-adrenergen Rezeptor ist die Aktivierung von einer kleinen Drehung der Transmembrandomäne drei und einer großen Drehung der Transmembrandomäne sechs begleitet (gegen den Uhrzeigersinn, von der extrazellulären Seite aus gesehen). Dadurch entfernt sich das cytoplasmatische Ende der Transmembrandomäne sechs von der Transmembrandomäne drei. Als Folge davon werden G-Protein-Bindungsstellen in den intrazellulären Schleifen zwei und drei freigelegt (Farrens et al., 1996). An der cytoplasmatischen Seite von Transmembrandomäne drei befindet sich bei Rezeptoren der Rhodopsin-Familie ein hochkonserviertes DRY-Motiv (im Oxytocinrezeptor DRC). Das Arginin dieses Motivs wird im inaktiven Rezeptor durch eine hydrophile Tasche aus polaren Resten der Transmembrandomänen eins, zwei und sieben festgehalten. Die Aktivierung des Rezeptors führt dazu, dass das Aspartat protoniert wird, wodurch das Arginin aus der polaren Tasche verdrängt wird.

Receptors for Amines,
Nucleotides, Eicosanoids,
and Lipid Moieties



Peptide Hormone Receptors



Abbildung 23: Ligandenbindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Biogene Amine, Eicosanoide, Nukleotide und bestimmte Lipidbestandteile binden in der Transmembranregion der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Peptiden binden außer an die Transmembranregion auch die extrazellulären Schleifen und das N-terminale Segment. Abbildung aus Ji et al. (1998)

Infolgedessen werden Sequenzen der zweiten und dritten cytoplasmatischen Schleife freigelegt, die dann mit heterotrimeren G-Proteinen interagieren können (Probst et al., 1992; Favre et al., 2005). Nach längerer Aktivierung werden die Rezeptoren desensibilisiert. Dies geschieht, indem die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren innerhalb von Sekunden bis Minuten nach ihrer Aktivierung an Serin- und Threoninresten der cytosolischen Domäne phosphoryliert werden (Lefkowitz, 1998). Die Phosphorylierung kann durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), durch eine Diacylglycerol-aktivierte Proteinkinase (PKC) oder durch eine G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Proteinkinase (GRK) erfolgen. Die Proteinkinase wird dabei selbst auch durch die Signaltransduktionskaskade aktiviert, die von der Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ausgeht. Es findet also eine negative Rückkopplung statt. Bei der Phosphorylierung durch die PKA oder durch die PKC ändert sich die Konformation des G-Protein-gekoppelten Rezeptors so, dass die Interaktion mit G-Proteinen verhindert wird. Nach einer Phosphorylierung durch eine GRK hingegen bindet das Protein Arrestin an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor und verhindert damit, dass G-Proteine an den Rezeptor binden können. Das Arrestin kann Clathrin binden, welches die Endocytose des Rezeptors bewirkt. Der endocytierte Rezeptor kann entweder in Lysosomen abgebaut werden oder er wird in Endosomen dephosphoryliert, vom Liganden getrennt und zur Zellmembran zurücktransportiert.

2.3.2 Der Oxytocinrezeptor

Der Oxytocinrezeptor (OTR) ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, dessen wichtigste Funktionen die Auslösung der Wehen bei der Geburt und die Stimulierung der Milchejektion in den Brustdrüsen sind (Dale, 1906; Ott und Scott, 1910). Ligand des OTRs ist das Peptidhormon Oxytocin. 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 42,7 kDa. Das hydrophatische Profil der Aminosäuresequenz lässt auf sieben mögliche Transmembrandomänen schließen, die zu 20 bis 30 % identisch sind mit entsprechenden Domänen anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren des Rhodopsintyps (Abb. 24). Das Protein enthält mehrere Stellen für mögliche posttranslationale Modifikationen. Es gibt drei N-Glykosylierungsstellen im aminoterminalen Bereich vor der ersten Transmembrandomäne. Zwischen den Cysteinen 112 und 187 in der ersten bzw. zweiten extrazellulären Schleife findet man eine Disulfidbrücke. Der Vergleich mit den Rezeptoren aus Schweinenieren

(Gorbulev et al., 1993), der Ratte (Rozen et al., 1995) und dem Rind (Ivell et al., 1995) zeigt eine große Variation der Aminosäuren auf der intrazellulären Seite. Im Gegensatz dazu sind die oben beschriebenen Strukturmerkmale, die Transmembrandomänen und vor allem die ersten beiden extrazellulären Schleifen streng konserviert. 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 von 38 kDa, welche dem berechneten Molekulargewicht des klonierten Rezeptors entspricht. Oxytocin ist ein Nonapeptid und liegt C-terminal als Amid vor. Die Aminosäurereste 1 und 6 sind durch eine Disulfidbrücke verbunden. Die ersten sechs Aminosäurereste bilden somit einen zwanziggliedrigen Ring, an den ein C-terminales Tripeptid geknüpft ist (Abb. 25). Oxytocin und Vasopressin werden in neurosekretorischen Zellen gebildet, deren Zellkörper zu Kerngebieten vereint im Nucleus supraopticus und im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus liegen. Die Hormone werden in Granula verpackt, in den Axonen zur Neurohypophyse transportiert und dort in den neurosekretorischen Endigungen der Nervenfasern gespeichert (Brownstein et al., 1990). Oxytocin und Vasopressin stammen von ähnlichen Präprohormonen ab. Nach einer Signalsequenz folgen jeweils die Nonapeptidhormone und ihre Trägerproteine, die als Neurophysine bezeichnet werden. Die Präprohormone werden in mehreren Schritten enzymatisch in die eigentlichen Hormone und deren Trägerproteine gespalten. Die Trägerproteine gelangen zusammen mit den Hormonen in die Speichergranula. Die Neurophysine erfüllen eine Schutzfunktion und werden zusammen mit ihren Hormonen in das Blut ausgeschüttet. Die Sekretion der Hormone durch Exocytose des Granuluminhaltes erfolgt, sobald entsprechende Reize an den hypothalamischen Nervenzellen einlaufen (Breslow, 1979; Acher, 1993). Zusätzlich zu seiner endokrinen Ausschüttung aus der Neurohypophyse kann Oxytocin jedoch auch von intrauterinen Geweben, wie z. B. der Decidua (Epithelschicht des Uterus), synthetisiert werden und parakrin wirken (Miller et al., 1993; Lefebvre et al., 1992). Für die Wirkung des Oxytocins unverzichtbar sind zweiwertige Metallkationen. Dies gilt sowohl im Uterus (Bentley, 1965; Krejčí und Poláček, 1968), als auch bei der Bindung von tritiiertem Hormon an Plasmamembranen, bei der Mg^{2+} oder Mn^{2+} im Puffer die Affinität des Agonisten zum Rezeptor steigern (Soloff und Swartz, 1974). Im Gegensatz hierzu ist die Bindung von Oxytocin-Antagonisten unabhängig von Metallkationen und wird auch durch den Zusatz von EDTA nicht inhibiert (Antoni und Chadio, 1989).

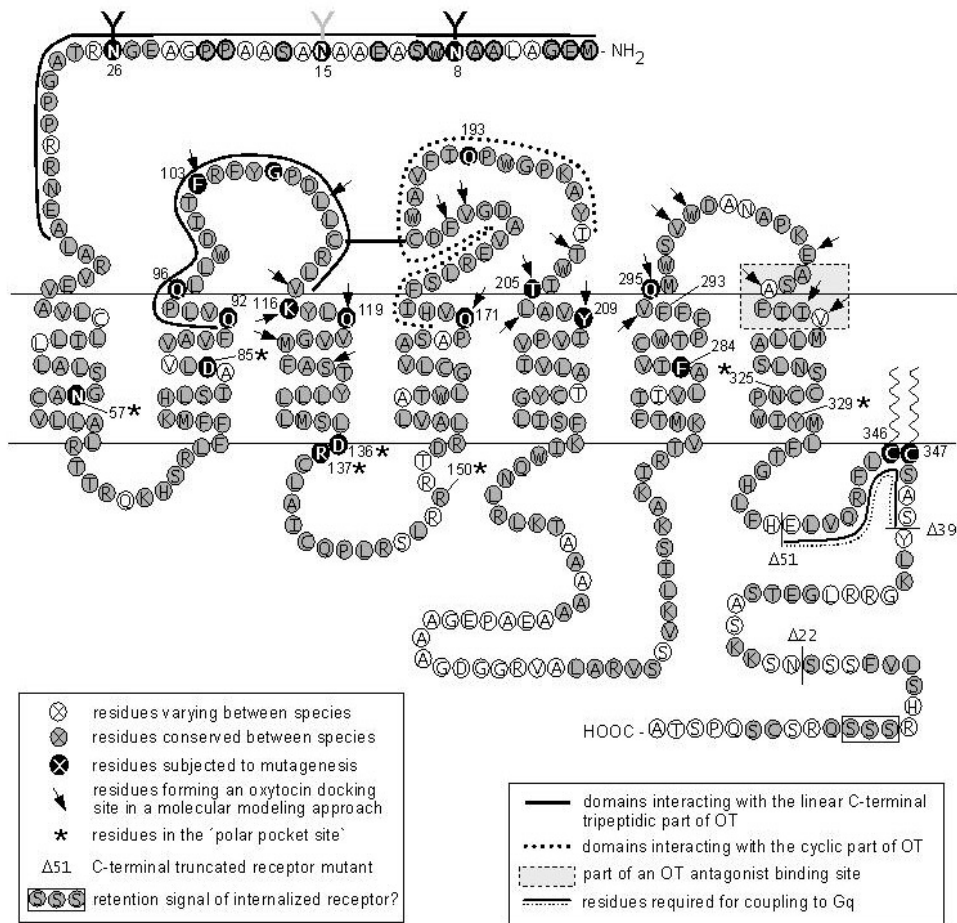


Abbildung 24: Der humane Oxytocinrezeptor. Abbildung aus Gimpl und Fahrenholz (2001).

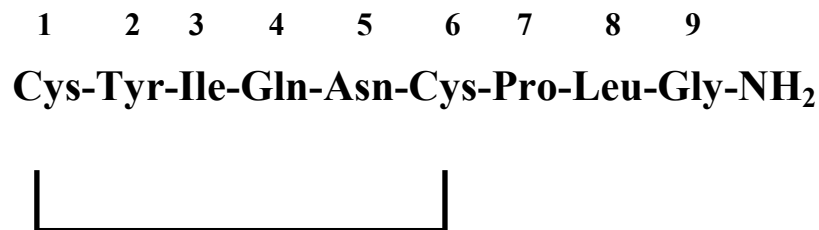


Abbildung 25: Die Struktur von Oxytocin. Die Cysteine 1 und 6 sind durch eine Disulfidbrücke verbunden.

Nach welchem Mechanismus Metallkationen die Bindung der Agonisten beeinflussen ist noch nicht geklärt. Die Oxytocinsekretion der Neurohypophyse wird während des Geburtsvorganges durch nervale Afferenzen aus dem Uterus und der Vagina stimuliert. Durch Northern-Blot-Analyse wurde gezeigt, dass die Regulation der Rezeptormenge im

Myometrium während der Schwangerschaft auf der Ebene der Genexpression erfolgt (Kimura et al., 1992). Während im frühen Stadium der Schwangerschaft die Menge an mRNA noch sehr gering ist, steigt sie kurz vor der Geburt enorm an, was zu einer gesteigerten Empfindlichkeit des Myometriums für Oxytocin führt (Fuchs et al., 1982). Nach der Geburt findet dann wieder eine Rückregulation der Rezeptordichte statt. Durch Oxytocin kommt es in dieser Phase zu heftigen Kontraktionen der Uterusmuskulatur, die als Wehen bekannt sind. 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. Oxytocin findet deshalb klinische Verwendung zur Einleitung der Wehen und zur Promotion der Laktation. Oxytocin wirkt jedoch nicht nur als Hormon in den peripheren Organen, sondern auch als zentraler Neurotransmitter und Neuromodulator im Gehirn (Richard et al., 1991). Das Hormon beeinflusst das Sozialverhalten, indem es die Lust fördert soziale Bindungen einzugehen. Es steuert Eltern-Kind-Beziehungen und induziert sexuelles Paarverhalten (Insel, 1992). Bei der Ejakulation des Mannes beim Orgasmus steigt der Oxytocinspiegel im Blut auf das Dreifache an. Oxytocin bewirkt zudem die Kontraktion der glatten Muskulatur der Beckenbodenorgane und fördert die Erektion (Carter, 1992; Pedersen et al., 1992). Oxytocin stimuliert die Prostaglandin-Synthese im Endometrium (Roberts et al., 1976), in der Decidua (Fuchs et al., 1982; Fukai et al., 1984) und im Amnion (Roberts et al., 1984; Moore et al., 1988; Hinko und Soloff, 1992). Man fand heraus, dass Unterschiede im Sozialverhalten und in der Paarbindung verschiedener Wühlmausarten mit der unterschiedlichen Verteilung von Oxytocinrezeptoren in bestimmten Hirnregionen korreliert sind (Insel und Shapiro, 1992; Insel, 1992). Der Oxytocinrezeptor zeigt eine Sequenzhomologie von 40 % zum Vasopressin-V₂-Rezeptor. Aus Ligandenbindungsstudien mit Rezeptorchimären ist bekannt, dass Oxytocin vor allem mit der N-terminalen Region des Rezeptors, sowie mit dessen erster und zweiter extrazellulärer Schleife wechselwirkt (Postina et al., 1996). Demnach bindet der lineare, C-terminale, aus drei Aminosäureresten bestehende Teil des Oxytocins an die N-terminale Domäne und die erste extrazelluläre Schleife, während die zweite extrazelluläre Schleife mit dem zyklischen Teil des Oxytocinmoleküls interagiert.

2.3.3 Regulation der Affinität des Oxytocinrezeptors durch Cholesterin

Membranproteine bzw. in der Zellmembran verankerte Hormonrezeptoren werden durch den Cholesteringehalt der Membran beeinflusst. Das Membrancholesterin kann bestimmte

Konformationen von Rezeptoren stabilisieren. Das kann durch eine direkte Interaktion des Cholesterins mit dem Rezeptor geschehen, wenn das Cholesterin an eine bestimmte Stelle des Rezeptors binden kann. Die Funktion von Membranproteinen kann aber auch indirekt durch den Cholesteringehalt der Membran moduliert werden, da deren biophysikalische Eigenschaften vom Cholesteringehalt abhängen.

Der Oxytocinrezeptor wird durch Cholesterin spezifisch reguliert. Änderungen des Cholesteringehaltes der Membran beeinflussen die Ligandenbindung des Rezeptors stark. Ein Entzug des Cholesterins aus der Membran hat eine niedrigere Affinität des Rezeptors zu seinem Liganden zur Folge (Abb. 26).

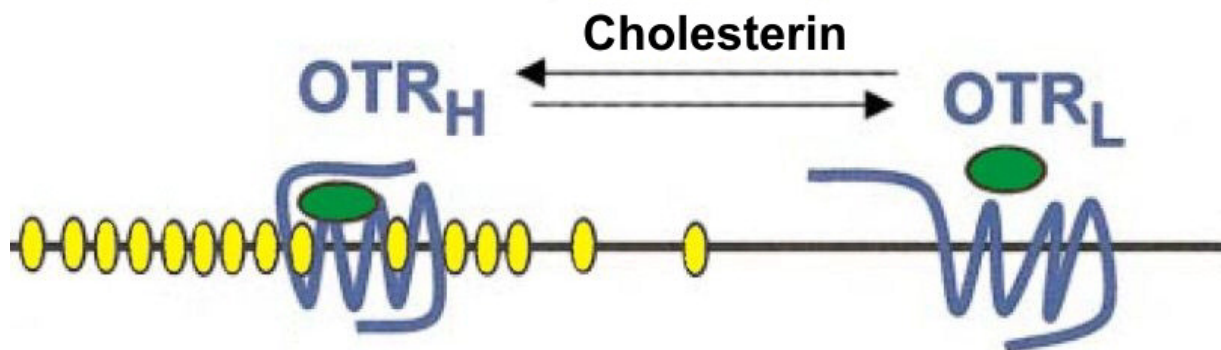


Abbildung 26: Der Oxytocinrezeptor wird durch Cholesterin reguliert. Wird der Plasmamembran Cholesterin (gelb dargestellt) entzogen, geht der OTR von einem hochaffinen (H) in einen niederaffinen (low affinity, L) Zustand über. Der Ligand Oxytocin (grün) wird dann nicht mehr oder kaum noch gebunden. Der Effekt ist reversibel – wird der Cholesteringehalt der Membran wieder erhöht, dann nimmt der OTR wieder die hochaffine Konformation an. Abbildung (modifiziert) aus Gimpl und Fahrenholz (2001).

Klein et al. (1995) konnten durch Experimente mit Meerschweinchen-Zellmembranen zeigen, dass die Dissoziationskonstante K_D des Oxytocinrezeptors für seinen Liganden Oxytocin von einem Wert von 1,5 nM auf einen Wert von 131 nM anstieg, wenn man den Membranen experimentell Cholesterin entzog – der Rezeptor ging also von einem hochaffinen in einen niederaffinen Zustand über. Die Anzahl der Bindungsstellen blieb dabei gleich ($B_{\max} = 1,7$ pmol/mg). Dieser Effekt war reversibel. Erhöhte man den Cholesteringehalt der Membranen wieder, dann erniedrigte sich auch der K_D -Wert wieder. Erweitert wurden diese Beobachtungen durch Experimente, die von Gimpl et al. (1997) durchgeführt wurden (Abb. 27). Dabei wurde den Membranen von Zellen, die den Oxytocinrezeptor oder den strukturverwandten Cholecystininrezeptor exprimierten, Cholesterin entzogen. Bei Radioliganden-Bindungstests zeigte sich, dass die Funktion des Oxytocinrezeptors stärker

vom Cholesteringehalt der Membran beeinflusst wurden als die des Cholecystokinrezeptors – ein Hinweis darauf, dass der Oxytocinrezeptor im Gegensatz zum Cholecystokinrezeptor direkt mit Cholesterin interagiert.

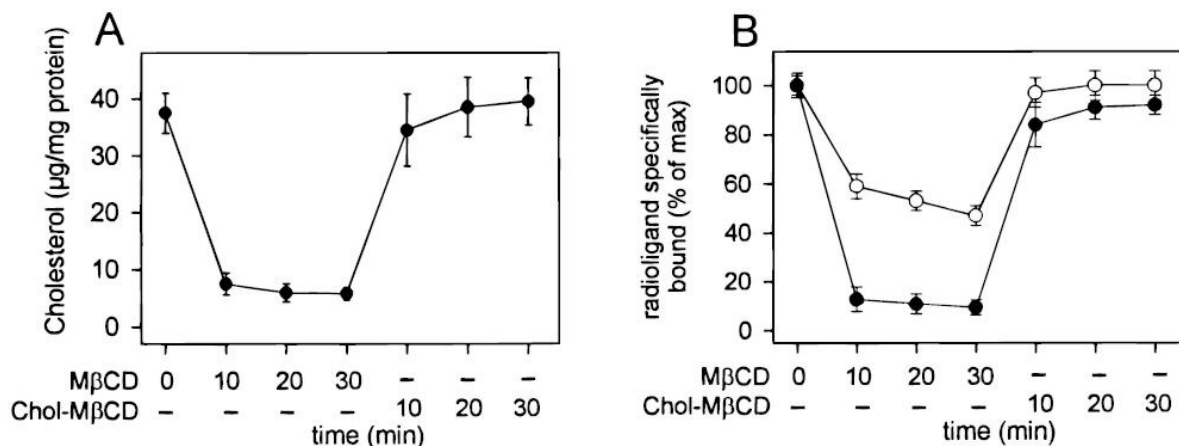


Abbildung 27: Einfluss des Membran-Cholesteringehalts auf die Ligandenbindung des Oxytocinrezeptors. A: Das Cholesterin ließ sich mit der Substanz MβCD innerhalb von 30 min fast vollständig aus Zellmembranen entfernen. Die Membranen konnten innerhalb von weiteren 30 min mit Hilfe Chol-MβCD wieder mit Cholesterin angereichert werden. B: Ligandenbindungstests mit radioaktivem Oxytocin mit den auf diese Weise behandelten Membranen (schwarze Punkte) zeigen, dass die Affinität des OTR zum Oxytocin bei Verringerung des Cholesteringehalts der Membranen fast völlig verloren geht. Zum Vergleich ein Ligandenbindungstest mit dem Cholecystokinrezeptor (CCKR) und radioaktivem Cholecystokinin (weiße Punkte). Der CCKR ist ein anderer G-Protein gekoppelter Rezeptor, der in seiner Struktur dem OTR sehr ähnlich ist. Beim CCKR ist der Effekt nicht so stark wie beim OTR, was darauf hinweist, dass die Affinität des OTRs nicht über die allgemeinen Membraneigenschaften moduliert wird. Abbildung aus Gimpl et al. (1997).

Durch weitere Experimente konnten Gimpl et al. zeigen, dass der OTR tatsächlich spezifisch mit Cholesterin interagiert (Abb. 28). Sie führten dazu Anisotropiemessungen und Radioliganden-Bindungstests mit rezeptorhaltigen Membranen durch, bei denen der Cholesteringehalt auf unterschiedliche Werte eingestellt worden war. Die Fluoreszenzanisotropie ist ein Maß für den Cholesteringehalt einer Membran. Bei steigendem Cholesteringehalt der Membran nimmt die Anisotropie zu. Beim Oxytocinrezeptor zeigte sich ein sigmoidaler Zusammenhang zwischen Ligandenbindung und Anisotropie. Beim Cholecystokinrezeptor hingegen ist dieser Zusammenhang linear. Man kann daraus schließen, dass der Cholecystokinrezeptor indirekt durch die Membraneigenschaften moduliert wird, während der Oxytocinrezeptor hingegen direkt mit dem Cholesterin interagiert.

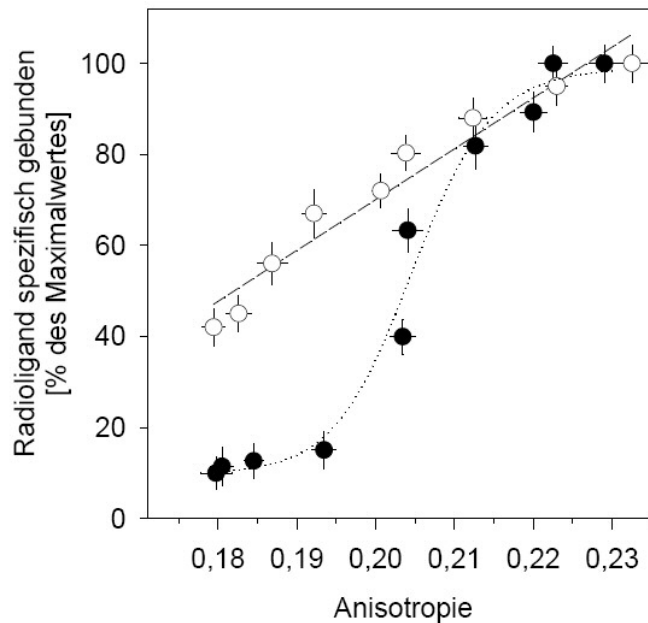


Abbildung 28: Ligandenbindung des Oxytocinrezeptors und des Cholecystokinrezeptors in Relation zur Anisotropie der Membranen. Die Anisotropie einer Membran verhält sich proportional zum Cholesteringehalt der Membran. Beim Oxytocinrezeptor zeigt sich eine sigmoidale Abhängigkeit zwischen Ligandenbindung und Anisotropie (schwarze Punkte). Beim Cholecystokinrezeptor ist dieser Zusammenhang dagegen linear (weiße Punkte). Abbildung aus Gimpl et al. (1997).

Der sigmoidale Verlauf der Affinität des OTR zu seinem Liganden weist außerdem darauf hin, dass der OTR entweder in einer Konformation mit hoher Affinität oder in einer Konformation mit niedriger Affinität vorliegt und keine Konformation mit mittlerer Affinität existiert. Entfernt man nur einen kleinen Teil des Cholesterins aus der Membran, dann stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Rezeptoren mit hoher Affinität und Rezeptoren mit niedriger Affinität ein. Das Cholesterin hätte demnach eine Schalterfunktion, es könnte den inaktiven Rezeptor in einen aktiven Zustand überführen. Möglicherweise ist dies ein Mechanismus, mit dem der Oxytocinrezeptor auch im Organismus reguliert wird. Der Rezeptor könnte von cholesterinarmen Bereichen der Plasmamembran in cholesterinreiche Rafts-Domänen transferiert und dadurch aktiviert werden (Gimpl et al., 2000). Die Cholesterin-Abreicherungs- und Wiederanreicherungs-experimente ließen sich auch mit detergenssolubilisierten Rezeptoren durchführen, was ebenfalls darauf hinweist, dass der Oxytocinrezeptor direkt mit dem Cholesterin interagiert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass nur Cholesterin spezifisch mit dem Oxytocinrezeptor interagiert. Lagert man andere Steroide, die dasselbe Sterol-Grundgerüst wie Cholesterin haben, in Cholesterin-abgereicherte Membranen ein, dann lässt sich der hochaffine Zustand des Oxytocinrezeptors damit nicht wieder herstellen – was darauf hindeutet, dass die chemischen Gruppen des

Cholesterinmoleküls – vor allem die Hydroxygruppe in Position drei – eine spezifische Interaktion mit dem Rezeptormolekül vermitteln (Burger et al., 2000). Studien mit molekularem Modeling, die von Politowska et al. (2001) durchgeführt wird, unterstützen ebenfalls die Aussage, dass der Oxytocinrezeptor eine Cholesterin-Bindungsstelle besitzt.

2.4 Ziele der Arbeit

Cholesterin kann die Eigenschaften von Proteinmolekülen beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten das StAR- und das MLN64-Protein, der humane Oxytocinrezeptor und das SCAP-Protein hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit Cholesterin untersucht werden. Alle diese Proteinmoleküle zeichnen sich dadurch aus, dass sie Cholesterin binden können. Das StAR- und das MLN64-Protein sind an der Biosynthese von Steroiden beteiligt. Die Biosynthese von Steroiden findet in den Mitochondrien steroidogener Zellen statt. Dazu muss Cholesterin in die Mitochondrien transportiert werden. Das StAR-Protein ist dafür essentiell notwendig. Es ist noch nicht geklärt, ob das StAR-Protein als Cholesterintransporter zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran fungiert oder ob es durch Bindung an die äußere Mitochondrienmembran die Ausbildung von Kontaktstellen der äußeren mit der inneren Membran auslöst und damit einen Fluss von Cholesterin zur inneren Mitochondrienmembran ermöglicht.

In dieser Arbeit sollte die Cholesterinbindungsstelle des StAR-Proteins identifiziert werden. Auch sollte geklärt werden, ob für die Funktionsfähigkeit von StAR ein teilweise entfalteter Zustand des Proteins nötig ist, wie es von einer Hypothese gefordert wird. Als Werkzeug für diese Untersuchungen stand ein in unserer Arbeitsgruppe entwickeltes fotoreaktives Cholesterinderivat zur Verfügung (Burger, 2000). Damit sollte auch das MLN64-Protein untersucht werden. Das MLN64-Protein ist am Cholesterintransport von späten Endosomen zu den Mitochondrien und damit ebenfalls an der Steroidsynthese beteiligt.

Durch weitere Experimente sollte die Cholesterinbindungsstelle des humanen Oxytocinrezeptors eingegrenzt bzw. identifiziert werden. Der Oxytocinrezeptor wird durch Cholesterin in seiner Ligandenaffinität moduliert. Bindet der Oxytocinrezeptor Cholesterin, dann geht er von einem niederaffinen in einen hochaffinen Zustand über. Nur der hochaffine Rezeptor dürfte bei den niedrigen Oxytocinkonzentrationen physiologisch aktivierbar sein. Ein Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung der potenziellen Cholesterinbindungstelle(n) im Oxytocinrezeptor.

Das Protein SCAP ist ebenso wie der Oxytocinrezeptor ein Transmembranprotein. Die Interaktion von SCAP mit dem Protein Insig spielt eine wichtige Rolle bei der Cholesterinbiosynthese. Die Interaktion kommt nur dann zustande, wenn SCAP Cholesterin gebunden hat. Die Cholesterinbindungsstelle des SCAP-Proteins sollte mit dieser Arbeit eingegrenzt werden. Außerdem sollte die Regulation des SCAP-Proteins durch das Steroid 25-Hydroxycholesterin untersucht werden. Dieses Steroid kann ebenfalls die Interaktion von SCAP mit Insig induzieren. Es ist noch nicht bekannt, auf welche Weise dieser Regulationsmechanismus funktioniert. Der Effekt des 25-Hydroxycholesterins sollte mit der Blue-Native-Gel-Technik studiert werden. Es sollte eine Antwort auf die Frage gefunden werden, ob das SCAP-Protein direkt durch das 25-Hydroxycholesterin beeinflusst wird oder ob noch ein weiteres, unbekanntes Protein bei diesem Regulationsmechanismus eine Rolle spielt. Die Experimente mit dem SCAP sollten während eines Auslandsaufenthaltes an der University of Texas in Dallas in der Arbeitsgruppe von Michael S. Brown und Joseph L. Goldstein durchgeführt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Geräte

Laborchemikalien und Lösungsmittel wurden in größtmöglicher Reinheit von den Firmen Sigma, (Deisenhofen), AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm), Applied Biosystems (Weiterstadt), Hoechst (Frankfurt) und Biomol (Hamburg) beschafft. Das Wasser für sämtliche Anwendungen wurde über eine Millipore-Anlage ultrafiltriert (Millipore, Eschborn).

3.1.1 Chemikalien für molekularbiologische Arbeiten:

Enzyme:

T4-DNA-Ligase (10 U/ μ l) und Ligasepuffer: USB (USA)

RNase A: Amersham Life Sci., Braunschweig

Hind III (10 U/ μ l) und Not I (10 U/ μ l): New England BioLabs

Agarose: Sigma, Deisenhofen

DNA-Standards „Gene Ruler 1kb DNA-Ladder“ und „Gene Ruler 100 bp DNA- Ladder Plus“: MBI Fermentas

3.1.2 Reagenzien und Geräte für Western-Blots

Schüttler "Orbital Shaker": Bellco Biotechnology, Vineland, New Jersey, USA und

"Rocker II, Model 260350": Boekel Scientific

Nitrocellulosemembran "Hybond-C Extra": Amersham Biosciences, UK

Film "X-OMAT Blue XB-1": Kodak und "F-BX810": Phenix Research Products und

"Hyperfilm": Amersham Life Sci., Braunschweig

ECL System "SuperSignal West Pico Stable Peroxide Solution": Pierce und "ECL Western blotting detection system": Amersham Life Sci., Braunschweig

Whatman-Papier (3 mm): Bender & Hobein, Bruchsal

3.1.3 Chemikalien und Geräte für Radioliganden-Bindungstests:

Oxytocin: Bachem, Heidelberg.

[Tyrosyl-2,6-³H]Oxytocin (NET-858): Du Pont, Bad Homburg.

Szintillator „Rotiszint eco plus“: Roth, Karlsruhe

Szintillator für Röhrengelge "Lipoluma" und „Lumasolve“: Lumac-LSC/Perkin-Elmer, Groningen, NL

Szintillationsmessgerät „TRI-CARB 2100 TR“: Packard, Dreieich

Brandel Cell Harvester: Brandel, Gaithersburg (USA)

GF/F Glasfaserfilter: Bender & Hobein, Bruchsal

Szintillationsröhrchen: Canberra Packard, Dreieich

3.1.4 Geräte, Chemikalien und Medien für die Kultur eukaryotischer Zellen:

Sterilwerkbank: Nunc, Wiesbaden

CO₂-Brutschrank „MCO-17A1“: Sanyo Electric Co., Ltd., Japan

Zellkulturschalen (Durchmesser 10 cm): Sarstedt, Nümbrecht

24-Well-ELISA-Platten: Greiner Labortechnik, Frickenhausen

Kryoröhrchen: Nunc, Wiesbaden

Inverses Mikroskop „Olympus CK 2“: Olympus, Hamburg

Zellkulturmedium „DMEM-high glucose“ für HEK-Zellen: PAA, Linz

Fetales Kälberserum (FCS): PAA, Linz

Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml): PAA, Linz

Nu-Serum: JRH Biosciences

G 418: Gibco BRL, Paisley, Schottland

L-Glutamin (200mM): PAA, Linz

Dimethylsulfoxid (DMSO): Merck, Darmstadt

Trypsin/EDTA: PAA, Linz

3.1.5 Geräte und Chemikalien für die Bakterienkultur:

Sterilwerkbank: Biochrom KG, Berlin

37° C-Schüttler: Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Bakterien-Kulturschalen (Durchmesser 10 cm): Sarstedt, Nümbrecht

Ampicillin: Sigma, Deisenhofen

Bacto-Trypton: AppliChem, Darmstadt

Hefeextrakt: AppliChem, Darmstadt

Natriumchlorid: Roth, Karlsruhe

3.1.6 Zentrifugen:

Kühlzentrifuge „J2-21“: für DNA-Großpräp: Beckman, München

Mikroliterkühlzentrifuge „5417R“: Eppendorf, Hamburg

Mikroliterzentrifuge „5415 C“: Eppendorf, Hamburg

Tischzentrifuge für 15 ml-Röhchen: DuPont, Bad Homburg

Vakuumbzentrifuge „Speed-Vac“: Savant Instruments, NY, USA

Ultrazentrifuge „L7-65“ mit den „Rotoren Ti60 und SW41“: Beckman, München

3.1.7 Chromatographie:

HPTLC-Fertigplatten „Kieselgel 60 F₂₅₄“: Merck, Darmstadt

Für analytische Dünnschichtchromatographien wurden 5x10 cm-Platten mit einer Schichtdicke von 0,25 mm verwendet, für präparative Auftrennungen wurden 10 x 20 cm-Platten mit einer Schichtdicke von ebenfalls 0,25 mm verwendet.

3.1.8 Sonstige Materialien und Geräte:

UV-Spektrometer zur Reinheitsbestimmung von DNA „Hitachi U-2000“: Colora Messtechnik GmbH, Lorch

UV-Spektrometer zur Aufzeichnung der Fluoreszenzspektren: Photon Technology International, NJ, USA

UV-Tisch zur Betrachtung von DNA-Agarosegelen „Transilluminator 4000“: Stratagene, Heidelberg

SELDI-TOF-Massenspektrometer: Ciphergen, Göttingen

Ni-NTA-Matrix: Qiagen, Hilden

WGA-Agarose: Pharmacia, Freiburg

3.1.9 Häufig verwendete Puffer:

Puffer A: 50 mM HEPES-KOH, pH 7,4, 250 mM Sucrose, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 5 mM Na-EDTA. Dem Puffer wurden folgende Proteaseinhibitoren zugesetzt: 25 µg/mL N-acetyl-leucinal-norleucinal, 1 µg/mL, 1 µg/µL Pepstatin, 2 µg/mL Aprotinin, 10 µg/mL Leupeptin, 200 µM phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF).

Bindungspuffer für Radioliganden-Bindungstests mit dem OT-Rezeptor: 20 mM HEPES / NaOH, pH 7,4; 5 mM MgCl₂

Hypotonischer Lysispuffer zur Lyse von Zellen: 10 mM HEPES / NaOH, pH 7,4 mit 10 mM EDTA

OTR-Lysispuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 % (w/v) Deoxycholat, 0,1 % SDS, 1 % (w/v) Nonidet P40.

PBS (Phosphate buffered Saline) für die Zellkultur: 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na₂HPO₄, 0,24 g/l KH₂PO₄, pH 7,4, autoklaviert

SDS Lysis Buffer: 10 mM Tris, pH 7.6, 100 mM NaCl, 1 % SDS

TAE-Puffer für Agarosegelelektrophorese: 40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,4

TBS-(Tris buffered Saline): Für die in Mainz durchgeführten Western-Blots. 1 L enthält: 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 3,0 g Tris (pH 7,4).

TBS-Tween20: 1 L enthält: 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 3,0 g Tris (pH 7,4), 1 g Tween20.

Towbin-Transferpuffer für Western-Blots (Semidry-Verfahren): 25 mM Tris, 193 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,05 % (w/v) SDS. Der gewünschte pH-Wert stellt sich von selbst ein.

Transfer-Puffer für Western-Blots (Transfer im Tank): 2,2 g/L Tris-HCl, pH 7,4, 11,2 g/L Glycin, 10 % Methanol

PBS-Tween 20 (für die in den USA durchgeführten Western-Blots, Sigma, dry powder, Cat P-3563, final: NaCl 0.138 M, KCl 0.0027 M, Tween 20 – 0.05 %, pH 7.4 bei RT)

10 x TGS (Bio-Rad): für SDS-Gelelektrophorese in den USA. final: 25 mM Tris, pH 8.3, 126 mM Glycine, 0.1 % SDS

Tsujishita-Puffer für die Isolierung von MLN64-Protein: 150 mM NaCl, 50 mM KCl, 50 mM Tris (pH 7,4), 10 mM DTT (Dithiothreitol).

3.1.10 Plasmide

pfmOTR-His wurde von Dr. Gerald Gimpl aus dem pcDNA3-Plasmid (5446 bp) der Firma Invitrogen kloniert (Gimpl, 2000). Das pfmOTR-His-Plasmid enthält am 5'-Ende die Signalsequenz für Hämagglutinin, ein flag- und ein myc-Epitop. Darauf folgt die Sequenz für den humanen OTR und eine Sequenz, die für zehn Histidinreste kodiert. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass dieser Epitop-markierte OTR die gleiche Affinität zum Liganden hat wie der unmarkierte.

pfmOTR-GFP wurde ebenfalls von Dr. Gimpl kloniert (Gimpl and Fahrenholz, 2000).

pcDNA-FRT-OTR-GFP wurde im Rahmen dieser Arbeit aus dem pfmOTR-GFP hergestellt. Dazu wurden Sowohl pfmOTR-GFP als auch der pcDNA-FRT-Vector (Invitrogen) mit Hind III und Not I geschnitten. Das OTR-GFP-Fragment wurde dann mit dem pcDNA-FRT-Plasmid ligiert.

pCMV-SCAP, pCMV-SCAP(D443N), pCMV-SCAP(Y298C), pCMV-SCAP(L315F) codieren für den Wildtyp und für Punktmutanten von SCAP und enthalten den Cytomegalovirus-Promoter (Yabe et al, 2002; Sakai et al, 1997).

pCMV-Insig1-Myc, pCMV-Insig2-Myc codieren für Insig1 und Insig2, und enthalten die DNA-Sequenz für ein sechsfaches Myc-Epitop am C-terminalen Ende der Proteine (Yang et al., 2002; Yabe et al, 2002).

pTK-Insig1-Myc und pTK-Insig2-Myc codieren für Insig1 und Insig2 mit einem C-terminalen sechsfachem Myc-Epitop unter Kontrolle des TK-Promoters (Feramisco et al., 2005).

pTK-HSV-SREBP2 codiert für das humane SREBP unter Kontrolle eines TK-Promoters, und enthält N-terminal die DNA-Sequenz für ein HSV(herpes simplex virus)-Epitop (Nohturfft et al. 1998).

pTK-HSV-SCAP codiert für den SCAP-Wildtyp, und enthält die DNA-Sequenz für zwei Kopien des HSV-Epitops am N-Terminus des Proteins (Yang et al., 2002).

pCMV-CBP-FLAG-SCAP(TM1-6)-Myc codiert in (5'-3'-Richtung) für ein Calmodulin-Bindeprotein-Tag, für ein FLAG-Epitop, die ersten 6 Transmembrandomänen vom Hamster-SCAP (Aminosäuren 1-448) und 3 Tandemkopien des Myc-Epitops (Yang et al., 2002).

pcDNA3 (Invitrogen) wurde für Mock-Transfektionen verwendet.

3.1.11 Zelllinien

HEK 293 (Human Embryonic Kidney cells, menschliche embryonale Nierenzellen, Klon CRL 1573, ATCC, Rockville, USA)

HEK-OTR-GFP: HEK-293-Zellen, die stabil den humanen Oxytocinrezeptor mit einem C-terminalen GFP-Tag exprimieren. Wurde von Herrn Dr. Gimpl erzeugt (Gimpl and Fahrenholz, 2000).

HEK-OTR-His: HEK-293 stabil transfiziert mit dem humanen Oxytocinrezeptor-Konstrukt (N-terminales FLAG-Epitop, gefolgt von einem c-myc-Epitop und einem C-terminalen Dekahistidin-Tag).

HEK-SCAP-TM1-6: Eine stabil transfizierte Zelllinie, die SCAP-TM1-6 exprimiert (Yang et al., 2002)

CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary, ATCC No. CRL-9618)

SRD13A: Eine aus CHO-7-Zellen mittels Gammastrahlung erzeugte Zelllinie (Rawson et al., 1999). Den Zellen fehlt das SCAP. Sie sind daher auxotroph für Cholesterin.

Für Fotoaffinitätsmarkierungen wurden auch Zellmembranen verwendet, die aus Insektenzellen stammten, die SCAP-TM1-8 exprimierten (Radhakrishnan et al., 2004).

3.1.12 Bakterien

Escherichia coli-Zellen, Typ DH5 α (Clontech, Heidelberg)

Für die Experimente in den USA wurden kompetente *Escherichia coli*-Zellen, Typ DH5 α der Firma Invitrogen verwendet.

BL21-*E.coli*-MLN64 (Watari et al, 1997), BL21-*E.coli*-StAR und BL21-*E.coli*-StAR-A218V (Arakane et al. 1998) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Jerome Strauss III, University of Pennsylvania (USA) zur Verfügung gestellt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von *E.coli* DH5 α

Für die Kultivierung der Bakterien wurden die folgenden Medien verwendet:

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt und 10 g/l Natriumchlorid (pH 7,0). Das Medium wird 25 min bei 125° C autoklaviert.

LB-Amp-Medium: Wie LB-Medium. Das nach dem Autoklavieren abgekühlte Medium wurde mit 100 μ g/ml Ampicillin versetzt.

LB-Amp-Platten: 100 g Medium enthalten: 1,5 g Agar- Agar, ad 100 ml mit LB-Medium, versetzt mit 10 mg Ampicillin.

Die Kultur erfolgte entweder in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten. *E. coli*-Zellen weisen in LB-Medium bis zu einer Inkubationszeit von etwa 18 h ein exponentielles Wachstum auf. *E. coli*, die ein Antibiotikum-Resistenzgen gegen z. B. Ampicillin besitzen, können durch LB-

Amp-Medium selektioniert werden. Um Dauerkulturen herzustellen, wurden die *E. coli* in LB-Medium circa 6 h wachsen gelassen. Zu 1000 µl Zellsuspension wurden 500 µl 30 %ige autoklavierte Glycerinlösung (w/v) gegeben. Die Suspension wurde bei – 20 ° C eingefroren und nach einem Tag bei – 80° C gelagert.

3.2.2 Herstellung von kompetenten DH5a -*E.coli*-Zellen

Ein 1 Liter-Erlenmeyerkolben mit 400 ml LB-Medium wurde mit 1 ml Übernacht-Kultur versetzt (Übernacht-Kultur: 5 ml LB-Medium mit *E. coli* angeimpft und 8 bis 18 h bei 37° C geschüttelt). Die Bakterien ließ man auf dem Schüttler bei 37° C circa 4 h wachsen, bis die Suspension eine optische Dichte von 0,4 bis 0,6 Extinktionseinheiten erreicht hatte, gemessen bei 600 nm. Das Wachstum wurde dann gestoppt, indem die Suspension auf Eis gestellt wurde. Die Suspension wurde dann in zwei sterilen 250 ml-Zentrifugenbechern abzentrifugiert (Beckman-Zentrifuge, 6000 rpm, 4° C, 10 min, Rotor JA 16). Die Pellets wurden in insgesamt 100 ml steriler kalter Calciumchloridlösung (50 mM; durch einen 0,2 µm- Filter sterilfiltriert) vorsichtig resuspendiert, vereinigt und anschließend 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde erneut abzentrifugiert (6000 rpm, 4° C, 10 min, Rotor JA 16). Das Pellet wurde in 20 ml steriler Calciumchloridlösung (50 mM, mit 10 % (w/v) Glycerin) vorsichtig resuspendiert und für einige Stunden (4 h bis 10 h) auf Eis stehen gelassen. Danach wurde die Zellsuspension zu 200 µl-Aliquots portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80° C gelagert.

3.2.3 Transformation von *E.coli* DH5a

Bei der Transformation wurden die neu ligierten Plasmide in *E. coli*- Zellen eingebracht. Die Zellmembranen der *E. coli*-Zellen wurden per Hitzeschock für Plasmide durchlässig gemacht. Da nur die Bakterien, die Plasmide aufgenommen hatten, ein Ampicillin-Resistenzgen trugen, konnten nur diese auf LB-Amp-Platten Kolonien bilden und somit herausselektioniert werden. Eine *E. coli*-Zelle sollte idealerweise nur ein Plasmid aufnehmen, da sonst die Möglichkeit bestünde, dass ein Plasmid, das ein Resistenzgen trägt und ein anderes, das die falsche DNA-Sequenz hat, in derselben Zelle enthalten sind. Die Bakterienzellen sollten daher im Überschuss zu den Plasmidmolekülen vorhanden sein. Bei der praktischen Durchführung ging man nach folgendem Schema vor:

Die LB-Amp-Platten wurden aus dem Kühlraum geholt und auf 37 ° C vorgewärmt (2 bis 3 h leicht geöffnet im Trockenschrank). Von den kompetenten Zellen ließ man 200 µL auf Eis auftauen. Von dem Ligationsansatz wurden 10 µL für die Transformation eingesetzt. Von den kompetenten Zellen wurden 100 µL in ein 15 ml-Röhrchen gegeben und auf Eis inkubiert.

Der Ligationsansatz wurde mit den Zellen gemischt und 30 bis 60 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde der Hitzeschock durchgeführt, indem die Zellen für 90 s bei 42° C im Wasserbad inkubiert wurden. Sofort danach wurde der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert. Die DNA sollte bei diesem Schritt aufgenommen werden. Zu dem Ansatz wurden dann 700 µL Soc-Medium gegeben. Der Ansatz wurde dann 1 h bei 37° C geschüttelt und anschließend ausplattiert (100 bis maximal 600 µL je Platte, am besten zwei Platten mit verschiedenen Mengen). Die Platten wurden bei 37° C inkubiert und nach maximal 18 h im Kühlschrank über Kopf gelagert (es wurde so vermieden, dass Kondenswasser auf die Bakterienkolonien tropfte). Parallel zu dem Transformationsansatz wurde eine Negativkontrolle durchgeführt. Dazu wurden kompetente *E. coli* genauso wie der Ligationsansatz behandelt und ausplattiert, mit dem Unterschied, dass keine Plasmide zugesetzt wurden. Bei der Negativkontrolle sollten dann keine Bakterienklone auf der LB-Amp-Platte zu sehen sein.

Das für die Transformation von *E.coli*-Zellen verwendete Soc-Medium hatte folgende Zusammensetzung: 20 g/L Bacto-Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 0,6 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, auf 1 Liter auffüllen, autoklavieren (125° C, 20 min), abkühlen lassen, dann steril zugeben: 10 mL/L 1M MgSO₄, 10 ml/l 1M MgCl₂ und Glucose: final 20 mM.

3.2.4 Plasmid isolation aus Bakterienzellen

Um die klonierte DNA zu präparieren, wurden die Zellmembranen der *E. coli*-Zellen durch eine alkalische Lyse aufgebrochen und die Plasmid-DNA durch Zentrifugation von den übrigen Zellbestandteilen getrennt, danach aufgereinigt und dann mit Ethanol gefällt. Je nach präparierter DNA- Menge wurden entweder „Mini - Präps“ oder „Maxi - Präps“ durchgeführt:

Plasmidschnellpräparation zur Analyse von transformierten *E. coli* („Minipräp“)

Variante 1: Aufreinigung der DNA über eine Säule (wenn eine möglichst hohe Reinheit der DNA erwünscht war):

Verwendet wurde dazu das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen). Dabei kamen die folgenden Puffer zum Einsatz:

Puffer P1: 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0 mit RNase A: 100 µg/ml, autoklaviert

Puffer P2: 0,2 M NaOH, 1 % SDS

Puffer P3: 3 M Kaliumacetat, pH 5,5, autoklaviert

Puffer EB: 10 mM Tris / HCl, pH 8,5

Drei Milliliter LB-AMP-Medium wurden in ein 15 mL-Röhrchen vorgelegt. Ein Bakterienklon wurde mit einem autoklavierten Zahnstocher gepickt, und der Zahnstocher wurde in das Röhrchen geworfen. Die Bakterien wurden über Nacht auf einem Schüttler bei 37° C inkubiert. 1,5 mL der Kultur wurden in ein Eppendorfgesäß gegeben und abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 1 min, 20800 g, RT), der Rest der Kultur wurde bei 4° C aufbewahrt. Der Überstand wurde vollständig entfernt, und das Pellet wurde in 250 µL Puffer P1 resuspendiert. Um die RNA zu verdauen, wurde die Suspension mindestens 3 min stehen gelassen. Dann wurden 250 µL Puffer P2 zugegeben, und das Gefäß wurde sofort ohne zu schütteln mehrmals invertiert. Die P2-Lösung diente zur alkalischen Lyse der Zellmembranen. Die Lösung wurde dann für maximal 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 350 µL Puffer P3 zugegeben, die Lösungen wurden vorsichtig gemischt, und die Mischung wurde abzentrifugiert (15 min, 20800 g, 4° C). Die P3- Lösung neutralisiert den basischen pH-Wert wieder. Der Überstand wurde auf die Säule gegeben und per Zentrifugation (20800 g, 1 min) durch die Säule geleitet. Die DNA bindet dabei an die Säule. Der Säulendurchlauf wurde verworfen. Die Säule wurde zweimal mit je 350 µL Puffer PE gewaschen, in ein trockenes Auffanggefäß gesteckt und dann noch einmal 3 min zentrifugiert, um Reste des Waschpuffers zu entfernen. Um die DNA zu eluieren, wurde die Säule zweimal mit je 25 µL Puffer oder Wasser behandelt, d.h. die Flüssigkeit wurde auf die Säule gegeben, und es wurde 1 min zentrifugiert.

Variante 2: Aufreinigung der DNA per Zentrifugation und Isopropanolfällung (wenn keine hohe Reinheit der isolierten DNA erforderlich war):

Zwei Milliliter der Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (1 min, 14000 rpm). Der Überstand wurde mit der Pipette vollständig entfernt, und das Bakterienpellet wurde in 350 µL STET-Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurden 25 µL Lysozymlösung (20 mg/ml in Wasser) zugegeben; die Suspension wurde 5 min bei RT und anschließend noch für 50 Sekunden im Wasserbad bei 100° C inkubiert. Danach wurden die Zelltrümmer von der Plasmid-DNA durch Zentrifugation getrennt (15 min, RT, 14000 rpm). Das Pellet wurde mit einem sterilen Zahnstocher aus dem Eppendorfgesäß entfernt. Zu der im Eppendorfgesäß verbliebenen Lösung wurden 38 µL Kaliumacetatlösung (pH 4,8) gegeben und mit der Lösung vermischt. Um die Plasmid-DNA zu fällen, wurden dann 400 µL Isopropanol zugegeben, mit der Lösung gemischt, und es wurde zentrifugiert (15 min, RT, 14000 rpm). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen, und das Pellet wurde mit 400 µL 70% Ethanol gewaschen, d.h. der Alkohol wurde zugegeben, und es wurde erneut

zentrifugiert (5 min, RT, 14000 rpm). Das Pellet wurde in der Sterilbank trocken gelassen und anschließend in 40 μL Wasser aufgelöst. Die in der Lösung noch vorhandene RNA wurde zerstört, indem 1 μL RNase A-Lösung (0,1 mg/mL) zugegeben wurde. Die Plasmid DNA wurde für 30 min bei 37° C mit der RNase A inkubiert.

Plasmidgroßpräparation („Maxipräp“)

Reine Plasmid-DNA in großen Mengen für Transfektionen und Klonierungen wurde aus 250 mL oder 400 mL Bakteriensuspension nach der folgenden Methode isoliert: 400 mL LB-Amp-Kulturmedium wurden mit dem Bakterienklon angeimpft und über Nacht (8 bis 15 h) bei 37° C in einem 1-Liter-Erlenmeyerkolben geschüttelt. Danach wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert. Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus dem Bakterienpellet wurde folgender Kit verwendet: „QIA filter Plasmid Maxi Kit“, Cat. No 12262, Qiagen).

3.2.5 Ethanolfällung

Die wässrige DNA-Lösung wurde mit 50 μL 3 M Kaliumacetat (pH 5,5) vermischt. Anschließend wurden 1500 μL 100 % Ethanol zugegeben und mit der Lösung vermischt. Die ethanolische Lösung wurde für mindestens eine Stunde bei -20°C inkubiert. Die DNA fiel dabei aus der Lösung aus. Die DNA wurde 20 min mit 14000 rpm bei RT abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 mL 75 %igem Ethanol gewaschen. Nachdem erneut zentrifugiert worden war (14000 rpm, RT, 5 min), wurde der Waschalkohol abgegossen, das DNA-Pellet getrocknet und in 0,5 – 1 mL Wasser gelöst.

3.2.6 Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA

Die Konzentration und die Reinheit der DNA wurden photometrisch bestimmt. Dazu wurden 10 μL DNA-Lösung entnommen und zu 490 μL Wasser gegeben (Verdünnung 1 : 50). Diese verdünnte Lösung wurde in Quarzküvetten bei 260 und bei 280 nm vermessen. Die Proteinverunreinigungen absorbieren bei 280 nm, die DNA bei 260 nm. Bei reinen Nukleinsäurelösungen liegt der Quotient A_{260}/A_{280} zwischen 1,8 und 2,0. Für doppelsträngige DNA entspricht eine Absorption von 1,0 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Alternativ dazu konnte die DNA-Konzentration auch per Agarosegel abgeschätzt werden. Dazu wurde eine bestimmte Menge der Plasmid-DNA auf ein Gel aufgetragen. Als Referenz wurde eine DNA-Lösung bekannter Konzentration aufgetragen. Indem die Intensität der Banden verglichen wurde, konnte die ungefähre DNA-Konzentration bestimmt werden.

3.2.7 Restriktion von Plasmid-DNA

Ein Restriktionsenzym mit einer Aktivität von 1 u verdaut idealerweise pro Stunde 1 μmol DNA (Plasmid-DNA mit einer für das Enzym spezifischen Schnittstelle pro Plasmid). Bei einem Restriktionsansatz sollte das eingesetzte Enzymvolumen nicht mehr als 10 % des Gesamtvolumens ausmachen. Die eingesetzte DNA-Menge muss also auf die Enzymmenge abgestimmt sein. Der für die Restriktionsenzyme benötigte Puffer liegt 10fach konzentriert vor, es wird daher ein Zehntel des Gesamtvolumens eingesetzt und dann mit Wasser aufgefüllt. Um einen möglichst vollständigen Verdau zu erreichen, lässt man die Reaktion für mindestens eine Stunde bei der für das Enzym optimalen Temperatur (meist 37°C) laufen. Ein typischer Restriktionsansatz wird mit einem Volumen von 20 μL durchgeführt.

3.2.8 Ligation von Plasmid-DNA

Mit Hilfe des Enzyms DNA-Ligase lassen sich DNA-Fragmente unter Bildung einer Phosphodiesterbindung kovalent verknüpfen und somit in geschnittene Vektoren einfügen. Für die Ligation wurde ein bestimmtes Volumen Vektor mit einem bestimmten Volumen Insert gemischt. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert sollte etwa 1:3 sein, damit möglichst viele Vektoren ein Insert einbauen. Ligationen wurden in einem Reaktionsvolumen von 10 bis 20 μL durchgeführt. Für einen Ligationsansatz wurde 1 μL Ligase verwendet, entsprechend einer Enzymaktivität von 10 U. Der Ligasepuffer lag zehnfach konzentriert vor. Der Ansatz wurde auf Eis zusammenpipettiert. Anschließend wurde der Ansatz 2 bis 12 Stunden im Wasserbad bei 15°C inkubiert. Zur Kontrolle wurde noch ein zweiter Ansatz angesetzt, bei dem das Insert weggelassen wurde.

3.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Per Elektrophorese kann man DNA-Fragmente nach ihrer Größe auftrennen. Hier wurden für die Elektrophorese Agarosegele verwendet. Die Polysaccharidmoleküle bilden im Gel ein Netzwerk, das kleine DNA-Fragmente leichter passieren können als große. Die Porengröße des Netzwerkes hängt von der Agarosekonzentration im Gel ab. Die hier verwendeten Konzentrationen von 1,0 % und 1,5 % sind geeignet, um DNA-Fragmente einer Größe von etwa 0,4 kb bis 7 kb bzw. 0,2 kb bis 4 kb aufzutrennen. Da DNA-Moleküle unter physiologischen Bedingungen negativ geladen vorliegen, wandern sie im elektrischen Feld zum Pluspol. Legt man also an ein Gel eine Spannung an, dann wandern kleine DNA-Fragmente schneller durch die Poren des Gels zum Pluspol als große, die Wanderungsgeschwindigkeit ist umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der

Molekülgröße. Das dem Gel zugesetzte Ethidiumbromid kann sich aufgrund seiner planaren Struktur in die DNA einlagern und mit ihr so wechselwirken, dass der Komplex Ethidiumbromid-DNA bei Bestrahlung mit UV-Licht im sichtbaren Bereich fluoresziert. Die verschiedenen DNA-Fragmente werden so im Gel als Muster von Banden sichtbar. Vergleicht man das so erhaltene Bandenmuster im Gel mit den Banden, die ein Marker mit Fragmenten bekannter Größe liefert, so kann man die Größe der Fragmente aus der DNA-Probe bestimmen.

Praktisch wurde nach folgendem Schema vorgegangen: 1 g Agarose wurde eingewogen und mit 100 mL TAE-Puffer aufgefüllt. Die Agarose wurde im Mikrowellenofen aufgeköcht, um sie zu lösen. In die wieder abgekühlte Agaroselösung wurden 10 µL Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) gegeben. Die Lösung wurde in die Gelkammer gegossen, aushärten gelassen und mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit Auftragspuffer versetzt. Der Auftragspuffer enthält Bromphenolblau oder einen anderen Farbstoff, der auf der Höhe kleiner DNA-Fragmente von ca. 100 bp ebenfalls zum Pluspol wandert und so den Weg der DNA im Gel sichtbar werden lässt. Er enthält außerdem Glycerin, um die Dichte der aufgetragenen DNA-Probe zu erhöhen, so dass sie in der Geltasche verbleibt.

3.2.10 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Um aus einem Gemisch von DNA-Fragmenten selektiv ein bestimmtes DNA-Fragment zu isolieren, trennt man das Gemisch per Gelelektrophorese auf, schneidet die Bande, die die gewünschte DNA enthält, heraus und extrahiert die DNA aus dem Agarosegel. Die DNA-Extraktion wurde mit dem „Quiaquick Gel Extraction Kit“ der Firma Quiagen durchgeführt. Das DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel herausgeschnitten, das Gelstück wurde in ein 1,5 mL-Eppendorfgefäß gegeben und abgewogen. Je 100 mg Gel wurden 300 µL Puffer „QG“ zugegeben. Das Gelstück wurde in dem Puffer aufgelöst, indem es für 10 min bei 50° C inkubiert und während dieser Zeit mehrmals gevortext wurde. Zu der Lösung wurden je 100 mg Gel 100 µL Isopropanol zugegeben. Die Lösung wurde auf eine „QIAquick“-Säule gegeben und per Zentrifugation (Tischzentrifuge, 1 min, 20800 g) durch die Säule geleitet. Die DNA wurde dabei an die Säule gebunden. Die DNA bindet nur dann gut an die Säule, wenn der pH-Wert der Lösung nicht höher als 7,5 ist. Um den pH-Wert zu kontrollieren, enthält der Puffer QG einen Indikator - die Lösung sollte gelb sein. Anschließend wurde die Säule mit 0,75 mL Puffer „PE“ gewaschen, indem der Puffer auf die Säule gegeben, und nach einer Inkubationszeit von 3 min zentrifugiert (1 min, 20800 g) wurde. Um aus dem „PE“-

Puffer stammende Ethanolreste von der Säule zu entfernen, wurde die Säule in ein trockenes Auffanggefäß gesteckt und es wurde noch einmal eine Minute lang zentrifugiert (20800 g). Die Säule wurde dann in ein 1,5 mL-Eppendorfgefäß gesteckt und die DNA wurde eluiert, indem 25 µL Wasser/Puffer „EB“-Gemisch (1:1) auf die Säule gegeben wurden und zentrifugiert wurde (1 min, 20800 g). Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt.

3.3 Proteinexpression in Bakterienzellen

Die Kultur der BL 21-*E.coli*-Zellen erfolgte in LB-Medium. Bei der Expression des StAR-Proteins und der StAR-A218V-Mutante wurde dem Medium das Antibiotikum Kanamycin zugesetzt (25 µg/mL Medium). Bei der Expression des MLN64-Proteins wurde Kanamycin (25 µg/mL Medium) zugegeben. Die Bakterien wurden als Glycerin-Dauerkulturen bei -80° C gelagert. Für die Kultur der Bakterien wurde etwas Material mit einer sterilen Impföse aus der -80° C-Probe herausgekratzt und über Nacht in 5 mL Medium mit Antibiotikum in einem 15 mL-Röhrchen bei 37° C geschüttelt. Nach 8-12 h wurde 1 mL der Bakterien in einen Schikanekolben mit 400 mL Medium (mit Antibiotikum) überführt. Der Kolben wurde für etwa 3,5 h bei 37° C geschüttelt bis die Bakterienkultur eine optische Dichte von 0,5-1,0 bei 600 nm aufwies. Die Expression des Proteins wurde durch die Zugaben von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid induziert. Nach 4,5 h Inkubation wurden die Bakterien dann pelletiert. Das Bakterienpellet wurde mit 10 mL des folgenden Puffers resuspendiert: 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM β-Mercaptoethanol. Die Bakterienzellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen (3 x 15 Pulse von 1 s Dauer, dazwischen 2 x 30 s Pause - die Bakterien wurden dabei auf Eis inkubiert). Die Probe wurde bei 4° C für 30 min mit 20000 g zentrifugiert (Beckman Zentrifuge, JA 20 Rotor, 15000 rpm). Der Überstand wurde in ein 15 mL-Röhrchen überführt und mit 500 µL Ni-NTA-Agarosematrix (Qiagen) versetzt. Die Probe wurde für 4 -12 h bei 4° C invertiert. Die exprimierten Proteine enthielten C-terminal ein sechsfaches Histidin-Tag. Dieses His-Tag kann an die Ni-NTA-Matrix binden (Abb. 29).

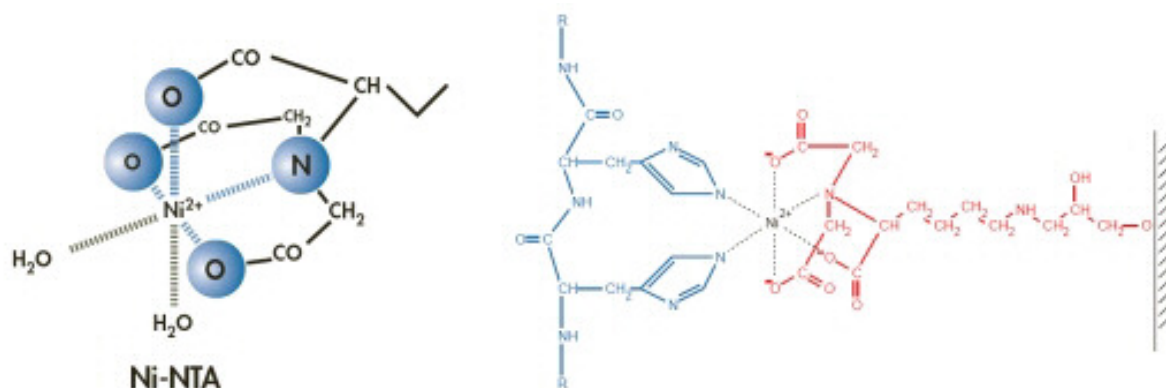


Abbildung 29: Die Nickel-NTA-Matrix bindet Proteine mit His-Tags. Die Trinitriloessigsäure ist kovalent an Agarosematrix gekoppelt und komplexiert Ni²⁺-Ionen. Diese Komplexe können Histidinreste von Proteinen binden. Mit Hilfe von Imidazol, das den Histidinresten in seiner Struktur ähnlich ist, können die Proteine von der Matrix eluiert werden (aus dem Ni-NTA-Handbuch der Firma Qiagen).

Der Ansatz wurde (im Kühlraum bei 4° C) in eine etwa 20 cm lange Säule mit 8 mm Innendurchmesser gegeben, und die Matrix wurde mit 10 mL des folgenden Puffers gewaschen: 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0), 20 mM Imidazol. Danach wurde das an die Matrix gebundene Protein mit 2 mL Imidazol-Puffer (250 mM) eluiert. Imidazol ist in seiner Struktur den Histidinresten ähnlich, und kann somit das Protein von der Ni-NTA-Matrix verdrängen. Für das StAR-Protein und die A218V-Mutante wurde folgender Puffer zur Elution verwendet: 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0), 250 mM Imidazol. Für die Elution des MLN64 wurden dem Puffer außerdem noch 40 % (w/v) Glycerin zugesetzt (ohne diesen Zusatz bildete das MLN64 Aggregate). Um das Imidazol aus dem Eluat zu entfernen, wurde es dialysiert. Die Dialysemembran (Mw-cutoff 12 kDa, Sigma) wurde vor der Dialyse auf folgende Weise behandelt: die Membran wurde für 30 min bei RT in H₂O inkubiert, danach für 30 min bei 60° C in 2 % (w/v) NaHCO₃ und 1 mM EDTA. Danach wurde die Membran für weitere 30 min in H₂O inkubiert. Diese Prozedur wurde durchgeführt, um sicher zu gehen, dass die Membran keine zweiwertigen Kationen mehr enthält, die mit den Proteinen interagieren können. Für die Dialyse des StAR-Proteins und der StAR-Mutante wurde folgender Puffer verwendet: 50 mM KCl, 50 mM HEPES (pH 7,4), 1 mM DTT. Für die Elution des MLN64-Proteins wurde folgender Puffer verwendet: 150 mM NaCl, 50 mM KCl, 50 mM Tris (pH 7,4), 10 mM DTT (Dithiothreitol), 40 % (w/v) Glycerin. Die Probe wurde für 24 h gegen das tausendfache Volumen Puffer dialysiert. Typischerweise lieferte eine 400 mL-Bakterienkultur etwa 2-3 mg Protein.

3.4 Proteinbestimmung

Zur Ermittlung des Proteingehalts einer Probe wurde die von Bradford (1976) entwickelte Methode verwendet. Das Prinzip bei dieser Messung besteht darin, dass sich das Absorptionsmaximum von Coomassie brilliant blue von 465 nm auf 595 nm verschiebt, wenn der Farbstoff an Proteine bindet. Durch Messung der Absorption einer Probe bei 595 nm und Vergleich mit den Messwerten einer Konzentrationsreihe von BSA lässt sich die Proteinkonzentration der Probe relativ genau ermitteln. Für die Messungen wurde Bradford-Reagens der Firma Roth verwendet. Bei den in den USA durchgeführten Experimenten wurde nach der BCA-Methode gearbeitet (Smith et al. 1985). Diese Methode beruht darauf, dass Proteine mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung Komplexe bilden. Die Cu^{2+} -Ionen der Komplexe werden vermutlich zu Cu^+ -Ionen reduziert, die mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden. Die für die Messungen verwendete Bicinchoninsäure und die CuSO_4 -Lösung (4%, w/v) stammten von der Firma Sigma.

3.5 Proteinfällung

Proteine wurden gefällt, indem das vierfache oder fünffache Volumen der Probe an -20°C kaltem Aceton zugegeben wurde. Die Probe wurde kurz gevortext und für mindestens 1 h bei -20°C inkubiert. Danach wurde die Probe bei 4°C für 10 min mit 20800 g abzentrifugiert. Der Überstand über dem Proteinpellet wurde mit der Pipette abgesaugt, und das restliche Lösungsmittel wurde durch halbstündige Evaporation der Probe bei RT oder in der SpeedVac (Dauer ca. 3 min) entfernt.

Hatte die Probe ein relativ großes Volumen, dann wurden die Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Dabei wurden 1500 μL Probe mit 170 μL TCA (6,1 M) gemischt. Die Probe wurde gevortext und für 4 min bei 4°C mit 20800 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Pipette abgesaugt, und das Pellet wurde 2x mit 750 μL -20°C kaltem Aceton gewaschen (Aceton zugeben, für 4 min bei 4°C mit 20800 g abzentrifugieren, wieder Aceton zugeben, wieder zentrifugieren).

3.6 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden in einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die verwendeten Geräte wurden vor dem Einbringen in die sterile Werkbank mit Ethanol (80 %) desinfiziert. Die adhärent wachsenden Zellen wurden in speziell beschichteten Plastikschaalen

mit Zellkulturmedium bei 37° in einem Brutschrank kultiviert. Die für die Zellkultur verwendeten Lösungen wurden durch Autoklavieren (30 min, 125° C) oder durch Filtration (Porengröße 0,2 µm) sterilisiert; Glasmaterialien durch trockene Hitze (4 h, 180° C). Bei Konfluenz wurden die Zellen abgelöst und auf frische Kulturschalen ausgesät. Dazu wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen einmal mit PBS und danach ca. 5 min mit 2 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung behandelt (0,05 % (w/v) Trypsin, 0,54 mM EDTA, in PBS). Die Zellen ließen sich so leicht mit 8 ml PBS von der Schale ablösen. Die Zellsuspension wurde in ein 15ml-Röhrchen überführt und 5 min mit 1000 g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 10 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in geeigneter Verdünnung mit frischem Medium auf neue Schalen ausgesät.

Die HEK-Zellen wurden in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und bei einem Gehalt von 95 % wassergesättigter Luft inkubiert. Die Zellen wurden mit folgendem Medium inkubiert: „DMEM-high glucose“ (PAA, Linz). Folgende Komponenten wurden dem Medium zugesetzt: L-Glutamin (2 mM), 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Penicillin, 1 % (v/v) Streptomycin.

Die bei den Experimenten in den USA verwendeten CHO- und SRD13A-Zellen wurden bei einer Atmosphäre von 8-9 % CO₂ kultiviert. Diese Zellen wurden in einer 1:1 Mischung aus 50 % Ham's F-12 Medium (Sigma) und 50 % Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) kultiviert. Dem Medium wurden 5 % FCS zugesetzt. Bei den SRD13A-Zellen, die kein Cholesterin und ungesättigte Fettsäuren synthetisieren können, wurden dem Medium außerdem 5 µg/µL Cholesterin, 1 mM Na-Mevalonat, 20 µM Na-Oleat, 100 units/mL Penicillin und 100 units/mL Streptomycin-Sulfat zugesetzt. Die in Suspension wachsenden HEK-SCAP-TM1-8-Zellen wurden als 1 L-Kultur bei 37° C ohne Anreicherung von CO₂ in der Atmosphäre in einem Glaskolben mit Rührfisch inkubiert. Die Zellen wurden eine Woche nach der Aussaat geerntet. Kultiviert wurden diese Zellen in folgendem Medium: HyQ SFX-MAb complete serum-free medium with L-glutamine (Hyclone).

3.6.1 Transiente Transfektion von SRD13A-Zellen

Am Tag 0 wurden die Zellen in einer Dichte von $7,5 \times 10^5$ auf einer 10 cm-Schale ausgesät. Die Zellen wurden während der Transfektion in einer Mischung aus 50 % Ham's F-12 medium (Sigma) und 50 % DMEM kultiviert. Dem Medium waren 5 % FCS, 5 µg/µL Cholesterin, 1 mM Na-Mevalonat und 20 µM Na-Oleat zugesetzt worden (kein Antibiotikum). Am Tag 2 wurden die Zellen mit dem FuGENE 6 Reagens (Roche Applied Science) transfiziert. Pro Schale wurden bei den meisten Transfektionen insgesamt 4 µg DNA

eingesetzt. Je μg DNA wurden 3 μL Transfektionsreagens eingesetzt. Für die Transfektion wurde die DNA in einem 1,5 mL-Eppendorfgefäß mit dem Transfektionsreagens gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurden in der Sterilbank 200 μL Zellkulturmedium zugegeben, und die Lösungen wurden durch 30 x Pipettieren gemischt. Nach weiterer 10-minütiger Inkubation wurde die Lösung auf die Zellen pipettiert. Die Zellen waren zuvor mit PBS gewaschen und mit 4 mL neuem Medium versetzt worden.

3.6.2 Stabile Transfektion von HEK-Zellen mit dem Flp-In-System

Das Flp-In System (Invitrogen) ermöglicht es, eine DNA Sequenz zielgerichtet in das Genom einer speziellen HEK-Zelllinie einzubauen und somit Proteine stabil in HEK Zellen zu exprimieren (Abb. 30). Der pfm-OTR-GFP-Vector (erzeugt von Dr. Gerald Gimpl) wurde mit Hind III und Not I restringiert. Der pcDNA5/FRT-Vector (Invitrogen) wurde ebenfalls mit Hind III und Not I restringiert. Das OTR-GFP-Fragment wurde mit dem pcDNA5/FRT-Vector ligiert. Bei der Transfektion wurden die Flp-In-HEK-Zellen auf einer polylysinbeschichteten 6 cm-Schale mit 5 mL DMEM-complete-Medium ausgesät. Einen Tag später wurden die zu 80 % konfluenten Zellen transfiziert. Die Zellen wurden für 5 h mit MEM/FCS/Glu-Medium inkubiert. Unmittelbar vor der Transfektion wurden die Zellen einmal mit MEM-Medium ohne Zusätze gewaschen. Für die Transfektion wurden 15 μL Lipofectamin (Invitrogen) verwendet. Die Zellen wurden mit der DNA und dem Lipofectamin für fünf Stunden inkubiert. Danach wurde die DNA-Lipofectamin-Lösung abgesaugt und durch 5 mL DMEM/FCS/Glu-Medium ohne P/S ersetzt. Einen Tag später wurden die Zellen auf eine 10 cm-Schale mit 10 mL DMEM-complete-Medium ausgesät. Am dritten Tag nach der Transfektion wurden die konfluenten Zellen 1:3 auf eine neue 10 cm-Schale ausgesät. Verwendet wurde DMEM-complete-Medium, dem als Selektions-antibiotikum Hygromycin B zugesetzt wurde. Die meisten Zellen starben durch die Behandlung mit Hygromycin B ab. Es dauerte etwa einen Monat bis eine konfluente 10cm-Schale Flp-In-HEK-OTR-GFP-Zellen zur Verfügung stand.

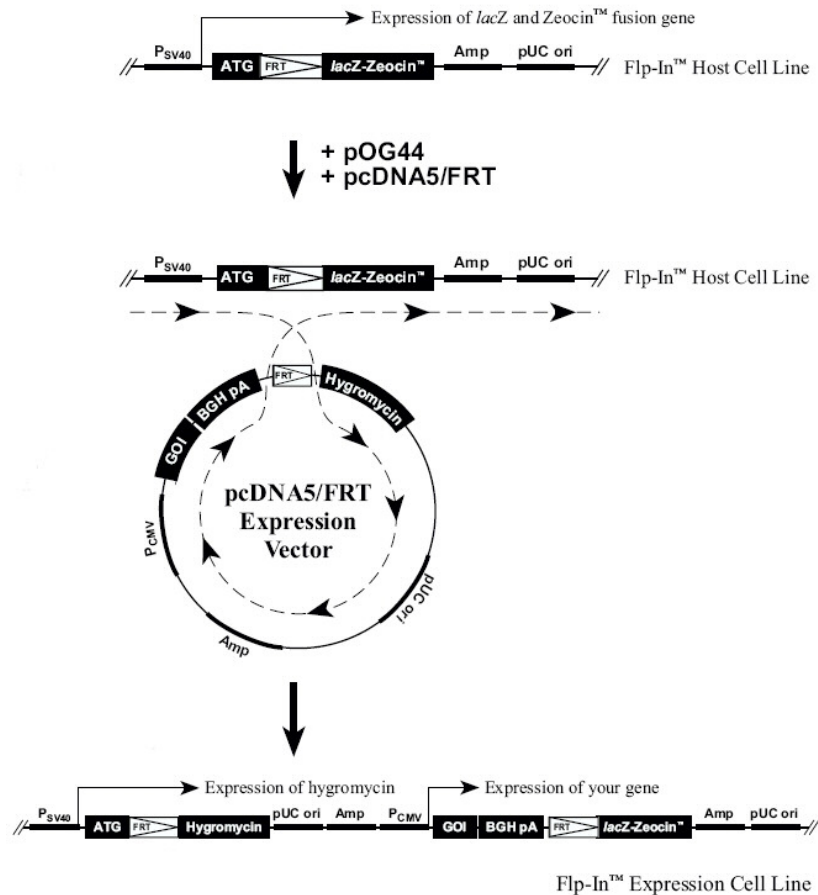


Abbildung 30: Das FlpIn-System. Die genomische DNA dieser HEK-Zellen enthält eine FRT (Flp Recombination Target)-site. Transfiziert man die Zellen mit dem pcDNA5/FRT Expressionsplasmid, das ebenfalls eine FRT site und die gewünschte DNA Sequenz enthält und gleichzeitig mit einem pOG44 Plasmid, das für die Expression der Flp Rekombinase sorgt, dann wird die DNA Sequenz in die FRT-site der HEK Zellen integriert. Transfizierte Zellen können dann durch Behandlung mit dem Antibiotikum Hygromycin B selektiert werden, da der pcDNA5/FRT auch die für Hyg B codierende DNA Sequenz enthält (aus dem FlpIn-Handbuch der Firma Invitrogen).

3.6.3 Anlegen von Dauerkulturen

Zum Einfrieren wurden abgelöste Zellen in Kulturmedium mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum und 10 % (v/v) DMSO suspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1,5 mL-Kryoröhrchen gegeben. Die Kryoröhrchen wurden in eine mit Eis gefüllte Styroporbox gegeben, in der Box bei minus 80° C eingefroren und nach einem Tag in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert. Bei erneuter Aussaat wurden die Zellen möglichst schnell aufgetaut, d. h. das Kryoröhrchen wurde im Wasserbad bei 37° C inkubiert und anschließend wurden die Zellen sofort auf eine 10 cm-Schale mit 8,5 ml Medium ausgesät. Das Medium wurde am nächsten Tag gewechselt. Die CHO Zellen wurden nicht in flüssigem Stickstoff, sondern bei -80° C dauerhaft gelagert. Für manche Zellen günstiger ist es, wenn man sie in einem Medium mit einem größeren Anteil an FCS (bis zu 90 %) einfriert.

3.7 Zellernte und Membranpräparationen

3.7.1 Präparation von HEK-OTR-Membranen

Von einer konfluenten 10 cm-Schale mit HEK-OTRGFP-Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml eiskaltem PBS (mit 5 mM EDTA) überschichtet. Nachdem die Zellen für 5 min mit dem PBS inkubiert worden waren, wurden sie mit einer Pipette suspendiert bzw. von der Kulturschale abgelöst. Es wurde dabei kein Trypsin verwendet. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL-Röhrchen überführt. Noch auf der Schale verbliebene Zellen wurden mit weiteren 2 mL PBS (5mM EDTA) ab gespült und ebenfalls in das 15 mL-Röhrchen gegeben. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten lang bei 1000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet mit einem Homogenisator aus Glas in 1 mL eiskaltem hypotonischen Lysispuffer (10 mM HEPES-NaOH, pH 7,4 mit 10 mM EDTA) resuspendiert und für 5 min bei 4° C inkubiert. Die lysierten Zellen wurden homogenisiert, indem der eingeschiffene Glasstößel des Homogenisators etwa 15 x auf und ab bewegt wurde. Dies geschah auf Eis. Danach wurde die Suspension zentrifugiert (15 min, 20800 g, 4° C). Das Pellet wurde mit 1 mL Bindungspuffer gewaschen und schließlich in 450 µL Bindungspuffer resuspendiert. Für die Radioliganden-Bindungstests ergab eine konfluente Schale Zellen somit vier Testansätze.

3.7.2 Präparation von Membranen aus SRD13A- und CHO-Zellen

Bei den in den USA durchgeführten Experimenten wurden Membranen nach der folgenden Methode präpariert: Von den 10 cm-Schalen wurde das Medium entfernt. Die Zellen wurden zweimal mit 5 mL eiskaltem PBS gewaschen, mit einem Zellscraper in weiteren 5 mL kaltem PBS suspendiert und für 5 min bei 1000 g und 4° C in 15 oder 50 mL-Röhrchen abzentrifugiert. Der Überstand wurde weggeschüttet, und auf das Pellet (es bestand meistens aus den Zellen von 2-6 Schalen) wurde 1 mL Puffer A gegeben. Das Pellet wurde für 45 min mit dem Puffer A auf Eis inkubiert. Durch die 45-minütige Inkubation soll sich die Ausbeute an Membranen erhöhen. Danach wurden die Zellen durch 40 Passagen durch eine 1 mL-Spritze aufgebrochen (auf Eis). Die Spritze ist mit einer 22-gauge-Nadel bestückt. Der Unterdruck, der beim schnellen Aufsaugen der Zellen in die Spritze entsteht, bricht die Zellen auf. Um Zellkerne und nicht-aufgeschlossene Zellen abzutrennen, wurden die Proben in 1,5 mL-Eppendorfgefäße überführt und für 5 min bei 4° C und 1000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und für 10 min bei 20800 g und 4° C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde mit Puffer A

resuspendiert. Der Proteingehalt der Membranen wurde per BCA-Assay bestimmt. Die Membranen wurden meist als 500- μ g-Aliquots bei -80° C gelagert.

3.7.3 Dichtegradientenzentrifugation zur Reinigung von Plasmamembranen

Die Membranen wurden zunächst nach der in 3.7.1 beschriebenen Methode präpariert. In ein Beckman-10mL-Zentrifugenröhrchen wurden 3,5 mL 60 % Sucrose (in hypotonischem Lysispuffer: 10 mM HEPES-NaOH, pH 7,4 mit 10 mM EDTA) pipettiert. Die Lösung wurde mit 4 mL 35 % Sucroslösung (in hypotonischem Lysispuffer) überschichtet. Auf den Sucrose-Gradienten wurden vorsichtig 10 mg Membranen in 2 mL hypotonischem Lysispuffer (ohne Sucrose) gegeben. Diese Arbeitsschritte wurden im Kühlraum bei 4° C durchgeführt. Jeweils 6 Proben wurden in einem Beckman Swing-out-Rotor gegeben und mit der Beckman-Ultrazentrifuge für 2,5 h mit 100000 g (34000 rpm) bei 4° C zentrifugiert. Bei der Zentrifugation bildeten sich 3 Fraktionen: ein Pellet am Boden des Röhrchens und zwei Banden. Die obere Bande enthielt die Plasmamembranen. Die Membranen wurden mit der Pipette abgesaugt und mit 5 mL Lysispuffer verdünnt. Die Membranen wurden für 30 min bei 100000 g und 4° C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit Bindungspuffer (20 mM HEPES-NaOH, pH 7,4; 5 mM $MgCl_2$) resuspendiert und wieder abzentrifugiert. Die Membranen wurden auf diese Weise noch 2x mit Bindungspuffer gewaschen, um die Sucrose aus der Lösung zu entfernen. Durch Bindungstests konnte gezeigt werden, dass die Oxytocinrezeptoren durch die Reinigung der Plasmamembranen per Dichtegradientenzentrifugation um den Faktor 6 angereichert werden konnten.

3.8 Veränderung der Steroidzusammensetzung von Zellen oder Membranen

Für die Entfernung (Abreicherung) von Cholesterin aus Zellen oder Zellmembranen und für den Einbau von Cholesterin oder anderen Steroiden (Anreicherung) wurden Methyl- β -Cyclodextrin (MBCD) oder Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HPCD) verwendet. Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide aus α -1,4-verknüpften Glucosebausteinen. Die beiden hier verwendeten Cyclodextrine bestehen aus 7 Glucoseuntereinheiten. Die Cyclodextrine besitzen einen hydrophoben Hohlraum, in den Cholesterin und andere Steroide eingelagert werden können. Das HPCD besitzt eine etwas geringere Affinität zum Cholesterin als das MBCD.

3.8.1 Herstellung von Cyclodextrin-Komplexen

M β CD in H₂O (40 mg/mL) wurde auf 80° C erhitzt. Das in Ethanol gelöste Steroid wurde unter Rühren tropfenweise zugegeben. Das Volumen des in Ethanol zugegebenen Steroids betrug 10 % des Volumens der M β CD-Lösung. Die Lösung wurde für 10 min unter Rühren inkubiert. Dann wurde die Lösung in der SpeedVac oder mit N₂ evaporiert, bis das Lösungsmittel verdampft war. Die M β CD-Steroid-Komplexe wurden mit H₂O resuspendiert, so dass sich eine finale Konzentration des Steroids von 3 mM oder 2,5 mM in 40 mg/mL M β CD ergab. Die Cyclodextrin-Steroid-Komplexe wurden durch einen 0,2 μ M-Filter filtriert (Millipore) und als 200 μ L-Aliquots bei -20° C oder -80° C gelagert.

Bei den Experimenten zur Solubilisierung des Oxytocinrezeptors wurde Cholesterin-M β CD verwendet, bei dem das Cholesterin eine Konzentration von 10 mM hatte. Die Komplexe wurden auf die folgende Weise hergestellt: 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. Die Lösung wurde für 5 h unter Rühren inkubiert. Dann wurde die Lösung mit H₂O auf 78 mL aufgefüllt. Die Lösung wurde filtriert (0,2 μ M). Die Cholesterinkonzentration betrug 10 mM und die M β CD-Konzentration 100 mM.

3.8.2 Veränderung des Steroidgehalts lebender Zellen

Den SRD13A-Zellen wurde durch Behandlung mit HPCD für 1-2 h Cholesterin entzogen. Dazu wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und dann mit einer 1:1 Mischung aus 50 % Ham's F-12 medium (Sigma) und 50 % Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 1 % (w/v) HPCD und 5 % newborn calf lipoprotein-deficient serum (NCLPPS), 50 μ M Na-Mevalonat und 50 μ M Na-Compactin inkubiert. Um die Zellen mit Cholesterin oder einem anderen Steroid wieder anzureichern, wurden sie zuerst 2x mit PBS gewaschen und dann für 4-6 h mit dem oben beschriebenen Medium inkubiert, das dieses Mal jedoch kein HPCD, sondern Cholesterin-M β CD-Komplexe oder ein anderes mit M β CD komplexiertes Steroid enthielt.

3.8.3 Veränderung des Steroidgehalts von Membranen

Den Membranen wurde Cholesterin entzogen, indem sie für 10-30 min bei 30° C unter Schütteln mit 30 mM M β CD inkubiert wurden. Das M β CD wurde als 200 mM-Lösung zu den Membranen gegeben. Danach wurden die Membranen abzentrifugiert und 2x mit Bindungspuffer gewaschen. Um die Membranen wieder anzureichern, wurden sie für 30 min

bei 30° C mit unterschiedlichen Mengen der 3 mM Cholesterin-MBCD-Lösung oder einem anderem mit MBCD komplexierten Steroid inkubiert. Danach wurden die Membranen abzentrifugiert und 2x mit Bindungspuffer gewaschen.

3.9 Radioliganden-Bindungstests

Mit dem Bindungstest sollte hier untersucht werden, wie hoch die Affinität der Rezeptorchimäre zu dem Liganden Oxytocin ist. Für den Test wurden rezeptorhaltige Zellen oder Zellmembranen mit tritiummarkiertem Oxytocin inkubiert. Anhand der β -Strahlung des Tritiums lässt sich messen, wieviel Ligand an den Rezeptor bindet. Da der Ligand jedoch auch unspezifisch binden kann (an Zellmembranen, Proteine, Lipide, Glycane oder die Oberfläche des Eppendorfgefäßes), wurde eine Differenzmessung durchgeführt. Dazu wurden die Rezeptoren einmal mit dem radioaktiven Liganden alleine inkubiert; die dabei erhaltenen Messwerte entsprachen der spezifischen Bindung an die Rezeptoren plus der unspezifischen Bindung. In einem weiteren Ansatz wurden die Rezeptoren mit derselben Menge tritiummarkiertem Liganden, die jedoch mit einem fünfhundertfachen Überschuss an unmarkiertem Liganden versetzt worden war, inkubiert. Da der im Überschuss vorhandene unmarkierte Ligand den Radioliganden von den spezifischen Bindungsstellen verdrängt, wird hier nur die unspezifische Bindung gemessen. Die Differenz der beiden Messwerte entspricht somit der spezifischen Bindung des Radioliganden an die Rezeptoren.

3.9.1 Bindungstest an Zellmembranen

Für einen Bindungstest wurden präparierte Zellmembranen in 90 μ L Bindungspuffer (20 mM HEPES-NaOH, pH 7,4; 5 mM $MgCl_2$) suspendiert. Es wurden 10 μ L tritiiertes Oxytocin (100 nM) zugegeben. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 30° C im Wasserbad inkubiert. Dabei kam es zur Einstellung des Bindungsgleichgewichtes. Die Reaktion wurde abgestoppt, indem das Eppendorfgefäß auf Eis gestellt wurde. Der nicht gebundene Ligand wurde durch Zentrifugation vom gebundenen Liganden abgetrennt. Dazu wurde für 5 min zentrifugiert (20800 g, 4° C), der Überstand wurde abgesaugt, und 1 mL Bindungspuffer wurde auf das Pellet gegeben. Es wurde erneut zentrifugiert (5 min/20800 g/4°C) und der Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet wurde in 50 μ L Triton / EDTA-Puffer resuspendiert, in ein Polystyrol-Zählröhrchen überführt und mit 2 mL Szintillator versetzt.

3.9.2 Bindungstest an solubilisierten Zellmembranen

HEK-OTRGFP-Membranen wurden mit dem Detergens CHAPSO solubilisiert. Die Membranen wurden pelletiert (20800 g, 10 min, 4° C) und auf Eis mit Solubilisierungspuffer bei einer Konzentration von 5 mg Protein/mL resuspendiert. Dieser Puffer hatte die folgende Zusammensetzung: 0,8 % (w/v) CHAPSO, 20 mM HEPES (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 10 % (w/v) Glycerin, 0,1 mM Cholesterin/M β CD. Das Cholesterin-M β CD wurde als 10 mM-Lösung zum Puffer gegeben. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension für 60 min bei 100000 g zentrifugiert. Das Solubilisat wurde 1:8 verdünnt. Verwendet wurde dazu der oben beschriebene Puffer, der dieses Mal jedoch kein CHAPSO enthielt. Die CHAPSO-Konzentration der Probe betrug somit 0,1 % (w/v). für den Bindungstest wurden 90 μ L der Probe mit 10 μ L tritiertem Oxytocin (100 nM) für 30 min bei 30° C inkubiert. Die solubilisierten Rezeptoren wurden mit Hilfe des Brandel Cell Harvester (Brandel, Gaithersburg, USA) auf GF/F-Glasfasermembranen gesaugt, die vorher für 1 h in 0,3 % Polyethylenimin (PEI) eingelegt worden waren. Das PEI verstärkt die Bindung von Proteinen an die Membran. Der ungebundene Ligand wurde entfernt, indem Bindungspuffer durch die Membran gesaugt wurde. Die Membranen wurden in Szintillator gegeben und auf ihre Radioaktivität vermessen.

3.10 Synthese des fotoreaktiven Cholesterin-Analogons

Das Azocholestanol wurde nach der von Burger (2000) beschriebenen Methode synthetisiert. Durch eine Lösung von 1 g 6-Ketocholestan-3 β -ol in trockenem Methanol wurde bei 0° C für 2 h trockenes NH₃-Gas perlen gelassen. Dann wurde eine Lösung von 1 g Hydroxylamin-O-sulfonsäure in 10 mL trockenem Methanol unter Rühren langsam dazu getropft. Der Ansatz wurde für 8 h vor Licht geschützt unter Rühren inkubiert und filtriert. Es wurde 1 mL Triethylamin zugegeben, und die Lösung wurde bis zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wurde in 20 mL trockenem Methanol aufgenommen. Nach erneuter Zugabe von 1 mL Triethylamin wurde eine Lösung von 1 g Iod in 10 mL Methanol langsam bis zur bleibenden Gelbfärbung des Ansatzes dazu getropft. Das überschüssige Iod wurde durch die Zugabe von Natriumdithionit reduziert. Um das wasserunlösliche Reaktionsprodukt zu fällen, wurde der Ansatz unter Rühren zu 300 mL H₂O gegeben. Das dabei entstehende Präzipitat wurde abfiltriert. Das bei der Reaktion entstandene 6-Azi-cholestan-3 β -ol (Azocholestanol, Abb. 31) wurde mit einer Kieselgel 60-Säule gereinigt. Als Laufmittel wurde Petrolether (30-50) : Diethylether : Essigsäure 80 : 20 : 2 verwendet. Die Reaktionsprodukte

wurden in 10 mL Chloroform gelöst auf die Säule gegeben (Länge der Säule = 35 cm, Durchmesser 4,5 cm). Das Azocholestanol konnte per Dünnschichtchromatografie oder durch sein charakteristisches Absorptionsspektrum (Maxima bei 351 und 371 nm) identifiziert werden.

Für einige Experimente wurde tritiummarkiertes Azocholestanol verwendet. Dieses wurde hergestellt, indem die OH-Gruppe des Azocholestanols zuerst zu einer Ketogruppe oxidiert und anschließend mit tritiiertem Natriumborhydrid (Amersham) wieder reduziert wurde. Bei dieser Reaktion entstanden Stereoisomere. Die Hydroxylgruppe in Position 3 entstand in α - und in β -Konfiguration. Die Isomere konnten per Dünnschichtchromatografie getrennt werden. Für die Oxidation des Azocholestanols wurden 60 mg der Substanz in 10 mL Aceton gelöst. Eine Lösung von 100 mg CrO_3 in $\text{H}_2\text{O} : \text{H}_2\text{SO}_4$ (9 : 1, v/v) wurde tropfenweise bis zur Persistenz der orangenen Farbe dazu gegeben. Dann wurde 1 mL Isopropanol dazu gegeben, und der Ansatz wurde für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 20 mL H_2O zu dem Ansatz gegeben, und die hydrophoben Reaktionsprodukte wurden mit 15 mL Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde evaporiert. Die darin enthaltenen Reaktionsprodukte wurden mit einer Kieselgel 60-Säule aufgereinigt (Länge der Säule = 30 cm, Durchmesser = 1 cm). Als Laufmittel wurde dabei Hexan : Ethylacetat 3 : 1 (v/v) verwendet. Für die Reduktion wurden 2,4 mg 6-Azi-cholestan-3-on (das entspricht 5,8 μmol) in 1 mL Tetrahydrofuran gelöst. Dazu wurde 1 mL Natriumbor- $[\text{}^3\text{H}]$ -hydrid (in 0,1 M NaOH) hinzugegeben. Die Menge des eingesetzten Natriumbor- $[\text{}^3\text{H}]$ -hydrids betrug etwa 1 μmol , und hatte eine Radioaktivität von 25 mCi. Der Reaktionsansatz wurde für 24 h unter Rühren vor Licht geschützt bei RT inkubiert. Danach wurden 300 μL 1 M HCl zugegeben, um Reste des Natriumbor- $[\text{}^3\text{H}]$ -hydrids, das nicht mit dem Azocholestanon reagiert hatte, zu zersetzen. Die organischen Reaktionsprodukte wurden mit Ethylacetat extrahiert. Das 6-Azi-cholestan-3 α - $[\text{}^3\text{H}]$ -3 β -ol (= $[\text{}^3\text{H}]$ -Azocholestanol) konnte per Dünnschichtchromatografie gereinigt werden. Verwendet wurden dazu Kieselgelplatten (Kieselgel F₂₅₄, 10 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm, Merck). Als Laufmittel wurde Hexan : Ethylacetat (2 :1) verwendet. Die radioaktiven Reaktionsprodukte konnten mittels Autoradiografie (Hyperfilm, Amersham) identifiziert werden. Der Bereich des Kieselgels, der das $[\text{}^3\text{H}]$ -Azocholestanol enthielt, wurde ausgekratzt, und das $[\text{}^3\text{H}]$ -Azocholestanol wurde mit Ethanol und Ethylacetat aus dem Kieselgel extrahiert und mit einem 0,2 μM -Filter (Millipore) filtriert. Das $[\text{}^3\text{H}]$ -Azocholestanol wurde in Ethanol gelöst oder als M β CD-Komplex bei -20° C gelagert.

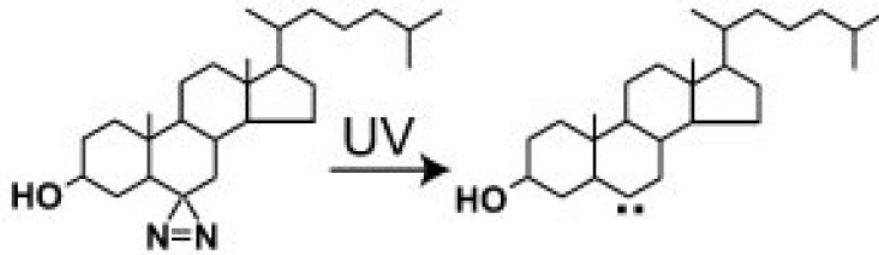


Abbildung 31: Formel des Azocholestanols. Das Azocholestanol besitzt eine fotoreaktive Diazirinegruppe in Position 6. Bei UV-Bestrahlung wird es in ein reaktives Carben umgewandelt, das unspezifisch kovalente Bindungen mit den Aminosäureresten von Proteinen bilden kann. (Aus Adams et al. 2004)

Bei den Experimenten in Dallas wurde auch mit einem fotoreaktiven 25-Hydroxycholesterinderivat gearbeitet. Das Molekül hatte wie das Azocholestanol eine fotoreaktive Diazirinegruppe in Position 6. Das Molekül war nicht mit Tritium markiert. Synthetisiert wurde es von Herrn Jef K. De Brabander, Department of Biochemistry, University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas (Adams et al., 2004).

3.11 Fotoaffinitätsmarkierungen

Bei der Fotoaffinitätsmarkierung des Oxytocinrezeptors wurden HEK-OTRGFP-Membranen mit M β CD-Lösung (30 mM) für 30 min bei 30°C angereichert, zweimal mit Bindungspuffer gewaschen und in Bindungspuffer mit [3 H]-Azocholestanol-M β CD (3 mM) für 20 min bei 30°C wieder angereichert. Die Membranen wurden weitere zwei Male mit Bindungspuffer gewaschen und mit Bindungspuffer resuspendiert. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 4° C mit einer 200 Watt-UV-Lampe (Quecksilberdampfampe, $\lambda = 330$ nm, Leitz, Wetzlar) bestrahlt. Typisches Probenvolumen war 1 mL. Die Probe befand sich bei der Bestrahlung in einer Quartzküvette mit Rührfisch. Die Membranen wurden mit Bindungspuffer resuspendiert. Die Proteine wurden gefällt. Die Pellets wurden mit Probenauftragspuffer resuspendiert und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Probe wurde per Röhrengel und Szintillationsmessung analysiert. Bei einigen Fotoaffinitätsmarkierungen von StAR und MLN64 wurde die 200 Watt-UV-Lampe verwendet. StAR und MLN64 befanden sich während der Bestrahlung in einer Quartzküvette mit Rührfisch. Das Probenvolumen betrug 1 mL mit 100 μ g Protein. Die Bestrahlung wurde bei 4° C durchgeführt.

Bei der Fotoaffinitätsmarkierung von SCAP wurden 100 Mikrogramm Membranen in 500 μ L Puffer A mit unterschiedlichen Konzentrationen des nichtradioaktiven Azocholestanols für 20

min bei RT vor Licht geschützt invertierend inkubiert. Das Azocholestanol wurde in Form von M β CD-Komplexen zugegeben (2,5 mM Azocholestanol, 25 mM M β CD). Danach wurde für 10 min bei 4° C mit 20800 g zentrifugiert, und der Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet wurde mit 130 μ L Puffer A resuspendiert und in zwei 60 μ L-Aliquots aufgeteilt. Eines der beiden wurde für 10 min bestrahlt. Das andere wurde solange vor UV Licht geschützt auf Eis gelagert. Die Probe befand sich während der Bestrahlung ebenfalls auf Eis. Für die Bestrahlung wurde eine 8-Watt-UV-Lampe (WL=365 nm) verwendet („UVL-28“, 365 nm, UVP). Die Lampe wurde direkt auf die geöffneten Eppendorfgefäße gestellt. Nach der Bestrahlung wurde zu allen Proben jeweils 15 μ L 5x Probenauftragspuffer gegeben. Die Proben wurden dann für 2h bei 37° C inkubiert. Das durch die kovalente Bindung erhöhte Molekulargewicht von SCAP konnte per SDS-Gel und Western-Blot detektiert werden. Verwendet wurden 10 % SDS-Gele (Trenngel 5,5 cm, Sammelgel 0,5 cm, Breite des Gels 8 cm, Dicke 1,5 mm, 15 Taschen je Gel). Je Geltasche wurden typischerweise 5 oder 10 μ L Probe aufgetragen. Maximal 10 Proben je Gel, rechts und links immer mindestens zwei Taschen ohne Probe nur mit 1x Probenauftragspuffer. Das Gel wurde so lange laufen lassen, bis der Molekulargewichtsbereich, der der Masse von SCAP entspricht, idealerweise etwa 1,5 cm vom unteren Ende des Gels entfernt ist. Die Lauffront lief dabei aus dem Gel heraus. Für die Elektrophorese wurde eine Minigelapparatur von Biorad, bei der das Gel in einer Plexiglkammer im Laufpuffer eingetaucht ist, verwendet. Der Puffer kühlt das Gel, es wird so vermieden, dass die Lauffront eine sichelförmige Gestalt annimmt. Das Gel wurde mit relativ niedriger Stromstärke laufen gelassen (15 mA). Der Gellauf dauerte 4 h.

StAR und MLN64 wurden auf die gleiche Weise wie SCAP mit dem nichtradioaktiven Azocholestanol oder dem [3 H]-Azocholestanol markiert. Für die Bestrahlung wurde der UV-Tisch verwendet, der auch für die Beobachtung von DNA-Ethidiumbromid-Gelen benutzt wurde („Transilluminator 4000“, Stratagene, Heidelberg). Der UV-Tisch wurde bei der Bestrahlung umgekehrt auf die Styroporbox mit den Proben gestellt. Der Abstand der UV-Lampe zu den Proben betrug 5 cm. Die Proben befanden sich während der Bestrahlung in 1,5 mL-Eppendorfgefäßen bei geöffnetem Deckel auf Eis. Das Probenvolumen betrug 200 μ L mit 20-30 μ g Protein. Nach der Bestrahlung wurden die Proteine mit Aceton gefällt und dann weiter analysiert. Die Fotoaffinitätsmarkierung des Oxytocinrezeptors mit dem nichtradioaktiven Azocholestanol wurde auch auf diese Weise durchgeführt.

3.12 Chemische Spaltung von Proteinen mit Cyanbromid

Cyanbromid (CNBr) spaltet Proteine spezifisch nach Methioninresten (siehe Abbildung 32). In einem typischen Reaktionsansatz befanden sich 20-30 µg StAR oder MLN64 in einem Volumen von 30 µL in einem 1,5 mL-Eppendorfgeläß. Dazu wurden 100 µg in 70 µL 100 % Ameisensäure gelöstes CNBr gegeben. Die Probe wurde für 24 h vor Licht geschützt bei oder bei RT unter Schütteln inkubiert. Danach wurde das Lösungsmittel im Abzug mit N₂ evaporiert. Die Probe wurde mit H₂O resuspendiert und entweder sofort weiter analysiert oder bei -20°C gelagert.

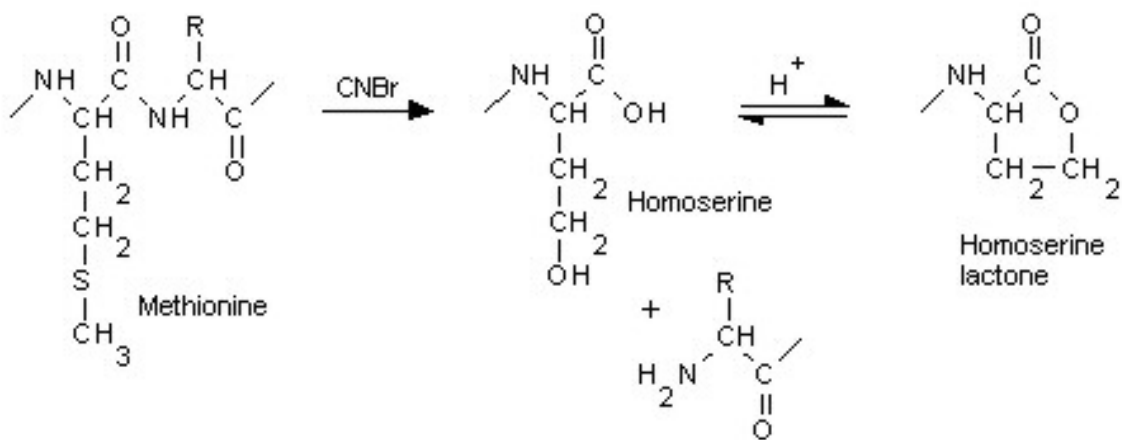


Abbildung 32: Cyanbromid spaltet Proteine nach Methioninresten

3. 13 Enzymatische Spaltung von Proteinen

Die proteolytische Spaltung von SCAP erfolgte nach dem von Adams et al. (2004) beschriebenen Protokoll. 100 µg-Aliquots der mit 20,800 g abzentrifugierten Membranen aus mit SCAP-cDNA transfizierten SRD13A-Zellen oder aus HEK-Zellen, die SCAP stabil exprimierten (Yang et al. 2002), wurden mit 135 µL Puffer A resuspendiert. Zu jedem Aliquot wurden 2 µg Trypsin (Sigma, in 5 µL Puffer A resuspendiert) zugegeben. Die Proben wurden für 30 min bei 30° C inkubiert. Der Trypsinverdau wurde abgestoppt, indem 100 µg (in 5 µL) Soybean-Trypsin-Inhibitor zugegeben wurde.

Bei einigen Experimenten wurden die Proben nach dem Verdau noch mit der PNGaseF (New England BioLabs) enzymatisch deglykosyliert (nach dem von Brown et al. 2002 erstellten Protokoll). Dazu wurden die Proben nach Zugabe des Trypsin-Inhibitors mit final 0,5 % (w/v) SDS versetzt und für 10 min bei 95° C inkubiert. Die Proben wurden mit Proteaseinhibitoren versetzt, so dass sich final folgende Konzentrationen ergaben: 50 µg/µL Leupeptin, 25 µg/µL

Pepstatin, 10 µg/mL Aprotinin. Es wurden 21 µL 0,5 M Natriumphosphat, pH 7,5 und 21 µL 10 % (v/v) Nonidet-P40 zugegeben. Die Proben wurden mit je 1 µL PNGaseF versetzt (finale Konzentration 2500 U/mL). Die Proben wurden dann für mindestens 2 h bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des vierfachen Volumens an -20 °C kaltem Aceton abgestoppt.

In einigen Experimenten wurde SCAP mit der Protease Chymotrypsin (Sigma) behandelt. Dabei wurden 50 µg Membranen mit Puffer A und 30 µg Chymotrypsin resuspendiert, so dass sich ein finales Volumen von 68 µL ergab. Die Proben wurden für 30 min bei 30° C inkubiert. Danach wurden die Proben für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 14 µL 5x Probenauftragspuffer zugegeben.

StAR und MLN64 wurden in einigen Experimenten mit der Protease LysC (Roche, Cat. No. 11420429001) gespalten. In einem typischen Experiment wurden 20 µg StAR oder MLN64 in einem Volumen von 20 µL 100 mM NH₄HCO₃ (pH 8,5) vorgelegt, mit 1 µg LysC in 1 µL desselben Puffers gemischt und für 24 h bei 37° C vor Licht geschützt unter N₂-Atmosphäre unter Schütteln inkubiert.

3.14 Gelelektrophorese

3.14.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese kann man die Proteine eines Proteingemischs nach ihrem Molekulargewicht auftrennen (Laemmli, 1970). Mit Mercaptoethanol oder Dithiothreitol werden vor der Elektrophorese die in den Proteinen eventuell vorhandenen Disulfidbrücken reduziert. Durch das Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine entfaltet und mit einer negativen Nettoladung versehen. Die negativ geladenen Proteine werden bei der Elektrophorese durch ein elektrisches Feld in Bewegung versetzt. Kleine Proteine wandern schneller durch die Poren des Polyacrylamidgels als große. Durch die Verwendung eines Sammelgels werden die Proteine im Gel aufkonzentriert; es entstehen so schärfere Banden. Die eigentliche Auftrennung der Proben findet im Trenngel statt.

Die verwendeten Gele hatten folgende Zusammensetzung:

Sammelgel: 3,75 % Acrylamid, 0,1 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 126 mM Tris (pH 6,8), 0,075 % APS, 0,08 % (v/v).

Trenngel: 10 % Acrylamid, 0,27 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 375 mM Tris (pH 8,8), 0,05 % APS, 0,05 % TEMED (v/v).

Für die Herstellung der Gele wurde eine 30 % Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1) verwendet, (Roth, Karlsruhe). Das verwendete APS lag als 10 %-Lösung in Wasser vor. Die meisten hier verwendeten Gele hatten die Abmessungen 5 x 8 cm, und waren 1,5 mm dick.

Der verwendete Laufpuffer hatte folgende Zusammensetzung: 10 L enthielten: 30,3 g Tris + 144,1 g Glycin + 10 g SDS (der gewünschte pH-Wert von 8,3 stellte sich meist von selbst ein). Vor der Gelelektrophorese wurden die Proben mit Probenauftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95° C inkubiert. Membranproteine wurden für 2 h bei 37° C inkubiert. Der 5x Probenauftragspuffer hatte folgende Zusammensetzung: 250 mM Tris (pH 6,8), 25 % Glycerin, 10 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,2 % Bromphenolblau. Alternativ wurde auch folgender Probenauftragspuffer verwendet: 2x Probenauftragspuffer: 0,13 M Tris (pH 6,8), 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 0,01 % Bromphenolblau, 200 mM DTT. Als Molekulargewichtsstandard wurden der „Low Range“- oder der Kaleidoskop-Standard der Firma BioRad oder der „See Blue Plus 2 Prestained Standard“ der Firma Invitrogen verwendet.

3.14.2 Tricingele

Verwendet man Tricin statt Glycin im Laufpuffer von SDS Gelen, so lassen sich damit auch Gemische aus relativ kleinen Proteine mit einem Molekulargewicht bis herab zu sieben Kilodalton auftrennen. Verwendet wurden sie hier, um die Trypsin- oder Chymotrypsin-Fragmente von SCAP aufzutrennen.

Die verwendeten Gele hatten folgende Zusammensetzung:

Sammelgel: 3,75 % Acrylamid, 0,1 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,72 M Tris (pH 8,45), 0,08 % APS, 0,08 % (v/v) TEMED.

Trenngel: 12 % oder 15 % Acrylamid, 10 % (w/v) Glycerin, 1 M Tris (pH 8,45), 0,05 % APS, 0,05 % TEMED (v/v).

Für die Herstellung der Gele wurde eine 30 % Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (30 % T, 29:1, 3,3 % C) verwendet, (BioRad). Das verwendete APS lag als 10 %-Lösung in Wasser vor. Die hier verwendeten Gele hatten die Abmessungen 5 x 8 cm, und waren 1,5 mm dick.

Folgende Laufpuffer wurden verwendet:

Anodenpuffer: 0,2 M Tris-HCl, pH 8,9

Kathodenpuffer: 0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1 % SDS (der gewünschte pH-Wert stellte sich von selbst ein).

3.14.3 Schäggergele

Mit dieser von Schägger und Jagow (1987) beschriebenen Methode lassen sich Proteingemische mit Molekulargewichten bis herab zu einem Kilodalton auftrennen. Diese Gele wurden hier dazu verwendet, um die Cyanbromid-Fragmente des StAR und MLN 64 Proteins aufzutrennen. Im Gegensatz zu einem normalen SDS Gel enthalten Schäggergele noch ein sogenanntes Spacergel zwischen Sammelgel und Trenngel.

Die Gele hatten folgende Zusammensetzung:

Sammelgel: 10 % Acrylamid, 0,27 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 126 mM Tris (pH 6,8), 0,075 % APS, 0,08 % (v/v).

Spacergel: 10 % Acrylamid, 0,61 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 1 M Tris-HCl (pH 8,45), 0,5 % APS, 0,05 % (v/v) TEMED.

Trenngel: 15,5 % Acrylamid, 1 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 13,4 % (w/v) Glycerin, 1 M Tris-HCl (pH 8,45), 0,5 % APS, 0,05 % (v/v) TEMED.

Für die Herstellung der Spacergele und Sammelgele wurde eine Lösung mit Acrylamid (BioRad) 46,5 % (w/v) und 3 % (w/v) Bisacrylamid) angesetzt. Die Gele waren 1,5 mm dick. Für die Herstellung des Sammelgels wurde eine 30 % Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1) verwendet (Roth, Karlsruhe). Das verwendete APS lag als 10 %-Lösung in Wasser vor. Die meisten hier verwendeten Gele hatten Abmessungen 6 x 8 cm (von den 6 cm entfielen 4,5 cm auf das Trenngel, 1 cm auf das Spacergel und 0,5 cm auf das Sammelgel). Die Gelelektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt und dauerte etwa 4 h.

Folgende Laufpuffer wurden verwendet:

Anodenpuffer: 0,2 M Tris-HCl (pH 8,9)

Kathodenpuffer: 0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1 % SDS (der gewünschte pH-Wert von 8,25 stellte sich von selbst ein).

2x Probenauftragspuffer für Schäggergele: 4 % (w/v) SDS, 12 % Glycerin, 50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2 % Mercaptoethanol, 0,01 % Serva Blue G.

Als Molekulargewichtsstandard wurde der „Polypeptide-Standard“ der Firma BioRad verwendet.

3.14.4 Röhrengel

Mit Röhrengelen wurde gearbeitet, um radioaktiv markierte Peptide und Proteine aufzutrennen. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele in etwa 1 mm dicke Scheibchen geschnitten. Die Gelstücke wurden mit einem Szintillator-Cocktail versetzt (90 % Lipoluma / 10 % Lumasolve / 1 % H₂O, 4 mL je Gelstück) und auf ihre Radioaktivität vermessen.

Verwendet wurden 10 cm lange Glasröhrchen mit 4 mm Innendurchmesser. Die SDS-Gele und auch die Laufpuffer hatten die gleiche Zusammensetzung wie bei den Plattengelen. Ein Röhrchengel hatte eine Länge von etwa 8 cm.

3.14.5 Blue Native Gele

Blue Native Gele ermöglichen es Proteine per Gelelektrophorese trennen, ohne dass Proteinkomplexe dabei in ihre Untereinheiten zerfallen. Gearbeitet wurde hier nach der von Schägger et al. (1991 und 1994) sowie von Yang et al. (2002) beschriebenen Methode. Bei der Elektrophorese wird kein SDS verwendet. Eine negative Ladung der Proteine und somit deren Wanderung im elektrischen Feld erreicht man allein durch die Zugabe des negativ geladenen Coomassie Farbstoffs zu dem Probenauftragspuffer und Laufpuffer. Die Membranproteinkomplexe wurden mit dem Detergens NP 40-alternative (Calbiochem) solubilisiert. Die Zugabe von Aminocaproinsäure zum Solubilisierungspuffer erleichterte die Solubilisierung der Membranproteine. Für die Elektrophorese wurden Gradientengele mit 4 % -10 % Acrylamid verwendet. Nach dem Gellauf wurden die Proteine elektrophoretisch auf PVDF Membranen (Millipore) transferiert. Die Membranen wurden dann mit Methanol gewaschen, um den Coomassie-Farbstoff zu entfernen. Anschließend wurden die Proteine per Western-Blot analysiert.

Verwendet wurden die folgenden Chemikalien und Lösungen:

Aminocaproinsäure (6-Aminohexanoic acid): Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO 63103 USA, Cat. No. A 2504

BIS-TRIS: Sigma, Cat. No. B9754

Coomassie Brilliant Blue G: Sigma, Cat. No. B-1131

40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1, 3,3 % C): Biorad, catalog No. 161-0146,

Das verwendete APS lag als 10 %-Lösung in Wasser vor.

1 M BisTris Stocklösung (pH 7,0 mit HCl eingestellt)

1 M Tricin Stocklösung (pH 7,0 mit NaOH eingestellt)

Gelpuffer: 500 mL enthalten 100 mL BisTris-Stocklösung und 131 g Aminocaproinsäure (Mw=131,2g)

10x Blue Native-Probenauftragspuffer: 10 mL enthalten 0,5 g Coomassie, 1,0 g Aminocaproinsäure, 500 µL BisTris-Stocklösung, 1,0 mL Glycerin.

Anodenpuffer: 50 mL BisTris-Stocklösung auf 1000 mL

Kathodenpuffer: 1000 mL enthalten 50 mL 1 M Tricin-Stocklösung, 15 mL Tricin-Stocklösung und 0,2 g Coomassie G250.

Die Gradientengele wurden hergestellt, indem zuerst 3,75 mL des noch nicht polymerisierten 4 % Gels mit einer 10 mL-Pipette aufgenommen wurden. Danach wurden 3,75 mL des 10 % Gels mit der Pipette aufgenommen. Durch das Gel wurden mit der Pipette 4-5 Luftblasen gesaugt. Dadurch bildete sich in der Pipette ein Gradient zwischen beiden Komponenten aus. Das Gel wurde dann in die Gelapparatur pipettiert. Das Gel hatte eine Größe von 8 x 6 cm und eine Dicke von 1,5 mm. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde das Sammelgel hinzugefügt. Die 3 Gelkomponenten hatten die folgende Zusammensetzung:

4 %-Gel: 4% Acrylamid, 0,5 M Aminocaproinsäure, 50 mM BisTris, 0,04 % TEMED, 0,4 % APS

10 %-Gel: 10% Acrylamid, 0,5 M Aminocaproinsäure, 50 mM BisTris, 14,2 % (v/v) Glycerin, 0,04 % TEMED, 0,4 % APS

Sammelgel: 3,2 % Acrylamid, 0,5 M Aminocaproinsäure, 50 mM BisTris, 0,08 % TEMED, 0,8 % APS

3.15 Coomassie-Färbung

Die Proteinbanden der SDS-Gele konnten mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden: Färbung für 1-2 h in 50 mL 30 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,1 (w/v) % Coomassie G 250. Entfärbung für 2h + 12 h mit 2x 50 mL 30 % Methanol, 10 % Essigsäure. Schäggergele wurden auf folgende Weise behandelt: Fixieren mit 50 % Methanol, 10 % Essigsäure für 1 h. Färben mit 0,025 % Coomassie in 10 % Essigsäure für 2 h. Entfärben mit 10 % Essigsäure für 2 h + 12 h.

3.16 Western-Blot

Nachweis von SCAP und Insig:

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine bei Raumtemperatur auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences, UK).

Es wurden folgende Antikörper verwendet:

IgG-9D5 (5 µg/µL). Monoklonaler Maus-Antikörper gegen Hamster-SCAP (Sakai et al., 1997).

IgG-9E10 (5µg/µL). Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das Myc-Epitop (Yang et al. 2002).

IgG-HSV-Tag (1:15000, Novagen). Zum Nachweis des HSV-SCAP.

Anti-Flag-M2 (Sigma). Zum Nachweis des in Insektenzellen überexprimierten SCAP-TM1-8. Als Zweitantikörper wurde in allen Fällen ein Anti-Maus-IgG-Antikörper (1:2000, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) verwendet, an den Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Die Blotmembranen wurden typischerweise für 1 h in PBS-Tween mit 5 % (w/v) Milchpulver („Instant Nonfat Dry Milk“, Nestle USA, Inc. Solon, Ohio 44139, USA) und 10 % FCS (Bio Whittaker, Walkersville, Maryland, USA) mit dem Erstantikörper inkubiert, danach für 3 x 10 min mit PBS-Tween gewaschen, für 30 min mit dem Zweitantikörper inkubiert und für weitere 3 x 10 min gewaschen.

Die gebundenen Antikörper wurden per Chemilumineszenz nachgewiesen (ECL System: SuperSignal West Pico Stable Peroxide Solution, Pierce, Rockford, IL 6105 USA, und SuperSignal West Pico Luminol Enhancer Solution).

Für die Detektion der Chemilumineszenz wurde folgender Film verwendet: X-OMAT Blue XB-1, Kodak (Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y. 14650 - distributed by Perkin Elmer Life Sciences, Cat NEF596) oder F-BX810, Phenix Research Products, 3540 Arden Road, Hayward, California 94545.

Für die Detektion des Oxytocinrezeptors mit GFP-Tag wurde ein Maus-Anti-GFP Antikörper (Roche, Cat. No 1814460) verwendet. Dieser Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 (in 5 % Milchpulver/TBS-Tween) für 1 h bei RT (oder ON bei 4° C) mit der Blotmembran inkubiert.

Für die Detektion des Oxytocinrezeptors mit His-Tag sowie für das StAR- und das MLN64-Protein wurde ein Anti-His-Antikörper (Qiagen) verwendet. Der Anti-His-Antikörper wurde in der Verdünnung 1:2000 (in 5 % Milchpulver/TBS-Tween) für 30 min bei RT mit der Blotmembran inkubiert. Als Zweitantikörper wurde ein Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Goat-Anti-Maus-IgG-POD-Antikörper eingesetzt (PerkinElmer, Cat. No. NEF822). Der Zweitantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2000 (in 5 % Milchpulver/TBS-Tween) für 30 min bei RT mit der Blotmembran inkubiert. Bei den Experimenten mit dem OTR, mit StA R und MLN64 wurde die Blotmembran nach der Inkubation mit dem Antikörper jeweils für 3x10 min mit TBS/Tween gewaschen. Die Entwicklung der Blots erfolgte mit dem ECL-System.

3.17 Immunpräzipitierung

Bei der Immunpräzipitierung des Oxytocinrezeptors wurden eine Schale HEK-OTR-GFP-Zellen (und zur Kontrolle 1 Schale untransfizierte HEK-Zellen) mit 1 mL OTR-Lysispuffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 % (w/v) Deoxycholat, 0,1 % SDS, 1 % (w/v) Nonidet P40) suspendiert. Die Suspension wurde mit Ultraschall behandelt (3 x 2 s, auf Eis). Das Zelllysat wurde mit 30 μ L IgG-Agarose (Sigma) präinkubiert. Anschließend wurde das Lysat mit weiteren 30 μ L IgG-Agarose und 12,5 μ L Anti-GFP-Antikörper (= 5 μ g) über Nacht bei 4°C inkubiert (IgG-Agarose und Anti-GFP-Antikörper waren zuvor für 3 h zusammen inkubiert und danach 4 x mit Lysispuffer gewaschen worden). Danach wurde das Lysat 4 x mit 1 mL OTR-Lysispuffer gewaschen. Das Pellet wurde mit 100 μ L Probenauftragspuffer für 5 min bei 95°C inkubiert, um die Rezeptoren von der Agarosematrix zu eluieren. 20 μ L des Eluats wurden auf ein 10 % SDS Gel aufgetragen. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurden die OT-Rezeptoren mit einem Maus-Anti-GFP Antikörper und dann mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Anti-Maus-IgG Antikörper detektiert. Der Blot wurde mit dem ECL System entwickelt. Als Positivkontrolle wurden 500 ng reines GFP Protein auf eine Spur des Gels aufgetragen (Bande bei 27 kDa und Dimer bei 54 kDa).

3.18 Reinigung des Oxytocinrezeptors mittels WGA-Agarose

Da der Oxytocinrezeptor glykosyliert ist, kann er an Weizenkeim-Agglutinin-Agarose binden (Wheat Germ Agglutinin, WGA). Das WGA hat die Fähigkeit, mit dem Zuckerrest N-Acetyl- β -D-Glucosamin zu interagieren. Rezeptorhaltige Membranen wurden mit Solubilisierungspuffer resuspendiert (0,8 % (w/v) CHAPSO, 20 mM HEPES (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 10 % (w/v) Glycerin, 0,1 mM Cholesterin/M β CD). Die Proteinkonzentration wurde auf 5 mg/mL eingestellt. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und danach für eine Stunde mit 100000 g bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde 1:8 verdünnt. Verwendet wurde dazu der oben beschriebene Puffer, der dieses Mal jedoch kein CHAPSO enthielt. Die Konzentration an CHAPSO betrug also nur noch 0,1 % und lag damit unter der kritischen Micellenkonzentration von CHAPSO. Von dem verdünnten Solubilisat wurden ein kleiner Teil Referenz aufbewahrt, der Rest wurde auf die Säule gegeben und über Nacht mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe in einer Säule über die WGA-Agarose zirkulieren gelassen (bei 4°C). Am nächsten Tag wurde die Säule mit N-Acetyl- β -D-Glucosamin (0,6 M) eluiert. Das Eluat wurde in 500 μ L-Fractionen aufgefangen. Mit dem

verdünnten Solubilisat und mit den Fraktionen wurden Radioligandenbindungstests durchgeführt.

3.19 Isolierung von SCAP-TM1-6 mit Anti-Flag-Affinitätsmatrix und Calmodulin Affinitätsmatrix

Um für die Analyse per Massenspektrometrie ausreichende Mengen an SCAP und dem mit dem Azocholestanol markiertem SCAP zu gewinnen, wurde das Protein in zwei Schritten aus HEK-Zellen isoliert und aufgereinigt. Gearbeitet wurde nach einem ähnlichen Protokoll wie von Yang et al. (2002) beschrieben. Aus HEK-Zellen wurden Membranen präpariert. Die HEK-Zellen exprimierten stabil ein SCAP-Konstrukt, das die ersten 6 Transmembrandomänen (Aminosäuren 1-448) vom Hamster-SCAP umfasste (SCAP-TM1-6). Dieses SCAP-Konstrukt enthielt außerdem ein Calmodulin-Bindeprotein-Tag, ein FLAG-Epitop und 3 Tandemkopien des Myc-Epitops. Die Membranen wurden mit dem Detergens Fos13 solubilisiert (Tridecyl-phosphocholin, Anatrace, Inc.). Der SCAP-Solubilisierungspuffer hatte folgende Zusammensetzung: 1 % Fos13 (w/v), 150 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7,4), Proteaseinhibitoren: 25 µg/mL N-acetyl-leucinal-norleucinal, 1 µg/mL, 1 µg/mL Pepstatin, 2 µg/mL Aprotinin, 10 µg/mL Leupeptin, 200 µM PMSF. Jeweils 1 mg Membranen wurden mit 100 µL dieses Puffers solubilisiert (durch 50 x Pipettieren). Danach wurde das Fos13 auf 0,1 % verdünnt. Verwendet wurden 900 µL des oben beschriebenen Puffers, der dieses Mal jedoch kein Detergens enthielt. Die Suspension wurde zentrifugiert (15 min, 20800 g, 4° C). Der Überstand wurde mit Anti-Flag-Affinitätsmatrix (Sigma, Produkt No. A2220) inkubiert. Zuvor wurden jeweils 60 µL der Matrix 2 x mit dem Puffer (mit 0,1 % Fos13) gewaschen (10 min invertierend bei 4° C mit je 1 mL Puffer inkubiert, dann für 1 min mit 1000 g bei 4° C abzentrifugiert). Die Matrix wurde für 4-12 h bei 4° C invertierend mit dem Solubilisat inkubiert. Danach wurde die Matrix 5 x mit dem Puffer (0,1 % Fos13) gewaschen. Das Protein wurde durch Zugabe des Flag-Peptids (Sigma, Product No. F3290) von der Matrix eluiert. Dazu wurde die Matrix mit 100 µL Puffer (1 % Fos13, 0,25 µg/µL Flag-Peptid) für 1 h unter Schütteln bei 4° C inkubiert. Im zweiten Reinigungsschritt wurde das Eluat mit Calmodulin-Affinitätsmatrix (Stratagene) inkubiert. Sind Ca^{2+} -Ionen im Puffer vorhanden, dann bindet das Calmodulin-Bindeprotein-Tag des SCAP an die Calmodulin-Affinitätsmatrix. Mit einem EGTA-haltigem Puffer kann das Protein von der Matrix eluiert werden. Jeweils 25 µL der Calmodulin-Affinitätsmatrix wurden zuvor 2x mit je 100 µL des folgenden Puffers gewaschen: 2 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH

7,4), 0,1 % Fos13, Proteaseinhibitoren. Jeweils 90 μ L Eluat der Anti-Flag-Affinitätsmatrix + 10 μ L 20 mM CaCl_2 (in 2 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7,4), 0,1 % Fos13, Proteaseinhibitoren) wurden mit der Calmodulin-Affinitätsmatrix für 4-12 h inkubiert (bei 4° C, unter Schütteln). Danach wurde die Matrix 3x mit 100 μ L des Puffers (mit 2 mM CaCl_2) gewaschen. Das Protein wurde mit folgendem Puffer von der Calmodulin-Affinitätsmatrix eluiert: 2 mM EGTA, 1% Fos13, 300 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7,4). Die Matrix wurde dazu mit 100 μ L dieses Puffers für 2 h bei 4° C unter Schütteln inkubiert. Wurden größere Mengen an Membranen eingesetzt, dann wurde mit größeren Volumina und größeren Mengen an Matrix gearbeitet. Bei einigen Versuchen wurden bis zu 80 mg Membranen eingesetzt. SCAP ließ sich auf diese Weise relativ rein im Mikrogramm-Maßstab gewinnen. Die SCAP-Bande war bei Coomassie-Färbung im Gel sichtbar. Es war daher möglich, SCAP und das markierte SCAP aus einem SDS-Gel auszuschneiden, einen im Gel-Trypsinverdau durchzuführen und die SCAP-Fragmente per Massenspektrometrie zu analysieren.

3.20 Fluoreszenzspektroskopie

Es wurde ein Fluoreszenzspektrometer der Firma Photon Technologies International, New Jersey (USA), verwendet. Die Messungen wurden bei 37° C durchgeführt. Die Probe befand sich dabei in einer Quarzküvette mit Rührfisch. Das Probenvolumen betrug 1 mL. Die fluoreszierenden Steroide wurden in Ethanol gelöst zu der Probe gegeben (10 μ L Steroid + 990 μ L Protein in Puffer).

3.21 Massenspektrometrie

Es wurde mit einem SELDI-TOF Massenspektrometer der Firma CIPHERGEN Biosystems GmbH, Göttingen gearbeitet. Für eine Messung wurden typischerweise 1 μ g Protein (das entspricht 0,26 nmol StAR oder 0,29 nmol MLN64) oder 1 μ g mit CNBR gespaltenes Protein auf den Proteinchip aufgetragen. Verwendet wurden H4-Chips (reversed Phase Chips mit relativ hydrophober Oberfläche und NP20-Proteinchips (normal phase). Außerdem kamen Chips zum Einsatz, die Ni-NTA-Gruppen an ihrer Oberfläche trugen und somit Proteine mit His-Tag besonders gut binden sollten. Als Energie absorbierende Matrix wurden Sinapinsäure (SPA) und α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) verwendet. SPA-Matrix wurde für die ungespaltenen Proteine verwendet. Die Matrixlösung wurde vor jeder Messung auf folgende Weise frisch angesetzt: 75 μ L Acetonitril und 75 μ L 1 % TFA in Wasser wurden

zu einem Aliquot SPA (CIPHERGEN) gegeben. Das Aliquot wurde für 5 min gevortext und für 1 min bei 20800 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verwendet. Der Spot auf dem Proteinchip wurde mit 4 μL 70 % Acetonitril gewaschen. Dann wurde 1 μL des Proteins (in 70 % Acetonitril) auf den Spot gegeben. Nachdem das Lösungsmittel verdunstet war, wurden 0,5 μL der Matrixlösung auf den Spot pipettiert. Durch mehrmaliges Pipettieren wurde die Matrixlösung mit der Proteinprobe vermischt. Nachdem das Lösungsmittel verdunstet war, wurden auf die gleiche Weise weitere 0,5 μL Matrix auf den Spot pipettiert. Nachdem das Lösungsmittel verdunstet war, wurde die Messung durchgeführt. Für die Untersuchung der Proteinfragmente wurde CHCA-Matrix verwendet. Die Matrixlösung wurde auf die folgende Weise angesetzt: Ein Aliquot CHCA (CIPHERGEN) wurde mit 100 μL Acetonitril und 100 μL 1 % TFA in Wasser versetzt, für 5 min gevortext und abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 50 μL abgenommen und mit 100 μL 1 % TFA in Wasser und 100 μL Acetonitril gemischt. Die so erhaltene 20 % CHCA-Lösung wurde auf die gleiche Weise für die Messung eingesetzt wie oben beschrieben.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Cholesterinbindungsstelle des StAR Proteins

Bei den hier durchgeführten Experimenten wurde ein fotoreaktives Cholesterinderivat verwendet, um eine Cholesterinbindungsstelle im StAR-Protein zu identifizieren. Dazu wurde das StAR-Protein mit dem tritiumhaltigen fotoreaktiven Cholesterin-Analogen radioaktiv markiert. Anschließend wurde es mit der Protease LysC enzymatisch oder mit Cyanbromid chemisch gespalten. Die dabei entstandenen Fragmente wurden per Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend in etwa 1 mm dicke Stücke geschnitten, und per Szintillationsmessung sollte bestimmt werden, welches Proteinfragment radioaktiv markiert war. Parallel dazu wurde das StAR Protein auch mit dem nichtradioaktiven Cholesterinderivat markiert, und nach Spaltung mit Cyanbromid wurden die Fragmente per Massenspektrometrie analysiert. Die Fotoaffinitätsmarkierungen wurden bei pH 7,4 und auch bei pH 3,0 durchgeführt, um die Molten-Globule-Hypothese zu testen. Ergänzt wurden die Fotoaffinitätsmarkierungen durch fluoreszenzspektroskopische Messungen, bei denen die fluoreszierenden Cholesterin-Analoga NBD-Cholesterin oder Dehydroergosterol eingesetzt wurden.

Das StAR-Protein konnte mit dem fotoreaktiven Cholesterinderivat radioaktiv markiert werden. Bei dem in Abbildung 33 gezeigten Experiment wurden zwei Proben mit jeweils der gleichen Konzentration an StAR-Protein und dem radioaktiven [³H]-Azocholestanol inkubiert. Die eine Probe wurde mit UV-Licht bestrahlt, die andere nicht. Die Proteine wurden mit Aceton gefällt und jeweils mittels eines Röhrenchengels nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Röhrenchengele wurden in Scheiben geschnitten, und diese wurden in Szintillator gegeben und auf ihre Radioaktivität vermessen. Bei der mit UV-Licht bestrahlten Probe war bei der dem StAR-Protein entsprechenden Masse (26 kDa) ein Radioaktivitätspeak zu sehen, bei der unbestrahlten Probe fehlte dieser Peak.

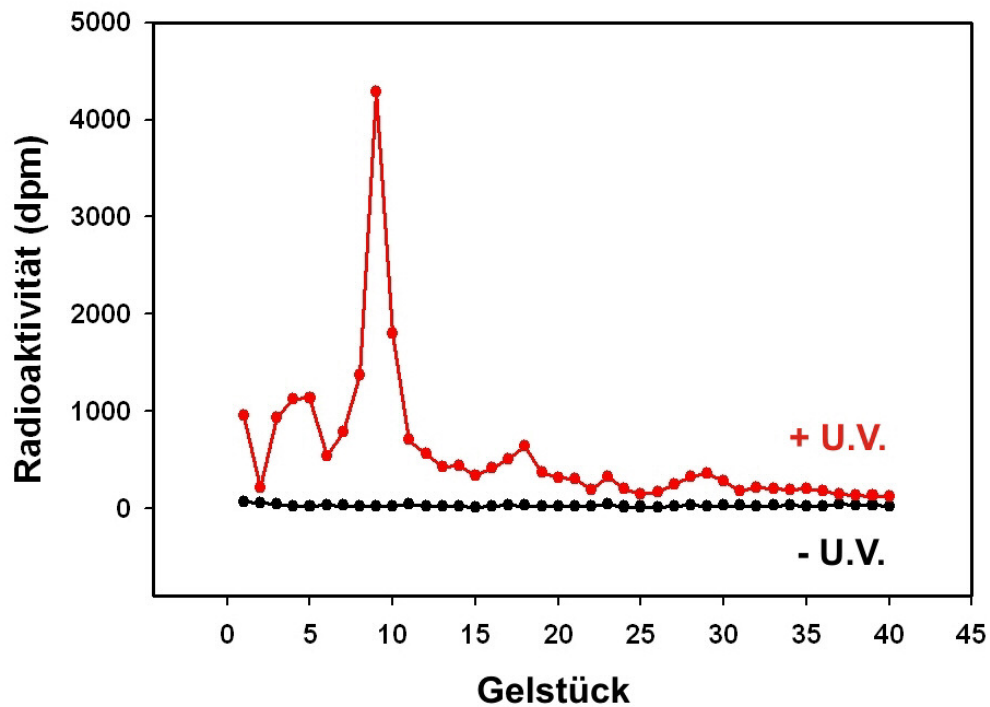


Abbildung 33: Fotoaffinitätsmarkierung des StAR-Proteins und Analyse per Röhrenchengel. Bei der mit UV-Licht bestrahlten Probe (rot) war in dem der Masse des StAR-Proteins entsprechenden Bereich des Gels ein Radioaktivitätsspeak zu sehen, der bei der unbestrahlten Probe (schwarz) fehlte.

Es wurde daraufhin untersucht, von welchen Faktoren die Fotoaffinitätsmarkierung abhängig ist. Um auszuschließen, dass das Azocholestanol unspezifisch an das StAR-Protein bindet, wurde die Fotoaffinitätsmarkierung auch mit hitzedenaturiertem StAR-Protein durchgeführt (Abb. 34). Die Fotoaffinitätsmarkierungen wurden außerdem auch bei pH 7,4 und bei pH 3,0 durchgeführt. Die Molten-Globule-Hypothese besagt ja, dass das StAR-Protein in teilweise entfaltetem Zustand vorliegen muss, um Cholesterin in die Mitochondrien transportieren zu können. Der teilweise entfaltete Zustand soll dadurch zustande kommen, dass in der näheren Umgebung der Mitochondrien ein erniedrigter pH-Wert herrscht, der durch den Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran verursacht wird.

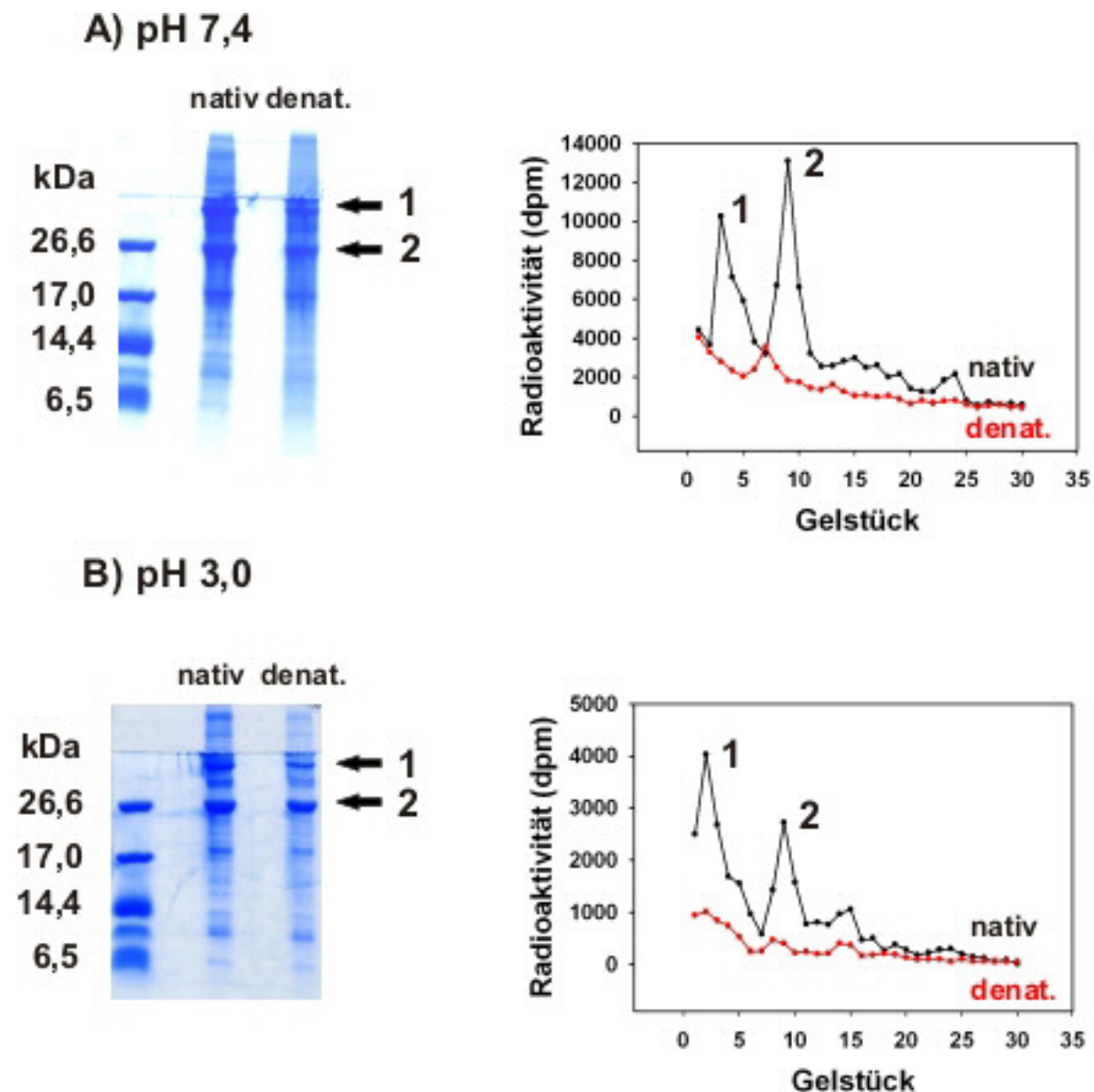


Abbildung 34: Einfluss von Hitzedenaturierung auf die Fotoaffinitätsmarkierung des StAR-Proteins. Die markierten Proteine wurden mit 10 % SDS-Gele aufgetrennt. Die Gele wurden mit Coomassie gefärbt, und die Trenngele wurden in 1 mm-Stücke geschnitten. Die mit 1 markierten Peaks entsprechen StAR-Dimeren, die mit 2 markierten dem StAR-Protein. Während das native StAR-Protein sowohl bei pH 7,4 (A) als auch bei pH 3,0 (B) mit dem fotoreaktiven Cholesterinanalogen radioaktiv markiert wird, findet bei dem hitzedenaturierten StAR-Protein keine Markierung statt. Markiert wurden jeweils 20 μg Protein in 100 μL Puffer. Die ^3H -Azocholestanol-Konzentration betrug jeweils 60 μM .

Diese Experimente zeigen, dass das StAR-Protein sowohl bei pH 7,4 als auch bei pH 3,0 mit dem [^3H]-Azocholestanol radioaktiv markiert wird. Die Menge des gebundenen Azocholestanols schien bei pH 3,0 geringer zu sein als bei pH 7,4. Das Radioaktivitätsmaximum des bei pH 7,4 markierten StAR-Proteins betrug 13096 dpm gegenüber 2727 dpm bei pH 3,0. Bei der Fällung des bei pH 3,0 markierten Proteins gingen

jedoch zirka 50 % des Materials verloren. Man kann daher davon ausgehen, dass bei diesem Experiment das StAR-Protein bei pH 7,4 etwa 2,5 x soviel [³H]-Azocholestanol gebunden hatte wie bei pH 3,0. Das hitzedenaturierte StAR-Protein wurde weder bei pH 7,4 noch bei pH 3,0 markiert. Um die Bindungsstelle des [³H]-Azocholestanols einzugrenzen, wurde das StAR-Protein mit Cyanbromid gespalten. Cyanbromid spaltet Proteine ausschließlich nach der Aminosäure Methionin. Durch die Cyanbromidspaltung wird das StAR-Protein in neun Fragmente zerlegt (Abb. 35).

Sequenz N62-StAR-C-His-6

	1	11	21	31	41	51	
1	LEETLYSDQE	LAYLQQGEEA	MQKALGILSN	QEGWKESQQ	DNGDKVMSKV	VPDVGKVFRL	60
61	EVVVDQPMER	LYEELVERME	AMGEWNPVVK	EIKVLQKIGK	DTFITHELAA	EAAGNLVGPR	120
121	DFVSVRCAKR	RGSTCVLAGM	DTDFGNMPEQ	KGVIRAEHGP	TCMVLHPLAG	SPSKTKLTWL	180
181	LSIDLKGWLP	KSIINQVLSQ	TQVDFANHLR	KRLESHPASE	ARCHHHHHH		

CNBr-Fragmente N62-StAR-C-His-6

MW (Da)	AA	Sequenz
7550	164-229	VLHPLAGSPSKTKLTWLLSI DLKGWLPKSHINQVLSQTQV DFANHLRKRLESHPASEARC HHHHHH
6232	83-140	GEWNPVKEIKVLQKIGKDT FITHELAAEAAGNLVGPRDF VSVRCAKRRGSTCVLAGM
2884	22-47	QKALGILSNQEGWKESQQD NGDKVM
2412	1-21	LEETLYSDQELAYLQQGEEA M
2293	48-68	SKVVPDVGKVFRLLEVVDQP M
1705	148-163	PEQKGVIRAEHGPTCM
1419	69-79	ERLYEELVERM
751	141-147	DTDFGNM
302	80-82	EAM

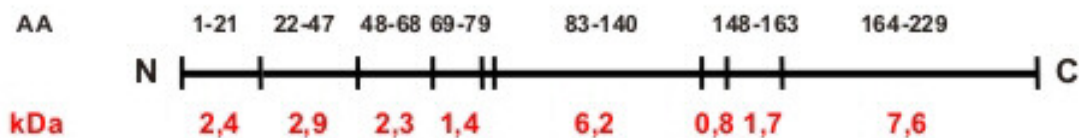


Abbildung 35: Sequenz des N62-C-His-StAR-Proteins und durch Cyanbromidspaltung entstehende Fragmente.

Die bei der Spaltung entstehenden Peptide können mit dem von Schägger et al. (1991) entwickeltem Gelsystem nach ihrer Masse aufgetrennt werden außer den beiden kleinsten – die Auflösung der Schäggergele reicht bis zu einer Masse von 1 kDa. Bei dem in Abbildung

36 gezeigten Experiment wurden 62,4 µg StAR-Protein mit [³H]-Azocholestanol bei pH 7,4 markiert.

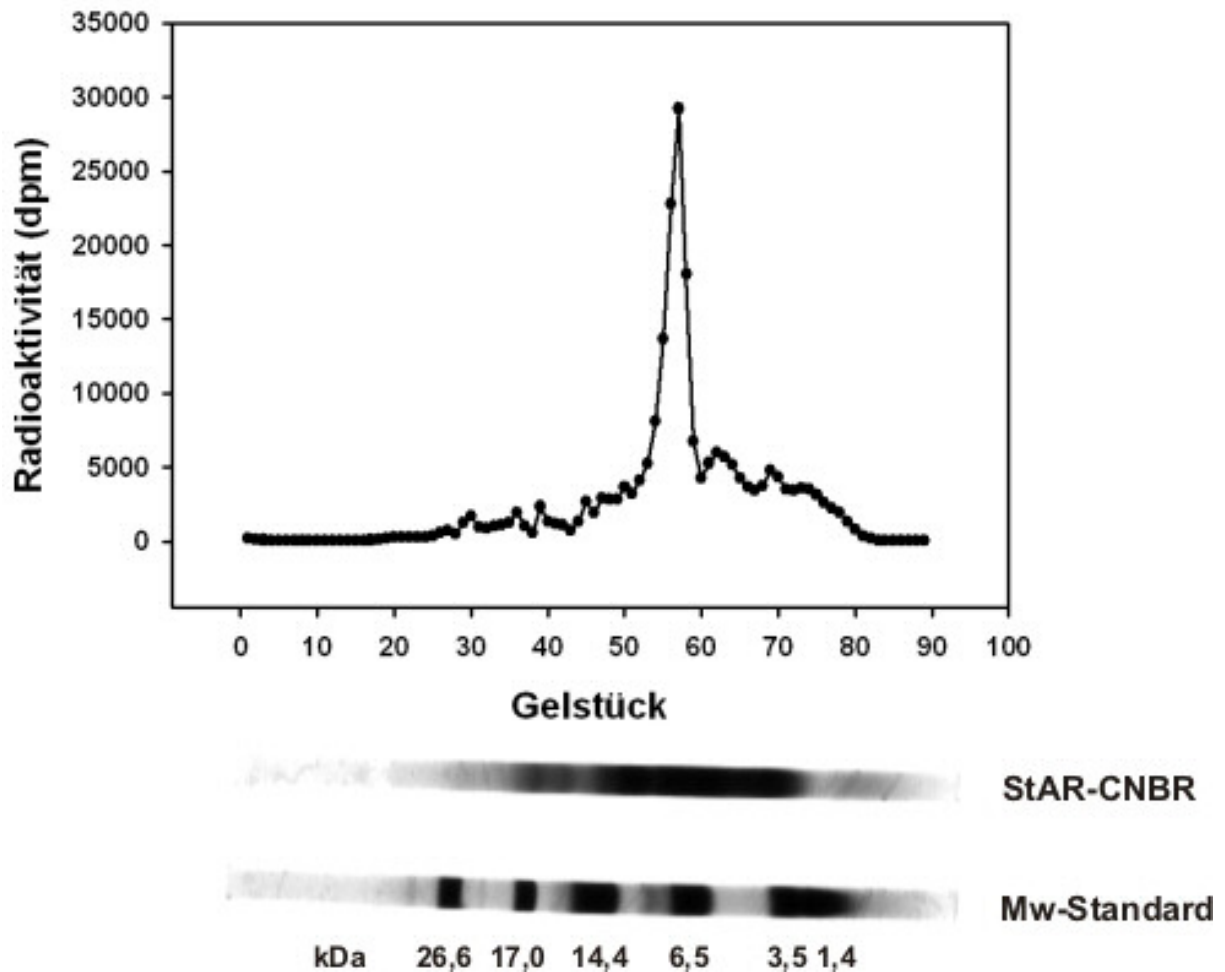


Abbildung 36: Fotoaffinitätsmarkierung von 62,4 µg StAR-Protein, Cyanbromidspaltung und Analyse der Proteinfragmente per Röhrgengel und Szintillationscount. Unter dem Szintillationscount ist das mit Coomassie gefärbte Röhrgengel mit der Probe zu sehen. Auf ein weiteres Röhrgengel wurde ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Da relativ viel CNBR- gespaltenes StAR-Protein aufgetragen wurde, sind die Fragmente nicht als einzelne Banden im Gel zu sehen. Die Szintillationsmessung zeigt jedoch, dass ein bestimmtes Fragment von ungefähr 6,5 kDa besonders stark radioaktiv markiert wurde.

Bei weiteren Experimenten zeigte sich, dass bei Spaltung des StAR-Proteins mit Cyanbromid ein charakteristisches aus vier Banden bestehendes Muster im Schäggergel zu sehen ist (siehe Abbildung 37). Bei dem in dieser Abbildung gezeigten Experiment wurden 20 µg markiertes StAR-Protein analysiert. Der Szintillationscount zeigt, dass die dritte Bande möglicherweise am stärksten markiert wird.

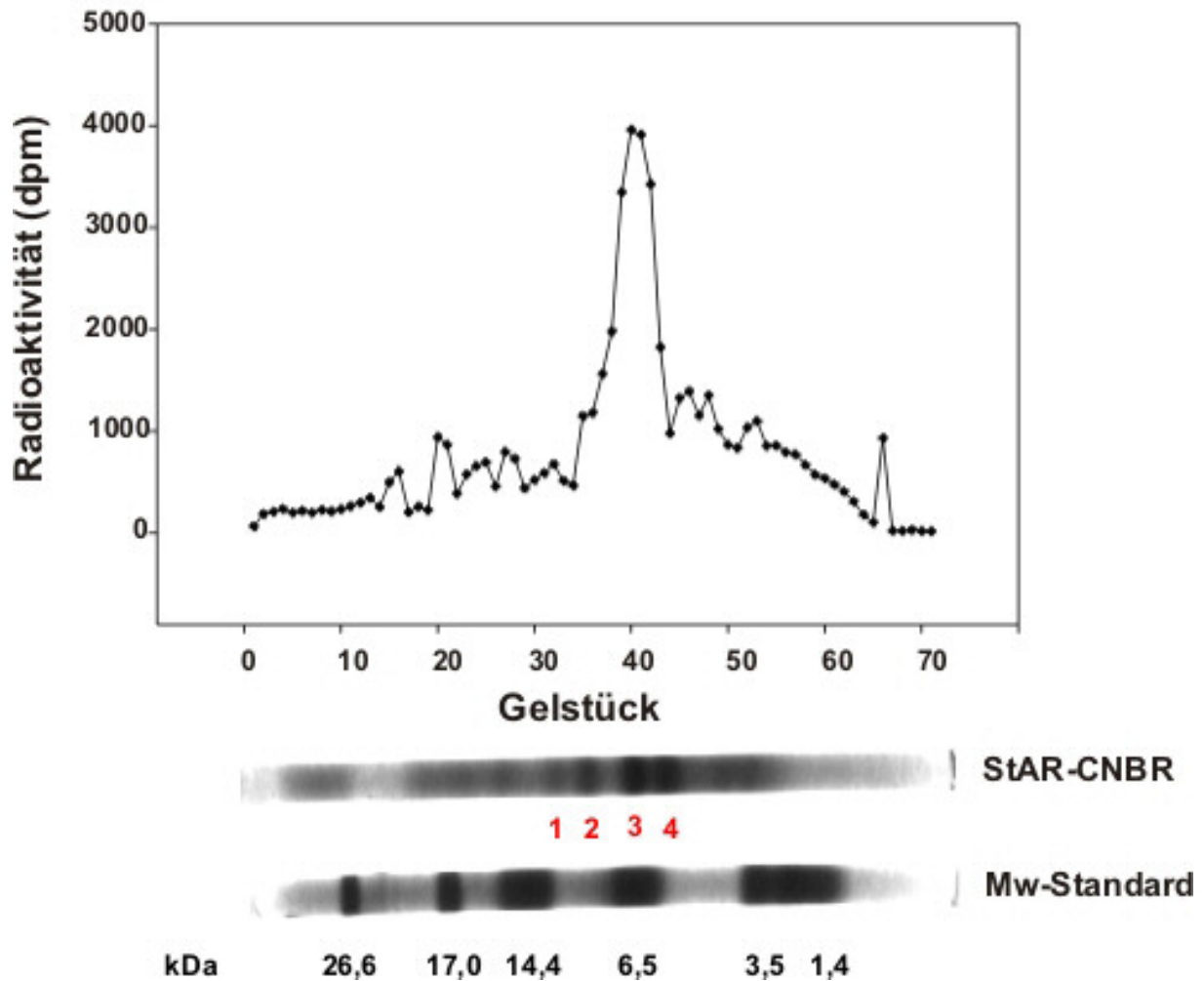


Abbildung 37: Fotoaffinitätsmarkierung von 20 µg des StAR-Proteins bei pH 7,4. Bei der Gelelektrophorese des mit Cyanbromid gespaltenen StAR-Proteins sind nach Coomassie-Färbung des Gels vier Banden besonders deutlich zu sehen. Bande Nummer 3 wird möglicherweise besonders stark markiert.

Um das Radioaktivitätsmaximum noch weiter einzugrenzen, wurde radioaktiv markiertes StAR-Protein auch mit Plattengelen aufgetrennt. Gegenüber den Röhrengelen hat dies den Vorteil, dass die mit Coomassie gefärbten Peptidbanden noch genauer den Radioaktivitätspeaks zugeordnet werden können. Bei dem in Abbildung 38 gezeigten Experiment wurden 20 µg markiertes StAR-Protein mit einem Schägger-Plattengel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, fotografiert, und das Trenngel wurde in 1 mm dicke Stücke geschnitten. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die dritte der vier Peptidbanden am stärksten radioaktiv markiert wird. Bei der markierten Bande könnte es sich um die bei Cyanbromidsplaltung theoretisch zu erwartende Bande von 6,2 kDa handeln. Dieses Fragment umfasst die Aminosäuren 83 bis 140 des StAR-Proteins.

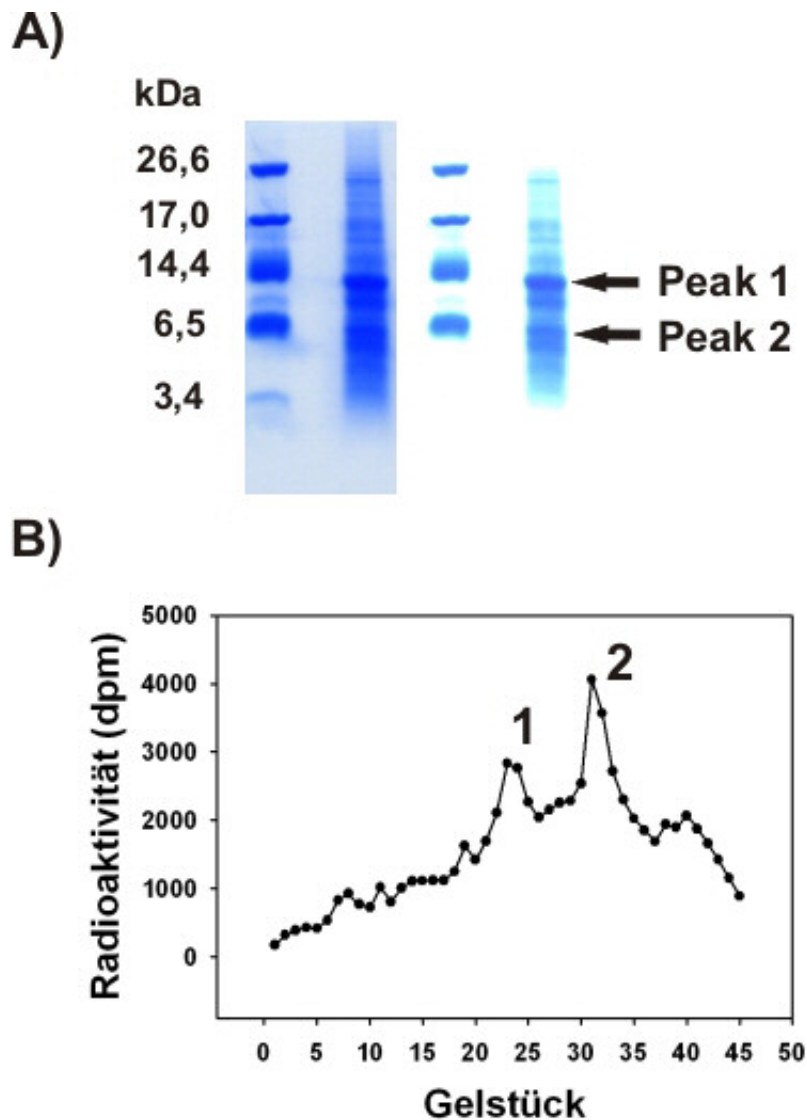


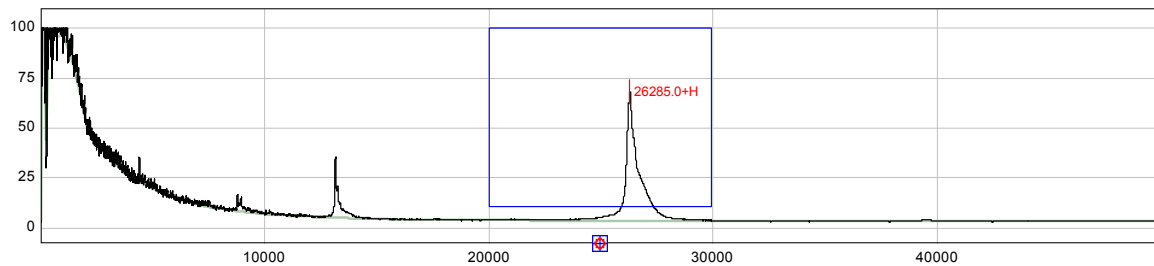
Abbildung 38: Fotoaffinitätsmarkierung des StAR-Proteins, Cyanbromidsplaltung, Auftrennung der Fragmente per Gelelektrophorese und Szintillationsmessung. Das mit dem radioaktiven Azocholestanol markierte StAR-Protein wurde mit einem Platten-Schäggel aufgetrennt. Abbildung A) zeigt das mit Coomassie gefärbte Gel. Das Gelfoto ist rechts ein zweites Mal mit verstärktem Kontrast abgebildet, um das Bandenmuster deutlicher zu zeigen. Das Gel wurde in 1 mm dicke Stücke geschnitten, die per Szintillationsmessung auf ihre Radioaktivität untersucht wurden (B). Das Maximum (2) entspricht der dritten Proteinfragmentbande von oben. Diese Bande läuft im Gel knapp unterhalb der 6,5 kDa-Bande des Molekulargewichtstandards.

Es kann ausgeschlossen werden, dass es sich um das C-terminale 7,6 kDa-Fragment handelt, das ebenfalls bei der Cyanbromidsplaltung entsteht, da das markierte Fragment im Gel unterhalb des 6,5 kDa-Proteins des Molekulargewichtstandards läuft. Das 7,6 kDa-Fragment scheint vielmehr der zweiten Bande von oben zu entsprechen. Der erste Peak entspricht einer Masse von etwa 13 kDa. Das Fragment könnte aus unvollständiger Spaltung des StAR-

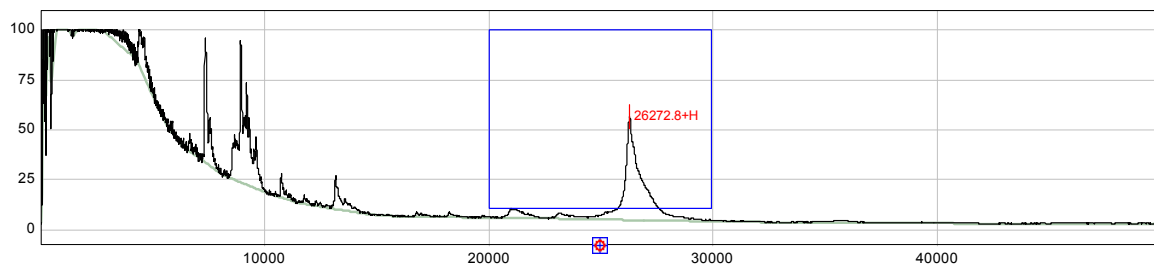
Proteins hervorgegangen sein. Es könnte das 6,2 kDa-Fragment zusammen mit einem N-terminalen Bereich des Proteins enthalten.

Die Fotoaffinitätsmarkierungen des StAR-Proteins wurden auch mit dem nichtradioaktiven Azocholestanol durchgeführt. Das markierte Protein (Abb. 39) wurde dann per Massenspektrometrie analysiert.

A) StAR-Protein, ungespalten



B) Mit Azocholestanol markiertes StAR-Protein, ungespalten



C) Per Massenspektrometrie analysierter Molekulargewichtsstandard

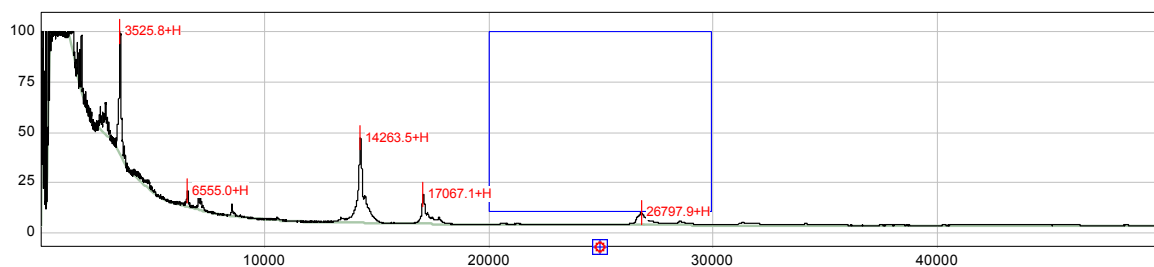
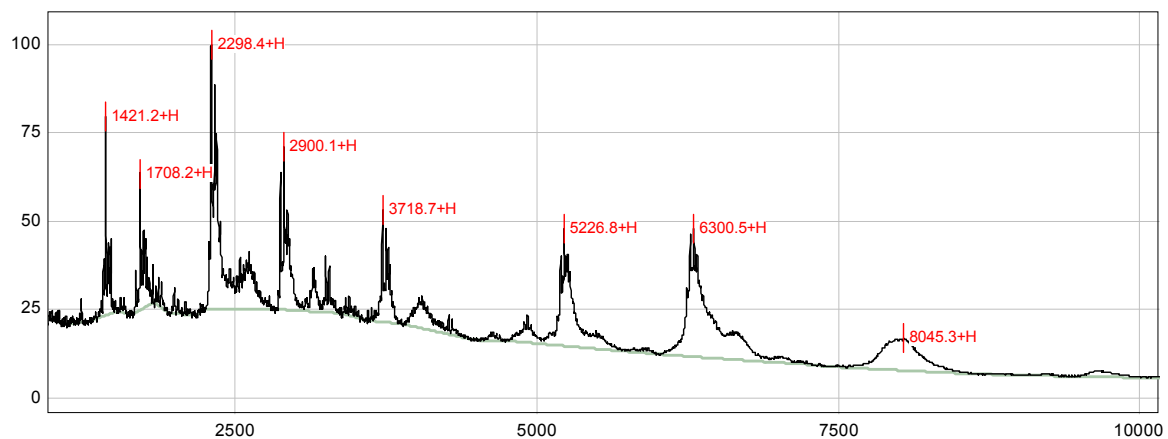


Abbildung 39: Fotoaffinitätsmarkierung des StAR-Proteins und Analyse per Massenspektrometrie. Abbildung A) zeigt das unmarkierte StAR-Protein (theoretisch erwartete Masse: 25795 Da). Der Proteinpeak ist bei 26286 Da zu sehen. B) zeigt das markierte StAR-Protein. Der Peak ist bei einer Masse von 26272 Da zu sehen. Bei C) ist zur Kontrolle der Molekulargewichtsstandard massenspektrometrisch vermessen worden. Peaks waren bei 26798, 17067, 14264, 6555 (schwach) und 3526 Da zu sehen. Theoretisch erwartet worden waren Massen von 26,6 kDa, 17,0 kDa, 14,4 kDa, 6,5 kDa und 3,5 kDa.

Mit der Massenspektrometrie war keine Markierung des StAR-Proteins nachweisbar. Bei der markierten Probe ist ein durch die Masse des Azocholestanols (385,7 Dalton, ohne

fotoreaktive Gruppe) entstandener Extrapeak zu erwarten, wenn das Protein mit einem Molekül des Cholesterinderivats markiert wird. Die Fotoaffinitätsmarkierung wurde mit einer Azocholestanol-Konzentration von 200 μM durchgeführt. Die Probe des unmarkierten StAR-Proteins wurde nicht mit Azocholestanol inkubiert. Für die Analyse per Massenspektrometrie wurde jeweils 1 μg Protein auf den Proteinchip aufgetragen. Die gemessenen Massen des StAR Proteins – 26286 Dalton unmarkiert und 26272 Dalton markiert – weichen von der theoretisch zu erwartenden Masse von 25795 Dalton ab. Es wurde daher noch 1 μL des Molekulargewichtsstandards vermessen. Auch hier waren bei den einzelnen Peaks Abweichungen von etwa 1 % zur theoretisch erwarteten Masse zu beobachten. Es wurden auch die Fragmente des mit Cyanbromid gespaltenen StAR-Proteins per Massenspektrometrie vermessen (Abb. 40).

A) StAR-Cyanbromid-Fragmente



B) Markiertes StAR-Protein, CNBR-Fragmente

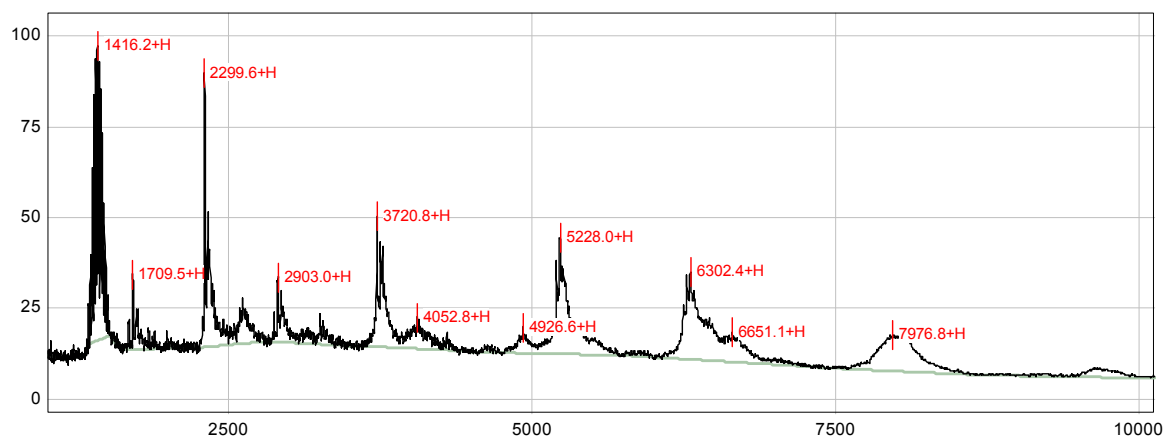
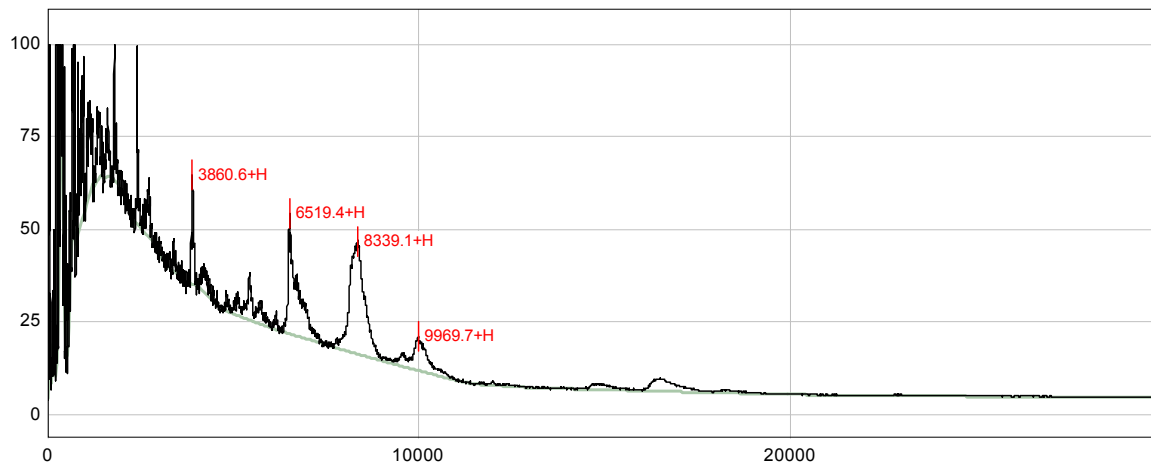


Abbildung 40: Massenspektrometrische Analyse des mit Cyanbromid gespaltenen StAR-Proteins Die in Abbildung A) gezeigte Probe wurde nicht mit Azocholestanol inkubiert. Die in Abbildung B) gezeigte Probe wurde bei einer Azocholestanol-Konzentration von 200 μM zehn Minuten mit UV-Licht bestrahlt. Auf den Proteinchip wurde jeweils 1 μg gespaltenes StAR-Protein aufgetragen.

Es konnte kein Unterschied zwischen dem Peakmuster des unmarkierten und des markierten StAR-Proteins beobachtet werden. Der bei 6301 Dalton (unmarkiertes Protein) bzw. 6302 Dalton (markiertes Protein) sichtbare Peak entspricht wahrscheinlich dem theoretisch zu erwartenden Fragment von 6232 Dalton, das die Aminosäuren 83-140 umfasst und bei der radioaktiven Fotoaffinitätsmarkierung wahrscheinlich am stärksten markiert wurde. Der bei einer Markierung dieses Fragments zu erwartende Extrapeak bei $6301 + 386 = 6687$ Dalton war jedoch nicht zu beobachten. Der bei 5227 Dalton (unmarkiert) und 5228 Dalton (markiert) sichtbare Peak entspricht eventuell einem aus unvollständiger Spaltung hervorgegangenen Fragment, das die Aminosäuren 1-47 umfasst. Die Peaks bei 3,7 kDa, 2,9 kDa, 2,3 kDa, 1,7 kDa und 1,4 kDa entsprechen Fragmenten aus dem N-terminalen Bereich des StAR-Proteins. Der im Bereich von 1,4 kDa sichtbare Peak ist bei der markierten Probe stärker ausgeprägt als bei der unmarkierten. Möglicherweise hängt dies damit zusammen, dass für die Markierung Azocholestanol-MBCD-Komplexe verwendet wurden. Das MBCD hat ein Molekulargewicht von 1310 Dalton. Ein weiterer, schwacher Peak bei 8045 Dalton (unmarkiert) bzw. 7977 Dalton (markiert) entspricht möglicherweise dem C-terminalen 7,6 kDa-Fragment.

Durch weitere Experimente wurde der carboxyterminale Bereich des StAR-Proteins genauer untersucht. Am C-Terminus des in Bakterien überexprimierten StAR-Proteins befindet sich ein 6xHis-Tag. Mit Hilfe spezieller Proteinchips, die Ni-NTA-Gruppen enthalten und somit spezifisch His-getagte Proteine binden, sollte ausschließlich das C-terminale 7,6 kDa-Cyanbromidfragment an den Proteinchip gebunden werden. Der Vergleich der unmarkierten mit der markierten Probe sollte Aussagen darüber ermöglichen, ob das C-terminale Fragment das Azocholestanol bindet (Abb. 41). An die verwendeten Proteinchips hatten allerdings mehrere Fragmente gebunden. Der bei 8339 Dalton (unmarkiert) bzw. 8314 Dalton (markiert) sichtbare Peak könnte eventuell durch das C-terminale Fragment verursacht worden sein, für das theoretisch eine Masse von 7,6 kDa zu erwarten wäre. Der ebenfalls sichtbare Peak bei einer Masse von 9970 Dalton (unmarkiert) bzw. 9975 Dalton (markiert) könnte dadurch erzeugt worden sein, dass ein aus unvollständiger Spaltung des StAR-Proteins Fragment entstanden ist, das die Aminosäuren 148-229 umfasst und theoretisch eine Masse von 9,3 kDa besitzen sollte. Der bei 6519 Dalton (unmarkiert) bzw. 6515 Dalton (markiert) sichtbare Peak wurde wahrscheinlich durch ein Fragment verursacht, das die Aminosäuren 80-140 beinhaltet.

A) StAR-CNBR (IMAC)



B) StAR-markiert-CNBR (IMAC)

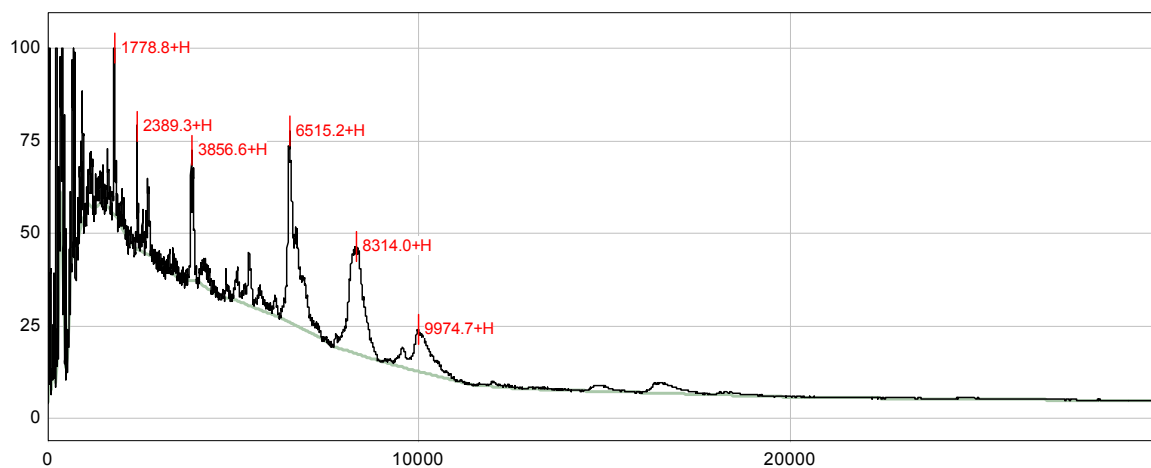


Abbildung 41: Massenspektrometrische Analyse des cyanbromidgespaltenen StAR-Proteins mit IMAC-Proteinchips. Die IMAC-Proteinchips enthalten Ni-NTA-Gruppen, die es ermöglichen, Proteine oder Peptide mit His-Tag spezifisch zu binden. Abbildung A) zeigt das gespaltene StAR-Protein mit vier Peaks bei 3861, 6519, 8339 und 9970 Dalton. B) zeigt das markierte und mit Cyanbromid gespaltene StAR-Protein mit Peaks bei 3857, 6515, 8314 und 9975 Dalton.

Grund dafür, dass Proteinfragmente auch unspezifisch an den Ni-NTA-Proteinchip gebunden hatten, war wahrscheinlich, dass das His-Tag durch die Behandlung mit Cyanbromid beschädigt wurde. Bestärkt wird diese Annahme durch später durchgeführte Experimente, bei denen das StAR-Protein oder die Cyanbromidfragmente des StAR-Proteins im Western-Blot mit einem His-Antikörper nachgewiesen werden sollten. Während beim StAR-Protein ein deutliches Signal zu sehen war, konnten keine Cyanbromidfragmente mittels Western-Blot nachgewiesen werden.

Zum Vergleich mit der Cyanbromidspaltung wurde das mit dem ^3H -Azocholestanol markierte StAR-Protein auch mit der Protease Lys-C behandelt, und die dabei entstandenen Fragmente wurden ebenso wie bei der Cyanbromidspaltung analysiert. Die Protease Lys-C spaltet Proteine nach der Aminosäure Lysin und zerlegt das StAR-Protein in insgesamt 18 Fragmente (Abb. 42).

LysC-Fragmente N62-StAR-C-His-6

MW	AA	Sequenz
4135	57-90	VFRLEVVDQPMERLYEELV ERMEAMGEWNPVK
3088	101-129	DTFITHELAAEAAGNLVGPR DFVSVRCAK
2716	1-23	LEETLYSDQELAYLQQGEEA MQK
2413	130-151	RRGSTCVLAGMDTDFGNMPE QK
2357	152-174	GVIRAEHGPTCMVLHPLAGS PSK
2311	192-211	SIINQVLSQTQVDFANHLRK
2178	212-229	RLESHPASEARCHHHHHHH
1316	24-35	ALGILSNQEGWK
1202	177-186	LTWLLSIDLK
1020	37-45	ESQQDNGDK
713	50-56	VVPDVGK
600	187-191	GWLPK
487	94-97	VLQK
464	46-49	VMSK
389	91-93	EIK
317	98-100	IGK
248	175-176	TK
147	36-36	K

Abbildung 42: Sequenz des StAR-Proteins und Fragmente bei Spaltung mit LysC.

Das Experiment in Abbildung 43 zeigt, dass ein etwa 4 kDa großes Fragment des StAR-Proteins besonders stark markiert wurde. Dies entspricht einem auch theoretisch erwarteten Fragment, das die Aminosäuren 57-90 umfasst und eine Masse von 4135 Dalton haben sollte. Dieses Fragment überschneidet sich mit dem besonders stark markierten 6,2 kDa-Fragment der Cyanbromidspaltung, das aus den Aminosäuren 83-140 gebildet wird.

Nachteilig bei der Spaltung mit Lys-C ist, dass relativ viele Fragmente entstehen. Da der Radioaktivitätspeak bei 4 kDa jedoch relativ schmal ist, besteht die Möglichkeit, dass tatsächlich nur das 4,1 kDa-Fragment markiert wurde. Wären auch einige der Fragmente mit den Massen von 2 - 3 kDa markiert worden, dann wäre der Peak wahrscheinlich breiter.

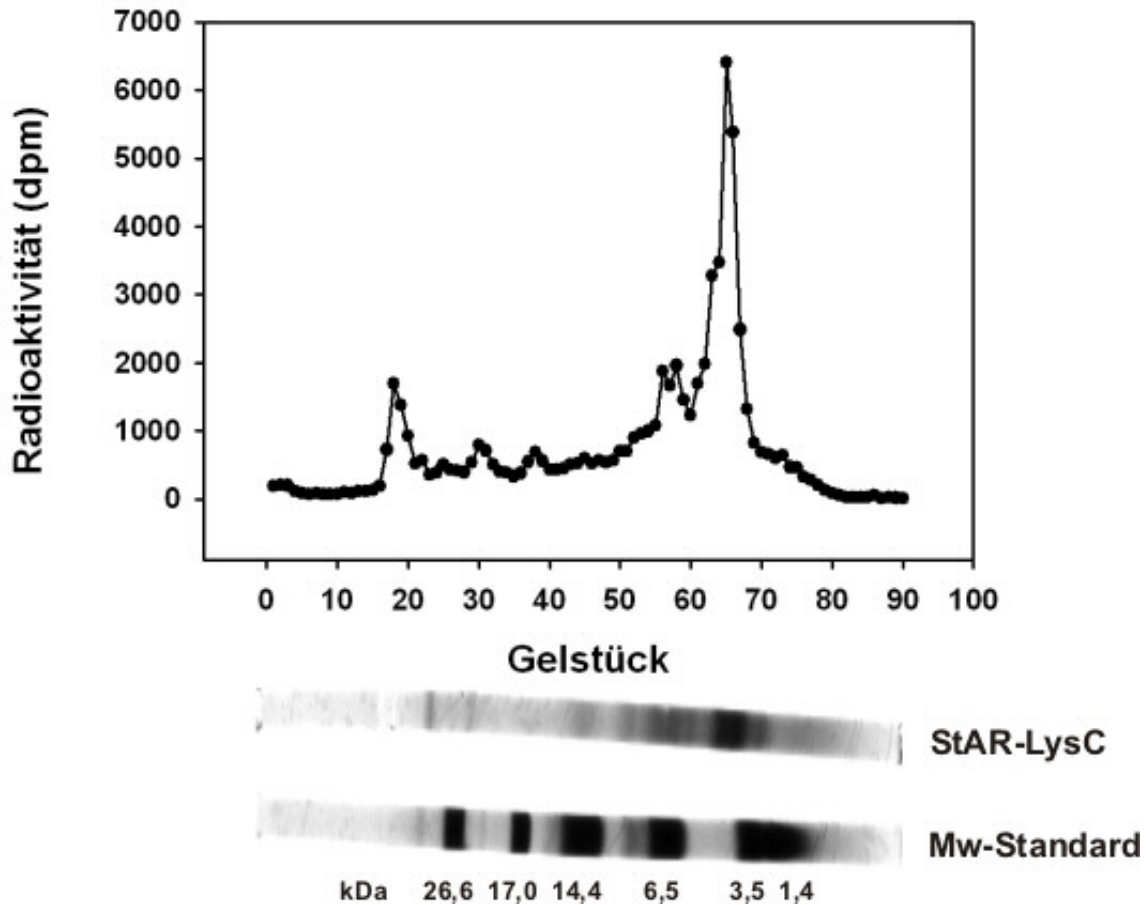


Abbildung 43: Fotoaffinitätsmarkierung von 20 μg StAR-Protein, enzymatische Spaltung mit der Protease LysC und Analyse der Proteinfragmente per Röhrchengel und Szintillationscount. 20 μg markiertes StAR-Protein wurden mit Lys-C enzymatisch gespalten. Dazu wurde das markierte Protein gefällt und mit 100 μL 25 mM Tris, pH 8,5, 1 mM EDTA resuspendiert. Es wurden 0,25 μg Lys-C in 2,5 μL desselben Puffers zugegeben, und die Probe wurde für 24 h bei 37°C geschüttelt. Die Fragmente wurden mit einem Schagger-Röhrchengel aufgetrennt. Die Fotografie des mit Coomassie gefärbten Gels ist unter dem Szintigramm abgebildet. Auf ein weiteres Röhrchengel wurde Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die Szintillationsmessung zeigt einen Peak bei etwa 4 kDa.

Abbildung 44 zeigt das Peakmuster der Cyanbromidfragmente im Vergleich zu den Lys-C-Fragmenten. Die Szintillationsmessung der Cyanbromidspaltung zeigte ein Radioaktivitätsmaximum bei etwa 6,5 kDa. Die Szintillationsmessung der Lys-C-Spaltung hatte ein Maximum bei etwa 4 kDa.

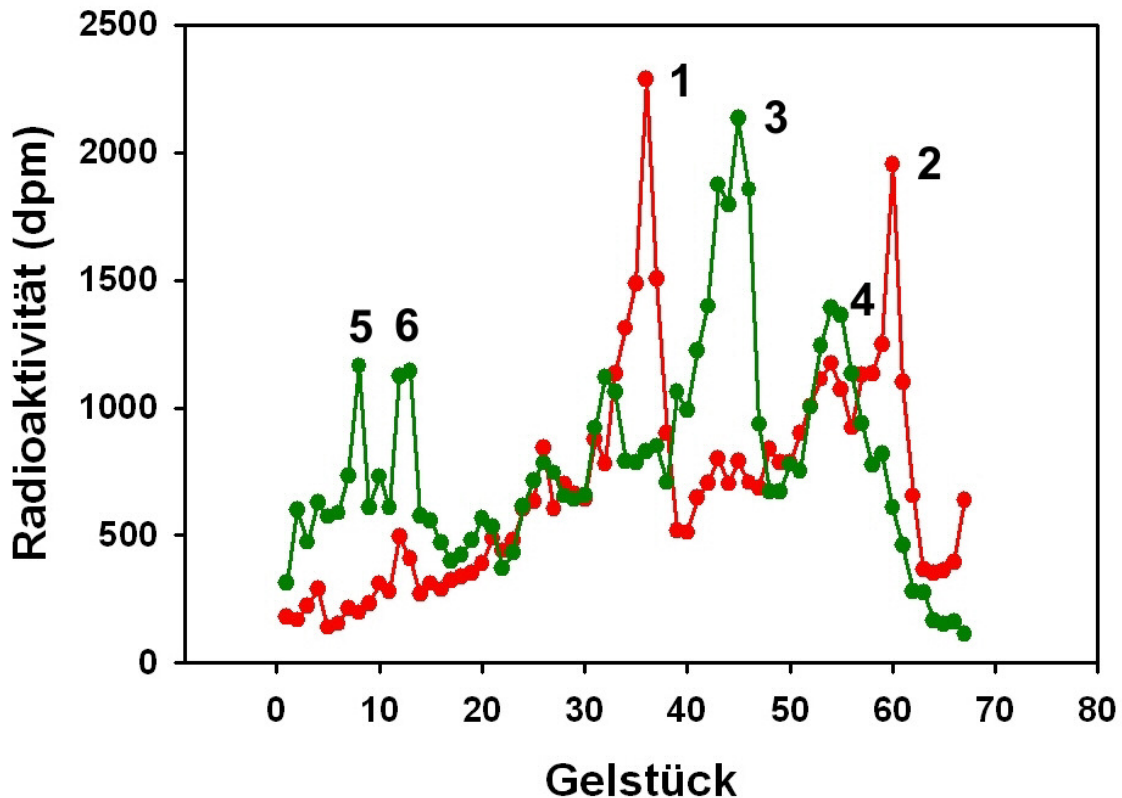
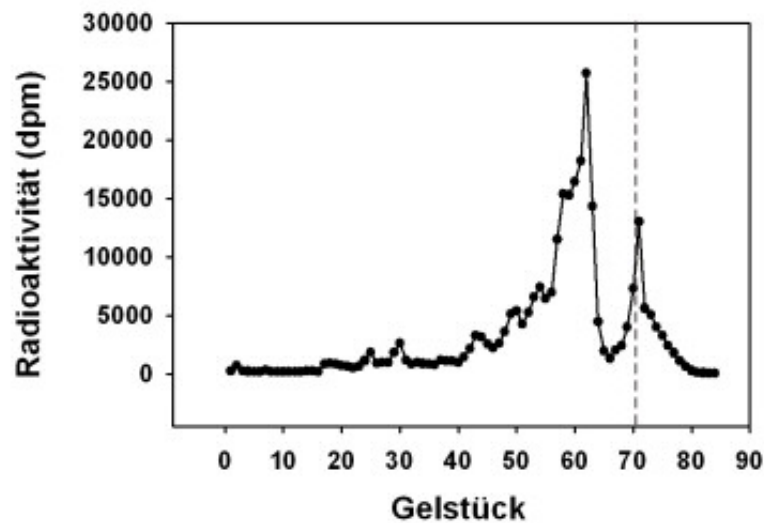


Abbildung 44: Unterschiedliche Fragmente des StAR-Proteins bei der Spaltung mit Lys-C oder Cyanbromid. Jeweils 20 µg StAR-Protein wurden mit final 50 µM des [^3H]-Azocholestanols markiert. Die Szintillationsmessung der Cyanbromidspaltung ist rot dargestellt. Das Radioaktivitätsmaximum lag bei 6,5 kDa (Peak Nr. 1). Die Szintillationsmessung der Lys-C-Spaltung ist grün dargestellt. Das Maximum lag hier bei 4 kDa (3). Bei der CNBR- und auch bei der Lys-C-Spaltung war jeweils ein kleinerer Nebenpeak zu sehen (CNBR: 2, LysC: 4), der durch die Lauffront des Gels verursacht wurde. Bei der Lys-C-Spaltung sind außerdem auch noch zwei kleine Peaks zu sehen, die durch ungespaltenes und unvollständig gespaltenes StAR-Protein verursacht wurden (5 und 6).

Um die Molten-Globule-Hypothese zu testen, wurde auch bei pH 3,0 mit [^3H]-Azocholestanol markiertes StAR-Protein mit der Protease Lys-C enzymatisch gespalten (Abb. 45). Bei dem StAR-Protein, das bei pH 3,0 markiert worden war, zeigte sich nach der enzymatischen Spaltung dasselbe Peakmuster wie bei der Probe, die bei pH 7,4 markiert worden war. Der Peak der bei pH 7,4 markierten Probe war mit 25663 dpm jedoch fast doppelt so groß wie der Peak des bei pH 3,0 markierten Proteins (13616). Das StAR-Protein (oder jedenfalls der 4 kDa große Bereich davon) wäre demnach bei pH 7,4 stärker markiert worden als bei pH 3,0.

A) pH 7,4



B) pH 3,0

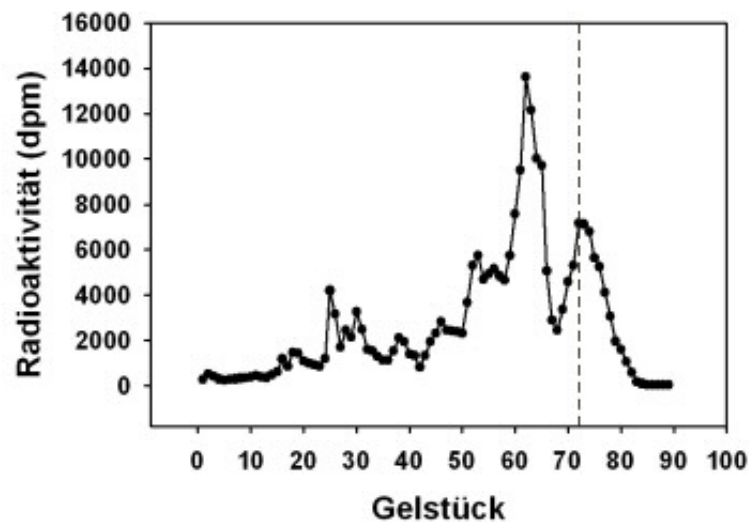


Abbildung 45: Fotoaffinitätsmarkierung des StAR-Proteins bei pH 7,4 (A) und bei pH 3,0 (B) und anschließende enzymatische Spaltung mit Lys-C. Das Peakmuster ist bei beiden Proben das gleiche. Markiert wurde in beiden Fällen ein etwa 4 kDa großes Fragment. Ein weiterer, kleinerer Peak wird jeweils durch die Lauffront des Gels verursacht. Die Lauffront ist jeweils durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die absoluten Maxima (25663 dpm bei pH 7,4 und 13616 dpm bei pH 3,0) unterscheiden sich.

Bei weiteren Experimenten wurde die StAR-A218V-Mutante untersucht. Diese Punktmutation macht das StAR-Protein inaktiv. Per Fotoaffinitätsmarkierung und Cyanbromidspaltung sollte untersucht werden, ob Mutante und natives Protein in gleichem Maße das fotoreaktive Cholesterinderivat binden und ob derselbe Bereich der Proteine markiert wird. Die Fotoaffinitätsmarkierungen wurden bei pH 7,4 und bei pH 3,0 durchgeführt (Abb. 46).

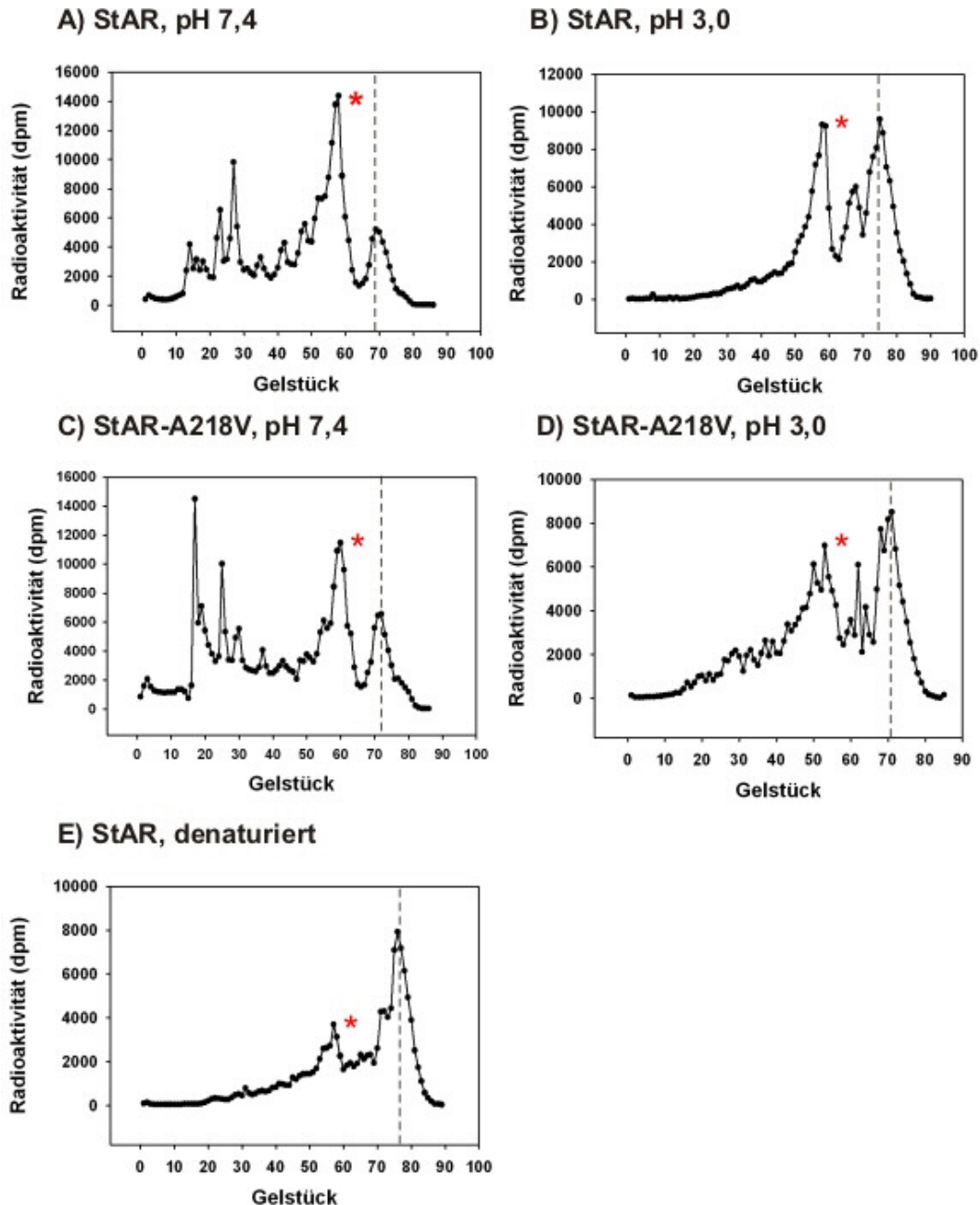


Abbildung 46: Fotoaffinitätsmarkierung des StAR-Proteins und der inaktiven StAR-A218V-Mutante bei pH 7,4 und bei pH 3,0, Cyanbromidspaltung und Analyse der Fragmente per Röhrgel. Markierungen wurden mit jeweils 20 μg Protein in einem 100 μL -Volumen mit einer $[^3\text{H}]$ -Azocholestanol-Konzentration von 50 μM durchgeführt. Zur Einstellung des pH-Werts des Dialysepuffers auf 3,0 wurde 100 mM Zitronensäure-KOH, pH 2,0 verwendet. Der dem 6,2 Kilodalton-Fragment entsprechende Peak ist jeweils mit einem roten Stern markiert. Die Lauffront ist jeweils durch eine gestrichelte Linie markiert. A) zeigt das bei pH 7,4 markierte StAR-Protein mit einem Radioaktivitätsmaximum des 6,2 kDa-Fragments von 14361 dpm. Der kleinere Peak im Bereich von Gelstück Nr. 70 wurde durch die Lauffront des Gels verursacht. B) zeigt die Markierung des StAR-Proteins bei pH 3,0. Das Maximum bei 6,2 kDa hatte eine Radioaktivität von 9227 dpm. C) zeigt die bei pH 7,4 markierte A218V-Mutante. Der 6,2 kDa-Peak hatte hier eine Radioaktivität von 11458 dpm. D) zeigt die bei pH 3,0 markierte StAR-Mutante. Das Maximum bei 6,2 kDa betrug 6976 dpm. E) zeigt die Markierung von hitzedenaturiertem StAR-Protein bei pH 7,4. Das Protein wurde vor der Bestrahlung mit UV-Licht für 5 min bei 95°C denaturiert. Der Peak bei 6,2 kDa hatte eine Radioaktivität von 3690 dpm.

Es zeigte sich, dass auch bei der A218V-StAR-Mutante das 6,2 kDa-Fragment am stärksten mit [³H]-Azocholestanol markiert wurde. Tabelle 1 zeigt die absoluten und relativen Markierungsraten des 6,2 kDa-Fragmentes unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

Protein	Markierung des 6,2 kDa-Fragments (dpm)	Relative Markierung des 6,2 kDa-Fragments (%)	Markierung total gesamtes Gel (dpm)	Relative Markierung gesamtes Gel (%)
StAR pH 7,4	14361	100	274149	100
A218V pH 7,4	11458	79,8	299265	109,2
StAR pH 3,0	9227	64,3	200606	73,2
A218V pH 3,0	6976	48,6	205456	74,9
StAR denaturiert	3690	25,7	129743	47,3

Tabelle 1: Radioaktive Markierung des StAR-Proteins und der StAR-A218V-Mutante bei pH 7,4 und bei pH 3,0.

Bei pH 7,4 wurde das 6,2 kDa-Fragment des StAR-Proteins demnach am stärksten markiert. Bei der A218V-Mutante war die Markierung dieses Fragments bei pH 7,4 um 20,2 % geringer. Beim StAR-Protein waren bei pH 3,0 im Vergleich zu pH 7,4 35,7 % weniger [³H]-Azocholestanol in das Fragment eingebaut worden. Beim StAR-Protein war die gesamte im Gel enthaltene Radioaktivität bei pH 3,0 gegenüber pH 7,4 um 26,8 % vermindert. Bei der Mutante war das Fragment bei pH 3,0 nur etwa halb so stark (48,6 %) markiert wie das Fragment des StAR-Wildtyps bei pH 7,4. Das Fragment des StAR-Proteins, das vor Zugabe des [³H]-Azocholestanols und der Bestrahlung mit UV-Licht durch Hitze denaturiert worden war, wies nur noch ein Viertel der Markierung des Fragments des nativen Proteins auf. Sowohl bei pH 7,4 als auch bei pH 3,0 war das 6,2 kDa-Fragment bei der A218V-Mutante weniger stark markiert worden als das 6,2 kDa-Fragment des StAR-Proteins. Bei pH 3,0 wurden die 6,2 kDa-Fragmente von StAR und StAR-Mutante weniger stark markiert als bei pH 7,4. Auffällig war, dass bei pH 3,0 (sowohl für Wildtyp als auch für die Mutante) und beim denaturierten Protein der Peak an der Lauffront des Gels deutlich stärker ausgeprägt war als bei pH 7,4. Die Lauffront des Gels enthielt Reste ungebundenen Azocholestanols und sehr kleine Proteinfragmente. Dieser Befund ist ein Hinweis darauf, dass bei pH 3,0 und beim denaturierten Protein das Azocholestanol auch unspezifisch an andere Bereiche des StAR-Proteins bindet.

Es wurde auch bestimmt, wie viele Azocholestanolmoleküle an das StAR-Protein binden (Tab. 2). Das Protein wurde nach der Markierung gefällt, und die Radioaktivität des Proteinpellets wurde gemessen. Auf das SDS-Gel wurde bei diesen Experimenten verzichtet.

Probe	UV-Bestrahlung	Radioaktivität des Pellets (20 µg Protein) (dpm)	Radioaktivität im Überstand nach der Proteinfällung (dpm)
StAR pH 7,4	-	17377	1551840
	+	25340	1543200
StAR pH 3,0	-	23734	1572480
	+	61576	1496160

Tabelle 2: Quantifizierung der Azocholestanolbindung an das StAR-Protein.

45 µg StAR-Protein in 450 µL Dialysepuffer wurden mit einer [³H]-Azocholestanol-Konzentration von final 50 µM für 20 Minuten vor Licht geschützt bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Ansatz wurde dann in zwei 200 µL-Aliquots aufgeteilt. Der eine wurde für 10 min bei 4°C mit UV-Licht bestrahlt, der andere wurde vor Licht geschützt bei 4°C inkubiert. Bei beiden Ansätzen wurden mit jeweils 1 mL -20°C-kaltem Aceton die Proteine gefällt. Die Proteinpellets wurden mit 50 µL 1% Triton-X-100 in Wasser resuspendiert und mit 4 mL Szintillationscocktail auf ihre Radioaktivität vermessen. Die Fotoaffinitätsmarkierung wurde auch bei pH 3,0 durchgeführt. Dazu wurde ein Puffer verwendet, der fast dieselbe Zusammensetzung hatte wie der Dialysepuffer, jedoch einen pH-Wert von 3,0 (329 µL H₂O/17,5 µL KCl [1 M]/5 µL KOH [1 M]/4,5 µL DTT [0,1 M]/21,5 µL StAR-Protein (45 µg)). Der pH Wert wurde mit [1 M] Zitronensäure-KOH (pH 2,0) auf 3,0 eingestellt und das Volumen mit Wasser auf 442,5 µL. Für die Fotoaffinitätsmarkierung wurden 7,5 µL ³H-Azocholestanol zugegeben. Das ³H-Azocholestanol hatte eine Konzentration von 3mM und war mit M₃BCD (40 mg/mL in Wasser) komplexiert. Es hatte eine spezifische Aktivität von 524.393 dpm/µL. Die Gesamtaktivität des [³H]-Azocholestanols je 200 µL-Probe betrug damit 1.747.977 dpm.

Die 20 µg Protein je Probe entsprachen einer Menge von 0,8 nmol StAR-Molekülen. Das Proteinpellet der bei pH 7,4 markierten Probe hatte netto (Differenz aus UV-bestrahlter Probe und unbestrahlter Probe) eine Aktivität von 7963 dpm. Diese Aktivität entsprach einer Menge von 0,046 nmol Azocholestanolmolekülen. Demnach hätten bei pH 7,4 5,7 % der StAR-Proteinmoleküle das fotoreaktive Cholesterinderivat kovalent gebunden. Bei dem bei pH 3,0 markierten StAR-Protein hatte das Pellet eine Aktivität von 37843 dpm. Dies entspricht 0,22 nmol [³H]-Azocholestanol. Demnach wären 27,1 % der StAR-Proteinmoleküle bei pH 3,0 mit dem Cholesterinanalogen markiert worden. Bei erniedrigtem pH-Wert würde das StAR-Protein demnach viermal soviel Azocholestanol binden wie bei pH 7,4. Dieser Befund widerspricht den Daten, die bei der Analyse des markierten Proteins oder Fragmenten davon

per SDS-Gel mit anschließender Szintillationsmessung der Gelstückchen gewonnen worden waren (bei pH 7,4 wurde das 6,2 kDa-Fragment des StAR-Proteins etwa 1,5 mal stärker radioaktiv markiert als bei pH 3,0).

Die Fotoaffinitätsmarkierungen mit [³H]-Azocholestanol wurden meistens bei einer finalen Konzentration des Steroids von 50 µM durchgeführt. Für eine gegebene Menge an StAR-Protein war ab einer Konzentration von 100 µM des Cholesterinanalogs keine weitere Steigerung der radioaktiven Markierung mehr zu erreichen (Abb. 47).

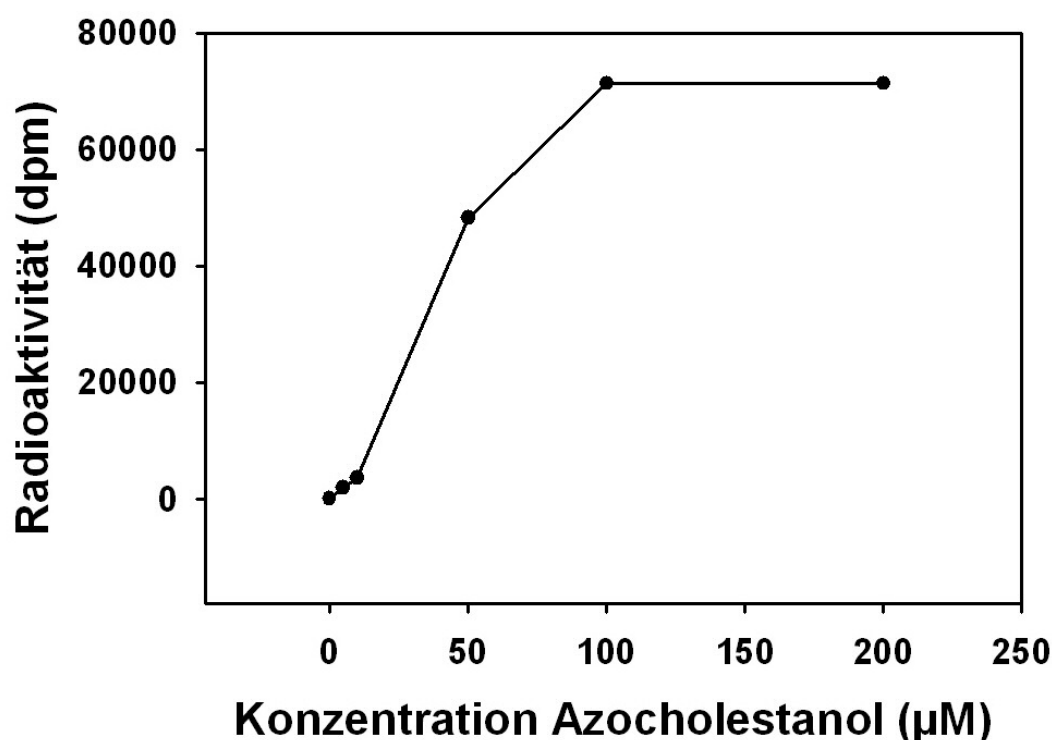


Abbildung 47: Fotoaffinitätsmarkierung von je 20 µg StAR-Protein bei steigender [³H]-Azocholestanol-Konzentration. Die Proteinkonzentration in der Probe betrug jeweils 4 µM. Die Proteine wurden gefällt und die Pellets auf ihre radioaktive Markierung vermessen. Jeweils 20 µg StAR-Protein wurde bei pH 7,4 in einem Volumen von 200 µL Dialysepuffer mit steigenden Konzentrationen des [³H]-Azocholestanols inkubiert. Bei einer Konzentration von 50 µM [³H]-Azocholestanol waren 68 % der maximalen Einbaurrate des Steroids erreicht.

Es wurde auch untersucht, ob sich die Fotoaffinitätsmarkierung des StAR-Proteins mit dem [³H]-Azocholestanol durch einen Überschuss von Cholesterin im Reaktionsansatz unterdrücken ließ (Abb. 48). Durch den Überschuss an Cholesterin ließ sich die Azocholestanolbindung an das StAR-Protein unterdrücken. Der Versuch wurde auch mit der A218V-Mutante durchgeführt und brachte die gleichen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

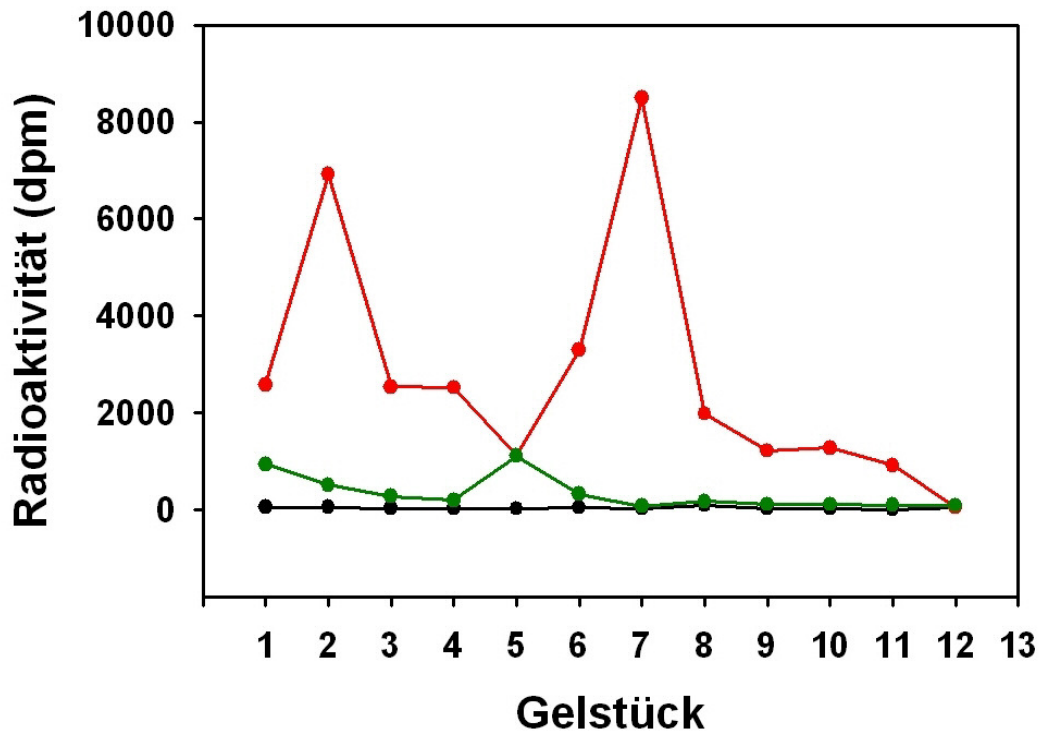


Abbildung 48: Verdrängung des fotoreaktiven Cholesterinderivats vom StAR-Protein durch Cholesterin. 20 µg Protein wurden in einem 200 µL-Ansatz mit einer Konzentration von 50 µM des fotoreaktiven Cholesterinanalogs für 20 Minuten inkubiert. Dann wurde Cholesterin zugegeben. Cholesterin war ebenso wie [³H]-Azocholestanol mit MβCD (40 mg/mL in Wasser) komplexiert und hatte eine Konzentration von 3 mM. Cholesterin lag final in einer Konzentration von 250 µM vor. Die Probe wurde für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit UV-Licht bestrahlt. Die Proteine wurden gefällt, mit einem 10 % SDS-Röhrchengel aufgetrennt und per Szintillationsmessung untersucht. Die ersten 25 mm des Röhrchengels wurden in 2 mm-Stücke geschnitten und per Szintillationsmessung analysiert. Die rot gezeichneten Messpunkte stammen von einer Probe mit dem markierten StAR-Protein. Der größere Peak (2) entspricht einer Masse des StAR-Proteins, der kleinere (1) links einem StAR-Dimer. Die grün gezeichneten Messpunkte entsprechen einer Probe, der ein 5 x Überschuss an Cholesterin zugesetzt worden war. Schwarz gezeichnet sind die Messpunkte einer Probe, bei der das StAR-Protein zwar mit dem [³H]-Azocholestanol (ohne Zugabe von Cholesterin) inkubiert worden war, nicht jedoch mit UV-Licht bestrahlt wurde.

Bei weiteren Experimenten wurde die Interaktion von Cholesterin mit dem StAR-Protein mittels fluoreszenzspektroskopischen Messungen untersucht. Für die fluoreszenzspektroskopischen Messungen wurde entweder NBD-Cholesterin oder Dehydroergosterol (DHE) verwendet. NBD-Cholesterin hat eine sehr ähnliche Struktur wie Cholesterin, besitzt jedoch dort, wo beim Cholesterin die hydrophobe Seitenkette sitzt eine aus zwei Ringen bestehende Gruppe, die bei 473 nm zur Fluoreszenz angeregt werden kann (Abb. 49). Dem Cholesterin noch ähnlicher ist das Dehydroergosterol. Es unterscheidet sich

vom Cholesterin nur durch das Vorhandensein von zwei zusätzlichen Doppelbindungen. Wegen dieser zusätzlichen Doppelbindungen kann es bei einer Wellenlänge von 324 nm zur Fluoreszenz angeregt werden.

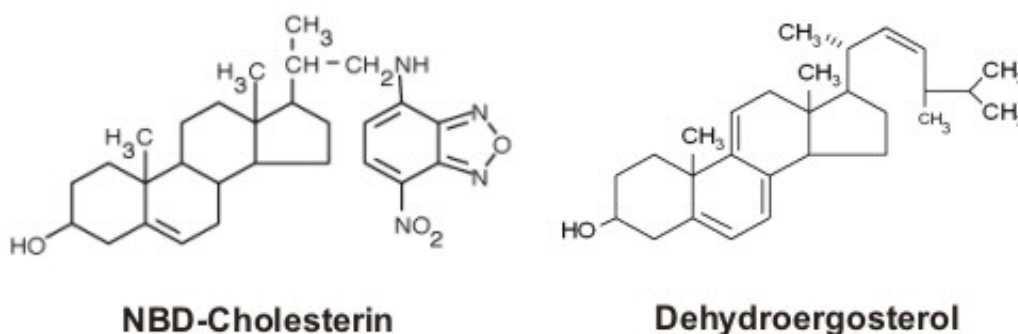


Abbildung 49: Struktur von NBD-Cholesterin (22-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-23,24-bisnor-5-cholen-3 β -ol) und von Dehydroergosterol (Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol).

Das StAR-Protein und die A218V-StAR-Mutante wurden jeweils bei pH 7,4 und bei pH 3,0 auf ihre Interaktion mit dem NBD-Cholesterin untersucht. Bei den Messungen zeigte sich, dass die Wechselwirkung zwischen StAR-Protein und NBD-Cholesterin bei pH 7,4 dreimal so groß war wie zwischen Mutante und NBD-Cholesterin bei pH 7,4. Bei pH 3,0 konnte für beide Proteine nur eine schwache Interaktion mit dem NBD-Cholesterin gemessen werden (Abb. 50).

Bei weiteren Experimenten wurde gemessen, wie sich die Fluoreszenzintensität bei gleich bleibender Konzentration von NBD-Cholesterin aber steigender Proteinkonzentration ändert. Die Messungen wurden ebenfalls mit dem StAR-Protein und der StAR-Mutante jeweils bei pH 7,4 und pH 3,0 durchgeführt (Abb. 51). Die Proben wurden bei 473 nm zur Fluoreszenz angeregt, und die Emission bei 540 nm wurde gemessen. Es zeigte sich auch hier, dass das StAR-Protein bei pH 7,4 stärker mit dem NBD-Cholesterin interagiert als die StAR-Mutante. Es wurde auch getestet, wie sich die Fluoreszenzintensität bei gleich bleibender Proteinkonzentration, aber steigenden Konzentrationen an NBD-Cholesterin verhält (Abb. 52). Bei einer Konzentration des StAR-Proteins von 0,5 μ M war ab einer Konzentration von 0,5 μ M des NBD-Cholesterins kein weiterer Anstieg der Fluoreszenzintensität mehr zu verzeichnen. Diese Messungen wurden bei pH 7,4 durchgeführt.

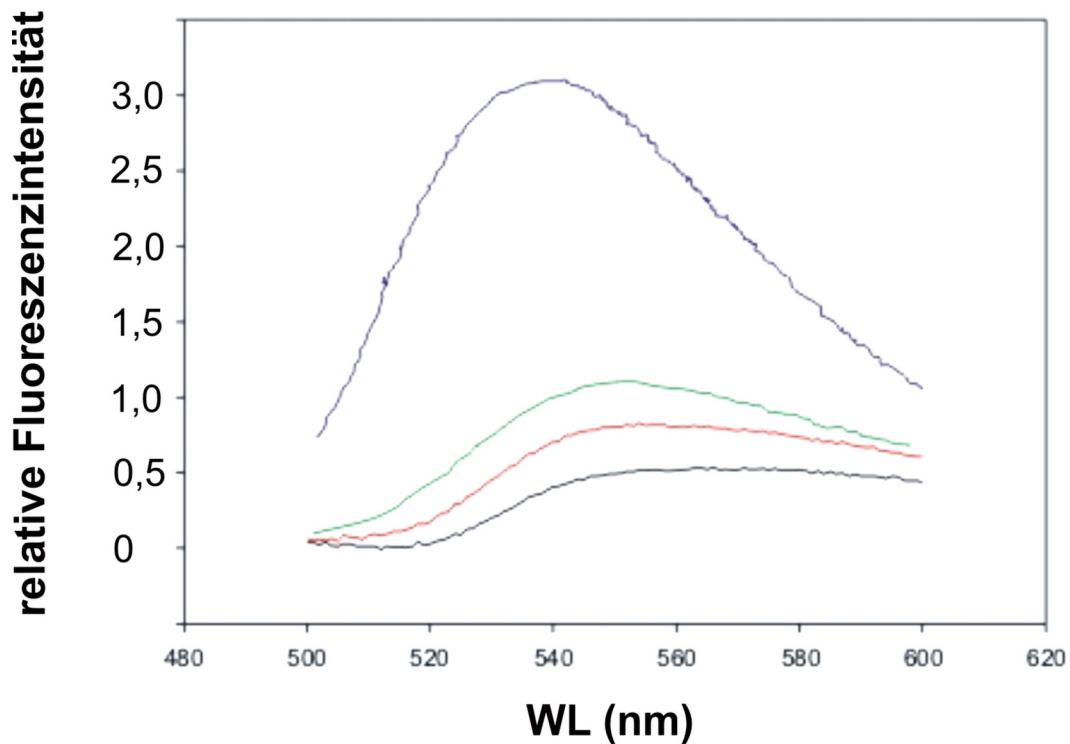


Abbildung 50: Interaktion des StAR-Proteins mit NBD-Cholesterin. Das Protein lag final in einer Konzentration von 4 μM vor. Zu 995 μL Protein wurden 5 μL NBD-Cholesterin in Ethanol zugegeben. Die Konzentration des NBD-Cholesterins betrug final 10 μM , die des Ethanols 0,5 %. Das Protein wurde mit dem fluoreszierenden Cholesterinderivat für zehn Minuten bei 37°C vor Licht geschützt inkubiert. Danach wurde ein Fluoreszenz-Emissionsspektrum aufgezeichnet. Die Probe wurde mit einer Wellenlänge von 473 nm zur Fluoreszenz angeregt, und die Emission im Bereich von 500-600 nm wurde aufgezeichnet. Bei allen Messungen wurde jeweils das Spektrum von NBD-Cholesterin im jeweiligen Puffer ohne das Protein subtrahiert. Das Spektrum des StAR-Protein bei pH 7,4 ist blau dargestellt, das Spektrum des StAR-Protein bei pH 3,0 schwarz, das Spektrum der A218V-Mutante bei pH 7,4 rot und bei pH 3,0 grün.

Dehydroergosterol hat gegenüber NBD-Cholesterin den Vorteil, dass an das Molekül keine fluoreszierende Gruppe angehängt ist, die die Interaktion mit Proteinmolekülen beeinflussen kann. Das DHE sollte sich also bei der Bindung an Proteine eher so verhalten wie das Cholesterin selbst. Das DHE wurde hier dazu verwendet, um die Interaktion des StAR-Proteins mit diesem Cholesterinderivat bei neutralem und saurem pH-Wert zu untersuchen. Es sollte so ausgeschlossen werden, dass die erniedrigte Fluoreszenzintensität, die bei der Interaktion des NBD-Cholesterins mit dem StAR-Protein bei pH 3,0 beobachtet wurde, ein Artefakt war. Denkbar wäre nämlich, dass die fluoreszierende Gruppe des NBD-Cholesterins bei niedrigem pH-Wert protoniert wird und dadurch das Cholesterinderivat nicht mehr an das StAR-Protein binden konnte.

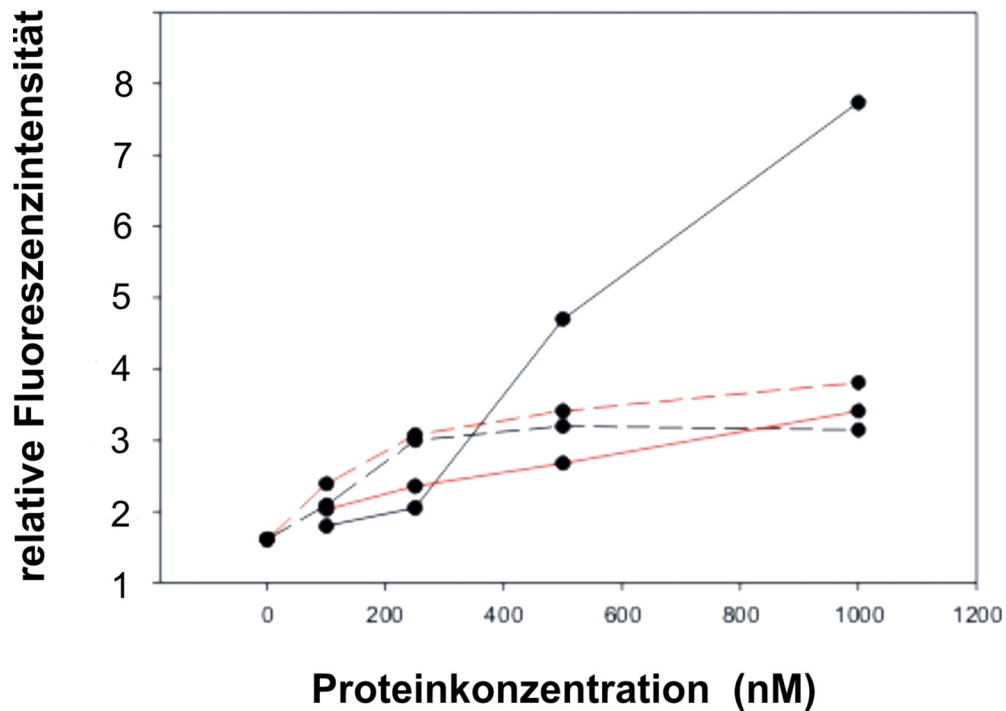


Abbildung 51: Die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration bei verschiedenen pH-Werten. Die Messungen wurden mit dem StAR-Protein bei pH 7,4 (schwarz) und bei pH 3,0 (schwarze gestrichelte Linie) sowie mit der StAR-Mutante bei pH 7,4 (rot) und pH 3,0 (rote gestrichelte Linie) durchgeführt. Die Konzentration des NBD-Cholesterins betrug jeweils 10 μM . Die Anregungswellenlänge war 473 nm. Gemessen wurde die Emission bei 540 nm.

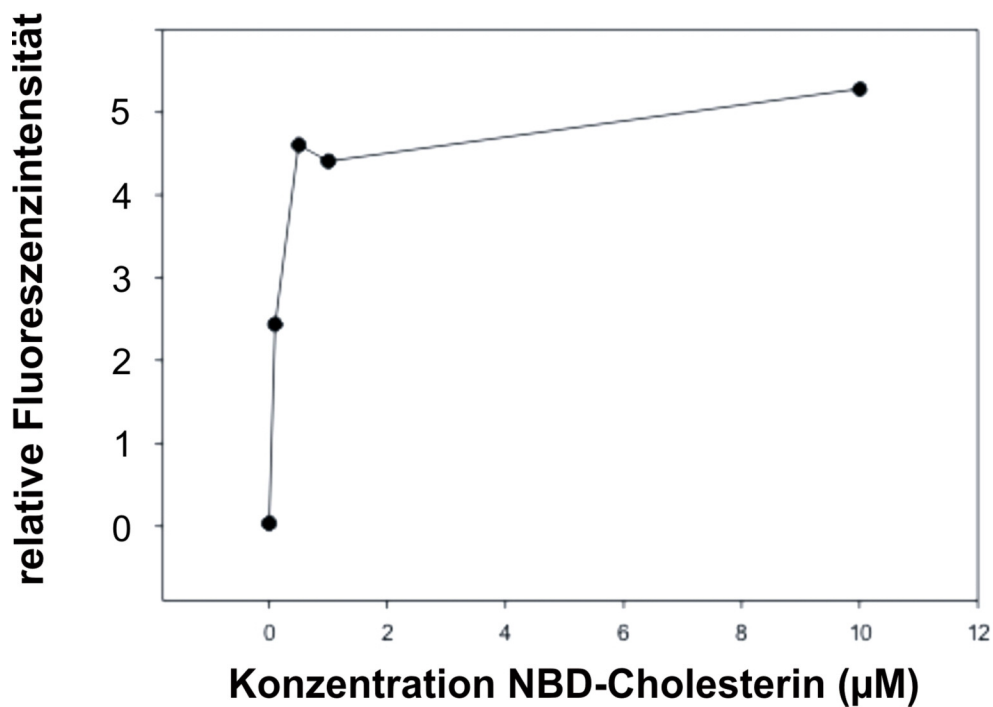


Abbildung 52: Die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Konzentration des NBD-Cholesterins. Die Konzentration des StAR-Proteins betrug bei allen Messungen konstant 0,5 μM . Die Konzentration des NBD-Cholesterins variierte von 0 -10 μM .

Es wurde auch untersucht, ob das StAR-Protein mit Dehydrocholesterol interagiert. Bei pH 7,4 wurde eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration gemessen, die sich ab einer bestimmten Proteinkonzentration (etwa 1 μM) jedoch nicht weiter steigerte (Abb. 53). Dies lässt auf eine spezifische Interaktion des DHEs mit dem StAR-Protein schließen. Zur Kontrolle wurden auch Messungen mit dem hitzedenaturierten StAR-Protein durchgeführt. Beim denaturierten StAR war praktisch keine Interaktion mit dem DHE messbar. Bei pH 3,0 war jedoch etwa im gleichen Ausmaß wie bei pH 7,4 eine Steigerung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration zu beobachten (Abb. 54). Der Anstieg war bei relativ niedrigen Proteinkonzentrationen zunächst weniger stark als bei pH 7,4. Bei einer Proteinkonzentration von etwa 1 μM wurde jedoch auch hier eine Sättigung der Fluoreszenzintensität gemessen. Die maximale Fluoreszenzintensität erreichte einen etwa genauso großen Wert wie bei pH 7,4.

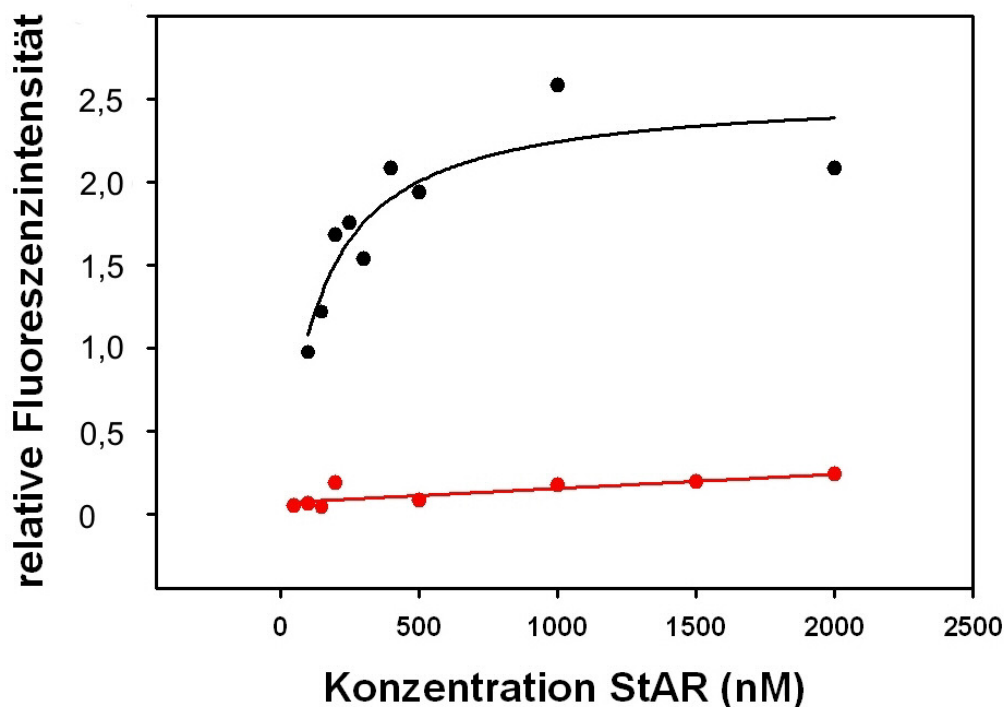


Abbildung 53: Interaktion des StAR-Proteins mit Dehydroergosterol bei pH 7,4. Gemessen wurde die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration bei konstanter DHE-Konzentration. Zu 990 μL Protein wurden 10 μL DHE in Ethanol zugegeben. Die Konzentration des NBD-Cholesterins betrug final 10 μM , die des Ethanols 1 %. Das Protein wurde mit DHE für 10 min bei 37° C in einer Quartzküvette unter Rühren vor Licht geschützt inkubiert. Danach wurde ein Fluoreszenz-Emissionsspektrum aufgezeichnet. Die Probe wurde mit einer Wellenlänge von 324 nm zur Fluoreszenz angeregt, und die Emission wurde bei 376 nm gemessen. Bei den einzelnen Messungen wurden jeweils die Negativkontrollen (DHE + Puffer und Protein + Puffer) subtrahiert. Die Messungen wurden auch mit hitzedenaturiertem StAR durchgeführt (rot dargestellt). Das Protein wurde hierzu für 5 min bei 95° C inkubiert.

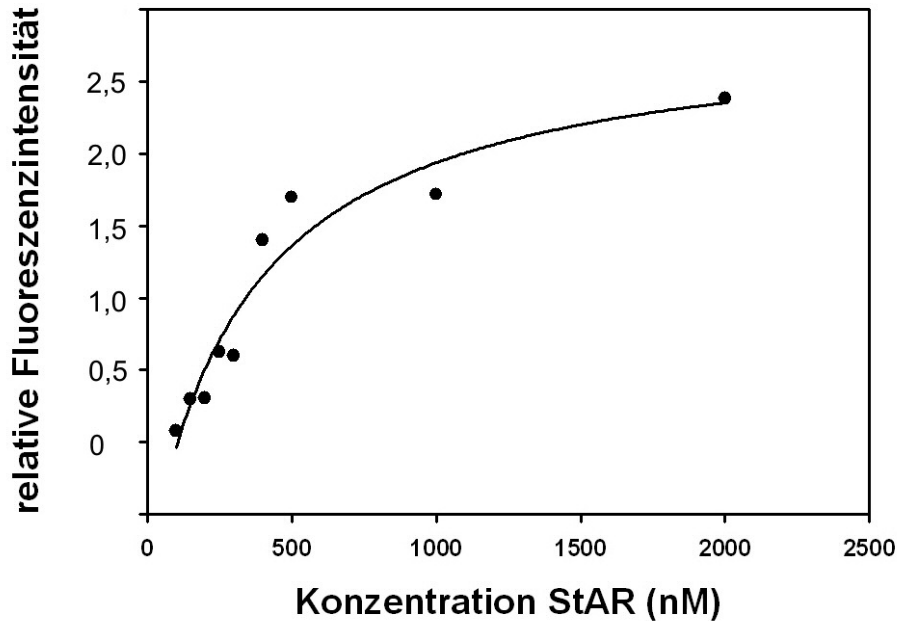


Abbildung 54: Interaktion des StAR-Proteins mit Dehydroergosterol bei pH 3,0. Der pH-Wert des Puffers, in dem das Protein gelöst war, wurde vor der Inkubation mit DHE mittels Zitronensäure-KOH (1 mM, pH 2,0) auf einen Wert von 3,0 eingestellt.

Bei der StAR-A218V-Mutante konnte bei pH 7,4 auch eine Interaktion mit dem Dehydroergosterol beobachtet werden (Abb. 55). Auch hier trat bei einer Proteinkonzentration von etwa 1 μ M eine Sättigung der Fluoreszenzintensität auf. Die maximale Fluoreszenzintensität erreichte jedoch nur einen etwa halb so hohen Wert wie beim StAR-Wildtyp.

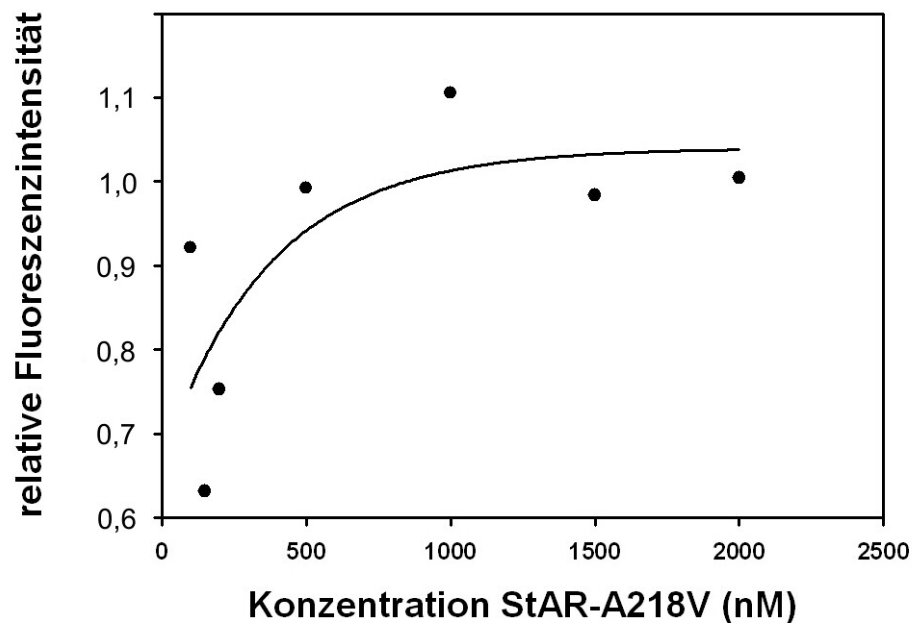


Abbildung 55: Interaktion der StAR-A218V-Mutante mit DHE bei pH 7,4.

Es wurde auch versucht, Cholesterin-Bindungstests zur Untersuchung des StAR-Proteins durchzuführen. Dabei wurde radioaktiv markiertes Cholesterin mit dem StAR-Protein inkubiert. Anschließend wurde das StAR-Protein über das His-Tag an Ni-NTA-Matrix gebunden. Das gebundene StAR-Protein wurde durch Zentrifugation vom Überstand abgetrennt (für die Reaktion wurden 1,5 ml-Röhrchen verwendet; ein typischer Reaktionsansatz enthielt 20 µg Protein). Das Pellet wurde gewaschen und die Proteine wurden mit Imidazol-Puffer (250 mM) von der Nickelmatrix eluiert. Die eluierten Proteine wurden per Szintillationsmessung dahingehend untersucht, wie viel radioaktives Cholesterin sie gebunden hatten. Leider schwankten die Messwerte zu stark, um gesicherte Aussagen über die Cholesterinbindung des StAR-Proteins machen zu können.

Außerdem wurde untersucht, ob das mit dem nichtradioaktiven Azocholestanol markierte StAR-Protein im SDS-Gel ein verzögertes Laufverhalten gegenüber dem unmarkierten StAR-Protein aufweist (Abb. 56). Ein solcher Mobilitätsshift war beim SCAP beobachtet worden (siehe Kapitel 4.4). Beim StAR-Protein war diese Erhöhung des Molekulargewichts jedoch nicht zu beobachten. Der einzige Effekt, der auftrat, war, dass die Bande des markierten StAR-Proteins im Western-Blot etwas unschärfer erschien als die des unmarkierten Proteins.

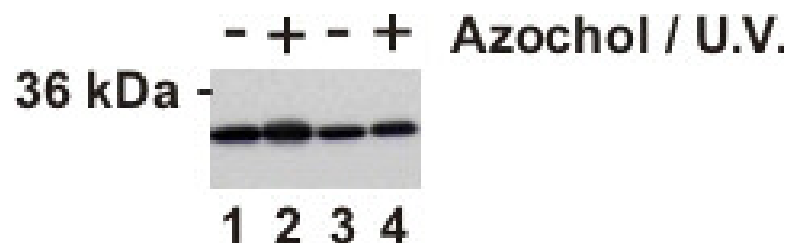


Abbildung 56: Fotoaffinitätsmarkierung des StAR-Proteins und Analyse per SDS-Gel und Western-Blot. Probe 2 und 4 wurden für 20 min bei RT und pH 7,4 mit 100 µM Azocholestanol-MBCD inkubiert und für 10 min bei 4° C mit UV-Licht bestrahlt. Die Proben 1 und 3 blieben unbehandelt. Die Proben wurden auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen (Probe 1 und 2: 400 ng pro Spur, Probe 3 und 4: 200 ng). Der Nachweis erfolgte mit einem gegen das His-Tag des StAR-Proteins gerichteten Antikörper.

4.2 Charakterisierung der Cholesterinbindungsstelle des MLN 64 Proteins

Für die hier durchgeführten Experimente wurde die cytoplasmatische START-Domäne des MLN64-Proteins in BL21-E.coli-Bakterienzellen überexprimiert und per Ni-NTA-Metallchelat-Affinitätschromatographie isoliert. Das MLN64-Protein wurde mit [³H]-Azocholestanol inkubiert und mit UV-Licht bestrahlt (Abb. 57). Bei der Szintillationsmessung zeigte sich, dass das MLN64-Protein an mehreren Stellen radioaktiv

markiert worden war – alle drei bei der Cyanbromidspaltung erzeugten Fragmente waren radioaktiv markiert. Es wurde auch versucht zu quantifizieren, wieviel Azocholestanolmoleküle von den im Reaktionsansatz befindlichen MLN64-Proteinmolekülen gebunden worden waren. Dazu wurden in drei parallelen Ansätzen je 6,25 µg MLN64 mit [³H]-Azocholestanol radioaktiv markiert. Die gefällten Proteine wurden nicht mit Cyanbromid gespalten, sondern mit 50 µL Wasser resuspendiert, mit 4 mL Szintillator versetzt und im Szintillationscounter auf ihre Radioaktivität vermessen. Die Szintillationsmessungen ergaben eine durchschnittliche Aktivität von 40346 dpm für 6,25 µg MLN64. Diese Menge an MLN64 entspricht 0,21 nmol Proteinmolekülen, und die 40346 dpm des bei diesem Experiment verwendeten [³H]-Azocholestanols entsprechen 0,23 nmol [³H]-Azocholestanolmolekülen. Demnach wäre jedes MLN64-Proteinmolekül durchschnittlich mit 1,1 Molekülen [³H]-Azocholestanol markiert worden. Es konnte auch gezeigt werden, dass sich [³H]-Azocholestanol durch einen zehnfachen Überschuss an Cholesterin von den Bindungsstellen am MLN64-Protein verdrängen ließ. Dazu wurde dem Reaktionsansatz nach Zugabe des [³H]-Azocholestanols (3,3 µL) die zehnfache Menge an Cholesterin-MBCD (3 mM) zugegeben. Die so behandelten 6,25 µg MLN64 hatten dann nur noch eine Aktivität von durchschnittlich 1203 dpm. Die radioaktive Markierung war demnach um 97 % verringert.

Die Markierung des MLN64-Proteins erfolgte auch mittels nichtradioaktiver Fotoaffinitätsmarkierung und Massenspektrometrie. Die Fotoaffinitätsmarkierung wurde genauso wie oben beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, dass nichtradioaktives Azocholestanol verwendet wurde. Zum einen sollte damit untersucht werden, wie viele Azocholestanolmoleküle das MLN64-Protein bindet. In der Massenspektrometrie sollte je gebundenem Azocholestanolmolekül ein zusätzlicher Peak zu sehen sein, der um 386 Dalton gegenüber dem des unmarkierten Proteins verschoben ist. Voraussetzung hierfür ist eine genügend hohe Markierungseffizienz. Die Fotoaffinitätsmarkierungen wurden bei verschiedenen Azocholestanolkonzentrationen durchgeführt. Bei den in Abb. 58 gezeigten Massenspektren war eine Konzentration von 200 µM eingesetzt worden. Für die Fotoaffinitätsmarkierung wurden 20 µL MLN64-Protein (20 µg) mit 166,6 µL Puffer und 13,4 µL Azocholestanol-MBCD (3 mM) verwendet. Eine Markierung des MLN64-Proteins konnte in keinem der durchgeführten Experimente beobachtet werden.

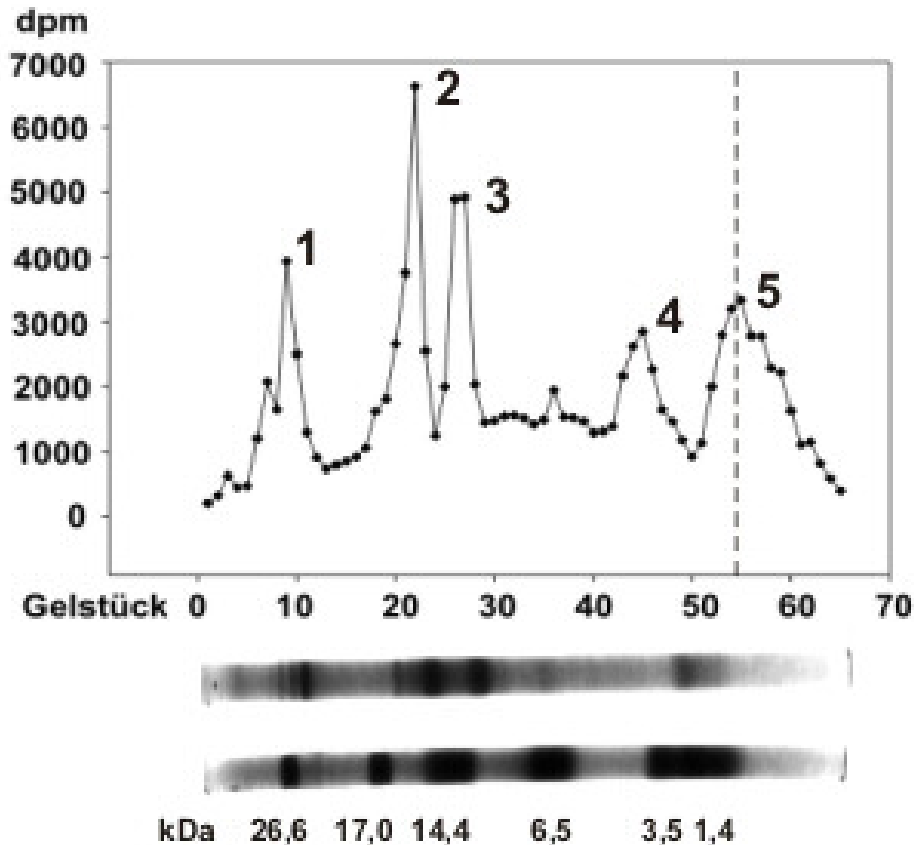


Abbildung 57: Fotoaffinitätsmarkierung des MLN64-Proteins, Cyanbromidspaltung und Analyse per Röhrgengel. 25 µg MLN64-Protein in vier Eppendorfgefäßen mit je 6,25 µL MLN64-Protein (entsprechend 6,25 µg) wurden mit je 190,45 µL Tsujishita-Puffer (mit DTT) und je 3,3 µL [³H]-Azocholestanol-MβCD (3 mM) gemischt. Die finale Azocholestanolkonzentration betrug damit 50 µM. Das MLN64-Protein lag vor der Fotoaffinitätsmarkierung in einem Puffer vor, der 40 % Glycerin enthält. Glycerin sollte die Aggregation des Proteins verhindern. Außerdem enthielt der Puffer, mit dem das Protein auch von der Nickel-NTA-Affinitätsmatrix eluiert worden war, 250 mM Imidazol. Sowohl Glycerin als auch Imidazol könnten einen störenden Einfluss auf die Fotoaffinitätsmarkierung des Proteins haben. Mit dem Tsujishita-Puffer wurde die Probe 32 x verdünnt. Während der Inkubation der Probe mit dem Azocholestanol und der Bestrahlung betrug der Gehalt an Glycerin 1,25 %, der Gehalt an Imidazol 7,8 %. Die Proben wurden 20 min vor Licht geschützt geschüttelt und dann für 10 min auf Eis mit UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurde das in den Proben enthaltene Protein mit je 1 mL -20° C kaltem Aceton präzipitiert. Die Proteine wurden mit je 100 µg Cyanbromid in 100 µL 70 % Ameisensäure vor Licht geschützt für 24 h bei 37°C geschüttelt. Die dabei entstandenen Proteinfragmente wurden im Abzug mit Stickstoff getrocknet, mit je 10 µL 1x Schägger-Probenauftragspuffer resuspendiert und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die 4 x 10 µL wurden vereinigt und mit einem Schägger-Röhrgengel aufgetrennt. Das Gel wurde in Scheiben geschnitten, und die Gelstückchen wurden per Szintillationsmessung analysiert. Der Peak Nr. 1 entspricht dem ungespaltenen MLN64-Protein, die beiden Peaks 2 und 3 rechts daneben dem 14 kDa- und dem 10 kDa-Fragment. Ein weiterer Peak (4) entspricht dem 3 kDa-Fragment. Der Peak ganz rechts (5) wird durch die Lauffront (durch gestrichelte Linie markiert) des Gels verursacht. Das mit Coomassie gefärbte Röhrgengel mit dem markierten und gespaltenen MLN64 wurde fotografiert, bevor es in Scheibchen geschnitten wurde. Die Fotografie ist unter dem Szintigramm abgebildet. Auf dem darunter abgebildeten Röhrgengel war Molekulargewichtsstandard aufgetragen worden.

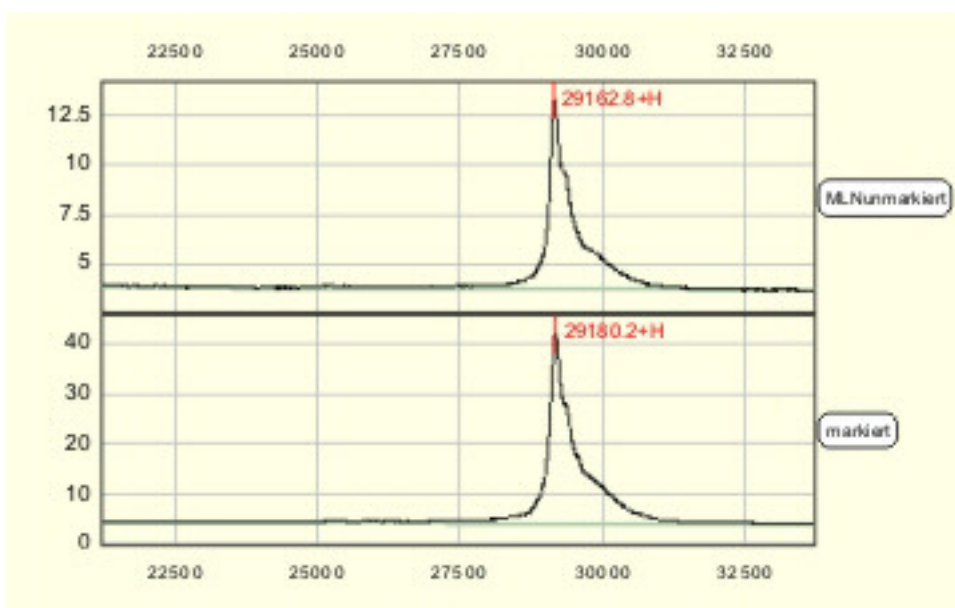
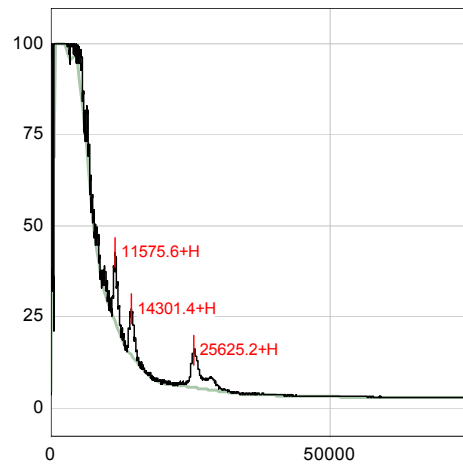


Abbildung 58: Fotoaffinitätsmarkierung des MLN64-Proteins und Analyse per Massenspektrometrie. Für die Messung wurden jeweils 1 µg Protein auf den Proteinchip aufgetragen. Trotz gleicher aufgetragener Proteinmengen ist die Intensität des Peaks der markierten Probe etwa dreimal so groß wie die der unmarkierten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass gebundenes Azocholestanol die Wechselwirkung mit der Chipmatrix verbessert hatte.

Es wurde auch versucht, das mit Cyanbromid gespaltene MLN64-Protein mittels Massenspektrometrie zu analysieren. Die Cyanbromidfragmente ließen sich zwar gut mit dem Massenspektrometer nachweisen, eine Markierung mit Azocholestanol war jedoch auch hier nicht zu sehen (Abb. 59).

Es wurden auch fluoreszenzspektroskopische Experimente mit MLN64 durchgeführt. Für die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Wechselwirkung des MLN64-Proteins mit Cholesterin wurde das fluoreszierende Dehydroergosterol (DHE) verwendet. DHE hat dieselbe Ringstruktur wie Cholesterin und unterscheidet sich von ihm nur durch zwei zusätzliche Doppelbindungen, durch die es bei einer Wellenlänge von 324 nm zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Bindet DHE an das MLN64-Protein, dann sollte das zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität führen, weil der Quencheffekt erniedrigt wird, den das DHE erfährt, wenn es vom hydrophilen wässrigem Medium in die hydrophobe Bindungstasche des Proteins gelangt (Abb. 60).

A) MLN64-unmarkiert -CNBR



B) MLN64-markiert-CNBR

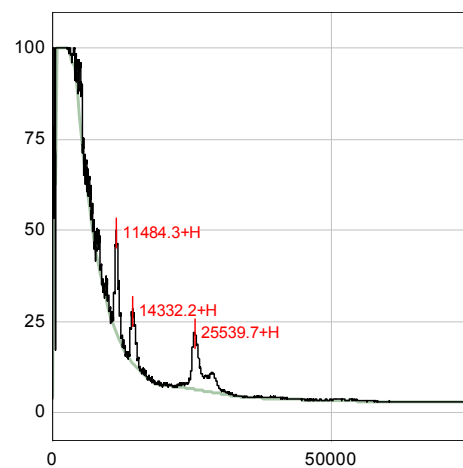


Abbildung 59: Fotoaffinitätsmarkierung des MLN64-Proteins, Cyanbromidspaltung und massenspektrometrische Analyse der Fragmente. Die drei sichtbaren Maxima entsprechen den zwei größeren Cyanbromidfragmenten, der Peak mit dem größten Molekulargewicht ungespaltenem Protein.

Bei konstanter DHE-Konzentration zeigte sich, dass mit steigender MLN64-Konzentration die Fluoreszenz zuerst anstieg und dann eine Sättigung der Fluoreszenzintensität auftrat. Dies spricht dafür, dass Dehydroergosterol spezifisch an MLN64 bindet. Zum Vergleich wurden auch Messungen mit denaturiertem MLN64 durchgeführt. Die Messungen wurden auf die gleiche Weise wie bei nativem MLN64 durchgeführt. Die Fluoreszenzemission war auch bei relativ hohen Proteinkonzentrationen deutlich niedriger als beim nativen Protein. Eine Sättigungskurve konnte hier nicht gemessen werden.

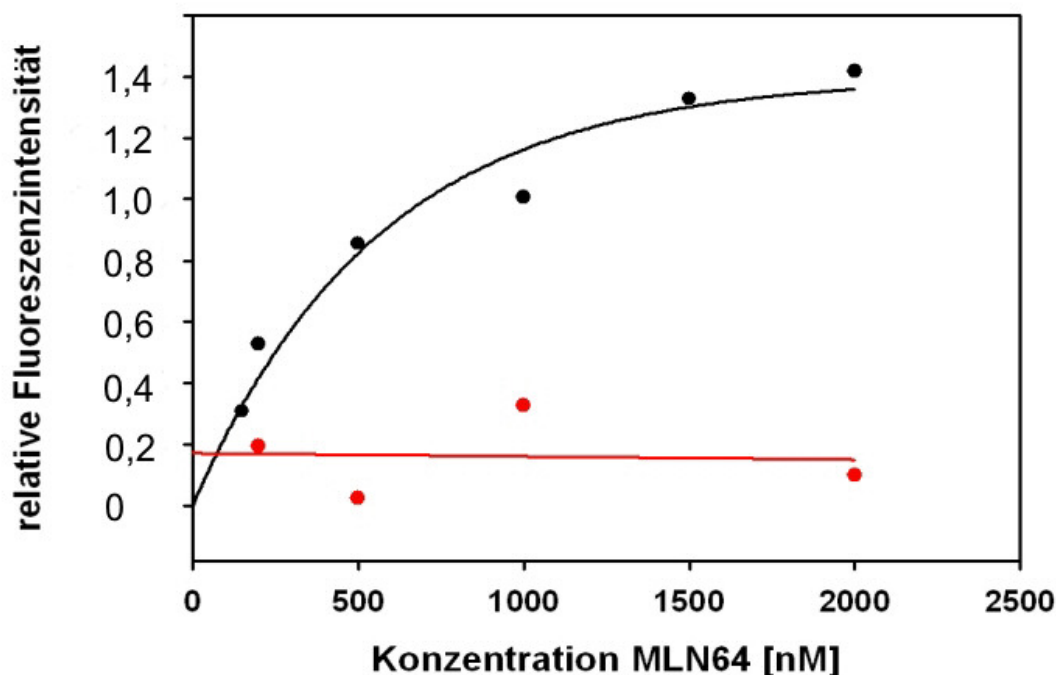


Abbildung 60: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung des MLN64-Proteins. Die Dehydroergosterol-Konzentration betrug bei allen Messungen $10 \mu\text{M}$. Das DHE wurde als ethanolische Lösung (1 mM) zum Protein gegeben ($10 \mu\text{L}$ DHE + $990 \mu\text{L}$ Tsujishita-Puffer mit unterschiedlichen Konzentrationen an MLN64). Nach 5 min Inkubation unter Rühren bei 37°C in der Quartzküvette wurde die Probe bei einer Wellenlänge von 324 nm zur Fluoreszenz angeregt, und die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 376 nm gemessen. Zur Kontrolle wurden Messungen mit dem im Puffer gelösten DHE und mit dem im Puffer gelösten Protein durchgeführt. Die Kontrollwerte wurden jeweils vom Probenwert subtrahiert. Bei steigender MLN64-Konzentration trat ab etwa $1,5 \mu\text{M}$ eine Sättigung der Fluoreszenzintensität ein. Zum Vergleich wurden die Messungen auch mit hitzedenaturiertem MLN64-Protein durchgeführt (rot dargestellt). Das Protein wurde dazu vor den Messungen für 5 min bei 95°C inkubiert. Das hitzedenaturierte MLN64 wurde in den Tsujishita-Puffer gegeben, $10 \mu\text{L}$ DHE wurden hinzugefügt, und nach fünfminütiger Inkubation bei 37°C wurde das Spektrum aufgezeichnet.

Es wurde auch versucht, die Markierung des MLN64-Proteins per Western-Blot nachzuweisen. Ziel dieser Experimente war es herauszufinden, ob das mit dem fotoreaktiven Cholesterinderivat markierte MLN64-Protein im SDS-Gel ein etwas größeres Molekulargewicht hat als das unmarkierte Protein. Beim SCAP konnte ein solcher Unterschied zwischen markierten und unmarkierten Protein gesehen werden (siehe Kapitel 4.4). Da das MLN64-Protein einen His-Tag besaß, konnte es mit einem anti-His-Tag per Western-Blot nachgewiesen werden. 200 ng MLN64-Protein erzeugten schon nach kurzer (5 s) Inkubationszeit der Blotmembran mit dem fotografischen Film ein deutliches Signal (Abb. 61). Die Proteinbanden im Western-Blot befanden sich bei unmarkiertem und markiertem Protein jedoch auf der gleichen Höhe. Die Fotoaffinitätsmarkierung konnte also per SDS-Gel und Western-Blot nicht nachgewiesen werden.

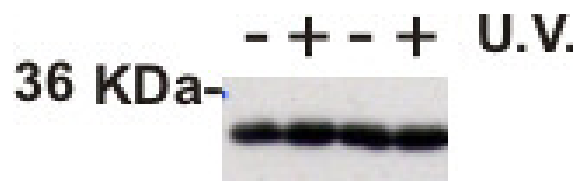


Abbildung 61: Fotoaffinitätsmarkierung von MLN64 und Nachweis per Western-Blot. Das MLN64-Protein wurde mit 100 μ M Azocholestanol für 20 min vor Licht geschützt bei RT unter Schütteln inkubiert. Die Hälfte der Probe wurde in einer Quartzküvette bei 4° C mit einer 200 Watt-Lampe bestrahlt (WL 300 nm). Die Proteine wurden mit einem 10 % SDS-Gel aufgetrennt (unmarkiertes und markiertes Protein jeweils in nebeneinander liegenden Spuren). Je Spur wurden 200 ng Protein in 1x Probenauftragspuffer aufgetragen. Der His-Antikörper wurde in der Verdünnung 1:2000 eingesetzt und für 1 h mit der Nitrozellulose-Blotmembran inkubiert. Der Zweitantikörper wurde ebenfalls in der Verdünnung 1:2000 verwendet (30 min Inkubationszeit). Zur Entwicklung des Blots wurde das ECL-System verwendet. Die Blotmembran wurde für 30 s mit dem fotografischen Film inkubiert. Zwischen markiertem und unmarkiertem MLN64 ist kein Unterschied im Molekulargewicht zu sehen.

Western-Blots wurden auch mit dem cyanbromidgespaltenen MLN64-Protein durchgeführt. Die Proteinfragmente konnten mit dem Schägger-Gelsystem aufgetrennt werden. Bei der Cyanbromidspaltung entsteht ein 3 kDa-Fragment, das den C-terminalen Bereich mit dem His-Tag enthält. Dieses Fragment sollte mit dem anti-His-Antikörper nachgewiesen werden, um zu beurteilen, ob sich die Markierung per Western-Blot nachweisen lässt. Im Western-Blot konnte das Fragment jedoch nicht detektiert werden. Möglicherweise war bei der Spaltung mit Cyanbromid, das Proteine ja eigentlich nur nach Methioninresten spalten sollte, auch das His-Tag beschädigt oder oxidiert worden.

4.3 Charakterisierung der Cholesterinbindungsstelle des Oxytocinrezeptors

Cholesterin kann Membranproteine auf zwei unterschiedliche Weisen beeinflussen. Zum einen indirekt, weil die physikalischen Eigenschaften der Membran wie zum Beispiel die Membranfluidität vom Cholesteringehalt abhängig sind. Indirekt durch Cholesterin beeinflusst wird zum Beispiel der Cholecystokininrezeptor Typ B (Gimpl et al., 1997). Andererseits kann Cholesterin aber auch direkt an manche Membranproteine binden und dadurch deren Eigenschaften verändern. Für den Oxytocinrezeptor konnte gezeigt werden, dass seine Affinität zum Liganden Oxytocin spezifisch vom Cholesteringehalt der Membran abhängt (Gimpl et al., 1997). Bei hohem Cholesteringehalt der Plasmamembran hat der Oxytocinrezeptor eine hohe Affinität zu seinem Liganden, bei geringem Cholesteringehalt eine niedrige Affinität. Mögliche Cholesterinbindungsstellen befinden sich wahrscheinlich in

den Transmembrandomänen des Oxytocinrezeptors. Ein möglicher Ansatz, die Cholesterinbindungsstellen einzugrenzen, ist es, Fusionsproteine herzustellen, bei denen eine oder mehrere der Transmembrandomänen des Oxytocinrezeptors durch Transmembrandomänen des Cholecystokininrezeptors ersetzt sind. Bei Experimenten, die Wiegand (2002) durchführte, wurden die Transmembrandomänen 6 und 7 des Oxytocinrezeptors gegen die des Cholecystokininrezeptors ausgetauscht. Die so erzeugte Rezeptorchimäre wurde genauso durch Cholesterin reguliert wie der Oxytocinrezeptor selber. Man kann daher davon ausgehen, dass nur die ersten fünf Transmembrandomänen des Oxytocinrezeptors an dessen spezifischer Interaktion mit Cholesterin beteiligt sind. Eine von mir im Rahmen meiner Diplomarbeit erzeugte Oxytocinrezeptormutante, bei der die Transmembrandomänen 5-8 mit denen des Cholecystokininrezeptors ersetzt waren, wurde in Zellen – wahrscheinlich aufgrund fehlerhafter Proteinfaltung - nicht exprimiert. Eine andere Möglichkeit zur Identifizierung von Cholesterinbindungsstellen besteht in der Verwendung eines fotoreaktiven Cholesterinderivates. Bei Experimenten von Burger (2000) konnte ein in Bakterienzellen exprimierter, per His-Tag-Affinitätschromatographie gereinigter und in Liposomen eingebauter Oxytocinrezeptor mit einem fotoreaktiven Cholesterinderivat markiert werden.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde der Oxytocinrezeptor in Säugerzellen (Human Embryonic Kidney-Zellen, HEK-Zellen) überexprimiert. Rezeptorhaltige Membranen sollten mit dem tritiumhaltigen, fotoreaktiven Cholesterinderivat markiert werden. Auftrennung der Membranproteine per SDS-Röhrchengel und Szintillationsmessung des in Scheiben geschnittenen Gels zeigen, ob ein der Masse des Oxytocinrezeptors entsprechendes Protein mit dem fotoreaktiven Cholesterinderivat markiert wird. Ist dies der Fall, dann können die radioaktiv markierten Rezeptoren durch Behandlung mit Proteasen oder durch chemische Reagenzien in Fragmente zerlegt werden, die ebenso wie der ganze Rezeptor per SDS-Röhrchengel und Szintillationsmessung analysiert werden können. Damit sollte es möglich sein, die Bindungsstelle des Cholesterinderivats einzugrenzen. Es ist notwendig, diese Experimente mit dem in eukaryotischen Zellen exprimiertem Oxytocinrezeptor durchzuführen, da der in Bakterienzellen exprimierte Oxytocinrezeptor nicht glykosyliert wird und nicht funktional ist.

Bei den hier durchgeführten Experimenten wurden Oxytocinrezeptoren verwendet, die C-terminal mit GFP fusioniert waren. Gegen GFP gibt es Antikörper, mit denen sich der Oxytocinrezeptor im Western-Blot nachweisen oder per Immunpräzipitierung aufkonzentrieren lässt. Experimente von Gimpl et al. (1997) haben gezeigt, dass sich der

Rezeptor mit C-terminalem GFP-Tag hinsichtlich Ligandenbindung und Cholesterin-Interaktion verhält wie der Wildtyp-Rezeptor. Der Zellklon, der den Oxytocinrezeptor mit GFP-Tag stabil exprimiert (5,3 pmol pro mg Membranprotein), wurde von Dr. Gimpl hergestellt. Ein weiteres Rezeptorkonstrukt wurde von mir im Rahmen dieser Arbeit erzeugt. Es handelt sich dabei ebenfalls um ein OTR-GFP-Konstrukt, das mit dem Flp-In-System (Invitrogen) stabil in HEK-Zellen zur Expression gebracht wurde (3,3 pmol pro mg Membranprotein). Die Verwendung dieses Transfektionssystems zur Erzeugung von Zellen, die den Oxytocinrezeptor exprimieren, hat den Vorteil, dass die Expression über viele Passagen der Zellen konstant bleibt, da der Rezeptor an einer genau definierten Stelle in das Genom der HEK-Zellen integriert wird. Die Zellmembranen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt, um so eine höhere Rezeptorkonzentration zu erhalten. Die Menge an Oxytocinrezeptoren ließ sich so von 5,3 pmol/mg Membranprotein auf bis zu 28,6 pmol/mg Membranprotein steigern. Die maximale Menge an Gesamtprotein, die man mit einem Röhrenchengel auftrennen kann, beträgt etwa 1 mg. Aus den rezeptorhaltigen Membranen wurde mit Hilfe von Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) ein Teil des Cholesterins entfernt. Dadurch sollte erreicht werden, dass bei der Wiederanreicherung mehr fotoreaktives Cholesterinderivat in die Membranen eingelagert wird. Die Wahrscheinlichkeit, dass Azocholestanol vom Membrancholesterin aus den Bindungsstellen am Oxytocinrezeptor verdrängt wird, sollte so verringert werden. Für die Fotoaffinitätsmarkierung wurde das fotoreaktive Cholesterinanalogue mit M β CD komplexiert (40 mg/ml M β CD in H₂O). Das Cholesterinderivat hatte eine Konzentration von 3 mM und eine Aktivität von 73260 dpm/ μ L. Die Membranproteine wurden mit einem 10 % SDS-PAGE-Röhrenchengel aufgetrennt. Das Röhrenchengel wurde in Scheiben geschnitten und die Gelstückchen wurden per Szintillationsmessung auf ihre Radioaktivität vermessen. Bei einer Masse von 100 kDa wäre ein durch das OTR-GFP-Protein erzeugter Radioaktivitätspeak zu erwarten (Abb. 62). Beobachtet werden konnte allerdings nur ein kleiner Peak bei einem Molekulargewicht von etwa 35 kDa. Die Markierung dieses 35 kDa-Proteins war reproduzierbar, der Peak war bei allen durchgeführten Experimenten mit fotoaffinitätsmarkierten Membranen zu sehen.

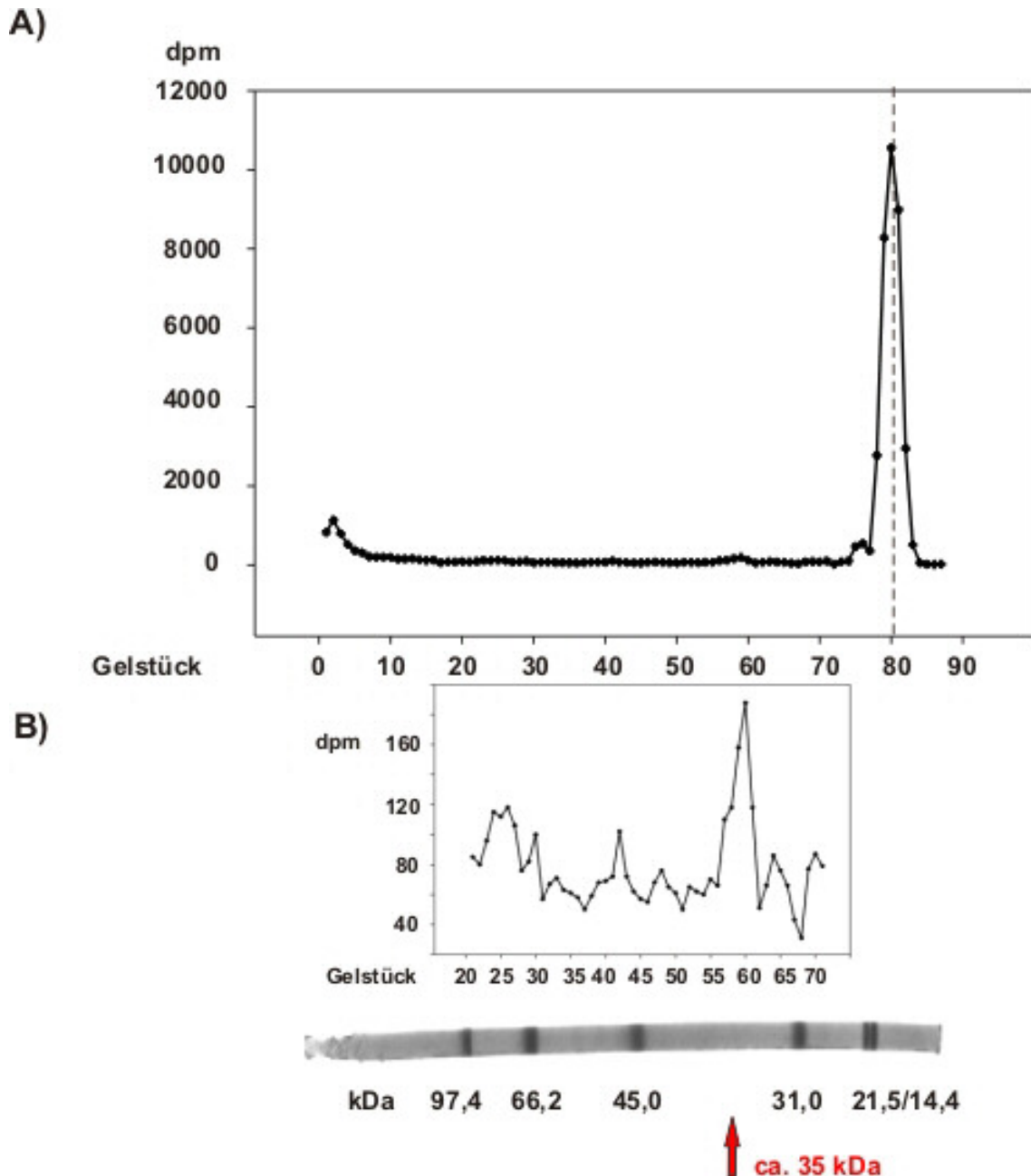


Abbildung 62: Fotoaffinitätsmarkierung des Oxytocinrezeptors. Im Dichtegradient gereinigte HEK-OTR-GFP-Membranen (4 mg mit 68,6 pmol Rezeptoren) wurden von Cholesterin abgereichert und mit 80 μL [^3H]-Azocholestanol-M β CD (3 mM) wieder angereichert. Die Gesamtmenge der eingesetzten Radioaktivität betrug $5,86 \times 10^6$ dpm. Nach der Fotoaffinitätsmarkierung wurden die Proteine gefällt und mit einem 10 % SDS-Röhrchengel aufgetrennt. Das Gel (Länge 98 mm) wurde in 87 Scheibchen geschnitten. Die Scheibchen wurden per Szintillationscount auf ihre Radioaktivität vermessen. Abbildung A) zeigt das Ergebnis der Radioaktivitätsmessung. Der große Radioaktivitätspeak bei Gelstück Nr. 80 entspricht der Lauffront des Gels (gestrichelte Linie). Abbildung B) zeigt mit den Gelstückchen 20 bis 70 einen Ausschnitt aus der oberen Abbildung. Auf ein weiteres Gel wurde Molekulargewichtsstandard aufgetragen (eine Fotografie dieses Gels ist unter den Szintillationscounts gezeigt). Der Peak bei Gelstück Nr. 59 entspricht einem Molekulargewicht von etwa 35 kDa.

Ein dem Oxytocinrezeptor entsprechender Radioaktivitätsspeak konnte jedoch nie beobachtet werden – auch nicht bei Experimenten, bei denen höhere Rezeptormengen als bei der in Abb. 62 gezeigten Szintillationsmessung eingesetzt wurden.

Bei weiteren Experimenten wurde versucht, durch Immunpräzipitierung des Oxytocinrezeptors die Konzentration der Rezeptoren vor dem Auftrag auf das Gel zu erhöhen. Das GFP-Tag ermöglichte es, Oxytocinrezeptoren mittels Anti-GFP-IgG-Agarose aufzukonzentrieren (Abb. 63).

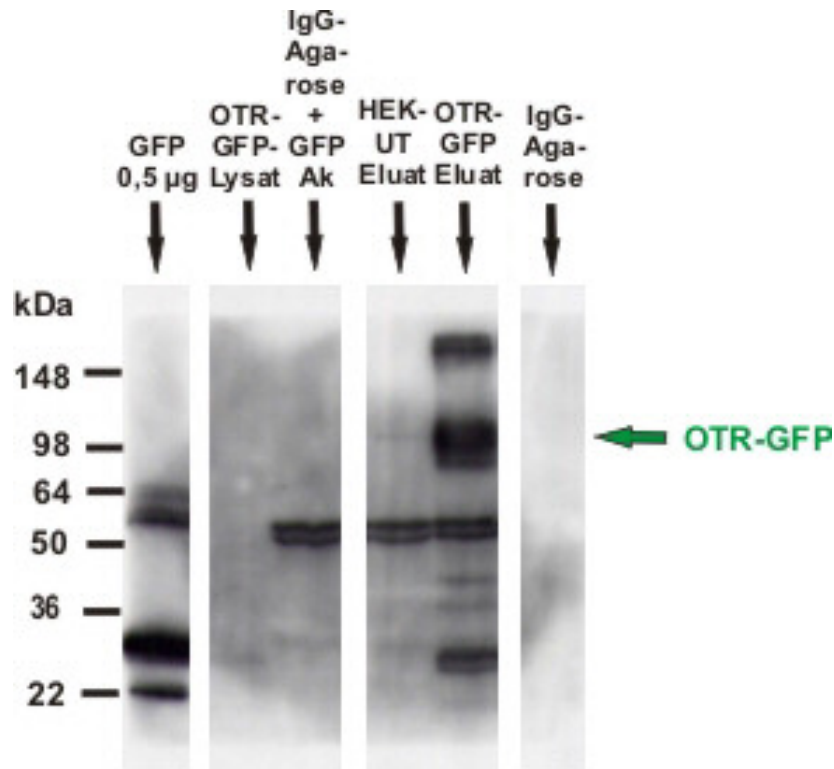


Abbildung 63: Immunpräzipitierung des Oxytocinrezeptors. Jeweils eine konfluente Schale HEK-OTR-GFP-61 Zellen oder zur Kontrolle untransfizierte HEK-Zellen (HEK-UT) wurden mit Lysispuffer und Ultraschall aufgeschlossen. Das Zelllysate (HEK-OTR-GFP-61-Zellen: 13,03 µg Protein pro mL) wurde mit IgG-Agarose präinkubiert. Anschließend wurde das Lysat mit IgG-Agarose und GFP-Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde das Lysat mit Lysispuffer gewaschen. Das Pellet wurde mit 100 µL Probenauftragspuffer für 5 min bei 95°C eluiert, 20 µL davon wurden auf ein 10 % SDS Gel aufgetragen. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurden die Proteine mit einem Maus-Anti-GFP Antikörper und einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Anti-Maus-IgG Zweitantikörper nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurden 500 ng reines GFP Protein auf eine Spur des Gels aufgetragen (Bande bei 27 kDa und Dimer bei 54 kDa). Die in 20 µL der lysierten HEK-OTR-GFP Zellen enthaltene Rezeptormenge war zu gering, um im Western Blot nachgewiesen werden zu können. Der für die Immunpräzipitierung verwendete GFP Antikörper erzeugte im Western Blot zwei Banden bei etwa 50 kDa. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte HEK Zellen verwendet. Die Bande des mit GFP getagten Oxytocinrezeptors ist bei etwa 100 kDa zu sehen. Die Bande bei etwa 200 kDa entspricht einem OTR-GFP-Dimer. Die weitere beim OTR-GFP-Eluat sichtbare Bande wird wahrscheinlich durch vom Rezeptor abgespaltenes GFP erzeugt. Die für die Immunpräzipitierung verwendete IgG-Agarose erzeugt kein Signal im Western Blot.

Auf ein Röhrchengel kann maximal 1 mg Protein aufgetragen werden. Mit Hilfe der Immunpräzipitierung können die markierten Rezeptoren aus einem relativ großen Reaktionsansatz mit mehreren Milligramm Membranprotein isoliert und per Röhrchengel analysiert werden. In einem typischen Experiment wurden Membranen mit M β CD von Cholesterin abgereichert und mit [3 H]-Azocholestanol-M β CD wieder angereichert. Die Membranen wurden mit UV-Licht bestrahlt und anschließend solubilisiert. Das Solubilisat wurde mit GFP-Antikörper und Anti-Maus-IgG-Agarose inkubiert. Die an die Agarosematrix gebundenen Oxytocinrezeptoren wurden mit Probenauftragspuffer eluiert. Das Eluat wurde auf ein 10 %-Röhrchengel aufgetragen. Das Röhrchengel wurde nach dem Gellauf in Scheiben geschnitten, und die Radioaktivität der Scheiben wurde per Szintillationsmessung analysiert. Außer dem Peak, der durch die Lauffront der Probe auf dem Gel erzeugt wurde, war jedoch kein Radioaktivitätsmaximum zu sehen (Daten nicht gezeigt). Auch der bei der Fotoaffinitätsmarkierung von Membranen ohne anschließende Immunpräzipitierung sichtbare Peak bei 35 kDa (Abb. 64) war hier nicht zu sehen. Diesen Experimenten lag die Annahme zugrunde, dass von einem Reaktionsansatz mit 40 pmol Rezeptoren 50 % mit je einem Azocholestanolmolekül markiert werden. Die Ausbeute bei der Solubilisierung und Immunpräzipitierung wurde ebenfalls auf 50 % geschätzt. Die 10 pmol markierten Rezeptoren bzw. 10 pmol [3 H]-Azocholestanolmoleküle sollten mit dem verwendeten radioaktivem Cholesterinderivat (73000 dpm/nmol) ein Signal von 730 dpm ergeben. Möglicherweise war ein geringerer Prozentsatz der Oxytocinrezeptoren markiert worden oder die Ausbeute bei der Immunpräzipitierung war geringer als geschätzt. Es wurden noch weitere Experimente zur Immunpräzipitierung des markierten Oxytocinrezeptors durchgeführt. Dabei wurden auch größere Rezeptorkonzentrationen verwendet. Ein Radioaktivitätspeak war jedoch bei keinem der Experimente zu sehen.

Es wurde auch versucht, den Oxytocinrezeptor mit WGA-Agarose aufzukonzentrieren. Da der Oxytocinrezeptor glykosyliert ist, kann er an Weizenkeim-Agglutinin-Agarose binden (Wheat Germ Agglutinin, WGA). WGA bindet den Zuckerrest N-Acetyl- β -D-Glucosamin. Der solubilisierter Oxytocinrezeptor wurde durch WGA-Agarose vor der Fotoaffinitätsmarkierung angereichert. Experimente von Burger (2000) haben gezeigt, dass der Oxytocinrezeptor mit dem Detergens CHAPSO, das in seiner Struktur dem Cholesterin verwandt ist, solubilisiert werden kann, ohne dabei seine Affinität zum Liganden Oxytocin zu verlieren. In einem typischen Experiment wurden 9,4 mg rezeptorhaltige Membranen (5,3 pmol Rezeptoren/mg Membranprotein) in 2,07 mL Puffer durch Zentrifugation pelletiert und mit 1,875 mL Solubilisierungspuffer resuspendiert. Der Solubilisierungspuffer enthielt 0,8 % CHAPSO. Die

Proteinkonzentration sollte ungefähr 5 mg/mL betragen. Die Suspension wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und danach für 1 h mit 100000 g bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde 1:8 auf die Zusammensetzung des Säulenpuffers verdünnt. Die Konzentration an CHAPSO betrug also nur noch 0,1 % und lag damit unter der kritischen Micellenkonzentration von CHAPSO (CMC = 8 mM = 0,5 %, w/v). Von dem verdünnten Solubilisat wurden 1,6 mL als Referenz aufbewahrt, die restlichen 13,4 mL wurden auf die Säule gegeben und über Nacht mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe über die Säulenmatrix (1 mL WGA-Agarose) zirkulieren gelassen (bei 4°C). Am nächsten Tag wurde die Säule mit N-Acetyl-β-D-Glucosamin (0,6 M) eluiert. Das Eluat wurde in 500 µL-Fraktionen aufgefangen. Mit dem verdünnten Solubilisat und mit den Fraktionen wurden Radioligandenbindungstests durchgeführt. Für die Bindungstests wurden die solubilisierten Rezeptoren an Glasfasermembranen gebunden. In der ersten Fraktion (nach Durchlauf des Säulenvolumens) erzeugten 90 µL des Eluats einen durchschnittlichen dpm-Wert von 8622. Beim verdünnten Solubilisat betrug dieser Wert 3128 dpm. Die Rezeptoren ließen sich also mit dieser Methode ca. 2,8-fach anreichern. Bei der zweiten Eluatfraktion betrug der dpm-Wert jedoch nur 4212, was einem Anreicherungsfaktor von 1,17 entspricht. Die 90 µL der ersten Eluatfraktion enthielten 20,7 µg Protein. Bezogen auf 1 mg Protein würde dies einen dpm-Wert von 416521 ergeben. Bei einer spezifischen Aktivität des verwendeten [³H]-Oxytocins von 73260 dpm/pmol würde 1 mg des solubilisierten Proteins 5,69 pmol Rezeptoren enthalten.

Da nur ein kleiner Teil des Eluats - 500 µL von 5 mL - eine deutliche Anreicherung des Oxytocinrezeptors zeigte und Experimente mit ähnlich geringen Anreicherungsfaktoren auch schon von Burger (2000) erfolglos durchgeführt wurden, wurde dieser experimentelle Ansatz dann nicht weiter verfolgt.

Weitere Experimente hatten zum Ziel, HEK-OTR-GFP-Zellen zu erzeugen, die deutlich mehr Oxytocinrezeptoren exprimieren als der schon vorhandene Zellklon. Verwendet wurde dazu das Flp-In-System (Invitrogen). Das Flp-In-System ermöglicht es, eine cDNA gezielt in das Genom einer speziellen HEK-Zelllinie einzubauen und somit stabil zur Expression zu bringen. Die HEK-Zellen werden dazu mit zwei Plasmiden kotransfiziert. Das eine Plasmid enthält die DNA-Sequenz des Proteins, das exprimiert werden soll. Das andere Plasmid codiert für die Rekombinase, die den Einbau der DNA in eine bestimmte Stelle des Genoms ausführt.

Für die Transfektion der Flp-In-HEK-Zellen wurde ein pcDNA5-FRT-OTR-GFP-Vektor erzeugt. Dazu wurde der von Dr. Gimpl erzeugte pfm-OTR-GFP-Vektor mit Not I und mit Hind III restringiert. Das pcDNA5-FRT-Plasmid wurde ebenfalls mit Not I und mit Hind III geschnitten. Das OTR-GFP-Fragment wurde mit dem restringierten pcDNA5-FRT-Plasmid

ligiert. Mit dem neuen Plasmid wurden DH5-alpha-E. coli-Zellen transformiert. Die Klone wurden mittels Restriktionsanalyse untersucht. Ein Klon wurde ausgewählt und kultiviert. Mittels Plasmidpräparation wurde eine für Transfektionen ausreichende Menge DNA erzeugt. Die so erzeugten Flp-In-HEK-OTR-GFP-Zellen exprimierten den Oxytocinrezeptor allerdings nur mit einem Gehalt von 2,7 pmol Rezeptoren pro mg Membranprotein. Die Flp-In-HEK-OTR-GFP-Zellen erzielten also keinen Vorteil gegenüber der schon vorhandenem Zelllinie, die den Oxytocinrezeptor mit 5,3 pmol/mg Membranprotein exprimiert. Anhand der Fluoreszenz des GFP-Tags konnte im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden, dass alle Zellen den Oxytocinrezeptor korrekt in der Plasmamembran exprimierten.

Es wurde auch untersucht, ob der mit dem nichtradioaktiven Azocholestanol markierte Oxytocinrezeptor im SDS-Gel gegenüber dem unmarkierten Rezeptor ein verzögertes Laufverhalten aufweist. Eine solche Änderung der Mobilität konnte beim SCAP beobachtet werden (siehe Kapitel 4.4) und ist ein starkes Indiz dafür, dass das untersuchte Protein direkt mit Cholesterin wechselwirkt. Das Ergebnis eines dazu durchgeführten Experiments ist in Abbildung 64 gezeigt. Zwischen bestrahltem und nicht bestrahltem Oxytocinrezeptor war kein Unterschied im Laufverhalten im Gel zu sehen. Wäre dies der Fall gewesen, hätte man durch nichtradioaktive Fotoaffinitätsmarkierung und nachfolgende partielle proteolytische Spaltung mit anschließendem Western-Blot die Cholesterinbindungsdomäne des Oxytocinrezeptors eingrenzen können. Das Experiment wurde auch mit Membranen, die einen Oxytocinrezeptor mit His-Tag überexprimierten, durchgeführt. Ein Unterschied im Laufverhalten zwischen markiertem und unmarkiertem Rezeptor war jedoch auch hier nicht zu sehen (Daten nicht gezeigt).

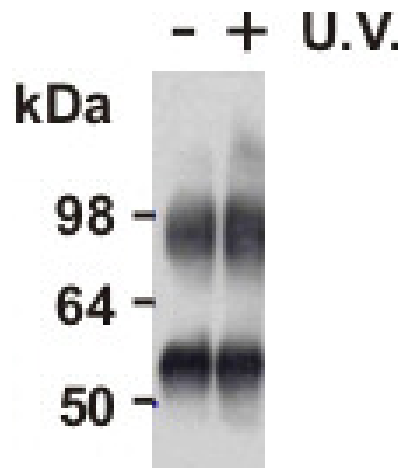


Abbildung 64: Nichtradioaktive Fotoaffinitätsmarkierung des Oxytocinrezeptors und Analyse per Western-Blot. 100 μg per Dichtegradientenzentrifugation gereinigte HEK-OTR-GFP-Membranen (22,4 pmol Rezeptoren pro mg Membranprotein, in 16,1 μL Bindungspuffer) wurden zu 450 μL Puffer A (ohne EDTA/EGTA, mit 10 mM MgCl_2) gegeben. Zu diesem Ansatz wurden 33,3 μL Azocholestanol-MBCD pipettiert. Die Konzentration der Azocholestanol-Cyclodextrin-Komplexe betrug 3 mM und die Konzentration des Azocholestanols im Reaktionsansatz damit 200 μM . Der Ansatz wurde für 20 min bei Raumtemperatur vor Licht geschützt geschüttelt. Danach wurde der Ansatz in zwei Aliquots á 230 μL aufgeteilt. Das eine Aliquot wurde vor Licht geschützt aufbewahrt. Das andere wurde für 15 min auf Eis mit UV-Licht bestrahlt. Beide Aliquots wurden durch Zentrifugation pelletiert (20800 g, 10 min, 4°C). Die Pellets wurden mit je 30 μL Probenauftragspuffer resuspendiert und für 2 h bei 37 °C geschüttelt (vor Licht geschützt). Je 10 μL von beiden Proben wurden nebeneinander auf ein 10 %-SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Gellauf wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Rezeptorproteine wurden mit einem Western-Blot sichtbar gemacht. Verwendet wurde ein GFP-Antikörper als Erstantikörper (verdünnt 1:1000, für 1 h inkubiert) und Meerrettichperoxidase-gekoppelter anti-Maus-IgG-Antikörper als Zweitantikörper (Verdünnung 1:2000, für 30 min inkubiert). Die Blotmembran wurde für 30 s mit dem fotografischen Film inkubiert. Die Oxytocinrezeptor-Bande war bei etwa 98 kDa zu sehen. Die Bande, die bei etwas über 50 kDa zu sehen ist, ist wahrscheinlich unspezifisch.

4.4 Charakterisierung der Cholesterin-Bindungsstelle von SCAP

Ziel dieser Experimente war es, die Region von SCAP zu identifizieren, die mit Cholesterin interagiert. Verwendet wurden hierzu das fotoreaktive Cholesterin-Analogon (nichtradioaktiv) und zusätzlich ein fotoreaktives 25-Hydroxy-Azocholestanol (die fotoreaktive Diaziringeruppe befand sich wie beim Azocholestanol in Position 6). Die Fotoaffinitätsmarkierung mit Azocholestanol konnte per SDS-Gel mit anschließendem Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. 65). Die im Western-Blot durch das markierte SCAP erzeugte Bande zeigte ein um 0,5 -1 kDa größeres Molekulargewicht im Vergleich zur Bande des unmarkierten Proteins. Dies entspricht ein bis zwei Azocholestanol-Molekülen. Beim Insig-Protein konnte diese Erhöhung des Molekulargewichts nicht nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass SCAP

spezifisch mit dem Azocholestanol interagiert. Ebenso konnte gezeigt werden, dass das fotoreaktive 25-Hydroxy-Azocholestanol nicht kovalent an SCAP bindet (und auch nicht an das Insig).

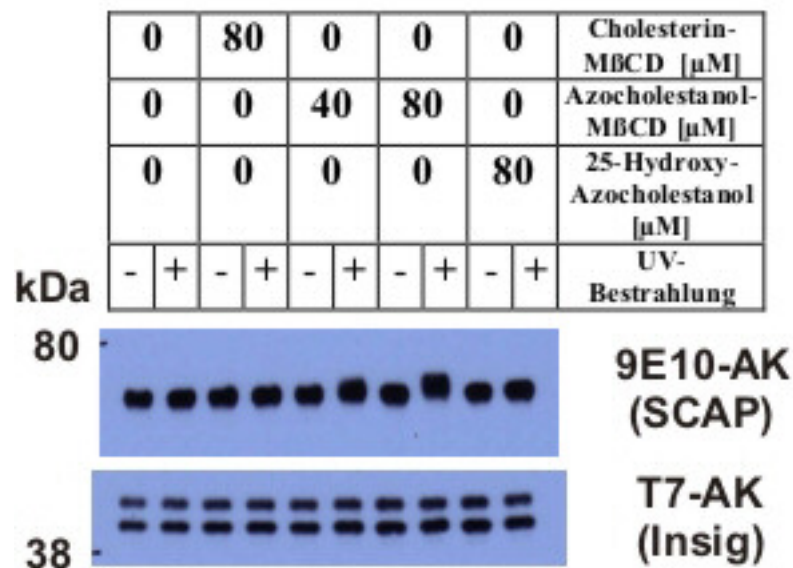


Abbildung 65: Fotoaffinitätsmarkierung von SCAP. Für die Fotoaffinitätsmarkierungen wurden Membranen aus HEK-Zellen verwendet, die SCAP-TM1-6 und Insig1 stabil exprimierten. SCAP konnte mit einem 9E10-Antikörper und Insig mit einem T7-Antikörper nachgewiesen werden. Den Zellen wurde mit HPCD für 2 h Cholesterin entzogen. Die Membranen wurden für 20 min mit den fotoreaktiven Sterolen wieder angereichert. Das mit Azocholestanol und UV-Licht behandelte SCAP hatte ein um etwa 1 kDa erhöhtes Molekulargewicht im SDS-Gel bzw. Western-Blot im Vergleich zum unbehandelten oder nicht bestrahlten SCAP. Beim Insig war diese Molekulargewichtserhöhung nicht zu sehen. Mit 25-Hydroxy-Azocholestanol behandeltes SCAP wurde nicht markiert.

Für diese Fotoaffinitätsmarkierung wurden HEK 293-Zellen verwendet, die stabil ein SCAP-Konstrukt exprimierten, das die Transmembrandomänen 1-6 umfasste. Dieses SCAP-TM1-6-Konstrukt war in der Lage, seine physiologische Funktion zu erfüllen (Yang et al. 2000). Es wurde verwendet, weil es die beiden Glykosylierungsstellen zwischen Transmembrandomäne 7 und 8 nicht enthielt. Dieses SCAP-TM-1-6-Konstrukt ließ sich per Western-Blot besser nachweisen als der SCAP-Wildtyp, der aufgrund der Glykosylierung relativ unscharfe Banden erzeugte. Die Markierung mit dem Azocholestanol konnte auch beim SCAP-Wildtyp, der alle acht Transmembrandomänen enthielt, nachgewiesen werden (Abb. 66). Um herauszufinden, ob das Azocholestanol an einen bestimmten Bereich von SCAP bindet, wurde das mit Azocholestanol markierte Protein und zum Vergleich auch das unmarkierte Protein mit den Proteasen Trypsin oder Chymotrypsin behandelt.

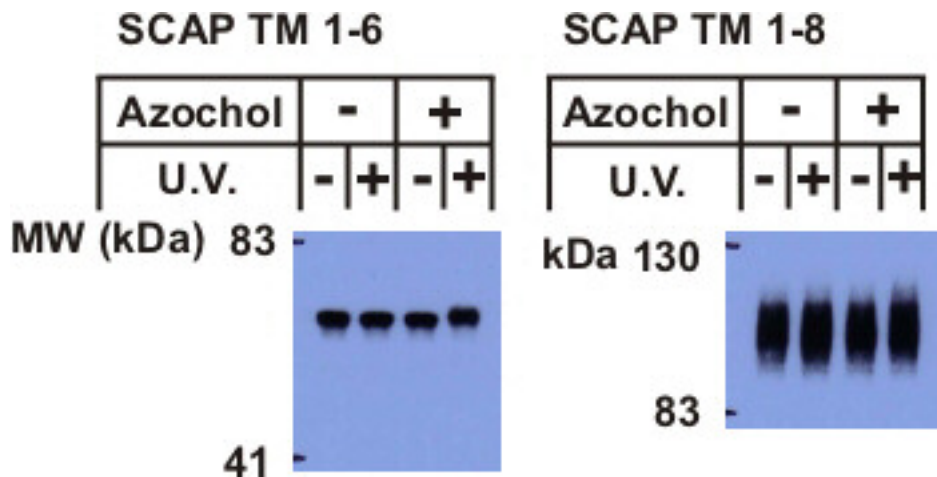


Abbildung 66: Fotoaffinitätsmarkierung von SCAP-TM 1-6 und SCAP-TM-1-8. Die Markierung mit Azocholestanol war auch bei einem SCAP-Konstrukt nachweisbar, das alle acht Transmembrandomänen enthielt. Dieses Konstrukt wurde in Sf9-Insektzellen überexprimiert und konnte im Western-Blot mit Hilfe eines gegen dessen Flag-Epitop gerichteten Antikörpers nachgewiesen werden. Aus den Insektzellen wurden Membranen präpariert, die mit Azocholestanol inkubiert wurden. Ebenso wie beim markierten SCAP-TM 1-6 war beim markierten SCAP-TM 1-8 ein verzögertes Laufverhalten im SDS-Gel zu beobachten. Durch die stärkere Glykosylierung des SCAP-TM 1-8 erschienen die Banden im Western-Blot jedoch unschärfer als beim SCAP-TM 1-6.

Einige der bei der Proteolyse entstandenen Fragmente konnten per Western-Blot nachgewiesen werden. Für den Nachweis der aminoterminalen Fragmente stand ein Antikörper zur Verfügung, der gegen das N-terminale HSV-Tag des verwendeten SCAP-Konstrukts gerichtet war (Abb. 67).

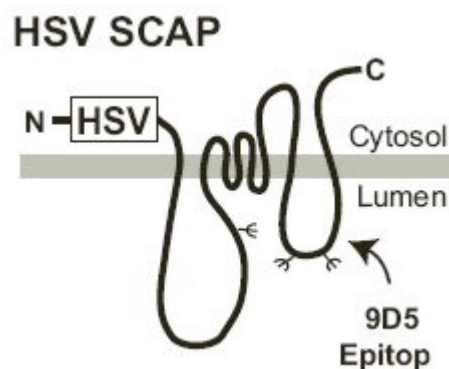


Abbildung 67: Die Topologie von SCAP und von Antikörpern erkannte Epitope. SCAP besitzt drei Glykosylierungsstellen: eine in der ersten luminalen Schleife und zwei weitere in der luminalen Schleife zwischen den Transmembrandomänen 7 und 8. Am N-Terminus besitzt das SCAP ein HSV-Tag. Die Detektion von SCAP und dessen N-terminalen Fragmenten per Western-Blot war mit einem HSV-Antikörper möglich. Der Bereich von SCAP, der die C-terminalen Transmembrandomänen 7 und 8 enthielt, konnte mit einem 9D5-Antikörper nachgewiesen werden. Abbildung (modifiziert) aus Adams et al. (2004).

Der 9D5-Antikörper erkannte einen Bereich der Schleife zwischen Transmembrandomänen 7 und 8. Dieser Antikörper konnte zur Detektion der C-terminalen Fragmente verwendet werden. Spaltet man SCAP mit der Protease Trypsin, dann entsteht ein Fragment, das die Transmembrandomänen 7 und 8 enthält (Abb. 68).

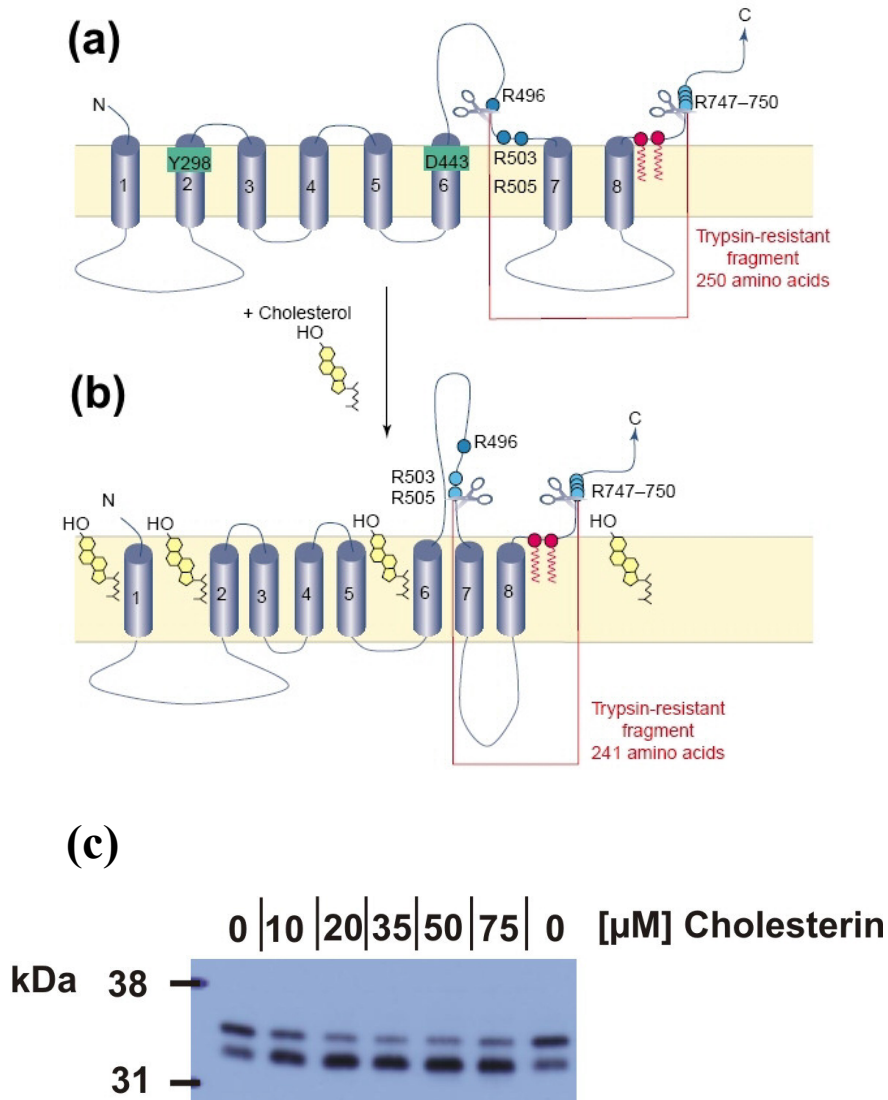


Abbildung 68: Wenn SCAP Cholesterin bindet, dann ändert es seine Konformation so, dass die Argininreste in Position 503 und 505 für die Protease Trypsin zugänglicher werden. (a) Bei niedrigem Cholesteringehalt der ER-Membran schneidet Trypsin am Argininrest in Position 496 und in Position R747-750. Dabei entsteht ein etwa 32 kDa großes Fragment. (b) Erhöht man den Cholesteringehalt der Zellen, dann schneidet Trypsin an den Argininresten in Position 503 und 505. Dabei entsteht ein etwas kleineres Fragment (in Position R747-750 schneidet Trypsin sowohl bei hohem als auch bei niedrigem Cholesteringehalt der ER-Membran). (c) Membranen aus Zellen, denen für 1 h mit HPCD Cholesterin entzogen worden war, wurden für 20 min mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cholesterin wieder angereichert und mit der Protease Trypsin verdaut. Nach Deglykosylierung mit dem Enzym PNGase F wurden die Fragmente per SDS-Gel aufgetrennt und per Western-Blot (9D5-Antikörper) nachgewiesen. Bei steigender Cholesterinkonzentration wurde vor allem das kleinere Fragment gebildet. Teile (a) und (b) der Abbildung aus Gimpl, G. et al. (2002).

Erhöht sich der Cholesteringehalt der ER-Membran, dann ändert SCAP seine Konformation. Als Folge davon kann die Protease Trypsin an einer weiteren Stelle von SCAP angreifen. Bei hohem Cholesteringehalt der ER-Membran entsteht bei Trypsinspaltung vornehmlich ein um neun Aminosäuren kleineres Fragment als bei niedrigem Cholesteringehalt. Es konnte gezeigt werden, dass die Konformationsänderung von SCAP und damit die Bildung des etwas kleineren Fragmentes auch durch die Anreicherung der Membranen mit Azocholestanol stattfindet (Abb. 69, oberer Western-Blot). Bestrahlung der mit Azocholestanol behandelten Proben mit UV-Licht verstärkte noch einmal die Bildung des 241-Aminosäuren-Fragments relativ zum 250-Aminosäuren-Fragment – die kovalente Bindung des fotoreaktiven Cholesterinderivats stabilisierte also die Konformation, bei der Trypsin auch in Position 503 schneidet. Ein verzögertes Laufverhalten der Proteinfragmente des mit Azocholestanol behandelten und bestrahlten SCAP im SDS-Gel im Vergleich zum unbestrahlten Protein war bei diesem Fragment nicht zu sehen. Führte man Western-Blots mit dem gegen den Aminoterminus gerichteten HSV-Antikörper durch, dann konnten ein etwa 15 kDa großes Fragment und ein etwa 10 kDa großes Fragment nachgewiesen werden. Bei beiden Fragmenten war der Mobilitätsshift nach Azocholestanol-Behandlung und UV-Bestrahlung zu sehen (Abb. 69, unterer Western-Blot). Behandlung der SCAP-Membranen mit der Protease Chymotrypsin anstatt Trypsin erzeugte ein etwa 10 kDa großes Fragment, das ebenfalls den Mobilitätsshift nach Fotoaffinitätsmarkierung aufwies (Daten nicht gezeigt – das Experiment hierzu wurde von Dr. Christopher Adams, University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas, durchgeführt). Dieses Fragment ist wahrscheinlich identisch mit dem als schwache 10 kDa-Bande sichtbaren Fragment in Abb. 69. Chymotrypsin schneidet Peptidbindungen nach Lysin und Arginin, Chymotrypsin hingegen katalysiert die Hydrolyse von Peptidbindungen nach großen hydrophoben Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan). Es konnte gezeigt werden, dass sich dieses Fragment am N-Terminus von SCAP befinden muss (Abb. 70). Dazu wurden Zellen einmal mit einer SCAP-cDNA mit HSV-Epitop transfiziert, und zur Kontrolle wurden Zellen mit einer SCAP-cDNA transfiziert, die kein HSV-Epitop hatte. Nach Behandlung der Membranen mit Chymotrypsin war das 10 kDa-Fragment nur mit dem HSV-Antikörper nachweisbar. Und nachweisbar war es nur dann, wenn die Membranen das HSV-SCAP enthielten. Das Fragment entsprach also dem N-Terminus von SCAP und enthielt die erste Transmembrandomäne.

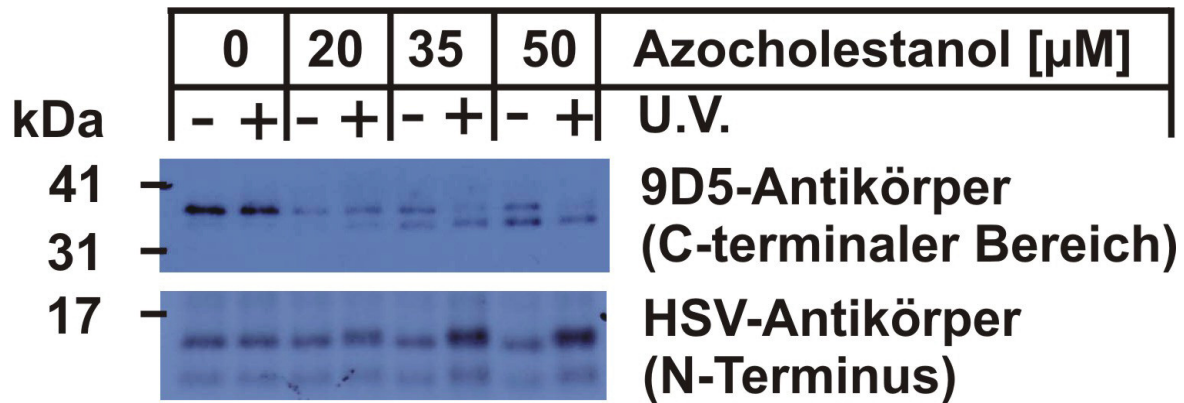


Abbildung 69: Fotoaffinitätsmarkierung von SCAP TM 1-8, Trypsinspaltung und Analyse per Westernblot. SRD13A-Zellen wurden mit den cDNAs für SCAP-TM 1-8 und Insig 1 transfiziert. Den Zellen wurde für 2 h mit HPCD Cholesterin entzogen. Die Zellmembranen wurden dann mit den angegebenen Konzentrationen an Azocholestanol inkubiert. Jeweils die Hälfte einer Probe wurde mit UV-Licht bestrahlt. Die andere Hälfte wurde bis zur Analyse der Probe im Dunkeln aufbewahrt. Die Proteine wurden mit einem 8%igem Tris-Glycin-SDS-Gel (oberer Blot) oder einem 15%igem Tricin-SDS-Gel (unten) aufgetrennt. Der Western-Blot wurde mit einem gegen das C-terminale 9D5-Epitop (oben) oder gegen das N-terminale HSV-Tag gerichteten Antikörper durchgeführt. Bei dem HSV-Blot war ein etwa 15 kDa und (schwächer) ein etwa 10 kDa großes Fragment zu sehen. Ab einer Azocholestanol-Konzentration von 20 μM war der Mobilitätsshift bei den beiden HSV-Fragmenten zu sehen. Bei dem 9D5-Blot konnte bei niedriger Azocholestanol-Konzentration das 250-Aminosäuren-Fragment nachgewiesen werden. Bei steigender Azocholestanol-Konzentration dann verstärkt das 241-Aminosäuren-Fragment. Der Mobilitätsshift zwischen markiertem und unmarkiertem Protein war hier nicht zu sehen. Bestrahlung der mit Azocholestanol behandelten Proben mit UV-Licht verstärkte die Bildung des 241-Aminosäuren-Fragments relativ zum 250-Aminosäuren-Fragment.

Es wurden auch Experimente durchgeführt, um mittels Massenspektrometrie den Bereich von SCAP zu identifizieren, der das Azocholestanol bindet. Dieser Versuchsansatz sollte auch eine genaue Aussage darüber ermöglichen, wie viele Azocholestanol-Moleküle an SCAP binden. Für diese Experimente wurden HEK-Zellen verwendet, die SCAP-TM-1-6 stabil exprimierten. Das SCAP enthielt ein Flag-Epitop, ein Myc-Epitop und ein Calmodulin-Bindemotiv. Aus den in Suspension kultivierten Zellen (1 L) wurden Membranen präpariert. Die Membranen wurden für 20 min mit 200 μM Azocholestanol inkubiert. Ein Teil der Membranen wurde mit UV-Licht bestrahlt. Die Membranen wurden mit dem Detergenz Fos13 solubilisiert. Die Isolierung von SCAP erfolgte über ein zweistufiges Verfahren: zuerst wurde das Solubilisat mit M2-Anti-Flag-Beads inkubiert. In einem zweiten Schritt wurde das Eluat an eine Calmodulin-Affinitätsmatrix gebunden. Das Eluat wurde mit Aceton präzipitiert. Das Proteinpellet wurde mit einer Mischung aus 50 % Wasser und 50 % Acetonitril resuspendiert.

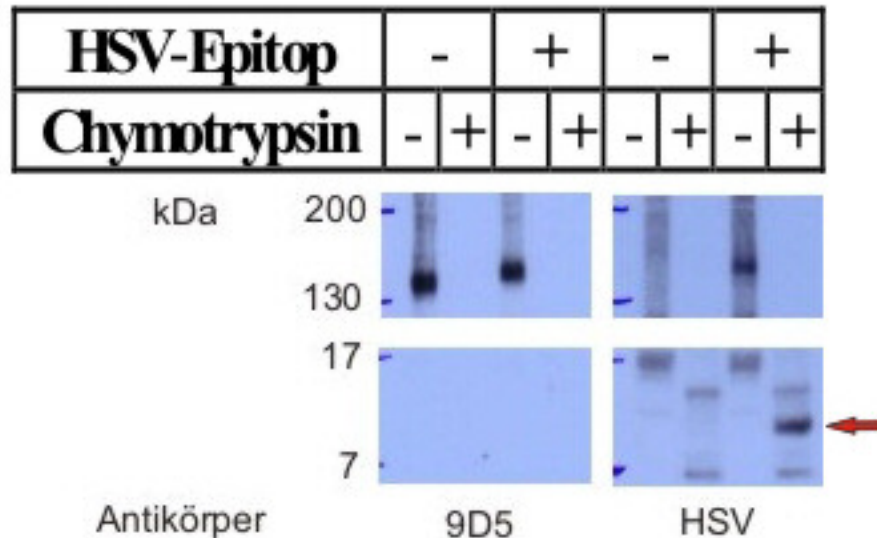


Abbildung 70: Chymotrypsinspaltung von SCAP erzeugt ein N-terminales, etwa 10 kDa großes Fragment. SRD13A-Zellen wurden mit Insig-1 und HSV-SCAP (Spur 3,4,7,8) oder SCAP-Myc ohne HSV-Tag (Spur 1,2,5,6) transfiziert. Den Zellen wurde mit HPCD für 2 h Cholesterin entzogen. Ein Teil der Membranen dieser Zellen wurde mit der Protease Chymotrypsin behandelt, der andere Teil blieb unbehandelt. Die Proteine der unbehandelten Membranen wurden mit 8 % Tris-Glycin-SDS-Gelen aufgetrennt (obere beide Gele). Die Proteinfragmente der mit Trypsin behandelten Membranen wurden mit 15 % Tricin-SDS-Gelen aufgetrennt. Der Nachweis per Western-Blot erfolgte mit einem gegen das 9D5-Epitop gerichteten Antikörper (linke beide Gele) oder einem gegen das N-terminale HSV-Tag gerichteten Antikörper (rechte beide Gele). Das 10 kDa-Fragment (roter Pfeil) kann nur mit dem gegen den N-Terminus gerichteten HSV-Antikörper nachgewiesen werden – und dies nur bei den Membranen, die das HSV-SCAP exprimieren. Die oberen beiden Blots zeigen das ungespaltene SCAP mit einem Molekulargewicht von etwa 135 kDa (das HSV-SCAP ist etwas leichter als das SCAP-Myc).

Ein kleiner Teil des Eluats wurde per Western-Blot mit einem gegen das Myc-Epitop gerichteten Antikörper analysiert (Abb. 71). Ein größerer Teil des Eluats wurde per ESI-Massenspektrometrie untersucht (die Spektren wurden von Dr. Bikash Pramanik, University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas, aufgezeichnet). Es konnte dabei jedoch weder das unmarkierte noch das markierte Protein nachgewiesen werden. Das Proteinpellet ließ sich nur schlecht in Acetonitril-Wasser-Gemischen lösen. Die Analyse per Massenspektrometrie war jedoch nur mit diesem Lösungsmittelgemisch möglich. Bei einem weiteren Massenspektrometrie-Experiment wurde das mit der oben beschriebenen Methode isolierte SCAP auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Die deutlich sichtbaren Banden des unmarkierten und des markierten Proteins wurden ausgeschnitten, die Gelstücke wurden mit Trypsin verdaut und per Massenspektrometrie (ESI) analysiert.

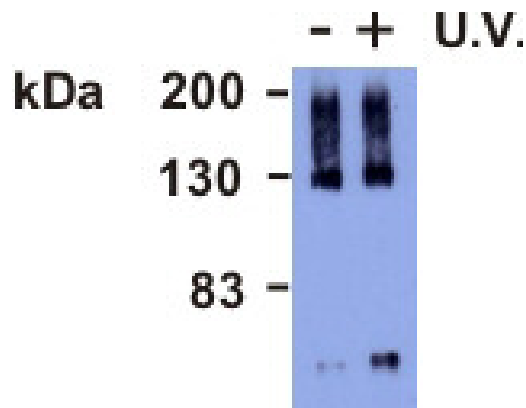
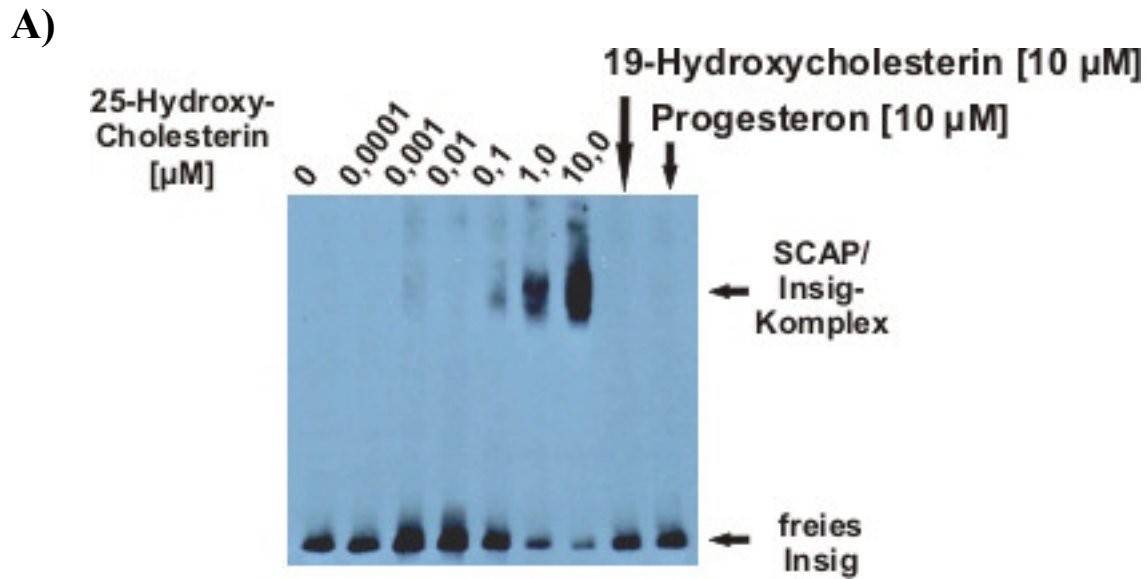


Abbildung 71: Isolierung von SCAP-TM-1-6 mittels Anti-Flag Affinitätsmatrix und Calmodulin-Affinitätsmatrix. SCAP-Membranen (je 120 mg unmarkiert und mit 200 μ M Azocholestanol markiert) wurden mit dem Detergens Fos13 solubilisiert. Nach der zweistufigen Isolierung von SCAP wurde die markierte und die unmarkierte Probe in jeweils 100 μ L Acetonitril/Wasser (1:1) aufgenommen. Je 5 μ L davon wurden für den hier gezeigten Western-Blot verwendet (Myc-Antikörper). Der Rest wurde per Massenspektrometrie analysiert. SCAP war bei einem Molekulargewicht von etwa 65 kDa zu sehen – das markierte Protein erzeugte eine etwas stärkere Bande als das unmarkierte. Die Bande bei 130 kDa kam wahrscheinlich durch ein SCAP-Dimer zu Stande.

Trypsinverdau und Aufzeichnung der Spektren wurden von Prof. Dr. Hongjung Shu und Mitarbeitern, University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas, durchgeführt. Per Massenspektrometrie konnten einige SCAP-Fragmente nachgewiesen werden. Ein Unterschied in der Masse bei den Fragmenten, die vom markierten Protein stammten im Vergleich zu denen vom unmarkiertem Protein, konnte nicht beobachtet werden. Es konnten nur Fragmente detektiert werden, die in Bereichen außerhalb der Transmembranregionen lagen. Vor der Analyse per Massenspektrometrie wurden die Trypsin-Fragmente mit einer reversed-phase-Säule gereinigt. Möglicherweise sind die Fragmente, die den hydrophoben Transmembranbereichen von SCAP entsprechen, nicht von der Säulenmatrix eluiert worden. Es wurden auch Markierungsexperimente mit radioaktivem Azocholestanol durchgeführt. Das radioaktiv markierte SCAP wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde nach dem Lauf auf eine Membran geblottet, und die Membran wurde mit einer Imaging-Platte inkubiert, die Betastrahlung detektieren konnte. Wegen der relativ langen Inkubationszeiten, die für die Detektion der Radioaktivität nötig war, wurde die Analyse per Western-Blot, partieller Proteolyse und Mobilitätsshift bevorzugt.

4.5 Untersuchungen zur Regulation der SCAP-Insig-Interaktion durch Cholesterin und 25-Hydroxycholesterin

Ziel dieser Experimente war es, die durch Cholesterin oder 25-Hydroxycholesterin ausgelöste Interaktion von SCAP mit Insig zu untersuchen. Mit Hilfe von SCAP-Punktmutanten sollte herausgefunden werden, ob bestimmte, evolutionär konservierte Aminosäurereste von SCAP für die Interaktion mit Insig wichtig sind. Untersucht wurde die SCAP-Insig-Interaktion mit Hilfe von Blue-Native-Gelen. Die Interaktion von SCAP mit Insig wurde ab einer Konzentration von 0,1 μM 25-Hydroxycholesterin ausgelöst (Abb. 72). Das 25-Hydroxycholesterin wurde dem Nährmedium der Zellen zugesetzt, und die Zellen wurden für 5 h damit inkubiert. Behandelte man die Zellen mit 19-Hydroxycholesterin, das sich vom 25-Hydroxycholesterin nur durch die Position der OH-Gruppe unterscheidet, so war auch bei der relativ hohen Konzentration von 10 μM keine Interaktion von SCAP mit Insig zu sehen. Auch die Behandlung mit Progesteron löste keine Bildung von Proteinkomplexen aus. Die Interaktion von SCAP mit Insig konnte auch induziert werden, wenn man isolierte Zellmembranen mit 25-Hydroxycholesterin behandelte (Abb. 73). Die Interaktion wurde ab einer Konzentration von 1 μM induziert. Dies zeigt, dass es sich bei der Regulation der Cholesterin-Biosynthese durch 25-Hydroxycholesterin um einen nicht-genomischen Effekt handeln muss. Es ist auch ein starker Hinweis darauf, dass kein cytosolisches Protein an diesem Regulationsmechanismus beteiligt ist, sondern dass das 25-Hydroxycholesterin nur auf Membranproteine wirkt. SCAP konnte auch dann zur Interaktion mit Insig gebracht werden, wenn man die Zellmembranen mit Cholesterin inkubierte (Abb. 74). Die für eine Interaktion nötige Cholesterinkonzentration war mit 25 μM zehnmal so groß wie die benötigte Konzentration von 25-Hydroxycholesterin. Abbildung 75 zeigt, dass sich die Interaktion von SCAP mit Insig außer durch die Behandlung der Zellen mit 25-Hydroxycholesterin auch durch Anreicherung der Zellen mit Cholesterin induzieren ließ. Bei einer SCAP-Punktmutante (Y298C) ließ sich diese Interaktion jedoch weder durch Cholesterin noch durch 25-Hydroxycholesterin induzieren. Derselbe Effekt war auch bei der Inkubation von Membranen der Y298C-Mutante zu sehen (Abb. 76). Die Behandlung der Membranen mit steigenden Konzentrationen an 25-Hydroxycholesterin führte ab einer Konzentration von 1 μM zur Interaktion des SCAP-Wildtyps mit Insig. Bei der Y298C-Mutante war jedoch auch bei relativ hoher Konzentration keine Komplexbildung von SCAP und Insig zu sehen. Die Behandlung sowohl der SCAP-Wildtyp-Membranen als auch der Y298C-Membranen mit Progesteron oder 19-Hydroxycholesterin führte zu keiner Interaktion von SCAP mit Insig.



B)

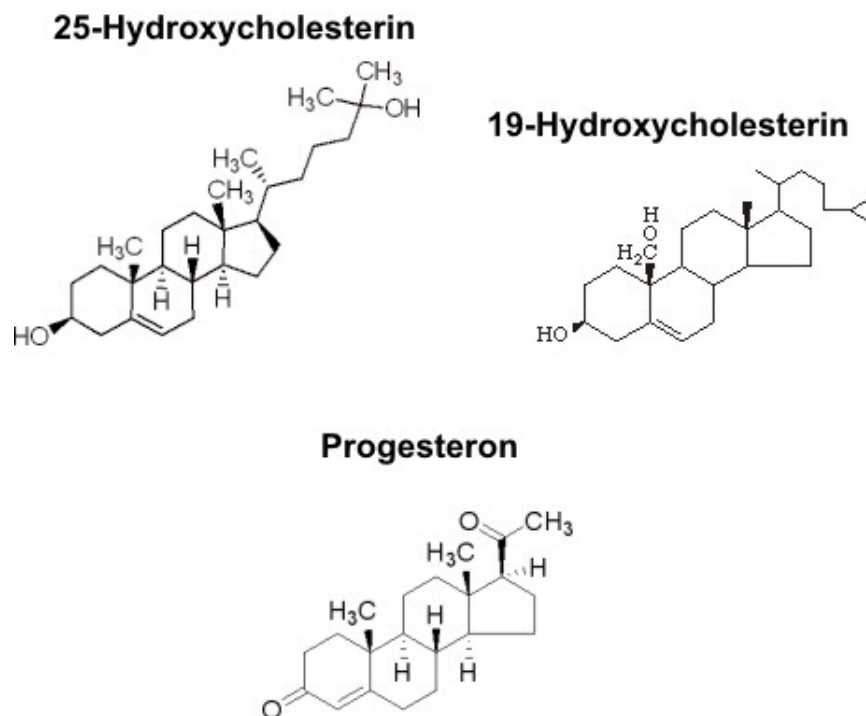


Abbildung 72: Regulation der SCAP-Insig-Interaktion bei steigender 25-Hydroxycholesterin-Konzentration. (A) SRD13A-Zellen wurden mit SCAP, Insig-1 und SREBP-2 transfiziert. Nach einstündiger Inkubation mit HPCD wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von 25-Hydroxycholesterin behandelt. Die Interaktion wurde ab einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ 25-Hydroxycholesterin ausgelöst. Zur Kontrolle wurden Zellen auch mit 19-Hydroxycholesterin und Progesteron behandelt. Diese beiden Sterole induzierten auch bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ keine Komplexbildung. (B) Das 19-Hydroxycholesterin unterscheidet sich vom 25-Hydroxycholesterin nur durch die Position der Hydroxylgruppe. Das Progesteron weist zwei Ketogruppen auf.

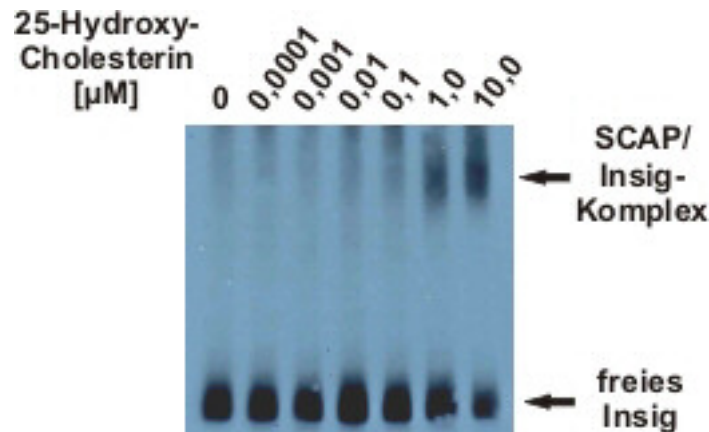


Abbildung 73: Die Bildung des SCAP-Insig-Komplexes lässt sich auch bei isolierten Zellmembranen mit 25-Hydroxycholesterin induzieren. SRD13A-Zellen wurden mit SCAP, Insig-1 und SREBP-2 transfiziert. Nach einstündiger Inkubation mit HPCD wurden die Zellen geerntet und Zellmembranen präpariert. Die Membranen wurden für 20 min bei Raumtemperatur mit unterschiedlichen Konzentrationen an 25-Hydroxycholesterin (2,5 mM in Ethanol) inkubiert. Die Interaktion trat ab einer Konzentration von 1 μM auf.

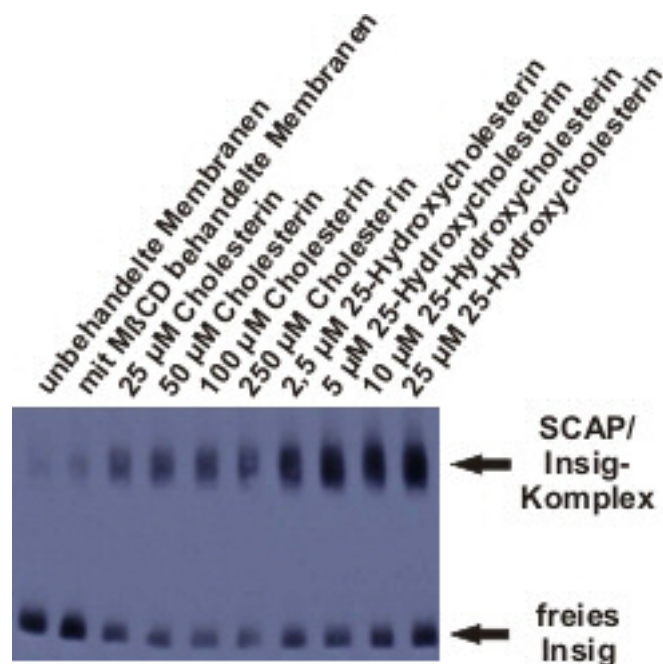


Abbildung 74: Die Interaktion lässt sich sowohl durch 25-Hydroxycholesterin als auch durch Cholesterin auslösen. SRD13A-Zellen wurden mit SCAP und Insig-1 transfiziert. Nach einstündiger Inkubation mit HPCD wurden die Zellen geerntet und Zellmembranen präpariert. Die Membranen wurden für 20 min bei Raumtemperatur mit Cholesterin (25 mM in Cyclodextrin-Komplexen) oder 25-Hydroxycholesterin (2,5 mM in Cyclodextrin-Komplexen) inkubiert. Die Membranen wurden mit dem Detergens NP40-alternative (Calbiochem) solubilisiert. Das Solubilisat wurde per Blue-Native-Gel analysiert. Eine zehnfach niedrigere Konzentration an 25-Hydroxycholesterin (2,5 μM) im Vergleich zu Cholesterin (25 μM) reichte aus, um die Bildung von SCAP-Insig-Komplexen zu induzieren.

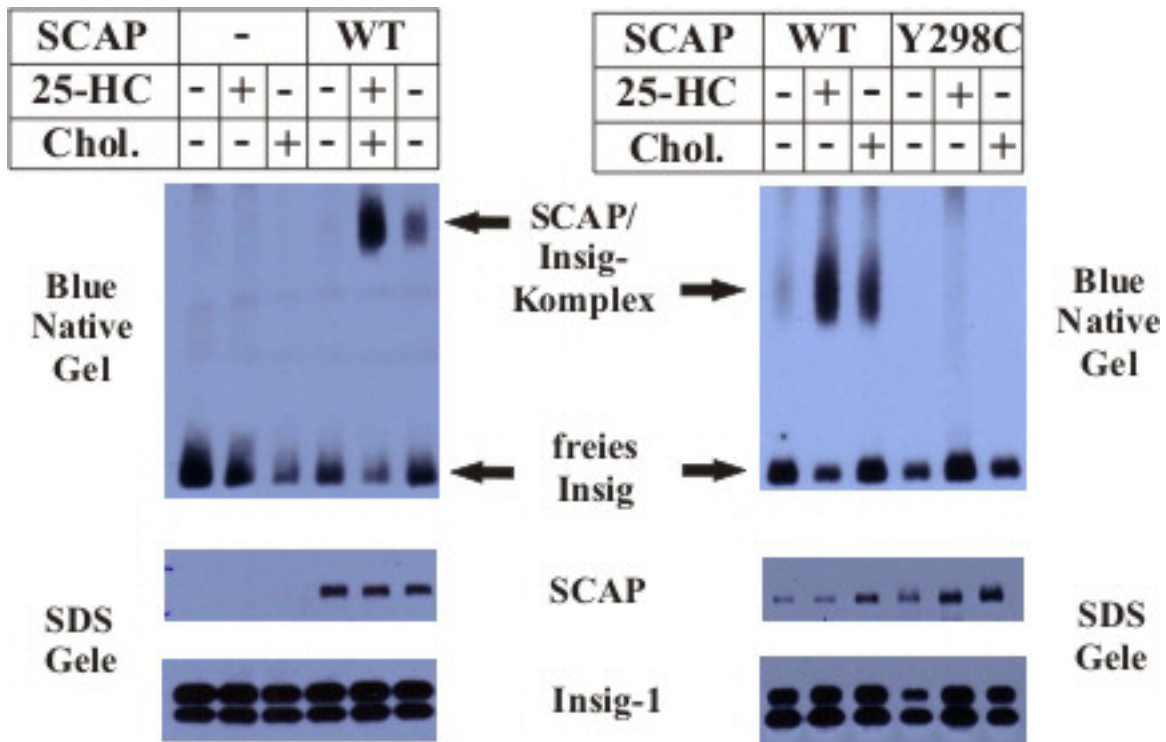


Abbildung 75: Stimulation der SCAP-Insig-Interaktion durch Cholesterin und 25-Hydroxycholesterin (25-HC). SCAP-defiziente SRD13A-Zellen wurden mit 0,05 μg pCMV-Insig-1-Myc und 2 μg TK-HSV-SREBP-2 transfiziert. Für die unter WT gezeigten Proben wurden Zellen außerdem noch mit 1,25 μg SCAP-Wildtyp transfiziert. Bei den unter Y298C gezeigten Proben wurden die Zellen zusätzlich noch mit 1,25 μg der SCAP-Mutante Y298C transfiziert. Den Zellen wurde mit HPCD-Medium für 1,5 h (Gele auf der linken Seite) bzw. 1 h (rechts) Cholesterin entzogen. Die Zellen wurden danach für 6 h mit 25 μM Cholesterin oder 2,5 μM 25-Hydroxycholesterin behandelt. Beide Sterole wurden in Form von Cyclodextrin-Komplexen zum Medium gegeben. Nachdem die Membranen mit dem Detergens NP40-alternative lysiert worden waren, wurde mit Blue Native Gelen untersucht, ob sich SCAP-Insig-Komplexe gebildet hatten. Die lysierten Membranen wurden auch per SDS-Gel auf die Expression von SCAP und Insig untersucht. Beim SCAP-Wildtyp wurden sowohl bei der Behandlung mit 25-Hydroxycholesterin als auch bei der Behandlung mit Cholesterin SCAP-Insig-Komplexe gebildet. Bei der Y298C-Mutante waren diese Proteinkomplexe nicht gebildet worden.

Bei der Untersuchung von SCAP-Punktmutanten stand neben dem Tyrosin in Position 298 auch der Aspartatrest in Position 428 in der sechsten Transmembrandomäne von SCAP im Zentrum des Interesses. Dieser Aminosäurerest ist bei einer Vielzahl von Spezies evolutionär konserviert. Tauschte man den Aspartatrest in Position 428 gegen Alanin aus, so führte dies dazu, dass SCAP konstitutiv, d.h. auch ohne Behandlung mit 25-Hydroxycholesterin oder Cholesterin, mit Insig interagiert (Abb. 77). Im Gegensatz dazu interagiert die Y298C-Mutante auch bei Behandlung mit 25-Hydroxycholesterin nicht mit Insig.

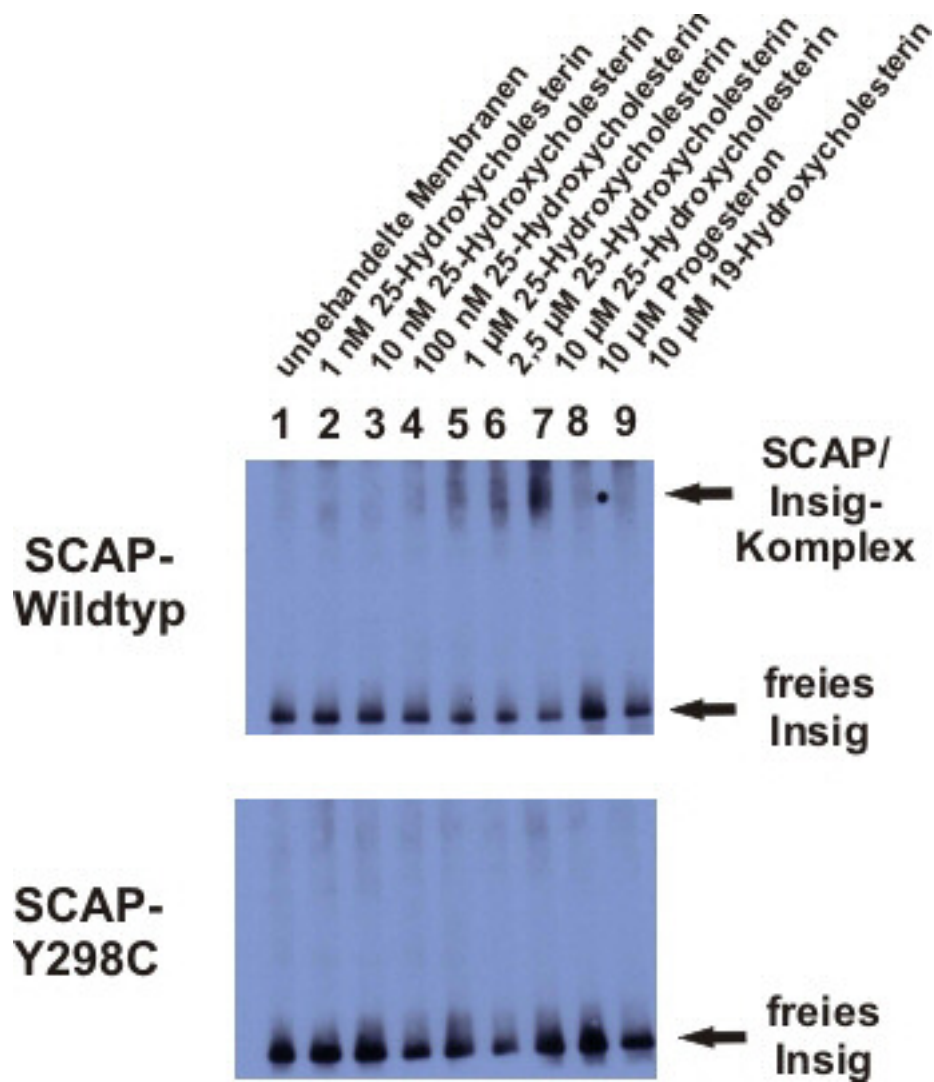


Abbildung 76: Vergleich des SCAP-Wildtyps mit der Y298C-Mutante. Membranen von SRD13A-Zellen, die mit Insig-1 und entweder SCAP oder der SCAP-Mutante Y298C transfiziert worden waren, wurden für 20 min mit verschiedenen Konzentration an 25-Hydroxycholesterin oder Progesteron oder 19-Hydroxycholesterin inkubiert. Die Membranen wurden solubilisiert und per Blue-Native-Gel analysiert. Bei den Membranen, die den SCAP-Wildtyp exprimierten, bildeten sich ab einer Konzentration von 1 µM Proteinkomplexe aus SCAP und Insig. Bei der Mutante ließ sich im Gegensatz zum Wildtyp bei steigender 25-Hydroxycholesterin-Konzentration keine Interaktion mit Insig induzieren. Beim SCAP-Wildtyp (und bei der Mutante) war auch durch hohe Konzentrationen von Progesteron oder 19-Hydroxycholesterin keine Komplexbildung auslösbar.

Die zur Kontrolle der Expression der beiden Proteine durchgeführten SDS-Gele mit anschließendem Western-Blot zeigten, dass die Expression von Insig sichtbar vermindert war, wenn es von den Zellen alleine ohne SCAP exprimiert wurde und wenn es bei der Y298C-Mutante nicht mit SCAP wechselwirken konnte. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Insig in der Zelle offenbar verstärkt abgebaut wird, wenn es nicht mit SCAP interagiert. Die im Western-

Blot durch SCAP verursachte Bande erschien beim SCAP-Wildtyp schärfer, wenn die Probe mit 25-Hydroxycholesterin behandelt worden war, als ohne Behandlung. Dies ist ein Hinweis darauf, dass bei der mit 25-Hydroxycholesterin behandelten Probe das SCAP im ER verblieb und nicht im Golgi glykosyliert wurde. Bei der Y298C-Mutante, die ja nicht zur Interaktion mit Insig gebracht werden kann, war SCAP offenbar auch ohne die Sterolbehandlung glykosyliert worden – die Banden im SDS-Gel waren ohne und mit Sterolbehandlung gleich breit. Bei der D428A-Mutante hatte offenbar auch bei der nicht behandelten Probe keine Glykosylierung, bzw. kein Transport von SCAP vom ER zum Golgi stattgefunden.

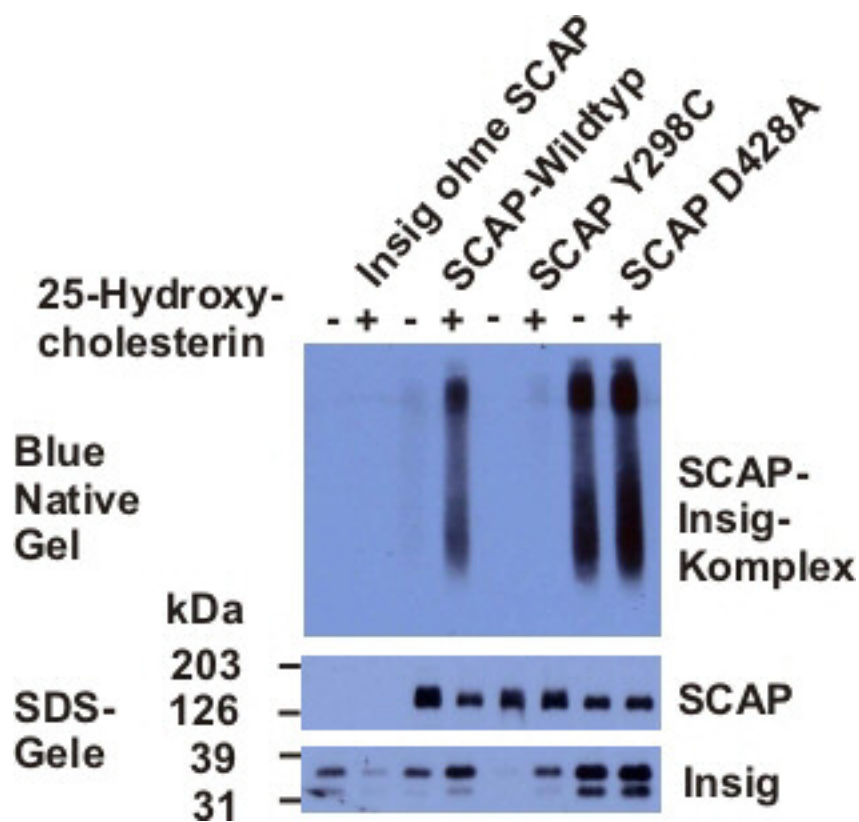


Abbildung 77: Die SCAP-Y298C-Mutante kann nicht durch 25-Hydroxycholesterin zur Interaktion mit Insig gebracht werden. Die D428A-Mutante interagiert auch in Abwesenheit von 25-Hydroxycholesterin mit Insig. SRD13A-Zellen wurden mit Insig-1-Myc und SCAP oder den SCAP-Mutanten Y298C oder D428A transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurde den Zellen für 2 h mittels Hydroxypropyl-Cyclodextrin Cholesterin entzogen. Im Anschluss daran wurde jeweils die eine Hälfte der Zellen für 5 h mit 25-Hydroxycholesterin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final) behandelt, die andere Hälfte wurde in normalem Zellkulturmedium inkubiert. Jeweils 30 μg der Zellmembranen wurden für das Blue-Native-Gel verwendet und jeweils 10 μg für das SDS-Gel. Die Proteine wurden geblottet, und der Western-Blot wurde mit einem Antikörper gegen das Myc-Epitop von Insig (Blue Native Gel und unteres SDS-Gel) oder mit einem Antikörper gegen die Peptidsequenz von SCAP (oberes SDS-Gel) durchgeführt.

Tauschte man den Aspartatrest in Position 428 gegen einen Glutamatrest aus (D428E), so verhielt sich diese Mutante ähnlich wie der SCAP-Wildtyp (Abb. 78). Durch Behandlung mit 25-Hydroxycholesterin bildeten sich SCAP-Insig-Proteinkomplexe. Im Unterschied zum Wildtyp interagierte hier jedoch ein kleiner Teil der SCAP-Moleküle auch ohne die Behandlung mit dem Sterol. Der Austausch des Aspartatrests gegen Asparagin führte dazu, dass diese SCAP-D428N-Mutante ebenso wie beim Austausch gegen Alanin (D428A) konstitutiv mit Insig interagierte. Wurde das Aspartat durch Arginin ersetzt (D428R), dann interagierte diese SCAP-Mutante nur noch vermindert mit Insig. Der Austausch gegen Lysin (D428K) führte zu einer noch stärkeren Verminderung der SCAP-Insig-Interaktion.

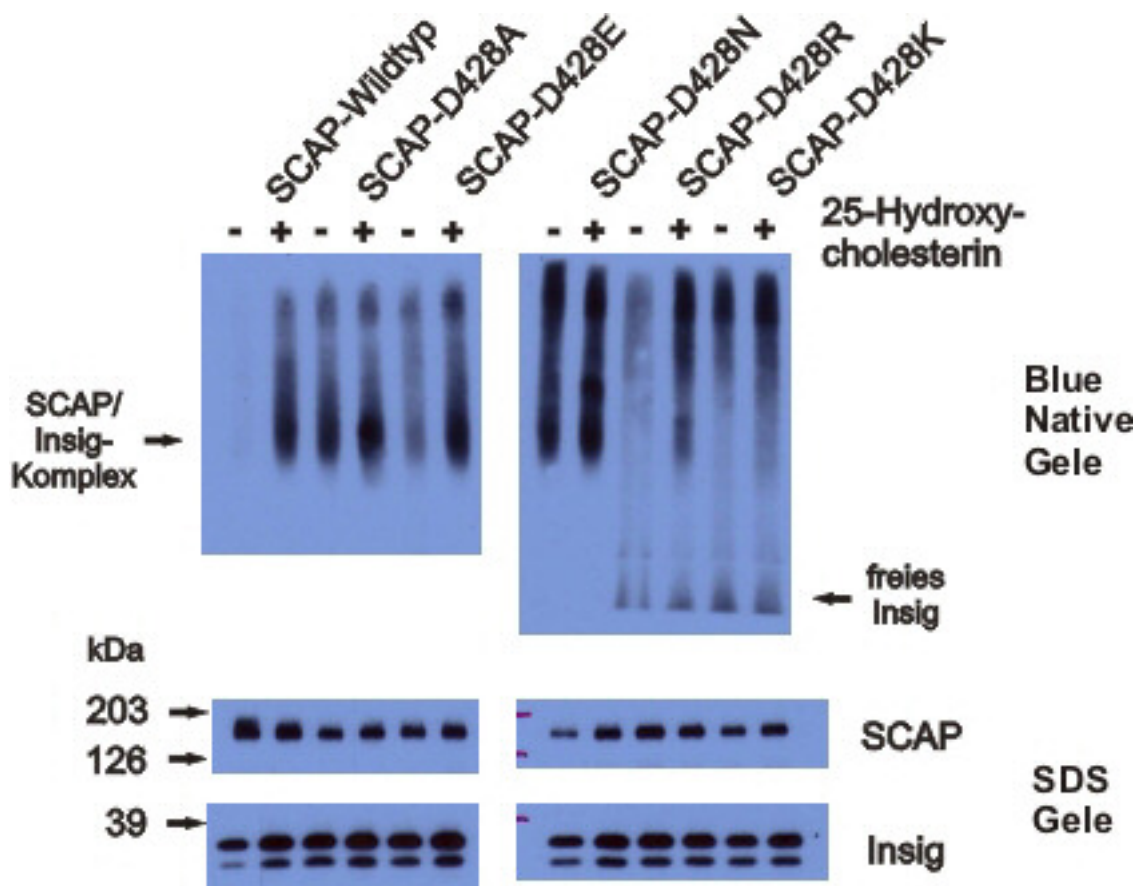


Abbildung 78: Analyse von SCAP-D428-Punktmutanten per Blue Native Gel. SRD13A-Zellen wurden mit Insig-1-Myc und SCAP-Wildtyp oder den SCAP-Mutanten D428A oder D428E oder D428N oder D428K transfiziert. Die Interaktion der SCAP-Mutanten mit Insig wurde per Blue Native Gel und anschließendem Western-Blot untersucht. Zusätzlich wurde per SDS-Gel und Western-Blot überprüft, ob die Expression von SCAP und Insig bei allen Proben gleichmäßig war.

Die D428R- und die D428K-Mutante wurden auch hinsichtlich ihrer Regulierbarkeit durch Cholesterin getestet (Abb. 79). Die D428R-Mutante, bei der das Aspartat durch Arginin ersetzt worden war, interagiert ab einer Cholesterinkonzentration von 40 μM mit Insig. Diese Mutante lässt sich also schwerer zur Interaktion mit Insig bringen als der SCAP-Wildtyp, bei dem schon bei einer Cholesterinkonzentration von 25 μM eine stärkere Interaktion zu sehen war (Abb. 75). Beim Austausch gegen Lysin (D428K) fand überhaupt keine SCAP-Insig-Interaktion mehr statt.

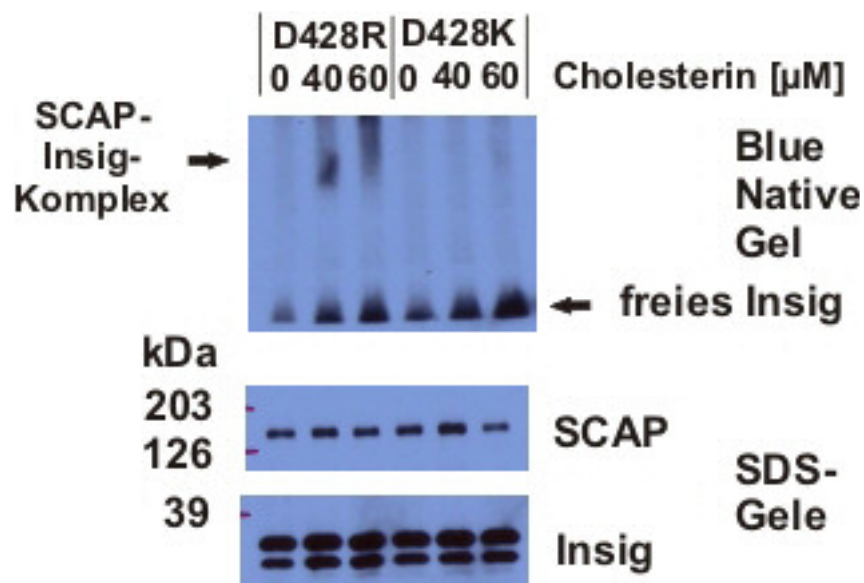


Abbildung 79: Einfluss von Cholesterin auf die SCAP-Mutanten D428R und D428K. SRD13A-Zellen wurden mit Insig-1-Myc und der SCAP-Mutante K305A transfiziert. Nachdem den Zellen mittels HPCD Cholesterin entzogen worden war, wurden sie für 5 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cholesterin inkubiert. Per Blue Native Gel wurde die Interaktion von SCAP mit Insig überprüft und per SDS-Gel, ob beide Proteine gleichmäßig exprimiert wurden. Beim Austausch des Aspartats in Position 428 von SCAP gegen Arginin findet eine Interaktion mit Insig noch statt. Austausch gegen Lysin macht SCAP jedoch insensitiv gegenüber Cholesterin, so dass keine Interaktion mit Insig mehr stattfindet.

Es wurden noch drei weitere SCAP-Punktmutanten getestet (Abb. 80). Bei der K305A-Mutante war ein Lysinrest in gegen Alanin ausgetauscht worden. Diese Mutation liegt in der ersten cytosolischen Schleife von SCAP. Das Lysin an dieser Stelle ist bei einer großen Zahl von Spezies evolutionär konserviert. Bei der L352F-Mutation ist ein Leucinrest gegen Phenylalanin ausgetauscht worden. Bei der N360A-Punktmutante ist ein Asparaginrest durch einen Alaninrest ersetzt worden. Die N360A-Mutation befindet sich ebenso wie die L352F-Mutation in der vierten Transmembrandomäne von SCAP.

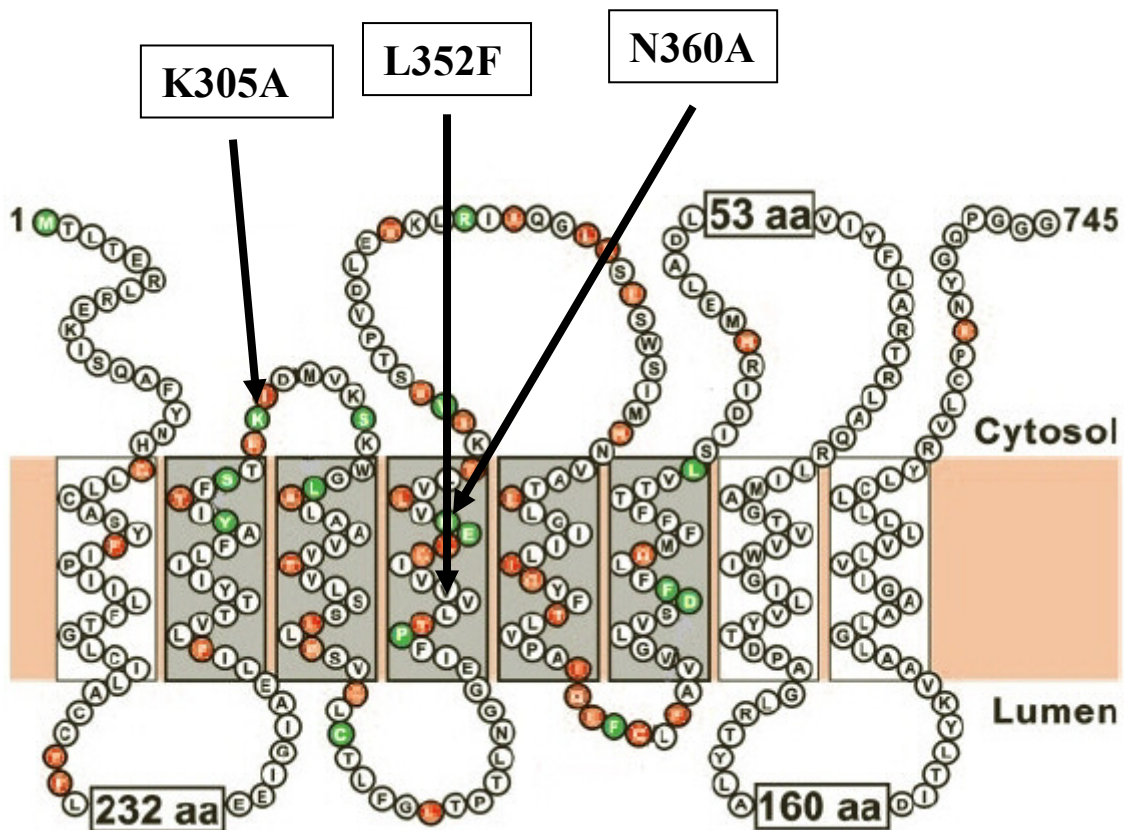


Abbildung 80: Position der K305A-, L352F- und der N360A-Punktmutationen.
Abbildung (modifiziert) aus Feramisco et al. (2005).

Der Austausch von Lysin gegen Alanin in Position 305 führte zu keiner Änderung der Funktionalität von SCAP (siehe Abbildung 81). Durch Inkubation mit 25-Hydroxycholesterin wurde die SCAP-Insig-Interaktion ausgelöst. Auch der Austausch des Methionins in Position 360 gegen Alanin zeigte keine Veränderung gegenüber dem Wildtyp. Bei der Y298C-Mutante fand keine Interaktion zwischen SCAP und Insig statt. Wurde Leucin in Position 352 jedoch gegen Phenylalanin ausgetauscht, fand die Interaktion auch in Abwesenheit von 25-Hydroxycholesterin statt. In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass die K305A-Mutante ebenso wie der SCAP-Wildtyp durch Cholesterin reguliert werden kann (Abb. 82).

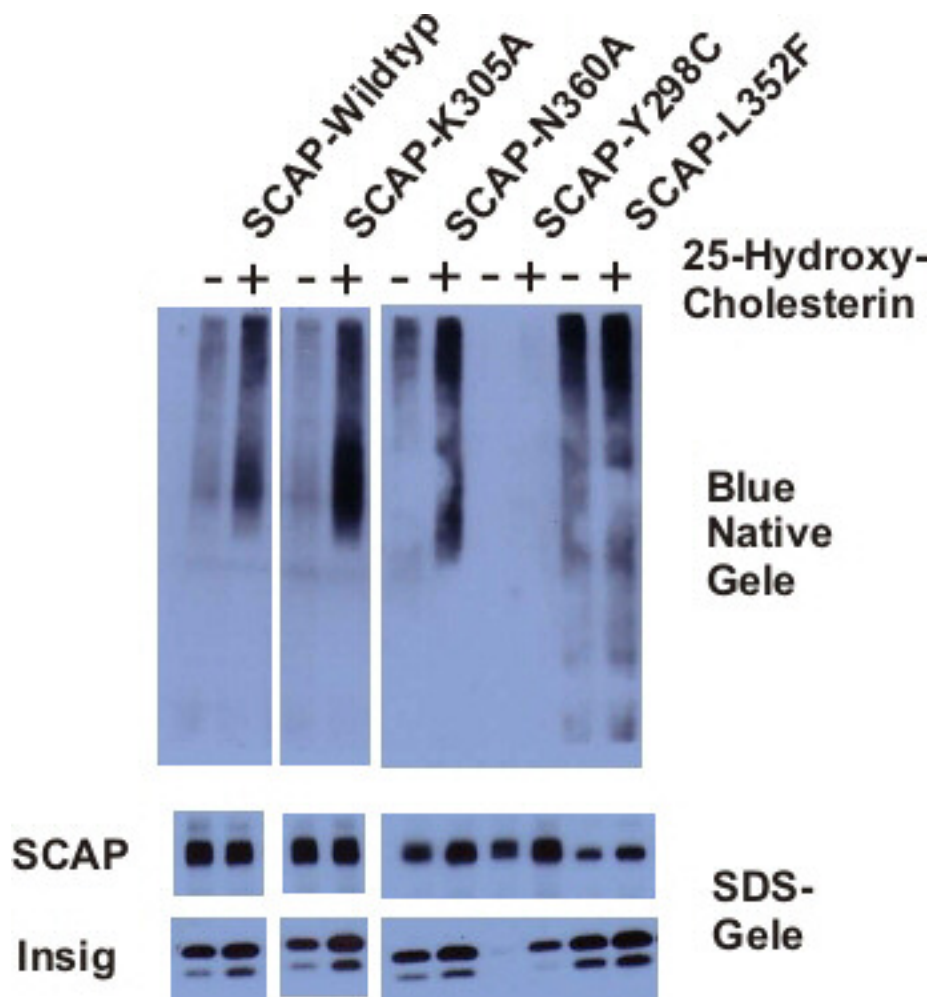


Abbildung 81: Einfluss von 25-Hydroxycholesterin auf die SCAP-Mutanten K305A, L352 und N360A. SRD13A-Zellen wurden mit Insig-1-Myc und SCAP oder den SCAP-Mutanten K305A oder N360A oder Y298C oder L352F transfiziert. Einen Tag später wurde den Zellen für 2 h mit HPCD Cholesterin entzogen. Danach wurden die Zellen für 5 h mit oder ohne 25-Hydroxycholesterin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final) inkubiert. Die Membranen wurden solubilisiert. Per Blue-Native-Gel wurde die Bildung von SCAP-Insig-Komplexen und per SDS-Gel die Expression von SCAP und Insig untersucht. Für den Nachweis der Komplexe wurde der gegen das Myc-Epitop von Insig gerichtete Antikörper 9E10 und für den Nachweis von SCAP der 9D5-Antikörper verwendet.

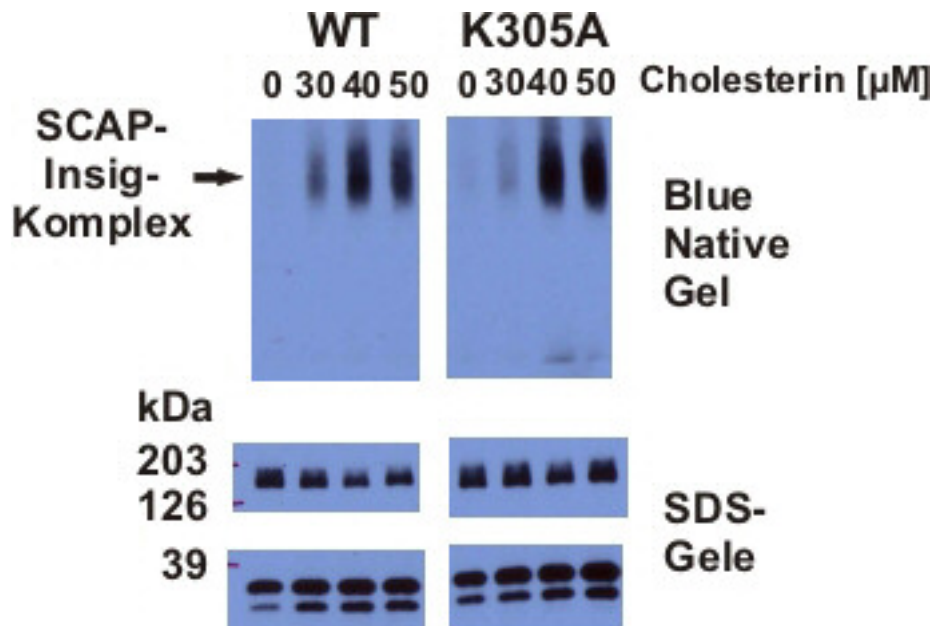


Abbildung 82: Die SCAP-K305A-Mutante wird ebenso wie der SCAP-Wildtyp durch Cholesterin reguliert. SRD13A-Zellen wurden mit Insig-1-Myc und der SCAP-Mutante K305A transfiziert. Nachdem den Zellen mittels HPCD Cholesterin entzogen worden war, wurden sie für 5 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cholesterin inkubiert. Das Cholesterin wurde in Form von Cyclodextrin-Komplexen zugegeben. Ebenso wie beim Wildtyp konnte bei einer Konzentration von 40 μM eine deutliche Interaktion von Insig mit SCAP beobachtet werden.

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung der Cholesterinbindungsstelle des StAR Proteins

Die aus den Fotoaffinitätsmarkierungen gewonnenen Daten weisen darauf hin, dass ein 6,2 kDa großes Fragment des StAR-Proteins besonders stark mit dem fotoreaktiven Cholesterinderivat markiert wird und damit einer Cholesterinbindungsstelle des StAR-Proteins entspricht. Der markierte Bereich umfasst die Aminosäuren 83 – 140 und damit einen Bereich, der fast ausschließlich aus β -Faltblättern gebildet wird (Abb. 83 und 84). Das StAR-Protein und die A218V-Mutante binden das Cholesterinanalogen sowohl bei pH 7,4 als auch bei pH 3,0 in diesem Bereich. Möglicherweise enthält dieser Bereich die Cholesterin-Bindungsstelle des StAR-Proteins und interagiert mit der äußeren Mitochondrienmembran. Bei niedrigem pH-Wert bindet dieser Bereich des StAR-Proteins jedoch weniger Azcholestanol als bei neutralem pH (sowohl beim Wildtyp als auch bei der A218V-Mutante). Möglicherweise entfaltet sich das StAR-Protein teilweise, wenn es mit dem sauren Milieu in der Nähe von Mitochondrien in Kontakt kommt, hat dadurch eine niedrigere

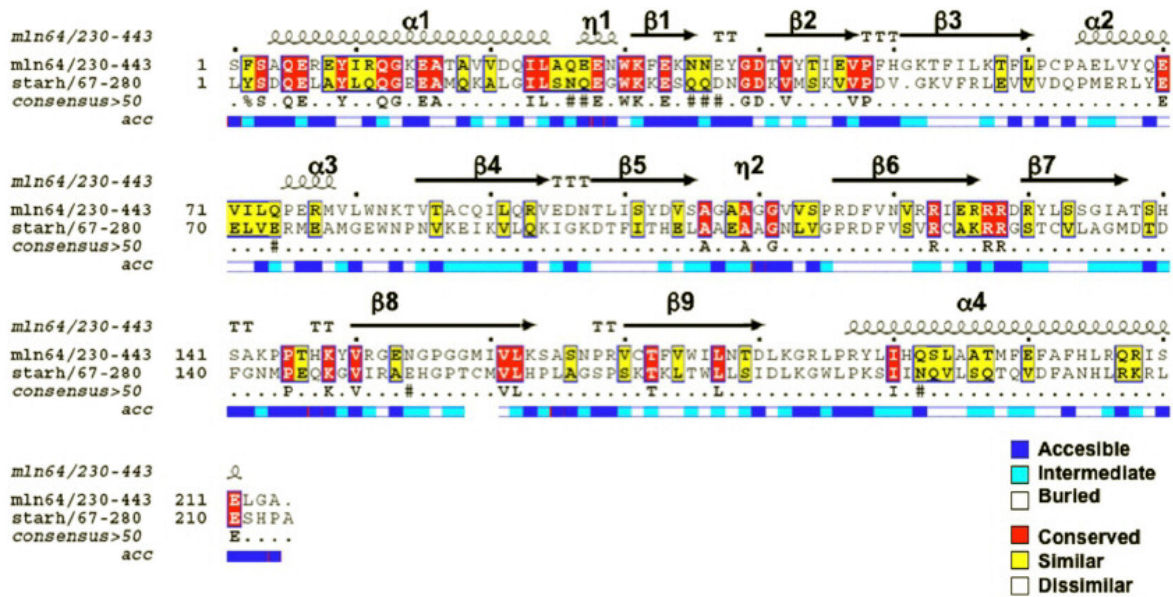


Abbildung 83: Sequenzalignment der START-Domänen von MLN64 und StAR. Der Bereich von StAR, der Azocholestanol bindet, umfasst die Aminosäuren 83-140 und damit die β -Faltblätter 4,5,6 und 7. Abbildung aus Murcia et al. (2006).

Affinität zum Cholesterin, und kann es somit leichter an die Mitochondrien abgeben. Für eine spezifische Interaktion von Cholesterin mit dem StAR-Protein spricht auch, dass beim denaturierten StAR-Protein sowohl Markierungsversuche als auch fluoreszenzspektroskopische Messungen keinen Hinweis auf Cholesterinbindung erbrachten. Die Tatsache, dass die A218V-Mutante auch Azocholestanol binden konnte, lässt sich erklären, wenn man davon ausgeht, dass StAR mit weiteren, bisher noch nicht identifizierten Proteinmolekülen wechselwirkt. Möglicherweise geht durch die A218V-Mutation die Fähigkeit von StAR verloren, mit anderen Proteinmolekülen oder der äußeren Mitochondrienmembran zu interagieren. Das fotoreaktive Cholesterinderivat ließ sich durch einen Überschuss an Cholesterin von der Bindungsstelle verdrängen. Dies spricht ebenfalls für das Vorhandensein einer spezifischen Cholesterinbindungsstelle. Ergebnisse der fluoreszenzspektroskopischen Messungen zeigen, dass StAR bei pH 7,4 das fluoreszierende Cholesterinderivat NBD-Cholesterin bindet. Bei pH 3,0 wird dieses Cholesterinderivat jedoch deutlich schwächer gebunden. Bei Messungen mit Dehydroergosterol waren die Unterschiede zwischen pH 7,4 und pH 3,0 allerdings weniger stark ausgeprägt. Das fluoreszierende Cholesterinderivat Dehydroergosterol bindet an das StAR-Protein auch bei saurem pH-Wert. Möglicherweise kommt dieser Effekt dadurch zu Stande, dass die fluoreszierende Gruppe des NBD-Cholesterins bei pH 3 protoniert wird.

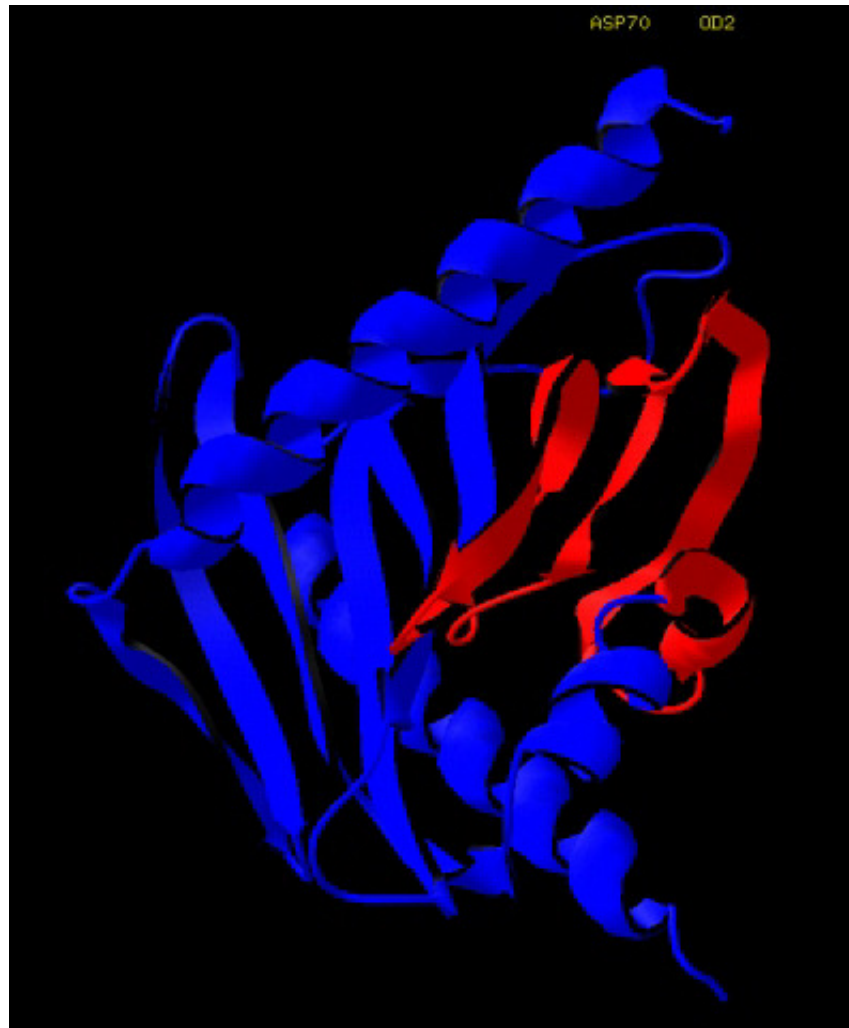


Abbildung 84: Struktur des StAR-Proteins. Der rot markierte Bereich entspricht dem 6,2 kDa-Fragment, das bei der Fotoaffinitätsmarkierung mit dem Azocholestanol besonders stark markiert wurde. Für die Darstellung wurde das Programm Swiss-PDB-Viewer verwendet. Die Struktur wurde ausgehend vom MLN64 errechnet. Die Struktur von MLN64 konnte per Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden. Das MLN64 besitzt 35 % Sequenzhomologie zum StAR-Protein.

Das dadurch positiv geladene NBD-Cholesterin hätte dann möglicherweise eine erniedrigte Affinität zum StAR-Protein. Mehrere Argumente sprechen dafür, dass StAR seine Wirkung nur dann entfalten kann, wenn es eine teilweise entfaltete Tertiärstruktur annimmt. Bose et al. (1999) führten Experimente mit CD-Spektroskopie bei unterschiedlichen pH-Werten durch. Bei einem pH-Wert von 3,5 nahm das StAR-Protein eine teilweise entfaltete Konformation an. Sie stellten die Hypothese auf, dass diese teilweise entfaltete Konformation auch in vivo eine Rolle spielen könnte. In der Nähe der Mitochondrien herrscht ein erniedrigter pH-Wert, der durch den Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran verursacht wird. In

der teilweise entfalteten Konformation kann das StAR-Protein möglicherweise besser mit der äußeren Mitochondrienmembran wechselwirken oder besser Cholesterin binden. Vielleicht werden auch bestimmte Aminosäurereste des StAR-Proteins durch den erniedrigten pH-Wert protoniert. Die dadurch stärker positiv geladenen Bereiche des StAR-Proteins könnten dann besser mit negativ geladenen Kopfgruppen von mitochondrialen Phospholipiden wechselwirken. Yaworsky et al. (2005) führten ebenfalls Experimente durch, um die Interaktion von StAR mit Membranen zu untersuchen. Sie inkubierten synthetische Lipidvesikel, die in ihrer Lipidzusammensetzung der äußeren Mitochondrienmembran entsprachen, bei verschiedenen pH-Werten mit dem StAR-Protein. Nur bei niedrigem pH-Wert blieb der C-Terminus des StAR-Proteins bei proteolytischem Verdau mit verschiedenen Proteasen (darunter auch Pepsin) unversehrt. Das weist darauf hin, dass die C-terminale α -Helix des StAR-Proteins bei niedrigem pH-Wert mit Membranen wechselwirkt und daher vor dem Angriff von Proteasen geschützt ist. Baker et al. (2005) konnten zeigen, dass für die steroidogene Aktivität von StAR eine Konformationsänderung nötig ist, an der die carboxyterminale α -Helix beteiligt ist. Sie führten ein molekulares Modeling durch. Die Struktur von StAR errechneten sie aus der bekannten Struktur des MLN 64-Proteins. Das molekulare Modeling zeigte, dass die aus β -Faltblättern gebildete, cholesterinbindende Domäne zugänglich wird, wenn die carboxyterminale α -Helix protoniert ist und sich dadurch die Konformation des Proteins ändert (Abb. 85). Aufgrund dieser theoretischen Betrachtungen erzeugten sie zwei rekombinate StAR-Mutanten, bei denen bestimmte Aminosäurereste gegen Cysteinreste ausgetauscht worden waren (Abb. 86). Dadurch bildeten sich Disulfidbrückenbindungen aus, die verhinderten, dass die C-terminale α -Helix bei niedrigem pH-Wert ihre Lage relativ zum Rest des Proteins ändern kann. Als Folge davon verlor das Protein seine Fähigkeit, Cholesterin zu binden und auch die Fähigkeit, bei isolierten Mitochondrien die Bildung von Pregnenolon zu starten. Dieser Effekt war reversibel. Reduzierte man die Disulfidbindungen, dann erlangte das Protein seine steroidogene Aktivität wieder. Untersuchungen des StAR-Proteins mit „molekularem Modeling“ wurden auch von Mathieu et al. (2002) durchgeführt. Diese Arbeitsgruppe kam zu dem Schluss, dass aus thermodynamischen Gründen immer ein bestimmter Prozentsatz des StAR-Proteins in teilweise entfaltetem Zustand vorliegt – auch bei neutralem pH-Wert. Die C-terminale α -Helix vermittelt möglicherweise auch die Anlagerung von StAR an die Mitochondrienmembran (Abb. 87). Da die Helix bei erniedrigtem pH-Wert weniger stark mit dem Protein assoziiert ist, kann sie sich besser an die Membran anlagern.

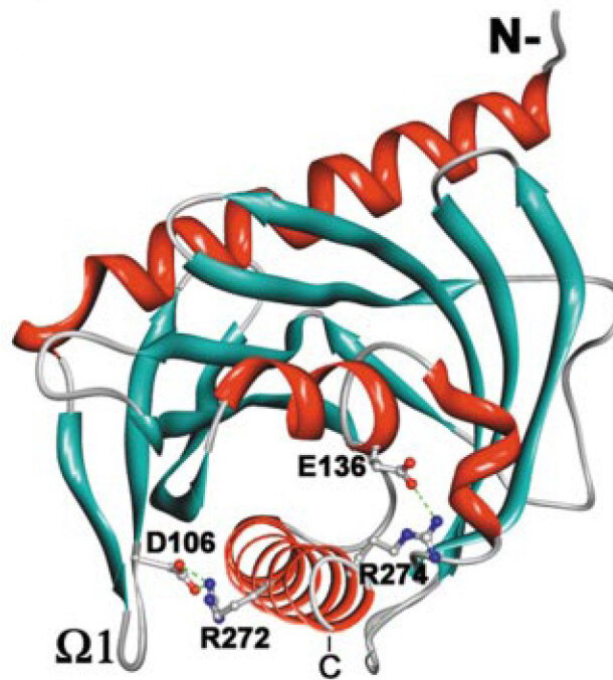


Abbildung 85: Das StAR-Protein interagiert über die C-terminale α -Helix mit Membranen. Ist die carboxyterminale Domäne (unten, rot dargestellt) protoniert, so ändert sich die Struktur des StAR-Proteins so, dass die cholesterinbindende Domäne zugänglich wird. Unter nativen Bedingungen bildet das Aspartat (D) in Position 106 zwei Wasserstoffbrückenbindungen zum Arginin (R) 272 aus. Ebenso wird die Konformation des Proteins durch die Interaktion zwischen der Glutaminsäure (E) 136 mit dem Arginin (R) 274 stabilisiert. Werden die Aminosäurereste bei niedrigem pH-Wert protoniert, so gehen diese Interaktionen verloren, die carboxyterminale Helix ist dann weniger stark an den Rest des Proteins gebunden. Abbildung aus Baker et al. (2005).

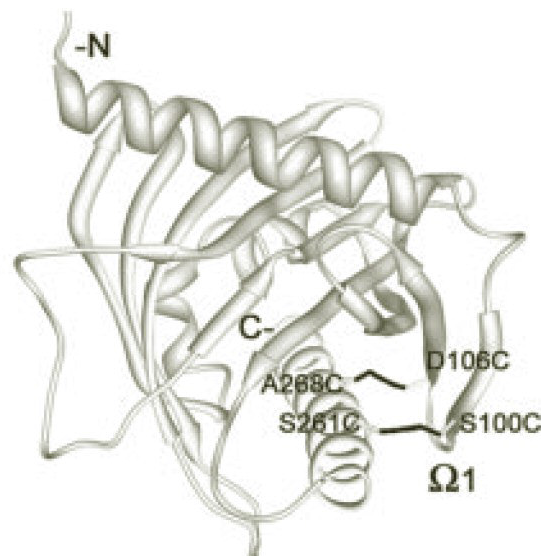


Abbildung 86: Durch zusätzliche Disulfidbrückenbindungen wird die C-terminale α -Helix kovalent an das StAR-Protein gebunden. Folge ist eine Abnahme der steroidogenen Aktivität um die Hälfte bei der S100C/S261C-Mutante und ein völliger Verlust der Aktivität bei der D106C/A268C-Mutante. Abbildung aus Baker et al. (2005).

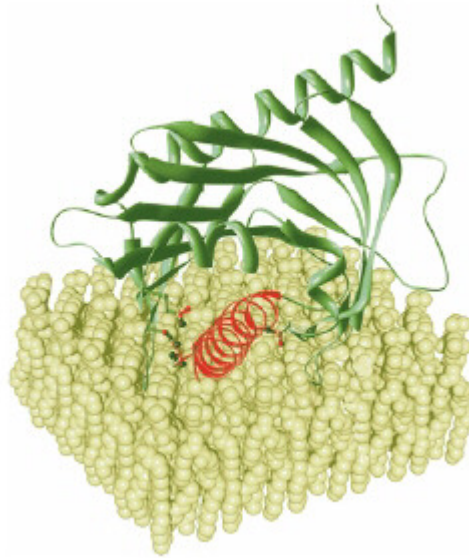


Abbildung 87: StAR lagert sich mit der C-terminalen α -Helix an Membranen an. Die C-terminale α -Helix ist rot dargestellt. Abbildung aus Miller (2006).

Die Kopfgruppen der Membranphospholipide sind bei niedrigem pH positiv geladen. Möglicherweise verstärkt dies die Interaktion zwischen der α -Helix und der Membran. Untersuchungen, die von Murcia et al. (2006) mittels „molekularem Modeling“ durchgeführt wurden, weisen darauf hin, dass sich die Ω 1-Schleife zwischen β -Faltblatt 5 und β -Faltblatt 6

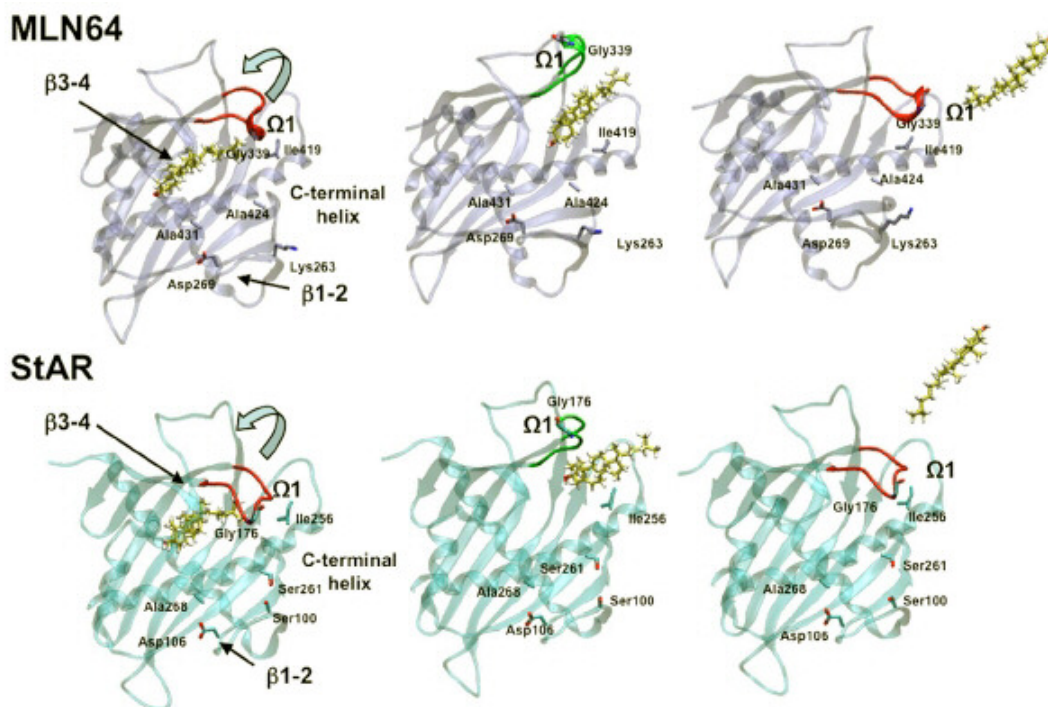


Abbildung 88: StAR und MLN64 geben ihren Liganden Cholesterin durch eine Bewegung der Ω 1-Schleife wieder frei. Abbildung aus Murcia et al. (2006).

bewegen muss, damit StAR und auch MLN64 das Cholesterin wieder freigeben können. Möglicherweise ist auch für diese Änderung der Konformation eine Erniedrigung des pH-Werts notwendig. Der Befund, dass StAR Azocholestanol bei neutralem und saurem pH-Wert bindet, steht im Einklang mit der Hypothese, dass die pH-Wert-Erniedrigung für die Anlagerung von StAR an Mitochondrien und für die Abdissoziation von Cholesterin nötig ist, nicht jedoch für die Bindung von Cholesterin an StAR. Murcia et al. (2006) konnten auch eine mögliche Cholesterin-Bindungsstelle per Modeling charakterisieren. Demnach interagiert Cholesterin hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen mit unpolaren Aminosäureresten von StAR. Die Hydroxylgruppe des Cholesterins könnte jedoch auch eine H-Brücke zum Leu 199 oder zum Arg 188 ausbilden (Abb. 89).

Es gelang nicht, die Markierung des StAR-Proteins mit dem nichtradioaktiven fotoreaktiven Cholesterinderivat per Western-Blot nachzuweisen. Möglicherweise bindet StAR nur ein einzelnes Azocholestanol-Molekül, und die daraus resultierende Erhöhung des Molekulargewichts ist nicht ausreichend, um per SDS-Gel und Western-Blot detektiert werden zu können. Ebenso wenig war es möglich, die Markierung mit dem Massenspektrometer nachzuweisen. Der wahrscheinlichste Grund dafür könnte gewesen sein, dass nur ein geringer Anteil der StAR-Proteine mit Azocholestanol markiert wurde. Der Peak des unmarkierten Proteins könnte dann den Peak des markierten Proteins überlagert haben. Die von Bose et al. (2002) durchgeführten Experimente sind ein starker Einwand gegen die Hypothese, dass StAR als Cholesterin-Shuttle zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran fungiert. Diese Experimente legen eher die Vermutung nahe, dass StAR an der äußeren Mitochondrienmembran die Aufnahme von Cholesterin aus anderen Zellorganellen vermittelt. Der Cholesterinfluss in die Mitochondrienmembran käme demnach durch das Zusammenspiel von StAR mit anderen Proteinmolekülen zu Stande. Möglicherweise vermittelt StAR auch die Ausbildung von Kontaktstellen zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran. Diese Kontaktstellen könnten einen Fluss von Cholesterin von der äußeren zur inneren Membran ermöglichen. Bei einem solchen Transportmechanismus wäre der Transport einer größeren Menge Cholesterin möglich als beim Transport durch Transportproteine. Bei zukünftigen Experimenten zur Funktion des StAR-Proteins wird die Herausforderung darin bestehen herauszufinden, mit welchen Proteinen StAR wechselwirkt. Ebenso müssten die Proteinmoleküle identifiziert werden, die Kontakte zwischen den Mitochondrien steroidogener Zellen mit anderen Zellorganellen vermitteln. Besonders interessant wäre es, mehr Informationen darüber zu gewinnen, aus welchen zellulären Cholesterin-Pools das für die Steroidogenese verwendete Cholesterin

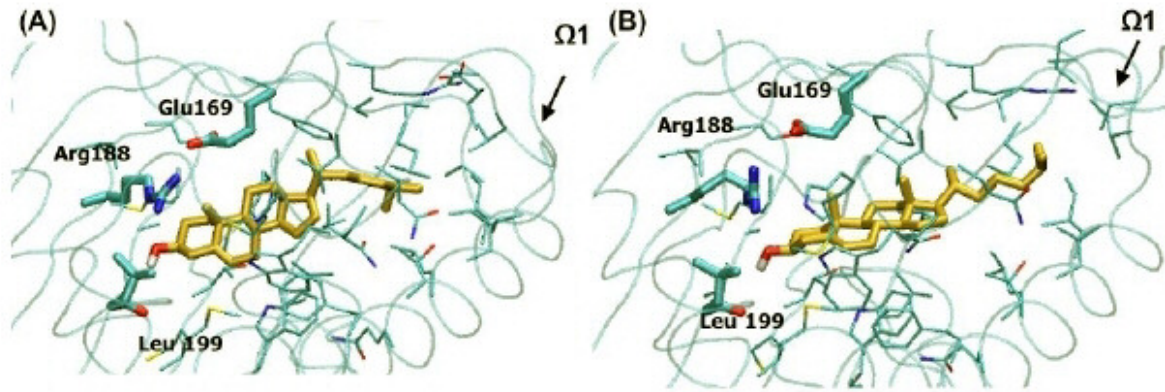


Abbildung 89: Molekulares Modeling der Interaktion von Cholesterin mit StAR. Die Hydroxylgruppe des Cholesterins kann eine H-Brücke zu Leu199 (A) oder zu Arg188 (B) ausbilden. Abbildung aus Murcia et al. (2006).

stammt und wie die Kontakte zwischen Mitochondrien und späten Endosomen zu Stande kommen. Weitere offene Fragen sind: Bilden intrazelluläre Lipidtröpfchen Kontakte zu Mitochondrien aus? Von welchen Faktoren ist die Ausbildung solcher Kontakte abhängig? Gibt es Kontakte zwischen Endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien? Außerdem müssten die Kontaktstellen zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran genauer charakterisiert werden. Besonders aufschlussreich wäre es, wenn sich ermitteln ließe, ob die Ausbildung der Kontaktstellen durch das StAR-Protein induziert werden kann. Ein weiterer experimenteller Ansatz könnte darin bestehen, StAR-Punktmutanten zu erzeugen, bei denen hydrophobe Aminosäuren im Azocholestanol-bindenden Bereich gegen hydrophile Aminosäuren ausgetauscht werden. Mit diesen Punktmutanten könnten dann Fotoaffinitätsmarkierungen mit dem Azocholestanol durchgeführt werden.

5.2 Charakterisierung der Cholesterinbindungsstelle des MLN64-Proteins

Bei den Fotoaffinitätsmarkierungen mit MLN64 konnte keine spezifische Bindungsstelle des Azocholestanols identifiziert werden. Die drei bei der Cyanbromidspaltung entstandenen Fragmente waren alle radioaktiv markiert worden. Möglicher Grund dafür könnte sein, dass Cholesterin in der Bindungsstelle von MLN64 eine größere Beweglichkeit hat als beim StAR-Protein. Das Azocholestanol könnte dann zu mehreren Aminosäureresten kovalente Bindungen ausbilden. Die Markierung könnte aber auch dadurch entstanden sein, dass das Protein während der Fotoaffinitätsmarkierung denaturiert worden war, wodurch das Azocholestanol auch an Bereiche binden konnte, die normalerweise nicht zugänglich sind.

Die START-Domäne des MLN64-Proteins bildet sehr leicht Aggregate. Diese Eigenschaft, die sich Tsujishita et al. (2000) zunutze machten, um das Protein zu kristallisieren, macht es aber problematisch mit dem Protein funktionelle Untersuchungen durchzuführen. Tatsächlich mussten für die Elution des Proteins von der Nickel-NTA-Matrix dem Elutionspuffer 40 % Glycerin zugesetzt werden. Andernfalls präzipitierte das Protein sofort, was sich in einer milchigweißen Trübung des Eluats und der Bildung eines Proteinsediments im Auffanggefäß zeigte. Möglicherweise wurde das Protein bei der Fotoaffinitätsmarkierung denaturiert und unspezifisch markiert. Wegen der starken Verdünnung des Proteins konnte durch Beobachtung mit dem bloßem Auge allein nicht beurteilt werden, ob das Protein aggregiert war. Das Eluat mit dem isolierten Protein enthielt neben dem Glycerin daher auch noch 250 mM Imidazol, das für die Elution von der Nickelmatrix dem Elutionspuffer zugesetzt wurde. Für die Fotoaffinitätsmarkierungen wurde das Protein 1:50 verdünnt, enthielt also bei der Markierung noch 0,8 % Glycerin und 5 mM Imidazol. Es wurden auch Experimente durchgeführt, bei denen MLN64 nach der Elution gegen einen Puffer mit 40 % Glycerin aber ohne Imidazol dialysiert wurde. Das Peakmuster war nach der Markierung mit Azocholestanol jedoch dasselbe wie bei den anderen Experimenten. Möglicherweise störte hierbei die hohe Glycerinkonzentration die Interaktion des Azocholestanols mit der Bindungsstelle von MLN64. Eine weitere potenzielle Fehlerquelle besteht darin, dass während der Fotoaffinitätsmarkierung ein Überschuss an [³H]-Azocholestanol-M β CD vorhanden ist. Das fotoreaktive Cholesterinderivat könnte während der Bestrahlung mit UV-Licht auch unspezifisch mit den nach außen gerichteten Aminosäureresten des MLN64-Proteins kovalente Bindungen ausbilden. Es wurden daher auch Experimente durchgeführt, bei denen mit Hilfe einer Gelfiltrationssäule der Puffer gewechselt wurde, nachdem das MLN64-Protein mit [³H]-Azocholestanol-M β CD inkubiert worden war. Anschließend wurde die Probe mit UV-Licht bestrahlt. Das Peakmuster war allerdings auch bei diesen Experimenten dasselbe – mehrere Bereiche des Proteins waren radioaktiv markiert. Trotz möglicher unspezifischer Markierung von StAR und MLN64 sollte man erwarten, dass das meiste Azocholestanol von der Cholesterinbindungsstelle des Proteins gebunden wird. Das am stärksten markierte Fragment sollte daher auch die Cholesterin-Bindungsstelle enthalten. Ein Grund dafür, dass mehrere Bereiche des MLN64-Proteins mit [³H]-Azocholestanol markiert wurden, könnte sein, dass dieses Protein drei oder noch mehr Andockstellen für Azocholestanol besitzt. Dies steht in Einklang mit den Modeling-Studien, die von Murcia et al. (2006) durchgeführt worden sind. Anders als beim StAR-Protein kann die Hydroxylgruppe des Cholesterins beim MLN64 nicht nur über eine H-Brücke mit Ser 362 interagieren,

sondern auch durch über Wassermoleküle vermittelte Wechselwirkungen mit noch anderen Aminosäureresten. In Abb. 90 sind vier mögliche Interaktionen von Cholesterin mit MLN64 gezeigt.

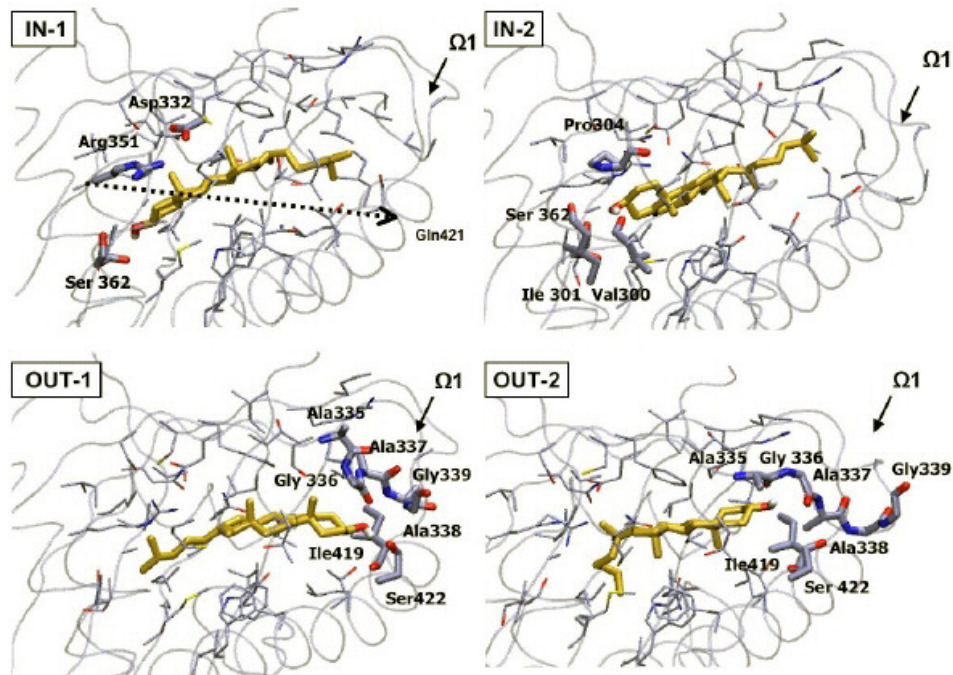


Abbildung 90: Vier mögliche Orientierungen von Cholesterin in der Bindungstasche von MLN64. Bei den „IN“-Konformationen interagiert die Hydroxylgruppe des Cholesterins über eine H-Brücke mit Ser 362 im Inneren der Bindungsstelle. Alternativ ist auch eine „OUT“-Konformation möglich, bei der die Hydroxylgruppe des Cholesterins mit Hilfe von Wassermolekülen mit Aminosäureresten am Eingang der Bindungsstelle interagiert. Die hydrophobe Seitenkette des Cholesterins liegt bei der „OUT“-Konformation im Inneren der Bindungsstelle. Das Cholesterin kann sich in der Bindungstasche um seine Längsachse drehen. Dadurch ergeben sich sowohl für „IN“ als auch für die „OUT“-Konformation jeweils zwei Möglichkeiten, wie das Cholesterin in der Bindungstasche orientiert sein kann. Abbildung aus Murcia et al. (2006).

Obwohl Fotoaffinitätsmarkierungen zeigten, dass jedes MLN64-Protein radioaktiv markiert worden war, konnte die Markierung mit dem Massenspektrometer nicht nachgewiesen werden. Vielleicht wurde die Bindung des Azocholestanols an das Proteinmolekül bei der Messung durch den Laserstrahl, mit dem das Protein aus der Matrix evaporiert wird, zerstört. Es ist aber auch möglich, dass nicht alle Proteinmoleküle markiert wurden. Der Peak des unmarkierten Proteins könnte dann den des markierten überdeckt haben oder das markierte Protein hatte wegen zu geringer Menge keinen Peak erzeugt. Hinzu kommt, dass Methyl- β -

Cyclodextrin mit MLN64 um die im Ansatz vorhandenen Steroidmoleküle als Bindungspartner konkurriert. Deutlich wurde dies auch bei den Experimenten, bei denen [³H]-Azocholestanol mit einem zehnfachen Überschuss an Cholesterin-M β CD von der Bindungsstelle am MLN64-Protein verdrängt wurde. Die Abnahme der Markierung von 97 % schon bei einem zehnfachen Überschuss an Cholesterin kam wahrscheinlich nicht alleine durch den Verdrängungseffekt des Cholesterins zustande, sondern wurde zumindest zum Teil auch durch das Cyclodextrin verursacht. Bei einer typischen Fotoaffinitätsmarkierung betrug die Konzentration des MLN64-Proteins etwa 1 μ M, und die [³H]-Azocholestanolkonzentration betrug 50 μ M. Da das [³H]-Azocholestanol in Form von Cyclodextrinkomplexen (40 mg/mL) zugegeben wurde, befanden sich auch 420 μ M M β CD im Ansatz – ein rund achtfacher Überschuss im Verhältnis zum Protein. Im Verdrängungsexperiment, wo Cholesterin auch als M β CD-Komplex eingesetzt wurde, waren dann sogar 4,2 mM Cyclodextrin im Reaktionsansatz vorhanden. Möglicher Grund dafür, dass im Western-Blot kein Unterschied zwischen markiertem und unmarkiertem MLN64 zu sehen war, könnte gewesen sein, dass an das Protein mehrere Azocholestanolmoleküle binden müssen, damit die Markierung im Western-Blot sichtbar wird. Die radioaktive Markierung weist jedoch darauf hin, dass ein Molekül MLN64 ein Molekül Azocholestanol bindet. Bei zukünftigen Experimenten mit MLN64 wäre es vorteilhaft, ein Massenspektrometer zu verwenden, mit dem man auch sehr kleine Proteinmengen detektieren kann. Inzwischen sind auch Methoden der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie entwickelt worden, bei denen ganze Proteinkomplexe detektiert werden können, ohne dass diese bei der Messung in ihre Untereinheiten zerfallen. Man könnte so auf die Fotoaffinitätsmarkierung verzichten und MLN64, das zuvor mit normalem Cholesterin inkubiert worden war, per Massenspektrometrie untersuchen. Eine weitere, vielversprechende Methode wäre der Einsatz der Biacore-Technologie. Das MLN64-Protein könnte dabei zum Beispiel über das His-Tag an eine Affinitätsmatrix gebunden werden, die danach mit einem cholesterinhaltigen Puffer inkubiert wird. Die Interaktion zwischen Cholesterin und MLN64 könnte so direkt studiert werden. Aussagen über die Beschaffenheit der Cholesterinbindungsstelle könnten durch den Einsatz von Punktmutanten gemacht werden.

Bei zukünftigen Experimenten mit dem MLN64-Protein ist es jedoch vor allem von Interesse herauszufinden, welche Rolle das Protein in der Zelle spielt, mit welchen Proteinen es zum Beispiel in den Zellen der Plazenta wechselwirkt. Mittels RNAi-Experimenten gelingt es vielleicht in Zukunft das endogene MLN64-Protein in plazentalen Zellen auszuschalten. Dann könnte man messen, welche Auswirkungen dies auf die Cholesterinverteilung innerhalb der

Zelle hat. Interessant wäre es auch, die Cholesterin-Verteilung mit isotoopenmarkiertem Cholesterin oder mit Hilfe fluoreszierender Cholesterinanaloga zu analysieren. Alpy et al. (2005) konnten ein Protein namens MENTHO (MLN64 NH₂-terminal domain homologue) als Interaktionspartner von MLN64 identifizieren. Die Funktion von MENTHO ist noch nicht bekannt. Gibt es weitere Interaktionspartner von MLN64? Die Suche danach könnte zum Beispiel mittels Co-Immunpräzipitierung oder mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems geschehen. Experimente, die von Hölttä-Vuori et al. (2005) durchgeführt wurden, weisen darauf hin, dass das MLN64-Protein die Interaktion von Endosomen mit Aktinfilamenten vermittelt. Die Hauptfunktion des MLN64-Proteins besteht möglicherweise gar nicht darin, die Bildung von Steroidhormonen auszulösen, sondern ganz allgemein in der Steuerung der Bewegung von Endosomen innerhalb der Zelle. Die START-Domäne könnte die Funktion eines Cholesterinsensors haben. Bei hohem Cholesteringehalt in der Zelle könnte sie durch Cholesterin ihre Struktur ändern und nur in dieser Struktur dann die Interaktion mit anderen Proteinen auslösen. In diesem Zusammenhang spielen vermutlich auch das NPC1- und NPC2-Protein eine wichtige Rolle. Es wird spekuliert, dass NPC2 Cholesterin aus dem Inneren der Endosomen zur äußeren Endosomenmembran transportiert und dieses dort vom MLN64 an der Membran angereichert wird (Strauss et al. 2002). Das mit Cholesterin beladene MLN64-Protein könnte dann an der Interaktion der Endosomen mit anderen Zellorganellen beteiligt sein. Vielleicht ist die START-Domäne auch aktiv am Cholesterintransport zu anderen Zellorganellen beteiligt, indem sie eine Art Transporttunnel zu anderen Zellorganellen ausbildet. Experimente von Tuckey et al. (2004) weisen auf die Möglichkeit hin, dass die START-Domäne eine teilweise entfaltete Konformation annehmen könnte, um so mit der äußeren Mitochondrienmembran wechselwirken zu können – ähnlich wie es bei der Molten-Globule-Hypothese für das StAR-Protein gefordert wird.

5.3 Charakterisierung der Cholesterinbindungsstelle des Oxytocinrezeptors

Eine Fotoaffinitätsmarkierung des Oxytocinrezeptors mit dem fotoreaktiven Cholesterinderivat gelang leider nicht. So war auch eine Lokalisierung der Cholesterinbindungsstelle(n) nicht möglich. Grund dafür waren wahrscheinlich technische Schwierigkeiten. Die Menge der in einem Experiment eingesetzten Rezeptoren war vermutlich nicht ausreichend, um den radioaktiv markierten Oxytocinrezeptor nachzuweisen. Das für die Experimente eingesetzte fotoreaktive Cholesterinderivat hatte eine Aktivität von 73000 dpm/ μ L (der 3mM-Lösung). Drei nmol des fotoreaktiven Cholesterinderivats erzeugen

demnach 73000 dpm bei der Szintillationsmessung. Um einen deutlichen Peak sehen zu können, ist eine Aktivität von etwa 150 dpm notwendig (der Background bei diesen Messungen liegt bei etwa 75 dpm). Die Aktivität von 150 dpm entspricht 6,3 pmol des fotoreaktiven Cholesterinanalogs bzw. 6,3 pmol mit einem Molekül markierten Oxytocinrezeptoren. Nach Ligandenbindungsstudien, die von Burger (2000) durchgeführt wurden, binden an einen Oxytocinrezeptor fünf bis sechs Cholesterinmoleküle. Demnach könnten sogar schon 1,05 pmol markierte Rezeptoren ausreichend sein, um ein Signal bei der Szintillationsmessung zu erzeugen. Bei den hier durchgeführten Experimenten waren jedoch auch 68,9 pmol Rezeptoren nicht ausreichend, um den markierten Rezeptor nachweisen zu können. Möglicherweise wird das fotoreaktive Cholesterinderivat vom Membrancholesterin verdrängt, oder es hat eine etwas niedrigere Affinität zum Oxytocinrezeptor als das Cholesterin selbst. Auch die von Burger (2000) durchgeführten Markierungsexperimente mit dem in Bakterienzellen überexprimiertem und in Liposomen eingebauten Oxytocinrezeptor sprechen dafür, dass nur ein kleiner Teil der Rezeptoren mit dem fotoreaktiven Cholesterinderivat markiert wird. Dabei waren 20 µg Rezeptorprotein notwendig, um ein Signal bei der Autoradiografie zu erhalten. Das entspricht einer Menge von 200 pmol Rezeptoren. Der in Bakterienzellen überexprimierte Oxytocinrezeptor war jedoch nicht funktional. Gründe dafür waren wahrscheinlich das Fehlen von Cholesterin in Bakterienzell-Membranen und die fehlende Glykosylierung des Rezeptors. Das Cholesterinderivat besitzt seine fotoreaktive Gruppe am C-Atom 6 des Cholesterin-Grundgerüsts. Für eine erfolgreiche Markierung muss die fotoreaktive Gruppe sich dem Protein so annähern, dass sich eine kovalente Bindung ausbilden kann. Es besteht die Möglichkeit, dass bei der Bindung des Cholesterinderivats an den Oxytocinrezeptor die fotoreaktive Gruppe so orientiert ist, dass wegen zu großer Distanz zum Proteinmolekül keine kovalente Bindung gebildet werden kann. Eine Fotoaffinitätsmarkierung wäre dann trotz Bindung des fotoreaktiven Cholesterinderivats nicht möglich. Für eine nieder-affine Bindung des Cholesterinderivats an den Oxytocinrezeptor spricht auch, dass im SDS-Gel bzw. im Westernblot kein Unterschied im Laufverhalten des markierten Rezeptors im Vergleich zum unmarkierten zu sehen war. Beim SCAP-Protein war bei solchen Experimenten stets ein Shift von markiertem gegenüber unmarkiertem Protein zu beobachten. Darüberhinaus geht bei der Immunpräzipitierung viel Material verloren. Der Verlust an Oxytocinrezeptor betrug schätzungsweise 97 %. Hinzu kommt, dass bei der Solubilisierung des Rezeptors mit dem Detergens CHAPSO nur etwa 20 % der Rezeptoren funktional bleiben. Bei Szintillationsmessungen in Experimenten mit markierten Membranen zeigte sich, dass reproduzierbar ein etwa 35 kDa großes Protein

markiert wurde. Es ist nicht bekannt, um welches Protein es sich dabei handelt. Bei Fotoaffinitätsmarkierungen, die von Burger (2000) durchgeführt worden waren, war ebenfalls ein Radioaktivitätspeak bei 35 kDa zu sehen – und zwar auch bei Membranen von HEK-Zellen, die keinen Oxytocinrezeptor exprimierten. Es ist daher unwahrscheinlich, dass es sich bei dem 35 kDa-Protein um ein Fragment des Oxytocinrezeptors handelt. Gibt es zukünftig Möglichkeiten, die Cholesterin-Bindungsstelle des Oxytocinrezeptors zu identifizieren? Bei Fotoaffinitätsmarkierungen wäre es vorteilhaft, wenn man eine Zelllinie zur Verfügung hätte, die den Rezeptor mit noch höherer Rate exprimiert. Bei einer optimalen Expressionsrate von 50 pmol Rezeptoren pro mg Membranprotein und anschließender Dichtegradientenzentrifugation könnten Membranen erzeugt werden, die rund 300 pmol Rezeptoren pro mg Membranprotein enthalten. Wünschenswert wäre auch ein fotoreaktives Cholesterinanalogen mit noch höherer spezifischer Radioaktivität. Dieses könnte die Detektion geringer Rezeptormengen ermöglichen. Denkbar wäre die Verwendung eines fotoreaktiven Cholesterinderivats, bei dem mehrere Wasserstoffatome durch Tritiumatome ersetzt sind. Man könnte auch die Synthese eines anderen fotoreaktiven Cholesterinderivats in Betracht ziehen, bei dem die fotoreaktive Gruppe sich nicht in Position 6 befindet – vielleicht könnte es dann besser kovalente Bindungen zum Oxytocinrezeptor ausbilden. Verbesserungsmöglichkeiten existieren auch auf Seite der Detergenzien. Die Solubilisierung des Oxytocinrezeptors mit einem neu entwickelten Detergens, bei dem ein hoher Prozentsatz der Rezeptoren in funktionellem Zustand verbleiben, könnte neue experimentelle Möglichkeiten eröffnen. Das von Burger et al. (2005) entwickelte Chapsterol wäre für solche Experimente ein guter Startpunkt. Ein anderer Ansatzpunkt bestünde darin, den Oxytocinrezeptor in Insektenzellen zu exprimieren. Da Insektenzellen kein Cholesterin enthalten, würde das bei der Anreicherung der Membranen mit [³H]-Azocholestanol in die Membranen eingebaute fotoreaktive Cholesterinderivat nicht mit dem Membrancholesterin um die Bindungsstelle am Oxytocinrezeptor konkurrieren. Eine weitere Strategie wäre es, die von Radhakrishnan et al. (2004) für das SCAP-Protein entwickelten Cholesterin-Bindungstests auf den Oxytocinrezeptor anzuwenden. Der Oxytocinrezeptor müsste dazu in Insektenzellen überexprimiert, mit einem geeigneten Detergens solubilisiert und mit einem Affinitätstag isoliert werden. Durch Punktmutationen konservierter Aminosäuren könnte es möglich werden, eine OTR-Mutante zu finden, die - im Gegensatz zum Wildtyp - kein Cholesterin binden kann. Dies würde dann Aussagen über die Interaktion zwischen Oxytocinrezeptor und Cholesterin ermöglichen. Die Herausforderung bei diesem Ansatz bestünde aber auch wieder darin, ein geeignetes Detergens für die Solubilisierung zu finden.

5.4 Charakterisierung der Cholesterinbindungsstelle des SCAP Proteins

Es konnte ein 10 kDa großer, am N-Terminus des SCAP-Proteins befindlicher Bereich lokalisiert werden, der das fotoreaktive Cholesterinderivat bindet. Durchgeführt wurden diese Experimente mit dem nichtradioaktiven fotoreaktiven Cholesterinderivat. Das durch die kovalente Bindung des Cholesterinderivats erhöhte Molekulargewicht des SCAP-Proteins konnte im Westernblot nachgewiesen werden. Die beobachtete Erhöhung des Molekulargewichts entspricht etwa 1-2 Azocholestanol-Molekülen. Dieser 10 kDa große Bereich von SCAP enthält den N-Terminus, die erste Transmembrandomäne und einen Teil der ersten Schleife im ER-Lumen. Bisher ist man eher davon ausgegangen, dass die Transmembrandomänen 2-6 die Cholesterin-sensitive Domäne von SCAP bilden, und dass sich dort auch eine Cholesterin-Bindungsstelle befindet (Brown and Goldstein, 1999; Radhakrishnan et al., 2004). Die Tatsache, dass Azocholestanol an die Transmembrandomäne 1 bindet, kann dadurch zu Stande kommen, dass die Transmembrandomänen 2-6 eine Bindungsstelle für Cholesterin bilden, diese Bindungsstelle aber in enger räumlicher Nähe zur Transmembrandomäne 1 liegt, so dass die fotoreaktive Gruppe des Azocholestanols sich in der Nähe von TM 1 befindet und dort kovalent binden kann. Eine Bedingung bei der Fotoaffinitätsmarkierung von Proteinen mit Azocholestanol besteht darin, dass die fotoreaktive Gruppe so orientiert sein muss, dass das bei UV-Bestrahlung entstehende Carben mit Aminosäureresten interagieren kann. Es wäre zum Beispiel denkbar, dass SCAP auch noch andere Bindungsstellen für das Azocholestanol besitzt, die sich jedoch nicht nachweisen lassen, weil die fotoreaktive Gruppe so orientiert ist, dass sie zu weit von Aminosäureresten entfernt ist, um kovalente Bindungen ausbilden zu können. Ein starker Hinweis darauf, dass Azocholestanol an derselben Stelle von SCAP bindet wie das Cholesterin, ist jedoch die Tatsache, dass Azocholestanol ebenso wie Cholesterin die Konformationsänderung von SCAP hervorruft. Dies konnte experimentell nachgewiesen werden, indem man Zellmembranen erst mit dem Sterol anreicherte und dann *in vitro* mit Trypsin behandelte: Sowohl die Anreicherung mit Cholesterin als auch die mit Azocholestanol führten dazu, dass der Argininrest in Position 503 für Trypsin zugänglich wird. Dadurch entsteht ein etwas kleineres SCAP-Fragment als bei der Trypsinbehandlung von Membranen, die vorher nicht mit Cholesterin oder Azocholestanol angereichert wurden. Ein fotoreaktives 25-Hydroxycholesterinderivat bildete keine kovalenten Bindungen zu SCAP aus. Dies spricht dafür, dass 25-Hydroxycholesterin an ein anderes Protein als SCAP bindet, und dass dieses Protein dann die Interaktion von SCAP mit Insig auslöst und so die Cholesterin- und Lipidbiosynthese reguliert. Es gibt eine Familie von 15 als OSBPs bezeichneten Oxysterol

bindenden Proteinen (Olkkonen, 2004). Es ist möglich, dass eines dieser Proteine die SCAP-Insig-Interaktion auslöst. Es ist auch denkbar, dass ein weiteres, bisher noch nicht identifiziertes 25-Hydroxycholesterin bindendes Protein an diesem Regulationsmechanismus beteiligt ist. Bei zukünftigen Experimenten wird die Identifizierung dieses Proteins im Mittelpunkt stehen.

5.5 Untersuchungen zur Regulation der SCAP-Insig-Interaktion durch Cholesterin und 25-Hydroxycholesterin

Ein hoher Cholesteringehalt der ER-Membran führt dazu, dass SCAP und Insig interagieren. Man kann davon ausgehen, dass SCAP Cholesterin bindet und dadurch seine Konformation so ändert, dass die Interaktion mit Insig möglich wird. 25-Hydroxycholesterin kann ebenfalls die Interaktion von SCAP mit Insig induzieren. Oxysterole wie das 25-Hydroxycholesterin werden vor allem dann gebildet, wenn der intrazelluläre Cholesterinspiegel hoch ist (Schroepfer, 2000). Da 25-Hydroxycholesterin schon in sehr kleinen Konzentrationen die Interaktion von SCAP mit Insig auslösen geht man davon aus, dass 25-Hydroxycholesterin auch *in vivo* ein Regulator der Cholesterinbiosynthese ist. Da man keine Bindung des 25-Hydroxycholesterins an SCAP nachweisen konnte, nimmt man an, dass bei diesem Regulationsmechanismus noch ein weiteres, bisher noch nicht identifiziertes Protein beteiligt ist, das 25-Hydroxycholesterin bindet und dann die Interaktion von SCAP mit Insig induziert. In den hier durchgeführten Experimenten konnten die Bedingungen, unter denen die Interaktion von SCAP mit Insig stattfindet, mit Hilfe von Blue Native Gelen untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass Cholesterin und auch 25-Hydroxycholesterin die Interaktion von SCAP mit Insig auslösen. Die für eine Interaktion nötige Cholesterinkonzentration war mindestens zehnmal so groß wie die benötigte Konzentration von 25-Hydroxycholesterin. Da Progesteron und das dem 25-Hydroxycholesterin sehr ähnliche 19-Hydroxycholesterin die Interaktion von SCAP mit Insig nicht induzierten, spricht dies dafür, dass 25-Hydroxycholesterin spezifisch an ein anderes Protein bindet, um diesen Effekt auszulösen. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass ein fotoreaktives 25-Hydroxycholesterinderivat nicht von SCAP gebunden wurde. Das 25-Hydroxycholesterin konnte auch nicht die für die Interaktion mit Insig wichtige Änderung der Konformation von SCAP hervorrufen. Mit Hilfe der Blue Native Gele konnte gezeigt werden, dass die SCAP-Insig-Interaktion auch *in vitro* induziert werden kann. Dabei wurden keine Zellen, sondern Zellmembranen für relativ kurze Zeit (20 min) mit dem

25-Hydroxycholesterin inkubiert. Dies reichte aus, um die Interaktion von SCAP mit Insig zu induzieren. Man kann aus diesen Experimenten schlussfolgern, dass 25-Hydroxycholesterin durch einen nicht-genomischen Effekt die Interaktion von SCAP mit Insig auslöst - dass also 25-Hydroxycholesterin nicht erst die Synthese neuer Proteinmoleküle induziert, die dann die SCAP-Insig-Interaktion vermitteln. Da bei diesen Experimenten nur mit Membranen gearbeitet wurde, der Reaktionsansatz also nur wenig oder gar kein Cytosol enthielt, legt dies die Vermutung nahe, dass es sich bei dem postulierten 25-Hydroxycholesterin bindenden Protein um ein Membranprotein handelt. Im Mittelpunkt des Interesses bei zukünftigen Experimenten zu dieser Fragestellung wird die Identifizierung des Proteins sein, das die 25-Hydroxycholesterin vermittelte Induktion der SCAP-Insig-Interaktion auslöst. Experimente mit den Blue Native Gelen zeigten auch, dass der evolutionär konservierte Aspartatrest in Position 428 (Abb. 91) eine wichtige Rolle für die Funktionsfähigkeit von SCAP spielt. Wurde der negativ geladene Aspartatrest gegen Alanin ausgetauscht, dann interagierte SCAP auch dann mit Insig, wenn es kein oder nur wenig Cholesterin gebunden hatte.

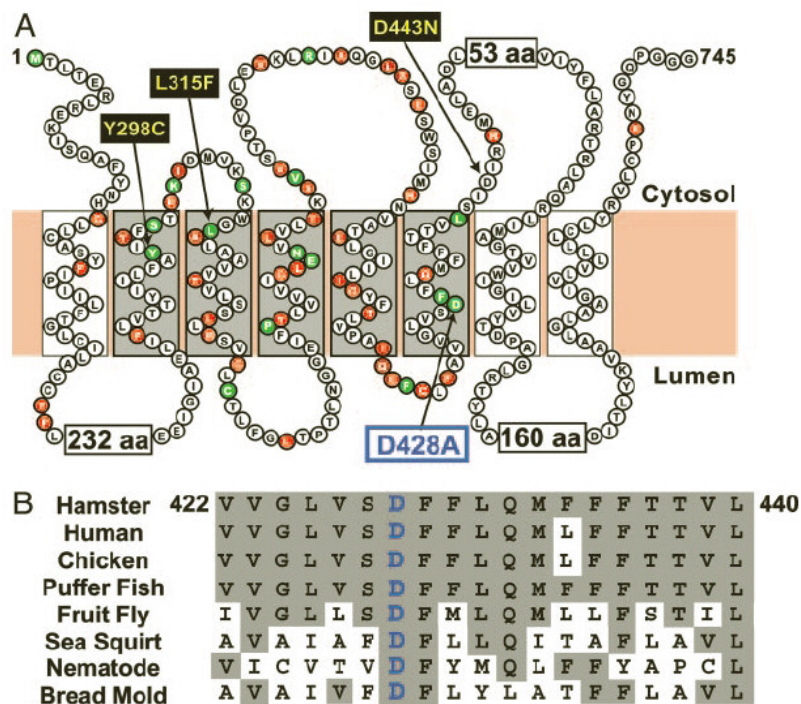


Abbildung 91: Die Aminosäuren in bestimmten Positionen von SCAP sind bei vielen Spezies konserviert. Abbildung A) zeigt die Aminosäuresequenz von SCAP mit den acht Transmembranhelices. Die Sterol-sensitiven Domänen (grau dargestellt) umfasst die Helices 2 bis 5. Die Punktmutanten D428A, Y298C, D443N und L315F sind nicht durch Sterole regulierbar. Die rot markierten Aminosäurereste sind bei sieben Spezies (Hamster, Mensch, Huhn, Kugelfisch, Drosophila, Seescheide und Caenorhabditis) evolutionär konserviert; die grün markierten sind zusätzlich auch noch beim Schimmelpilz konserviert. Abbildung B) zeigt, dass die in der fünften Transmembranhelix gelegene Aminosäure Asparagin in Position 428 bei den acht Arten konserviert ist. Abbildung aus Feramisco et al. (2005).

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

Acher, R. (1993) Neurohypophysial peptide systems: processing machinery, hydroosmotic regulation, adaptation and evolution. *Regul Pept.* **29**, 1-13.

Adams, C. M., Reitz, J., De Brabander, J.K., Feramisco, J.D., Li, L., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2004) Cholesterol and 25-Hydroxycholesterol Inhibit Activation of SREBPs by Different Mechanisms, Both Involving SCAP and Insigs. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 52772-52780

Albert, A.D., Young, J.E., und Yeagle, P.L. (1996) Rhodopsin-cholesterol interactions in bovine rod outer segment disk membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1285**, 47-55.

Alpy, F., Stoeckel, M-E., Dierich, A., Escola, J.-M., Wendling, C., Chenard, M.-P., Vanier, M.T., Gruenberg, J., Tomasetto, C., and Rio, M.-C. (2001) The Steroidogenic Acute Regulatory Protein Homolog MLN64, a Late Endosomal Cholesterol-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 4261-4269.

Alpy, F., Boulay, A., Moog-Lutz, C., Andarawewa, K.L., Degot, S., Stoll, I., Rio, M.C., Tomasetto, C. Metastatic lymph node 64 (MLN64), a gene overexpressed in breast cancers, is regulated by Sp/KLF transcription factors. *Oncogene* **22**, 3770-80.

Arakane, F., Sugawara, T., Nishino, H., Liu, Z., Holt, J.A., Pain, D., Stocco, D.M., Miller, W.L., and Strauss, J.F. (1996) Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) retains activity in the absence of its mitochondrial import sequence: Implications for the mechanism of StAR action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13731-13736.

Arakane, F, Kallen, C. B., Watari, H., Foster, J. A., Sepuri, N. B. V. Pain, D., Stayrook, S. E., Lewis, M., Gerton, G. L., Strauss III, J. F. (1998) The Mechanism of Action of Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR). StAR ACTS ON THE OUTSIDE OF MITOCHONDRIA TO STIMULATE STEROIDOGENESIS. *Journal of Biological chemistry* **273**, 16339-16345.

Chadio, S.E.; Antoni, F.A. (1989) Characterization of oxytocin receptors in rat adenohypophysis using a radioiodinated receptor antagonist peptide. *J. Endocrinol* **122**, 465-470.

Arakane, F., Kallen, C.B., Watari, H., Foster, J.A., Sepuri, N.B.V., Pain, D., Stayrock, S.E., Lewis, M., Gerton, G.L., and Strauss, J.F. (1998) The Mechanism of Action of Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR). *Journal of Biological Chemistry* **273**, 16339-16345.

Ardail, D., Lerme, F., Louisot, P. (1991) Involvement of contact sites in phosphatidylserine import into liver mitochondria. *J Biol Chem.* **266**, 7978-81.

Artemenko, I. P., Zhao, D., Dale, B., Hales, K. H, and Jefcoate, C. R. (2001) Mitochondrial processing of newly synthesized steroidogenic acute regulatory protein (StAR), but not total StAR, mediates cholesterol transfer to cytochrome P450 side chain cleavage enzyme in adrenal cells. *J Biol Chem.* **276**, 46583-96.

- Arthur, J.R. and Boyd, G.S. (1974) The effect of inhibitors of protein synthesis on cholesterol side-chain cleavage in the mitochondria of luteinized rat ovaries. *Eur J Biochem.* **49**, 117-27.
- Backer, J.M. und Dawidowicz, E.A. (1981) Mechanism of cholesterol exchange between phospholipid vesicles. *Biochemistry.* **20**, 3805-10.
- Baker, B. Y., Yaworsky, D. C. and Miller, W. L. A pH-dependent Molten Globule Transition Is Required for Activity of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein, StAR. *J. Biol. Chem.* **280**, 41753 – 41760
- Bargmann, C. I., (1998) Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* **282**, 2028-2033.
- Becq, F., Hamon, Y., Bajetto, A., Gola, M., Verrrier, B. & Chimini, G. (1997) ABC1, an ATP binding cassette transporter required for phagocytosis of apoptotic cells, generates a regulated anion flux after expression in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 2695-2699.
- Bentley, P. J. (1965) The potentiating action of magnesium and manganese on the oxytocin effect of some oxytocin analogues. *J. Endocrinol.* **32**, 215-222.
- Berg, J. M., Stryer, L., Tymoczko, J.L. (2002) *Biochemistry*, 5th Edition, W.H. Freeman and Company, New York
- Boesze-Battaglia, K. & Schimmel, R. (1997) Cell membrane lipid composition and distribution: implications for cell function and lessons learned from photoreceptors and platelets. *J. Exp. Biol.* **200**, 2927-2936.
- Bose, H.S., Baldwin, M.A., and Miller, W.L. (1998) Incorrect folding of Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) in Congenital Lipoid Adrenal Hyperplasia. *Biochemistry* **37**, 9768-9775.
- Bose, H.S., Whittal, R.M., Baldwin, M.A., Miller, W.L. (1999) The active form of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR, appears to be a molten globule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7250-7255.
- Bose, H.S., Whittal, R.M., Huang, M.C., Baldwin, M.A., and Miller, W.L. (2000) N-218 MLN64, a Protein with StAR-like Steroidogenic Activity, Is folded and Cleaved Similarly to StAR. *Biochemistry* **39**, 11722-11731.
- Bose, H.S., Lingappa, V.R., and Miller, W.L. (2002) Rapid regulation of steroidogenesis by mitochondrial protein import. *Nature* **417**, 87-91.
- Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Breslow, E. (1979) Chemistry and biology of the neurophysins. *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 251-274.
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **89**, 331-40.

- Brown, R. E. (1998) Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *Journal of Cell Science* **111**, 1-9.
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 11041-11048.
- Brown, A.J., Sun, L., Feramisco, J.D., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2002) Cholesterol Addition to ER Membranes Alters Conformation of SCAP, the SREBP Escort Protein that Regulates Cholesterol Metabolism. *Molecular Cell* **10**, 237-245.
- Brownstein, M. J., Russel, J. T., Gainer, H. (1990) Synthesis, transport and release of posterior pituitary hormones. *Science* **207**, 373-378.
- Burger, K., Fahrenholz, F. and Gimpl, G. (1999) Non-genomic effects of progesterone on the signaling function of G protein-coupled receptors. *FEBS Lett.* **464**, 25-29.
- Burger, K., Gimpl, G., Fahrenholz, F. (2000). Regulation of receptor function by cholesterol. *Cell Mol Life Sci.* **57**, 1577-92.
- Burger, K. (2000) Cholesterin und Progesteron – Modulatoren G-Protein-gekoppelter Signaltransduktionswege. Dissertation Universität Mainz.
- Caron, K. M., Soo, S. C., Wetsel, W. C., Stocco, D. M., Clark, B. J., Parker, K. L. (1997) Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 11540-5.
- Carter, C. S. (1992) Oxytocin and sexual behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Rev.* **16**, 131-134.
- Civen, M., Leeb, J., Hill, M., Sekhom, S. (1984) Effects of excess dietary cholesterol on adrenal cholesterol accumulation and steroidogenesis. *J Steroid Biochem.* **20**, 893-9.
- Clapham, D.E., Neer, R. J. (1997) G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **37**, 167-203.
- Clark, B. J., Wells, J., King, S. R. , Stocco, D. M. (1994) The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) *J. Biol. Chem.* **269**, 28314 – 28322.
- Clark, B. J., Pezzi, V., Stocco, D. M., Rainey, W. E. (1995) The steroidogenic acute regulatory protein is induced by angiotensin II and K⁺ in H295R adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol.* **115**, 215-19.
- Clark, B. J., Pezzi, V., Stocco, D. M., Rainey, W. E. (1995) Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Endocrinol.* **9**, 1346-55.
- Christensen, K., Bose, H.S., Harris, F.M., Miller, W.L., and Bell, J.D. (2001) Binding of Steroidogenic Acute Regulatory Protein to Synthetic Membranes Suggests an Active Molten Globule. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 17044-17051.

- Christenson, L.K. and Strauss, J.F. (2000) Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta* **1529**, 175-187.
- Dale, H. H. (1906) On some physiological actions of ergot. *J. Physiol. Lond.* **34**, 163-205.
- Davies, M. A., Schuster, H. F., Brauner, J. W. & Mendelsson, R. (1990) Effects of cholesterol on conformational disorder in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. A quantitative IR study of the depth dependence. *Biochemistry* **29**, 4368-4373.
- DeGrella, R. F. and Simoni, R.D. (1982). Intracellular transport of cholesterol to the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 14256-14262.
- Dreger, M., Krauss, M., Herrmann, A. & Hucho F. (1997) Interactions of the nicotinic acetylcholine receptor transmembrane segments with the lipid bilayer in native receptor-rich membranes. *Biochemistry* **36**, 839-847.
- Duncan, E., E.A., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Sakai, J. (1997) Cleavage Site for Sterol-regulated Protease Localized to a Leu-Ser Bond in the Luminal Loop of Sterol Regulatory Element-binding Protein-2. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 12778-12785.
- Epstein, L. F. und Orme-Johnson, N. R. (1991) Regulation of steroid hormone biosynthesis. Identification of precursors of a phosphoprotein targeted to the mitochondrion in stimulated rat adrenal cortex cells. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 19739-45.
- Espenshade, P.J., Li, W.-P., and Yabe, D. (2002) Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11694-11699.
- Estabrook, R. W. and Rainey, W. E. (1996) Twinkle, twinkle little StAR, how we wonder what you are. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13552-13554.
- Evans, W. H., Graham, J. M. (1989) Membrane structure and function. IRL Press, Oxford.
- Evans, R. M. (1994) Intermediate filaments and lipoprotein cholesterol. *Trends Cell Biol.* **4**, 149-151.
- Farese, R.V. (1971) Calcium as a mediator of adrenocorticotrophic hormone action on adrenal protein synthesis. *Science* **173**, 447-50.
- Farrens, D. L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W. L. & Khorana, H. G. (1996) Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* **274**, 768-770.
- Feramisco, J.D., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2004) Membrane topology of human insig-1, a protein regulator of lipid synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 8487-96.
- Feramisco, J.D., Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Reitz, J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2005) Intramembrane aspartic acid in SCAP protein governs cholesterol-induced conformational change. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 3242-7.

Fernandez-Ballester, G., Castresana, J., Fernandez, A. M., Arrondo, J. L., Ferragut, J. A. & Gonzalez-Ros, J. M. (1994) A role for cholesterol as a structural effector of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* **33**, 4065-4071.

Fielding P. E. & Fielding, C. J. (1995) Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res.* **36**, 211-28.

Fielding P. E. & Fielding, C. J. (1995) Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry* **34**, 14288-14292.

Fielding P. E. & Fielding, C. J. (1996) Intracellular transport of low density lipoprotein derived free cholesterol begins at clathrin-coated pits and terminates at cell surface caveolae. *Biochemistry* **35**, 14932-14938.

Fuchs, A. R., Fuchs, F., Husslein, P., Soloff, M. S. & Fernström, M. (1982) Oxytocin receptors and human parturition. A dual role for oxytocin in the initiation of labor. *Science* **215**, 1396-1398.

Fukai, H., Den, K., Sakamoto, H., Uchida, F. & Takagi, S. (1984) Study of oxytocin and prostaglandin $F_{2\alpha}$ receptors in human myometria and amnion-decidua complex during pregnancy and labor. *Endocrinol. Japon.* **31**, 565-570.

Garren, L. D., Ney, R. L., Davis, W. W. (1965) Studies on the role of protein synthesis in the regulation of corticosterone production by adrenocorticotrophic hormone in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **53**, 1443-1450.

Gether, U. and Kobilka, B. K. (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 17979-17982.

Gimpl, G., Klein, U., Reiländer, H. & 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.

Gimpl, G., Burger, K. & Fahrenholz, F. (1997) Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry* **36**, 10959-10974.

Gimpl, G., 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., Burger, K., Politowska, E., Ciarkowski, J. & Fahrenholz, F. (2000) Oxytocin receptors and cholesterol: interaction and regulation. *Exp. Physiol.* **85S**, 41S-49S.

Gimpl, G. and Fahrenholz, F. (2001) The oxytocin-receptor system: structure, function and regulation. *Physiol. Rev.* **81**, 629-83.

Gimpl, G. (2002) A closer look at the cholesterol sensor. *TRENDS in Biochemical Sciences*, Vol. 27, 596-599.

Gimpl, G., Burger, K., and Fahrenholz, F. (1997) Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry* **36**, 10959-10974.

- Goldstein, J. L., deBose-Boyd, R. A., Brown, M. S. (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell* **124**, 35-46
- Gorbulev, V., Büchner, H., Akhundova, A. & Fahrenholz, F. (1993) Molecular cloning and functional characterization of V₂ [8-lysine] vasopressin and oxytocin receptors from a pig kidney cell line. *Eur. J. Biochem.* **215**, 1-7.
- Hamm, H. E. (1998) The many Faces of G Protein Signaling. *J. Biol. Chem.* **273**, 669-672
- Han, K-K., Richard, C., and Biserte, G. (1982) Current developments in chemical cleavage of proteins. *Int. J. Biochem.* **15**, 875-884.
- Harder, T. & Simons, K. (1997) Caveolae, DIGs and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 534-542.
- Harikrishna, J. A., Black, S. M., Szklarz, G. D., Miller, W. L. (1993) Construction and function of fusion enzymes of the human cytochrome P450sc system. *DNA Cell Biol.* **12**, 371-9.
- Harmala, A.-S., Porn, M. I. & Slotte, J. P. (1993) Sphingosine inhibits sphingomyelinase-induced cholesteryl ester formation in cultured fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1210**, 97-104.
- Harmala, A.-S., Porn, M. I., Mattjus, P. & Slotte, J. P. (1994) Cholesterol transport from plasma membranes to intracellular membranes is inhibited by 3 beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one. *Biochim. Biophys. Acta* **1211**, 317-325.
- Harris, J. S., Epps, D. E., Davio, S. R. & Kezdy, F. J. (1995) Evidence for transbilayer tail-to-tail cholesterol dimers in dipalmitoylglycerophosphocholine liposomes. *Biochemistry* **34**, 3851-3857.
- Hinko, A. and Soloff, M. S. (1992) Characterization of oxytocin receptors in rabbit amnion involved in the production of prostaglandin E₂. *Endocrinology* **130**, 3547-53.
- Hoekstra, D. and Ijzendoorn, S. (2000) Lipid trafficking and sorting: how cholesterol is filling gaps. *Current Opinion in Cell Biology* **12**, 496-502.
- Hölttä-Vuori, M., Apy, F., Tanhuanpää, K., Jokitalo, E., Mutka, A.-L., Ikonen, E. (2005) MLN64 is involved in actin-mediated dynamics of late endocytic organelles. *Molecular Biology of the Cell* **16**, 3873-86.
- Horton, J. D., Shimomura, I., Brown, M. S., Hammer, R. E., Goldstein, J. L., Shimano, H. (1998) Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest* **101**, 2331-9.
- Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M.R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Wang, X. (1993) SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 11603-11607.

Hua, X., Nohturfft, A., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1996) Sterol Resistance in CHO Cells Traced to Point Mutation in SREBP Cleavage-Activating Protein. *Cell* **87**, 415-426.

Hua, X., Sakai, J., Ho, Y.K., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1995) Hairpin Orientation of Sterol Regulatory Element-binding Protein-2 in Cell Membranes as determined by Protease Protection. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 29422-29427.

Insel, T. R. (1992) Oxytocin – a neuropeptide for affiliation: evidence from behavioral, receptor autoradiographic and comparative studies. *Psychoneuroendocrinology* **17**, 3-35.
Insel und Shapiro, 1992

Insel, T. R. and Shapiro L.E. (1992) Oxytocin receptors and maternal behavior. *Ann N Y Acad Sci.* **652**, 122-41.

Ivell R., Bathgate, R., Rust, W., Balvers, M. & Morley, S. (1995) Structure and organization of the bovine oxytocin receptor gene. *Oxytocin: Cellular and Molecular Approaches in Medicine and Research*, Plenum Press, New York, 295-300.

Jefcoate, C. (2002) High-flux mitochondrial cholesterol trafficking, a specialized function of the adrenal cortex. *Journal of Clinical investigation* **110**, 881-890.

Ji, T. H., Grossmann, M. & Ji, I. (1998) G protein coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* **273**, 17299-17302.

Johnson, W. J., Mahlberg, F. H., Rothblat, G. H. & Philips, M. C. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1085**, 273-298.

Kallen, C.B., Billheimer, J.T., Summers, S.A., Stayrock, S.E., Lewis, M., and Strauss, J.F. (1998) Steroidogenic Acute Regulatory Protein is A Sterol Transfer Protein. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 26285-26288.

Kandutsch, A. A. and Chen, H. W. (1974) Inhibition of sterol synthesis in cultured mouse cells by cholesterol derivatives oxygenated in the side chain. *Journal of Biological Chemistry* **249**, 6057-61.

Kaplan, M. R. and Simoni, R. D. (1985) Transport of cholesterol from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *J Cell Biol.* **101**, 446-53.

Keim, K. L., Sigg, E. B. (1976) Physiological and biochemical concomitants of restraint stress in rats. *Pharmacol Biochem. Behav.* **4**, 289-97.

Kimura, T., Tanizawa, O., Mori, K., Brownstein, M. J. & Okayama, H. (1992) Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* **356**, 526-529.

Kishida, T., Kostetskii, I., Zhang, Z., Martinez, F., Liu, P., Walkley, S. U., Dwyer, N. K., Blanchette-Mackie, E. J., Radice, G. L., Strauss, III, J. F. (2004) Targeted Mutation of the MLN64 START Domain Causes Only Modest Alterations in Cellular Sterol Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 19276 – 19285.

- Klein, U. & Fahrenholz, F. (1994) Reconstitution of the myometrial oxytocin receptor into proteoliposomes. Dependence of oxytocin binding on cholesterol. *Eur. J. Biochem.* **220**, 559-567.
- Klein, U., Gimpl, G. & Fahrenholz, F. (1995) Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with β -cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* **34**, 13784-13793.
- Kojro, E., Hackenberg, M., Zsigo, J. & Fahrenholz, F. (1991, b) Identification and enzymatic deglycosilation of the myometrial oxytocin receptor using a radioiodinated photoreactive antagonist. *Journal of Biological Chemistry.* **266**, 21416-21421.
- Krauss, G. (2002) *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Krueger, R. J. Orme-Johnson, N. R. (1983) Acute adrenocorticotrophic hormone stimulation of adrenal corticosteroidogenesis. Discovery of a rapidly induced protein. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 10159-67.
- Kloppenborg, P. W., Island, D. P., Liddle, G. W., Michelakis, A. M., Nicholson, W. E. (1968) A method of preparing adrenal cell suspensions and its applicability to the in vitro study of adrenal metabolism. *Endocrinology* **82**, 1053-8.
- Krejčí, I & Poláček, 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.
- Kurzchalia, T. V. & Parton, R. G. (1999) Membrane microdomains and caveolae. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 424-431.
- Lacapère, J. J. and Papadopoulos, V. (2003) Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids* **68**, 569-85.
- Lambright, D. G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N. P., Hamm, H. E. & Sigler, P. B. (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* **379**, 311-319.
- Lange, Y., Swaisgood, M. H., Ramos, B. V. & 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., Echevarria, F. & 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., Strelbel, F. & Steck, T. L. (1993) Role of the plasma membrane in cholesterol esterification in rat hepatoma cells *J. Biol. Chem.* **268**, 13838-13843.
- Lange, Y. & Steck (1994) Cholesterol homeostasis. Modulation by amphiphiles. *J. Biol. Chem.* **269**, 29371-29374.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T 4. *Nature* **227**, 680-685.

- Lavaque, E., Sierra, A., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L. M. (2006). Steroidogenic acute regulatory protein in the brain. *Neuroscience* **138**, 741-747.
- Lavie, Y., Fiucci, G., Czarny, M. & Liscovitch, M. (1999) Changes in membrane microdomains and caveolae constituents in multidrug-resistant cancer cells. *Lipids* **34**, S57-63.
- Lefebvre, D. L., Giaid, A., Bennett, H., Larivière, R. & Zingg, H. H. (1992) Oxytocin gene expression in rat uterus. *Science* **256**, 1553-1555.
- LeHoux, J.G., Mathieu, A., Lavigne, P., Fleury, A. (2003) Adrenocorticotropin regulation of steroidogenic acute regulatory protein. *Microsc Res Tech.* **61**, 288-99.
- Li, Q. & Yokoyama, S. (1995) Independent Regulation of Cholesterol Incorporation into Free Apolipoprotein-mediated Cellular Lipid Efflux in Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 26216-26223.
- Li, Q., Tsujita, S. & Yokoyama, S. (1997) Selective Down-Regulation by Protein Kinase C Inhibitors of Apolipoprotein-Mediated Cellular Cholesterol Efflux in Macrophages. *Biochemistry* **36**, 12045-12052.
- Li, H., Yao, Z., Degenhardt, B., Teper, G., Papadopoulos, V. (2000) Cholesterol binding at the cholesterol recognition/ interaction amino acid consensus (CRAC) of the peripheral-type benzodiazepine receptor and inhibition of steroidogenesis by an HIV TAT-CRAC peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 1267-72.
- Lin, T., Hu, J. Wang, D., Stocco, D. M. (1995) Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* **267**, 1828-31.
- Liscum, L. (1990) Pharmacological inhibition of the intracellular transport of low-density lipoprotein-derived cholesterol in Chinese hamster ovary cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1045**, 40-48.
- Liscum, L. & Underwood, K. W. (1995) Intracellular cholesterol transport and compartmentation. *J. Biol. Chem.* **270**, 15443-15446.
- Liscum, L., and Munn, N.J. (1999) Intracellular cholesterol transport. *Biochimica et Biophysica Acta* **1438**, 19-37.
- Luker, G. D., Nilsson, K. R., Covey, D. F. & Piwnicka-Worms, D. (1999) Multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein enhances esterification of plasma membrane cholesterol. *J. Biol. Chem.* **274**, 6979-6991.
- Mathieu, A. P., Lavigne, P., LeHoux, J. G. (2002) Molecular modeling and structure-based thermodynamic analysis of the StAR protein. *Endocr Res.* **28**, 419-23.
- Mathieu, A. P., Fleury, A., Ducharme, L., Lavigne, P., LeHoux, J. G. (2002) Insights into steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-dependent cholesterol transfer in mitochondria: evidence from molecular modeling and structure-based thermodynamics supporting the existence of partially unfolded states of StAR. *J Mol Endocrinol.* **29**, 327-45.

- Maxfield, F. R. and Wüstner, D. (2002) Intracellular cholesterol transport. *J.Clin.Invest* **110.7**, 891-98.
- McPherson, R. and Gauthier, A. (2004). Molecular regulation of SREBP function: the Insig-SCAP connection and isoform-specific modulation of lipid synthesis. *Biochem Cell Biol.* **82**, 201-11.
- Mendez, A. J., Oram, J. F., Bierman, E. L. (1991) Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol. *J Biol Chem.* **266**, 10104-11.
- Miller, F. D., Chibbar, R. & Mitchell, B. F. (1993) Synthesis of Oxytocin in amnion, chorion and decidua: a potential paracrine role for oxytocin in the onset of human parturition. *Regulatory Peptides* **45**, 247-251.
- Miller, W.L. (2006) StAR Search - What We Know About How the Steroidogenic Acute Regulatory Protein Mediates Mitochondrial Cholesterol Import. *Molecular Endocrinology* Sep 14 [Epub ahead of print]
- Moog-Lutz, C., Tomasetto, C., Regnier, C. H., Wendling, C., Lutz, Y., Müller, D., Chenard, M. P., Basset, P., Rio, M. C. (1997) MLN64 exhibits homology with the steroidogenic acute regulatory protein (STAR) and is over-expressed in human breast carcinomas. *Int J Cancer.***71**, 183-91.
- Moore, J. J., Dubyak, G. R., Moore, R. M. & Vander Kooy, D. (1988) Oxytocin activates the inositol-phospholipid-protein kinase-C system and stimulates prostaglandin production in human amnion cells. *Endocrinology* **123**, 1771-1777. et al., 1988
- Murcia, M., Faráldo-Gómez, J.D., Maxfield, F.R., Roux, B. (2006) Modeling the structure of the StART domains of MLN64 and StAR proteins in complex with cholesterol. *Journal of Lipid Research*, Sep 21 [Epub ahead of print]
- Murata, M., Peränen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T. V. & Simons, K. (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10339-10343.
- Narayanaswami, V. & 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 γ -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. & Blanchette-Mackie, E.J. (1996) Intracellular Trafficking of Cholesterol Monitored with a Cyclodextrin. *J. Biol. Chem.* **271**, 21604-21613.
- Nohturfft, A., Yabe, D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Espenshade, P.J. (2000) Regulated step in cholesterol-feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell* **102**, 315-323.
- Nohturfft, A., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1998) Topology of SREBP Cleavage-activating Protein, a Polytopic Membrane Protein with a Sterol-sensing domain. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 17243-17250.

- Norum, K. R., Lilljeqvist, A. C. & Drevon, C. A. (1977) Coenzyme-A-dependent esterification of cholesterol in intestinal mucosa from guinea-pig. Influence of diet on the enzyme activity. *Scand. J. Gastroenterol.* **12**, 281-288.
- Nunez, M. T. & Glass, J. (1982) Reconstitution of the transferrin receptor in lipid vesicles. Effect of cholesterol on the binding of transferrin. *Biochemistry* **21**, 4139-4143.
- Oram, J. F., Mendez, A. J., Slotte, J. P. & Johnson, T. F. (1991) High density lipoprotein apolipoproteins mediate removal of sterol from intracellular pools but not from plasma membranes of cholesterol-loaded fibroblasts. *Arterioscler. Thromb.* **11**, 403-414.
- Osborne, T. (2000) Sterol Regulatory Element-binding Proteins (SREBPs): Key Regulators of Nutritional Homeostasis and Insulin Action. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 32379-32382.
- Ott, I. & Scott, J. C. (1910) The action of infundibulin upon the mammary secretion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **8**, 48-49.
- Pai, J., Guryev, O., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1998) Differential Stimulation of Cholesterol and Unsaturated Fatty Acid Biosynthesis in Cells Expressing Individual Nuclear Sterol Regulatory Element-binding Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 26138-26148.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. & Miyano, M. (2000) Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* **289**, 739-745.
- Papadopoulos, V., Amri, H., Boujrad, N., Cascio, C., Culty, M., Garnier, M., Hardwick, M., Li, H., Vidic, B., Brown, A. S., Reversa, J. L., Bernassau, J. M., Drieu, K. (1997) Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids* **62**, 21-8.
- Pedersen, C. A., Caldwell, J. D., Jirikowski, G. F. & Insel, T. R., Hrsg. (1992) Oxytocin in maternal, sexual and social behaviors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **652**.
- Petrescu, A.D., Gallegos, A.D., Okamura, Y., Strauss, J.F., and Schroeder, F. (2001) Steroidogenic Acute Regulatory Protein Binds Cholesterol and Modulates Mitochondrial Membrane Sterol Domain Dynamics. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 36970-36982.
- Phillips, M. C., Johnson, W. J. & Rothblat, G. H. (1987) Mechanisms and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer. *Biochim. Biophys. Acta* **906**, 223-276.
- Politowska, E., Kazmierkiewicz, R., Wiegand, V., Fahrenholz, F., Ciarkowski, J. (2001) Molecular modelling study of the role of cholesterol in the stimulation of the oxytocin receptor. *Acta Biochim Pol.* **48**, 83-93.
- Pon, L. A., Vestweber, D., Yang, M., Schatz, G. (1989) Interaction between mitochondria and the nucleus. *J Cell Sci Suppl.* **11**, 1-11.
- Postina, R., Kojro, E., Fahrenholz, F. (1996) Separate agonist and peptide antagonist binding sites of the oxytocin receptor defined by their transfer into the V2 vasopressin receptor. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 31593-601.

- Privalle, C. T., Crivello, J. F., Jefcoate, C. R. (1983) Regulation of intramitochondrial cholesterol transfer to side-chain cleavage cytochrome P-450 in rat adrenal gland. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **80**, 702-6.
- Probst, W. C., Snyder, L. A., Schuster, D. I., Brosius, J. & Sealfon, S. C. (1992) Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol.* **11**, 1-20.
- Radhakrishnan, A., Sun, L.-P., Kwon, H. J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2004) Direct Binding of Cholesterol to the Purified Membrane Region of SCAP: Mechanism of a Sterol-Sensing Domain. *Molecular Cell* **15**, 259-268
- Rawson, R. B., DeBose-Boyd, R., Goldstein, J. L., Brown, M. S. (1999) Failure to Cleave Sterol Regulatory Element-binding Proteins (SREBPs) Causes Cholesterol Auxotrophy in Chinese Hamster Ovary Cells with Genetic Absence of SREBP Cleavage-activating Protein. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 28549-28556.
- Rozen, F., Russo, C., Banville, D. & Zingg, H. H. (1995) Structure, characterization and expression of the rat oxytocin receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 200-204.
- Russell, D. W. (2000) Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta.* **1529**, 126-35.
- Sankaram, M. B. & Thompson, T. E. (1991) Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **88**, 8686-8690.
- Sakai, J., Nohturfft, A., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1998) Cleavage of Sterol Regulatory Element-binding Proteins (SREBPs) at Site-1 Requires Interaction with SREBP Cleavage-activating Protein. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 5785-5793.
- Sakai, J., Nohturfft, A., Cheng, D. Ho, Y.K., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997) Identification of complexes between the COOH-terminal Domains of Sterol Regulatory Element-binding Proteins (SREBPs) and SREBP Cleavage-Activating Protein. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 20213-20221.
- Sandhoff, T. W., Hales, D. B., Hales, K. H., McLean, M. P. (1998) Transcriptional regulation of the rat steroidogenic acute regulatory protein gene by steroidogenic factor 1. *Endocrinology* **139**, 4820-31.
- Sarria, A. J., Panini, S. R. & Evans, R. M. (1992) A functional role for vimentin intermediate filaments in the metabolism of lipoprotein-derived cholesterol in human SW-13 cells. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 19455-19463.
- Schägger, H., and Jagow, G. (1987) Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**, 368-379.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem.* **199**, 223-31.

- Schägger, H., Cramer, W. A., von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217**, 220-230.
- Schröder, F., Nemezc, G., Wood, W. G., Joiner, C., Morrot, G., Ayrault-Jarrier, M. & Devaux, P. F. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1066**, 183-192.
- Schwaiger, M., Herzog, V., Neupert, W. (1987) Characterization of translocation contact sites involved in the import of mitochondrial proteins. *J Cell Biol.* **105**, 235-46.
- Sever, N., Song, B. L., Yabe, D., Goldstein, J. L., Brown, M. S., DeBose-Boyd, R. A. (2003) Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain. *Mol Cell.* **11**, 25-33.
- Shaul, P. W. & Anderson, R. G. (1998) Role of plasmalemmal caveolae and signal transduction. *Am. J. Physiol.* **275**, L843-L851.
- Shimano, H., Horton, J. D., Shimomura, I., Hammer, R. E., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1997) Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J. Clin. Invest.* **99**, 846-854.
- Simbeni, R. Paltauf, F., Daum, G. (1990) Intramitochondrial transfer of phospholipids in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 281-5.
- Simons, K. & Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.
- Simons, K., and Ikonen, E. (2000) How cells handle cholesterol. *Science* **290**, 1721-26.
- Slotte, J. P., Oram, J. F. & Bierman, E. L. (1987) Binding of high density lipoproteins to cell receptors promotes translocation of cholesterol from intracellular membranes to the cell surface *Journal of Biological Chemistry* **262**, 12904-12907.
- Soloff, M. S. & Swartz, T. L. (1973) Characterization of a proposed oxytocin receptor in rat mammary gland. *Journal of Biological Chemistry* **248**, 6471-6478.
- Spillane, D. M., Reagan, J. W., Kennedy, N. J., Schneider, D. L. & Chang, T.-Y. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1254**, 283-294.
- Smart, E. J., Ying, Y., Donzell, W. C., Anderson, W. G. (1996) A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 29427-29435.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 75-85.
- Stocco, D. M., Clark, B. J. (1996) Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev.* **17**, 221-44.

- Stocco, D. M., Clark, B. J. (1996) Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochem Pharmacol.* **51**, 197-205.
- Stocco and Chen, 1991 Presence of identical mitochondrial proteins in unstimulated constitutive steroid-producing R2C rat Leydig tumor and stimulated nonconstitutive steroid-producing MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Endocrinology* **128**, 1918-26.
- Stocco, D. M. and Kilgore, M. W. (1988) Induction of mitochondrial proteins in MA-10 Leydig tumour cells with human choriogonadotropin. *Biochem J.* **249**, 95-103.
- Stocco, D.M. (2000) The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *Journal of Endocrinology* **164**, 247-253.
- Stocco, D. M. (2001) StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 193-213.
- Stocco, D. M. (2001) Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. *Mol Endocrinol.* **15**, 1245-54.
- Stoffel-Wagner, B. (2003) Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications. *Ann N Y Acad Sci.* **1007**, 64-78.
- Strauss, J.F. III, Liu, P., Christenson, L.K., Watari, H. Sterols and intracellular vesicular trafficking: lessons from the study of NPC1. *Steroids* **67**, 947-951
- Sugawara, T., Holt, J.A., Driscoll, D., Strauss, J.F., Lind, D., Miller, W.L., Patterson, D., Clancy, K.P., Hart, I.M., Clark, B.J., and Stocco, D.M. (1995) Human steroidogenic acute regulatory protein: Functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4778-4782.
- Thomson, M. (2003) Does cholesterol use the mitochondrial contact site as a conduit to the steroidogenic pathway? *BioEssays* **25**, 252-258.
- Tsujishita, Y. and Hurley, J.H. (2000) Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. *Nature Structural Biology* **7**, number 5, 408-414.
- Tuckey, R. C., Bose, H. S., Czerwionka, I., Miller, W. L. (2004) Molten globule structure and steroidogenic activity of N-218 MLN64 in human placental mitochondria. *Endocrinology.* **145**, 1700-7.
- Uittenbogaard, A., Ying, Y. & Smart, E. J. (1998) Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J. Biol. Chem.* **273**, 6525-6532.
- Underwood, K. W., Andemariam, B., McWilliams, G. L. & 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. & 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.

van, Meer G. and R. M. Liskamp (2005) Brilliant lipids. *Nature Methods* **2**, 114-15.

Watari, H., Arakane, F., Moog-Lutz, C., Kallen, C.B., Tomasetto, C., Gerton, G.L., Rio, M.C., Baker, M.E., Strauss, J.F. (1997) MLN64 contains a domain with homology to the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that stimulates steroidogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8462-8467.

West, L.A., Horvat, R.D., Roess, D.A., Barisas, B.G., Juengel, J.L., Niswender, G.D. (2001) Steroidogenic acute regulatory protein and peripheral-type benzodiazepine receptor associate at the mitochondrial membrane. *Endocrinology* **142**, 502-505.

Wiegand (2002) Cholesterin – Interaktion mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und intrazelluläre Verteilung. Dissertation Universität Mainz.

Wiegand, V., Chang, T.-Y., Strauss, J.F., Fahrenholz, F., and Gimpl, G. (2003) Transport of plasma membrane-derived cholesterol and the function of Niemann-Pick C1 protein. *The FASEB J.*, doi: 10.1096/fj.02-0818fje, published online February 19, 2003.

Wu, W.-G. & Chi, L.-M. (1991) Conformational change of cholesterol side chain in lipid bilayers. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 4683-4685.

Wüstner, D., Mukherjee, S., Maxfield, F. R., Müller, P., Herrmann, A. (2001). Vesicular and nonvesicular transport of phosphatidylcholine in polarized HepG2 cells. *Traffic* **4**, 277-96.

Yabe, D., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2002) Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 12753-12758.

Yang, T., Espenshade, P.J., Wright, M.E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J.L., Brown, M.S. (2002) Crucial Step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* **110**, 489-500.

Yaworsky, D.C., Baker, B.Y., Bose, H.S., Best, K.B., Jensen, L.B., Bell J.D., Baldwin, M.A., Miller, W.L. (2005) pH-dependent Interactions of the carboxyl-terminal helix of steroidogenic acute regulatory protein with synthetic membranes. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 2045-54.

Yeagle, P. L. (1991) Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie* **73**, 1303-1310.

Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M. R., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J. L., Brown, M. S. (1993) SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* **75**, 187-97.

Zhang, M., Liu, P., Dwyer, N.K., Christenson, L.K., Fujimoto, T., Martinez, F., Comly, M., Hanover, J.A., Blanchette-Mackie, and Strauss, J.F. (2002) MLN64 Mediates Mobilization of Lysosomal Cholesterol to Steroidogenic Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 33300-33310.

6.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des Cholesterins.....	Seite 9
Abbildung 2: Cholesterinbiosynthese, Aufnahme von Cholesterin in die Zelle und intrazellulärer Transport.....	Seite 11
Abbildung 3: Drei grundlegende Mechanismen des intrazellulären Cholesterintransports.....	Seite 12
Abbildung 4: ER- und Mitochondrienmembranen kommen in engen räumlichen Kontakt.....	Seite 15
Abbildung 5: Cholesterintransport in steroidogenen Zellen.....	Seite 15
Abbildung 6: Wechselwirkung zwischen Cholesterin und Membran-Phospholipiden.....	Seite 18
Abbildung 7: Die Cholesterinbiosynthese.....	Seite 21
Abbildung 8: In der Membran des Endoplasmatischen Retikulums befindet sich ein Proteinkomplex aus SCAP und SREBP, der mit Insig interagieren kann.....	Seite 22
Abbildung 9: Proteolytische Spaltung des SREBPs.....	Seite 23
Abbildung 10: Transport des SCAP-SREBP Komplexes vom ER zum Golgi und proteolytische Prozessierung des SREBPs.....	Seite 24
Abbildung 11: Die SREBP Isoformen haben unterschiedliche Funktionen	Seite 26
Abbildung 12: Cholesterin bindet an SCAP.....	Seite 27
Abbildung 13: Der erste Schritt der Synthese von Steroidhormonen findet in den Mitochondrien Steroidhormon produzierender Zellen statt.....	Seite 29
Abbildung 14: Die Bildung verschiedener Steroidhormone aus Cholesterin.....	Seite 29
Abbildung 15: Regulation der Steroidogenese.....	Seite 30
Abbildung 16: Zwei verschiedene Modelle zur Funktion des StAR-Proteins.....	Seite 34

Abbildung 17: Bildung eines Membrankontakts zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran.....	Seite 35
Abbildung 18: Ein möglicher Mechanismus des Cholesterintransports in Mitochondrien.....	Seite 37
Abbildung 19: Der periphere Benzodiazepinrezeptor (PBR) ist möglicherweise am Cholesterintransport in Mitochondrien beteiligt.....	Seite 38
Abbildung 20: Das MLN 64-Protein.....	Seite 39
Abbildung 21: Signaltransduktion durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	Seite 42
Abbildung 22: Aufbau G-Protein gekoppelter Rezeptoren.....	Seite 42
Abbildung 23: Ligandenbindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	Seite 43
Abbildung 24: Der humane Oxytocinrezeptor.....	Seite 46
Abbildung 25: Die Struktur von Oxytocin.....	Seite 46
Abbildung 26: Der Oxytocinrezeptor wird durch Cholesterin reguliert.....	Seite 48
Abbildung 27: Einfluss des Membran-Cholesteringehalts auf die Ligandenbindung des Oxytocinrezeptors.....	Seite 49
Abbildung 28: Ligandenbindung des Oxytocinrezeptors und des Cholecystokininrezeptors in Relation zur Anisotropie der Membranen.....	Seite 50
Abbildung 29: Die Nickel-NTA-Matrix bindet Proteine mit His-Tags.....	Seite 65
Abbildung 30: Das FlpIn-System.....	Seite 69
Abbildung 31: Formel des Azocholestanols.....	Seite 76
Abbildung 32: Cyanbromid spaltet Proteine nach Methioninresten.....	Seite 78
Abbildung 33: Fotoaffinitätsmarkierung des StAR-Proteins und Analyse per Röhrchengel.....	Seite 90
Abbildung 34: Einfluss von Hitzedenaturierung auf die Fotoaffinitätsmarkierung des StAR- Proteins.....	Seite 91
Abbildung 35: Sequenz des N62-C-His-StAR-Proteins und durch Cyanbromidspaltung entstehende Fragmente.....	Seite 92
Abbildung 36: Fotoaffinitätsmarkierung von 62,4 µg StAR-Protein, Cyanbromid-Spaltung und Analyse der Proteinfragmente per Röhrchengel und Szintillationsmessung.....	Seite 93

Abbildung 37: Fotoaffinitätsmarkierung von 20 µg des StAR-Proteins bei pH 7,4.....	Seite 94
Abbildung 38: Fotoaffinitätsmarkierung des StAR-Proteins, Cyanbromidspaltung, Auftrennung der Fragmente per Gelelektrophorese und Szintillationsmessung.....	Seite 95
Abbildung 39: Fotoaffinitätsmarkierung des StAR-Proteins und Analyse per Massenspektrometrie.....	Seite 96
Abbildung 40: Massenspektrometrische Analyse des mit Cyanbromid gespaltenen StAR-Proteins.....	Seite 97
Abbildung 41: Massenspektrometrische Analyse des cyanbromidgespaltenen StAR-Proteins mit IMAC-Proteinchips.....	Seite 99
Abbildung 42: Sequenz des StAR-Proteins und Fragmente bei Spaltung mit LysC.....	Seite 100
Abbildung 43: Fotoaffinitätsmarkierung von 20 µg StAR-Protein, enzymatische Spaltung mit der Protease LysC und Analyse der Proteinfragmente per Röhrchengel und Szintillationsmessung.....	Seite 101
Abbildung 44: Unterschiedliche Fragmente des StAR-Proteins bei der Spaltung mit Lys-C oder Cyanbromid.....	Seite 102
Abbildung 45: Fotoaffinitätsmarkierung des StAR-Proteins bei pH 7,4 (A) und bei pH 3,0 (B) und anschließende enzymatische Spaltung mit Lys-C.....	Seite 103
Abbildung 46: Fotoaffinitätsmarkierung des StAR-Proteins und der inaktiven StAR-A218V-Mutante bei pH 7,4 und bei pH 3,0, Cyanbromidspaltung und Analyse der Fragmente per Röhrchengel.....	Seite 104
Abbildung 47: Fotoaffinitätsmarkierung von je 20 µg StAR-Protein bei steigender [³ H]-Azocholestanol-Konzentration.....	Seite 107
Abbildung 48: Verdrängung des fotoreaktiven Cholesterinderivates vom StAR-Protein durch Cholesterin.....	Seite 108
Abbildung 49: Struktur von NBD-Cholesterin (22-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)- 23,24-bisnor-5-cholen-3β-ol) und von Dehydroergosterol (Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol).....	Seite 109
Abbildung 50: Interaktion des StAR-Proteins mit NBD-Cholesterin.....	Seite 110
Abbildung 51: Die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit	

von der Proteinkonzentration bei verschiedenen pH-Werten.....	Seite 111
Abbildung 52: Die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Konzentration des NBD-Cholesterins.....	Seite 111
Abbildung 53: Interaktion des StAR-Proteins mit Dehydroergosterol bei pH 7,4.....	Seite 112
Abbildung 54: Interaktion des StAR-Proteins mit Dehydroergosterol bei pH 3,0.....	Seite 113
Abbildung 55: Interaktion der StAR-A218V-Mutante mit DHE bei pH 7,4.....	Seite 113
Abbildung 56: Fotoaffinitätsmarkierung des StAR-Proteins und Analyse per SDS-Gel und Western-Blot.....	Seite 114
Abbildung 57: Fotoaffinitätsmarkierung des MLN64-Proteins, Cyanbromidspaltung und Analyse per Röhrchengel.....	Seite 116
Abbildung 58: Fotoaffinitätsmarkierung des MLN64-Proteins und Analyse per Massenspektrometrie.....	Seite 117
Abbildung 59: Fotoaffinitätsmarkierung des MLN64-Proteins, Cyanbromidspaltung und massenspektrometrische Analyse der Fragmente.....	Seite 118
Abbildung 60: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung des MLN64-Proteins.....	Seite 119
Abbildung 61: Fotoaffinitätsmarkierung von MLN64 und Nachweis per Western-Blot.....	Seite 120
Abbildung 62: Fotoaffinitätsmarkierung des Oxytocinrezeptors.....	Seite 123
Abbildung 63: Immunpräzipitierung des Oxytocinrezeptors.....	Seite 124
Abbildung 64: Nichtradioaktive Fotoaffinitätsmarkierung des Oxytocinrezeptors und Analyse per Western-Blot.....	Seite 128
Abbildung 65: Fotoaffinitätsmarkierung von SCAP.....	Seite 129
Abbildung 66: Fotoaffinitätsmarkierung von SCAP-TM 1-6 und SCAP-TM-1-8.....	Seite 130
Abbildung 67: Die Topologie von SCAP und von Antikörpern erkannte Epitope.....	Seite 130
Abbildung 68: Wenn SCAP Cholesterin bindet,	

- dann ändert es seine Konformation so,
dass die Argininreste in Position 503 und 505
für die Protease Trypsin zugänglicher werden.....Seite 131
- Abbildung 69: Fotoaffinitätsmarkierung von SCAP TM 1-8,
Trypsinspaltung und Analyse per Westernblot.....Seite 133
- Abbildung 70: Chymotrypsinspaltung von SCAP erzeugt
ein N-terminales, etwa 10 kDa großes Fragment.....Seite 134
- Abbildung 71: Isolierung von SCAP-TM-1-6 mittels Anti-Flag-
Affinitätsmatrix und Calmodulin-Affinitätsmatrix.....Seite 135
- Abbildung 72: Regulation der SCAP-Insig-Interaktion
bei steigender 25-Hydroxy-cholesterin-Konzentration.....Seite 137
- Abbildung 73: Die Bildung des SCAP-Insig-Komplexes
lässt sich auch bei isolierten Zellmembranen
mit 25-Hydroxycholesterin induzieren.....Seite 138
- Abbildung 74: Die Interaktion lässt sich sowohl durch
25-Hydroxycholesterin als auch durch Cholesterin auslösen.....Seite 138
- Abbildung 75: Stimulation der SCAP-Insig-Interaktion
durch Cholesterin und 25-Hydroxycholesterin (25-HC).....Seite 139
- Abbildung 76: Vergleich des SCAP-Wildtyps mit der Y298C-Mutante.....Seite 140
- Abbildung 77: Die SCAP-Y298C-Mutante kann nicht durch
25-Hydroxycholesterin zur Interaktion mit Insig gebracht werden.
Die D428A-Mutante interagiert auch in Abwesenheit
von 25-Hydroxycholesterin mit Insig.....Seite 141
- Abbildung 78: Analyse von SCAP-D428-Punktmutanten per Blue Native Gel.....Seite 142
- Abbildung 79: Einfluss von Cholesterin auf die SCAP-Mutanten
D428R und D428K.....Seite 143
- Abbildung 80: Position der K305A-, L352F- und der
N360A-Punktmutationen.....Seite 144
- Abbildung 81: Einfluss von 25-Hydroxycholesterin
auf die SCAP-Mutanten K305A, L352 und N360A.....Seite 145
- Abbildung 82: Die SCAP-K305A-Mutante wird ebenso
wie der SCAP-Wildtyp durch Cholesterin reguliert.....Seite 146
- Abbildung 83: Sequenzalignment der START-
Domänen von MLN64 und StAR.....Seite 147
- Abbildung 84: Struktur des StAR-Proteins.....Seite 148

Abbildung 85: Das StAR-Protein interagiert über die C-terminale α -Helix mit Membranen.....	Seite 150
Abbildung 86: Durch zusätzliche Disulfidbrückenbindungen wird die C-terminale α -Helix kovalent an das StAR-Protein gebunden.....	Seite 150
Abbildung 87: StAR lagert sich mit der C-terminalen α -Helix an Membranen an.....	Seite 151
Abbildung 88: StAR und MLN64 geben ihren Liganden Cholesterin durch eine Bewegung der Ω 1-Schleife wieder frei.....	Seite 151
Abbildung 89: Molekulares Modeling der Interaktion von Cholesterin mit StAR.....	Seite 153
Abbildung 90: Vier mögliche Orientierungen von Cholesterin in der Bindungstasche von MLN64.....	Seite 155
Abbildung 91: Die Aminosäuren in bestimmten Positionen von SCAP sind bei vielen Spezies konserviert.....	Seite 162
Tabelle 1: Radioaktive Markierung des StAR-Proteins und der StAR-A218V-Mutante bei pH 7,4 und bei pH 3,0.....	Seite 105
Tabelle 2: Quantifizierung der Azocholestanolbindung an das StAR-Protein.....	Seite 106

6.3 Abkürzungsverzeichnis

ABC-Translocator-Protein	ABC: ATP-Binding-Cassette
ACAT	Acyl-Coenzym A: Cholesterin-Acyltransferase
ACC	Acetoacetyl-Coenzym A
Abb	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bzw	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCKR	Cholecystokininrezeptor
CE	Cholesterinester
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CHAPSO	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonat

CHO	Chinese Hamster Ovary
DC	Dünnschichtchromatographie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
dpm	decays per minute
<i>E.coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAS	Fatty Acid Synthesis
FCS	Fetal Calf Serum
FD-Massenspektrometrie	Feld-Desorptions-Massenspektrometrie
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GABA	γ -Aminobuttersäure
GTP	Guanosintriphosphat
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Proteinkinase
h	Stunde
HBS	HEPES-Buffered Saline
HDL	High Density Lipoprotein
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPCD	Hydroxy-Propyl- β -Cyclodextrin
HSP56	Heat Shock Protein 56
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K _D	Dissoziationskonstante
KAN	Kanamycin
kDa	Kilodalton
K _D	Dissoziationskonstante
LE	Late Endosomes
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LDL	Low Density Lipoprotein
LY	Lysosomes
M β CD	Methyl- β -Cyclodextrin

min	Minute
MLCK	smooth muscle myosin light chain kinase
MLN64	Metastatic Lymph Node 64-Protein
NMR	Kernspinresonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
NPC1-Protein	Niemann Pick Typ C 1-Protein
OSBP	Oxysterol Binding Protein
OT	Oxytocin
[³ H]-OT	tritiummarkiertes Oxytocin
OTR	Oxytocinrezeptor
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCI	Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol
PCR	Polymerase Chain-Reaction
PEG	Polyethylenglykol
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Diacylglycerol-aktivierte Proteinkinase
RE	Recycling Endosomes
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCAP	Sterol responsive element binding protein Cleavage Activating Protein
SRB1	Scavenger-Rezeptor Typ B1
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SE	Sorting Endosomes
SPL	Sphingolipide
SRB1	Scavenger-Rezeptor Typ B1
SREBP	Sterol Regulatory Element-Binding Protein
StAR-Protein	Steroidogenic Acute Regulatory protein
START-Domänen	StAR related Lipid Transfer-Domänen
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett

v/v	Volumen pro Volumen
WGA	Wheat Germ Agglutinin
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht (weight) pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht

Die Aminosäuren sind entsprechend dem Drei-Buchstaben-Code oder entsprechend dem Ein-Buchstaben-Code abgekürzt.