

**Untersuchungen zur intrazellulären Speicherung
verschiedener Plasmamembranproteine in einer
Fibroblastenzelllinie aus der Ratte**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main



von

Claudia Fohrer

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2006

(D30)

Vom Fachbereich Biowissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. R. Wittig

Gutachter: Prof. Dr. W. Volknandt
Prof. Dr. H. Zimmermann

Datum der Disputation: 27.06.2006

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit hilfreich zur Seite gestanden haben, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Zimmermann und Herrn Prof. Dr. W. Volkandt für die freundliche Aufnahme im Arbeitskreis Neurochemie, die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen und die Begutachtung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. Frank Bonzelius danke ich für die wissenschaftliche Betreuung und die hilfreiche Unterstützung, die erheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Auch Frau Jasmin El-Delik möchte ich für ihre Unterstützung und die freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre danken.

Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. A. Ullrich, MPI für Biochemie in Martinsried, der mir freundlicherweise das Plasmid VSVG-proHB-EGF zur Verfügung stellte.

Der Jürgen Manchot Stiftung (vormals Pinguin Stiftung) danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Darüber hinaus danke ich meinen Freunden und insbesondere Herrn Stefan Volk für ihr Interesse und den seelischen Beistand.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Vater bedanken, der mit viel Geduld meinen Werdegang unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Struktur und Funktion von GSVs.....	2
1.1.1	Dynamik der GSVs	4
1.1.2	GSV-spezifische Proteine	9
1.2	Spaltung von Ektodomänen membranassoziierter Proteine.....	10
1.2.1	Hydrolytische Spaltung von proHB-EGF	12
1.2.2	Metalloproteasen vom Typ der ADAMs.....	13
1.2.3	Die Rolle von ADAMs bei der Transaktivierung des EGFR durch	
	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	14
1.3	Fragestellung	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Geräte	17
2.2	Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmittel.....	18
2.3	Plasmide	21
2.4	Reagenzien für den Restriktionsverdau.....	22
2.5	Bakterienstämme	23
2.6	Zelllinien	23
2.7	Antikörper	23
2.8	Lösungen und Puffer	24
2.8.1	Medien und Lösungen für die Bakterienkultur	24
2.8.2	Medien und Lösungen für die Zellkultur	26
2.8.3	Lösungen für die Transfektion von Säugerzellen	27
2.8.4	Lösungen für die subzelluläre Fraktionierung	28
2.8.5	Lösungen für die Gradientenzentrifugation	29
2.8.6	Lösungen für die Proteinbestimmung nach Bradford	30
2.8.7	Lösungen für die Proteinbestimmung nach Peterson.....	31
2.8.8	Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese und den Western-Blot.....	32
2.8.9	Lösungen für die Aufreinigung des anti-GLUT4 Antikörpers an	
	Protein A Sepharose.....	36
2.8.10	Lösungen für die Immunadsorption	36
2.8.11	Lösungen für die Zelloberflächen-Analyse.....	37
2.9	Molekularbiologische Methoden.....	38

2.9.1	Umklonierung von Plasmid-Vektoren	38
2.9.2	Transformation von chemisch kompetenten <i>Escherischia coli</i> XL1blue und DH5 α	39
2.9.3	Mini-Präparation von Plasmid-DNA nach del Sal et al. (1988)	40
2.9.4	Gelelektrophorese.....	41
2.9.5	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> XL1blue und <i>E.coli</i> DH5 α nach Qiagen	42
2.10	Zellbiologische Methoden.....	43
2.10.1	Auftauen von Säugetierzellen	43
2.10.2	Einfrieren von Säugetierzellen.....	43
2.10.3	Ablösen und Umsetzen von adhärenenten Zellen.....	43
2.10.4	Stabile Transfektion von Rat1-W575-Zellen und transiente Transfektion	44
	von CHO/GLUT4-Zellen mittels Elektroporation	44
2.10.5	Selektion der stabil transfizierten Rat1-W575-Zellen.....	45
2.10.6	Transfektionsnachweis durch Analyse der Einzelklone.....	46
2.11	Subzelluläre Fraktionierung	46
2.11.1	Subzelluläre Fraktionierung modifiziert nach Herman et al. (1994)	46
2.11.2	Subzelluläre Fraktionierung nach einem Temperaturblock	48
2.11.3	Subzelluläre Fraktionierung nach Blockierung der Endozytose durch hypertones Medium	48
2.11.4	Subzelluläre Fraktionierung nach Stimulation der Zellen mit Thrombin	48
2.11.5	Isolierung und Anreicherung VSVG-proHB-EGF enthaltender Membrankompartimente aus transfizierten CHO/GLUT4-Zellen	49
2.12	Spaltung von VSVG-proHB-EGF durch Vesikel-assoziierte Proteasen.....	50
2.13	Proteinbiochemische Methoden	50
2.13.1	Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford (1976).....	50
2.13.2	Bestimmung des Proteingehaltes nach Peterson	51
2.13.3	Proteinfällung	51
2.13.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli et al. (1970).....	52
2.13.5	Western-Blot	53
2.14	Aufreinigung des anti-GLUT4 Antikörpers an Protein A Sepharose	55
2.15	Immunadsorption	56
2.16	Zelloberflächen-Analyse	58
3	Ergebnisse.....	60

3.1	Transfektion von Rat1-Zellen	60
3.1.1	Klonierung des Vektors.....	60
3.1.2	Stabile Transfektion von Rat1-Zellen mit GLUT4myc	62
3.2	Subzelluläre Verteilung vesikelassoziierter Proteine in Rat1/GLUT4myc-Zellen	64
3.2.1	Analyse der intrazellulären Lokalisation von GLUT4 mittels subzellulärer Fraktionierung	64
3.2.2	Nachweis einer VSVG-proHB-EGF spaltenden vesikulären Enzymaktivität.	66
3.2.3	Verteilung der Proteasen ADAM10 und TACE	69
3.2.4	Intrazelluläre Lokalisation des Thrombinrezeptors.....	71
3.2.5	Vergleichende Analyse der Verteilung von TGN-Vesikeln	73
3.3	Analyse der Colokalisation verschiedener Membranproteine mit GSVs	75
	mittels Immunadsorption.....	75
3.3.1	Effizienz und Spezifität der GLUT4-Bindung	75
3.3.2	Analyse der Colokalisation der proHB-EGF spaltenden Enzymaktivität	78
	mit GSVs	78
3.3.3	Analyse der Colokalisation der Proteasen ADAM10 und TACE mit GSVs... ..	80
3.3.4	Analyse des humanen Thrombinrezeptors auf Colokalisation mit GSVs.....	82
3.3.5	Assoziation eines TGN-Markerproteins mit GSVs.....	84
3.4	Dynamik der GSVs in Rat1/GLUT4myc-Zellen	86
3.4.1	Analyse der GSV-Biosynthese unter Temperaturblock-Bedingungen	86
3.4.2	Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose	90
3.4.3	Zelloberflächenanalyse nach Hemmung der	
	Clathrin-vermittelten Endozytose	93
3.4.4	Stimulation der Rat1/GLUT4myc-Zellen mit Thrombin	95
4	Diskussion.....	105
4.1	Stabile Expression von GLUT4	106
4.2	Ist eine proHB-EGF hydrolysierende Protease in Rat1/GLUT4myc-Zellen	
	mit GSVs assoziiert?	108
4.2.1	Charakterisierung der Lokalisation einer proHB-EGF spaltenden Proteaseaktivität in Rat1/GLUT4myc-Zellen.....	109
4.2.2	Sind die Proteasen ADAM10 und TACE mit GSVs assoziiert?.....	111

4.3	Assoziation des humanen Thrombinrezeptors und eines TGN-Markerproteins mit intrazellulären Membrankompartimenten in Rat1/GLUT4myc-Zellen	112
4.4	Dynamik der GSVs in Rat1/GLUT4myc-Zellen	114
4.4.1	Analyse der regulierten Exozytose der GSVs	114
4.4.2	Charakterisierung der GSV-Rezirkulation	117
4.4.3	Analyse der GSVs unter Temperaturblockbedingungen.....	118
4.5	Offene Fragen und Ausblick	119
5	Zusammenfassung	121
6	Abkürzungsverzeichnis	124
7	Literatur	128

1 Einleitung

Die Zusammensetzung der Plasmamembran tierischer Zellen kann unter anderem durch regulierte Exozytose und durch hydrolytische Abspaltung von Ektodomänen membranassoziierter Proteine (Ectodomain Shedding) modifiziert werden.

Bei der regulierten Exozytose fusionieren intrazelluläre Vesikel auf ein spezifisches Signal hin mit der Plasmamembran. Solche Vesikel werden sowohl am **Trans-Golgi-Netzwerk (TGN)** als auch aus Endosomen gebildet. Ein besonders gut untersuchtes Beispiel eines Vesikels endosomalen Ursprungs, dessen Exozytose reguliert wird, ist der synaptische Vesikel. Das spezifische Signal, das zu einer Fusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran der Nervenendigung führt, ist eine erhöhte Ca^{2+} -Ionen-Konzentration infolge einer Depolarisation der Nervenzelle (Übersichtsartikel: Südhof, 2004). Regulierte Exozytose spezialisierter Vesikel konnte auch an Muskel- und Fettzellen nachgewiesen werden. Diese spezialisierten Vesikel, die sogenannten **GSVs (GLUT4 containing small vesicles)**, dienen der intrazellulären Speicherung des **Glucosetransporters4 (GLUT4)** sowie seinem insulin-abhängigen Einbau in die Plasmamembran (Kap. 1.1).

Eine proteolytische Abspaltung der Ektodomänen von Zelloberflächenproteinen ist ein weit verbreiteter Regulationsmechanismus. Eine solche Modifikation der Plasmamembranzusammensetzung kann z.B. zur Freisetzung von Enzymen oder von regulatorischen Wachstumsfaktoren führen (Kap. 1.2). Ein gut untersuchtes Beispiel für einen auf diese Weise regulierten Wachstumsfaktor, der so in eine lösliche Form überführt wird, ist der Heparin-bindende epidermale Wachstumsfaktor (**heparin binding-epidermal growth factor = HB-EGF**), der während der Zellproliferation und bei der Wundheilung von großer Bedeutung ist (Übersichtsartikel: Martin, 1997; Higashiyama, 2004).

1.1 Struktur und Funktion von GSVs

In der Plasmamembran sind Rezeptor-, Transport- und Kanalproteine inseriert, die der Zelle einen Austausch mit ihrer Umgebung ermöglichen.

Bei der rezeptorvermittelten Endozytose gelangen einige dieser Membranproteine unter Beteiligung Clathrin-umhüllter Vesikel ins sogenannte frühe Endosom. Ein Teil dieser Proteine wird nach ihrer Internalisierung zur Degradation an die Lysosomen weitergeleitet, andere rezirkulieren konstitutiv zur Zelloberfläche zurück. Eine dritte Gruppe von Plasmamembranproteinen akkumuliert nach der Endozytose in intrazellulären Speicherkompartimenten.

Die Speicherkompartimente unterliegen einer Regulation durch extrazelluläre Signale und gewährleisten eine schnelle Mobilisierung der Membranproteine zurück zur Zelloberfläche bei Eingang eines entsprechenden Reizes. Ohne Neusynthese von Proteinen kann auf diese Weise die Zusammensetzung der Plasmamembran rasch den jeweiligen Erfordernissen angepasst werden (Kelly, 1993).

In Fett- und Muskelzellen von Säugetieren konnten solche spezialisierten Speichervesikel, die neben anderen Membranproteinen unter physiologischen Bedingungen auch GLUT4 enthielten, nachgewiesen werden (Slot et al., 1991; Rodnick et al., 1992). GLUT4 gehört zu einer Familie von strukturell eng verwandten Glucosetransportern, die alle 12 transmembrane Domänen aufweisen (James et al., 1989, Übersichtsartikel: Gould & Bell, 1990; Wood & Trayhurn, 2003). Innerhalb dieser Familie ist GLUT4 der einzige Transporter, der einer strengen Insulin-Regulation unterliegt. Neben Fett- und Muskelzellen scheinen auch Gehirn (Rayner et al., 1994) und Plazenta (Xing et al., 1998; Ericsson et al., 2005) GLUT4 zu exprimieren. Die GLUT4-enthaltenden Vesikel sind Teil eines tubulovesikulären Systems und weisen eine relativ homogene Größenverteilung (Durchmesser: 50-100 nm) auf. Man fand heraus, dass die GSVs an der Insulin-abhängigen Translokation des GLUT4 zur Zelloberfläche beteiligt sind und somit eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutzuckerspiegels spielen (Übersichtsartikel: James et al., 1994; Pessin et al., 1999; Simpson et al., 2001; Dugani & Klip, 2005). In Abwesenheit eines Stimulus findet sich ein Großteil des von Fett- und Muskelzellen exprimierten GLUT4 in intrazellulären tubulovesikulären Strukturen. Erhöht sich durch Aufnahme von Nahrung der Blutzuckerspiegel, dann wird Insulin von B-Zellen des Pankreas ausgeschüttet. Die Bindung des Hormons an einen spezifischen Rezeptor auf der Zelloberfläche führt innerhalb weniger Minuten zu einer Translokation von

mehr als der Hälfte des intrazellulär gespeicherten GLUT4 in die Plasmamembran. Dies bewirkt eine erhöhte Glucoseaufnahme und dadurch eine Absenkung des Blutzuckerspiegels. Über die Identität der GSVs ist in der Vergangenheit viel spekuliert worden (Übersichtsartikel: James et al., 1994). Eine Verwandtschaft der GLUT4-enthaltenden Vesikel mit synaptischen Vesikeln (Laurie et al., 1993) oder mit endozytotischen Transportvesikeln (Cutler, 1993) ist postuliert worden.

In Transfektionsstudien mit PC12-(Phaeochromocytoma12-) Zellen aus dem Nebennierenmark der Ratte, 3T3-Zellen (einer Fibroblastenzelllinie aus der Maus), CHO-(Chinese Hamster Ovary) Zellen und Rat1-Zellen (einer Fibroblastenzelllinie aus der Ratte), die unter physiologischen Bedingungen kein GLUT4 exprimieren, konnten diese Vesikel mit einer homogenen Größenverteilung von 60-90 nm ebenfalls nachgewiesen werden (Herman et al., 1994; Bonzelius & Herman, unveröffentlichte Daten). In CHO-Zellen sind diese Vesikel - wie für Fett- und Muskelzellen beschrieben - endozytotischen Ursprungs und rezirkulieren konstitutiv zu und von der Plasmamembran (Wei et al., 1998; Li et al., 2001; Übersichtsartikel: Pessin et al., 1999). Nach den Befunden der genannten Autoren handelt es sich bei den GSVs scheinbar um eine neue, eigenständige Vesikelpopulation, die eventuell in zahlreichen Zelltypen für die intrazelluläre Speicherung von Zelloberflächenproteinen sowie deren stimulationsabhängige Translokation zur Plasmamembran zuständig sein könnte.

1.1.1 Dynamik der GSVs

Wie oben beschrieben, scheint GLUT4 in allen bisher daraufhin untersuchten Zelltypen ständig zwischen der Plasmamembran und seinem Speicherkompartiment zu zirkulieren. In Fett- und Muskelzellen wirkt Insulin offenbar sowohl über eine Erhöhung der Exozytoserate als auch über die Herabsetzung der Endozytoserate des Glucosetransporters (Shibata et al., 1996; Huang et al., 2001; Übersichtsartikel: Watson et al., 2004; Dugani & Klip, 2005). Nach Beendigung der Insulinanregung wird GLUT4 durch vermehrte Clathrin-vermittelte Endozytose aus der Plasmamembran entfernt. Der Glucosetransporter gelangt dann über ein endosomales Kompartiment wieder in neu gebildete GSVs.

1.1.1.1 Regulation der GSV-Translokation

Verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden sind an der Translokation von GSVs in Fett- und Muskelzellen beteiligt.

Die Stimulation der Zielzellen erfolgt über spezifische membranständige Rezeptoren für Insulin. Der Insulinrezeptor ist ein über Disulfidbrücken verbundenes α_2 -, β_2 - Heterotetramer. Er gehört zur Familie der Wachstumsfaktoren-Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität. Die α -Untereinheiten sind an der extrazellulären Seite der Plasmamembran lokalisiert und tragen die Bindungsstelle für das Peptidhormon. Die β -Untereinheiten hingegen besitzen eine extrazelluläre, eine transmembrane und eine intrazelluläre Region (Übersichtsartikel: Elmendorf & Pessin, 1999).

Insulin aktiviert nach der Bindung an die α -Untereinheiten des Rezeptors in der Zielzelle die Rezeptortyrosinkinase der β -Untereinheiten. Dies führt zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors an multiplen Tyrosinresten (Übersichtsartikel: Holman & Kasuga, 1997), wodurch sich die Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors erhöht. Dies führt wiederum zur Phosphorylierung von Rezeptor-bindenden Proteinen, zu denen neben der Insulinrezeptorsubstratfamilie IRS-1, IRS-2, IRS-3 und IRS-4 unter anderem auch Cbl und Gab-1 (**G**rb2-associated **b**inder-1) gehören, die zwischen Insulinrezeptor und verschiedenen Signaltransduktionselementen vermitteln können. Die Phosphotyrosinreste in IRS-1 und den anderen erwähnten Rezeptor-bindenden Proteinen befinden sich in spezifischen Domänen, die wiederum von anderen Proteinen über SH2 (**s**rc-**H**omologie2)- Domänen erkannt und gebunden werden (Übersichtsartikel: Saltiel & Pessin, 2002). SH2-Domänen finden sich

beispielsweise bei der **Phosphatidylinositol-3-Kinase** (PI-3-Kinase), sowie auch bei dem Grb2-SOS-System (**growth-factor receptor-bound protein2-son-of-sevenless**) (Übersichtsartikel: Holman & Kasuga, 1997). Die PI-3-Kinase spielt eine zentrale Rolle bei der Auslösung der Translokation der GSVs. Das Enzym wird von IRS-1 aktiviert und wahrscheinlich auch innerhalb der Zelle an die Plasmamembran und andere Kompartimente positioniert (Übersichtsartikel: Elmendorf & Pessin, 1999). PI-3-Kinase ist aus einer regulatorischen p85- und einer katalytischen p110-Untereinheit zusammengesetzt, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) phosphoryliert. Das wiederum führt zur Aktivierung der 3' phosphoinositol-abhängigen Kinase-1 (3' **phosphoinositide-dependent kinase-1** = PDK-1). PDK-1 phosphoryliert und aktiviert die **Protein-Kinase B** (PKB) - auch bekannt als Akt - und die Protein-Kinasen C ζ (PKC ζ) und PKC λ. Zahlreiche Untersuchungen weisen auf eine Beteiligung dieser Kinasen an der insulinstimulierten GLUT4-Translokation hin, ihre genaue Rolle unter physiologischen Bedingungen ist jedoch unklar (Übersichtsartikel: Saltiel & Pessin, 2002; Watson et al., 2004). Daneben scheint die PI-3-Kinase auch für die Vermittlung anderer Wirkungen des Insulins wie z.B. die Erhöhung der Glykogensyntheserate verantwortlich zu sein (Übersichtsartikel: Holman & Kasuga, 1997).

Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass die Aktivierung des von der PI-3-Kinase ausgehenden Signalwegs nicht alleine für die erhöhte Glucoseaufnahme durch Fett- und Muskelzellen verantwortlich ist. Nach neueren Erkenntnissen wird der volle Insulineffekt auf die GLUT4-Translokation und die Glucoseaufnahme wahrscheinlich nur bei gleichzeitiger Aktivierung eines synergistischen PI-3-Kinase-unabhängigen Signalwegs erreicht. Dabei bindet Insulin an seinen Rezeptor in spezialisierten Membrandomänen, sogenannten Caveolae (Übersichtsartikel: Saltiel & Pessin, 2002; Chang et al., 2005). Caveolae sind Einstülpungen der Plasmamembran, die reich an Glykolipiden und Cholesterin sowie den Proteinen Caveolin und Flotillin sind. Sie kommen vor allem in Fett-, Muskel- und Endothelzellen vor. Der Insulinrezeptor, der in Caveolae lokalisiert ist, phosphoryliert das cytoplasmatische Protein Cbl. Dieses interagiert mit dem Cbl assoziierten **Protein** (CAP), welches an Flotillin bindet und dadurch den Komplex auf der Innenseite von Caveolae verankert. Das Tyrosin-phosphorylierte Cbl bindet gleichzeitig an die SH2-Domäne von CrkII. Dieses wiederum bindet konstitutiv an den GDP (**Guanosindiphosphat**)-GTP (**Guanosintriphosphat**)-Austauschfaktor C3G (**Cyanidin 3-Glykosid**). C3G aktiviert die kleinen G-Proteine TC10 (in Fettzellen) bzw. Rac (in Muskelzellen). Das aktivierte GTP-bindende TC10 bzw. Rac scheint in die Stabilisierung des Aktinkortex und die Regulation des Aktinzytoskeletts involviert zu

sein (Übersichtsartikel: Zorzano et al., 2005). Die Aktivierung von TC10 ist spezifisch für Insulin. Wird diese Aktivierung blockiert, so ist der insulinstimulierte Glucosetransport und die GLUT4-Translokation auch bei intaktem PI-3-Kinase Weg vollständig gehemmt (Chiang et al., 2001).

Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass möglicherweise noch weitere Signaltransduktionswege eine Rolle bei der stimulierten Umverteilung von GLUT4 zur Zelloberfläche spielen. Einer davon geht ebenfalls vom Insulinrezeptor aus und läuft über das GTP-bindende Protein Ras sowie die nachgeschaltete **Mitogen-aktivierte Protein-Kinase** (Map-Kinase) (Manchester et al., 1994; Sweeney et al., 1999; Übersichtsartikel: Saltiel & Kahn, 2001). Durch Insulin-Rezeptor-bindende Proteine (Grb2) und Guanosinnukleotid-Austauschfaktoren (SOS) wird Ras aktiviert. Dies führt zur Aktivierung des Map-Kinase-Signalweges über die Serinkinase Raf.

Auch eine Insulin-unabhängige Translokation von GLUT4 ist mehrfach beschrieben worden. Die entsprechenden Signalwege gehen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, wie z.B. dem Endothelin-Rezeptor, aus (Wu-Wong et al., 1999). Der Endothelin-Rezeptor aktiviert und phosphoryliert $G_{\alpha q}$, die α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins. $G_{\alpha q}$ bindet daraufhin wahrscheinlich direkt die katalytische Untereinheit der PI-3-Kinase und aktiviert diese. Dies führt, wie oben beschrieben, zur GLUT4-Translokation (Ishibashi et al., 2001). Nach neueren Erkenntnissen ist $G_{\alpha q}$ auch am Insulin-stimulierten Glucosetransport beteiligt. Hier kommt es offenbar zur Tyrosin-Phosphorylierung von $G_{\alpha q}$ in Folge der Aktivierung des Insulinrezeptors. $G_{\alpha q}$ bildet auch in diesem Fall einen Komplex mit der katalytischen Untereinheit der PI-3-Kinase, der die GLUT4-Translokation stimuliert (Imamura et al., 1999; Usui et al., 2004). Auch stimulatorische ($G_{\alpha s}$) und inhibitorische ($G_{\alpha i}$) α -Untereinheiten der trimeren G-Proteine haben einen Einfluss auf die GLUT4-Translokation (Ferrara & Cushman 1999). Dabei modulieren beide Formen von α -Untereinheiten die Exposition von GLUT4 auf der Außenseite der Plasmamembran. $G_{\alpha i}$ fördert die Fusion von bereits andockten GSVs mit der Plasmamembran. Dies führt zu einer erhöhten Glucoseaufnahme. Im Gegensatz dazu blockiert $G_{\alpha s}$ die Fusion andockter GSVs mit der Plasmamembran (Poirier et al., 2001).

1.1.1.2 GSV-Exozytose

Anhand des gut untersuchten Exozytose-Mechanismus synaptischer Vesikel wurde ein Modell für die GLUT4-Translokation, das Andocken und die Fusion der GSVs mit der Plasmamembran entwickelt (Übersichtsartikel: Rea & James, 1997; Holman & Sandoval, 2001; Simpson et al., 2001; James, 2005): Die GLUT4-enhaltenden Vesikel werden nach einem Insulinstimulus zur Zelloberfläche mobilisiert wie in Kap. 1.1.1.1 beschrieben. Dort scheint sich ein Komplex aus dem v-SNARE (vesicle membrane **SNAP** receptor) Synaptobrevin2 (VAMP2 = vesicle-associated membrane protein 2), sowie den t-SNAREs (target membrane **SNAP** receptor) Syntaxin4 und SNAP23 zu bilden. Dabei bindet Syntaxin4 nur an VAMP2, wenn Syntaxin4 nicht im Komplex mit Synip (**Syntaxin4** interagierendes Protein) vorliegt. Auf diese Weise scheint Synip die Vesikelfusion durch Reduzierung der Interaktion von v-SNAREs und t-SNAREs zu regulieren (Min et al., 1999; Holman, 1999; Spurlin et al., 2004). Weitere an der Vesikelfusion beteiligte regulatorische Faktoren sind Munc18c (Thurmond et al., 2000; Übersichtsartikel: Ramm & James, 2005) und ein hypothetisches insulinreguliertes PDZ-Domänen bindendes Protein (Übersichtsartikel: Holman & Sandoval, 2001). Dabei hält Munc18c in Abwesenheit von Insulin Syntaxin4 in einer inaktiven Konformation. Ist Insulin vorhanden, so verändert Munc18c wahrscheinlich seine Konformation und ermöglicht dadurch die Syntaxin4-abhängige Fusion der GSVs mit der Plasmamembran (Übersichtsartikel: Watson et al., 2004; Ramm & James, 2005).

Neuere Befunde von Inoue et al. (2003) deuten darauf hin, dass auch ein als Exozyst bezeichneter Multiproteinkomplex, der peripher mit der Plasmamembran assoziiert ist, eine Rolle bei der Exozytose von GSVs spielt. So zeigen die Autoren, dass ein Bestandteil des Exozyst-Komplexes - Exo70 - an aktiviertes TC10 in Caveolae bindet. Da die Überexpression einer mutierten Form von Exo70 zwar den insulinabhängigen Einbau von GLUT4 in die Plasmamembran und die Glucoseaufnahme hemmt, jedoch keinen Einfluss auf die Translokation von GSVs zur Zelloberfläche hat, wird angenommen, dass der Exozyst eine Rolle in einem frühen Stadium der Vesikelfusion mit der Plasmamembran spielt.

1.1.1.3 Rezirkulation der GSVs

Der Rezirkulationsweg von GSVs in Fett- und Muskelzellen wird zur Zeit kontrovers diskutiert (Übersichtsartikel: Holman & Sandoval, 2001; Maxfield & McGraw, 2004; Dugani & Klip, 2005). Es sind zwei Modelle postuliert worden, die sich vor allem hinsichtlich der beteiligten intrazellulären Kompartimente und des Weges zur Plasmamembran unterscheiden. Übereinstimmung herrscht dagegen bei der Beschreibung des Weges von der Plasmamembran, d.h. der Internalisierung von GLUT4. Es wird allgemein angenommen, dass GLUT4 mittels Clathrin-vermittelter Endozytose zunächst in ein frühes Endosom gelangt. Von dort wird es zu einem perinucleären „Recycling-Endosom“ weitergeleitet. Das erste Modell geht davon aus, dass sich aus dem „Recycling-Endosom“ spezialisierte GSVs bilden, die weder Marker des Endosoms noch des TGN enthalten. In Abwesenheit von Insulin rezirkuliert GLUT4 konstitutiv sowohl über endosomale Transportvesikel (die sich ebenfalls vom „Recycling-Endosom“ abschnüren) als auch über GSVs zurück zur Zelloberfläche. Auf Grund der unterschiedlichen Geschwindigkeit von Exo- und Endozytose liegt der Großteil des GLUT4 hierbei stets intrazellulär vor. Die Insulin-Stimulation bewirkt eine vermehrte Exozytose der GSVs und möglicherweise auch der GLUT4-enhaltenden endosomalen Transportvesikel, bei gleichzeitiger Verminderung der GLUT4 Endozytose.

Im Gegensatz dazu postuliert das zweite Modell, dass GLUT4 vom „Recycling-Endosom“ zu einem spezialisierten Subkompartiment des TGN geleitet wird, das auch die GSVs umfasst (Shewan et al., 2003). Nach dieser Auffassung rezirkuliert nur der im Endosom verbliebene GLUT4-Anteil in Abwesenheit von Insulin konstitutiv zur Plasmamembran zurück, während die GSVs ein statisches Speicherkompartiment bilden. Bei Insulin-Stimulation fusionieren dann die GSVs nicht direkt mit der Plasmamembran, sondern mit dem „Recycling-Endosom“ und erhöhen dadurch den intrazellulären Anteil an GLUT4, der in direktem Austausch mit der Zelloberfläche steht (Coster et al., 2004).

Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass in CHO-Zellen GLUT4 nach seiner Clathrin-vermittelten endozytotischen Aufnahme in ein großes unterhalb der Plasmamembran gelegenes endosomales Kompartiment gelangt. Diese spezialisierten peripheren Endosomen scheinen als Donor-Organell für die Synthese der GSVs zu fungieren. Sie unterscheiden sich von typischen frühen Endosomen, da sie keinen Transferrinrezeptor als Marker für die Rezeptor-vermittelte Endozytose enthalten. Die genannten Befunde weisen darauf hin, dass GLUT4 in diesen Zellen bereits auf der Ebene der Plasmamembran von anderen per

Endozytose aufgenommenen Membranproteinen getrennt wird (Wei et al., 1998; Lim et al., 2001).

1.1.2 GSV-spezifische Proteine

In GSVs aus Fett- und Muskelzellen sind mittlerweile neben GLUT4 noch weitere spezifische Proteine identifiziert worden. Zu den transmembranen Vesikelproteinen gehören u.a. Sortilin / Neurotensinrezeptor (Lin et al., 1997; Morris et al., 1998), der nach neuesten Erkenntnissen eine wichtige Rolle bei der Biogenese der GSVs zu spielen scheint (Shi & Kandror, 2005), sowie die zuvor schon erwähnten SNARE-Proteine VAMP2 (Martin et al., 1996) und Syntaxin4 (Volchuk et al., 1996). Die insulinregulierte Aminopeptidase (IRAP) - auch bekannt als Angiotensin4-Rezeptor - ist fast vollständig mit GLUT4 in GSVs colokalisiert. Die physiologische Bedeutung dieses GSV-Proteins ist noch unklar. Diskutiert wird u.a. ein Einfluss neuronaler IRAP auf die Gedächtnisbildung (Keller et al., 1995; Chai et al., 2004; Übersichtsartikel: Keller, 2004). Das periphere Membranprotein Tankyrase bindet über eine Interaktion mit der IRAP an GSVs. Es wird insulinabhängig von der Map-Kinase phosphoryliert, wobei seine Funktion noch im Dunkeln liegt (Chi & Lodish, 2000). Ein weiteres peripher mit GSVs assoziiertes Membranprotein ist das kleine GTP-bindende Protein Rab4, das bei der GLUT4-Translokation eine Rolle spielt (Übersichtsartikel: Watson et al., 2004). Rab4 interagiert mit Syntaxin4, das zu den t-SNAREs gehört (Li et al., 2001). Ein weiterer Interaktionspartner von Rab4 ist KIF3, das zu der Kinesinfamilie der Mikrotubuli-assoziierten Motorproteine gehört. Aktiviertes Rab4 bindet an KIF3 und könnte so die Bewegung der GSVs zur Plasmamembran vermitteln (Imamura et al., 2003). Andere periphere Membranproteine wie Spektrin (Tsakiridis et al., 1994), α -Tubulin und Vimentin (Guilherme et al., 2000) interagieren als Zytoskelettelemente mit GSVs. Darüber hinaus scheinen auch die PI-3-Kinase (Heller-Harrison et al., 1996) und die Proteinkinase B- β / Akt2 (Calera et al., 1998), die bei der Translokation der GSVs eine wichtige Rolle spielen (vergl. Kap. 1.1.1.1), transient mit der Vesikelmembran assoziiert zu sein.

1.2 Spaltung von Ektodomänen membranassoziierter Proteine

Die hydrolytische Abspaltung der Ektodomänen (Ectodomain Shedding) dient, wie beschrieben, der Regulierung verschiedener transmembraner Proteine auf der Zelloberfläche. 2-4 % aller Proteine auf der Plasmamembran können auf diesem Weg modifiziert werden.

Zu dieser heterogenen Gruppe an Proteinen gehören u.a. das an der Entstehung der Alzheimer'schen Erkrankung beteiligte Amyloidvorläuferprotein (Amyloid Precursor Protein = APP), der Notchrezeptor, das Zelladhäsionsprotein L1, der Tumornekrosefaktor α (TNF α) sowie die membrangebundenen Vorstufen verschiedener Wachstumsfaktoren, wie z.B. der HB-EGF oder transforming growth factor α (TGF α) (Übersichtsartikel: Moss und Bartsch, 2004). Die physiologische Bedeutung der Abspaltung von Ektodomänen kann sehr unterschiedlich sein, wie die genannten Proteine veranschaulichen. So kann APP an drei Stellen von verschiedenen Proteasen prozessiert werden. Die sogenannte β -Sekretase spaltet neuronales APP in ein lösliches Peptidfragment, das in den Extrazellulärraum des Gehirns entlassen wird und ein Fragment mit einem extrazellulären, einem transmembranen und einem cytoplasmatischen Anteil. Dieses membrangebundene Fragment wird von einer γ -Sekretase erneut hydrolytisch prozessiert, um ein cytoplasmatisches Segment freizusetzen, dessen Funktion bisher ungeklärt ist. Dabei werden gehäuft Amyloid- β -Peptidfragmente in den Extrazellulärraum des Gehirns freigesetzt. Bei der Alzheimer'schen Erkrankung häufen sich diese extrazellulären Bruchstücke in übermäßiger Menge an und lagern sich zu Filamenten zusammen, die sogenannte Amyloid-Plaques bilden. Es wird angenommen, dass diese Plaques Nervenzellen verletzen und zu deren Untergang beitragen. Kommt es jedoch extrazellulär zu einer Spaltung des neuronalen APP durch eine α -Sekretase anstelle der β -Sekretase, so werden nach Prozessierung durch die γ -Sekretase keine intakten Amyloid- β -Peptide gebildet. Als α -Sekretase sind zwei Mitglieder der ADAM- (a disintegrin and metalloprotease) Familie der Metalloproteasen identifiziert worden. Die γ -Sekretase besteht aus einem Komplex mehrerer Proteine, von denen Presenilin1 das membrangebundene APP-Fragment proteolytisch prozessiert. Über die Identität der β -Sekretase ist bisher nichts bekannt (Buxbaum et al., 1998; Lammich et al., 1999; Allinson et al., 2004; Übersichtsartikel: Tandon & Fraser, 2002; Allinson et al., 2003). Der Notchrezeptor ist bei der Differenzierung von Nervenzellen aus dem ektodermalen Epithel im Rahmen der Frühentwicklung von Bedeutung. Er erfährt drei proteolytische Spaltungen. Der neu synthetisierte Notchrezeptor

wird zunächst von der Protease Furin im Golgi-Apparat in einen extrazellulären und einen transmembranen / cytoplasmatischen Anteil gespalten, die nicht-kovalent miteinander verbunden bleiben. Diese Form des Rezeptors wird zur Plasmamembran transportiert. Die Bindung des Liganden Delta - von einer benachbarten Zelle aus - an den Notchrezeptor löst die nächsten zwei proteolytischen Schritte aus. Eine zweite Protease - diskutiert wird wiederum ein Mitglied der ADAM-Familie - spaltet den Notchrezeptor in ein Segment, das in den Extrazellulärraum freigesetzt wird und ein membrangebundenes Fragment. Presenilin1 hydrolysiert das membrangebundene Fragment des Notchrezeptors im Bereich der transmembranen Domäne und setzt das cytoplasmatische Segment frei. Dieses wandert in den Nucleus und aktiviert die Transkription zahlreicher Gene. Die Produkte dieser Gene sind vor allem genregulatorische Proteine, die die Expression von Genen blockieren, die im Nervensystem bei der neuronalen Differenzierung gebraucht werden. Auf diese Weise signalisiert der von neuronalen Vorläuferzellen exprimierte Ligand Delta durch Binden an den auf benachbarten Zellen liegenden Notchrezeptor, sich nicht ebenfalls zu Nervenzellen zu entwickeln (Brou et al., 2000). Das Zelladhäsionsprotein L1, das zur Immunglobulinfamilie gehört, wird an der Plasmamembran proteolytisch geschnitten. Die so freigesetzte Ektodomäne kann durch autokrine / parakrine Bindung an Integrine die Migration von Zellen z.B. im Nervensystem und in Tumoren stimulieren. Als Protease sind Mitglieder der ADAM-Familie identifiziert worden (Gutwein et al., 2000; Mechttersheimer et al., 2001). Die erwähnten Wachstumsfaktoren und das Cytokin TNF α werden durch hydrolytische Spaltung an der Zelloberfläche in ihre jeweilige reife Form überführt und aktiviert. Bei den für die Spaltung der Ektodomänen verantwortlichen Enzymen handelt es sich um Mitglieder der ADAM-Familie und/oder Mitglieder der Familie der MMPs (**m**atrix **m**etallo**p**roteasen) (Black et al., 1997; Rosendahl et al., 1997; Hinkle et al., 2003; Übersichtsartikel: Massague & Pandiella, 1993).

1.2.1 Hydrolytische Spaltung von proHB-EGF

Ein gut untersuchtes Beispiel für ein transmembranes Protein, das durch hydrolytische Spaltung aktiviert wird, ist der Heparin-bindende epidermale Wachstumsfaktor. HB-EGF ist ein Mitglied der EGF-Familie und wurde erstmals im konditionierten Medium von humanen Monozyten und Makrophagen entdeckt (Besner et al., 1990). HB-EGF ist ein ca. 14-22 kDa großes lösliches Glykoprotein, das in verschiedenen Formen von 75-86 Aminosäuren Länge vorkommt (Higashiyama et al., 1992; Izumi et al., 1998). Zusätzlich existiert ein transmembranes Vorläufermolekül proHB-EGF, das 208 Aminosäuren lang ist (Izumi et al., 1998). ProHB-EGF wird von verschiedenen Mitgliedern der ADAM-Familie der Metalloproteasen (Fan & Derynck, 1999; Übersichtsartikel: Blobel, 2000) und einem Mitglied der MMPs (Suzuki et al., 1997) in ein pro-Peptid, das den cytoplasmatischen und den transmembranen Anteil enthält und reifes HB-EGF gespalten (Übersichtsartikel: Derynck, 1992; Massague & Pandiella, 1993). Dies führt zur Ablösung des aktiven Wachstumsfaktors von der Plasmamembran. HB-EGF wirkt dann als autokriner / parakriner Mediator auf die gleiche oder auf benachbarte Zellen. Die C-terminale Region des Wachstumsfaktors HB-EGF bindet an den EGF-Rezeptor (EGFR) und aktiviert diesen. Der N-Terminus, eine 21 Aminosäuren lange hydrophile Heparinbindungsdomäne, moduliert die Bindung von HB-EGF an den EGFR (Goishi et al., 1995). Die Aktivierung des EGFR durch HB-EGF kann zu vielfältigen physiologischen Wirkungen führen. So ist die Aktivierung des EGFR u.a. für die Regulation von Zellproliferation und Wundheilung von Bedeutung (Tokumaru et al., 2000; Übersichtsartikel: Martin, 1997). Des weiteren spielt das HB-EGF im Zellzyklus (Toki et al., 2005) und bei der Entwicklung und Funktion des Herzens und anderer Organe (Iwamoto et al., 2003; Yamazaki et al., 2003) eine Rolle. Der EGF-Rezeptor ist in den letzten Jahren ins Zentrum des Interesses zahlreicher Arbeitsgruppen gerückt, da eine erhöhte Aktivität dieses Rezeptors in Verbindung mit einer Vielzahl von malignen Tumoren gebracht wird (Übersichtsartikel: Prenzel et al., 2000). Ein Grund für die Überaktivierung des EGF-Rezeptors könnte die vermehrte proteolytische Freisetzung von löslichen Liganden wie z.B. HB-EGF sein. Die Hydrolyse membrangebundener Vorstufen von EGF-Rezeptor-Liganden scheint bei der Entstehung und dem Wachstum von Brust-, Darm- und Prostatakrebs eine Rolle zu spielen (Übersichtsartikel: Gschwind et al., 2001).

1.2.2 Metalloproteasen vom Typ der ADAMs

Die für die Abspaltung von Ektodomänen zuständigen Metalloproteasen sind häufig integrale Membranproteine der Plasmamembran, deren aktives Zentrum im Extrazellulärraum liegt. Auch wenn die zweifelsfreie Identifizierung der verantwortlichen Protease in vielen beschriebenen Fällen von Ektodomänenabspaltung noch aussteht, so zeichnet sich doch ab, dass sehr oft Mitglieder der großen Familie der ADAMs eine Rolle bei diesem Prozess spielen. Hierbei handelt es sich um Zn^{2+} -abhängige Metalloproteasen. Die ADAM-Familie umfasst zur Zeit 40 identifizierte Mitglieder mit einer Länge von jeweils rund 750 Aminosäuren (Webseite: http://www.people.virginia.edu/~jw7g/Table_of_the_ADAMs.html). Analysen der Aminosäuresequenzen der verschiedenen ADAMs weisen darauf hin, dass voraussichtlich nur etwa die Hälfte dieser Proteine tatsächlich Proteaseaktivität (erkennbar an der Konsensussequenz HEXXH in der Metalloproteasedomäne) besitzen. Diese Aktivität ist im extrazellulären N-Terminus lokalisiert. Daran schließen sich die Disintegrindomäne, eine Cystein-reiche Region und die EGF-artige Domäne an. Die cytoplasmatische Domäne enthält Signalmotive wie Phosphorylierungsstellen und Prolin-reiche Regionen, die an SH3-Domänen binden können. Des Weiteren enthalten neu synthetisierte ADAMs am N-Terminus zunächst noch eine pro-Domäne (Übersichtsartikel: Blobel, 2005). Die pro-Domäne von katalytisch aktiven ADAMs wirkt als intramolekularer Inhibitor. So bleibt die Metalloprotease selbst inaktiv, bis eine pro-Protein-Convertase die pro-Domäne entfernt oder diese autokatalytisch im Trans-Golgi-Netzwerk entfernt wird (Loechel et al., 1999; Milla et al., 1999; Schlomann et al., 2002; Gonzales et al., 2004). Die Disintegrindomäne und die Cystein-reiche Region sind bei der Substratbindung von Bedeutung und erleichtern das Entfernen der pro-Domäne von der katalytischen zinkbindenden Region. Über die Funktion der ADAMs, die keine katalytische Aktivität besitzen, ist bisher relativ wenig bekannt (Übersichtsartikel: Blobel, 2005).

Die oben beschriebene Spaltung von proHB-EGF kann alternativ durch ADAM9 (Izumi et al., 1998), ADAM10 - auch bekannt als Kuzbanian - (Yan et al., 2002), ADAM12 (Asakura et al., 2002) und ADAM17 - besser bekannt als TACE (TNF α -converting enzyme) - (Sunnarborg et al., 2002) durchgeführt werden. Welche der erwähnten Metalloproteasen jeweils an der Spaltung von proHB-EGF beteiligt sind, hängt u.a. vom Zelltyp ab (Übersichtsartikel: Higashiyama, 2004)

1.2.3 Die Rolle von ADAMs bei der Transaktivierung des EGFR durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

In Rat1-Fibroblasten kann die Spaltung von proHB-EGF durch die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren ausgelöst werden. So führt die Aktivierung des heterolog exprimierten Ecdysonrezeptors über eine intrazelluläre Signalkaskade u.a. zur Aktivierung einer entsprechenden extrazellulären Proteaseaktivität (Prenzel et al., 1999). Bei dieser könnte es sich um die zuvor in Kap. 1.2.2 genannten ADAMs handeln, die proHB-EGF proteolytisch spalten. Das freigesetzte reife HB-EGF kann nun mit dem EGFR auf der gleichen oder auf benachbarten Zellen interagieren (Prenzel et al., 1999). Man spricht in diesem Fall von einer Transaktivierung. Ein endogener G-Protein-gekoppelter Rezeptor in Rat1-Zellen, der die beschriebene Rolle bei der Transaktivierung des EGF-Rezeptors spielen könnte, ist der Thrombinrezeptor.

Der Thrombinrezeptor (**Protease Activated Receptor1** = PAR1) wird von der Protease Thrombin aktiviert. Durch Spaltung der aminoterminalen Ektodomäne des PAR1 entsteht ein neuer N-Terminus des Rezeptors mit der Aminosäuresequenz Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn. Diese Sequenz selbst wirkt nun als Ligand für PAR1 und aktiviert den Rezeptor. Nach der Aktivierung wird PAR1 phosphoryliert, internalisiert und schließlich in Lysosomen degradiert. PAR1 scheint nicht wie viele G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zu rezirkulieren. Es wird jedoch ein intrazellulärer Vorrat an intaktem Thrombinrezeptor vermutet, durch den aktivierte Rezeptoren schnell ersetzt werden können (Übersichtsartikel: Coughlin, 1999; Coughlin, 2000). Die Aktivierung der Thrombinrezeptoren durch Thrombin führt zu ganz unterschiedlichen Reaktionen der betroffenen Zellen. Besonders gut untersucht ist in diesem Zusammenhang die Aktivierung von Thrombozyten bei der Blutstillung nach Gefäßverletzung. Aus Prothrombin wird Thrombin an Stellen solcher Verletzungen erzeugt. Die Bindung des Thrombins an Thrombinrezeptoren auf der Oberfläche von Thrombozyten führt zu einer tiefgreifenden morphologischen Umgestaltung der Blutplättchen. Hierdurch kommt es zur Aggregation und Bildung eines Pfropfes, der ein Leck vorläufig abdichtet. Darüber hinaus bindet Thrombin auch an Rezeptoren auf Endothelzellen. Dies hat unter anderem die Freisetzung von gerinnungsfördernden Mediatoren sowie die vermehrte Expression anti-apoptotischer Faktoren zur Folge (Übersichtsartikel: Coughlin, 2005).

1.3 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Struktur und Dynamik der Speichervesikel vom Typ der GSVs in Rat1-Zellen zu analysieren. Im Mittelpunkt steht dabei die Frage, ob diese Vesikel eine Rolle bei der Regulation der HB-EGF Freisetzung spielen. So sind die oben beschriebenen Befunde zur G-Protein-abhängigen Steigerung der Ektoproteaseaktivität mit einem Modell vereinbar, nach dem die proHB-EGF spaltende Metalloprotease in Abwesenheit eines Stimulus intrazellulär in GSVs gespeichert wird. Die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die, wie beschrieben, auch zu einer Translokation von GSVs führt (vergl. Kap. 1.1.2), könnte auf diesem Weg die beschriebene Zunahme der Enzymaktivität auf der Zelloberfläche bewirken.

Von Herman et al. wurden 1994 aus Zellen, die unter physiologischen Bedingungen kein GLUT4 enthielten, GSVs isoliert. Dazu wurden CHO-, PC12- und 3T3-Zellen stabil mit GLUT4 als heterologem Marker für das spezifische Speicherkompartiment transfiziert. Der Nachweis von GSVs erfolgte über subzelluläre Fraktionierung und anschließendem Western-Blot mit anti-GLUT4 Antikörpern. Bisher unveröffentlichte Versuche (Bonzelius & Herman; Fohrer, Diplomarbeit, 2001) zeigen, dass auch transient oder stabil GLUT4 exprimierende Rat1-Zellen GSVs enthalten. Zunächst sollen daher Rat1-Zellen stabil mit GLUT4myc transfiziert werden, um GSVs eindeutig mittels subzellulärer Fraktionierung identifizieren zu können. Da es keine Antikörper gegen die extrazellulären Domänen des Glucosetransporters gibt, soll ein GLUT4-Konstrukt mit einem myc-Epitop in der ersten extrazellulären Domäne verwendet werden. Mit Hilfe des myc-Epitops kann GLUT4 auf der Zelloberfläche quantifiziert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit werden die Vesikel dann hinsichtlich ihrer Membranzusammensetzung analysiert. Hier soll zunächst geklärt werden, ob sie endogene proHB-EGF spaltende Enzymaktivität(en) enthalten. Als Kandidaten für identifizierte proHB-EGF spaltende Metalloprotease(n) in Rat1-Zellen kommen ADAM10 und/oder TACE in Frage. Die Hydrolyse des proHB-EGF durch ADAM9 konnte bereits ausgeschlossen werden (Prenzel et al., 1999). ADAM12 wird nicht analysiert, da es keinen gut charakterisierten kommerziell erhältlichen Antikörper gibt, der mit dieser Protease aus der Ratte unter den hier verwendeten Bedingungen reagiert. Sind die Proteasen ADAM10 und/oder TACE ebenfalls mit GLUT4 in GSVs colokalisiert? Darüber hinaus wird auch die subzelluläre Lokalisation

des humanen Thrombinrezeptors (hPAR1) bestimmt, da auch für dieses Membranprotein ein intrazelluläres Speicherkompartiment beschrieben worden ist (vergl. Kap. 1.2).

Abschließend soll geklärt werden, ob die in Rat1-Zellen identifizierten GSVs den gleichen Biosyntheseweg und das gleiche dynamische Verhalten zeigen, wie die bisher vor allem in Fett- und Muskelzellen sowie in transfizierten CHO-Zellen untersuchten Speichervesikel. Eine zentrale Frage dieser Untersuchungen ist, ob die GSVs in Rat1-Zellen tatsächlich, wie in unserem oben beschriebenen Modell zur stimulationsabhängigen Aktivierung von Ekto-proteasen postuliert, einer regulierten Exozytose unterliegen. Um dies zu klären, werden die Zellen über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (Thrombinrezeptor) stimuliert, um die proHB-EGF spaltende(n) Protease(n) zu aktivieren, wie von Prenzel et al. (1999) beschrieben. Unter diesen Bedingungen kann die Translokation von GSV-spezifischen Proteinen zur Plasmamembran bestimmt werden.

Daneben soll im Rahmen dieser Untersuchungen die Rolle eines temperatursensitiven endosomalen Kompartiments bei der Biosynthese der GSVs in Rat1/GLUT4myc-Zellen betrachtet werden. Diese spezialisierten Endosomen scheinen als Donor-Organell für die Bildung der GSVs in transfizierten CHO-Zellen zu fungieren (siehe Kap. 1.1.1.3). Darüber hinaus soll untersucht werden, ob GSVs in Rat1/GLUT4myc-Zellen ebenfalls konstitutiv rezirkulieren, wie für Fett- und Muskelzellen sowie transfizierte CHO-Zellen beschrieben.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

<u>Geräte</u>	<u>Hersteller</u>
Autoklav	Wolf
Bakterieninkubator BK 600	Heraeus Instruments
Begasungsbrutschrank BBD 6220	Heraeus Instruments
Bohrmaschinenantrieb PSB 600 RE	Bosch
CCD-Kamera CF 8/4 FCM	Kappa
Elektrophoresekammer	Biometra
Elektroporationssystem 600	BTX
Fraktionssammler Cygnet	ISCO
Kühl-, Gefrierschränke	Scientific Industries
Mikroskop (invers)	Zeiss
pH-Meter 761	Knick
Probenmischer	Dynal
Abbe-Refraktometer	Zeiss
Rührer	KIKA-Labortechnik
Schüttler 3017	GFL
Sonifier (Zellzerstörer) B-12	Branson
Spannungsgeber P25	Biometra
Spektralfluorimeter RF-510	Shimadzu
Spektralphotometer Uvikon 810	Kontron
Standmagnet	Dynal
Sterilwerkbank HA 2448 GS	Heraeus Instruments
Trans-Blot, Semi-Dry-Transfer-Kammer	Bio-Rad
Transilluminator	Biometra
Vakuumpumpe XX55	Millipore
Vortex-Mixer	Scientific Industries
Waage SBC 33	Scaltec
Wasserbad SW-20C	Julabo

Zentrifugen und dazugehörige Rotoren

Tischzentrifugen und Rotoren

Biofuge pico	Heraeus Instruments
202 MK-Zentrifuge	Sigma
Rotoren 12040, 12045	Sigma

Kühlzentrifugen und Rotoren

J2-21 M/E-Zentrifuge	Beckman
Rotoren JA10, JA17, JA18	Beckman
Minifuge T	Heraeus Instruments
Rotor 3360	Heraeus Instruments

Ultrazentrifugen (UZ) und Rotoren

L5.50 UZ	Beckman
Centrikon T-1065 UZ	Kontron Instruments
Ausschwingrotoren (UZ) SW56, SW40Ti	Beckman
Festwinkelrotor (UZ) 60Ti	Beckman

2.2 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmittel

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Aceton	Riedel-de Haen
Acrylamid	Roth
N,N`-methylen-bis-acrylamid	Roth
Agar	Gerbu
Agarose	Gibco
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	Sigma
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Roth
Cetyl-Trimethyl-Ammoniumbromid (CTAB)	Sigma
Citronensäure	Merck

Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva
D-19 (Entwickler)	Kodak
Desoxycholat (DOC)	Sigma
Dimethylsulphoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
ECL Western Blotting detection reagents	Amersham Pharmacia
ECL Chemiluminescence -Hyperfilm	Amersham Pharmacia
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethanol, reinst	Merck
Ethidiumbromid	Gibco
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA
Folin-Ciocalteu-Phenol	Fluka
Geneticin Sulfat (G418)	PAA
D-Glucose	Fluka
Glutaraldehyd	Fluka
Glycerin	Applichem
Glycin	Roth
Harnstoff	Merck
Hefeextrakt	Gerbu
Hepes	Roth
Jodacetamid	Sigma
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumtartrat	Merck
Kupfersulfat	Merck
L-Lysin	Sigma
Poly-L-Lysin-Hydrobromid	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
Magnetische Beads goat anti-rabbit IgG	Pierce
Methanol	Riedel-de Haen
Milchpulver	Roth
Mops	Roth
Natriumacetat	Merck

Natriumazid	Merck
Natriumbutyrat	Sigma
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Riedel-de Haen
Natriumhydroxid, reinst	Merck
Nonidet P 40 (NP40)	Roche
Paraformaldehyd	Merck
Penicillin-Streptomycin	Gibco
o-Phenylendiamin	Sigma
o-Phosphorsäure	Riedel-de Haen
Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Polyethylenglycol4000 (PEG)	Fermentas
2-Propanol	Riedel-de Haen
Proteaseinhibitoren:	
Antipain	Calbiochem
Benzamidin	Sigma
Chymostatin	Calbiochem
Leupeptin	Calbiochem
Pepstatin A	Calbiochem
Proteinmarker für SDS-Gele:	
Bench Mark Prestained Protein Ladder	Gibco
Prestained MW Standard Blue Mixture	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	
D-Saccharose	Roth
Salzsäure	Appllichem
Saponin	Sigma
D-Sorbitol	Fluka

Superfix (Fixierer)	Tetenal
Temed	Roth
Thrombin	Sigma
Trichloressigsäure	Merck
Tris	USB
Triton X-100	Sigma
Trypsin-EDTA 0,05 %	Gibco
Trypsin 0,25 %	Gibco
Trypton	Gerbu
Tween 20	Sigma
Wasserstoffperoxid 30 % (H ₂ O ₂)	Applichem

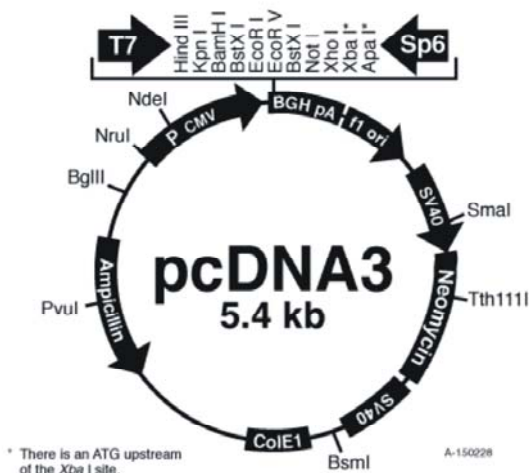
Zellkulturmedien:

Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Gibco
Nutrient Mixture F-12 (HAM's)	Gibco

Zeozin	Invitrogen
--------	------------

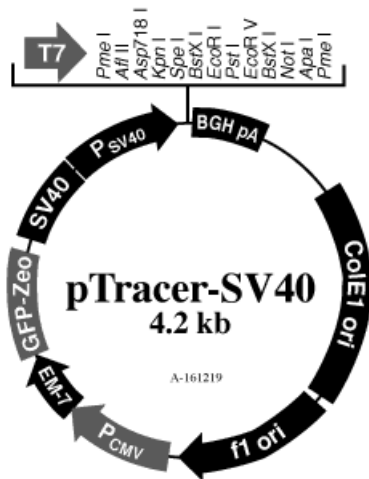
2.3 Plasmide

Expressionsvektor pcDNA3	Invitrogen
--------------------------	------------



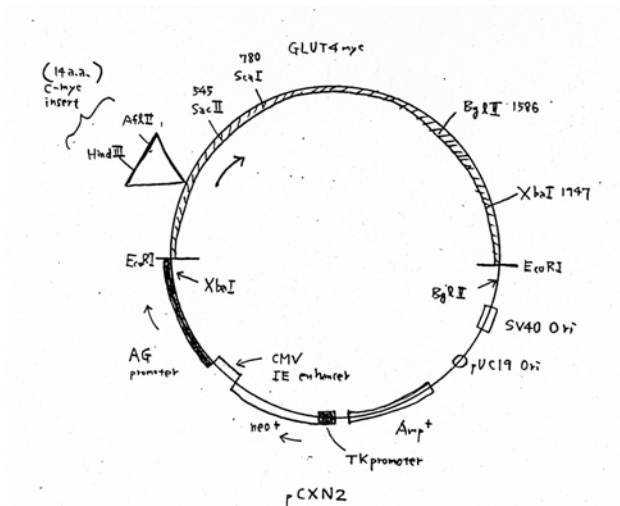
Expressionsvektor pTracer SV40

Invitrogen



Expressionsvektor pcXN2-GLUT4myc

Kanai et al., 1993



2.4 Reagenzien für den Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme:

EcoRI	Fermentas
EcoR5 (Eco32)	Fermentas
FspI	Fermentas
Sall	Fermentas
SspI	Fermentas
XhoI	Fermentas

Lysozym	Gerbu
Puffer gelb, orange, rot	Fermentas
T4 DNA-Ligase	Fermentas
T4 DNA-Ligasepuffer	Fermentas

2.5 Bakterienstämme

Escherischia coli DH5 α

Escherischia coli XL1blue

2.6 Zelllinien

CHO-K1-Zellen: Chinese Hamster Ovary-Wildtyp-Zellen.

CHO/GLUT4-Zellen: CHO-K1-Zellen, stabil mit GLUT4 aus der Ratte transfiziert
(Herman et al., 1994).

Rat1-W575-Zellen: Rat1-Fibroblastenzelllinie aus der Ratte, stabil mit dem humanen
Thrombinrezeptor transfiziert (Hein et al., 1994).

2.7 Antikörper

anti-ADAM10 (polyklonal)	ProSci
anti-FLAG (monoklonal)	Integra
anti-GLUT4 (polyklonal)	F. Bonzelius, JWG-Universität, Frankfurt
anti-myc Klon 9E10 (monoklonal)	M. Bishop, UC San Francisco, USA
anti-TACE (polyklonal)	Santa Cruz
anti-TGN38 (monoklonal)	Affinity BioReagents
anti-Transferrinrezeptor (CD71) (monoklonal)	Ancell
anti-VSV Glykoprotein Klon P5D4 (monoklonal)	Sigma
anti-Kaninchen IgG / HRP	Sigma

anti-Maus IgG / HRP

Dako

anti-Ziege IgG / HRP

Sigma

2.8 Lösungen und Puffer

2.8.1 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur

LB-Medium

1 % Trypton

0,5 % Hefeextrakt

0,2 M NaCl

pH 7,5, autoklavieren

LB-Medium für Zeozin

1 % Trypton

0,5 % Hefeextrakt

0,1 M NaCl

pH 7,5, autoklavieren

LB-Agar-Platten

1 l LB-Medium

1,5 % Agar

autoklavieren, rühren,

bei ca. 55 °C Zugabe von Zeozin,

Platten giessen

SOC-Medium

2 % Trypton

0,5 % Hefeextrakt

10 mM NaCl

pH 7,0, autoklavieren

20 mM Glukose

10 mM MgCl₂

steril filtrieren

Ampicillin	Stammlösung	50 mg/ml A.bidest.
	Endkonz. Vorkultur	50 µg/ml
	Nachtkultur	100 µg/ml steril filtrieren
Zeozin	Stammlösung	100 mg/ml
	Endkonz. im Medium	25 µg/ml
Lysozym	Stammlösung	50 mg/ml A.bidest.
	Endkonz.	25 mg/ml
CTAB		5 % CTAB (w/v) steril filtrieren
EtBr		10 mg/ml A.bidest. dunkel aufbewahren
STET Puffer		8 % Saccharose w/v 0,1 % TritonX-100 v/v 50 mM EDTA 50 mM Tris/HCl pH 8,0
TBE-Puffer		90 mM Tris 90 mM Borsäure 3 mM EDTA
TE-Puffer		10 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0, autoklavieren

TFB-Puffer	10 mM Mops 75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15 % Glycerin steril filtrieren
------------	--

2.8.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur

PBS	0,15 M NaCl 15 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O pH 7,4, steril filtrieren
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium	DMEM-Pulvermedium 14 mM NaHCO ₃ pH 7,0, steril filtrieren
Wachstumsmedium für Rat1-W575-Zellen	DMEM-Medium 10 % FCS 100 units/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 250 µg/ml G418
Inaktiviertes Medium für Rat1-W575-Zellen	DMEM-Medium 10 % FCS , hitzeinaktiviert bei 56° C für 30 min 100 units/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

Wachstumsmedium für CHO-Zellen	HAM`s F-12
	10 % FCS
	100 units/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
Gefriermedium	Wachstumsmedium
	10 % steriles DMSO
G418	in 100 mM Hepes pH 7,4 lösen steril filtrieren
Endkonz. im Medium	250 µg/ml

2.8.3 Lösungen für die Transfektion von Säugerzellen

Elektroporationspuffer	137 mM NaCl
	5 mM KCl
	0,7 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	6 mM Glukose
	20 mM Hepes
	pH 7,05, steril filtrieren
„Erholungs“-Medium	Wachstumsmedium
	3 mM EGTA (pH 7,4)
Zeozin	Stammlösung 100 mg/ml
	Endkonz. im Medium 1 mg/ml

2.8.4 Lösungen für die subzelluläre Fraktionierung

Puffer A	150 mM	NaCl
	10 mM	Hepes pH 7,4
	1 mM	EGTA pH 7,4
	0,1 mM	MgCl ₂
	pH 7,4, autoklavieren	

Die unten aufgeführten Proteaseinhibitoren-Stammlösungen werden alle 1:1000 verdünnt in Puffer A eingesetzt (Puffer A + PI).

Proteaseinhibitoren B	4,2 mM	Leupeptin
	3,1 mM	Antipain
	10 mM	Hepes (pH 7,4)

Proteaseinhibitoren C	3,3 mM	Chymostatin
	1,5 mM	PepstatinA
	DMSO	

Proteaseinhibitor D	1 mM	Benzamidin
	10 mM	Hepes (pH 7,4)

Medium für Temperaturblock	20 mM	Hepes
	100 units/ml	Penicillin
	100 µg/ml	Streptomycin
	in DMEM-Medium	
	pH 7,4, steril filtrieren	

hypertones Medium für Endozytoseblock	0,45 M	Sorbitol
	100 units/ml	Penicillin
	100 µg/ml	Streptomycin
	in inaktiviertem DMEM-Medium	
	steril filtrieren	

Medium für Thrombinstimulation	1 unit/ml	Thrombin
	1 %	BSA
	100 units/ml	Penicillin
	100 µg/ml	Streptomycin
	in DMEM-Medium	
	steril filtrieren	

2.8.5 Lösungen für die Gradientenzentrifugation

Dichtegradient	30 %	Saccharose (5,3 ml)
	60 %	Saccharose (5,3 ml)
	über einem Saccharosekissen (siehe unten)	
	gelöst in 20 mM Mops (pH 7,0)	
Glyceringradient	5 %	Glycerin (5,3 ml)
	25 %	Glycerin (5,3 ml)
	über einem Saccharosekissen (siehe unten)	
	gelöst in Puffer A + PI	
Saccharosekissen	50 %	Saccharose
	25 %	Glycerin
	in Puffer A gelöst	

2.8.6 Lösungen für die Proteinbestimmung nach Bradford

Ansetzen der Standardreihe als Doppelbestimmung:

Proben Nr.	BSA (100 µg/ml in A.bidest.)	A.bidest.	Protein Endkonzentration
0	0 µl	100 µl	0 µg / ml
1	10 µl	90 µl	1 µg / ml
2	20 µl	80 µl	2 µg / ml
3	30 µl	70 µl	3 µg / ml
4	40 µl	60 µl	4 µg / ml
5	50 µl	50 µl	5 µg / ml
6	60 µl	40 µl	6 µg / ml

Bradfordlösung

0,01 % Coomassie G-250

5 % Ethanol

10 % o-Phosphorsäure

filtrieren

2.8.7 Lösungen für die Proteinbestimmung nach Peterson

Ansetzen der Standardreihe als Doppelbestimmung:

Proben Nr.	BSA (100 µg/ml in A.bidest.)	NaOH (0,1 N)	Protein Endkonzentration
0	0 µl	200 µl	0 µg / ml
1	10 µl	190 µl	1 µg / ml
2	20 µl	180 µl	2 µg / ml
3	30 µl	170 µl	3 µg / ml
4	40 µl	160 µl	4 µg / ml
5	50 µl	150 µl	5 µg / ml
6	60 µl	140 µl	6 µg / ml

CTC

Lösung A

0,4 % CuSO₄

0,8 % K-Tartrat

CuSO₄ und K-Tartrat getrennt

voneinander ansetzen, nach

vollständigem Lösen vereinen

Lösung B

20 % Na₂CO₃

erst nach vollständigem Lösen von A und

B vereinen

Endkonz. in der Lösung

0,1 % CuSO₄

0,2 % K-Tartrat

10 % Na₂CO₃

Stabilität: 2 Monate

Reagenz A	SDS (10 %) CTC NaOH (0,8 N) A.bidest. gleiche Teile der Bestandteile Stabilität: 2 Wochen
Reagenz B	1:6 Folin-Ciocalteu-Reagenz in A.bidest.

2.8.8 Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese und den Western-Blot

Elektrophoresepuffer	0,1 M Tris 0,1 M Glycin 0,1 % SDS
Probenpuffer (1fach)	2 % SDS 10 % Glycerin 62,5 mM Tris (pH 6,8) 0,001 % Bromphenolblau
Probenpuffer reduzierend	25 mM DTT in Probenpuffer
Prestained MW Standard Blau	1 Packungsgröße MW Standard Blau 4 M Harnstoff 4fach Probenpuffer/25 mM DTT 5 min bei 95° C erhitzen, 5 min auf Eis 1fach Probenpuffer/200 mM JAA 30 min bei RT, bei -20° C einfrieren

Diskontinuierliche SDS-Gele:

	Sammelgel	Trenngel		
	6 %	8 %	10 %	15 %
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	2,0 ml	5,4 ml	6,7 ml	10,3 ml
1,5 M Tris pH8,8		5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
0,5 M Tris pH 6,8	2,5 ml			
A.bidest.	5,4 ml	9,3 ml	7,9 ml	4,3 ml
APS (10 %)	0,1 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
TEMED	10 µl	20 µl	20 µl	20 µl

Transferpuffer

25 mM Tris
0,19 M Glycin
1 mM EDTA
0,05 % SDS
20 % Methanol

Blockierungspuffer für Western-Blot:

PBS
5 % Milchpulver
0,05 % Tween20

Primärantikörper:

anti-ADAM10

1:2000 Antikörper
PBS
1 % BSA
0,05 % Tween20
0,02 % NaN₃

anti-FLAG	1:500 Antikörper PBS 1 % BSA 0,05 % Tween20 0,02 % NaN ₃
anti-GLUT4	1:200 Antikörper PBS 1 % BSA 0,05 % Tween20 0,02 % NaN ₃
anti-myc	1:400 Antikörper PBS 1 % BSA 0,05 % Tween20 0,02 % NaN ₃
anti-TACE	1:400 Antikörper PBS 1 % BSA 0,05 % Tween20 0,02 % NaN ₃
anti-TGN38	1:1000 Antikörper PBS 1 % BSA 0,05 % Tween20 0,02 % NaN ₃

2.8.9 Lösungen für die Aufreinigung des anti-GLUT4 Antikörpers an Protein A Sepharose

Laufpuffer	0,1 M	NaH ₂ PO ₄
	0,1 M	Na ₂ HPO ₄
	pH 8,0	
Elutionspuffer	0,15 M	NaCl
	0,1 M	Essigsäure
	pH 3,0	

2.8.10 Lösungen für die Immunadsorption

Blocklösung	0,5 %	Saponin
	2 %	Glycin
	2 %	L-Lysin
	in PBS (pH 7,4)	
Waschlösung	1 %	Glycin
	1 %	L-Lysin
	in PBS (pH 7,4)	

2.8.11 Lösungen für die Zelloberflächen-Analyse

Paraformaldehyd

PBS
4 % Paraformaldehyd
1 mM $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

Blocklösung

PBS
5 % BSA
1 mM $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

Phosphat-Citrat-Puffer

50 mM Na_2HPO_4
25 mM Citronensäure
pH 5,0

Primärantikörper:

anti-myc

1:100 Antikörper
PBS
1 % BSA

anti-Transferrinrezeptor

1:100 Antikörper
PBS
1 % BSA

Sekundärantikörper:

anti-Maus

1:500 Antikörper
PBS
1 % BSA

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 Umklonierung von Plasmid-Vektoren

2.9.1.1 Restriktionsverdau

Für die stabile Transfektion von Rat1-W575-Zellen wird das GLUT4myc-Konstrukt benötigt. Dieses lag ursprünglich in dem pcXN2-GLUT4myc Plasmid vor, das eine Geneticin- (G418-) Resistenz trug. Da die stabil mit dem humanen Thrombinrezeptor transfizierten Rat1-W575-Zellen bereits über eine G418-Resistenz selektiert worden sind, wird für die Selektion von GLUT4myc-Zellen eine andere Resistenz benötigt. Der Vektor pTracer verfügt über eine **Zeo**zin- (Zeo-) Resistenz, die mit dem **Green Fluorescent Protein**- (GFP-) Konstrukt (Cramer et al., 1996) gekoppelt ist. Mit Hilfe des GFP kann der Transfektionserfolg auf einfache Art und Weise mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden. Das zeo/GFP-Konstrukt sollte aus dem Vektor pTracer geschnitten und in das pcXN2-GLUT4myc Plasmid ligiert werden.

Dazu werden in einem Ansatz 6 µl des Plasmids pcXN2-GLUT4myc, 1 u/µg der Restriktionsenzyme SspI und FspI, die die **Ampicillin** (Amp)/G418-Resistenz mit stumpfen Enden aus dem Plasmid schneiden, sowie 1 µl Puffer gelb zusammen gegeben und mit A.bidest. auf 10 µl aufgefüllt. Parallel dazu wird das zeo/GFP-Insert aus dem Vektor pTracer mit den Restriktionsenzymen SspI sowie Eco32 geschnitten. Beide Ansätze werden getrennt voneinander für 3 Stunden bei 37° C inkubiert, damit die Enzyme die jeweiligen Plasmide schneiden können. Um die Reaktion zu stoppen, werden die beiden Ansätze für 15 min bei 65° C erhitzt und anschließend auf **Raumtemperatur** (RT) abgekühlt.

2.9.1.2 Ligation des Plasmids pcXN2-GLUT4myc mit dem Insert zeo/GFP

Für die Ligation des Plasmids pcXN2-GLUT4myc mit dem Insert zeo/GFP werden jeweils 6 µl Plasmid-DNA und Insert-DNA eingesetzt. Das Insert sollte für hohe Ligationseffizienz etwa dreimal konzentrierter vorliegen als das Plasmid. Diese jeweils 6 µl werden mit 4 µl T4 DNA-Ligase (1 u/µl), 2 µl T4 DNA-Ligase Puffer und 2 µl Polyethylenglycol4000 (PEG), das die Ligation von stumpfen DNA-Abschnitten erhöht, zusammen pipettiert und über Nacht bei 16° C inkubiert.

Am folgenden Tag wird der Ligationsansatz mit den Restriktionsenzymen EcoR5 und XhoI inkubiert, damit religierter pTracer geschnitten wird und so keine Bakterien mit dem religierten Vektor transformiert werden. 2 µl der ligierten DNA werden zu je 0,2 µl der Enzyme EcoR5 und XhoI, 1 µl Puffer rot und 6,8 µl A.bidest. pipettiert und für 3 Stunden bei 37° C inkubiert. Um die Restriktionsenzyme zu inaktivieren, wird der Ansatz für 15 min bei 65° C erhitzt.

2.9.2 Transformation von chemisch kompetenten *Escherischia coli*XL1blue und DH5α

Kurz vor der Transformation von chemisch kompetenten Bakterien wird das pcXN2-GLUT4myc-zeo/GFP Plasmid für 10 min bei 65° C erhitzt und anschließend auf RT abgekühlt. Ein 100 µl Aliquot von chemisch kompetenten *Escherischia coli* XL1blue (*E.coli*) in TFB-Puffer wird auf Eis stehend aufgetaut und 5 µl (200-1000 ng) Plasmid-DNA dazu pipettiert, gemischt und für 30 s auf Eis gestellt. Anschließend wird das Gemisch für 60 s bei 42° C inkubiert. Die transformierten Bakterien werden sofort in 1 ml Luria-Bertani (LB)-Medium mit niedriger Salzkonzentration gegeben und bei 37° C für 60 min im Schüttler inkubiert, damit die Antibiotikaresistenz exprimiert wird. Die niedrige Salzkonzentration im LB-Medium ist notwendig, damit die Aktivität von Zeozin nicht inhibiert wird. Auf einer LB-Zeozin (25 µg/ml)-Platte wird ein Tropfen der transformierten Bakterien mit einem Trigalski-Spatel verteilt und auf einer weiteren LB-Zeozin-Platte wird der Rest der Bakterien verteilt. Beide Platten werden bei 37° C für 18 Stunden inkubiert.

Am folgenden Tag wird ein Einzelklon gepickt, in 2,5 ml LB-Zeozin-Medium gegeben und im Wasserbad bei 37° C über Nacht geschüttelt.

750 μl dieser Vorkultur werden mit 250 μl sterilem Glycerin gemischt und bei -80°C aufbewahrt. Aus 1,5 ml Vorkultur wird Plasmid-DNA mittels einer Mini-Präparation isoliert und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Mit pcDNA3-VSVG-proHB-EGF transformierte *E.coli* wurden bereits in der Diplomarbeit von Claudia Fohrer beschrieben. Dabei wurde ein 50 μl Aliquot von superkompetenten *E.coli* DH5 α auf Eis stehend aufgetaut und mit 0,5 μl Plasmid pcDNA3-VSVG-proHB-EGF, das aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Axel Ullrich aus dem MPI für Biochemie in Martinsried stammt, in eine Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand von $d = 2\text{ mm}$) hineinpipettiert, gemischt und bei $129\ \Omega$, $50\ \mu\text{F}$, $1,2\ \text{kV}$ elektroporiert. Die elektroporierten Bakterien sind genau wie die zuvor beschriebenen chemisch transformierten Bakterien behandelt worden. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte jedoch über Ampicillin. Mit dem pcDNA3-VSVG-proHB-EGF Plasmid werden CHO-Zellen transfiziert, um VSVG-proHB-EGF-enthaltende Membrankompartimente zu isolieren (siehe Kap. 2.10.4 und Kap. 2.11.5).

2.9.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA nach del Sal et al. (1988)

1,5 ml der oben beschriebenen Vorkultur in LB-Zeozin-Medium werden in ein Reaktionsgefäß gegeben und in der Sigma-Zentrifuge 202MK, Rotor 12045 bei $9000\ \text{x g}$, RT für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, das Pellet in 200 μl sterilem STET-Puffer resuspendiert und anschließend auf einem Vortex-Mixer heftig gemischt, bis sich eine homogene Suspension gebildet hat. Um die Zellwand zu zerstören, werden 10 μl Lysozym (25 mg/ml) zugegeben und gut gemischt. Anschließend wird die Probe bei RT für 5 min inkubiert. Die Inkubationszeit sollte auf keinen Fall weiter ausgedehnt werden, da bei der Lyse der Zellen auch chromosomale DNA austreten kann. Die Probe wird bei 100°C im Wasserbad für 45 s gekocht und anschließend in der Sigma-Zentrifuge bei $13600\ \text{x g}$, RT für 15 min zentrifugiert, um das freigesetzte Plasmid von den Zelltrümmern abzutrennen. Das gallertige Pellet wird verworfen, im klaren Überstand befindet sich das Plasmid, das durch Zugabe von 8 μl CTAB (5 %) gefällt wird. Die Lösung wird durch das ausfallende Plasmid sofort deutlich trüb und in der Sigma-Zentrifuge bei $13600\ \text{x g}$, RT für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und, um das CTAB wieder zu verdrängen, wird das Pellet in 300 μl NaCl-Lösung (1,2 M) gelöst. Es folgt eine erneute Fällung des Plasmids mit 750 μl

eiskaltem Ethanol (reinst.). Anschließend wird bei 13600 x g, 4° C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und, um die Salzkonzentration zu vermindern, wird das Pellet ohne zu resuspendieren mit 500 µl Ethanol (70 %) kurz gewaschen. Das Pellet wird getrocknet und in 20 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

2.9.4 Gelelektrophorese

Um den Einbau des Inserts in das Plasmid zu überprüfen, wird der Vektor mit Enzymen geschnitten und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Zum Verdau der Plasmid-DNA werden die Restriktionsenzyme Sall und EcoRI in zwei voneinander getrennten Ansätzen verwendet. 3 µl Plasmid-DNA werden zu 1 µl Puffer orange, 5,5 µl A.bidest., 0,5 µl Enzym Sall oder EcoRI pipettiert und bei 37° C für 2 Stunden inkubiert. Die Auftrennung der geschnittenen Plasmid-DNA erfolgt im 0,7 %igen Agarosegel. Zur Größenbestimmung wird ein Größenstandard (lambda) verwendet. Die Agarose wird in entsprechender Konzentration in 1 fach TBE-Puffer gelöst, 6 µl EtBr (konz.) zugesetzt, in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen und erkalten lassen. Nach dem Erstarren des Gels wird dieses in eine Gelelektrophoresekammer gelegt und der Kamm entfernt. 10 µl der Proben werden jeweils mit 2 µl sechsfach konzentriertem Probenpuffer vermischt und in die Geltaschen gegeben. Die Gelelektrophoresekammer wird mit TBE-Puffer gefüllt; der Lauf erfolgt bei konstanter Spannung von 95 V für 1 Stunde. Nach Beendigung des Laufs wird das Gel aus der Gelelektrophoresekammer genommen und die Plasmid-DNA durch das zwischen den Basenpaaren interkalierende EtBr auf einem Transilluminator durch UV-Anregung sichtbar gemacht.

2.9.5 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* XL1blue und *E.coli* DH5 α nach Qiagen

Aus einer bei -80° C eingefrorenen Suspension transformierter *E.coli* XL1blue bzw. *E.coli* DH5 α werden 2,5 ml SOC-Zeozein-Medium bzw. SOC-Ampicillin-Medium inokuliert und über Tag bei 37° C inkubiert (Vorkultur). Die Vorkultur wird nach erfolgter Trübung des Mediums vollständig in zwei Erlenmeyerkolben mit je 250 ml LB-Zeozein-Medium bzw. LB-Ampicillin-Medium gegeben und über Nacht bei 37° C im Schüttler inkubiert.

Die Bakterien aus beiden Erlenmeyerkolben werden in der Beckmann Kühlzentrifuge, Rotor JA10 bei 6200 x g, 4° C für 10 min zentrifugiert. Das Plasmid wird dann mit Hilfe eines Qiagen-Kits isoliert und aufgereinigt. Die so gewonnene DNA wird durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol bei vorsichtigem Schwenken gefällt. Das Präzipitat wird in der Sigma-Zentrifuge, Rotor 12040 bei 13600 x g, 4° C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, das Pellet mit 5 ml kaltem Ethanol (70 %) gewaschen und bei 13600 x g, 4° C für 15 min zentrifugiert. Der Ethanolüberstand wird verworfen, das DNA-Pellet getrocknet. Nach Resuspension des Pellets in 200 μ l TE-Puffer wird mit einer 1:100 Verdünnung die DNA-Konzentration und die -Reinheit spektralphotometrisch ermittelt (das Verhältnis der Absorption bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm sollte bei etwa 1,8 bis 2 liegen).

Das in der Maxi-Präparation gewonnene pcXN2-GLUT4myc-zeo/GFP Plasmid steht nun in ausreichender Menge zur Verfügung, um Rat1-W575-Zellen stabil mit dem Vektor zu transfizieren (siehe Kap. 2.10.4).

2.10 Zellbiologische Methoden

2.10.1 Auftauen von Säugetierzellen

Zum Auftauen von Säugetierzellen wird ein Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und bei 37° C im Wasserbad zügig aufgetaut. Sobald die Zellen aufgetaut sind, werden sie sofort in der Sterilwerkbank in ein steriles Röhrchen mit 20 ml Wachstumsmedium (37° C) überführt. Es folgt eine Zentrifugation der Zellen bei 200 x g, RT für 5 min. Das Zellpellet wird in 5 ml Wachstumsmedium resuspendiert und in eine Zellkulturplatte mit bereits vorgelegtem Medium überführt. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt.

2.10.2 Einfrieren von Säugetierzellen

Die Zellen einer 15 cm Kulturplatte werden zweimal mit 10 ml PBS gewaschen, mit 1,5 ml Trypsin (0,25 %) für 5 min (bei Rat1-Zellen) bzw. 1,5 ml Trypsin (0,05 %) für 1,5 min (bei CHO-Zellen) inkubiert und mit 5 ml Wachstumsmedium ab gespült. Die abgelösten Zellen werden in ein 50 ml-Röhrchen überführt, mit Medium auf 25 ml aufgefüllt und bei 200 x g, RT für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 2 ml eiskaltem Gefriermedium resuspendiert und je 1 ml werden in zwei Kryoröhrchen überführt. Die Zellen werden zunächst 20 min auf Eis gelagert, bevor sie bei -80° C für sieben Tage aufbewahrt werden. Anschließend werden die Kryoröhrchen in den Stickstofftank gegeben.

2.10.3 Ablösen und Umsetzen von adhärennten Zellen

Die verschiedenen Zelllinien werden alle zwei bis drei Tage geteilt. Die Zellen werden zweimal mit 10 ml PBS gewaschen, mit 1,5 ml Trypsin (0,25 %) für 5 min (bei Rat1-Zellen) bzw. 1,5 ml Trypsin (0,05 %) für 1,5 min (bei CHO-Zellen) inkubiert. Auf frische Zellkulturplatten werden je 20 ml Wachstumsmedium vorgelegt, die trypsinisierten Zellen werden abgeklopft, in 5 ml Wachstumsmedium aufgenommen und je nach Dichte auf zwei

bis fünf Platten verteilt. Die Zellen werden im Heraeus Brutschrank bei 37° C, 5 % CO₂, 95 % rH gehalten.

2.10.4 Stabile Transfektion von Rat1-W575-Zellen und transiente Transfektion von CHO/GLUT4-Zellen mittels Elektroporation

Als Expressionsvektor für die stabile Transfektion wird das pcXN2-GLUT4myc-zeo/GFP Plasmid verwendet. Dieses trägt eine Zeozinresistenz (siehe Kap. 2.9.1.2).

Für die transiente Transfektion von CHO/GLUT4-Zellen mittels Elektroporation wird das Plasmid pcDNA3-VSVG-proHB-EGF benutzt.

Die jeweilige Zelllinie wird zwei Tage vor der Transfektion so geteilt, dass zu Versuchsbeginn vier Platten (15 cm) zur Verfügung stehen, die jeweils etwa 80 % konfluent sind. Die Zellen werden zweimal mit 10 ml PBS gewaschen, mit 1,5 ml Trypsin von der Platte gelöst und mit 5 ml Wachstumsmedium abgespült. Die abgelösten Zellen aus vier Platten werden in ein 50 ml-Röhrchen gegeben und in der Heraeus-Minifuge T bei 200 x g, RT für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, das Zellpellet in 5 ml Elektroporationspuffer resuspendiert und auf 25 ml aufgefüllt. Abermals wird in der Heraeus-Minifuge bei 200 x g, RT für 5 min zentrifugiert. In der Zwischenzeit werden 60 µg GLUT4myc-zeo/GFP-DNA bzw. 60 µg VSVG-proHB-EGF-DNA in je vier Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand von $d = 4$ mm) vorgelegt. Die gleiche Menge TE-Puffer als Kontrolle wird in eine weitere Elektroporationsküvette vorgelegt. Das Zellpellet wird in 3,2 ml (0,8 ml pro ursprünglicher Zellkulturplatte) Elektroporationspuffer resuspendiert; jeweils 0,8 ml der Suspension werden in eine Küvette gegeben und 2 min inkubiert. Die Rat1-W575-Zellen werden im Elektroporationssystem bei 400 µF, 310 V, $\tau = 5$ ms elektroporiert, während die CHO-Zellen bei 250 µF, 420 V, $\tau = 3,5$ ms transfiziert werden. Nach anschließender vierminütiger Inkubationszeit wird der Inhalt aus je zwei Küvetten in 20 ml „Erholungs“-Medium überführt und bei 37° C für 30 min im Brutschrank inkubiert. Nach 30 min werden die 50 ml-Röhrchen bei 200 x g, RT für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wird auf zwei Platten, in die bereits jeweils 20 ml Wachstumsmedium vorgelegt worden sind, verteilt und in den Brutschrank bei 37° C gestellt. Nach 24 Stunden wird das Wachstumsmedium gewechselt, um abgestorbene Zellen zu entfernen.

Die mit GLUT4myc transfizierten Rat1-W575-Zellen werden mit Zeozin selektiert (siehe Kap. 2.10.5), um stabile Klone zu erhalten. Die transient transfizierten CHO/GLUT4-Zellen werden ca. 40 Stunden nach der Transfektion subzellulär fraktioniert (siehe Kap. 2.11), um VSVG-proHB-EGF enthaltende Membrankompartimente zu isolieren.

2.10.5 Selektion der stabil transfizierten Rat1-W575-Zellen

48 Stunden nach der Elektroporation sind die Kontrollzellen zu 50-55 % konfluent, die mit der DNA elektroporierten Zellen sind nur zu etwa 45 % konfluent. Beide Zellpopulationen werden separat behandelt. Sie werden jeweils zweimal mit 10 ml PBS gewaschen, mit 1,5 ml Trypsin abgelöst, mit 4,5 ml Wachstumsmedium abgespült und in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Mit der Neubauer-Zählkammer werden die Zellen gezählt und auf Platten (10 cm) mit folgender Zelldichte verteilt: 1×10^5 Zellen, 5×10^4 Zellen, 1×10^4 Zellen, 8×10^3 Zellen und 5×10^3 Zellen. Die Kontrollzellen werden in den Dichten 5×10^5 Zellen und 1×10^5 Zellen ausplattiert. Durch Zugabe von 1 mg/ml Zeozin werden die Zellen bei 37° C im Brutschrank selektiert. Der Mediumwechsel mit Zeozingabe erfolgt alle zwei Tage. Nach 16 Tagen sind die untransfizierten Zellen auf den Kontrollplatten zu 90 % abgestorben. Nur am Rand konnten im Zellverband noch einige Zellen überleben. Auf den mit transfizierten Zellen besetzten Platten sind einzelne Klone zu sehen. Die Platten werden zwei-mal mit 10 ml PBS gewaschen und für 3 min in 10 ml PBS inkubiert, damit sich die Klone im Verband leichter von der Platte lösen. Die Klone werden mit je 70 µl PBS mittels einer automatischen Pipette (1 ml-Spitze) aufgezogen, in eine Vertiefung einer 96 Vertiefungen umfassenden Platte gegeben und 200 µl Wachstumsmedium hinzugefügt. Pro Platte werden nur ca. 5 Klone gepickt, um Kontaminationen der einzelnen Klone durch wegschwimmende Zellen zu verhindern. Nach 24 Stunden wird das Wachstumsmedium gewechselt und 1 mg/ml Zeozin zugefügt. Alle 48 Stunden wird nun das Wachstumsmedium + Zeozin gewechselt. Bedecken die Zellklone die ganze Vertiefung einer Platte, werden sie mit Trypsin abgelöst und so oft in immer größere Vertiefungen überführt, bis sie auf zwei 10 cm Platten wachsen. Von hier aus können die Klone entweder weiter expandiert (siehe Kap. 2.10.3), oder auf die Expression von GLUT4 hin analysiert werden (siehe Kap. 2.10.6).

2.10.6 Transfektionsnachweis durch Analyse der Einzelklone

Die Klone werden auf die Expression von GLUT4 hin analysiert. Dabei werden untransfizierte Rat1-W575-Zellen als Negativkontrolle und CHO-GLUT4-Zellen als Positivkontrolle benötigt. Die verschiedenen Zellpopulationen sind in etwa gleich konfluent. Sie werden zweimal mit 10 ml PBS gewaschen, mit 1 ml Trypsin abgelöst und mit 3 ml Wachstumsmedium von der Platte gespült. Die verschiedenen Zellpopulationen werden einzeln bei 200 x g, RT für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in jeweils 15 ml PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1 mM) resuspendiert. Es folgt die gleiche Zentrifugation wie zuvor. Der Überstand nach diesem Waschschrift wird ebenfalls dekantiert, das Zellpellet in 80 μl PBS + NP40 (1 %) resuspendiert, um die Membranen aufzuschließen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach einstündiger Solubilisierung auf Eis und gelegentlichem Mischen werden die Solubilisate bei 12700 x g, 4° C für 15 min in der Sigma-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand enthält die solubilisierten Proteine. Von ihm werden je 30 μl abgenommen und für einen Nachweis im Western-Blot nicht-reduzierend vorbereitet (siehe Kap. 2.13.4.1).

2.11 Subzelluläre Fraktionierung

2.11.1 Subzelluläre Fraktionierung modifiziert nach Herman et al. (1994)

Die Rat1-W575/GLUT4myc-Zellen werden zwei bis drei Tage vor der Präparation geteilt, um eine maximale Konfluenz zu gewährleisten und 24 Stunden vor Durchführung der Versuche mit inaktiviertem Medium inkubiert. Das Hitzeinaktivieren des FCS (fetal calf serum) ist notwendig, da die im Serum häufig enthaltenen geringen Mengen an Thrombin eventuell eine vermehrte Translokation von GSVs auslösen können. Es werden für eine Standardpräparation zwischen 8 und 12 Zellkulturplatten (15 cm) benötigt. Um eine Degradation von Proteinen zu minimieren und Membrantransportprozesse zu stoppen, werden alle nun folgenden Schritte mit vorgekühlten Lösungen auf Eis oder im Kühlraum durchgeführt. Je zwei Platten werden auf Eis gestellt, zweimal mit je 10 ml kaltem Puffer A gespült, anschließend mit 4 ml kaltem Puffer A + Proteaseninhibitoren (PI) überschichtet und mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Beide Platten werden zusammen noch

einmal mit 5 ml Puffer A + PI gespült, um alle Zellen in Suspension zu bekommen. Die Zellsuspension wird auf zwei Zentrifugenröhrchen verteilt. In der Heraeus-Minifuge werden die Suspensionen bei 200 x g, 4° C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand, der sämtliche aus den Zellen freigesetzten löslichen Proteine und kleinen Organellen wie GSVs enthält, wird in ein Zentrifugenröhrchen für den Rotor 60Ti gegeben. Das korrespondierende Zellpellet wird in 200 µl Puffer A + PI resuspendiert und im Glas/Teflonhomogenisator mit einem Bohrmaschinenantrieb, Stufe 4 mit 12 Passagen, 4° C aufgeschlossen. Das resultierende Homogenat wird mit gekühlter Pasteurpipette in ein Reaktionsgefäß transferiert. Anschließend wird bei 1000 x g, 4° C für 5 min in der Sigma-Zentrifuge zentrifugiert. Der hierbei gebildete postnukleäre Überstand wird mit dem Überstand, der bei der Zentrifugation der Zellsuspension entstanden ist, im Zentrifugenröhrchen für den Rotor 60Ti vereinigt und auf 30 ml aufgefüllt. In der Kontron-Ultrazentrifuge folgt eine Zentrifugation bei 177000 x g, 4° C für 1 Stunde. Unter diesen Bedingungen werden sämtliche Membrankompartimente pelletiert. Der Überstand wird dekantiert, das Pellet wird mit zweimal 3 ml Puffer A + PI vorsichtig gewaschen, um lösliche Proteine zu entfernen. Anschließend wird das Pellet in 80 µl Puffer A + PI resuspendiert und das Röhrchen mit weiteren 80 µl gespült, um so wenig wie möglich an Protein zu verlieren. Im Glas/Teflonhomogenisator mit einem Bohrmaschinenantrieb Stufe 4, 20 Passagen wird das resuspendierte Pellet homogenisiert. Das Homogenat wird mit gekühlter Pasteurpipette in ein Reaktionsgefäß transferiert. Für das Homogenat wird zur Proteinbestimmung ein Test nach Bradford durchgeführt. Circa 2 mg (800 µg) Protein werden dann auf einen mittleren (kleinen) Sedimentationsgeschwindigkeitsgradienten (5-25 % Glycerin über einem 50 % Saccharosekissen in Puffer A) geladen. Um die intrazellulären Bestandteile nach ihrer Größe aufzutrennen, wird der Gradient bei 61000 x g, 4° C für 2,5 Stunden im Rotor SW40Ti (60000 x g, 4° C für 1 Stunde im Rotor SW56Ti) in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Absammeln der Fraktionen des Gradienten erfolgt von oben mit einem Buchler Auto Densi-Flow II C, Isco Fraktionssammler, Tropfenzahl 10 (Tropfenzahl 6) bei 4° C. Die Fraktionen werden bei 4° C aufbewahrt. Der Nachweis der Verteilung von Proteinen im Gradienten erfolgt über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot (siehe Kap. 2.13.4 und Kap. 2.13.5). Die Proben werden nicht-reduzierend vorbereitet (siehe Kap. 2.13.4.1).

2.11.2 Subzelluläre Fraktionierung nach einem Temperaturblock

Im Temperaturblock werden die Rat1-W575/GLUT4myc-Zellen unphysiologisch niedrigen Temperaturen von 15° C ausgesetzt. Dies verhindert das Abschnüren der GSVs aus dem Endosom, nicht jedoch die GSV-Exozytose sowie die GLUT4-Endozytose. Somit kommt es zu einer Umverteilung der in den GSVs vorhandenen Membranproteine zu den großen endosomalen Kompartimenten, die am Boden des Gradienten sedimentieren (Wei et al., 1998). 12 Zellkulturplatten (15 cm) Rat1-W575/GLUT4myc-Zellen werden 24 Stunden vor Versuchsbeginn mit inaktiviertem Medium inkubiert. Sechs Platten werden vor dem Abschaben für 2 Stunden in Hepes gepuffertem Medium (20 mM, pH 7,4) bei 15° C Raumluft im Kühlbrüter inkubiert. Die verbliebenen sechs Platten werden ebenfalls in Hepes gepuffertes Medium gegeben und bei 37° C Raumluft im Brutschrank inkubiert. Nach 2 Stunden erfolgt die subzelluläre Fraktionierung wie in Kap. 2.11.1 beschrieben.

2.11.3 Subzelluläre Fraktionierung nach Blockierung der Endozytose durch hypertones Medium

12 Zellkulturplatten (15 cm) Rat1W575/GLUT4myc-Zellen werden vor Versuchsbeginn für 24 Stunden mit inaktiviertem Medium inkubiert. Sechs Platten werden vor dem Abschaben für 30 min mit Sorbitol (0,45 M) im gleichen Medium bei 37° C inkubiert. Hypertones Medium hemmt die Clathrin-vermittelte Endozytose, während die Exozytose unbeeinflusst bleibt (Heuser & Anderson, 1989; Hansen et al., 1993). Dadurch kommt es zu einer Umverteilung von Membranproteinen konstitutiv rezirkulierender Vesikel zur Zelloberfläche. Die restlichen sechs Platten werden zur Kontrolle unbehandelt gelassen. Die anschließende subzelluläre Fraktionierung erfolgt wie in Kap. 2.11.1 beschrieben.

2.11.4 Subzelluläre Fraktionierung nach Stimulation der Zellen mit Thrombin

Rat1-W575/GLUT4myc-Zellen exprimieren den humanen Thrombinrezeptor, der durch Gabe von Thrombin im Medium aktiviert werden kann.

12 Zellkulturplatten (15 cm) Rat1-W575/GLUT4myc-Zellen werden für 24 Stunden mit inaktiviertem Medium behandelt. Sechs Platten werden für 10 min bei 37° C mit 1 u/ml

Thrombin in DMEM-Medium mit 1 % BSA inkubiert. Die restlichen sechs Platten werden als Kontrolle ebenfalls in DMEM-Medium mit 1 % BSA für 10 min bei 37° C inkubiert. Anschließend erfolgt eine subzelluläre Fraktionierung wie in Kap. 2.11.1 beschrieben.

2.11.5 Isolierung und Anreicherung VSVG-proHB-EGF enthaltender Membrankompartimente aus transfizierten CHO/GLUT4-Zellen

Vier Zellkulturplatten transient mit VSVG-proHB-EGF transfizierter CHO/GLUT4-Zellen werden 32 Stunden nach der Transfektion und 14 Stunden vor Präparationsbeginn mit Natriumbutyrat (4 mM) behandelt. Natriumbutyrat erhöht die Expression von Genen, die an einen Cytomegalovirus- (CMV) Promotor gekoppelt sind (Hock et al., 1989). VSVG-proHB-EGF steht im pcDNA3-Vektor unter Kontrolle dieses Promotors.

Um VSVG-proHB-EGF enthaltende Membrankompartimente zu isolieren, werden je zwei Platten auf Eis gestellt, zweimal mit je 10 ml kaltem Puffer A gespült, mit 4 ml kaltem Puffer A + PI überschichtet und mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst. Die Zellsuspension wird in ein Zentrifugenröhrchen überführt und beide Platten werden zusammen noch einmal mit 5 ml Puffer A + PI nachgespült. In der Heraeus-Minifuge wird die Suspension bei 200 x g, 4° C für 5 min zentrifugiert, der Überstand wird dekantiert und das Pellet wird in 350 µl Mops-Puffer (20 mM, pH 7,2) resuspendiert. Die Zellsuspension wird im Glas/Teflonhomogenisator mit einem Bohrmaschinenantrieb, Stufe 4 mit 12 Passagen aufgeschlossen. Das Homogenat wird in ein Reaktionsgefäß transferiert und der Proteingehalt nach Bradford bestimmt. 2,5 mg des Homogenats werden dann auf einen Saccharosedichtegradienten (30-60 % Saccharose, ohne Kissen) geladen. Um die intrazellulären Bestandteile nach ihrer Dichte aufzutrennen, wird der Gradient in der Ultrazentrifuge, Rotor SW40Ti bei 154500 x g, 4° C für 6 Stunden zentrifugiert. Das Absammeln der Fraktionen des Gradienten erfolgt von oben mit einem Buchler Auto Densi-Flow II C, Isco Fraktionssammler, mit Tropfenzahl 10 bei 4° C. Die Fraktionen werden bei -20° C aufbewahrt.

Der Nachweis der VSVG-proHB-EGF enthaltenden Membrankompartimente erfolgt im Western-Blot (siehe Kap. 2.13.5). Die Proben werden reduzierend vorbereitet (siehe Kap. 2.13.4.1).

2.12 Spaltung von VSVG-proHB-EGF durch Vesikel-assoziierte Proteasen

Die mittels Sedimentationsgeschwindigkeitsgradientenzentrifugation aufgereinigten GLUT4-enthaltenden Vesikel aus Rat1-W575/GLUT4myc-Zellen werden am Tag nach der Präparation in der Ultrazentrifuge, Rotor 60Ti bei 177000 x g, 4° C für 2 Stunden aufkonzentriert. Das Pellet wird in PBS mit Ca²⁺/Mg²⁺ (1 mM) oder in Hepes (20 mM) mit Ca²⁺/Mg²⁺ (1 mM) resuspendiert und nach Zugabe von NP40 (1 %) auf Eis für 30 min solubilisiert. Parallel dazu werden die VSVG-proHB-EGF enthaltenden Membranen aus dem Dichtegradienten (siehe Kap. 2.11.5) für 5 min bei 95° C erhitzt, um in ihnen enthaltende Proteasen zu inaktivieren. Anschließend werden ebenfalls 1 % NP40 für 30 min auf Eis zu den Membranen gegeben. 10 µl solubilisierte Vesikelmembranen aus Rat1-GLUT4myc-Zellen werden mit 10 µl solubilierten VSVG-proHB-EGF-enthaltenden Membrankompartimenten aus transfizierten CHO/GLUT4-Zellen bei 37° C im Wasserbad für 45 min bzw. 5 min (bei der Analyse immunadsorbierter GSVs) inkubiert. Die verschiedenen Membranen werden gemischt, um zu überprüfen, ob GSVs aus Rat1-W575/GLUT4myc-Zellen proHB-EGF hydrolysierende Proteaseaktivität enthalten. Als Kontrollen werden 10 µl solubiliertes VSVG-proHB-EGF mit 10 µl Puffer bei 37° C für 45 min bzw. 5 min (bei der Immunadsorption) inkubiert. Die Proben werden anschließend reduzierend behandelt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Spaltung bzw. der Abbau von VSVG-proHB-EGF wird im Western-Blot analysiert.

2.13 Proteinbiochemische Methoden

2.13.1 Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford (1976)

Um den Proteingehalt von Lösungen zu bestimmen, wird zunächst eine Standardreihe mit einer BSA-Lösung angesetzt (siehe Kap. 2.8.6). Von der zu messenden Probe wird eine adäquate Verdünnung (in der Regel 1:100) angesetzt und auf 100 µl mit A.bidest. aufgefüllt. Sowohl zur Standardreihe als auch zur Probe werden 1 ml Bradfordlösung gegeben und bei RT für 5 min inkubiert. Anschließend erfolgt eine kolorimetrische Bestimmung des Proteingehaltes der Proben über ein Spektralphotometer bei 595 nm.

2.13.2 Bestimmung des Proteingehaltes nach Peterson

Der Proteingehalt von Proben mit einem hohen Anteil an membranständigen Proteinen wird mittels Proteinbestimmung nach Peterson ermittelt. Die zu messenden Proben werden zunächst mit A.bidest. auf 1 ml aufgefüllt, 100 µl DOC (0,15 %) werden dazu pipettiert, gemischt und bei RT für 10 min inkubiert. Anschließend werden die Proben durch Zugabe von 100 µl TCA (72 %) über Nacht bei 4° C auf Eis gefällt. Am nächsten Morgen werden die Proben in der Sigma-Zentrifuge bei 13600 x g, 4° C für 60 min zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, das Pellet wird in 200 µl NaOH (0,1 N) unter häufigem Mischen für 60 min bei RT gelöst. Parallel dazu wird eine Standardreihe mit einer BSA-Lösung angesetzt (siehe Kap. 2.8.7), die nach Zugabe von NaOH identisch wie die Proben behandelt wird. Es werden 200 µl Reagenz A hinzugefügt, gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 100 µl Folin-Ciocalteu-Reagenz (1:6) unter Schütteln und Inkubation für 30 min bei RT. Die Bestimmung des Proteingehaltes der Proben erfolgt durch Messung an einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 750 nm.

2.13.3 Proteinfällung

Bei geringer Konzentration des zu untersuchenden Proteins werden vor der Analyse mittels Gelelektrophorese (siehe Kap. 2.13.4) zwischen 200 µl und 1 ml Probe gefällt. Dazu werden die Proben bei 4° C auf 1 ml mit A.bidest. aufgefüllt, 100 µl DOC (0,15 %) zugegeben, gemischt und bei RT für 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl TCA (72 %) werden die Proben über Nacht bei 4° C auf Eis gefällt. In der Sigma-Zentrifuge werden die Proben bei 13600 x g, 4° C für 60 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen; zum Pellet werden 1 ml eiskaltes Aceton/HCl (200:1) vorsichtig zugegeben, ohne das Pellet zu zerstören. Es folgt eine dreißigminütige Zentrifugation bei 13600 x g, 4° C. Das Pellet wird in 30 µl A.bidest. resuspendiert und für die Analyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophore und Western-Blot vorbereitet.

2.13.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli et al. (1970)

Die Auftrennung von Proteingemischen nach Molekulargewicht erfolgt mittels **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)** unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen. Bei dieser Methode werden die Proteine durch Anlagerung des amphoteren, negativ geladenen Detergenz, Natriumdodecylsulfat (SDS), das im Probenpuffer enthalten ist, denaturiert. Gleichzeitig werden die Ladungen der Proteine maskiert. Durch diese Interaktion werden die Proteine gezwungen, eine lineare Form anzunehmen. Die Gelelektrophorese nutzt die Wanderung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld. Die geladenen Proteine bewegen sich im elektrischen Feld wegen der negativen Ladung des SDS in Richtung Anode. Bei gleichbleibender Feldstärke wird die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im Gel von ihrer Größe und ihrer Ladung bestimmt. Die Eigenladung der Proteine kann im Vergleich zur Ladung des angelagerten SDS vernachlässigt werden; es erfolgt eine Auftrennung nach Größe.

2.13.4.1 Probenvorbereitung

Die Proben werden reduzierend oder nicht-reduzierend vorbereitet.

Bei reduzierender Behandlung werden zu 20 µl Probe 6,7 µl vierfach Probenpuffer mit Dithiothreitol (Endkonzentration 25 mM) gegeben und bei 95° C im Wasserbad für 5 min erhitzt. Dabei werden Disulfidbrücken reduziert. Anschließend werden die Proben kurz auf Eis abgekühlt und weitere 6,7 µl einfach Probenpuffer mit Jodacetamid (Endkonzentration 200 mM) bei RT für 30 min zugesetzt. Jodacetamid verhindert durch Acetylierung die Neubildung der Disulfidbrücken.

Bei nicht-reduzierender Behandlung werden 30 µl je Probe mit 10 µl vierfach Probenpuffer bei RT für 60 min inkubiert.

2.13.4.2 Polyacrylamid-Gele

Die Auftrennung der Proteine erfolgt in 8, 10 oder 15 %igen **Polyacrylamidgelen** (PAA-Gel). Das Sammelgel besitzt eine Acrylamidkonzentration von 6 %. Die vorbereitete Trenngellösung wird zwischen 2 Glasplatten (8x10,5 cm) gegossen, so dass 3/4 der Glasplatten mit Trenngel bedeckt ist, und mit Isopropanol bis zur Polymerisation des Gels überschichtet. Anschließend wird das Isopropanol entfernt und das Sammelgel über das Trenngel gegossen. Die Höhe des Sammelgels beträgt etwa 2 cm; die Probenaschen werden mit einem Kunststoffkamm ausgespart.

Die Glasplatten des diskontinuierlichen Polyacrylamid-Mini-Flachbettgels werden in eine Elektrophoresekammer eingespannt und die Apparatur mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Zum Auftrennen wird ein konstanter Strom von 5 mA pro Gel für 5 min angelegt. Dabei wandern die Proben in Richtung Anode und sammeln sich am Boden der Probenasche. Dann werden 15 mA angelegt, bis die Proben in das Trenngel gelangt sind. Sobald sie im Trenngel sind, erfolgt die Elektrophorese bei 25 mA, bis die Lauffront das Ende des Trenngels erreicht.

Als Molekulargewichtsmarker wird bei 8 %igen und 10 %igen PAA-Gelen Prestained Molecular Weight Standard Blue Mixture verwendet, bei 15 %igen PAA-Gelen wird die Bench Mark Prestained Protein Ladder eingesetzt.

2.13.5 Western-Blot

2.13.5.1 Proteintransfer nach Towbin et al. (1979)

Um die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine biochemisch nachweisen zu können, werden sie auf eine PVDF- (**P**olyvinylid**e**nfluorid) Membran transferiert.

Dazu wird das PAA-Gel auf eine in Methanol getränkte und anschließend mit A.bidest. gewaschene PVDF-Membran gelegt. Oberhalb des Gels und unterhalb der Membran werden je drei Filterpapiere gelegt. Das Ganze wird in Transferpuffer getränkt und luftblasenfrei auf eine Trans-Blot-Apparatur gelegt. Durch Anlegen eines konstanten Stroms von 150 mA pro Gel für 60 min werden die Proteine elektrophoretisch auf die PVDF-Membran transferiert.

Zum Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen wird die Membran in eine Blocklösung (5 % Milchpulver in PBS/Tween20) bei 4° C über Nacht gelegt. Am nächsten Tag wird die

Membran bei RT dreimal für je 5 min gewaschen und anschließend für 1,5 Stunden mit dem Primärantikörper inkubiert, der an das zugehörige Antigen bindet. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit PBS/Tween20, um unspezifisch gebundene Immunglobuline zu entfernen, folgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei RT für 45 min, der spezifisch an den primären Antikörper bindet und kovalent mit einem Meerrettich-Peroxidase-Molekül verbunden ist. Diese Methode ist sehr empfindlich, da der Primärantikörper selbst von mehreren Molekülen des Sekundärantikörpers erkannt wird. Nach weiteren drei fünfminütigen Waschschrinen mit PBS/Tween20 wird das Antigen detektiert.

2.13.5.2 Enhanced Chemilumineszenz Detektionssystem

In diesem Schritt wird die Detektion des Antigens auf der PVDF-Membran initiiert.

Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidaseaktivität erzeugt durch Umsetzung eines speziellen Substrats Chemolumineszenz, die mit einem lichtempfindlichen Röntgenfilm detektiert werden kann. Die Intensität der Schwärzung des Films korreliert mit der Konzentration des Proteins.

Es werden je 2,5 ml ECL-Lösung 1 und 2 auf die Membran gegeben und 1 min inkubiert. Anschließend wird die in Klarsichtfolie verpackte Membran zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Autoradiographie-Kassette gelegt. Die Expositionsdauer richtet sich nach der Intensität der Chemolumineszenz. Der Film wird anschließend für 1,5 min entwickelt, kurz gewässert, um ein Verschleppen der Entwicklungslösung in den Fixierer zu vermeiden, für 3 min fixiert und anschließend für mindestens 10 min gewässert. Die Röntgenfilme werden zur Dokumentation mit einer CCD-Kamera aufgenommen und gegebenenfalls mit Hilfe der MCID-Software (Imaging Research) densitometrisch ausgewertet.

2.14 Aufreinigung des anti-GLUT4 Antikörpers an Protein A Sepharose

Die Aufreinigung der anti-GLUT4 IgGs aus dem Serum eines Kaninchens erfolgt mittels Bindung an eine Protein A Sepharose Säule.

Dabei wird als erstes ein Ultrafiltrationsröhrchen für die Aufkonzentrierung des Antikörpers zweimal mit 2 ml Laufpuffer für 30 min in der Beckmann Kühlzentrifuge im Rotor JA10 bei 4900 x g zentrifugiert, um das Natriumazid, das zur Aufbewahrung des Röhrchens im Kühlraum benötigt wird, zu entfernen. Zum Absättigen der Ultrafiltrationsröhrchenmembran wird diese mit 2 ml Laufpuffer/BSA (1 %) ebenfalls im Rotor JA10 für 30 min bei 4900 x g zentrifugiert und anschließend mit Laufpuffer zweimal gewaschen, um das ungebundene BSA zu entfernen. Parallel dazu werden 500 µl anti-GLUT4 Serum in der Sigma-Zentrifuge für 10 min bei 13600 x g, 4° C zentrifugiert; der Überstand wird mit Laufpuffer auf 2 ml aufgefüllt. Diese 2 ml werden in dem zuvor vorbereiteten Ultrafiltrationsröhrchen im Rotor JA10 für 30 min bei 4900 x g auf 150 µl eingengt, mit Laufpuffer erneut auf 2 ml aufgefüllt und erneut in der Zentrifuge eingengt, damit der Antikörper mit Hilfe des Phosphatpuffers auf pH 8 umgepuffert wird. Die konzentrierte Antikörperlösung wird in ein Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit dem Laufpuffer auf 500 µl aufgefüllt. In der Zwischenzeit wird die Protein A Sepharose Säule, die eine Bindungskapazität von 10 mg/ml und ein Säulenvolumen von 2 ml hat, mit Laufpuffer bei 30 ml/h für 1,5 Stunden bei 4° C gewaschen. Anschließend sinkt der Überstand langsam in die Säule und diese wird daraufhin sofort mit 500 µl der umgepufferten Antikörperlösung überschichtet. Dabei sollte das Säulenmaterial nicht aufwirbeln. Nachdem die Antikörperlösung langsam in die Säule eingesunken ist, wird diese mit Laufpuffer überschichtet und bei 10 ml/h für 2 Stunden bei 4° C laufen gelassen. Danach wird die Säule mit Elutionspuffer bei 15 ml/h eluiert. 15 Fraktionen zu je 1 ml werden gesammelt. Da der aufgereinigte Antikörper bei dem sauren pH-Wert instabil ist, werden die einzelnen Fraktionen schnell auf pH 7,4 mit 100 µl Tris (1M, pH 10,6) eingestellt. Der Proteingehalt wird nach Bradford bestimmt. Der so aufgereinigte Antikörper wird aliquotiert und bei -80° C eingefroren.

Um die Protein A Sepharose Säule erneut für eine Antikörperaufreinigung benutzen zu können, wird sie bei 30 ml/h mit Methanol (50 %) für 1 Stunde bei 4° C regeneriert. Anschließend wird die Säule für 1 Stunde mit Laufpuffer, in dem 0,02 % Natriumazid enthalten ist, beschickt und unter diesem Puffer bei 4° C aufbewahrt.

2.15 Immunadsorption

Die Kolokalisation von Proteinen in GSVs wird mittels Immunadsorption analysiert. Hierbei werden GSVs spezifisch mit an magnetische Beads (Kügelchen) gebundenen anti-GLUT4 Antikörpern aus einer Vesikelfraktion herausgebunden.

Alle im folgenden genannten Vorgänge werden bei 18° C durchgeführt.

Die magnetischen Beads, an die bereits ein sekundärer anti-Kaninchen Antikörper kovalent gebunden ist, werden durch sanfte Schüttelbewegungen des Vorratsgefäßes gleichmäßig resuspendiert und 2 ml der Suspension werden in ein Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wird nach Inkubation des Gefäßes auf einem Standmagneten nach 5 min entfernt und die magnetischen Beads, die an der Wandung des Reaktionsgefäßes nahe des Standmagneten haften, mit 1 ml Blocklösung versetzt und für 30 min auf dem Probenmischer unter langsamer rotierender Bewegung inkubiert. Nach diesem Absättigen unspezifischer Bindungsstellen schließen sich zwei Waschschritte für je 10 min mit 1 ml PBS/Glycin/Lysin (1 %) an, um nicht gebundenes Saponin zu entfernen. Dafür werden die magnetischen Beads vorsichtig in 1 ml Waschlösung resuspendiert, für 10 min auf dem Probenmischer unter rotierender Bewegung inkubiert und anschließend für 5 min auf den Standmagneten gestellt, um die Waschlösung entfernen zu können. Ein weiteres Mal wird mit PBS auf die gleiche Art und Weise gewaschen. Dann werden 30 µg polyklonaler anti-GLUT4 Antikörper, der über eine Protein A Sepharose Säule aufgereinigt worden ist (siehe Kap. 2.14), in 200 µl PBS aufgenommen, auf die magnetischen Beads gegeben und für 1 Stunde auf dem Probenmischer inkubiert. Anschließend wird der Überstand nach 5 minütiger Inkubation auf dem Standmagneten abgenommen und die magnetischen Beads dreimal in 1 ml PBS für je 10 min gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die magnetischen Beads werden in 1 ml PBS vorsichtig resuspendiert und mit 1 µl bzw. 2 µl Glutaraldehyd (rein) versetzt und genau 5 min bzw. 7,5 min auf dem Probenmischer inkubiert. Glutaraldehyd stabilisiert durch Quervernetzung die Bindung des anti-GLUT4 Antikörpers an den Sekundärantikörper. Die Reaktion wird durch Zugabe von 500 µl PBS/Glycin/Lysin (1 %) gestoppt und das Glutaraldehyd neutralisiert. Anschließend werden die magnetischen Beads zweimal für je 10 min mit PBS/Glycin/Lysin (1 %) auf dem Probenmischer gewaschen. Bei 4° C werden sie über Nacht in PBS/Glycin/Lysin (1 %) aufbewahrt. Parallel zu der Vorbereitung der magnetischen Beads findet eine Vesikelpräparation mittels subzellulärer Fraktionierung von Rat1-W575/GLUT4myc-Zellen statt (siehe Kap. 2.11.1). Aus zwei Gradienten werden die

Fractionen, die einen Großteil der GSVs enthalten, vereinigt und gemischt. Der Proteingehalt wird mittels Proteinbestimmung nach Peterson (siehe Kap. 2.13.2) bestimmt.

Am nächsten Tag werden die Beads in zwei gleiche Ansätze geteilt, mit jeweils 80 µg Vesikelprotein gemischt, mit PBS auf 1 ml aufgefüllt und für 2 Stunden bei 18-20° C auf dem Probenmischer inkubiert. Hierbei binden GSVs über die anti-GLUT4 Antikörper an die magnetischen Beads. Danach werden die Reaktionsgefäße auf Standmagnete gestellt, der Überstand nach 5 min abgezogen und aufbewahrt. In ihm befindet sich ein Großteil der Vesikel, die kein GLUT4 enthalten. Die beiden identischen Ansätze werden nun, nach dem Abnehmen des Überstands, für die folgenden Schritte wieder vereinigt. Es schließen sich drei Waschschritte für je 10 min mit PBS auf dem Probenmischer an. Der Überstand des ersten Waschschritts wird zur späteren Analyse aufbewahrt.

Die magnetischen Beads werden in 50 µl PBS/NP40 (1 %) bzw. 50 µl Probenpuffer (1fach) aufgenommen und die gebundenen Membrankompartimente für 30 min bzw. 5 min auf Eis solubilisiert. Nach der anschließenden Inkubation für 5 min auf dem Standmagneten wird das Eluat abgenommen. Die magnetischen Beads werden mit 50 µl PBS/NP40 (1 %) bzw. 50 µl Probenpuffer (1fach) für 5 min nacheluiert und beide Eluate vereinigt (NP40) bzw. aufbewahrt (Probenpuffer).

Parallel dazu werden 2 ml der Vesikelfraktion vom Gradienten (Elternfraktion), 2 ml des Überstands mit den Kompartimenten, die kein GLUT4 enthalten und 2 ml des ersten Waschschritts bei je 177000 x g, 4° C für 1 Stunde im Rotor 60Ti in der Kontron-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Pellets werden in je 100 µl PBS oder 50 µl Probenpuffer (1fach) resuspendiert. Je 30 µl der Elternfraktion, des Eluats, des Überstands und des ersten Waschschritts werden unter nicht-reduzierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Western-Blot analysiert.

Für die Analyse der Verteilung von proHB-EGF spaltender Enzymaktivität werden die in 100 µl PBS aufgenommene Elternfraktion, das Eluat und der Überstand mit je 10 µl NP40 (10 %) versetzt, gemischt und auf Eis für 30 min solubilisiert. Parallel dazu werden VSVG-proHB-EGF-enthaltende Membrankompartimente (siehe Kap. 2.11.5) ebenfalls mit NP40 (Endkonzentration 1 %) versetzt und für 30 min auf Eis solubilisiert. Jeweils 10 µl VSVG-proHB-EGF werden zu 10 µl Elternfraktion bzw. Eluat bzw. Überstand gegeben und für 45 min bei 37° C inkubiert. Als Kontrolle werden 10 µl solubiliertes VSVG-proHB-EGF mit 10 µl PBS bei 37° C für 45 min inkubiert. Die Proben werden anschließend reduzierend behandelt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und der Abbau von VSVG-proHB-EGF im Western-Blot analysiert.

2.16 Zelloberflächen-Analyse

Stimulationsabhängige Veränderungen der Menge bestimmter Proteine auf der Plasmamembran werden mit Hilfe einer Zelloberflächen-Analyse untersucht.

Eine 24 Vertiefungen umfassende Zellkulturplatte wird mit Poly-L-Lysin beschichtet, um die Haftung der adhärent wachsenden Zellen für die zahlreichen im folgenden beschriebenen Waschschritte zu optimieren. Dazu wird Poly-L-Lysin-Hydrobromid (0,1 %) für 15 min bei RT in jede Vertiefung der Platte gegeben. Anschließend werden die Platten mit sterilem A.bidest. gewaschen und über Nacht unter der Sterilwerkbank trocknen gelassen. Am nächsten Morgen folgt ein weiterer Waschschritt. Dann werden $2,5 \times 10^5$ Rat1-Zellen (Rat1-W575/GLUT4myc-zeo/GFP-Klon38-Zellen) in 500 μ l inaktiviertem Medium in jede Vertiefung gegeben und für einen Tag im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wird das Medium von den Zellen entfernt; diese werden mit 37° C warmen PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1 mM) gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen. Ein Teil der Zellen wird für 30 min mit Saccharose (0,45 M) im inaktivierten Wachstumsmedium (bzw. 10 min mit Thrombin (1 u/ml) in BSA (1 %)-DMEM-Medium) stimuliert. Die Kontrollen werden nur mit inaktiviertem Medium für 30 min (bzw. BSA (1 %)-DMEM-Medium für 10 min) im Brutschrank behandelt. Die Stimulation wird durch vorsichtiges aber zügiges Waschen mit 500 μ l eiskaltem PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1 mM) beendet.

Alle weiteren Schritte erfolgen auf dem Schüttler bei 45 Schüttelzyklen/min. In 400 μ l PBS/Paraformaldehyd (4 %) werden die Zellen für 10 min bei 4° C auf Eis und für weitere 10 min bei 37° C fixiert. Dadurch werden sämtliche Membrantransportprozesse gestoppt und die Plasmamembranproteine auf der Zelloberfläche fixiert. Anschließend werden die Zellen bei RT für 1 min in 500 μ l PBS/Glycin (25 mM) mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1 mM) inkubiert, um überschüssiges Paraformaldehyd umzusetzen. Danach werden die Zellen für 1 min in PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1 mM) gewaschen. Es folgt eine 60igminütige Inkubation der Zellen in jeweils 500 μ l Blocklösung (5 % BSA/PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1 mM)) bei RT. Anschließend wird jede Vertiefung mit PBS/BSA (1 %) mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1 mM) für 1 min gewaschen und je 200 μ l anti-GLUT4 bzw. anti-Transferrinrezeptor Antikörper (1:100) für 60 min bei RT auf die Zellen gegeben. Der Primärantikörper bindet spezifisch an das Antigen, das extrazellulär auf der Plasmamembran sitzt. Nach der Inkubation des Antikörpers wird bei RT dreimal für je 15 min mit PBS/BSA (1%) mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1 mM) gewaschen. Vom sekundären anti-Maus (1:500) Antikörper, an den Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, werden ebenfalls 200 μ l für

eine 60minütige Inkubation eingesetzt. Anschließend wird mit PBS/BSA (1%) mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1 mM) bei RT einmal für 15 min und mit PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1 mM) bei RT dreimal für je 15 min gewaschen.

Es schließt sich eine Farbreaktion an, in deren Verlauf das chromogene Substrat **o-Phenylendiamin** (OPD) von HRP in ein gelblich-braunes Produkt umgesetzt wird. Die Menge des pro Zeiteinheit gebildeten Produkts ist proportional zur Menge des gebundenen Antikörpers. Hierzu wird eine OPD-Tablette (4 mg) in 10 ml Phosphat-Citrat-Puffer (pH 5,0) gelöst und unmittelbar vor der Inkubation 20 μl H_2O_2 (30 %) hinzugefügt. Jeweils 300 μl dieser Reaktionslösung werden für 1 min unter starkem Schütteln bei 220 Schüttelzyklen/min in eine Vertiefung gegeben. Die Reaktion wird mit 50 μl HCl (3 N) abgestoppt. Danach werden 250 μl des Reaktionsprodukts aus jeder Vertiefung genommen, mit 350 μl A.bidest. im Reaktionsgefäß verdünnt und die Absorption im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Transfektion von Rat1-Zellen

3.1.1 Klonierung des Vektors

Um GSVs eindeutig identifizieren zu können, werden Rat1-Zellen über Elektroporation stabil mit GLUT4 als heterologem Marker für das spezifische Speicherkompartiment transfiziert, wie in Kapitel 2.10.4 beschrieben.

Die verwendete Rat1-Zelllinie exprimiert bereits den humanen Thrombinrezeptor (hPAR1) stabil und verfügt über eine Geneticin- (G418-) Resistenz als Selektionsmarker (Bezeichnung dieser transfizierten Zellen: Rat1-W575-Zellen). Es sind zuvor schon einmal diese Rat1-W575-Zellen mit einem GLUT4-Konstrukt stabil transfiziert worden (Fohrer, Diplomarbeit, 2001). Der damals benutzte pcDNA3-Expressionsvektor beinhaltet die cDNA für GLUT4 aus der Ratte. Da pcDNA3 jedoch auch eine G418-Resistenz vermittelt, war die Selektion der positiven Klone über eine Cotransfektion mit dem sogenannten pTracer-Plasmid, das eine Zeozin-Resistenz trägt, ermöglicht worden. Die hierbei gewonnenen Klone zeigten jedoch eine zu geringe GLUT4-Expression, um Experimente wie die Immunadsorption von GSVs (siehe Kap. 2.15 und Kap. 3.3) durchführen zu können. Auch erlaubte der verwendete Vektor keine selektive Detektion von GLUT4 auf der Zelloberfläche (siehe Kap. 2.16, Kap. 3.4.3 und Kap. 3.4.4.2), da es keine Antikörper gegen die extrazellulären Domänen des Glucosetransporters gibt.

Daher ist für die vorliegende Arbeit das Plasmid pcXN2 verwendet worden, das ein GLUT4-Konstrukt mit einem myc-Epitop in der ersten extrazellulären Domäne enthält (Kanai et al., 1993). Dieser pcXN2-GLUT4myc-Vektor beinhaltet jedoch ebenfalls nur eine G418-Resistenz. Da die Rat1-Zellen bereits, wie eingangs erwähnt, bei der Transfektion mit dem humanen Thrombinrezeptor über eine G418-Resistenz selektiert worden waren, wird für eine erneute stabile Transfektion ein anderer Selektionsmarker benötigt. Das pTracer-Plasmid verfügt über die erforderliche Zeozinkassette, die mit einem GFP-Konstrukt gekoppelt ist. Da die Transfektionseffizienz bei Cotransfektionen meist gering ausfällt, ist nicht erneut cotransfiziert worden. Stattdessen wird der Selektionsmarker in den pcXN2-GLUT4myc-Vektor ligiert. Mit den Restriktionsenzymen SspI und FspI wird ein Großteil der Amp/G418-Resistenz mit einer Größe von 1,2 kb aus dem pcXN2-GLUT4myc-Vektor entfernt, während

für das Herausstrennen des vollständigen *zeo*/GFP-Konstrukts mit einer Größe von 2,5 kb aus dem pTracer-Plasmid die Enzyme *Ssp*I und *Eco*32 verwendet werden. Anschließend wird das *zeo*/GFP-Insert an die Stelle der entfernten *Amp*/G418-Resistenz in den pcXN2-GLUT4myc-Vektor ligiert. *E.coli* XL1blue wird mit dem gewonnenen Plasmid pcXN2-GLUT4myc-*zeo*/GFP transformiert und mittels Zeozin selektiert. Aus dem hierbei isolierten Bakterienklon wird die Plasmid-DNA mittels Mini-Präparation nach del Sal et al. (1988) isoliert. Um den korrekten Einbau der Zeozin/GFP-Kassette in den Vektor zu überprüfen, wird ein Verdau der Plasmid-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen durchgeführt. Anschließend werden die DNA-Fragmente in einem 0,7 %igen Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt (Abb. 1).

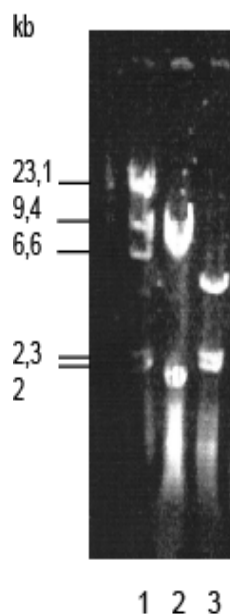


Abb. 1 Gelelektrophoretische Analyse des pcXN2-GLUT4myc-*zeo*/GFP-Vektors nach dem Schneiden mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Sall*. Die Auftrennung der Fragmente erfolgt über ein 0,7 %iges Agarosegel. In der ersten Tasche (1) ist der Größenstandard enthalten. In der Mitte (2) folgt die DNA, die mit dem Enzym *Eco*RI geschnitten worden ist und in der dritten Tasche (3) ist die durch das Restriktionsenzym *Sall* geschnittene DNA aufgetragen.

Der pcXN2-GLUT4myc-Vektor hatte eine Gesamtgröße von 9,4 kb. Da die *Amp*/G418-Resistenz, die eine Größe von etwa 1,2 kb hat, entfernt worden und durch das *zeo*/GFP-Konstrukt, das eine Größe von 2,5 kb aufweist, ersetzt worden ist, beträgt die Gesamtgröße des umklonierten pcXN2-GLUT4myc-*zeo*/GFP-Vektors nun etwa 10,7 kb. Wie in Abb. 1 zu sehen, schneidet das Restriktionsenzym *Eco*RI das pcXN2-GLUT4myc-*zeo*/GFP-Plasmid in drei Fragmente von 1,7 kb, 2 kb und 7 kb, während das Enzym *Sall* drei Fragmente von 2,3

kb, 2,5 kb und 5,9 kb erzeugt. Dies stimmt sehr gut mit den berechneten Fragment-Größen überein.

Zur Absicherung dieses Ergebnisses ist die Plasmid-DNA zusätzlich von einem kommerziellen Anbieter sequenziert worden. Die Sequenz stimmt erwartungsgemäß mit der aus der Literatur bekannten Sequenz überein.

3.1.2 Stabile Transfektion von Rat1-Zellen mit GLUT4myc

Die Rat1-W575-Zellen werden mit der beschriebenen Plasmid-DNA mittels Elektroporation transfiziert und anschließend über die Zeozin-Resistenz selektiert. Die hierbei erhaltenen Klone werden auf ihre GLUT4-Expression hin untersucht.

Der Nachweis der stabilen Expression von GLUT4myc erfolgt über eine immunbiochemische Analyse der Einzelklone. Zu diesem Zweck werden die Zellen zunächst mit 1 % NP40 solubilisiert. Die Proteine des gesamten Zellsolubisates werden dann gelelektrophoretisch in einem 10 %igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Der Nachweis von GLUT4 erfolgt im Western-Blot. GLUT4 wird über einen polyklonalen Primärantikörper und einen Peroxidasegekoppelten anti-Kaninchen Sekundärantikörper detektiert. Abb. 2 zeigt die entsprechende Analyse auf stabile GLUT4-Expression bei verschiedenen positiven und negativen Klonen mit je einer Positiv- und Negativkontrolle für GLUT4.

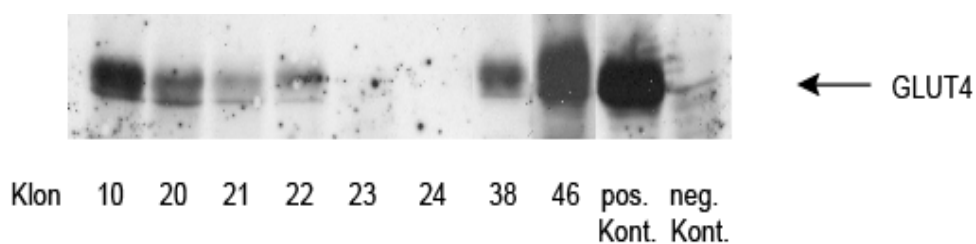


Abb. 2 Western-Blot Analyse des gesamten Zellsolubisates aus mit GLUT4myc transfizierten Rat1-W575-Zellen. Dargestellt ist der immunbiochemische Nachweis von GLUT4myc im Western-Blot bei sechs positiven und zwei negativen (23, 24) Klonen. Die beiden Taschen am rechten Rand enthalten jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle. Als Positivkontrolle werden mit GLUT4 stabil transfizierte CHO/GLUT4-Zellen eingesetzt, als Negativkontrolle dienen untransfizierte Rat1-W575-Zellen.

GLUT4 läuft typischerweise als breite Bande im Bereich von M_r ca. 45-55 kDa. In diesem apparenten Molekulargewichtsbereich ist eine kräftige Bande bei CHO/GLUT4-Zellen zu sehen; bei untransfizierten Rat1-W575-Zellen ist keine Bande im Bereich von GLUT4 zu erkennen.

Von den insgesamt 48 analysierten Klonen weisen Rat1-W575/GLUT4myc-zeo/GFP/Klon10, Klon20, Klon21, Klon22, Klon38 und Klon46 ebenfalls jeweils eine Bande von M_r ca. 50 kDa auf.

Die erwähnten sechs Klone werden auch auf ihre myc-Immunreaktivität hin untersucht. Wie zu erwarten, sind alle sechs Klone positiv.

3.2 Subzelluläre Verteilung vesikelassoziierter Proteine in Rat1/GLUT4myc-Zellen

3.2.1 Analyse der intrazellulären Lokalisation von GLUT4 mittels subzellulärer Fraktionierung

Die Assoziation des Glucosetransporters mit kleinen, intrazellulären Speichervesikeln, wie für Fett- und Muskelzellen (Slot et al., 1991; Rodnick et al., 1992) sowie CHO-Zellen (Herman et al., 1994; Wei et al., 1998) beschrieben, soll durch Zellfraktionierung verifiziert werden.

Alle im folgenden beschriebenen Versuche werden mit dem GLUT4myc-exprimierenden Klon38 der Rat1-W575/GLUT4myc-zeo/GFP-Zellen durchgeführt (vergl. Abb. 2). Der Einfachheit halber werden diese Zellen von nun an als Rat1/GLUT4myc-Zellen bezeichnet.

Diese Rat1/GLUT4myc-Zellen werden mit Hilfe eines Glycerin-Sedimentationsgeschwindigkeitsgradienten (5-25 % Glycerin) subzellulär fraktioniert, wie in Kap. 2.11.1 beschrieben. Unter den verwendeten Bedingungen sedimentieren GSVs etwa in der Mitte des Gradienten.

Die Gradientenfraktionen werden unter nicht-reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE auf einem 10 %igen Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Mittels Western-Blot wird die GLUT4-Verteilung analysiert. Die Auswertung des Bandenmusters erfolgt densitometrisch. Dabei wird die Intensität der einzelnen Banden als prozentualer Anteil an der gesamten über den Gradienten aufsummierten Immunreaktivität dargestellt.

Abbildung 3 zeigt exemplarisch für einen von 19 Versuchen die bimodale Verteilung des Glucosetransporters in Rat1/GLUT4myc-Zellen. Ein erster Gipfel befindet sich auf dem Boden des Gradienten (Fraktion 1-3) im Bereich großer Membrankompartimente wie Endosomen und Plasmamembranbruchstücken. Ein zweites Maximum ist im Bereich kleiner Vesikel (Fraktion 8-13) zu erkennen. Dieser zweite Gipfel markiert die Lokalisation der GSVs im Gradienten.

Es zeigt sich, dass auch Rat1/GLUT4myc-Zellen GSVs aufweisen, wie unter anderem für Fett- und Muskelzellen sowie CHO-Zellen beschrieben.

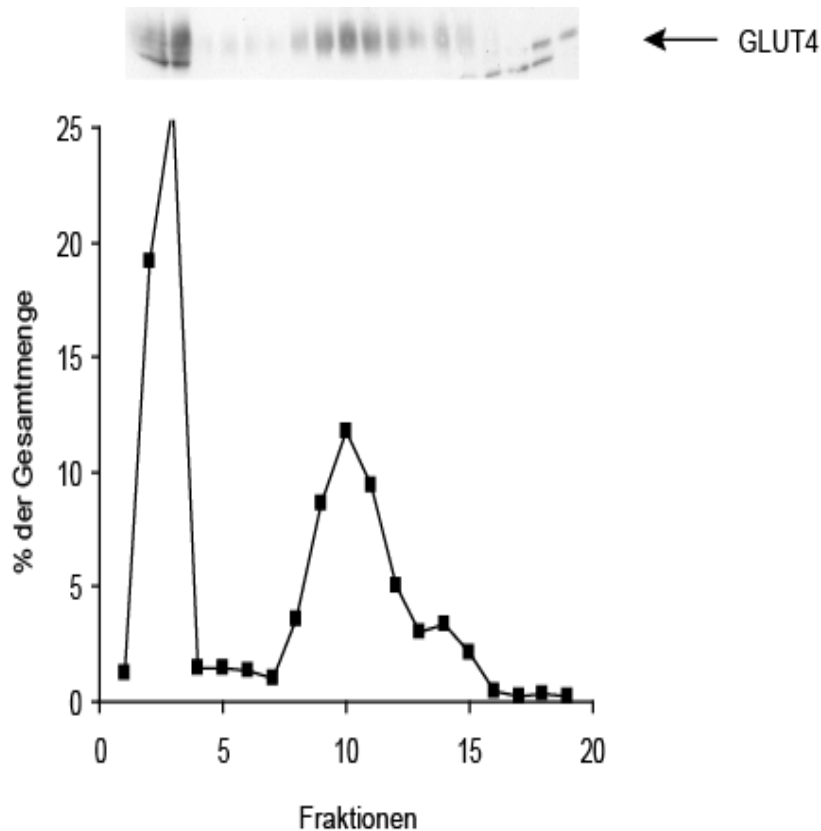


Abb. 3 Verteilung von GLUT4 nach subzellulärer Fraktionierung von Rat1/GLUT4myc-Zellen. Ein vorgereinigtes Homogenat aus Rat1/GLUT4myc-Zellen wird über einen Glyceringradienten (5-25 %) aufgetrennt. Die Verteilung des Markers GLUT4 wird mittels SDS-PAGE / Western-Blot analysiert. Dargestellt ist der in den einzelnen Fraktionen jeweils enthaltene prozentuale Anteil der GLUT4-Immunreaktivität an der im Gradienten enthaltenen Gesamtmenge eines exemplarischen Versuchs. Die GLUT4-Werte basieren auf einer densitometrischen Auswertung der entsprechenden Western-Blot Daten. Die Originaldaten sind oberhalb des Graphen abgebildet. Bei den Banden in Fraktion 16-19 handelt es sich um Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen.

Die Gradientenfraktionen sind vom Boden (Fraktion 1) nach oben (Fraktion 19) aufgetragen.

Außerhalb des Darstellungsbereichs:

GLUT4 Fraktion 3: 26 %

3.2.2 Nachweis einer VSVG-proHB-EGF spaltenden vesikulären Enzymaktivität

Da die Rat1-Zellen unter physiologischen Bedingungen kein GLUT4 exprimieren, stellt sich die Frage nach den endogenen Membranproteinen sowie der Funktion der GSVs in diesen Zellen. Verschiedene Befunde weisen auf eine mögliche Assoziation einer endogenen proHB-EGF spaltenden Enzymaktivität mit GSVs hin, über die die Aktivität der Protease(n) auf der Plasmamembran reguliert werden könnte (siehe Kap. 1.2.3). Daher soll im nächsten Schritt die Colokalisation mit GLUT4 untersucht werden.

Da die proHB-EGF hydrolysierende Enzymaktivität zunächst nur über ihr physiologisches Substrat identifiziert werden konnte, ist dieses Membranprotein in CHO-Zellen exprimiert und aus diesen isoliert worden. Zu diesem Zweck sind CHO/GLUT4-Zellen mit der entsprechenden cDNA transient transfiziert worden. Die cDNA kodiert für ein proHB-EGF-Konstrukt, das ein VSVG-Epitop am cytoplasmatischen C-Terminus trägt. Die nach subzellulärer Fraktionierung mittels Dichtegradientenzentrifugation bei einer Dichte von 38-40 % Saccharose sedimentierenden VSVG-proHB-EGF enthaltenden Membrankompartimente werden mit NP40 solubilisiert, um das proHB-EGF-Konstrukt optimal zugänglich für eine hydrolytische Spaltung zu machen. Parallel dazu werden GSVs aus Rat1/GLUT4-Zellen mittels Sedimentationsgeschwindigkeitsgradientenzentrifugation isoliert, wie in Kap. 2.11.1 beschrieben. Die Gradientenfraktionen, die den GLUT4 Gipfel im Bereich der GSVs umfassen, werden zusammengegeben. Nach der Solubilisierung der Vesikelmembranen mit NP40 zur Freisetzung der lumenal orientierten Enzymaktivität werden die GSV Fraktionen mit den VSVG-proHB-EGF Fraktionen für 45 min bei 37° C inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE auf einem 15 %igen Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Das enthaltene VSVG-proHB-EGF kann mit Hilfe eines monoklonalen anti-VSVG Antikörpers detektiert werden.

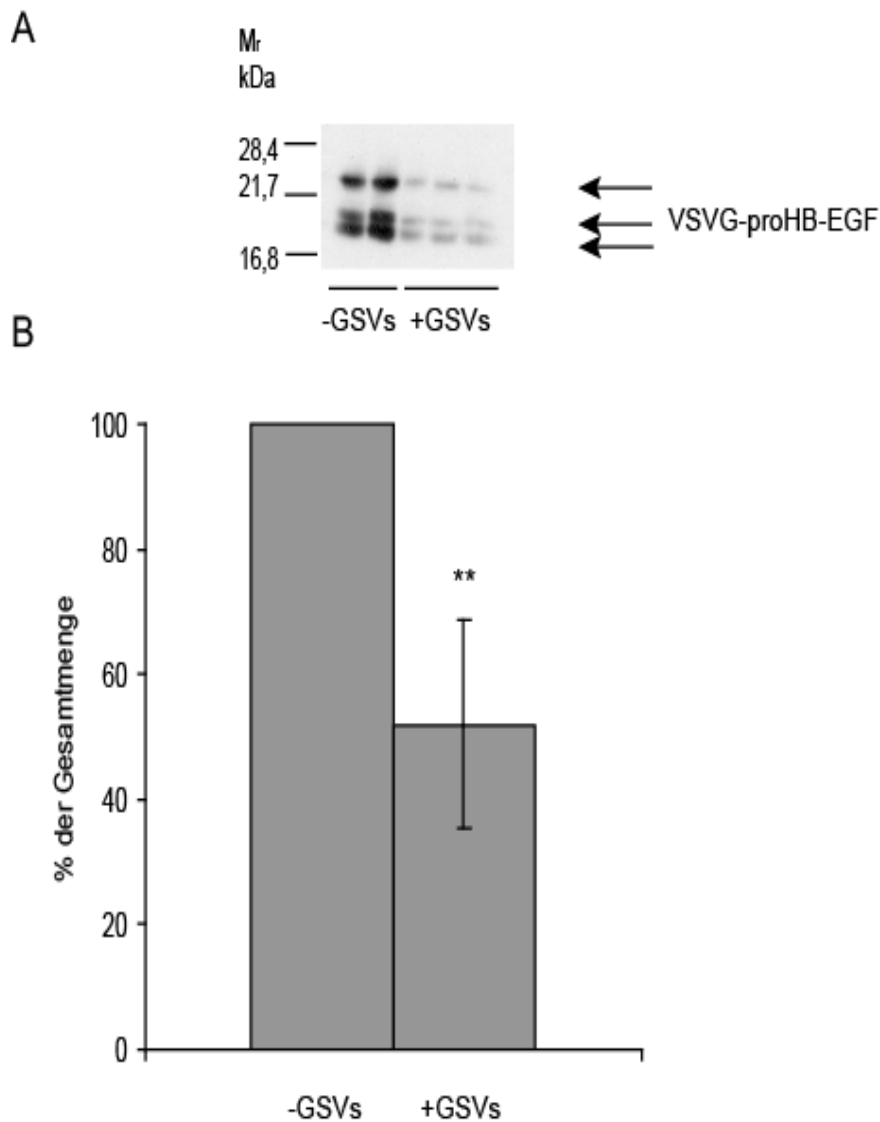


Abb. 4 Enzymatischer Abbau von VSVG-proHB-EGF durch eine vesikelassoziierte proteolytische Aktivität. Membrangebundenes VSVG-proHB-EGF wird aus transfizierten CHO/GLUT4-Zellen über einen kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten (30-60 %) isoliert. Die in den Gradientenfraktionen mit einer Dichte von 38-40 % Saccharose enthaltenen Membranproteine werden mit NP40 solubilisiert. Es folgt eine Inkubation mit ebenfalls solubilisierten, aus Rat1/GLUT4myc-Zellen aufgereinigten Vesikeln aus dem GSV-Bereich des Glyceringradienten für 45 min bei 37° C (+GSVs). -GSVs sind Kontrollen, bei denen die VSVG-proHB-EGF enthaltenden Membranen ohne Zugabe von GSVs unter gleichen Bedingungen in PBS inkubiert werden. A) Dargestellt ist die SDS-PAGE / Western-Blot Analyse der verschiedenen Ansätze eines exemplarischen Versuchs mit Hilfe eines anti-VSVG Antikörpers. B) Gezeigt ist die quantitative Analyse der Intensität der untersten Bande des VSVG-proHB-EGF mittels Densitometrie (n=9; t-Test; ** p < 0,01). Alle Inkubationen sind im doppelten bzw. dreifachen Ansatz durchgeführt worden.

In Abbildung 4A ist der enzymatische Abbau von VSVG-proHB-EGF durch vesikel-assoziierte Proteaseaktivität aus Rat1/GLUT4myc-Zellen in einem exemplarischen Experiment dargestellt. In Übereinstimmung mit den Befunden anderer Autoren wird VSVG-proHB-EGF in mehrere Banden mit einem apparenten Molekulargewicht zwischen ca. 17 und 30 kDa aufgetrennt (Goishi et al., 1995; Prenzel et al., 1999). Es zeigt sich gegenüber der Kontrolle eine deutlich verminderte Intensität aller drei VSVG-proHB-EGF Banden. Da die Hydrolyse der untersten VSVG-proHB-EGF Bande am besten reproduzierbar war, wurde für eine quantitative Analyse stellvertretend nur noch die Intensität dieser Bande analysiert. Abb. 4B zeigt, dass die Inkubation mit GSVs im Mittel zu einem Abbau von etwa $52 \% \pm 16,6 \%$ des proHB-EGF führt (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=9$). Dieser Befund ist statistisch signifikant (einseitiger t-Test für paarige Stichproben; $** p < 0,01$) und deutet darauf hin, dass tatsächlich eine proHB-EGF hydrolysierende Enzymaktivität mit Vesikeln von der Größe der GSVs assoziiert ist.

3.2.3 Verteilung der Proteasen ADAM10 und TACE

Im nächsten Schritt soll versucht werden, spezifische Proteasen zu identifizieren, die für die vesikelassoziierte proHB-EGF hydrolysierende Aktivität verantwortlich sein könnten. Hierfür kommen prinzipiell mehrere Kandidaten in Frage (siehe Kap. 1.2.2), von denen zwei - ADAM10 und TACE - näher untersucht werden. Zunächst wird ihre mögliche Cosedimentation mit GLUT4 und der VSVG-proHB-EGF spaltenden Enzymaktivität im Glyceringradienten bestimmt. Hierzu sind Rat1/GLUT4myc-Zellen wiederum, wie oben beschrieben, subzellulär fraktioniert worden. Die einzelnen Fraktionen werden anschließend einer SDS-PAGE / Western-Blot Analyse unter nicht-reduzierenden Bedingungen unterzogen. Das von den Zellen endogen exprimierte ADAM10 wird mit Hilfe eines polyklonalen anti-ADAM10 Antikörpers detektiert. Die entsprechende Bande läuft typischerweise um 60 kDa. Das ebenfalls von den Zellen endogen exprimierte TACE wird mittels eines polyklonalen anti-TACE Antikörpers detektiert. TACE läuft bei der SDS-PAGE mit einem apparenten Molekulargewicht von 85 kDa. Die GLUT4-Verteilung wird mittels eines anti-GLUT4 Antikörpers sichtbar gemacht.

In Abbildung 5 ist exemplarisch für einen von fünf Versuchen die Verteilung der drei Proteine dargestellt. Im Vesikelbereich zwischen Fraktion 8 und 11 liegt ein Maximum der ADAM10-Verteilung. Auch im Bodenbereich zwischen Fraktion 2 und 3 zeigt sich ein ADAM10-Gipfel. Das Maximum der TACE-Verteilung im Vesikelbereich liegt zwischen Fraktion 8 und 10. Der TACE-Gipfel im Bodenbereich zwischen Fraktion 2 und 3 stimmt mit dem von ADAM10 überein. Das bimodale Verteilungsmuster ähnelt der beschriebenen Lokalisation von GLUT4 im Gradienten (vergl. Abb.3). Beim direkten Vergleich zeigt sich, dass der GSV-Gipfel mit dem vesikulären ADAM10-Gipfel übereinstimmt, während die vesikuläre TACE einen etwas breiteren Gipfel mit einem zusätzlichen Anteil im Bereich größerer Kompartimente aufweist (Abb. 5). Das zeigt, dass sowohl ADAM10 als auch TACE zumindest teilweise mit Vesikeln der Größe von GSVs assoziiert sind.

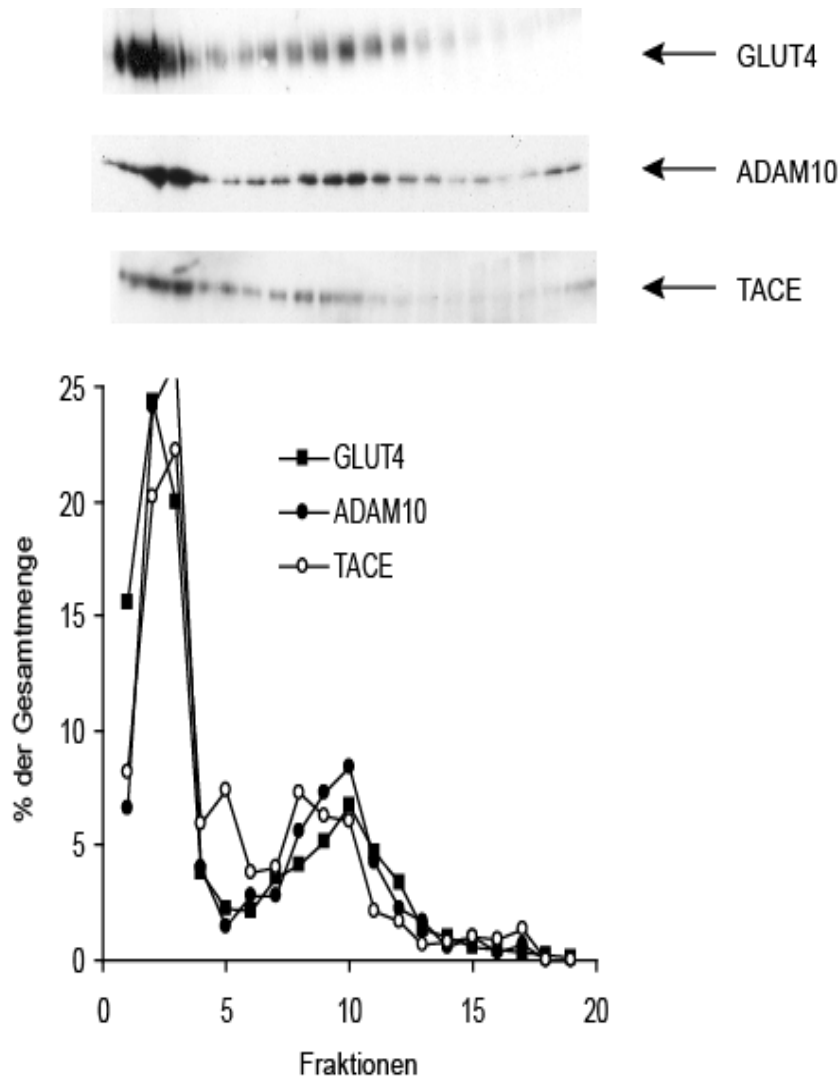


Abb. 5 Verteilung von GLUT4, ADAM10 und TACE nach subzellulärer Fraktionierung von Rat1/GLUT4myc-Zellen. Die Zellen werden mit Hilfe einer Sedimentationsgeschwindigkeitsgradientenzentrifugation fraktioniert, wie in Abb. 3 beschrieben. Die Verteilung der drei Proteine in einem exemplarischen Versuch wird mittels SDS-PAGE / Western-Blot analysiert und densitometrisch ausgewertet. Dargestellt ist der in den einzelnen Fraktionen enthaltene prozentuale Anteil der GLUT4-, ADAM10- und TACE-Immunreaktivität an den im Gradienten jeweils enthaltenen Gesamtmengen. Im löslichen Bereich des Gradienten ist sowohl bei ADAM10 als auch bei TACE eine Bande zu sehen, die nicht reproduzierbar zu detektieren ist. Da die beiden Proteasen nicht in löslicher Form vorkommen, muss es sich hierbei um eine Kreuzreaktivität handeln. Daher sind die entsprechenden Immunreaktivitäten bei der densitometrischen Auswertung nicht berücksichtigt worden. Das Bandenmuster oberhalb der densitometrischen Auswertung zeigt die Verteilung der GLUT4-, ADAM10- und TACE-Immunreaktivität im korrespondierenden Western-Blot.

Die Gradientenfraktionen sind vom Boden (Fraktion 1) nach oben (Fraktion 19) aufgetragen. Außerhalb des Darstellungsbereichs:

ADAM10 Fraktion 3: 25,2 %

3.2.4 Intrazelluläre Lokalisation des Thrombinrezeptors

Da auch für den Thrombinrezeptor eine Akkumulation in einem intrazellulären Speicherkompartiment beschrieben worden ist (Übersichtsartikel: Coughlin, 2000), wird auch die mögliche Assoziation dieses Membranproteins mit GSVs in Rat1/GLUT4myc-Zellen analysiert. Hierzu werden Rat1/GLUT4myc-Zellen mit Hilfe eines Glycerin-Sedimentationsgeschwindigkeitsgradienten (5-25 % Glycerin) subzellulär fraktioniert, wie zuvor beschrieben. Die Gradientenfraktionen werden unter nicht-reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE auf einem 10 %igen Gel aufgetrennt. Im Western-Blot wird der von den Zellen exprimierte hPAR1, der ein FLAG-Epitop am extrazellulären N-Terminus trägt, mit Hilfe eines monoklonalen anti-FLAG Antikörpers detektiert. Der Rezeptor läuft typischerweise als breite Bande um 66 kDa. Die GLUT4-Verteilung wird mittels des anti-GLUT4 Antikörpers sichtbar gemacht.

In Abbildung 6 ist exemplarisch für einen von vier Versuchen das entsprechende bimodale Verteilungsmuster des hPAR1 zu sehen. Ein erstes Maximum befindet sich auf dem Boden des Gradienten (Fraktion 1-3) im Bereich großer Membrankompartimente. Ein zweiter Gipfel ist im Vesikelbereich (Fraktion 8-10) zu erkennen. Die zum Vergleich analysierte Verteilung des GSV-Markers GLUT4 zeigt, dass der GSV-Gipfel gegenüber dem vesikulären hPAR1-Gipfel um eine Fraktion nach hinten verschoben ist (Abb. 6). Das deutet darauf hin, dass hPAR1 vor allem mit Vesikeln assoziiert ist, die einen etwas größeren Durchmesser aufweisen als GSVs.

3.2.5 Vergleichende Analyse der Verteilung von TGN-Vesikeln

Alle bisher genannten Membranproteine sind im Rahmen ihrer Biosynthese vorübergehend auch mit Vesikeln des TGN assoziiert. Daher ist die präzise Lokalisation dieses Kompartiments bei der Sedimentationsgeschwindigkeitsgradientenzentrifugation im Vergleich zu GSVs von großer Bedeutung.

Um die Lokalisation zu überprüfen, werden die Zellen subzellulär fraktioniert, wie in Kap. 2.11.1 beschrieben. Die Gradientenfraktionen werden unter nicht-reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE auf einem 8 %igen (TGN38) bzw. 10 %igen (GLUT4) Gel aufgetrennt. Der heterolog exprimierte GSV-Marker GLUT4 wird im Western-Blot nachgewiesen und seine Verteilung densitometrisch ausgewertet. Die Verteilung des TGN-Markers TGN38, der mittels eines monoklonalen anti-TGN38 Antikörpers detektierbar ist, wird nach dem Western-Blot ebenfalls densitometrisch analysiert. TGN38 hat ein apparentes Molekulargewicht zwischen 85-95 kDa.

Abbildung 7 stellt exemplarisch die Verteilung der beiden Markerproteine über den Gradienten in einem von drei Versuchen dar. Im Vesikelbereich ist der GSV-Gipfel (Fraktion 7-10) anhand der GLUT4-Immunreaktivität wiederum gut zu erkennen. TGN38 zeigt dagegen im Vesikelbereich des Gradienten ein deutlich nach rechts verschobenes Maximum zwischen Fraktion 10-13. Dies deutet darauf hin, dass TGN-Vesikel einen kleineren Durchmesser als GSVs aufweisen und daher mit dem hier verwendeten Fraktionierungsprotokoll von diesen abgetrennt werden.

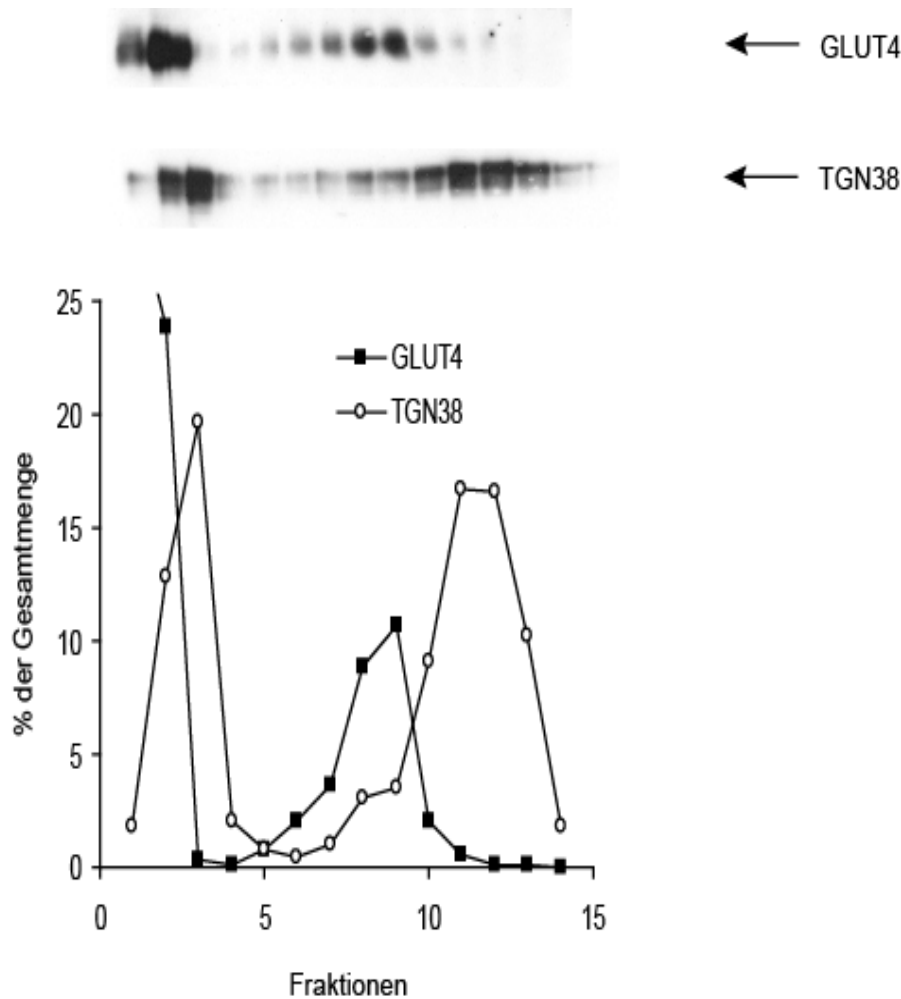


Abb. 7 Subzelluläre Verteilung von GLUT4 und TGN38 in Rat1/GLUT4myc-Zellen. Ein vorgereinigtes Homogenat wird in einem exemplarischen Experiment über einen Glycerin-Sedimentationsgeschwindigkeitsgradienten (5-25 % Glycerin) aufgetrennt. Aliquots der einzelnen Fraktionen werden mittels SDS-PAGE / Western-Blot Analyse auf ihren Gehalt an GLUT4 und TGN38 hin analysiert. Dargestellt sind die relativen Anteile, bezogen auf die jeweiligen Gesamtmengen im Gradienten, der densitometrisch bestimmten GLUT4- bzw. TGN38-Immunreaktivität in den einzelnen Fraktionen. Das Bandenmuster oberhalb der densitometrischen Auswertung zeigt die Verteilung von GLUT4- und TGN38-Immunreaktivität im Western-Blot.

Die Gradientenfraktionen sind vom Boden (Fraktion 1) nach oben (Fraktion 14) aufgetragen. Außerhalb des Darstellungsbereichs:

GLUT4 Fraktion 1: 47 %

3.3 Analyse der Colokalisation verschiedener Membranproteine mit GSVs mittels Immunadsorption

Die dargestellten Untersuchungen zur Cosedimentation verschiedener Markerproteine in Glycerin-Gradienten werden im nächsten Schritt durch eine GSV-Immunadsorption ergänzt. Dieser experimentelle Ansatz dient vor allem zur Klärung der Frage, ob Proteine, die im Gradienten ganz oder teilweise mit GSVs sedimentieren, tatsächlich mit diesen Vesikeln, oder aber mit anderen Membrankompartimenten gleicher Größe assoziiert sind.

3.3.1 Effizienz und Spezifität der GLUT4-Bindung

Die Rat1/GLUT4myc-Zellen werden mit Hilfe eines Glycerin-Sedimentationsgeschwindigkeitsgradienten (5-25 %) subzellulär fraktioniert, wie in Kap. 2.11.1 beschrieben. Anschließend werden die Fraktionen, die einen Großteil der GSVs enthalten, auf die magnetischen Beads gegeben, an die ein anti-GLUT4 Antikörper bzw. Präimmunantikörper gekoppelt worden sind (siehe Kap. 2.15). GSVs binden aufgrund ihres Gehalts an GLUT4 an die mit anti-GLUT4 Antikörpern gekoppelten Beads, während ein Großteil der Vesikel, die kein GLUT4 enthalten, im Überstand verbleibt. Die magnetischen Beads werden nach der Inkubation vom Überstand getrennt und gewaschen. Anschließend werden die an die Beads gebundenen Membrankompartimente mit Hilfe von NP40 (1 %) solubilisiert. Der Überstand wird zum Vergleich entsprechend behandelt.

Die Solubilisate werden unter nicht-reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE auf einem 10 %igen Gel aufgetrennt. Im Western-Blot wird GLUT4 mit Hilfe eines polyklonalen anti-GLUT4 Antikörpers nachgewiesen und anschließend densitometrisch quantifiziert.

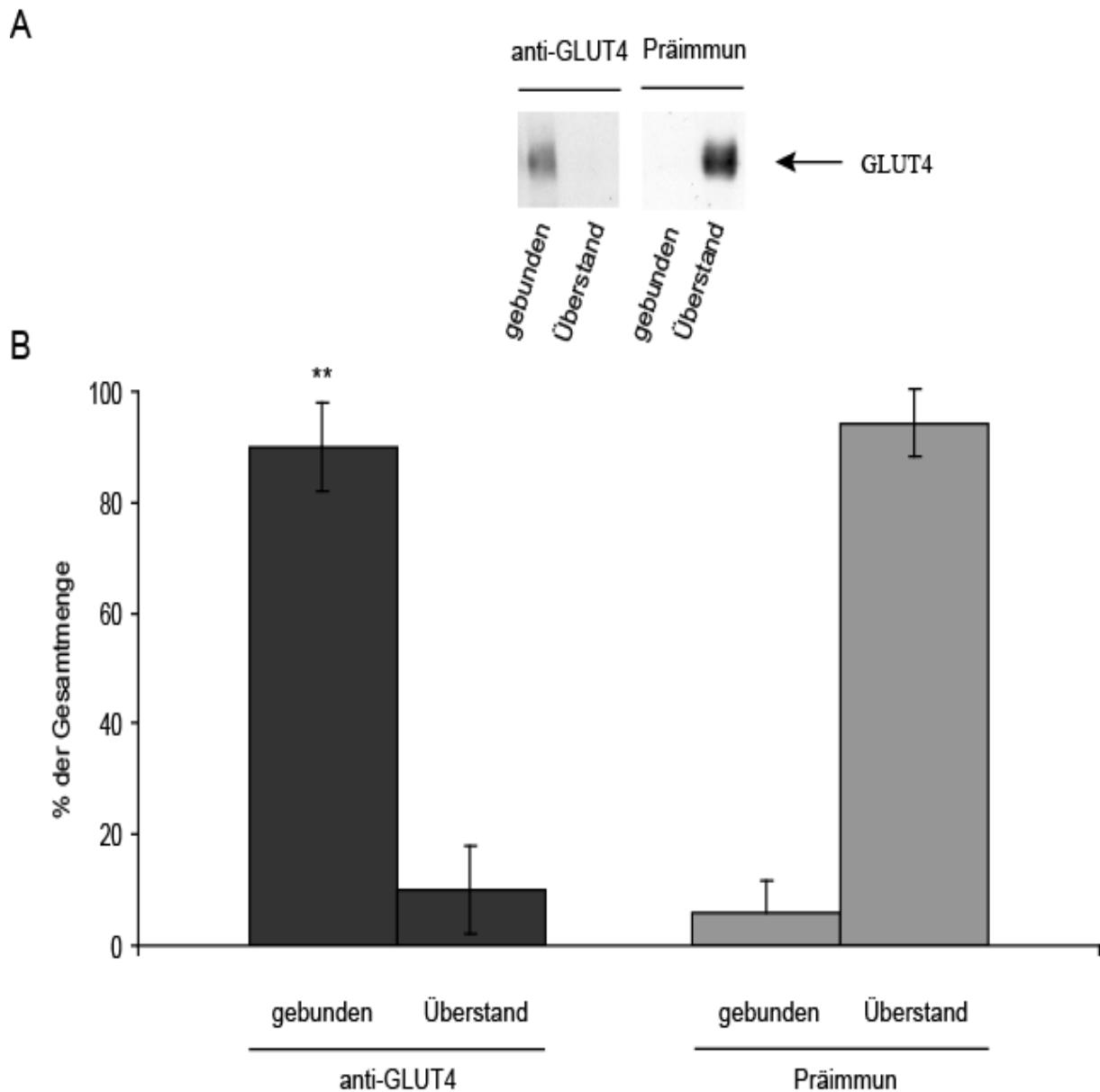


Abb. 8 Immunadsorption von GSVs aus Rat1/GLUT4myc-Zellen. Ein vorgereinigtes Homogenat aus Rat1/GLUT4myc-Zellen wird über einen Glyceringradienten aufgetrennt. Die Fraktionen, die einen Großteil der GSVs enthalten, werden mit magnetischen Beads, an die anti-GLUT4 Antikörper (dunkelgrau) bzw. Präimmunantikörper (hellgrau) gekoppelt worden sind, inkubiert. Die an die magnetischen Beads gebundenen Membrankompartimente sowie die im Überstand enthaltenen Kompartimente werden in PBS/NP40 solubilisiert. Aliquots der einzelnen Fraktionen werden unter nicht-reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE / Western-Blot Analyse auf ihren Gehalt an GLUT4 hin analysiert. Dargestellt sind die relativen Anteile der densitometrisch quantifizierten GLUT4-Immunreaktivität in den einzelnen Fraktionen (B; n=5, anti-GLUT4 bzw. n=4, Präimmunantikörper). Dabei wird die Summe aus gebundener Fraktion und Überstand als 100 % definiert. Der Unterschied in der Bindung an anti-GLUT4- und an Präimmun-Beads ist statistisch signifikant (t-Test; ** $p < 0,01$). Die Originaldaten eines exemplarischen Versuches sind oberhalb des Diagramms abgebildet (A).

Abbildung 8B zeigt die Verteilung von GLUT4 aus Rat1/GLUT4myc-Zellen in den einzelnen Fraktionen (n=5, anti-GLUT4 bzw. n=4, Präimmunantikörper). Der höchste Anteil an GLUT4 befindet sich mit 90 % in der an die magnetischen Beads gebundenen Fraktion. Im Überstand sind nur 10 % der GLUT4-Menge enthalten. Somit ist die Effizienz der GSV-Bindung sehr hoch. Als Kontrolle für die Spezifität der Bindung wird die Immunadsorption mit magnetischen Beads, an die Präimmunantikörper gekoppelt sind, durchgeführt (n=4). Dabei werden nur etwa 6 % an GLUT4 in der gebundenen Fraktion und 94 % im Überstand detektiert. Dies zeigt, dass die GSV-Bindung auch sehr spezifisch ist. Der Unterschied der GLUT4-Bindung an mit anti-GLUT4 Antikörpern gekoppelten Beads und mit Präimmunantikörpern gekoppelten Beads ist statistisch signifikant (einseitiger Zweistichproben-t-Test für unabhängige Zufallsstichproben; ** $p < 0,01$).

3.3.2 Analyse der Colokalisation der proHB-EGF spaltenden Enzymaktivität mit GSVs

Um zu klären, welcher Anteil der in Kap. 3.2.2 beschriebenen vesikulären VSVG-proHB-EGF hydrolysierenden Proteaseaktivität mit GSVs assoziiert ist, wird erneut eine Immunadsorption durchgeführt. Dabei werden wiederum, nach dem oben beschriebenen Protokoll, GLUT4-enhaltende Vesikel über anti-GLUT4 Antikörper an magnetische Beads gebunden.

Die gebundenen und die im Überstand verbliebenen Membrankompartimente werden mit NP40 solubilisiert, um die lumenal orientierten Enzymaktivitäten freizusetzen. Anschließend werden die Solubilisate mit dem Substrat VSVG-proHB-EGF für 5 min bei 37° C inkubiert (siehe Kap. 2.12). Die Analyse der Spaltung des proHB-EGF erfolgt mittels SDS-PAGE und Western Blot. Auch hier wird wieder die Degradation der untersten Bande des Triplets (siehe Abb. 4) quantifiziert.

Die in Abb. 9B dargestellte Immunadsorption weist darauf hin, dass ungefähr 65 % der vesikulären VSVG-proHB-EGF spaltenden Enzymaktivität in Rat1/GLUT4myc-Zellen mit GSVs assoziiert sind, während ca. 35 % dieser Proteaseaktivität in anderen Vesikeln ähnlicher Größe vorhanden sind (n=4). Zur Überprüfung der Spezifität der Bindung werden wiederum mit Präimmunantikörpern gekoppelte magnetische Beads eingesetzt (n=2). Dabei findet sich nur etwa 6 % der proteolytischen Aktivität in Vesikeln, die unspezifisch an die magnetischen Beads gebunden haben. 94 % der Aktivität verbleibt unter diesen Bedingungen im Überstand. Der Unterschied zur Bindung an anti-GLUT4 Beads ist statistisch signifikant (einseitiger Zweistichproben-t-Test für unabhängige Zufallsstichproben; * $p < 0,05$).

Als Kontrolle für den Verlauf der Immunadsorption ist die GLUT4-Immunreaktivität getestet worden. Mit 86 % GSV-Bindung ist die Effizienz erneut hoch. Auch der Unterschied zur GLUT4-Bindung an mit Präimmunantikörpern gekoppelten magnetischen Beads (8 %) ist wieder statistisch signifikant (einseitiger Zweistichproben-t-Test für unabhängige Zufallsstichproben; ** $p < 0,01$).

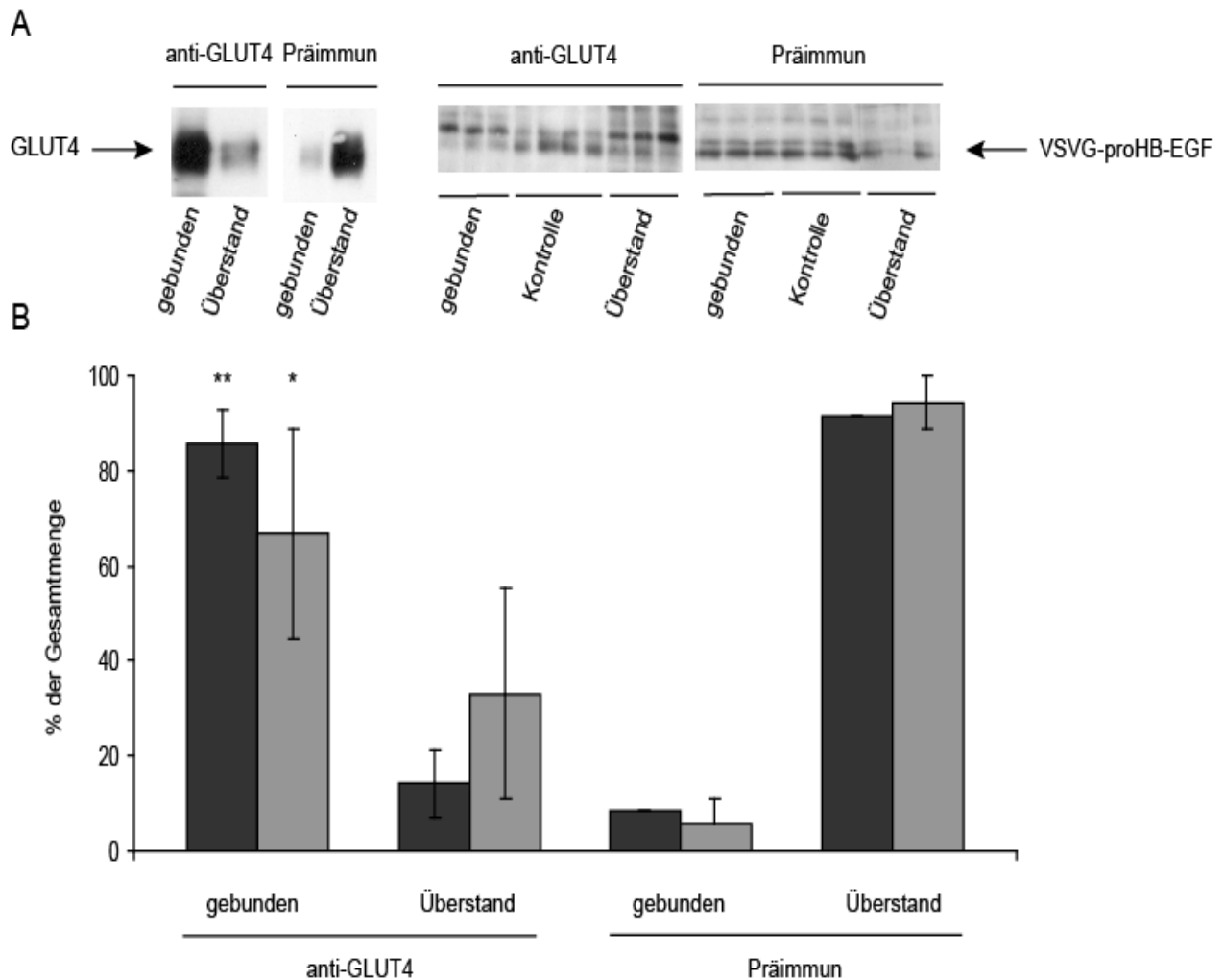


Abb. 9 Analyse der Assoziation einer VSVG-proHB-EGF spaltenden Proteaseaktivität mit GSVs. Eine vorgereinigte Vesikelfraktion aus Rat1/GLUT4myc-Zellen wird einer Immunadsorption unterzogen, wie in Abb. 8 beschrieben. Die gebundenen und die im Überstand verbliebenen Membrankompartimente werden jeweils in 1 % NP40 solubilisiert. Es folgt eine 5minütige Inkubation mit VSVG-proHB-EGF bei 37° C. Das VSVG-proHB-EGF ist zuvor mittels Dichtegradientenzentrifugation aus transfizierten CHO-Zellen isoliert worden. Der Abbau von VSVG-proHB-EGF durch vesikelassoziierte Proteasen und die anti-GLUT4 Immunreaktivität in den einzelnen Fraktionen werden mittels SDS-PAGE / Western-Blot analysiert. Im Diagramm (B) dargestellt ist der relative Anteil der GLUT4-Immunreaktivität (dunkelgrau) und der VSVG-proHB-EGF hydrolysierenden Aktivität (hellgrau) in der gebundenen Fraktion und im Überstand (n=4, anti-GLUT4 bzw. n=2, Präimmunantikörper). Dazu ist jeweils die Immunreaktivität der untersten Bande des VSVG-proHB-EGF Triplets nach Inkubation mit den solubilisierten GSVs (gebundene Fraktion) bzw. mit den anderen vesikulären Kompartimenten (Überstand) von der Immunreaktivität der entsprechenden Bande nach Inkubation mit PBS (Kontrolle) subtrahiert worden. Die Summe der Intensitätsabnahme bei gebundener Fraktion und Überstand ist als 100 % definiert worden. Die Unterschiede in der Bindung an anti-GLUT4- und an Präimmun-Beads sind statistisch signifikant (t-Test; ** $p < 0,01$ bzw. * $p < 0,05$). Oberhalb des Diagramms ist der korrespondierende Western-Blot eines exemplarischen Versuchs zu sehen (A).

Alle Inkubationen sind im dreifachen Ansatz durchgeführt worden.

3.3.3 Analyse der Colokalisation der Proteasen ADAM10 und TACE mit GSVs

Da mehr als die Hälfte der VSVG-proHB-EGF spaltenden Enzymaktivität in GSVs lokalisiert zu sein scheint (siehe Kap. 3.3.2) und die Metalloproteasen ADAM10 und TACE im Glyceringradienten weitgehend mit GSVs sedimentieren (vergl. Abb. 5), soll eine Assoziation dieser Proteasen mit GSVs mittels Immunadsorption überprüft werden.

Das Immunadsorptionsprotokoll ist für diesen Zweck leicht abgewandelt worden (siehe Kap. 2.15), da ADAM10 und TACE nach Solubilisierung mit NP40 im Western-Blot nicht detektiert werden konnten. Die Solubilisierung erfolgt daher direkt mit Probenpuffer für die SDS-PAGE.

Auf die Gelelektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen folgt eine Western-Blot Analyse. Die endogen exprimierten Proteasen ADAM10 und TACE werden mittels eines anti-ADAM10 bzw. anti-TACE Antikörpers detektiert, während die GLUT4-Verteilung mittels eines anti-GLUT4 Antikörpers sichtbar gemacht wird.

In Abbildung 10 ist die Verteilung des GSV-Markerproteins GLUT4 als Kontrolle für den Verlauf der Immunadsorption densitometrisch analysiert worden. Die gemessene Bindungseffizienz ist auch unter den veränderten Versuchsbedingungen mit etwa 95 % gebundenem GLUT4 sehr hoch (n=4). Nur knapp 5 % an GLUT4 findet sich im Überstand.

Zur Analyse der unspezifischen Bindung werden auch hier magnetische Beads mit Präimmunantikörpern gekoppelt (n=3). Dabei werden etwa 20 % an GLUT4 in der gebundenen Fraktion und rund 80 % im Überstand detektiert.

Die Proteasen ADAM10 und TACE sind sehr ähnlich wie GLUT4 verteilt. Rund 99 % beider Proteine finden sich in der gebundenen Fraktion, während nur etwa 1 % im Überstand detektiert werden.

Weniger als 2 % der Metalloproteasen finden sich nach Kopplung der magnetischen Beads mit Präimmunantikörpern in der gebundenen Fraktion, während fast 98 % im Überstand zu detektieren sind. Die Unterschiede in der Bindung an anti-GLUT4- und an Präimmun-Beads sind für alle drei untersuchten Proteine statistisch signifikant (einseitiger Zweistichproben-t-Test für unabhängige Zufallsstichproben; ** $p < 0,01$).

Die beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die beiden untersuchten Metalloproteasen nahezu vollständig mit GLUT4 in GSVs colokalisiert sind.

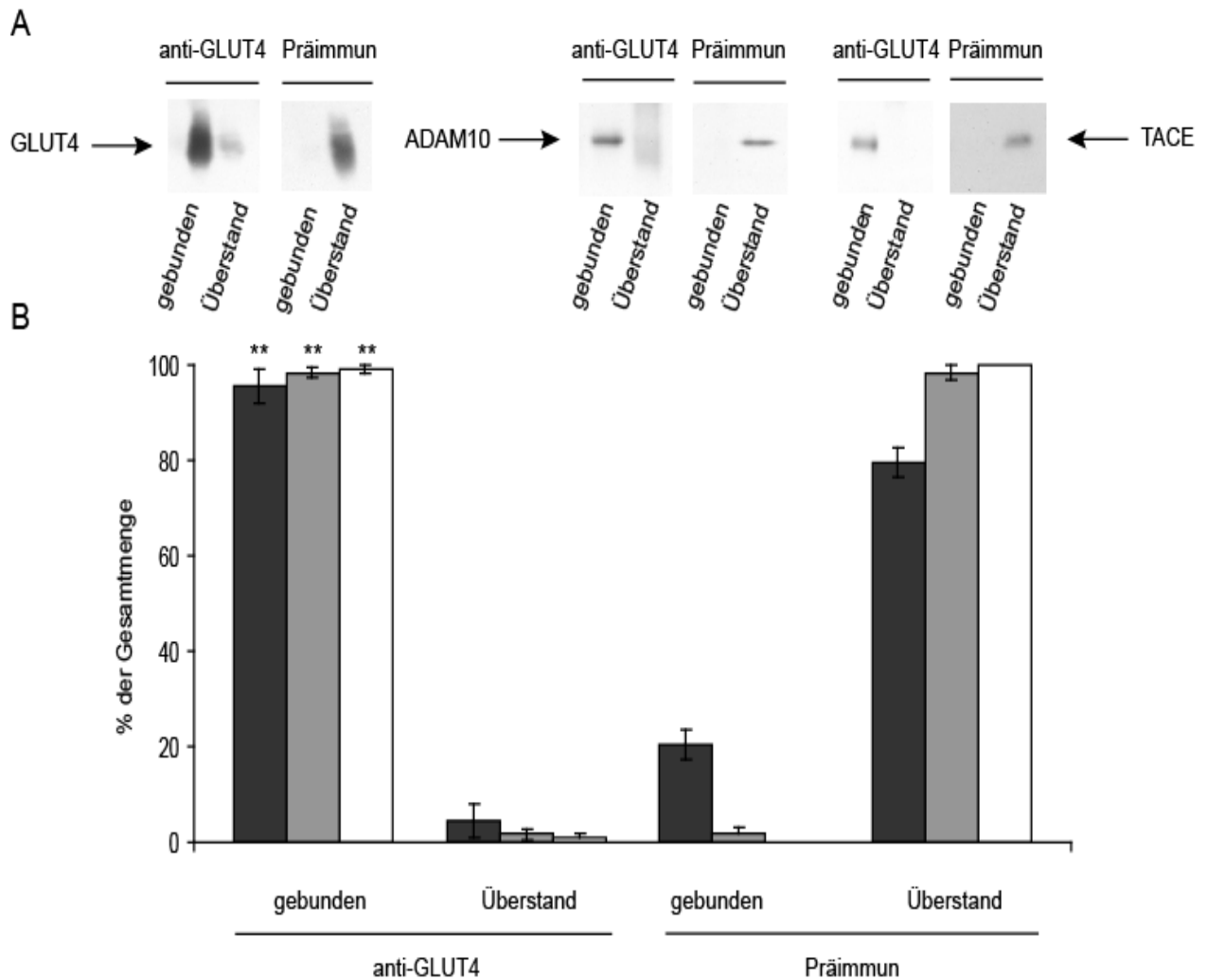


Abb. 10 Verteilung von ADAM10 und TACE bei der Immunadsorption von GSVs aus Rat1/GLUT4myc-Zellen. Die Zellen werden subzellulär fraktioniert, wie in Abb. 3 beschrieben. Die Vesikelfractionen werden mit magnetischen Beads, an die anti-GLUT4 Antikörper bzw. Präimmunantikörper gekoppelt worden sind, inkubiert. Mittels SDS-PAGE / Western-Blot wird die Verteilung von GLUT4 (dunkelgrau), ADAM10 (hellgrau) und TACE (weiß) mit Hilfe eines anti-GLUT4, anti-ADAM10 und anti-TACE Antikörpers analysiert und densitometrisch quantifiziert (B; n=4, anti-GLUT4 bzw. n=3, Präimmunantikörper). Die Summe aus der in der gebundenen Fraktion und im Überstand jeweils enthaltenen Immunreaktivität wird als 100 % definiert. Die Unterschiede in der Bindung an anti-GLUT4- und an Präimmun-Beads sind statistisch signifikant (t-Test; ** p < 0,01). Oberhalb des Diagramms sind die Originaldaten eines exemplarischen Versuchs dargestellt (A).

3.3.4 Analyse des humanen Thrombinrezeptors auf Colokalisation mit GSVs

Da auch der Thrombinrezeptor eine teilweise Überlappung mit GSVs im Glyceringradienten zeigt, soll eine mögliche Assoziation mit diesen Vesikeln durch Immunadsorption geklärt werden. Hierzu werden Rat1/GLUT4myc-Zellen wiederum mit Hilfe eines Glycerin-Sedimentationsgeschwindigkeitsgradienten (5-25 %) subzellulär fraktioniert. Die Vesikelfraktionen werden mit magnetischen Beads, an die anti-GLUT4 Antikörper bzw. Präimmunantikörper gekoppelt worden sind, inkubiert. Die nach erfolgter Immunadsorption erhaltenen Fraktionen werden erneut mittels SDS-PAGE und Western-Blot untersucht.

Abbildung 11 zeigt die Verteilung von hPAR1. Für die Kontrolle des Verlaufs der Immunadsorption ist erneut die GLUT4-Immunreaktivität getestet worden. Auch hier zeigt sich das bekannte Bild. Mehr als 95 % an GLUT4 findet sich in der gebundenen Fraktion bei einer unspezifischen Bindung von ca. 19 %. Genau gegensätzlich sieht es mit der Bindung von hPAR1 an die mit anti-GLUT4 Antikörpern gekoppelten magnetischen Beads aus (n=2). Es findet sich nur etwa 1,5 % in der gebundenen Fraktion, während mehr als 98 % der hPAR1-Immunreaktivität im Überstand zu detektieren ist. Bei Analyse der unspezifischen Bindung (n=3) finden sich weniger als 1 % in der gebundenen Fraktion, während mehr als 99 % der hPAR1-Immunreaktivität im Überstand verbleibt.

Dieser Befund weist darauf hin, dass GSVs keine nennenswerten Mengen des Thrombinrezeptors enthalten (vergl. Abb. 6).

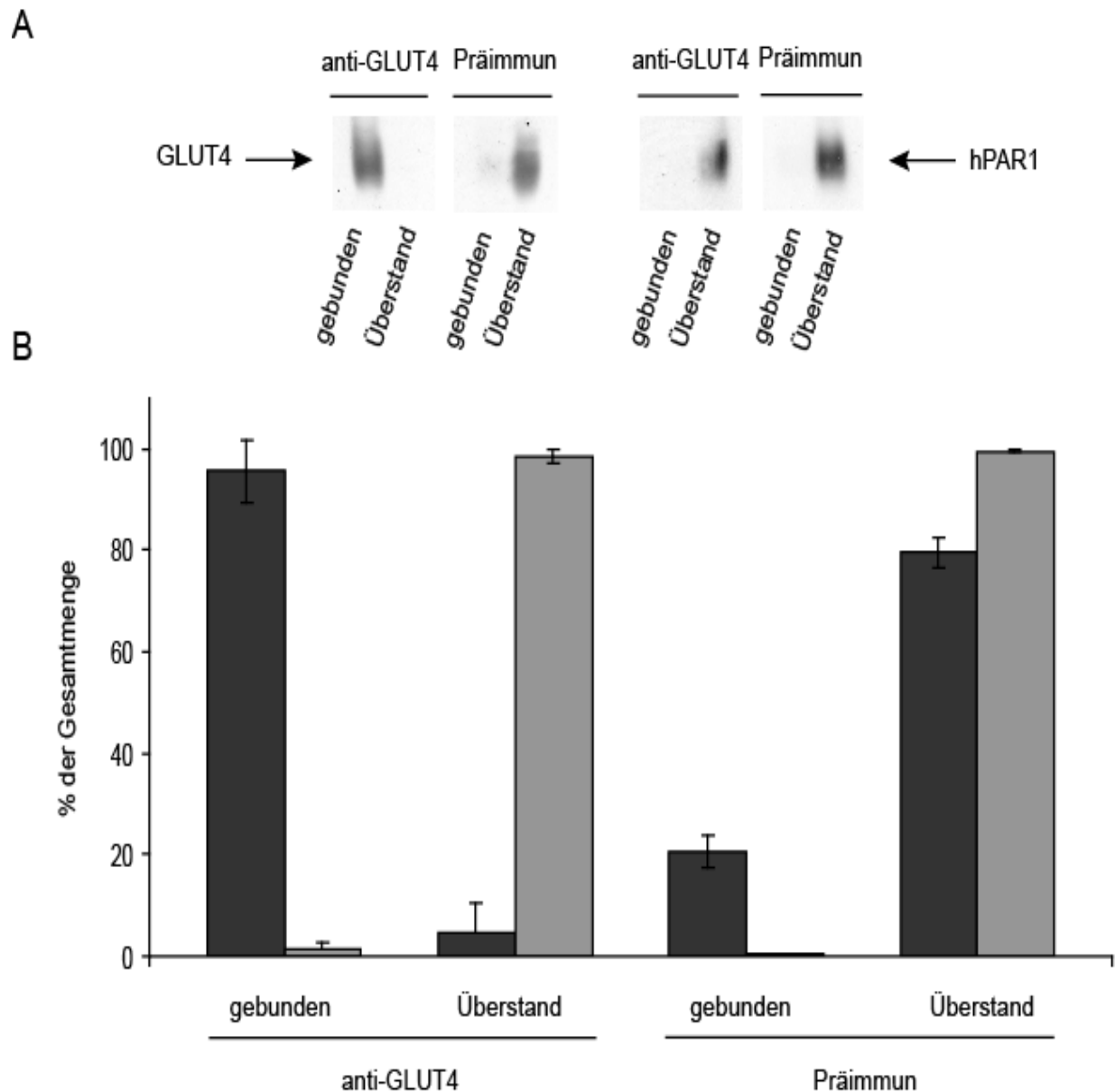


Abb. 11 Verteilung von hPAR1-Immunreaktivität nach Immunadsorption einer Vesikelfraktion aus Rat1/GLUT4myc-Zellen mit anti-GLUT4 Antikörpern bzw. Präimmunantikörpern. Mittels SDS-PAGE / Western-Blot wird die Verteilung von GLUT4 (dunkelgrau) und hPAR1 (hellgrau) analysiert und densitometrisch quantifiziert (B; n=2, anti-GLUT4 bzw. n=3, Präimmunantikörper). Die Summe aus gebundener Fraktion und Überstand werden als 100 % definiert.

Oberhalb des Diagramms sind die Originaldaten eines exemplarischen Versuchs zu sehen (A).

3.3.5 Assoziation eines TGN-Markerproteins mit GSVs

Da die Markerproteine GLUT4 und TGN38 bei der Sedimentationsgeschwindigkeitsgradientenzentrifugation eine leichte Überlappung zeigten (vergl. Abb. 7), soll untersucht werden, ob TGN-Vesikel aufgrund ihres möglichen GLUT4-Gehalts unter den verwendeten Bedingungen ebenfalls an anti-GLUT4 Beads binden.

Dazu werden die durch subzelluläre Fraktionierung gewonnenen Vesikelfractionen in einer Immunadsorption eingesetzt, wie in Kap. 2.15 beschrieben. Die gebundenen und die im Überstand verbliebenen vesikulären Kompartimente werden mittels SDS-PAGE / Western-Blot Analyse unter Verwendung eines anti-TGN38 Antikörpers untersucht.

In Abbildung 12 ist die Verteilung von TGN38 bei Verwendung von mit anti-GLUT4 Antikörpern gekoppelten magnetischen Beads zu sehen (n=3). Für die Kontrolle des Verlaufs der Immunadsorption ist erneut die GLUT4-Immunreaktivität getestet worden. Dabei ist die GSV-Bindung erneut mit ca. 94 % sehr hoch. Im Gegensatz dazu findet sich nur etwa 22 % der TGN38-Immunreaktivität in der gebundenen Fraktion, während ca. 78 % im Überstand detektiert werden kann. Für den Nachweis der Spezifität der Bindung werden mit Präimmunantikörpern gekoppelte magnetische Beads eingesetzt (n=2). Dabei werden rund 19 % an GLUT4 bzw. etwa 10 % an TGN38 in der gebundenen Fraktion und 81 % an GLUT4 bzw. 90 % an TGN38 im Überstand detektiert. Eine Colokalisation von TGN38 und GLUT4 im gleichen Membrankompartiment kann daher durch die Immunadsorption nicht belegt werden. Während der Unterschied in der GLUT4-Bindung an anti-GLUT4- und an Präimmun-Beads wiederum statistisch signifikant ist (einseitiger Zweistichproben-t-Test für unabhängige Zufallsstichproben; ** $p < 0,01$), ist eine spezifische Bindung von TGN38 statistisch nicht gesichert (einseitiger Zweistichproben-t-Test für unabhängige Zufallsstichproben; * $p > 0,05$).

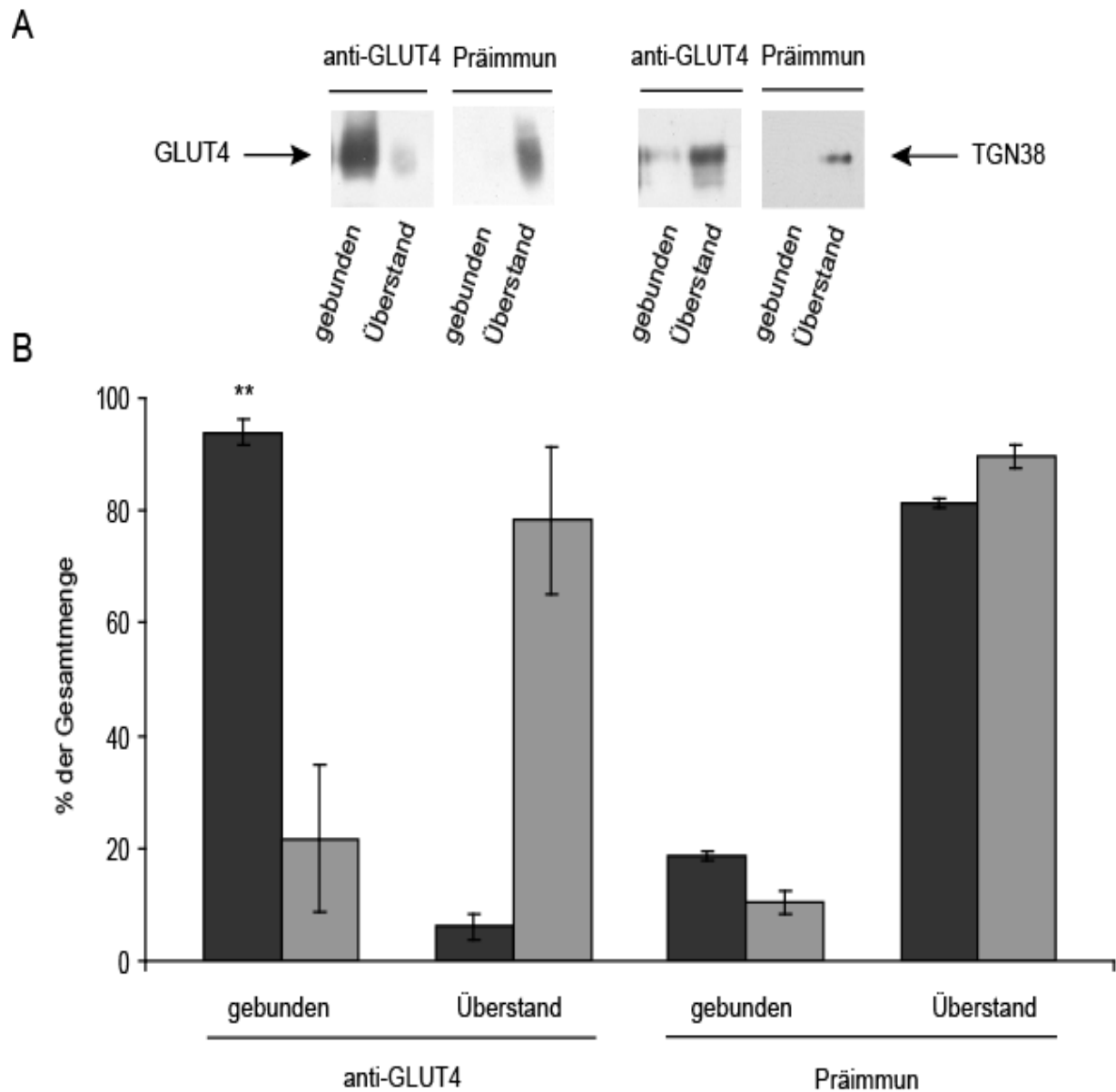


Abb. 12 Verteilung von TGN38-Immunreaktivität nach Immunadsorption einer Vesikel-fraktion aus Rat1/GLUT4myc-Zellen mit anti-GLUT4 Antikörpern bzw. Präimmun-antikörpern. Mittels SDS-PAGE / Western-Blot wird die Verteilung von GLUT4 (dunkelgrau) und TGN38 (hellgrau) analysiert und densitometrisch quantifiziert (B; n=3, anti-GLUT4 bzw. n=2, Präimmunantikörper). Die Summe aus gebundener Fraktion und Überstand wird als 100 % definiert. Der Unterschied in der Bindung an anti-GLUT4- und an Präimmun-Beads ist für GLUT4 statistisch signifikant (t-Test; ** $p < 0,01$), während der Unterschied für TGN38 nicht statistisch gesichert ist (t-Test; * $p > 0,05$).

Oberhalb des Diagramms sind die Originaldaten eines exemplarischen Versuchs zu sehen (A).

Ein Teil der hier verwendeten GLUT4-Daten ist auch in Abb. 11 einbezogen worden, da in einem experimentellen Ansatz nicht nur hPAR1, sondern auch TGN38 bestimmt worden ist.

3.4 Dynamik der GSVs in Rat1/GLUT4myc-Zellen

Im nächsten Schritt soll untersucht werden, ob die in Rat1/GLUT4myc-Zellen identifizierten GSVs den gleichen Biosyntheseweg und das gleiche dynamische Verhalten zeigen, wie für Fett- und Muskelzellen sowie für transfizierte CHO-Zellen beschrieben. In den genannten Zelltypen rezirkulieren GSVs auch in Abwesenheit eines Stimulus konstitutiv, wobei GLUT4 nach der Exozytose mittels Clathrin-vermittelter Endozytose internalisiert wird (siehe Kap. 1.1.1.3). Darüber hinaus konnte für CHO-Zellen gezeigt werden, dass die Biogenese der GSVs über ein spezialisiertes endosomales Kompartiment läuft, wie in Kap. 1.1.1.3 beschrieben.

Sowohl der Rezirkulationsweg als auch der Biosyntheseweg können experimentell an spezifischer Stelle blockiert und damit analysiert werden. So verhindert ein Absenken der Temperatur auf 15° C (15° C-Block) die Abschnürung von GSVs aus dem spezialisierten Endosom, während die konstitutive Exo- und Endozytose nur leicht verlangsamt werden. Hierdurch kommt es zu einer Akkumulation von GLUT4 in den spezialisierten Endosomen und einer Abnahme der GSVs. Eine Inkubation der Zellen in hypertonem Medium blockiert dagegen die Rezirkulation der Vesikel auf der Ebene der Plasmamembran durch Inhibition der Clathrin-vermittelten Endozytose. Da die konstitutive Exozytose unbeeinflusst bleibt, führt dies zu einer Akkumulation von GLUT4 auf der Zelloberfläche und ebenfalls einer Abnahme der GSVs.

3.4.1 Analyse der GSV-Biosynthese unter Temperaturblock-Bedingungen

Bei diesem experimentellen Ansatz werden, wie in Kap. 2.11.2 beschrieben, Rat1/GLUT4myc-Zellen einer unphysiologisch niedrigen Temperatur von 15° C für zwei Stunden ausgesetzt und anschließend subzellulär fraktioniert. Der heterolog exprimierte GSV-Marker GLUT4 wird nach der subzellulären Fraktionierung im Western-Blot nachgewiesen und seine Verteilung densitometrisch analysiert. Die Proteasen ADAM10 und TACE scheinen nach den in Kap. 3.3.3 dargestellten Ergebnissen mit GLUT4 in GSVs colokalisiert zu sein (vergl. Abb. 10). Um diesen Befund zu überprüfen, ist auch das Verhalten der beiden Metalloproteasen unter 15° C-Block-Bedingungen untersucht worden. Zusätzlich wurde auch der TGN-Marker TGN38 in diese Untersuchungen einbezogen. Wegen der im Vergleich zu

GLUT4 deutlich schwächeren Immunreaktivität der untersuchten Proteine mussten die Proben vor der SDS-PAGE mittels Fällung aufkonzentriert werden. Der biochemische Nachweis der Proteine erfolgt wie im Falle von GLUT4 über Western-Blot. Die Verteilung wird anschließend ebenfalls densitometrisch analysiert.

Abbildung 13 zeigt exemplarisch für einen von vier Versuchen die Verteilung der genannten Proteine über den Gradienten. Bei den unbehandelten Rat1/GLUT4myc-Zellen ist deutlich der GLUT4-Gipfel im Bereich der GSVs (Fraktion 7-10; 25,1 % Anteil an der Gesamtmenge) sowie ein Maximum am Boden des Gradienten (Fraktion 1 und 2; 70,8 %), wo endosomale Membranen und Plasmamembranbruchstücke sedimentieren, zu erkennen (13A). Die bei 15° C inkubierten Zellen zeigen im Vergleich dazu eine deutliche Abnahme des GLUT4-Gipfels im Bereich der GSVs (Fraktion 6-9; 5,6 %). Im Bodenbereich (Fraktion 1 und 2; 93,5 %) ist dagegen eine Zunahme der GLUT4-Immunreaktivität festzustellen. Das Ausmaß variiert von Versuch zu Versuch, so dass es im Mittel zu einer Abnahme von 12,3 % \pm 9 % auf 2,6 % \pm 2,1 % im Bereich der GSVs und gleichzeitigen Zunahme von 85 % \pm 10 % auf 95,1 % \pm 2,4 % in den Bodenfraktionen nach Inkubation der Rat1/GLUT4myc-Zellen bei 15° C kommt.

Dies deutet darauf hin, dass GSVs auch in Rat1/GLUT4myc-Zellen konstitutiv rezirkulieren und dass ihr Biosyntheseweg auch in diesen Zellen ein großes spezialisiertes endosomales Kompartiment einschließt, das am Boden des Gradienten sedimentiert.

Abbildung 13B zeigt exemplarisch die Verteilung von TGN38. Der Gipfel im Vesikelbereich ist bei der Kontrolle gegenüber dem GSV-Maximum wiederum deutlich in Richtung kleinerer Membrankompartimente verschoben (Fraktion 10-13, vergl. Abb. 7). Der 15° C-Block führt hier zu einer Verschiebung dieses Gipfels in Richtung größerer Vesikel (Fraktion 7-11) ohne nennenswerte Veränderung der Immunreaktivität von 52,7 % auf 52,2 %. Parallel dazu kommt es zu einer leichten Zunahme der in den Bodenfraktionen (Fraktion 1-3) sedimentierenden TGN38-Immunreaktivität von 34,4 % auf 35,9 %. Im Mittel kommt es zu einer Zunahme von 44,3 % \pm 13,6 % auf 48,3 % \pm 4,6 % im Vesikelbereich und einer Abnahme von 47,7 % \pm 16,6 % auf 42,2 % \pm 9,1 % in den Bodenfraktionen nach Inkubation der Zellen bei 15° C.

Bei der Analyse von ADAM10 und TACE zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei GLUT4. Abbildung 13C stellt exemplarisch die Verteilung von ADAM10 über den Gradienten dar. Im Bereich der GSVs (Fraktion 7-10) führt der 15° C-Block zu einer deutlichen Abnahme der ADAM10-Immunreaktivität von 21,1 % auf 5 %, während in der Bodenfraktion (Fraktion 1) eine Zunahme von 65,1 % auf 92,4 % zu verzeichnen ist. Werden die Werte für die

ADAM10-Immunreaktivität aus allen durchgeführten Experimenten gemittelt, so zeigt sich eine Abnahme von $9 \% \pm 8,1 \%$ auf $6,7 \% \pm 5,4 \%$ in den Vesikelfraktionen und eine gleichzeitige Zunahme von $84,8 \% \pm 13,2 \%$ auf $88,4 \% \pm 9,8 \%$ in den Bodenfraktionen nach Inkubation der Rat1/GLUT4myc-Zellen bei 15°C .

In Abbildung 13D ist exemplarisch die Verteilung der Protease TACE in Rat1/GLUT4myc-Zellen dargestellt. Ein Gipfel ist im Bereich der GSVs zwischen den Fraktionen 6-9 ($23,1 \%$) in unbehandelten Zellen zu sehen. Ein weiteres Maximum ist am Boden des Gradienten in den Fraktionen 1-3 ($67,6 \%$) zu erkennen. Die bei 15°C inkubierten Zellen weisen wiederum eine Abnahme der Immunreaktivität im Vesikelbereich ($18,1 \%$) bei gleichzeitiger Zunahme am Boden (76%) auf. Im Mittel nimmt die TACE-Immunreaktivität im Bereich der Vesikel von $21,3 \% \pm 4,5 \%$ auf $16,9 \% \pm 13,2 \%$ ab bei einer gleichzeitigen Zunahme von $64,8 \% \pm 13,3 \%$ auf $75,9 \% \pm 20,7 \%$ in den Bodenfraktionen nach Inkubation der Zellen bei 15°C .

Die beiden Metalloproteasen ADAM10 und TACE verhalten sich also unter den Bedingungen des 15°C -Blocks sehr ähnlich wie GLUT4, während der TGN-Marker TGN38 eine gänzlich andere Verteilung aufweist. Dies unterstützt den oben genannten Befund, dass ADAM10 und TACE höchstwahrscheinlich mit GSVs assoziiert sind. Eine nennenswerte Colokalisation mit TGN-Vesikeln erscheint dagegen auch unter Einbeziehung der Daten aus der subzellulären Fraktionierung (Abb. 7) und der Immunadsorption (Abb. 12) als sehr unwahrscheinlich.

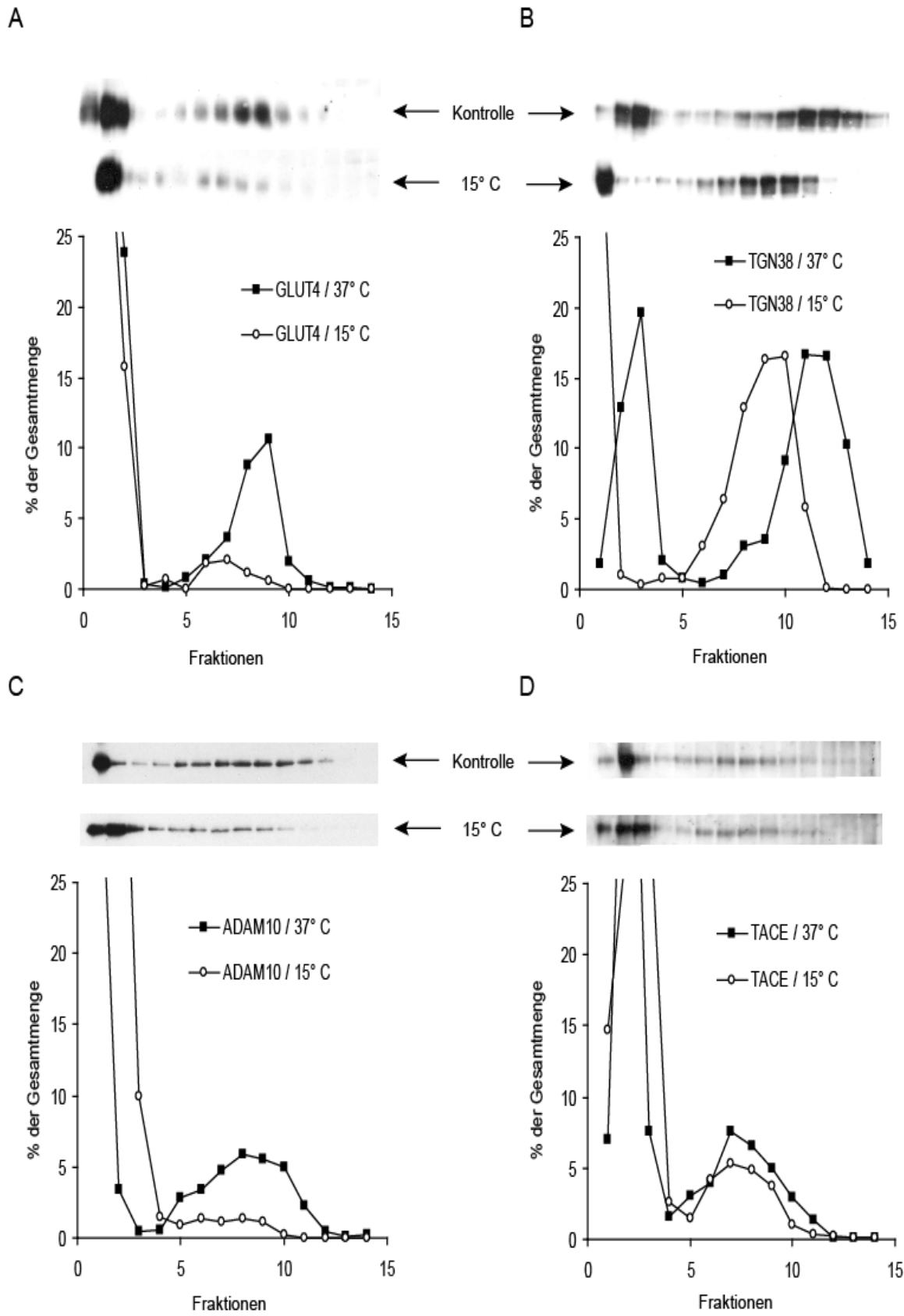


Abb. 13 Verteilung von GLUT4, TGN38, ADAM10 und TACE in Rat1/GLUT4myc-Zellen unter den Bedingungen eines 15° C-Blocks. Ein vorgereinigtes Homogenat aus Zellen, die entweder bei 37° C (Kontrolle) oder bei 15° C für zwei Stunden inkubiert worden sind, wird über einen Glyceringradienten (5-25 %) aufgetrennt. Aliquots der einzelnen Fraktionen werden mittels SDS-PAGE / Western-Blot Analyse auf ihren Gehalt an GLUT4 (A), TGN38 (B), ADAM10 (C) und TACE (D) hin analysiert. Dargestellt sind die relativen Anteile, bezogen auf die jeweiligen Gesamtmengen im Gradienten, der densitometrisch bestimmten GLUT4-, TGN38-, ADAM10- und TACE-Immunreaktivität in den einzelnen Fraktionen eines exemplarischen Versuchs. Das Bandenmuster oberhalb der densitometrischen Auswertung zeigt jeweils den korrespondierenden Western-Blot.

Die Gradientenfraktionen sind vom Boden (Fraktion 1) nach oben (Fraktion 14) aufgetragen.

Außerhalb des Darstellungsbereichs:

GLUT4 (37° C)	Fraktion 1: 47 %
GLUT4 (15° C)	Fraktion 1: 77,8 %
ADAM10 (37° C)	Fraktion 1: 65,1 %
ADAM10 (15° C)	Fraktion 1: 32,3 % und 2: 50,2 %
TACE (37° C)	Fraktion 2: 53 %
TACE (15° C)	Fraktion 2: 29,7 % und 3: 31,6 %
TGN38 (15° C)	Fraktion 1: 35,9 %

3.4.2 Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose

Um den Rezirkulationsweg der GSVs in Rat1/GLUT4myc-Zellen weitergehend zu charakterisieren, ist im nächsten Schritt die Clathrin-vermittelte Endozytose durch Inkubation der Zellen in hypertonem Medium gehemmt worden. Zu diesem Zweck werden die Zellen zunächst für 30 min in Medium mit Sorbitol (0,45 M) inkubiert und anschließend subzellulär fraktioniert, wie in Kap. 2.11.1 beschrieben.

Der GSV-Marker GLUT4 sowie die Proteasen ADAM10 und TACE werden nach subzellulärer Fraktionierung im Western-Blot nachgewiesen und ihre Verteilung densitometrisch ausgewertet.

In Abbildung 14A ist exemplarisch für einen von drei Versuchen die Verteilung von GLUT4 über den Gradienten dargestellt. Bei den unbehandelten Zellen zeigt sich das bekannte Muster mit einem Gipfel im Bereich der GSVs zwischen Fraktion 5-7 (20,7 % der Gesamtmenge) sowie einem weiteren Gipfel am Boden des Gradienten (Fraktion 1; 76,1 %), wo endosomale Membranen und Plasmamembranbruchstücke sedimentieren. Die in hypertonem Medium inkubierten Rat1/GLUT4myc-Zellen hingegen weisen eine deutliche Abnahme der GLUT4-Immunreaktivität im Bereich der GSVs zwischen Fraktion 5-7 (0,61 %) bei gleichzeitiger Zunahme in den Bodenfraktionen (Fraktion 1 und 2; 97,9 %) auf. Das Ausmaß dieser Umverteilung variiert von Versuch zu Versuch, so dass es im Mittel zu einer Abnahme von $14,1 \% \pm 6,4 \%$ auf $5,2 \% \pm 5,1 \%$ im Bereich der GSVs und einer gleichzeitigen Zunahme von $80,2 \% \pm 8,6 \%$ auf $92 \% \pm 6,4 \%$ in den Bodenfraktionen nach Inkubation der Rat1/GLUT4myc-Zellen mit Sorbitol kommt.

Abbildung 14B zeigt die entsprechende Verteilung der ADAM10-Immunreaktivität im Gradienten. Anders als bei GLUT4 nimmt hier der Gipfel im Bereich der GSVs (Fraktion 6-9) bei Inkubation der Zellen mit hypertonem Medium von 17,5 % auf 27,6 % zu. Gleichzeitig verringert sich die ADAM10-Immunreaktivität am Boden im Bereich großer Membrankompartimente (Fraktion 1 und 2) von 73,8 % auf 64,4 %. Im Mittel kommt es zu einer Zunahme der ADAM10-Immunreaktivität von $13,2 \% \pm 3,3 \%$ auf $23,9 \% \pm 9,2 \%$ im Bereich der GSVs und einer Abnahme von $80 \% \pm 6,1 \%$ auf $68,4 \% \pm 9,8 \%$ in den Bodenfraktionen nach Inkubation der Rat1/GLUT4myc-Zellen mit hypertonem Medium.

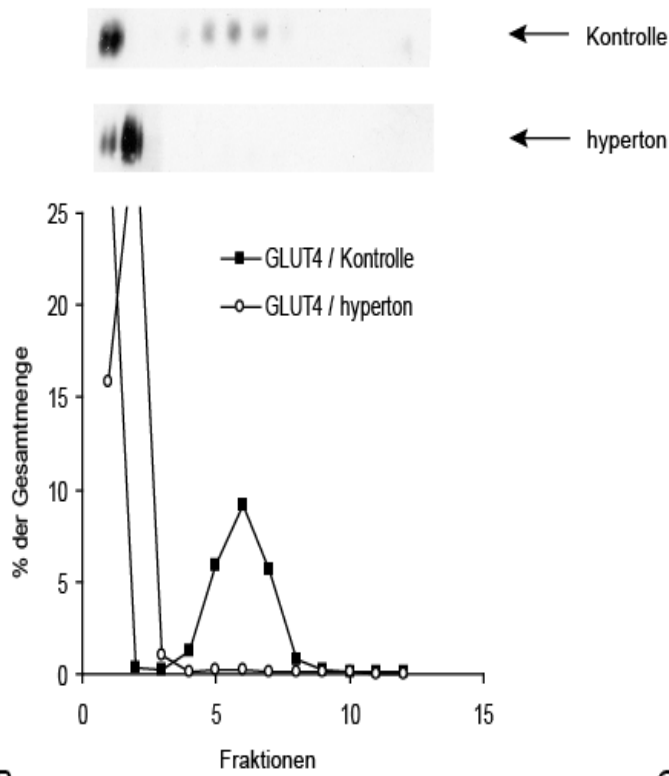
Die TACE-Immunreaktivität zeigt unter diesen Bedingungen eine ähnliche Umverteilung. Das Maximum im Bereich der GSVs (Fraktion 5-8) steigt von 8,5 % auf 10,3 % an. Allerdings bleibt die am Boden des Gradienten sedimentierende TACE-Immunreaktivität

nahezu unverändert bei 86,5 % (Kontrolle 87,5 %). Im Mittel kommt es zu keiner nennenswerten Umverteilung der TACE-Immunreaktivität nach Inkubation der Zellen mit Sorbitol.

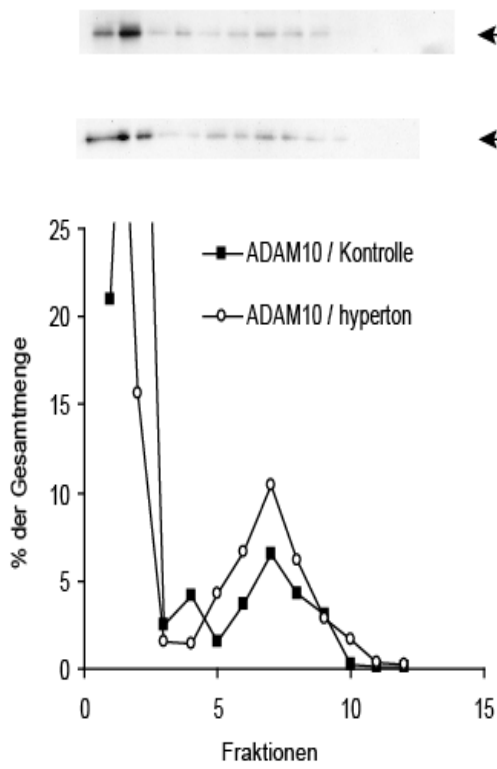
Das Verhalten des GSV-Markers GLUT4 deutet darauf hin, dass der Glucosetransporter auch in Rat1/GLUT4myc-Zellen im Rahmen seiner konstitutiven Rezirkulation mittels Clathrin-vermittelter Endozytose internalisiert wird.

Während alle bisherigen Befunde (siehe Kap. 3.3.3 und Kap. 3.4.1) auf eine Assoziation von ADAM10 und TACE mit GSVs hinweisen, verhalten sich die beiden Metalloproteasen in Gegenwart von hypertonem Medium anders als GLUT4. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass ADAM10 und TACE mit einer Subpopulation von GSVs assoziiert sind, die ein anderes dynamisches Verhalten zeigt als der Rest der Speichervesikel.

A



B



C

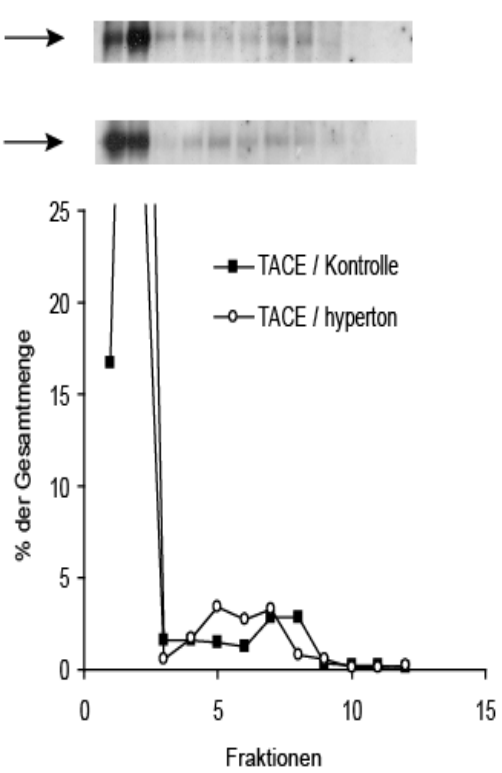


Abb. 14 Subzelluläre Verteilung von GLUT4, ADAM10 und TACE in unbehandelten und in mit hypertonem Medium inkubierten Rat1/GLUT4myc-Zellen. Ein vorgereinigtes Homogenat aus unbehandelten (Kontrolle) oder in hypertonem Medium (0,45 M Sorbitol) inkubierten Rat1/GLUT4myc-Zellen wird über Sedimentationsgeschwindigkeitsgradientenzentrifugation (5-25 % Glycerin) aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen aus einem exemplarischen Versuch werden mittels SDS-PAGE / Western-Blot Analyse auf ihren Gehalt an GLUT4 (A), ADAM10 (B) und TACE (C) hin analysiert. Dargestellt ist der in den einzelnen Fraktionen enthaltene prozentuale Anteil der GLUT4-, ADAM10- und TACE-Immunreaktivität an den im Gradienten jeweils enthaltenen Gesamtmengen. Das Bandenmuster oberhalb der densitometrischen Auswertung zeigt die Verteilung der GLUT4-, ADAM10- und TACE-Immunreaktivität im Western-Blot.

Die Gradientenfraktionen sind vom Boden (Fraktion 1) nach oben (Fraktion 12) aufgetragen.

Außerhalb des Darstellungsbereichs:

GLUT4 (Kontrolle)	Fraktion 1: 76,1 %
GLUT4 (hyperton)	Fraktion 2: 82 %
ADAM10 (Kontrolle)	Fraktion 1: 61,6 % und 2: 25,6 %
ADAM10 (hyperton)	Fraktion 1: 25,7 % und 2: 51,4 %
TACE (Kontrolle)	Fraktion 2: 70,8 %
TACE (hyperton)	Fraktion 1: 50,6 % und 2: 35,9 %

3.4.3 Zelloberflächenanalyse nach Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose

Um das Ausmaß der Umverteilung von GLUT4 aus den GSVs zur Plasmamembran zu quantifizieren, wird eine Messung der GLUT4-Immunreaktivität auf der Zelloberfläche durchgeführt. Eine entsprechende Analyse kann für ADAM10 und TACE nicht durchgeführt werden, da für die beiden Proteasen keine Antikörper zur Verfügung stehen, die extrazelluläre Epitope erkennen.

Zu diesem Zweck wird ein Teil der Rat1/GLUT4myc-Zellen zunächst, wie oben beschrieben, für 30 min in hypertonem Medium (0,45 M Saccharose) inkubiert. Saccharose und Sorbitol hemmen gleichermaßen die Clathrin-vermittelte Endozytose (Heuser & Anderson, 1989; Wei et al., 1998; Janez et al., 2000; Li et al., 2001). Die anschließende Zelloberflächenanalyse wird, wie in Kap. 2.16 beschrieben, durchgeführt. Das von den Zellen exprimierte GLUT4 trägt extrazellulär ein myc-Epitop, so dass mittels eines monoklonalen anti-myc Antikörpers das Protein auf der Außenseite der Plasmamembran zu detektieren ist. Die Menge an gebundenem Antikörper wird photometrisch über die Umsetzung eines chromogenen Substrats durch einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper bestimmt. Als Bezugspunkt (100 %) dient die bei der Analyse von unbehandelten Rat1/GLUT4myc-Zellen gebildete Menge an Reaktionsprodukt.

In Abbildung 15 ist die prozentuale Veränderung der Menge an GLUT4myc-Immunreaktivität auf der Oberfläche von Rat1/GLUT4myc-Zellen unter den beschriebenen Bedingungen dargestellt (n=3). Nach Inkubation der Zellen mit hypertonem Medium nimmt die GLUT4-Menge auf der Plasmamembran signifikant von 100 % auf $166 \% \pm 4,3 \%$ zu (einseitiger t-Test für paarige Stichproben; ** $p < 0,01$).

Die beobachtete Tendenz zur Abnahme von GLUT4 im Bereich der GSVs (siehe Abb. 14) scheint also mit einer entsprechenden Zunahme des Glucosetransporters auf der Zelloberfläche verbunden zu sein.

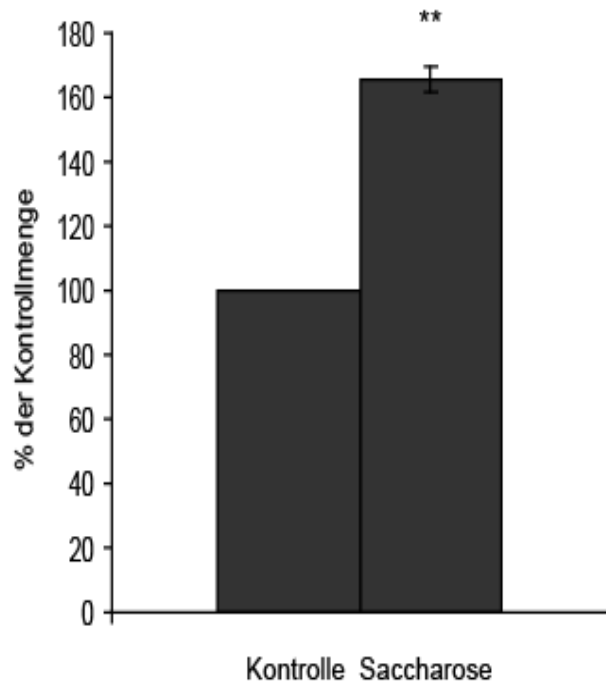


Abb. 15 Analyse der Umverteilung von GLUT4myc aus den GSVs zur Plasmamembran nach Inkubation der Rat1/GLUT4myc-Zellen in hypertonem Medium. Die Zellen werden für 30 min in normalem (Kontrolle) oder hypertonem Medium (0,45 M Saccharose) inkubiert. Bei einer Zelloberflächenanalyse (n=3) werden die Rat1/GLUT4myc-Zellen mittels eines anti-myc Antikörpers und eines daran bindenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers auf ihren Gehalt an GLUT4myc-Immunreaktivität auf der Außenseite der Plasmamembran hin analysiert. Die Menge an gebundenem Antikörper ist proportional zur Menge eines mittels HRP umgesetzten chromogenen Substrats. Die Absorption des erhaltenen Reaktionsprodukts wird mittels Spektralphotometer bestimmt und prozentual dargestellt. Als Bezugspunkt (100 %) dient die bei der Analyse von unbehandelten Rat1/GLUT4myc-Zellen gebildete Menge an Reaktionsprodukt (** p < 0,01).

3.4.4 Stimulation der Rat1/GLUT4myc-Zellen mit Thrombin

In einer abschließenden Versuchsreihe ist untersucht worden, ob GSVs in Rat1/GLUT4myc-Zellen einer regulierten Exozytose unterliegen, wie für authentische GSVs in -Fett- und -Muskelzellen beschrieben. Eine solche spezifische Stimulierbarkeit der Translokation von GSVs zur Zelloberfläche in nicht Fett- und Muskelzellen hatte bisher nicht zweifelsfrei demonstriert werden können. Die Frage nach der regulierten Exozytose gewinnt hier zusätzliche Bedeutung dadurch, dass die GSVs in Rat1/GLUT4myc-Zellen nach den in Kap. 3.3.3 dargestellten Befunden die endogenen Metalloproteasen ADAM10 und TACE enthalten. Die Aktivität beider Proteasen auf der Zelloberfläche wird - auf bisher nicht geklärte Weise - reguliert und kann u.a. durch Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, wie z.B. des Thrombinrezeptors, stimuliert werden. Da auch die Exozytose der GSVs in Adipozyten über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren induziert werden kann (siehe Kap. 1.1.1.1), werden im folgenden Rat1/GLUT4myc-Zellen, die den humanen Thrombinrezeptor heterolog exprimieren, mit Thrombin stimuliert. Hierbei sollen folgende konkrete Fragen beantwortet werden: Unterliegen GSVs in Rat1/GLUT4myc-Zellen einer regulierten Exozytose und wenn ja, trägt dieser Prozess durch einen Einbau von ADAM10 und TACE in die Plasmamembran zur beobachteten stimulationsabhängigen Aktivitätssteigerung der beiden Proteasen auf der Zelloberfläche bei?

3.4.4.1 Charakterisierung des GSV-Markers GLUT4 sowie ADAM10 und TACE unter Stimulationsbedingungen

Rat1/GLUT4myc-Zellen werden mit Thrombin (1 u/ml) für 10 min bei 37° C inkubiert und anschließend mit Hilfe eines Glycerin-Sedimentationsgeschwindigkeitsgradienten (5-25 % Glycerin) subzellulär fraktioniert, wie in Kap. 2.11.1 beschrieben. Der heterolog exprimierte GSV-Marker GLUT4 sowie die Proteasen ADAM10 und TACE werden nach der subzellulären Fraktionierung mittels SDS-PAGE / Western-Blot nachgewiesen und ihre Verteilung densitometrisch analysiert. Des Weiteren wird der hPAR1 ebenfalls mittels SDS-PAGE / Western-Blot analysiert. Da der Rezeptor bei der Aktivierung durch Thrombin proteolytisch geschnitten wird, ist dies eine gute Kontrolle für den Stimulationserfolg.

Abbildung 16A zeigt die Verteilung von GLUT4 über den Gradienten in einem exemplarischen von sieben Versuchen. Das nahezu vollständige Verschwinden der hPAR1-

Immunreaktivität in den Bodenfraktionen des Gradienten dokumentiert den Erfolg der Stimulation (Abb. 16B). Diese hat eine Reduktion der GLUT4-Immunreaktivität im GSV-Bereich des Gradienten von 24,7 % der Gesamtmenge (Fraktionen 6-9) auf 13,4 % (Fraktion 7-10) und einen Anstieg im Bereich der Bodenfraktionen (Fraktion 1 und 2), wo Endosomen und Plasmamembranbruchstücke sedimentieren, von 60,2 % auf 74,5 % zur Folge (Abb. 16A).

Der beschriebene Effekt der Thrombinstimulation auf den GSV-Gipfel ist reproduzierbar. Werden die Werte für die GLUT4-Immunreaktivität aus den sieben durchgeführten Experimenten gemittelt, so kommt es zu einer Abnahme von $26,5 \% \pm 7,2 \%$ auf $13,4 \% \pm 5,5 \%$ im Bereich der GSVs und gleichzeitigen Zunahme von $61,4 \% \pm 10,9 \%$ auf $75,9 \% \pm 9,2 \%$ in den Bodenfraktionen nach Stimulation der Rat1/GLUT4myc-Zellen mit Thrombin. Die Abnahme im Vesikelbereich nach Stimulation der Rat1/GLUT4myc-Zellen ist statistisch signifikant (einseitiger t-Test für paarige Stichproben; $** p < 0,01$).

Diese Befunde sind mit einem Modell vereinbar, nach dem die Thrombinstimulation eine vermehrte Exozytose von GSVs und damit eine Translokation von GLUT4 aus den Vesikeln in die Plasmamembran bewirkt.

Abbildung 16C und D stellt die entsprechenden Verteilungen der Metalloproteasen über den Gradienten in unbehandelten und mit Thrombin inkubierten Rat1/GLUT4myc-Zellen in einem exemplarischen Versuch dar. Nach Thrombinstimulation zeigt sich für ADAM10 (Abb. 16C) eine sehr leichte Abnahme der Immunreaktivität im Vesikelbereich von 18,7 % (Fraktion 7-10) auf 17,2 % (Fraktion 9-11), während der Anteil dieser Protease in den Bodenfraktionen (Fraktion 1 und 2) mit 71,9 % gegenüber den Kontrollbedingungen mit 72 % praktisch unverändert bleibt.

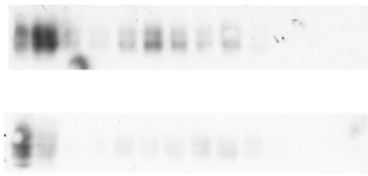
Auch das TACE (Abb. 16D) zeigt einen leichten Abfall im Bereich der GSVs infolge der Thrombinstimulation. Hier nimmt der Anteil im Vesikelbereich nach Stimulation von 22 % (Fraktion 6-9) auf 17 % (Fraktion 6-9) ab, während der Anteil der TACE-Immunreaktivität in den Bodenfraktionen (Fraktion 1 und 2) von 65,5 % auf 71,8 % zunimmt.

Werden die Werte für die ADAM10-Immunreaktivität aus allen durchgeführten Experimenten gemittelt, so zeigt sich mit einer leichten Abnahme von $19,6 \% \pm 3,2 \%$ auf $18,9 \% \pm 5,5 \%$ im Vesikelgipfel und einer ebenfalls leichten Abnahme von $60,7 \% \pm 13,9 \%$ auf $59,4 \% \pm 13,1 \%$ in den Bodenfraktionen nach Stimulation der Rat1/GLUT4myc-Zellen mit Thrombin so gut wie keine Veränderung. Ein anderes Bild ergibt sich für die TACE-Immunreaktivität. Die Mittelwerte zeigen eine Zunahme der TACE-Immunreaktivität von $23,9 \% \pm 10,5 \%$ auf $30,1 \% \pm 10,3 \%$ im Bereich der Vesikel und gleichzeitig eine Abnahme von $60,2 \% \pm 16,9 \%$

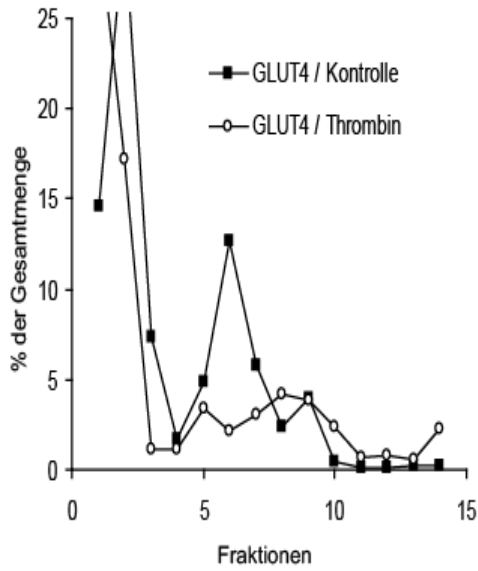
auf $51,3 \% \pm 17 \%$ in den Bodenfraktionen nach Stimulation der Rat1/GLUT4myc-Zellen mit Thrombin. Die Veränderungen der Anteile der beiden Proteasen im Bereich der GSVs nach Thrombinstimulation sind statistisch nicht signifikant (einseitiger t-Test für paarige Stichproben; * $p > 0,05$).

Die dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Abnahme der GLUT4-Menge im GSV-Bereich infolge der Thrombinstimulation nicht mit einer entsprechenden Reduktion der ADAM10- und TACE-Immunreaktivität einhergeht. Dies unterstützt den bei den Untersuchungen mit hypertonem Medium (vergl. Abb. 14) erhobenen Befund, dass die beiden Metalloproteasen sich möglicherweise in einer Subpopulation von GSVs befinden, die ein anderes dynamisches Verhalten zeigt, als die übrigen GLUT4-Vesikel.

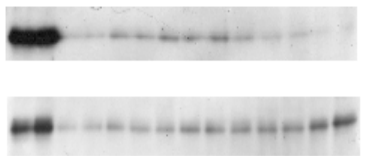
A



B



C



D

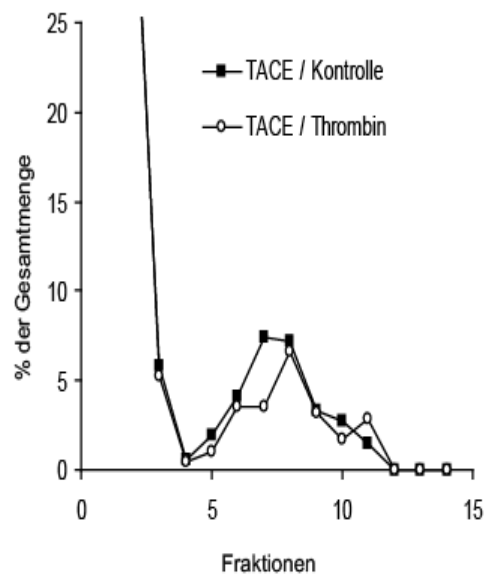
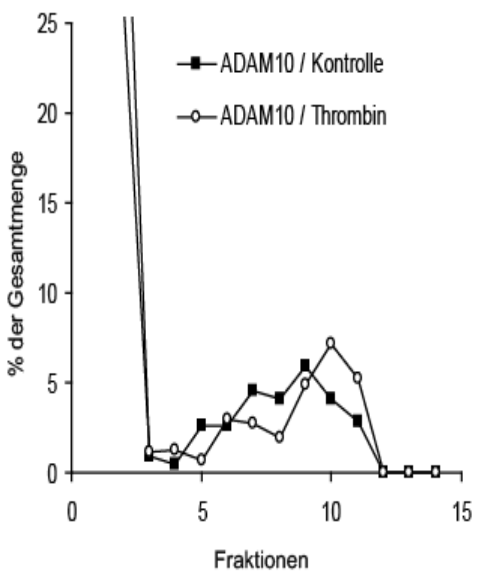
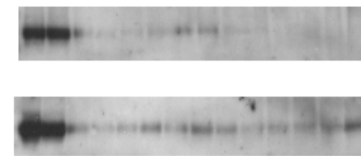


Abb. 16 Verteilung von GLUT4 und hPAR1 sowie der Proteasen ADAM10 und TACE in unbehandelten und mit Thrombin (1 u/ml für 10 min) bei 37° C inkubierten Rat1/GLUT4myc-Zellen. Die Zellen werden mittels Sedimentationsgeschwindigkeitsgradientenzentrifugation subzellulär fraktioniert. Die Verteilung der Proteine in einem exemplarischen Versuch wird mit Hilfe von SDS-PAGE / Western-Blot analysiert und GLUT4, ADAM10 und TACE densitometrisch ausgewertet. Dargestellt ist der in den einzelnen Fraktionen enthaltene prozentuale Anteil der GLUT4- (A), ADAM10- (C), und TACE-Immunreaktivität (D) an den im Gradienten jeweils enthaltenen Gesamtmengen. Im löslichen Bereich des Gradienten ist sowohl bei ADAM10 als auch bei TACE eine Bande zu sehen, die nicht reproduzierbar zu detektieren ist. Da die beiden Proteasen nicht in löslicher Form vorkommen, muss es sich hierbei um eine Kreuzreaktivität handeln. Daher sind die entsprechenden Immunreaktivitäten bei der densitometrischen Auswertung nicht berücksichtigt worden. Das Bandenmuster oberhalb der Auswertung zeigt die Verteilung der GLUT4- (A), ADAM10- (C) und TACE-(D) Immunreaktivität im Western-Blot. Zur Kontrolle des Stimulationserfolgs sind von der hPAR1-Immunreaktivität nur die ersten beiden Bodenfraktionen dargestellt, da nur sie nennenswerte Mengen an plasmamembranständigem Thrombinrezeptor enthalten (B).

Die Gradientenfraktionen sind vom Boden (Fraktion 1) nach oben (Fraktion 14) aufgetragen. Außerhalb des Darstellungsbereichs:

GLUT4 (Kontrolle)	Fraktion 2: 45,6 %
GLUT4 (Thrombin)	Fraktion 1: 57,3 %
ADAM10 (Kontrolle)	Fraktion 1: 34,7 % und 37,2 %
ADAM10 (Thrombin)	Fraktion 1: 46,2 % und 25,8 %
TACE (Kontrolle)	Fraktion 1: 31,6 % und 33,9 %
TACE (Thrombin)	Fraktion 1: 36,9 % und 2: 34,9 %

3.4.4.2 Zelloberflächenanalyse der Rat1/GLUT4myc-Zellen nach Thrombinstimulation

3.4.4.2.1 Quantitative Analyse von GLUT4 auf der Plasmamembran

Um zu überprüfen, ob die Abnahme der GLUT4-Immunreaktivität im Vesikelbereich bei Thrombinstimulation tatsächlich mit einer exozytotischen Umverteilung zur Plasmamembran einhergeht, wird auch hier eine Messung der GLUT4-Immunreaktivität auf der Zelloberfläche durchgeführt.

Dazu werden Rat1/GLUT4myc-Zellen für 10 min in Thrombin enthaltendem Medium (1 u/ml) inkubiert, wie oben beschrieben. Anschließend wird eine Zelloberflächenanalyse durchgeführt, wie in Kap. 2.16 dargestellt.

In Abbildung 17 ist die prozentuale Veränderung der Menge an GLUT4myc-Immunreaktivität auf der Oberfläche von Rat1/GLUT4myc-Zellen gezeigt (n=5). Die Stimulation der Zellen mit Thrombin führt hier zu einer signifikanten Zunahme auf mehr als das Doppelte (von 100 % auf 226 % ± 15,5 %; einseitiger t-Test für paarige Stichproben; ** p < 0,01).

Dies deutet darauf hin, dass die beschriebene GLUT4-Abnahme im Vesikelbereich (siehe Abb. 16) auf einen vermehrten Einbau des Glucosetransporters in die Plasmamembran zurückzuführen ist.

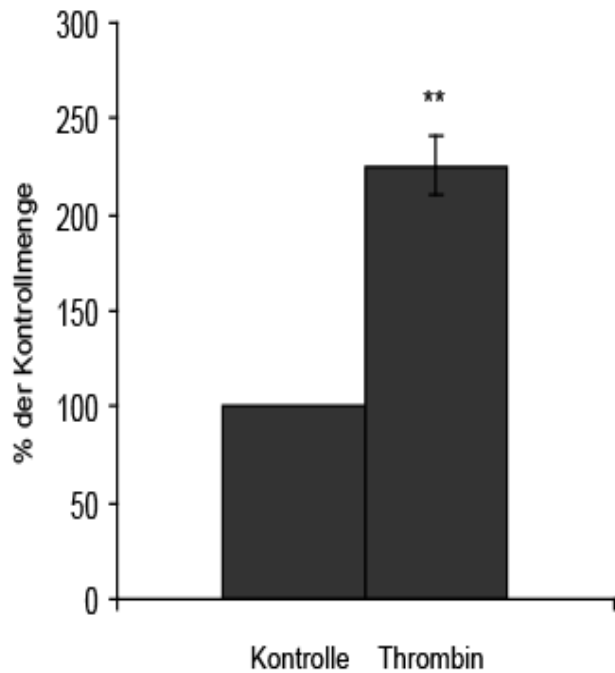


Abb. 17 Analyse der Umverteilung von GLUT4myc aus den GSVs zur Plasmamembran nach Stimulation der Rat1/GLUT4myc-Zellen mit Thrombin. Die Zellen werden nach Stimulation mit Thrombin bzw. Inkubation unter Kontrollbedingungen mittels Zelloberflächenanalyse (n=5) untersucht. Bei einer Zelloberflächenanalyse (n=5) werden die Rat1/GLUT4myc-Zellen mittels eines anti-myc Antikörpers und eines daran bindenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers auf ihren Gehalt an GLUT4myc-Immunreaktivität auf der Außenseite der Plasmamembran hin analysiert. Die Menge an gebundenem Antikörper ist proportional zur Menge eines mittels HRP-umgesetzten chromogenen Substrats. Die Absorption des erhaltenen Reaktionsprodukts wird mittels Spektralphotometer bestimmt und prozentual dargestellt. Als Bezugspunkt (100 %) dient die bei der Analyse von unbehandelten Rat1/GLUT4myc-Zellen gebildete Menge an Reaktionsprodukt (** p < 0,01).

3.4.4.2.2 Quantitative Analyse des Transferrinrezeptors auf der Zelloberfläche

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die durch Thrombin stimulierte Zunahme von GLUT4 auf der Plasmamembran zumindest zum Teil auf einer vermehrten Rezirkulation endosomaler, GLUT4-enhaltender Transportvesikel beruht, wird auch das Verhalten des Transferrinrezeptors bei Stimulation der Zellen mit Thrombin analysiert.

Dafür werden Rat1/GLUT4myc-Zellen erneut mit Thrombin enthaltendem Medium (1 u/ml) für 10 min inkubiert. Es folgt eine Zelloberflächenanalyse, wie in Kap. 2.16 beschrieben.

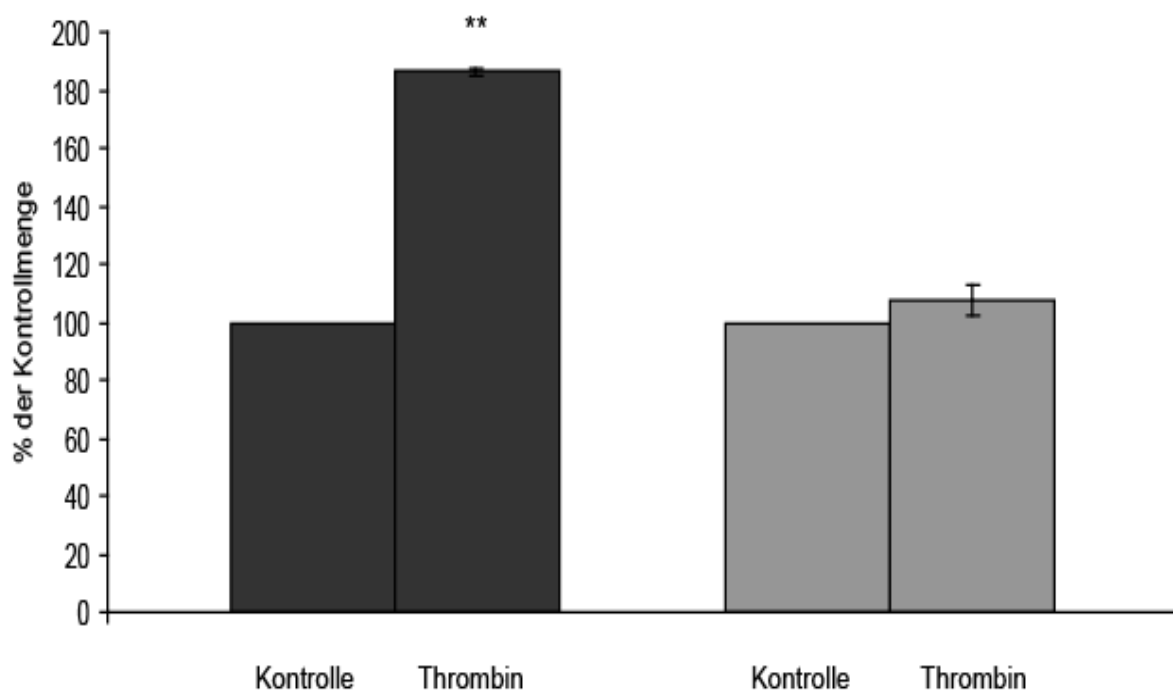


Abb. 18 Analyse der Umverteilung von GLUT4myc und Transferrinrezeptor nach Stimulation der Rat1/GLUT4myc-Zellen mit Thrombin. Die Zellen werden nach Stimulation mit Thrombin bzw. Inkubation unter Kontrollbedingungen mittels Zelloberflächenanalyse (n=3) auf ihren Gehalt an GLUT4myc- (dunkelgrau) und Transferrinrezeptor-Immunität (hellgrau) auf der Außenseite der Plasmamembran hin analysiert. Dabei werden die Rat1/GLUT4myc-Zellen mittels eines anti-myc bzw. anti-Transferrinrezeptor Antikörpers und eines daran bindenden HRP-gekoppelten Sekundäntikörpers untersucht. Die Menge an gebundenem Antikörper ist proportional zur Menge eines mittels HRP-umgesetzten chromogenen Substrats. Die Absorption des erhaltenen Reaktionsprodukts wird mittels Spektralphotometer bestimmt und prozentual dargestellt. Als Bezugspunkt (100 %) dient die bei der Analyse von unbehandelten Rat1/GLUT4myc-Zellen gebildete Menge an Reaktionsprodukt (** p < 0,01 für GLUT4 bzw. * p > 0,05 für den Transferrinrezeptor).

In Abbildung 18 ist die prozentuale Veränderung der Menge an GLUT4myc-Immunreaktivität auf der Oberfläche von Rat1/GLUT4myc-Zellen als Kontrolle für den Stimulationserfolg dargestellt (n=3). Erneut kommt es nach Stimulation der Zellen mit Thrombin zu einer deutlichen, signifikanten Zunahme von GLUT4myc auf der Plasmamembran (von 100 % auf 186 % \pm 1,2 %; einseitiger t-Test für paarige Stichproben; ** p < 0,01). Dagegen verändert sich die Menge des Transferrinrezeptors auf der Zelloberfläche unter Stimulationsbedingungen nicht signifikant (von 100 % auf 108 % \pm 5,7 %; einseitiger t-Test für paarige Stichproben; * p > 0,05).

Dieser Befund deutet darauf hin, dass der endosomale Rezirkulationsweg durch die Thrombinstimulation nicht merklich beeinflusst wird. Das vermehrt in die Plasmamembran eingebaute GLUT4 stammt daher mit hoher Wahrscheinlichkeit vor allem aus GSVs.

3.4.4.3 Stimulation von nicht mit GLUT4myc transfizierten Rat1-Zellen mit Thrombin

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die heterologe Expression von GLUT4 einen Einfluss auf die stimulationsabhängige Dynamik der ADAM10- und TACE-enthaltenden Vesikel hat, werden die Auswirkungen einer Thrombinstimulation auf die beiden Proteasen auch an Rat1-Zellen untersucht, die kein GLUT4 exprimieren.

Dafür werden Rat1-W575-Zellen ebenfalls mit Thrombin für 10 min inkubiert und anschließend über einen Glycerin-Sedimentationsgeschwindigkeitsgradienten (5-25 %) subzellulär fraktioniert. Die erhaltenen Fraktionen werden gefällt und mittels SDS-PAGE / Western-Blot analysiert und densitometrisch ausgewertet.

In Abbildung 19 sind exemplarisch für einen von drei Versuchen die entsprechenden Verteilungen der Metalloproteasen über den Gradienten in stimulierten und unter Kontrollbedingungen inkubierten Rat1-W575-Zellen zu sehen. Das erneute fast vollständige Verschwinden der hPAR1-Immunreaktivität in den Bodenfraktionen des Gradienten zeigt den Erfolg der Stimulation (Abb. 19A). Nach Thrombinstimulation kommt es zu einem leichten Anstieg der ADAM10-Immunreaktivität (Abb. 19B) im Vesikelbereich (Fraktion 7-10) von 16,6 % auf 23,2 %. Gleichzeitig geht der Anteil der Protease ADAM10 in den Bodenfraktionen (Fraktion 1 und 2) von 67,5 % auf 62,6 % zurück.

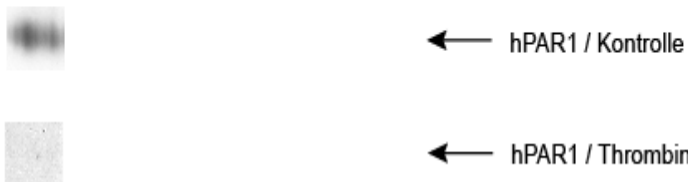
Das TACE (Abb. 19C) zeigt nach Stimulation der Zellen mit Thrombin im Bereich der Vesikel (Fraktion 7-10) einen leichten Abfall von 26,7 % auf 23,2 %, während es im Bereich

der Bodenfraktionen (Fraktion 1 und 2) zu einem Anstieg der TACE-Immunreaktivität von 56,2 % auf 62,8 % kommt.

Werden die Werte aus den drei Versuchen gemittelt, so kommt es zu einer Zunahme der ADAM10-Immunreaktivität von $11,1 \% \pm 4,7 \%$ auf $13,4 \% \pm 9,3 \%$ im Vesikelbereich und zu einer gleichzeitigen Abnahme von $78,6 \% \pm 9,6 \%$ auf $75,5 \% \pm 15,4 \%$ in den Bodenfraktionen nach Stimulation der Rat1-W575-Zellen mit Thrombin. Die TACE-Immunreaktivität nimmt im Mittel nach Inkubation der Zellen mit Thrombin im Bereich der Vesikel von $26,5 \% \pm 5,8 \%$ auf $24,9 \% \pm 3,3 \%$ ab und am Boden des Gradienten von $60,4 \% \pm 10,8 \%$ auf $63,9 \% \pm 4,3 \%$ zu. Die Veränderungen der Anteile der beiden Proteasen im Vesikelbereich des Gradienten nach Thrombinstimulation sind statistisch wiederum nicht signifikant (zweiseitiger Zweistichproben-t-Test für unabhängige Zufallsstichproben; * $p > 0,05$).

Die gezeigten Befunde weisen darauf hin, dass eine Thrombinstimulation auch in Rat1-Zellen, die kein GLUT4 exprimieren, nicht zu einer nennenswerten Abnahme der Mengen an vesikelassoziierten ADAM10 und TACE führt.

A



B



C

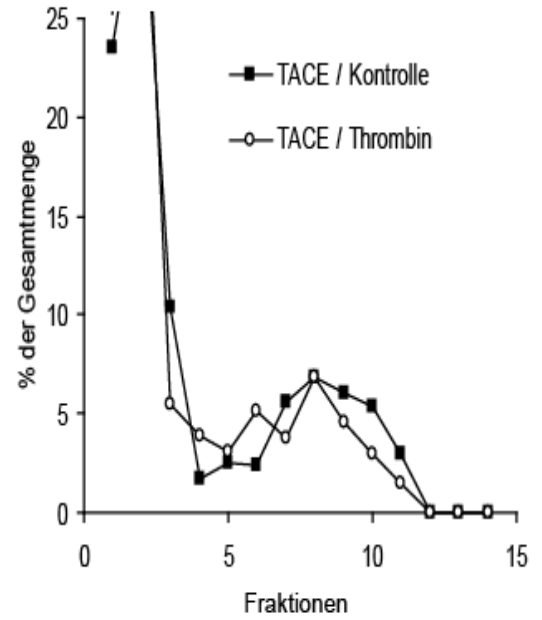
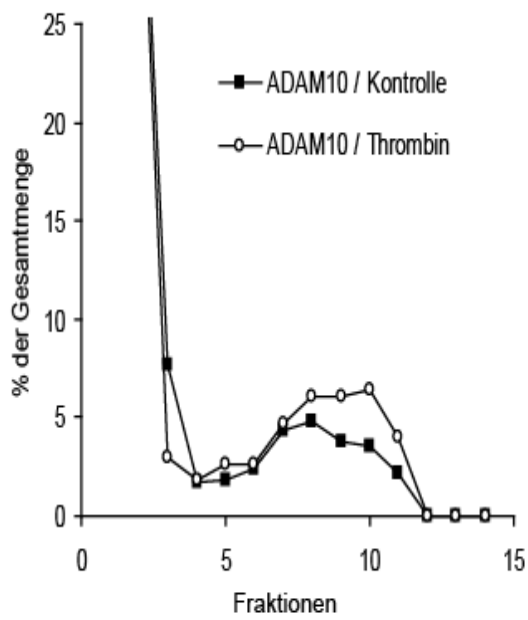
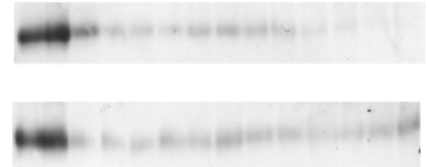


Abb. 19 Darstellung der Verteilung von ADAM10 und TACE in unbehandelten und mit Thrombin inkubierten Rat1-W575-Zellen. Die Zellen werden nach Stimulation mit Thrombin bzw. Inkubation unter Kontrollbedingungen mit Hilfe eines Glycerin-Sedimentationsgeschwindigkeitsgradienten (5-25 %) subzellulär fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen eines exemplarischen Versuchs werden mittels SDS-PAGE / Western-Blot Analyse auf ihren Gehalt an hPAR1 (A), ADAM10 (B) und TACE (C) hin analysiert. Dargestellt sind die relativen Anteile, bezogen auf die jeweilige Gesamtmenge des Gradienten, der densitometrisch bestimmten ADAM10-Immunreaktivität sowie der TACE-Immunreaktivität in den einzelnen Fraktionen. Im löslichen Bereich des Gradienten ist sowohl bei ADAM10 als auch bei TACE eine Bande zu sehen, die nicht reproduzierbar zu detektieren ist. Da die beiden Proteasen nicht in löslicher Form vorkommen, muss es sich hierbei um eine Kreuzreaktivität handeln. Daher sind die entsprechenden Immunreaktivitäten bei der densitometrischen Auswertung nicht berücksichtigt worden. Das Bandenmuster oberhalb der Auswertung zeigt die Verteilung der ADAM10- und TACE-Immunreaktivität im Western-Blot. Zur Kontrolle des Stimulationserfolgs sind von der hPAR1-Immunreaktivität nur die ersten beiden Bodenfraktionen dargestellt, da nur sie nennenswerte Mengen an plasmamembranständigem Thrombinrezeptor enthalten (A).

Außerhalb des Darstellungsbereichs:

ADAM10 (Kontrolle)	Fraktion 1: 29,4 % und 2: 38,1 %
ADAM10 (Thrombin)	Fraktion 1: 26,1 % und 2: 36,6 %
TACE (Kontrolle)	Fraktion 2: 32,7 %
TACE (Thrombin)	Fraktion 1: 25,3 % und 2: 37,7 %

4 Diskussion

GLUT4-Vesikel in Fett- und Muskelzellen spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation des Blutzuckerspiegels. Sie dienen der intrazellulären Speicherung von GLUT4 in Abwesenheit von Insulin und dem raschen exozytotischen Einbau dieses Glucosetransporters in die Plasmamembran bei Insulinstimulation (Übersichtsartikel: James et al., 1994; Pessin et al., 1999; Simpson et al., 2001; Dugani & Klip, 2005; vergl. Kap. 1.1). Auch in verschiedenen Zelllinien, die normalerweise kein GLUT4 exprimieren, wie z.B. PC12-, CHO-, und 3T3-Zellen können solche GSVs nach Transfektion mit dem Glucosetransporter identifiziert werden (Herman et al., 1994). Welche physiologische Bedeutung die Speichervesikel in den zuletzt genannten Zelltypen haben, ist bisher völlig ungeklärt. Ein Vergleich von GSVs aus transfizierten CHO-Zellen mit authentischen GSVs aus Fett- und Muskelzellen zeigt zahlreiche Gemeinsamkeiten: Die Vesikel haben einen Durchmesser von 60-90 nm. Sie enthalten neben GLUT4 die Aminopeptidase IRAP sowie das kleine G-Protein Rab4. In Abwesenheit von Insulin rezirkulieren die GSVs konstitutiv. An ihrer Biogenese ist ein endosomales Donorkompartiment beteiligt (Herman et al., 1994; Wei et al., 1998; Lim et al., 2001). Auf Grund dieser Übereinstimmungen wurde ein Modell postuliert, nach dem GSV-artige Speichervesikel in vielen, wenn nicht allen, Säugerzelltypen für die intrazelluläre Speicherung und die regulierte Exozytose spezifischer Plasmamembranproteine zuständig sein könnten (Herman et al., 1994). Ein Ansatz zur Überprüfung dieser Arbeitshypothese besteht in der Analyse von GSVs aus Zellen, die normalerweise kein GLUT4 exprimieren, auf ihren Gehalt an Membranproteinen, die unter Stimulationsbedingungen auf der Zelloberfläche akkumulieren und auf eine mögliche regulierte Exozytose.

Beide Fragestellungen stehen im Zentrum der vorliegenden Arbeit. Als Untersuchungsobjekt dienen hierbei Rat1-Zellen. Diese Zelllinie exprimiert mindestens ein Protein, dessen Aktivität unter Stimulationsbedingungen auf der Zelloberfläche stark ansteigt. Hierbei handelt es sich um eine proHB-EGF hydrolysierende Protease (Prenzel et al., 1999). Darüber hinaus ist auch die Bildung von GSVs in Rat1-Zellen bereits nachgewiesen worden (Bonzelius & Herman, unveröffentlichte Daten; Fohrer, Diplomarbeit, 2001). Ein weiterer Vorteil des hier verwendeten Rat1-Klons ist, dass er den humanen Thrombinrezeptor, einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, stabil überexprimiert. Die Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren führt zu der von Prenzel et al. (1999) beschriebenen Zunahme der Proteaseaktivität auf der Oberfläche dieser Zellen. Darüber hinaus stimuliert der aktivierte

Thrombinrezeptor $G_{\alpha q}$ (LaMorte et al., 1993) die gleiche G-Protein-Untereinheit, die bei Aktivierung des Endothelin-Rezeptors eine Translokation von GSVs in Adipozyten vermittelt (Ishibashi et al., 2001; siehe Kap. 1.1.1.1). Damit ist zumindest ein potentieller Stimulus zur Auslösung einer Exozytose der GSVs bekannt, der gleichzeitig auch eine Aktivitätszunahme endogen exprimierter Membranproteine auf der Zelloberfläche bewirkt (vergl. Kap. 4.4.1).

4.1 Stabile Expression von GLUT4

Frühere Untersuchungen zeigen, dass eine transiente Expression von GLUT4 in den hier verwendeten Rat1-Zellen nur sehr unbefriedigende Ergebnisse liefert. Zum einen ist die Expressionsrate des Glucosetransporters unter diesen Bedingungen sehr niedrig, und zum anderen scheint auch die Menge an stabil exprimiertem Thrombinrezeptor vermindert zu sein (Bonzelius & Herman, unveröffentlichte Daten).

Aus diesem Grund sind für die vorliegende Untersuchung stabile Transfektanten der Rat1-Zellen mit einem GLUT4myc-Konstrukt hergestellt worden. Rat1-Zellen waren bereits früher schon einmal mit Wildtyp-GLUT4 aus der Ratte stabil transfiziert worden (Fohrer, Diplomarbeit, 2001). Damals wurde der pcDNA3-Expressionsvektor verwendet, der eine G418-Resistenz enthält. Da die Zelllinie, die den humanen Thrombinrezeptor exprimiert, bereits über eine G418-Resistenz verfügt, waren die positiven Klone über eine Cotransfektion mit dem sogenannten pTracer-Plasmid, das eine Zeozin-Resistenz trägt, selektiert worden. Die Transfektionseffizienz war mit zwei von über einhundert analysierten, Zeozin-resistenten Klonen sehr gering gewesen. Auch war die Intensität der GLUT4-Expression beider Klone zu niedrig, um Experimente wie die Immunadsorption von GSVs durchführen zu können. Des Weiteren kann GLUT4 bei beiden Klonen nicht selektiv auf der Plasmamembran detektiert werden, da es keine Antikörper gegen die extrazellulären Domänen des Glucosetransporters gibt. Aus diesem Grund ist für die vorliegende Arbeit ein Vektor mit einem GLUT4-Konstrukt verwendet worden, das ein myc-Epitop in der ersten extrazellulären Domäne trägt (pcXN2-GLUT4myc). Auch dieser Vektor verfügt über eine G418-Resistenz. Daher wird diese Resistenz aus dem pcXN2-Vektor entfernt und durch eine Zeozin-Resistenz ersetzt. Bei der anschließenden stabilen Transfektion der Rat1-Zellen mit diesem Vektor zeigen sechs der insgesamt 48 analysierten Klone (13 %) eine GLUT4myc-Expression. Die Transfektionseffizienz ist in diesem Fall also weitaus höher als bei der beschriebenen Cotransfektion von

GLUT4-cDNA und Zeozin-Resistenz, die sich in zwei verschiedenen Vektoren befanden (Fohrer, Diplomarbeit, 2001). Jedoch ist der Anteil der positiven Klone etwas niedriger als für die stabile Transfektion von CHO-, PC12- und 3T3-Zellen mit GLUT4 beschrieben (Herman et al., 1994). Unter den von den Autoren genannten Bedingungen sind jeweils etwa 20 % der selektierten Klone GLUT4-positiv. Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass der verwendete Rat1-Klon prinzipiell schwierig zu transfizieren ist.

Die Analyse der intrazellulären Lokalisation von GLUT4 mittels subzellulärer Fraktionierung zeigt die gleiche Verteilung, die für Adipozyten sowie transfizierte CHO-, PC12- und 3T3-Zellen beschrieben ist (Herman et al., 1994). Ein deutlicher Gipfel markiert die Lokalisation der GSVs etwa in der Mitte des Glyceringradienten und ein zweites Maximum zeigt sich in den Bodenfraktionen. Da die GSVs in Rat1/GLUT4myc-Zellen das gleiche Sedimentationsverhalten zeigen wie in transfizierten CHO-, PC12- und 3T3-Zellen, kann man davon ausgehen, dass sie auch etwa die gleiche Größenverteilung aufweisen. Die Identität der GLUT4-enthaltenden Membrankompartimente am Boden des Gradienten lässt sich nicht eindeutig klären, da hier ein Gemisch aus verschiedenen, großen Membranen sedimentiert. In diesem Bereich können Marker für endosomale Kompartimente und das TGN (Wei et al., 1998) sowie für die Plasmamembran (Lim et al., 2001) detektiert werden.

4.2 Ist eine proHB-EGF hydrolysierende Protease in Rat1/GLUT4myc-Zellen mit GSVs assoziiert?

GLUT4 ist, wie beschrieben, ein essentieller Marker für den Nachweis von GSVs und eröffnet darüber hinaus die Möglichkeit, die Vesikel mittels Immunadsorption weiter aufzureinigen. Die Funktion der GSVs in Rat1-Zellen lässt sich jedoch nur anhand ihrer endogen exprimierten Membranproteine erschließen. Daher werden die GSVs in der vorliegenden Arbeit unter anderem gezielt auf ihren Gehalt an einem endogenen Membranprotein hin untersucht, dessen Funktion bekannt ist und dessen biologische Aktivität auf der Zelloberfläche über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren reguliert wird (vergl. Kap. 1.2). Auf diese Weise soll nicht nur die Membranzusammensetzung der GSVs weiter charakterisiert werden, sondern vor allem die oben genannte Arbeitshypothese zur Funktion dieser Vesikel experimentell überprüft werden. Bei dem genannten Membranprotein handelt es sich um die in Rat1-Zellen und anderen Zelllinien von Prenzel et al. (1999) teilweise charakterisierte proHB-EGF hydrolysierende Proteaseaktivität. Diese Enzymaktivität setzt auf der Zelloberfläche durch hydrolytische Spaltung aus proHB-EGF den löslichen Wachstumsfaktor HB-EGF frei. HB-EGF ist ein autokrin bzw. parakrin wirkender Botenstoff, der zur Familie der EGF-Rezeptor-Liganden gehört. Die Aktivierung dieses Rezeptors durch HB-EGF spielt beispielsweise bei der Zellproliferation und der Wundheilung eine Rolle (siehe Kap. 1.2.1). Nach den Befunden von Ullrich und Mitarbeitern (Daub et al., 1996) exprimieren auch Rat1-Zellen den EGFR auf der Plasmamembran. Er scheint hier vor allem an der Regulation der DNA-Synthese und der Zellproliferation beteiligt zu sein.

4.2.1 Charakterisierung der Lokalisation einer proHB-EGF spaltenden Proteaseaktivität in Rat1/GLUT4myc-Zellen

Eine Schwierigkeit bei der Arbeit mit der proHB-EGF spaltenden Enzymaktivität liegt darin begründet, dass kein kommerziell erhältliches Substrat existiert, dessen Umsetzung leicht bestimmt werden kann. Da es sich bei proHB-EGF um ein Glykoprotein handelt (Übersichtsartikel: Massague & Pandiella, 1993), kann dieses natürliche Substrat auch nicht aus transformierten Bakterien gewonnen werden. Aus diesem Grund wird das proHB-EGF in einer Säugerzelle (CHO/GLUT4-Zellen) überexprimiert und anschließend grob aufgereinigt. Die Verwendung eines Konstruktes mit einem VSVG-Epitop am carboxyterminalen Ende erlaubt die einfache Detektion von Hydrolyseprodukten nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Western-Blot.

Als Zelloberflächenprotein sollte das VSVG-proHB-EGF vor allem in der Plasmamembran, eventuell aber auch im ER und im Golgi-Apparat akkumulieren. Nach Dichtegradientenzentrifugation zeigen sich dann auch zwei VSVG-proHB-EGF Gipfel im Saccharosegradienten, von denen einer in einem Bereich liegt, in dem die Plasmamembran nach den Befunden anderer Autoren sedimentiert (ca. 40 % Saccharose, Clift-O'Grady et al., 1998). Mit dem im Bereich der Plasmamembran angereicherten Protein steht bereits ein durchaus brauchbares Substrat zur Verfügung, so dass auf eine weitergehende Aufreinigung verzichtet werden kann.

Interessanterweise scheinen nicht alle VSVG-proHB-EGF Formen unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen gleichermaßen hydrolysiert zu werden. In der Mehrzahl der Versuche ist vor allem eine Bande mit M_r ca. 17 kDa betroffen.

Grundsätzlich eignet sich die Intensitätsabnahme einzelner Banden eher als Maß für die Hydrolyse von VSVG-proHB-EGF als die Zunahme von Abbauprodukten geringeren Molekulargewichts, da Hydrolyseprodukte ohne vollständigen Carboxyterminus wegen des fehlenden VSVG-Epitops nicht nachgewiesen werden können. Das von Prenzel et al. (1999) hauptsächlich detektierte Abbauprodukt mit M_r ca. 9 kDa tritt hier gar nicht in Erscheinung. Dies liegt möglicherweise daran, dass die genannten Autoren für ihre Analyse der proHB-EGF Spaltung zum Teil Tris-Tricin-SDS Gele verwenden (Schägger & von Jagow, 1987), die sich besonders gut zur Auftrennung niedermolekularer Polypeptide eignen.

Die hier vorgestellte Untersuchung zeigt deutlich, dass tatsächlich mindestens eine Protease mit den GSVs aus Rat1-Zellen assoziiert ist, die die 17 kDa-Form von proHB-EGF reproduzierbar spaltet. Mittels Immunadsorption ist die GSV-assoziierte proteolytische

Aktivität weiter untersucht worden. Dabei zeigt sich, dass etwa $\frac{2}{3}$ der proHB-EGF hydrolysierenden Proteaseaktivität(en) mit GLUT4 in GSVs colokalisiert sind. Das verbleibende Drittel der Protease(n) scheint in anderen Vesikeln vorzukommen, die die gleiche Größe wie GSVs haben, aber kein GLUT4 enthalten. Interessanterweise ist dieses Verhältnis der Colokalisation mit GSVs ähnlich wie das der IRAP, die ein gut untersuchtes GSV-assoziiertes Protein ist. Auch die Vesikel-assoziierte IRAP ist in verschiedenen Zelltypen zu ca. 70 % mit GLUT4 colokalisiert (Lee et al., 1999; Müller et al., unveröffentlichte Daten; Übersichtsartikel: Keller, 2004), während rund 30 % Teil von anderen Vesikeln sind, die die gleiche Größenverteilung wie GSVs aufweisen.

Es existieren derzeit verschiedene zum Teil widersprüchliche Hinweise darauf, welche Ektoproteasen proHB-EGF unter physiologischen Bedingungen spalten. Suzuki et al. (1997) zeigen, dass die Metalloprotease MMP-3 eine Chimäre aus HB-EGF und der alkalischen Phosphatase *in vitro* hydrolysiert. MMP-3 kommt aber als GSV-assoziiertes Membranprotein nicht in Frage, weil es sich hierbei um ein lösliches Enzym handelt, das in den Extrazellulärraum ausgeschüttet wird. Die Befunde von Izumi et al. (1998) deuten darauf hin, dass die Metalloprotease ADAM9 in Vero-H-Zellen eine Rolle bei der Spaltung von proHB-EGF spielt. Die von Prenzel et al. (1999) beschriebene Hydrolyse des proHB-EGF in verschiedenen Zelllinien lässt sich jedoch nicht durch die Expression einer dominant-negativen Mutante von ADAM9 hemmen. Daher scheint es sich in Rat1-Zellen um eine andere proHB-EGF hydrolysierende Protease als ADAM9 zu handeln. Auch ADAM10 (in COS7-Zellen; Yan et al., 2002), ADAM12 (in primären Kardiomyozyten; Asakura et al., 2002) und TACE (in primären Fibroblasten; Sunnarborg et al., 2002) können proHB-EGF hydrolysieren. In einer weiteren Studie konnte jedoch keine hydrolytische Spaltung von proHB-EGF durch ADAM9 und ADAM12 in Fibroblasten aus Mausembryonen detektiert werden (Sahin et al., 2004). ADAM10 und TACE zeigen dagegen auch bei dieser Untersuchung eine entsprechende Aktivität. Die Autoren spekulieren, dass das widersprüchliche Verhalten von ADAM9 und ADAM12 bei verschiedenen Untersuchungen möglicherweise auf die unterschiedlich starke Expression der beiden Proteasen in den verwendeten Zelltypen zurückzuführen ist.

4.2.2 Sind die Proteasen ADAM10 und TACE mit GSVs assoziiert?

Von den drei vielversprechendsten Kandidaten für eine GSV- und Plasmamembran-assoziierte proHB-EGF hydrolysierende Aktivität - ADAM10, ADAM12 und TACE - werden ADAM10 und TACE analysiert. ADAM12 ist nicht untersucht worden, da es keinen gut charakterisierten kommerziell erhältlichen Antikörper gibt, der unter den hier verwendeten Bedingungen mit ADAM12 aus der Ratte reagiert. Bei der Analyse von ADAM10 und TACE zeigt sich, dass die beiden Enzyme im Glyceringradienten eine ähnliche Verteilung wie GLUT4 aufweisen. Ein deutliches Maximum im Vesikelbereich demonstriert die Colokalisation mit GSVs bzw. Vesikeln ähnlicher Größe und ein zweiter Gipfel zeigt sich in den Bodenfraktionen. Um die Frage zu beantworten, ob ADAM10 und TACE mit GSVs assoziiert sind, ist eine Immunadsorption durchgeführt worden. Die beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die beiden untersuchten Metalloproteasen nahezu vollständig mit GLUT4 in GSVs colokalisiert sind. Kein anderes bisher mittels Immunadsorption untersuchtes Membranprotein zeigt einen so hohen Grad an Colokalisation mit dem Glucosetransporter in GSVs. ADAM10 und TACE scheinen mit einer Subpopulation von GSVs assoziiert zu sein, die besonders viel GLUT4 enthalten. Hierfür sprechen mehrere Befunde: Beide Proteasen binden zu fast 100 % an die mit anti-GLUT4 Antikörpern gekoppelten magnetischen Beads, während im Mittel etwa 95 % des GLUT4 gebunden wird. In einzelnen Versuchen, bei denen die Bindung von GLUT4 an die mit anti-GLUT4 Antikörpern gekoppelten magnetischen Beads nur ca. 70 % beträgt, werden dennoch fast 100 % der Metalloproteasen gebunden. Darüber hinaus wurde im Rahmen von Vorversuchen auch ein Protokoll getestet, bei dem die GSVs mit Hilfe von Essigsäure (pH 3) von den Beads abgelöst wurden. Hierbei konnten nur weniger als die Hälfte des gesamten GLUT4 und keine detektierbare Mengen an ADAM10 und TACE eluiert werden. Das deutet darauf hin, dass beide Proteasen mit den am stärksten gebundenen GSVs assoziiert sind. Auch dieser Befund ist vereinbar mit der Annahme, dass ADAM10 und TACE Bestandteil einer Subpopulation von GSVs mit besonders hohem GLUT4-Gehalt sind. Damit sind beide Enzyme zumindest mitverantwortlich für den zuvor beschriebenen GSV-assoziierten Anteil an vesikulärer proHB-EGF hydrolysierender Aktivität. Welche Proteasen die verbleibenden 35 % dieser Aktivität ausmachen, die mit anderen Vesikeln assoziiert sind, ist bisher unklar. Der Vorteil eines so komplexen Zusammenspiels verschiedener Enzymaktivitäten liegt wahrscheinlich unter anderem darin, dass die Zelle an mehreren Stellen regulierend in die Prozessierung von proHB-EGF - und vielleicht auch anderer Wachstumsfaktoren - eingreifen kann. Darüber

hinaus ermöglicht die Assoziation unterschiedlicher Zelloberflächenproteine mit verschiedenen Vesikeltypen potentiell eine differentielle Regulation der entsprechenden biologischen Aktivitäten. So werden auf ein spezifisches Signal hin nicht alle Vesikel-assoziierten Proteine zur Plasmamembran transportiert.

4.3 Assoziation des humanen Thrombinrezeptors und eines TGN-Markerproteins mit intrazellulären Membrankompartimenten in Rat1/GLUT4myc-Zellen

Befunde anderer Autoren (Hein et al., 1994) deuten darauf hin, dass auch der von Rat1-W575-Zellen stabil exprimierte humane Thrombinrezeptor in einem intrazellulären Speicherkompartiment akkumuliert. Aus diesem Kompartiment kann hPAR1 unter Stimulationsbedingungen zur Zelloberfläche mobilisiert werden. Die physiologische Bedeutung eines solchen Speicherkompartiments liegt sehr wahrscheinlich darin, dass bei länger anhaltender Stimulation ein intrazellulärer Vorrat an fertig synthetisiertem Rezeptor schnell als Ersatz für den hydrolysierten Thrombinrezeptor auf der Plasmamembran verwendet werden kann (Übersichtsartikel: Coughlin, 1999; Coughlin, 2000). Es liegt daher nahe, eine mögliche Assoziation von hPAR1 mit GSVs in Rat1/GLUT4myc-Zellen zu überprüfen. Die hier erhobenen Daten zeigen, dass der humane Thrombinrezeptor tatsächlich in der Mitte des Gradienten mit einer Population von Vesikeln assoziiert ist. Die Hauptmenge des Vesikel-assoziierten Thrombinrezeptors sedimentiert im Glyceringradienten jedoch etwas schneller als GLUT4 und scheint daher in Vesikeln lokalisiert zu sein, die etwas größer sind als GSVs. Die unterschiedliche Identität von GLUT4- und hPAR1-Vesikeln konnte im Rahmen einer Immunadsorption bestätigt werden.

Da GLUT4 im Rahmen seiner Biosynthese vorübergehend mit Elementen des TGN assoziiert ist, sollte auch untersucht werden, ob TGN-Vesikel möglicherweise Bestandteil des GSV-Gipfels im Gradienten sind. Die subzelluläre Verteilung von TGN38 zeigt ein deutlich nach rechts verschobenes Maximum im Vergleich zu GLUT4. Dies weist darauf hin, dass TGN-Vesikel einen kleineren Durchmesser als GSVs aufweisen. Mit dem hier verwendeten Fraktionierungsprotokoll werden die TGN-Vesikel also bereits gut von den GSVs abgetrennt. Zusätzlich ist mittels Immunadsorption überprüft worden, ob es eine messbare Colokalisation

von vesikulärem GLUT4 mit vesikulärem TGN38 gibt. Hierbei zeigt sich keine statistisch signifikante Assoziation von TGN38 mit GLUT4-enhaltenden Vesikeln. Der Großteil der Proteasen ADAM10 und TACE, die mit GSVs assoziiert sind, zeigt im Glyceringradienten keinerlei Überlappung mit TGN-Vesikeln, da die Metalloproteasen im Gegensatz zu TGN38 in größeren vesikulären Kompartimenten vorkommen. Diese Befunde weisen darauf hin, dass es sich bei der Subpopulation der Vesikel, mit denen ADAM10 und TACE assoziiert sind, nicht um TGN-Vesikel handelt. Ein ähnliches Bild ergibt sich aus der unterschiedlichen Verteilung des Thrombinrezeptors und des TGN-Markers im Gradienten. Auch hier ist keine Überlappung beider Proteine erkennbar. Der Vesikel-assoziierte hPAR1 sedimentiert deutlich schneller als TGN38.

4.4 Dynamik der GSVs in Rat1/GLUT4myc-Zellen

4.4.1 Analyse der regulierten Exozytose der GSVs

Nachdem der erste Teil unserer Arbeitshypothese, dass ADAM10 und TACE Bestandteil von GSVs sind, bestätigt werden konnte, stellt sich nun natürlich die Frage, ob die beiden Proteasen auch mittels regulierter Exozytose in die Plasmamembran eingebaut werden. In Fett- und Muskelzellen konnte eine regulierte Exozytose von GSVs schon gezeigt werden, jedoch nicht in Zelltypen, die endogen kein GLUT4 enthalten. Um dies zu untersuchen, sind Rat1/GLUT4myc-Zellen mit Thrombin, das den von diesen Zellen heterolog exprimierten humanen Thrombinrezeptor aktiviert, stimuliert worden. Dabei ist es zu einer Abnahme von GLUT4 im Bereich der GSVs im Gradienten und einer damit einhergehenden Zunahme am Boden des Gradienten, wo Endosomen und Plasmamembranbruchstücke sedimentieren, gekommen. Dies deutet zwar bereits auf eine Translokation hin. Im Hinblick auf die Zunahme von GLUT4 auf der Plasmamembran ist der Befund alleine jedoch noch nicht sehr aussagekräftig, da am Boden des Gradienten verschiedene Kompartimente sedimentieren. Daher ist ergänzend auch eine Zelloberflächenanalyse durchgeführt worden. Bei diesem experimentellen Ansatz bestätigte sich die deutliche Zunahme von GLUT4myc auf der Plasmamembran, die offensichtlich mit einer Abnahme im Bereich der GSVs einhergeht.

Auch in vaskulären Skelettmuskelzellen aus der Ratte führt eine Stimulation mit Thrombin zu einer erhöhten Glucoseaufnahme. Dies scheint jedoch nicht mit einer GLUT4-Translokation einher zu gehen (Kanda & Watanabe, 2005). Dagegen führt die Thrombinstimulation in Rat1/GLUT4myc-Zellen zu der oben beschriebenen GLUT4-Translokation. Das gegensätzliche Verhalten des Glucosetransporters kann eventuell auf unterschiedliche Inkubationszeiten zurückzuführen sein. Die vaskulären Skelettmuskelzellen werden doppelt so lange (20 min) wie die Rat1/GLUT4myc-Zellen mit Thrombin stimuliert. Die Untersuchungen von Hein et al. (1994) zeigen, dass bei einer längerfristigen Stimulation des Thrombinrezeptors in verschiedenen Zelltypen bereits nach wenigen Minuten der als Reaktion gemessene intrazelluläre Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration wieder zurück geht. Anschließend verhalten die Zellen sich für 10-20 min refraktär gegenüber weiteren Stimuli. Das heißt, im Laufe der von Kanda & Watanabe (2005) beschriebenen 20minütigen Stimulation könnte es nach einer

anfänglichen GLUT4-Translokation bereits wieder zu einer Rückverteilung in den Ausgangszustand gekommen sein.

Bei den hier dargestellten Befunden handelt es sich um die erste Beschreibung einer stimulierten GSV-Exozytose in nicht-Fett- und -Muskelzellen, die über die unter bestimmten Bedingungen ebenfalls stimulierbare Exozytose endosomaler Transportvesikel hinausgeht. So zeigten McGraw und Mitarbeiter bei der Stimulation von transfizierten CHO-Zellen mit Insulin zwar ebenfalls eine Zunahme von GLUT4 auf der Plasmamembran. Sie stellten jedoch auch eine parallele Erhöhung des Transferrinrezeptors auf der Zelloberfläche fest. Die Menge beider Markerproteine auf der Plasmamembran erhöhte sich gleichermaßen auf etwa das Doppelte. Da es sich bei dem Transferrinrezeptor um ein endosomales Markerprotein handelt, folgerten die Autoren, dass es nach Insulinstimulation zu einer vermehrten Exozytose endosomaler Transportvesikel, die u.a. auch GLUT4 enthalten, kommt (Übersichtsartikel: Maxfield & McGraw, 2004). Die Daten der Zelloberflächenanalyse in Rat1/GLUT4myc-Zellen zeigen jedoch keine nennenswerte Veränderung des Transferrinrezeptors auf der Plasmamembran, während die GLUT4myc-Menge um mehr als 100 % zunimmt. Möglicherweise liegt dies an den unterschiedlichen Stimuli. Insulin scheint die Exozytose endosomaler Transportvesikel in CHO-Zellen zu beschleunigen, während die Aktivierung des G-Proteingekoppelten Thrombinrezeptors spezifisch auf die GSV-Exozytose zu wirken scheint. Auch ist das Ausmaß der Umverteilung von GSVs offenbar zelltypspezifisch. Es entspricht in Rat1/GLUT4myc-Zellen etwa dem Ausmaß der stimulierten Umverteilung von GLUT4 in humanen Fettzellen. Bei diesen Zellen kommt es nach Stimulation mit Insulin zu einer zwei- bis dreifachen Zunahme von GLUT4 auf der Zelloberfläche. Wird Insulin jedoch zu Fettzellen aus der Ratte gegeben, so kommt es zu einem Anstieg von GLUT4 auf der Plasmamembran um das 20fache (Übersichtsartikel: Ishiki & Klip, 2005).

Die nach den in Kap. 3.3.3 dargestellten Befunden in GSVs von Rat1/GLUT4myc-Zellen enthaltenen Metalloproteasen ADAM10 und TACE können durch Aktivierung G-Proteingekoppelter Rezeptoren aktiviert werden (Prenzel et al., 1999). Da die GSV-Exozytose, wie gezeigt, in diesen Zellen über den Thrombinrezeptor stimulierbar ist, sollte man annehmen, dass eine Thrombinstimulation auch zu einer Erhöhung der Menge der beiden Enzyme auf der Zelloberfläche führt. Um auch diesen Teil der Arbeitshypothese zu überprüfen, sind die Proteasen ADAM10 und TACE unter den gleichen Stimulationsbedingungen untersucht worden wie GLUT4. Überraschenderweise zeigt sich im Gegensatz zu GLUT4 jedoch keine nennenswerte Abnahme im Bereich der GSVs im Gradienten. Das heißt, die Aktivierung des

Thrombinrezeptors bewirkt im Falle der Metalloproteasen keine Umverteilung zur Plasmamembran. Auch in nicht mit GLUT4myc transfizierten Rat1-Zellen zeigen die Metalloproteasen das gleiche Verhalten wie in Rat1/GLUT4myc-Zellen: Es kann keine deutliche Abnahme von ADAM10- bzw. TACE-Immunreaktivität im Bereich der kleinen Vesikel im Gradienten nach Stimulation mit Thrombin detektiert werden. Das beobachtete Verhalten von ADAM10 und TACE bei Thrombinstimulation ist also offenbar unabhängig von der heterologen GLUT4-Expression. Möglicherweise zeigt die Subpopulation der GSVs, in der sich die beiden Metalloproteasen in Rat1/GLUT4myc-Zellen vermutlich befinden (siehe Kap. 3.4.2), ein anderes dynamisches Verhalten, als die übrigen GLUT4-enthaltenden Vesikel. So könnte die Translokation der Metalloproteasen-enthaltenden GSVs auf ein anderes, bisher unbekanntes Signal hin ausgelöst werden. Auf diese Weise würden auf das gleiche Signal hin nicht alle vesikulär gespeicherten Membranproteine zur Plasmamembran mobilisiert werden, da sich diese in unterschiedlichen GSV-Subpopulationen befinden. Eine solche differentielle Regulation wäre physiologisch durchaus sinnvoll, da die Zelle auf diese Weise sehr spezifisch und gezielt auf veränderte Umweltbedingungen reagieren könnte.

Bei den Ektoproteasen-enthaltenden GSVs könnte es sich aber auch um eine Subpopulation handeln, die statisch unter den beschriebenen Stimulationsbedingungen ist, wie die von James und Mitarbeitern beschriebene „latente“ GSV-Population. Nach diesem Modell wird GLUT4 vom Endosom zu einem spezialisierten Subkompartiment des TGN geleitet, das auch die GSVs umfasst. Diese fusionieren bei Insulinstimulation mit dem Recycling-Endosom, das mit der Plasmamembran über Transportvesikel in Verbindung steht. Die „latente“ GSV-Population kann unter den verwendeten Bedingungen jedoch nicht durch Insulin mobilisiert werden (Coster et al., 2004; Übersichtsartikel: Bryant et al., 2002; Dugani & Klip, 2005). Möglicherweise werden diese „latenten“ GSVs im Sinne einer Reservepopulation erst bei deutlich stärkerer Insulinstimulation im Falle von Adipozyten bzw. Thrombinstimulation im Falle der Rat1/GLUT4myc-Zellen zur Exozytose veranlasst.

Interessanterweise wurde kürzlich die stimulationsabhängige Exozytose von ADAM10 in Ovarienkarzinom-Zellen gezeigt. Hierbei war ADAM10 jedoch in sogenannten Exosomen lokalisiert, die bei Exozytose als Vesikel in den Extrazellulärraum ausgeschüttet werden (Stoeck et al., 2006). Es kam daher nicht zu einem vermehrten Einbau der Protease in die Plasmamembran.

4.4.2 Charakterisierung der GSV-Rezirkulation

Bei der Analyse des Rezirkulationswegs der GSVs in Rat1/GLUT4myc-Zellen werden die genannten Zellen in hypertonem Medium inkubiert. Hypertones Medium blockiert die Rezirkulation verschiedener Vesikeltypen durch Inhibition der Clathrin-vermittelten Endozytose, während die konstitutive Exozytose unbeeinflusst bleibt (Wei et al., 1998; Janez et al., 2000; Li et al., 2001). Dies basiert wahrscheinlich auf einer Blockade der Interaktion zwischen Clathrin und dem Adaptorproteinkomplex HA2 an der cytosolischen Seite der Plasmamembran. In unbehandelten Zellen bilden mehrere Adaptorproteine einen Komplex, der Clathrin an die intrazelluläre Seite der Plasmamembran bindet. Die Wechselwirkungen zwischen benachbarten Adaptorproteinen und Clathrinmolekülen führen zur Bildung Clathrin-beschichteter Vertiefungen, die sich in die Zelle einstülpen und sich zu Clathrin-umhüllten Vesikeln abschnüren. Werden die Zellen jedoch in hypertonem Medium inkubiert, so interagiert Clathrin nicht mit dem Adaptorproteinkomplex (Hansen et al., 1993). Auch in Rat1/GLUT4myc-Zellen konnte nach subzellulärer Fraktionierung eine Tendenz zur Abnahme des GLUT4-Gipfels in der Mitte des Glyceringradienten im Bereich der Speichervesikel und eine damit einhergehende Zunahme am Boden des Gradienten beobachtet werden. Auch hier ist eine ergänzende Zelloberflächenanalyse durchgeführt worden. Diese zeigte eine signifikante Zunahme von GLUT4myc auf der Plasmamembran nach Zugabe von hypertonem Medium. Die genannten Befunde deuten darauf hin, dass auch in Rat1/GLUT4myc-Zellen GSVs konstitutiv rezirkulieren, weil die Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose mit hypertonem Medium zu einer Anreicherung von GLUT4myc auf der Zelloberfläche bei gleichzeitiger Abnahme im Bereich der GSVs führt. Im Gegensatz zu GLUT4 zeigt sich bei der ADAM10- und TACE-Immunreaktivität eher ein Trend zur Zunahme im Bereich der GSVs nach Inkubation der Zellen in hypertonem Medium. Allem Anschein nach rezirkuliert die Subpopulation der GSVs, mit der ADAM10 und TACE assoziiert sind, nicht über die Plasmamembran. Dies deckt sich mit dem oben beschriebenen Modell, wonach es sich bei diesen Vesikeln um ein im Hinblick auf den Austausch mit der Zelloberfläche statisches Speicherkompartiment handeln könnte.

4.4.3 Analyse der GSVs unter Temperaturblockbedingungen

Bei der Anwendung des Temperaturblocks wird die Tatsache ausgenutzt, dass der Biosyntheseweg von GSVs an spezifischer Stelle blockiert werden kann. Dabei wird die Formation neuer Speichervesikel aus einem peripheren endosomalen Donorkompartiment blockiert. Hierdurch kommt es in Rat1/GLUT4myc-Zellen zu einer Akkumulation von GLUT4 in den Endosomen, da bei der erniedrigten Temperatur von 15° C weder die Exozytose der GSVs, noch die Endozytose des Glucosetransporters gravierend beeinträchtigt ist. Dieses Phänomen konnte zuvor schon für transfizierte CHO-Zellen gezeigt werden (Wei et al., 1998). Auch der Biogeneseweg von GSVs in Rat1/GLUT4myc-Zellen scheint ein temperatursensitives Kompartiment zu umfassen, da es bei einem 15° C-Block tendenziell zu einer Abnahme des GSV-Markerproteins GLUT4 in der Mitte des Glyceringradienten im Bereich der Speichervesikel kommt. Gleichzeitig führt der 15° C-Block tendenziell zu einer Anreicherung von GLUT4 am Boden des Gradienten, wo Endosomen und Plasmamembranbruchstücke sedimentieren. Ein solcherart temperatursensitives Donor-Kompartiment wurde interessanterweise auch bei der Biogenese einer anderen Klasse spezialisierter Vesikel - den synaptischen Vesikeln - beschrieben (Desnos et al., 1995; Schmidt et al., 1997). Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen generellen Weg für die Biosynthese spezialisierter Vesikel endosomalen Ursprungs. Im Vergleich zu GLUT4 zeigen die beiden Proteasen ADAM10 und TACE ein ähnliches Verhalten unter Temperaturblockbedingungen. Auch hier zeigt sich ein Trend zu einer leichten Abnahme beider Enzyme im Bereich der GSVs bei einer damit einhergehenden Zunahme am Boden des Gradienten, wo große Membrankompartimente sedimentieren. Unter der Annahme, dass die beiden Proteasen sich in einer Reservepopulation von GSVs befinden (siehe Kap. 4.4.1), deutet dies darauf hin, dass auch diese Vesikel konstitutiv mit anderen Kompartimenten fusionieren und neu gebildet werden. Bei dem hypothetischen Fusionspartner handelt es sich allerdings nicht um die Plasmamembran, wie oben ausgeführt. In Frage käme z.B. das von James und Mitarbeitern postulierte Subkompartiment des TGN, das kein TGN38 enthält (Shewan et al., 2003). Ob sich aus diesem Kompartiment dann direkt wieder neue Reserve-GSVs bilden, und ob die Abschnürung von Vesikeln aus diesem spezialisierten Teil des TGN tatsächlich bei 15° C blockiert wird, ist nicht bekannt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die beiden endogenen Proteasen ADAM10 und TACE in Rat1/GLUT4myc-Zellen mit einer Subpopulation von GSVs assoziiert zu sein scheinen. Die vorgestellten Daten zeigen, dass die Stimulation des G-Protein-gekoppelten Thrombinrezeptors in diesen Zellen eine regulierte Exozytose der GSVs auslöst. Die Metalloproteasen-enthaltenden GSVs reagieren jedoch nicht auf diese Art der Stimulation. Sie bilden möglicherweise eine Reservepopulation von GSVs, die erst bei stärkerer Stimulation mobilisiert wird. Unter Ruhebedingungen scheint auch diese Vesikelpopulation über andere intrazelluläre Kompartimente, nicht jedoch über die Plasmamembran, zu rezirkulieren. Um die bisher vorliegenden Befunde zu verifizieren und zu ergänzen, bedarf es natürlich einer Reihe weiterführender Experimente.

4.5 Offene Fragen und Ausblick

Eine wichtige Vorhersage der diesem Projekt zu Grunde liegenden Arbeitshypothese ist die Stimulierbarkeit der Translokation der Metalloproteasen-enthaltenden GSVs zur Plasmamembran. Es konnte in dieser Arbeit ein regulierter exozytotischer Einbau von GLUT4 in die Plasmamembran nach Thrombinstimulation nachgewiesen werden. Ein Stimulus, der zur Translokation der Proteasen ADAM10 und TACE in Rat1/GLUT4myc-Zellen führt, ist jedoch bisher nicht bekannt.

Eine Möglichkeit, die regulierte Exozytose von GSVs in dieser Hinsicht weitergehend zu charakterisieren, wäre eine verstärkte Stimulation der Rat1/GLUT4myc-Zellen mit Thrombin. Wenn es sich bei den ADAM10- und TACE-enthaltenden GSVs tatsächlich um eine Reservepopulation handelt, könnte auf diesem Weg möglicherweise eine Mobilisierung der Vesikel erreicht werden.

Es ist aber auch denkbar, dass es sich bei den Metalloproteasen-enthaltenden GSVs um eine Subpopulation handelt, die auf andere Stimuli reagiert. Daher erscheint auch der Einsatz zusätzlicher Substanzen sinnvoll, für die sowohl eine Stimulation der Aktivität von ADAM10 und/oder TACE sowie eine Wirkung auf die Exozytose von GSVs beschrieben wurde. Hierzu gehören z.B. Phorbolster, die die PKC aktivieren.

Mit Hilfe spezifischer Inhibitoren verschiedener Signaltransduktionsfaktoren könnten die Signalwege weiter charakterisiert werden, die nach Aktivierung des Thrombinrezeptors zur Exozytose der GSVs führen.

Ein sinnvoller Ansatz für die weitere Analyse der Metalloproteasen-enthaltenden GSV-Population wäre die Einbeziehung der t-SNAREs Syntaxin6 und Syntaxin16. Von beiden ist bekannt, dass sie mit GLUT4 in einem spezialisierten Subkompartiment des TGN colokalisiert sind (Shewan et al., 2003), das nach den Befunden der Autoren auch die GSVs umfasst. Beide t-SNAREs können daher als Markerproteine für dieses spezialisierte Kompartiment dienen. Mittels Gradientenzentrifugation und Immunadsorption kann eine Assoziation von Syntaxin6 und Syntaxin16 mit GSVs in Rat1/GLUT4myc-Zellen geklärt werden.

Da ADAM10 und TACE nicht für die gesamte Vesikel-assoziierte proHB-EGF spaltende Enzymaktivität in Rat1-Zellen verantwortlich sind, stellt sich die Frage, welche andere Protease intrazellulär in Rat1-Zellen gespeichert ist. Aus diesem Grund sollte, sobald ein entsprechender Antikörper verfügbar ist, auch die intrazelluläre Lokalisation von ADAM12, das ebenfalls proHB-EGF hydrolysieren kann, analysiert werden.

Um der Frage nachzugehen, ob die intrazelluläre Speicherung von ADAM10 und TACE ein Rat1-zellspezifisches Phänomen ist, müssen weitere Zelltypen in die Untersuchungen einbezogen werden. Von Interesse sind hier vor allem solche Zelllinien, die nach den Befunden von Prenzel et al. (1999) eine stimulierbare proHB-EGF hydrolysierende Enzymaktivität auf der Plasmamembran exprimieren. Dazu gehören z.B. COS7- und HEK293-Zellen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit ist die Struktur und Dynamik von GSVs in Rat1-Zellen mit Hilfe zellbiologischer und proteinbiochemischer Methoden untersucht worden.

Um GSVs eindeutig identifizieren zu können, werden Rat1-Zellen stabil mit GLUT4myc als heterologem Marker für dieses spezifische Speicherkompartiment transfiziert. Zu diesem Zweck wird eine Zeozin-Resistenz als Selektionsmarker in einen GLUT4myc-enthaltenden Vektor eingefügt. Anschließend erfolgt die Transfektion von Rat1-Zellen. Die intrazelluläre GLUT4-Lokalisation in den als positiv identifizierten Rat1/GLUT4myc-Klonen entspricht dem für CHO/GLUT4-Zellen beschriebenen Verteilungsmuster. Nach subzellulärer Fraktionierung mit Hilfe eines Glyceringradienten zeigt sich ein Gipfel in den Bodenfractionen im Bereich großer Membrankompartimente, wie Endosomen und Plasmamembranbruchstücke. Ein zweites charakteristisches Maximum ist im Bereich kleiner Vesikel etwa in der Mitte des Gradienten zu sehen.

In der Folge werden Versuche zur Charakterisierung der Membranzusammensetzung der in Rat1/GLUT4myc-Zellen identifizierten GSVs durchgeführt. Mehrere potentiell vesikelassoziierte Membranproteine werden in diese Untersuchung einbezogen: eine endogene proHB-EGF hydrolysierende Proteaseaktivität, die Metalloproteasen ADAM10 und TACE und der von den Zellen heterolog exprimierte humane Thrombinrezeptor. Bei diesen Untersuchungen zeigt sich zunächst, dass GSVs eine Proteaseaktivität enthalten, die VSVG-proHB-EGF hydrolysiert. Bei einer Analyse der Verteilung der endogenen Metalloproteasen ADAM10 und TACE in Rat1/GLUT4myc-Zellen zeigt sich das gleiche bimodale Verteilungsmuster wie bei GLUT4 im Gradienten, was auf eine Assoziation beider Proteine mit GSVs hindeutet. Bei einer anschließenden Immunadsorption bestätigt sich, dass beide Proteasen mit GLUT4 in GSVs colokalisiert sind.

Auch der Thrombinrezeptor zeigt nach subzellulärer Fraktionierung ein Maximum im Vesikelbereich des Glyceringradienten, das gegenüber den GSVs leicht zu größeren Kompartimenten hin verschoben ist. In einer Immunadsorption konnte jedoch geklärt werden, dass der Thrombinrezeptor nicht mit GLUT4 in GSVs colokalisiert ist.

Des Weiteren weist die Verteilung des TGN-Markerproteins TGN38 nach subzellulärer Fraktionierung nur eine sehr geringe Überlappung mit GLUT4 im Bereich der Vesikel auf. Auch bei der anschließend durchgeführten Immunadsorption konnte keine spezifische Assoziation von TGN38 mit GSVs nachgewiesen werden.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Dynamik der GSVs in Rat1/GLUT4myc-Zellen. Befunde an authentischen GSVs in Fettzellen zeigen, dass die Vesikel über Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zur regulierten Exozytose veranlasst werden können. Um die Bedeutung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren für die Translokation von GSVs in Rat1/GLUT4myc-Zellen zu untersuchen, sind die Zellen mit Thrombin stimuliert worden, das den heterolog exprimierten humanen Thrombinrezeptor aktiviert. Die Stimulation führt zu einer Zunahme der GLUT4-Menge auf der Zelloberfläche auf mehr als das Doppelte. Dieser Effekt geht mit einer Abnahme des GSV-assoziierten GLUT4 einher, was für eine vermehrte Exozytose der Speichervesikel spricht. Endosomale Transportvesikel, die ebenfalls GLUT4 enthalten, scheinen keinen nennenswerten Beitrag zu dieser stimulationsabhängigen Umverteilung des Glucosetransporters zu leisten. Dies zeigt sich am Verhalten des Transferrinrezeptors, eines endosomalen Markerproteins, unter Stimulationsbedingungen. So bleibt die Transferrinrezeptor-Menge auf der Zelloberfläche nach Thrombinstimulation praktisch unverändert. Auch auf die Verteilung der Metalloproteasen ADAM10 und TACE hat Thrombin keinen messbaren Einfluss. Beide Proteasen befinden sich möglicherweise in einer Subpopulation von GSVs, die unter den beschriebenen Stimulationsbedingungen nicht zur Zelloberfläche mobilisiert werden. Die Ektoproteasen-enthaltenden GSVs könnten zu einer Reservepopulation gehören, die erst auf eine deutlich stärkere Thrombinstimulation mit Exozytose reagiert.

Untersuchungen anderer Autoren zeigen in Fett- und Muskelzellen sowie in transfizierten CHO-Zellen eine konstitutive Rezirkulation von GSVs. In CHO/GLUT4-Zellen kommt es bei einer Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose durch Inkubation mit hypertonem Medium zu einer Umverteilung von GLUT4 aus den GSVs in die Plasmamembran, da die konstitutive Exozytose unter diesen Bedingungen unbeeinflusst bleibt. Bei entsprechender Behandlung von Rat1/GLUT4myc-Zellen zeigt sich ebenfalls eine Abnahme von GLUT4myc im Bereich der GSVs im Gradienten und eine damit einhergehende Zunahme auf der Zelloberfläche. Dies weist darauf hin, dass GSVs auch in Rat1/GLUT4myc-Zellen konstitutiv rezirkulieren. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei der Verteilung der Metalloproteasen ADAM10 und TACE in Gegenwart von hypertonem Medium eher eine Tendenz zu einer Zunahme des GSV-assoziierten Anteils. Dies deutet darauf hin, dass die Ektoproteasen-enthaltende Subpopulation der GSVs nicht konstitutiv über die Plasmamembran rezirkuliert.

Abschließend wird die Rolle eines endosomalen Donorkompartiments bei der Biogenese von GSVs in Rat1/GLUT4myc-Zellen untersucht. In CHO-Zellen blockiert eine Abkühlung der

Zellen auf 15° C die Abschnürung von GSVs aus diesem Kompartiment, während die GSV-Exozytose und die GLUT4-Endozytose nahezu unbeeinträchtigt bleiben. Dies führt zu einer Abnahme der GSVs bei gleichzeitiger Akkumulation von GLUT4 in dem endosomalen Kompartiment. Werden Rat1/GLUT4myc-Zellen bei 15° C inkubiert, dann kommt es ebenfalls zu einer Umverteilung von GLUT4 aus den GSVs zu großen Membrankompartimenten hin. Scheinbar umfasst der GSV-Biosyntheseweg auch in diesen Zellen ein temperatursensitives Donorkompartiment. Die beiden Proteasen ADAM10 und TACE zeigen unter den Bedingungen des 15° C-Blocks das gleiche Verhalten wie GLUT4. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die ADAM10- und TACE-enhaltenden Vesikel ebenfalls eine konstitutive Dynamik zeigen und unter Einbeziehung anderer intrazellulärer Membrankompartimente rezirkulieren. Die Plasmamembran scheint jedoch kein Bestandteil des entsprechenden Rezirkulationswegs zu sein.

6 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
A.bidest	Aqua bidest
ADAM	a disintegrin and metalloprotease
APP	amyloid precursor protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	bovin serum albumin
C3G	cyanidin 3-glykoside
Ca ²⁺	Calciumionen
CAP	Cbl associated protein
CHO-Zellen	Chinese Hamster Ovary-Zellen
° C	Grad Celcius
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DDT	Dithiothreitol
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulphoxid
DOC	Deoxycholat
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
<i>E.coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylenglycol-bis-aminoethylester-N-N'-tetraacetat
et al	et altera
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	fetal calf serum
g	Gramm
Gaq	α-Untereinheit des G-Proteins
G418	Geneticin Sulfat
Gab-1	Grb2-associated binder-1
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	green fluorescent protein
GLUT4	Glucosetransporter4
G-Protein	GTP-binding regulated protein

Grb2	growth-factor receptor-bound protein2
GSV	GLUT4 containing small vesicle
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HAM's	Nutrient Mixture F-12
HB-EGF	heparin binding epidermal growth factor
HCl	Salzsäure
Hepes	N-s-Hydroxyethyl-piperazin-N-2-ethansäure
hPAR1	human protease activated receptor1
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IRAP	Insulin regulated Aminopeptidase
IRS	Insulin-receptor-substrate family
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Mol
MAP-Kinase	mitogen aktivated Protein-Kinase
mg	Miligramm
Mg ²⁺	Magnesiumionen
min	Minuten
ml	Mililiter
mM	Milimol
MMP	matrix metalloproteinase
M _r	apparentes Molekulargewicht
ms	Milisekunden
Mops	3-N-Morpholinopropansulfatsäure
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NP40	Nonidet40
NSF	N-ethyl-maleimid sensitives Fusionsprotein
PAA-Gel	Polyacrylamid-Gel
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

PC12-Zellen	Phaeochromocytoma12-Zellen aus dem Nebennierenmark der Ratte
PDK-1	phosphoinositide-dependent kinase-1
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Protein-Kinase B
PKC	Protein-Kinase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rat1-Zellen	Fibroblastenzelllinie aus der Ratte
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SD	Standard Deviation
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH2	src-Homologie2
SNAP	soluble NSF attachment protein
SOS	son-of-sevenless
STET-Puffer	Sodium-Chlorid-Ethylendiamintetraacetat-Tris-TritonX
Synip	Syntaxin4 interagierendes Protein
TACE	TNF α -converting enzyme
TBE-Puffer	Tris-HCl-Borsäure-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	NNN'N'Tetramethylethylendiamin
TGF α	transforming growth factor α
-Thr-Medium	Medium ohne Thrombin
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
t-SNARE	target membrane SNAP receptor
u	Unit
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
VAMP2	vesicle-associated membrane protein2
v-SNARE	vesicle membrane SNAP receptor

VSVG-proHB-EGF	heparin binding-epidermal growth factor precursor an ein VSV Glykoprotein gekoppelt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
zeo	Zeozin
Zn ²⁺	Zinkionen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
3T3-Zellen	Fibroblastenzelllinie aus der Maus

7 Literatur

- Allinson, T.M., Parkin, E.T., Condon, T.P., Schwager, S.L., Sturrock, E.D., Turner, A.J. & Hooper, N.M. (2004)
The role of ADAM10 and ADAM17 in the ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein.
Eur J Biochem, **271**, 2539-2547.
- Allinson, T.M., Parkin, E.T., Turner, A.J. & Hooper, N.M. (2003)
ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases.
J Neurosci Res, **74**, 342-352.
- Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., Ishikura, F., Yoshinaka, T., Ohmoto, H., Node, K., Yoshino, K., Ishiguro, H., Asanuma, H., Sanada, S., Matsumura, Y., Takeda, H., Beppu, S., Tada, M., Hori, M. & Higashiyama, S. (2002)
Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy.
Nat Med, **8**, 35-40.
- Besner, G., Higashiyama, S. & Klagsbrun, M. (1990)
Isolation and characterization of a macrophage-derived heparin-binding growth factor.
Cell. regul., **1**, 811-819.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J. & Cerretti, D.P. (1997)
A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells.
Nature, **385**, 729-733.
- Blobel, C.P. (2000)
Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface.
Curr Opin Cell Biol, **12**, 606-612.

Blobel, C.P. (2005)

ADAMs: key components in EGFR signalling and development.

Nat Rev Mol Cell Biol, **6**, 32-43.

Bradford, M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding.

Anal. Biochem., **72**, 248-254.

Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A. & Israel, A. (2000)

A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE.

Mol Cell, **5**, 207-216.

Bryant, N.J., Govers, R. & James, D.E. (2002)

Regulated transport of the glucose transporter GLUT4.

Nat Rev Mol Cell Biol, **3**, 267-277.

Buxbaum, J.D., Liu, K.N., Luo, Y., Slack, J.L., Stocking, K.L., Peschon, J.J., Johnson, R.S., Castner, B.J., Cerretti, D.P. & Black, R.A. (1998)

Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor.

J Biol Chem, **273**, 27765-27767.

Calera, M.R., Martinez, C., Liu, H., Jack, A.K., Birnbaum, M.J. & Pilch, P.F. (1998)

Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles.

J Biol Chem, **273**, 7201-7204.

Chai, S.Y., Fernando, R., Peck, G., Ye, S.Y., Mendelsohn, F.A., Jenkins, T.A. & Albiston, A.L. (2004)

The angiotensin IV/AT4 receptor.

Cell Mol Life Sci, **61**, 2728-2737.

Chang, L., Chiang, S.H. and Saltiel, A.R. (2005)

Insulin Signaling and the Regulation of Glucose Transport.

Mol Med.

Chi, N.W. & Lodish, H.F. (2000)

Tankyrase is a golgi-associated mitogen-activated protein kinase substrate that interacts with IRAP in GLUT4 vesicles.

J Biol Chem, **275**, 38437-38444.

Chiang, S.H., Baumann, C.A., Kanzaki, M., Thurmond, D.C., Watson, R.T., Neudauer, C.L., Macara, I.G., Pessin, J.E. & Saltiel, A.R. (2001)

Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10.

Nature, **410**, 944-948.

Clift-O'Grady, L., Desnos, C., Lichtenstein, Y., Faundez, V., Horng, J.T. & Kelly, R.B. (1998)

Reconstitution of synaptic vesicle biogenesis from PC12 cell membranes.

Methods, **16**, 150-159.

Coster, A.C., Govers, R. & James, D.E. (2004)

Insulin stimulates the entry of GLUT4 into the endosomal recycling pathway by a quantal mechanism.

Traffic, **5**, 763-771.

Coughlin, S.R. (1999)

How the protease thrombin talks to cells.

Proc Natl Acad Sci U S A, **96**, 11023-11027.

Coughlin, S.R. (2000)

Thrombin signalling and protease-activated receptors.

Nature, **407**, 258-264.

Coughlin, S.R. (2005)

Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology.

J Thromb Haemost, **3**, 1800-1814.

Cramer, A., Whitehorn, E.A., Tate, E. & Stemmer, W.P.C. (1996)

Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling.

Nat Biotech, **14**, 315-319.

Cutler, P. (1993)

Fast forward to fusion.

Nature, **364**, 287-288.

Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C. & Ullrich, A. (1996)

Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors.

Nature, **379**, 557-560.

Del Sal, G., Manfioletti, G. & Schneider, C. (1988)

A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing.

Nucleic Acids Res, **16**, 9878.

Derynck, R. (1992)

The physiology of transforming growth factor alpha.

Adv. Cancer Res., **58**, 27-52.

Desnos, C., Clift-O'Grady, L. & Kelly, R.B. (1995)

Biogenesis of synaptic vesicles in vitro.

J Cell Biol, **130**, 1041-1049.

Dugani, C.B. & Klip, A. (2005)

Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies.

Embo J, **6**, 1137-1142.

Elmendorf, J.S. & Pessin, J.E. (1999)

Insulin signaling regulating the trafficking and plasma membrane fusion of GLUT4-containing intracellular vesicles.

Exp Cell Res, **253**, 55-62.

Ericsson, A., Hamark, B., Powell, T.L. & Jansson, T. (2005)

Glucose transporter isoform 4 is expressed in the syncytiotrophoblast of first trimester human placenta.

Hum Reprod, **20**, 521-530.

Fan, H. & Derynck, R. (1999)

Ectodomain shedding of TGF- α and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and MAP kinase signaling cascades.

Embo J, **18**, 6962-6972.

Ferrara, C.M. & Cushman, S.W. (1999)

GLUT4 trafficking in insulin-stimulated rat adipose cells: evidence that heterotrimeric GTP-binding proteins regulate the fusion of docked GLUT4-containing vesicles.

Biochem J, **343 Pt 3**, 571-577.

Fohrer, C. (2001)

Struktur und Dynamik einer Klasse Aminopeptidase-enthaltender Speichervesikel.

Diplomarbeit, 1-95.

Goishi, K., Higashiyama, S., Klagsbrun, M., Nakano, N., Umata, T., Ishikawa, M., Mekada, E. & Taniguchi, N. (1995)

Phorbol ester induces the rapid processing of cell surface heparin-binding EGF-like growth factor: conversion from juxtacrine to paracrine growth factor activity.

Mol Biol Cell, **6**, 967-980.

Gonzales, P.E., Solomon, A., Miller, A.B., Leesnitzer, M.A., Sagi, I. & Milla, M.E. (2004)

Inhibition of the tumor necrosis factor- α -converting enzyme by its pro domain.

J Biol Chem, **279**, 31638-31645.

Gould, G.W. & Bell, G.I. (1990)

Facilitative glucose transporters: an expanding family.

Trends Biochem Sci, **15**, 18-23.

Gschwind, A., Zwick, E., Prenzel, N., Leserer, M. & Ullrich, A. (2001)

Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission.

Oncogene, **20**, 1594-1600.

Guilherme, A., Emoto, M., Buxton, J.M., Bose, S., Sabini, R., Theurkauf, W.E., Leszyk, J. & Czech, M.P. (2000)

Perinuclear localization and insulin responsiveness of GLUT4 requires cytoskeletal integrity in 3T3-L1 adipocytes.

J Biol Chem, **275**, 38151-38159.

Gutwein, P., Oleszewski, M., Mechtersheimer, S., Agmon-Levin, N., Krauss, K. & Altevogt, P. (2000)

Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells.

J Biol Chem, **275**, 15490-15497.

Hansen, S.H., Sandvig, K. & van Deurs, B. (1993)

Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification.

J Cell Biol, **121**, 61-72.

Hein, L., Ishii, K., Coughlin, S.R. & Kobilka, B.K. (1994)

Intracellular targeting and trafficking of thrombin receptors. A novel mechanism for resensitization of a G protein-coupled receptor.

J Biol Chem, **269**, 27719-27726.

Heller-Harrison, R.A., Morin, M., Guilherme, A. & Czech, M.P. (1996)

Insulin-mediated targeting of phosphatidylinositol 3-kinase to GLUT4-containing vesicles.

J Biol Chem, **271**, 10200-10204.

Herman, G.A., Bonzelius, F., Cieutat, A.M. & Kelly, R.B. (1994)

A distinct class of intracellular storage vesicles, identified by expression of the glucose transporter GLUT4.

Proc Natl Acad Sci U S A, **91**, 12750-12754.

Heuser, J.E. & Anderson, R.G.W. (1989)

Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation.

J. Cell Biol., **108**, 389-400.

Higashiyama, S. (2004)

Metalloproteinase-mediated shedding of heparin-binding EGF-like growth factor and its pathophysiological roles.

Protein Pept Lett, **11**, 443-450.

Higashiyama, S., Lau, K., Besner, G.E., Abraham, J.A. & Klagsbrun, M. (1992)

Structure of heparin-binding EGF-like growth factor. Multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature protein.

J Biol Chem, **267**, 6205-6212.

Hinkle, C.L., Mohan, M.J., Lin, P., Yeung, N., Rasmussen, F., Milla, M.E. & Moss, M.L. (2003)

Multiple metalloproteinases process protransforming growth factor-alpha (proTGF-alpha).

Biochemistry, **42**, 2127-2136.

Hock, R.A., Miller, A.D. & Osborne, R.A. (1989)

Expression of human adenosine deaminase from various strong promoters after gene transfer into human hematopoietic cell lines.

Blood, **74**, 876-881.

Holman, G.D. (1999)

A new deadly Syn?

Curr Biol, **9**, R735-737.

Holman, G.D. & Kasuga, M. (1997)

From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport.

Diabetologia, **40**, 991-1003.

Holman, G.D. & Sandoval, I.V. (2001)

Moving the insulin-regulated glucose transporter GLUT4 into and out of storage.

Trends in Cell Biology, **11**, 173-179.

Huang, J., Imamura, T. & Olefsky, J.M. (2001)

Insulin can regulate GLUT4 internalization by signaling to Rab5 and the motor protein dynein.

Proc Natl Acad Sci U S A, **98**, 13084-13089.

Imamura, T., Huang, J., Usui, I., Satoh, H., Bever, J. & Olefsky, J.M. (2003)

Insulin-induced GLUT4 translocation involves protein kinase C-mediated functional coupling between Rab4 and the motor protein kinesin.

Mol Cell Biol, **23**, 4892-4900.

Imamura, T., Ishibashi, K., Dalle, S., Ugi, S. & Olefsky, J.M. (1999)

Endothelin-1-induced GLUT4 translocation is mediated via Galpha(q/11) protein and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes.

J Biol Chem, **274**, 33691-33695.

Inoue, M., Chang, L., Hwang, J., Chiang, S.H. & Saltiel, A.R. (2003)

The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin.

Nature, **422**, 629-633.

Ishibashi, K., Imamura, T., Sharma, P.M., Huang, J., Ugi, S. & Olefsky, J.M. (2001)

Chronic endothelin-1 treatment leads to heterologous desensitization of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes.

J. Clin. Invest., **107**, 1193-1202.

Ishiki, M. & Klip, A. (2005)

Recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations and partners.

Endocr Rev, **146**, 5071-5078.

Iwamoto, R., Yamazaki, S., Asakura, M., Takashima, S., Hasuwa, H., Miyado, K., Adachi, S., Kitakaze, M., Hashimoto, K., Raab, G., Nanba, D., Higashiyama, S., Hori, M., Klagsbrun, M. & Mekada, E. (2003)

Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function.

Proc Natl Acad Sci U S A, **100**, 3221-3226.

Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S. & Mekada, E. (1998)

A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor.

Embo J, **17**, 7260-7272.

James, D.E. (2005)

MUNC-ing around with insulin action.

J Clin Invest, **115**, 219-221.

James, D.E., Piper, R.C. & Slot, J.W. (1994)

Insulin stimulation of GLUT-4 translocation: a model for regulated recycling.
Trends in Cell Biology, **4**, 120-126.

James, D.E., Strube, M. & Mueckler, M. (1989)

Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter.
Nature, **338**, 83-87.

Janez, A., Worrall, D.S., Imamura, T., Sharma, P.M. & Olefsky, J.M. (2000)

The osmotic shock-induced glucose transport pathway in 3T3-L1 adipocytes is mediated by gab-1 and requires gab-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity for full activation.
J Biol Chem, **275**, 26870-26876.

Kanai, F., Nishioka, Y., Hayashi, H., Kamohara, S., Todaka, M. & Ebina, Y. (1993)

Direct demonstration of insulin-induced GLUT4 translocation to the surface of intact cells by insertion of a c-myc epitope into an exofacial GLUT4 domain.
J Biol Chem, **268**, 14523-14526.

Kanda, Y. & Watanabe, Y. (2005)

Thrombin-induced glucose transport via Src-p38 MAPK pathway in vascular smooth muscle cells.
British Journal of Pharmacology, 1-8.

Keller, S.R. (2004)

Role of the insulin-regulated aminopeptidase IRAP in insulin action and diabetes.
Biol Pharm Bull, **27**, 761-764.

Keller, S.R., Scott, H.M., Mastick, C.C., Aebersold, R. & Lienhard, G.E. (1995)

Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4 vesicles.
J Biol Chem, **270**, 23612-23618.

Kelly, R.B. (1993) Secretion.

A question of endosomes [news; comment]. *Nature*, **364**, 487-488.

Koepsell, H., Korn, K., Ferguson, D., Menuhr, H., Ollig, D. & Haase, W. (1984)

Reconstitution and partial purification of several Na⁺ cotransport systems from renal brush-border membranes. Properties of the L- glutamate transporter in proteoliposomes.

J Biol Chem, **259**, 6548-6558.

Laemmli, U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature, **227**, 680-685.

Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C. & Fahrenholz, F. (1999)

Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease.

Proc Natl Acad Sci U S A, **96**, 3922-3927.

LaMorte, V.J., Harootunian, A.T., Spiegel, A.M., Tsien, R.Y. & Feramisco, J.R. (1993)

Mediation of growth factor induced DNA synthesis and calcium mobilization by Gq and Gi2.

J Cell Biol, **121**, 91-99.

Laurie, S.M., Cain, C.C., Lienhard, G.E. & Castle, J.D. (1993)

The glucose transporter GluT4 and secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) colocalize in rat adipocytes and partially segregate during insulin stimulation.

J Biol Chem, **268**, 19110-19117.

Lee, W., Ryu, J., Souto, R.P., Pilch, P.F. & Jung, C.Y. (1999)

Separation and partial characterization of three distinct intracellular GLUT4 compartments in rat adipocytes. Subcellular fractionation without homogenization.

J Biol Chem, **274**, 37755-37762.

- Li, D., Randhawa, V.K., Patel, N., Hayashi, M. & Klip, A. (2001)
Hyperosmolarity reduces GLUT4 endocytosis and increases its exocytosis from a VAMP2-independent pool in l6 muscle cells.
J Biol Chem, **276**, 22883-22891.
- Li, L., Omata, W., Kojima, I. & Shibata, H. (2001)
Direct interaction of Rab4 with syntaxin 4.
J Biol Chem, **276**, 5265-5273.
- Lim, S.N., Bonzelius, F., Low, S.H., Wille, H., Weimbs, T. & Herman, G.A. (2001)
Identification of discrete classes of endosome-derived small vesicles as a major cellular pool for recycling membrane proteins.
Mol Biol Cell, **12**, 981-995.
- Lin, B.Z., Pilch, P.F. & Kandrор, K.V. (1997)
Sortilin is a major protein component of Glut4-containing vesicles.
J Biol Chem, **272**, 24145-24147.
- Loechel, F., Overgaard, M.T., Oxvig, C., Albrechtsen, R. & Wewer, U.M. (1999) Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. Evidence for a functional cysteine switch.
J Biol Chem, **274**, 13427-13433.
- Manchester, J., Kong, X., Lowry, O.H. & Lawrence, J.C., Jr. (1994)
Ras signaling in the activation of glucose transport by insulin.
Proc Natl Acad Sci U S A, **91**, 4644-4648.
- Martin, P. (1997)
Wound healing--aiming for perfect skin regeneration.
Science, **276**, 75-81.

- Martin, S., Tellam, J., Livingstone, C., Slot, J.W., Gould, G.W. & James, D.E. (1996)
The glucose transporter (GLUT-4) and vesicle-associated membrane protein-2 (VAMP-2) are segregated from recycling endosomes in insulin-sensitive cells.
J Cell Biol, **134**, 625-635.
- Massague, J. & Pandiella, A. (1993)
Membrane-anchored growth factors.
Annu Rev Biochem, **62**, 515-541.
- Maxfield, F.R. & McGraw, T.E. (2004)
Endocytic recycling.
Nat Rev Mol Cell Biol, **5**, 121-132.
- Mechtersheimer, S., Gutwein, P., Agmon-Levin, N., Stoeck, A., Oleszewski, M., Riedle, S., Postina, R., Fahrenholz, F., Fogel, M., Lemmon, V. & Altevogt, P. (2001)
Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins.
J Cell Biol, **155**, 661-673.
- Milla, M.E., Leesnitzer, M.A., Moss, M.L., Clay, W.C., Carter, H.L., Miller, A.B., Su, J.L., Lambert, M.H., Willard, D.H., Sheeley, D.M., Kost, T.A., Burkhart, W., Moyer, M., Blackburn, R.K., Pahel, G.L., Mitchell, J.L., Hoffman, C.R. & Becherer, J.D. (1999)
Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE).
J Biol Chem, **274**, 30563-30570.
- Min, J., Okada, S., Kanzaki, M., Elmendorf, J.S., Coker, K.J., Ceresa, B.P., Syu, L.J., Noda, Y., Saltiel, A.R. & Pessin, J.E. (1999)
Synip: a novel insulin-regulated syntaxin 4-binding protein mediating GLUT4 translocation in adipocytes.
Mol Cell, **3**, 751-760.

- Morris, N.J., Ross, S.A., Lane, W.S., Moestrup, S.K., Petersen, C.M., Keller, S.R. & Lienhard, G.E. (1998)
Sortilin is the major 110-kDa protein in GLUT4 vesicles from adipocytes.
J Biol Chem, **273**, 3582-3587.
- Moss, M.L. & Bartsch, J.W. (2004)
Therapeutic benefits from targeting of ADAM family members.
Biochemistry, **43**, 7227-7235.
- Pessin, J.E., Thurmond, D.C., Elmendorf, J.S., Coker, K.J. & Okada, S. (1999)
Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location!
Location!
J Biol Chem, **274**, 2593-2596.
- Poirier, L.A., Rachdaoui, N. & Nagy, L.E. (2001)
GLUT4 vesicle trafficking in rat adipocytes after ethanol feeding: regulation by heterotrimeric G-proteins.
Biochem J, **354**, 323-330.
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C. & Ullrich, A. (1999)
EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF.
Nature, **402**, 884-888.
- Prenzel, N., Zwick, E., Leserer, M. & Ullrich, A. (2000)
Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification.
Breast Cancer Res, **2**, 184-190.
- Ramm, G. & James, D.E. (2005)
GLUT4 trafficking in a test tube.
Cell Metab, **2**, 150-152.

Rayner, D.V., Thomas, M.E. & Trayhurn, P. (1994)

Glucose transporters (GLUTs 1-4) and their mRNAs in regions of the rat brain: insulin-sensitive transporter expression in the cerebellum.

Can J Physiol Pharmacol, **72**, 476-479.

Rea, S. & James, D.E. (1997)

Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles.

Diabetes, **46**, 1667-1677.

Rodnick, K.J., Slot, J.W., Studelska, D.R., Hanpeter, D.E., Robinson, L.J., Geuze, H.J. & James, D.E. (1992)

Immunocytochemical and biochemical studies of GLUT4 in rat skeletal muscle.

J Biol Chem, **267**, 6278-6285.

Rosendahl, M.S., Ko, S.C., Long, D.L., Brewer, M.T., Rosenzweig, B., Hedl, E., Anderson, L., Pyle, S.M., Moreland, J., Meyers, M.A., Kohno, T., Lyons, D. & Lichenstein, H.S. (1997)

Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor-alpha-processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases.

J Biol Chem, **272**, 24588-24593.

Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P. & Blobel, C.P. (2004)

Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands.

J Cell Biol, **164**, 769-779.

Saltiel, A.R. & Kahn, C.R. (2001)

Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism.

Nature, **414**, 799-806.

Saltiel, A.R. & Pessin, J.E. (2002)

Insulin signaling pathways in time and space.

Trends Cell Biol, **12**, 65-71.

Schagger, H. & von Jagow, G. (1987)

Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.

Anal Biochem, **166**, 368-379.

Schlomann, U., Wildeboer, D., Webster, A., Antropova, O., Zeuschner, D., Knight, C.G., Docherty, A.J., Lambert, M., Skelton, L., Jockusch, H. & Bartsch, J.W. (2002)

The metalloprotease disintegrin ADAM8. Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion.

J Biol Chem, **277**, 48210-48219.

Schmidt, A., Hannah, M.J. & Huttner, W.B. (1997)

Synaptic-like microvesicles of neuroendocrine cells originate from a novel compartment that is continuous with the plasma membrane and devoid of transferrin receptor.

J Cell Biol, **137**, 445-458.

Shewan, A.M., van Dam, E.M., Martin, S., Luen, T.B., Hong, W., Bryant, N.J. & James, D.E. (2003)

GLUT4 recycles via a trans-Golgi network (TGN) subdomain enriched in Syntaxins 6 and 16 but not TGN38: involvement of an acidic targeting motif.

Mol Biol Cell, **14**, 973-986.

Shi, J. & Kandror, K.V. (2005)

Sortilin is essential and sufficient for the formation of Glut4 storage vesicles in 3T3-L1 adipocytes.

Dev Cell, **9**, 99-108.

Shibata, H., Omata, W., Suzuki, Y., Tanaka, S. & Kojima, I. (1996)

A synthetic peptide corresponding to the Rab4 hypervariable carboxyl-terminal domain inhibits insulin action on glucose transport in rat adipocytes.

J Biol Chem, **271**, 9704-9709.

Simpson, F., Whitehead, J.P. & James, D.E. (2001)

GLUT4--at the cross roads between membrane trafficking and signal transduction.
Traffic, **2**, 2-11.

Slot, J.W., Geuze, H.J., Gigengack, S., Lienhard, G.E. & James, D.E. (1991)

Immuno-localization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat.
J Cell Biol, **113**, 123-135.

Spurlin, B.A., Park, S.Y., Nevins, A.K., Kim, J.K. & Thurmond, D.C. (2004)

Syntaxin 4 transgenic mice exhibit enhanced insulin-mediated glucose uptake in skeletal muscle.
Diabetes, **53**, 2223-2231.

Stoeck, A., Keller, S., Riedle, S., Sanderson, M.P., Runz, S., LeNaour, F., Gutwein, P., Ludwig, A., Rubinstein, E. & Altevogt, P. (2006)

A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44.
Biochem J, **393**, 609-618.

Sudhof, T.C. (2004)

The synaptic vesicle cycle.
Annu Rev Neurosci, **27**, 509-547.

Sunnarborg, S.W., Hinkle, C.L., Stevenson, M., Russell, W.E., Raska, C.S., Peschon, J.J., Castner, B.J., Gerhart, M.J., Paxton, R.J., Black, R.A. & Lee, D.C. (2002)

Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability.
J Biol Chem, **277**, 12838-12845.

Suzuki, M., Raab, G., Moses, M.A., Fernandez, C.A. & Klagsbrun, M. (1997)

Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site.
J Biol Chem, **272**, 31730-31737.

- Sweeney, G., Somwar, R., Ramlal, T., Volchuk, A., Ueyama, A. & Klip, A. (1999)
An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes.
J Biol Chem, **274**, 10071-10078.
- Tandon, A. & Fraser, P. (2002)
The presenilins.
Genome Biol, **3**, reviews3014.
- Thurmond, D.C., Kanzaki, M., Khan, A.H. & Pessin, J.E. (2000)
Munc18c function is required for insulin-stimulated plasma membrane fusion of GLUT4 and insulin-responsive amino peptidase storage vesicles.
Mol Cell Biol, **20**, 379-388.
- Toki, F., Nanba, D., Matsuura, N. & Higashiyama, S. (2005)
Ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF like growth factor and subcellular localization of the C-terminal fragment in the cell cycle.
J Cell Physiol, **202**, 839-848.
- Tokumar, S., Higashiyama, S., Endo, T., Nakagawa, T., Miyagawa, J.I., Yamamori, K., Hanakawa, Y., Ohmoto, H., Yoshino, K., Shirakata, Y., Matsuzawa, Y., Hashimoto, K. & Taniguchi, N. (2000)
Ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands is required for keratinocyte migration in cutaneous wound healing.
J Cell Biol, **151**, 209-220.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979)
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc Natl Acad Sci U S A, **76**, 4350-4354.

Tsakiridis, T., Vranic, M. & Klip, A. (1994)

Disassembly of the actin network inhibits insulin-dependent stimulation of glucose transport and prevents recruitment of glucose transporters to the plasma membrane.

J Biol Chem, **269**, 29934-29942.

Usui, I., Imamura, T., Satoh, H., Huang, J., Babendure, J.L., Hupfeld, C.J. & Olefsky, J.M. (2004)

GRK2 is an endogenous protein inhibitor of the insulin signaling pathway for glucose transport stimulation.

Embo J, **23**, 2821-2829.

Volchuk, A., Wang, Q., Ewart, H.S., Liu, Z., He, L., Bennett, M.K. & Klip, A. (1996)

Syntaxin 4 in 3T3-L1 adipocytes: regulation by insulin and participation in insulin-dependent glucose transport.

Mol Biol Cell, **7**, 1075-1082.

Watson, R.T., Kanzaki, M. & Pessin, J.E. (2004)

Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes.

Endocr Rev, **25**, 177-204.

Wei, M.L., Bonzelius, F., Scully, R.M., Kelly, R.B. & Herman, G.A. (1998)

GLUT4 and transferrin receptor are differentially sorted along the endocytic pathway in CHO cells.

J Cell Biol, **140**, 565-575.

Wood, S. & Trayhurn, P. (2003)

Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins.

British Journal of Nutrition, **89**, 3-9.

Wu-Wong, J.R., Berg, C.E., Wang, J., Chiou, W.J. & Fissel, B. (1999)

Endothelin stimulates glucose uptake and GLUT4 translocation via activation of endothelin ETA receptor in 3T3-L1 adipocytes.

J Biol Chem, **274**, 8103-8110.

Xing, A.Y., Challier, J.C., Lepercq, J., Cauzac, M., Charron, M.J., Girard, J. & Hauguel-de Mouzon, S. (1998)

Unexpected expression of glucose transporter 4 in villous stromal cells of human placenta.

J Clin Endocrinol Metab, **83**, 4097-4101.

Yamazaki, S., Iwamoto, R., Saeki, K., Asakura, M., Takashima, S., Yamazaki, A., Kimura, R., Mizushima, H., Moribe, H., Higashiyama, S., Endoh, M., Kaneda, Y., Takagi, S., Itami, S., Takeda, N., Yamada, G. & Mekada, E. (2003)

Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities.

J Cell Biol, **163**, 469-475.

Yan, Y., Shirakabe, K. & Werb, Z. (2002)

The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors.

J Cell Biol, **158**, 221-226.

Zorzano, A., Palacin, M. & Guma, A. (2005)

Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle.

Acta Physiol Scand, **183**, 43-58.

Lebenslauf:

Name: Fohrer Claudia
Geburtstag: 16.06.1976
Geburtsort: Frankfurt am Main

Schulbildung:

Aug. 1982 - Juni 1986 Willemer Grundschule in Frankfurt am Main
Aug. 1986 - Juni 1995 Ziehen Gymnasium in Frankfurt am Main

Hochschulausbildung:

Okt. 1995 Aufnahme des Biologiestudiums an der
Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
Aug. 1998 Diplomvorprüfung in Biologie
März - April 2000 Diplomhauptprüfung in den Fächern
Zoologie, Humangenetik, Toxikologie
Juni 2000 - April 2001 Diplomarbeit unter Betreuung von Prof. Dr. Walter Volknandt
und Dr. Frank Bonzelius zum Thema "Struktur und Dynamik
einer Klasse Aminopeptidase-enthaltender Speichervesikel"
Mai 2001 Beginn der Dissertation unter gleicher Betreuung zum Thema
"Untersuchungen zur intrazellulären Speicherung verschiedener
Plasmamembranproteine in einer Fibroblastenzelllinie aus der
Ratte"

Studienbegleitende Tätigkeiten:

WS 2002/03 - WS 2004/05 wissenschaftliche Hilfskraft im Praktikum "Biol. für Mediziner"
SS 2003 wissenschaftliche Hilfskraft im Praktikum "Biol. für Mediziner"
WS 2002/03 - WS 2004/05 Halten eines propädeutischen Seminars begleitend zur
Vorlesung "Biologie für Mediziner"

Stipendium:

Feb. 2003 - Juli 2005 Stipendiatin der Jürgen Manchot Stiftung (vormals Pinguin
Stiftung)