



Strukturanalyse der stark gekrümmten Caveolenmembran

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller Universität Jena

von

Diplom-Biologin Wiebke Schlörmann
geboren am 29.01.1977 in Leer

Gutachter: PD Dr. Martin Westermann

Prof. Dr. Hans-Jürgen Agricola

Prof. Dr. Erhard Mörschel

Termin der öffentlichen Verteidigung (Disputation): 25.02.2008

*Was wir wissen ist ein Tropfen,
was wir nicht wissen ein Ozean.*

Isaac Newton

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV-VII
Tabellenverzeichnis	VIII
Verwendete Abkürzungen	IX-XI

1. Einleitung

1.1 Die Plasmamembran	1
1.2 Lipid Rafts	2
1.3 Struktur und Bedeutung der Caveolen	3
1.3.1 Morphologische Definition der Caveolen	3
1.3.2 Zusammensetzung der Caveolen	4
1.3.3 Funktion der Caveolen	7
1.3.3.1 Transportfunktion der Caveolen	7
1.3.3.2 Caveolen und Cholesterol-Homeostase	8
1.3.3.3 Die Rolle der Caveolen in der Signaltransduktion	10
1.4 Die Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung	12
1.5 Die Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung an Caveolen	15
1.6 Ziel der Arbeit	15

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur	17
2.2 Die Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung	17
2.2.1 Die Gefrierbruchtechnik und Herstellung der Gefrierbruch-Replika	18
2.2.2 Die Immunogoldmarkierung	19
2.3 Verbesserung der Gefrierbruch-Immunogold-Markierungstechnik und Optimierung der Markierungseffizienz	20
2.3.1 Variation der Bedampfungsparameter	21
2.3.2 Variation der Emissions-Parameter	21
2.3.3 Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung von Aquaporin 1 (AQP1)	22

2.3.4	“Cerium-Phosphat-Immunmarkierung”	23
2.3.5	Variation der Goldkorngröße – Einfluss der Goldkorngröße auf die Markierungseffizienz	25
2.3.6	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Caveolen-Membran	26
2.4	Darstellung der an Gefrierbruch- stabilisierten Membranhälften gebundenen Komponenten	27
2.4.1	Einbettung und Ultradünnschnitt von Gefrierbruch- stabilisierten Membranhälften	28
2.4.2	Schichtdickenbestimmung der Membranhälften immunmarkierter Replika mit Hilfe der beidseitigen C-Bedampfung	29
2.4.3	Schichtdickenbestimmung der Membranhälften unterschiedlich bedampfter Replika mit Hilfe der beidseitigen C-Bedampfung	30
2.5	Charakterisierung und Strukturanalyse der Caveolen-Membran	32
2.5.1	Untersuchungen an “Caveolen-Proteinen”	32
2.5.2	Isolation caveolinreicher Membrandomänen	38
2.5.3	Immunpräzipitation von Caveolen	38
2.5.4	Rekonstitution von isolierten 400 kDa Caveolin-Komplexen in Liposomen	39
3.	Ergebnisse	
3.1	Verbesserung der Gefrierbruch- Immunogold- Markierungstechnik und Optimierung der Markierungseffizienz	42
3.1.1	Variation der Bedampfungsparameter	42
3.1.2	Variation der Emissionsparameter	45
3.1.3	Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung von AQP1	46
3.1.4	“Cerium-Phosphat-Immunmarkierung”	48
3.1.5	Variation der Goldkorngröße	50
3.1.6	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Caveolen-Membran	55
3.2	Darstellung der an Gefrierbruch- stabilisierten Membranhälften gebundenen Komponenten	57

3.2.1	Einbettung und Ultradünnschnitt von Gefrierbruch- stabilisierten Membranhälften	57
3.2.2	Schichtdickenbestimmung der Membranhälften immunmarkierter Replika mit Hilfe der beidseitigen C-Bedampfung	58
3.2.3	Schichtdickenbestimmung der Membranhälften unterschiedlich bedampfter Replika mit Hilfe der beidseitigen C-Bedampfung	60
3.3	Charakterisierung und Strukturanalyse der Caveolen-Membran	61
3.3.1	Untersuchungen an "Caveolen-Proteinen"	61
3.3.2	Isolation caveolinreicher Membrandomänen	65
3.3.3	Immunpräzipitation von Caveolen	67
3.3.4	Rekonstitution von isolierten 400 kDa Caveolin-Komplexen in Liposomen	68
4.	Diskussion	71
4.1	Optimierung der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung	71
4.2	Biochemische Charakterisierung der Caveolen-Membran	77
4.3	Strukturanalyse der Caveolen-Membran	81
5.	Zusammenfassung	89
6.	Literaturverzeichnis	91
7.	Anhang	107
7.1	Chemikalienliste	107
7.2	Geräteliste	110
8.	Lebenslauf	112
9.	Verzeichnis der eigenen Publikationen	114
10.	Danksagung	115
11.	Ehrenwörtliche Erklärung	117

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Caveolen im Ultradünnschnitt einer Endothelzelle des Herzens	4
Abb. 1.2:	Darstellung der gestreiften Hülle der Caveolen einer Fibroblastenzelle in der Gefrier-Ätzung	4
Abb. 1.3:	Organisation von Lipid Rafts und Caveolen	4
Abb. 1.4:	Topologie von Caveolin in der inneren Zellmembran	5
Abb. 1.5:	Prinzip der Gefrierbruchmethode	12
Abb. 1.6:	Schematische Darstellung der "SDS-digested freeze-fracture replica-labeling"-Methode	14
Abb. 1.7:	Schematische Darstellung eines Querschnitts durch ein Immunogold-markiertes Replika	14
Abb. 1.8:	Modell einer replizierten Caveole nach Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung	15
Abb. 3.1.a-c:	Gefrierbruch Immunogold-Markierung von Caveolin-1 in chemisch unfixierten 3T3-Mausfibroblasten; a) 2,5 nm Pt/C-Bedampfung; b) 1,5 nm Pt/C-Bedampfung; c) C/Pt-Bedampfung	43
Abb. 3.2:	Markierungsraten für 2,5 nm Pt/C; 1,5 nm Pt/C und C/Pt im Vergleich	44
Abb. 3.3:	Markierungsraten für 89 mA (12 sec.), 65 mA (24 sec.) und 59 mA, 35 Sekunden im Vergleich	45
Abb. 3.4.a-b:	AQP1-Markierung, C/Pt; a) Protoplasmatische Spaltfläche; b) Plasma (PL)	46
Abb. 3.5:	Markierungsrate für AQP1 für die unterschiedlichen Spaltflächen (BG=Eis, EF, PL, PF) bei C/Pt-Bedampfung	47
Abb. 3.6:	Markierungsrate für AQP1 (PF) für die unterschiedlichen Bedampfungsvarianten (2,5 nm Pt/C; 1,5 nm Pt/C, C/Pt)	47

Abb. 3.7.a-b:	Gefrierbruch-Immunmarkierung von Caveolin-1 in chemisch unfixierten 3T3-Mausfibroblasten mit Cerium-Phosphat, protoplasmatische Spaltfläche; a) Pt/C-Bedampfung; b) C/Pt-Bedampfung	49
Abb. 3.8.a-b:	Gefrierbruch-Immunmarkierung von Caveolin-1 in chemisch unfixierten 3T3-Mausfibroblasten mit Cerium-Phosphat, exoplasmatische Spaltfläche; a) Pt/C-Bedampfung; b) C/Pt-Bedampfung	49
Abb. 3.9:	Elektronenmikroskopische Aufnahme negativ kontrastierter 2. Antikörper konjugiert mit 10 nm großen Goldpartikeln	50
Abb. 3.10:	Markierungsraten für 10 nm, 5 nm und 2 nm Antikörper-Gold-Komplexe	51
Abb. 3.11.a-c:	Immunogoldmarkierung chemisch unfixierter 3T3-Maus-Fibroblasten mit a) 10 nm Antikörper-Gold-Komplexen; b) 5 nm Antikörper-Gold-Komplexen; c) 2 nm Antikörper-Gold-Komplexen	52
Abb. 3.12.a-b:	a) Kippserie einer mit 2 nm Antikörper-Gold-Komplexen markierten Caveole; b) 3D-Rekonstruktion einer mit 2 nm Antikörper-Gold-Komplexen markierten Caveole	53
Abb. 3.13.a-b:	a) Kippserie einer mit 5 nm Antikörper-Gold-Komplexen markierten Caveole; b) 3D-Rekonstruktion einer mit 5 nm Antikörper-Gold-Komplexen markierten Caveole	54
Abb. 3.14.a-b:	a) Kippserie einer mit 10 nm Antikörper-Gold-Komplexen markierten Caveole; b) 3D-Rekonstruktion einer mit 10 nm Antikörper-Gold-Komplexen markierten Caveole	54
Abb. 3.15:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines mittels Gefrierbruchtechnik und Cav-1-Immunogoldmarkierung hergestellten Replikas	55
Abb. 3.16:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Plasmamembran einer NIH-3T3-Mausfibroblastenzelle	56
Abb. 3.17.a-d:	Dünnschnitte von Gefrierbruch-Replika chemisch unfixierter 3T3-Mausfibroblasten mit Caveolin-1 Immunmarkierung, a) Replika mit C-Bedampfung, b) Replika mit Pt/C- Bedampfung, c) Replika mit C-	57

	Bedampfung, d) abgelöste Proteinschicht mit Caveolin-1 Immunmarkierung	
Abb. 3.18:	Tangentialer Dünnschnitt durch ein Gefrierbruch-Replika chemisch unfixierter 3T3-Mausfibroblasten mit Caveolin-1 Immunmarkierung	58
Abb. 3.19.a-c:	Vergleich der Schichtdicken von Gefrierbruch-stabilisierten Membranhälften chemisch unfixierter 3T3-Mausfibroblasten nach beidseitiger C-Bedampfung (C/Pt-C) mit unterschiedlichen Markierungssituationen; a) Membranhälfte ohne Cav-1 Immunmarkierung; b) Membranhälfte mit 1. Antikörperschicht; c) Membranhälfte mit 2 Antikörperschichten	59
Abb. 3.20.a-c:	Vergleich der Schichtdicken von Gefrierbruch-stabilisierten Membranhälften chemisch unfixierter 3T3-Mausfibroblasten nach beidseitiger C-Bedampfung (C/Pt-C) mit unterschiedlichen Bedampfungssituationen; a) Membranhälfte mit 2 nm Pt/C; b) Membranhälfte mit 1,5 nm Pt/C; c) Membranhälfte mit C/Pt-Bedampfung	60
Abb. 3.21:	SDS-PAGE caveolärer Proteine	61
Abb. 3.22.a-b:	a) Cav-1 Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung; Pt/C-Bedampfung; b) Cav-1 Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung; C/Pt-Bedampfung	62
Abb.3.23.a-b:	a) Flot-2 Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung; Pt/C-Bedampfung; b) Flot-2 Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung; C/Pt-Bedampfung	62
Abb. 3.24.a-b:	a) eNOS Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung; Pt/C-Bedampfung; b) eNOS Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung; C/Pt-Bedampfung	62
Abb. 3.25.a-b:	a) Actin Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung; Pt/C-Bedampfung; b) Actin Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung; Pt/C-Bedampfung mit dünner Platinschicht	63

Abb. 3.26.a-b:	a) Cav-1 (20 nm) plus PTRF (10 nm) Gefrierbruch- Immunogoldmarkierung; Pt/C-Bedampfung; b) Cav-1 (20 nm) plus PTRF (10 nm) Gefrierbruch- Immunogoldmarkierung; C/Pt-Bedampfung	63
Abb. 3.27:	Isolation caveolinreicher Membranvesikel aus Rattenlunge, Western-Blot	65
Abb. 3.28.a-d:	Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung isolierter Membranvesikel	66
Abb. 3.29.a-e:	Immunpräzipitierte Vesikel im Negativkontrast mit Cav- 1-Markierung	67
Abb. 3.30:	Isolation von Caveolin-1 Komplexen aus Rinderlunge, Fraktionen aus dem Dichtegradienten; Western-Blot	69
Abb. 3.31.a-d:	a- c) Detailaufnahmen der isolierten Caveolin-1 Komplexen mit Cav-1 Immunmarkierung im Negativkontrast, d) Übersicht	69
Abb. 3.32.a-c:	Detailaufnahmen von Gefrierbrüchen der rekonstituierten Caveolin-1 Proteoliposomen mit Cav-1 Immunogold- markierung	70
Abb. 3.33:	Übersicht eines Gefrierbruches der rekonstituierten Cav-1 Proteoliposomen mit Cav-1 Immunogoldmarkierung	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Variation der Bedampfungsparameter	21
Tabelle 2.2:	Variation der Emissionsparameter	22
Tabelle 2.3:	Bedampfungsparameter für die Gefrierbruch- Immunogold-Markierung von AQP-1	23
Tabelle 2.4:	Bedampfungsparameter für die Cerium-Phosphat-Markierung	24
Tabelle 2.5:	Variation der Goldkorngröße	26
Tabelle 2.6:	Bedampfungsparameter für die Einbettung	29
Tabelle 2.7:	Entwässerungsschritte	29
Tabelle 2.8:	Kontrastierungslösung	29
Tabelle 2.9:	Immunmarkierung beidseitig C-bedampfter Replika	30
Tabelle 2.10:	Bedampfungsparameter für die beidseitige C-Bedampfung	31
Tabelle 2.11:	Puffer für SDS-PAGE	35
Tabelle 2.12:	Zusammensetzung des PAA-Gels	35
Tabelle 2.13:	Zusammensetzung des Western-Blot Puffers	36
Tabelle 2.14:	Verwendete Antikörper für die Western-Blot-Analyse	36
Tabelle 2.15:	Bedampfungsparameter für die Gefrierbruch- Immunogold-markierung an Caveolen-Proteinen	37
Tabelle 2.16:	Verwendete Antikörper für die Immunmarkierung der Caveolen-Proteine	37

Verwendete Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AQP-1	Aquaporin-1
AS	Aminosäure
BDMA	Benzylmethylamin
BSA	Bovine serum albumine
C	Kohlenstoff
CAM	Cell adhesion molecule
Cav-1	Caveolin-1
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
COP	Coat protein
Cryo-FESEM	Cryo-field emission scanning electron microscopy
CSD	Caveolin-1 scaffolding domain
ddH ₂ O	Doppelt-destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPC	Dipalmitoyl-L- α -Phosphatidylcholin
DRM	Detergenz-resistente Membran
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Exoplasmic fracture face, exoplasmatische Spaltfläche
EGF	Epidermal growth factor
eNOS	Endothelial nitric-oxide synthase
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ESA	Epidermal Surface Antigen
EtOH	Ethanol
FKS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energietransfer
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol

GTP	Guanosin Triphosphat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDL	High-density lipoprotein
HRP	Horseradish peroxidase
HSL	Hormon sensitive lipase
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl- xanthine
IMSID	Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation
K	Kelvin
kDa	kilo Dalton
kV	kiloVolt
LBB	Labeling blocking buffer
LDL	Low-density lipoprotein
mA	milli Ampere
MHC	Major Histocompatibility Complex
MAP	Mitogen-activated protein kinase
MBS	MES-buffered saline
NEM	<i>N</i> -ethyl-maleimid
NO	Stickstoff-Monoxid
NSF	<i>N</i> -maleimid-sensitive fusion protein
OG	Octyl-beta-D-glucopyranoside
Pa	Pascal
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphate-buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PF	Protoplasmic fracture face, protoplasmatische Spaltfläche
PHB-Domäne	Prohibitin homology domain
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pt	Platin
PTRF	Polymerase transcript release factor
Ras	Rat sarcoma
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SDS-FRL	SDS-freeze-fracture replica labeling
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SG-P	Sammelgelpuffer
SNAP	Soluble NSF attachment protein
SR-BI	Scavenger Receptor B-I
Src	Rous <u>s</u> arcoma virus
SV40	Simian Virus 40
TBS	Tris-buffered saline
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
TEMED	N, N, N', N'- Tetra-methyl-ethyl-diamin
TTF-1	Transcription termination factor 1
Tyr	Tyrosin
ü. N.	über Nacht
VAMP	Vesicle associated membrane protein
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule I
VEGF	Vascular endothelial growth factor

1. Einleitung

1.1 Die Plasmamembran

Die Zellmembran oder auch Plasmamembran stellt einen der wichtigsten Teile im Aufbau der Zellstruktur dar. Ohne sie gäbe es keine Zellen und kein Leben, wie wir es kennen. Jede Zelle benötigt Membranen, um ihre chemischen Bestandteile von der äußeren Umgebung abzugrenzen und ihren Zellinhalt vor dem Entweichen und Vermischen mit dem Außenmedium zu schützen. Darüber hinaus muss sie weitere für die Zelle lebenswichtige Funktionen erfüllen. Sie fungiert als selektive Barriere und ist an der zellulären Signalübertragung, an Transportvorgängen, am Zellwachstum und an Bewegungsvorgängen beteiligt. Alle in Zellen vorkommenden Membranen haben dabei eine universelle Grundstruktur, die aus einer dynamischen Anordnung ihrer Lipid- und Proteinbestandteile besteht. Diese Anordnung beruht auf der amphipathischen Eigenschaft der Lipide (z. B. Phospholipide), die sich in wässrigem Milieu durch Selbstorganisation in 5 nm dünne, zweidimensionale Bilayer-Schichten anordnen. Dabei lagern sich die hydrophoben Regionen der Lipide so zusammen, dass sie sich vom wässrigen Milieu abschirmen und ein hydrophobes Zentrum bilden. Die hydrophilen Regionen ragen nach außen ins wässrige Medium. Seit den Versuchen von Gorter und Grendel (1925) an isolierten Erythrozytenlipiden ist bekannt, dass Zellmembranen aus einer Lipid-Doppelschicht bestehen. Robertson (1967) bezeichnete diese einheitliche Grundstruktur als „unit membrane“. Danielli und Davson (1935) bezogen zum ersten Mal Proteine in den Aufbau der Membranstruktur ein. Sie entwickelten ein Modell für Biomembranen, in dem die Doppelschicht ausschließlich aus Lipiden besteht und die polare Oberfläche von Proteinen überzogen ist. Singer und Nicholson (1972) postulierten das „Flüssig-Mosaik-Modell“ („fluid-mosaic-model“) der Biomembran, welches heute noch Gültigkeit besitzt. Dabei durchziehen die Membranproteine die dynamische Lipid-Doppelschicht als lateral bewegliche Komponenten. Entscheidend für die Untersuchungen der Membranstruktur waren elektronenmikroskopische Methoden, wobei vor allem die Gefrierbruchtechnik Daten zur domänenhaften Verteilung der Membrankomponenten lieferte. Die Membranproteine wurden daraufhin als sogenannte Intramembranpartikel (IMP) definiert (Branton 1966). Die beiden Monolayer besitzen eine unterschiedliche Lipid-Zusammensetzung, so dass die Lipid-Doppelschicht asymmetrisch aufgebaut ist. Die

exoplasmatische Hälfte der Doppelschicht besteht überwiegend aus dem Phospholipid Phosphatidylcholin und dem Glykosphingolipid Sphingomyelin, wobei die protoplasmatische Hälfte hauptsächlich aus den Phospholipiden Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin gebildet wird. Neben Phospho- und Sphingolipiden gibt es noch die Sterole, von denen in Säugertierzellen nur das Cholesterol vorkommt. Cholesterol ist in beiden Hälften der Lipid-Doppelschicht lokalisiert (Zachowsky 1993, Holthuis und Levine 2005). Eine große Anzahl an Enzymen (Flippasen und Translokatoren) kontrollieren die asymmetrische Verteilung der Lipide in der Membran (Holthuis und Levine 2005). Ipsen et al. (1987) führten die Nomenklatur „solid/ liquid“ für die zweidimensionale Anordnung der Gesamtmoleküle und „ordered/ disordered“ für die Konformationsordnung der Acylketten ein. Der Phasenzustand der Lipide in Biomembranen ist überwiegend fluide, wobei die Lipidmoleküle mit ungeordneten Acylketten sehr beweglich sind. Diesen Zustand bezeichnet man als „liquid-disordered“ (l_d).

1.2 Lipid Rafts

Lipid Rafts sind mit Glycosphingolipiden und Cholesterol angereicherte Mikrodomänen in der exoplasmatischen Seite der Plasmamembran. Man nimmt an, dass es aufgrund unterschiedlicher physikalischer Eigenschaften dieser Lipide zu einer Phasen-Separation in der Zellmembran und zur Bildung von lateralen Mikrodomänen kommt (Brown und London 1998, Simons und van Meer 1988, Simons und Ikonen 1997). Die Sphingolipide in den Rafts ermöglichen mit ihren gesättigten Kohlenwasserstoffketten einen festen Einbau von Cholesterol, so dass sich eine Membrandomäne im “liquid- ordered” Gel-Phasenzustand mit eingeschränkter Beweglichkeit der Acylketten, aber noch hoher lateraler Mobilität der Lipidmoleküle, bildet. Die Plasmamembran, welche die Lipid Rafts umgibt, ist dagegen stark fluide, da sie überwiegend aus Phospholipiden mit ungesättigten Acyl-Ketten und Cholesterol besteht (Brown und London 1998, Schroeder et al. 1994). Eine der wichtigsten Eigenschaften der Raft-Domänen ist, dass sie bestimmte Proteine aufnehmen, während sie andere ausgrenzen. Proteine, die eine derartige Raft-Affinität besitzen, sind Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine, doppelt acylierte Proteine wie die Src-Proteinkinasen oder α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine (Resh 1999). Die Größe von Lipid Rafts wird kontrovers diskutiert. Kurzchalia und Parton (1999) sowie Simons und Toomre (2000)

postulierten für Lipid Rafts eine Größe von 50-100 nm. Die Lipid Rafts an der Zelloberfläche haben entscheidende Funktionen bei Signaltransduktionsprozessen, indem sie eine Plattform für zahlreiche Rezeptoren bilden, die durch Ligandenbindung aktiviert werden wie zum Beispiel FcεRI-, T-Zell-, B-Zell-, EGF-, Insulin- EphrinB1-Rezeptoren, Neurotrophin, GDNF, Hedgehog, H-Ras, Integrine, eNOS (Brown & London 1998, Rietveld et al. 1999, Simons und Toomre 2000).

1.3 Struktur und Bedeutung der Caveolen

1.3.1 Morphologische Definition der Caveolen

Eine spezielle Form der Raft-Domänen bilden die Caveolen, die zum ersten Mal von Palade (1953) als kleine Einstülpungen der Plasmamembran in elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Endothelzellen beschrieben wurden. Zwei Jahre nach der ersten Entdeckung dieser Plasmamembran-Invaginationen durch Palade beschrieb Yamada (1955) identische Strukturen im Epithel der Gallenblase und prägte für diese den Begriff "Caveolae" („little caves“, kleine Höhlen). Der Name "Caveolae" wurde daraufhin speziell den Kolben- oder omega-förmigen Invaginationen der Plasmamembran mit einem Durchmesser von 50-100 nm zugeordnet, die zwar keine Clathrinhülle aber eine charakteristische gestreifte Hülle aufwiesen (Peters et al. 1985, Rothberg et al. 1992, siehe Abbildung 1.2). In Abbildung 1.1 sind Caveolen im Ultradünnschnitt einer Endothelzelle des Herzens dargestellt. Neben diesen charakteristisch geformten caveolären Strukturen sind auch andere Formen gefunden worden wie zum Beispiel traubenförmige Strukturen in quergestreiften Muskelzellen, rosettenförmige Caveolen in Adipozyten und abgeschnürte, vesikuläre und tubuläre Strukturen in Endothelzellen (Simionescu et al. 1975, Scherer et al. 1994, Parton et al. 1997). Auf ultrastruktureller Ebene können morphologisch identifizierbare Caveolen in zahlreichen Geweben und Zelltypen gefunden werden, wobei die Menge aber variiert. So besitzen eine Reihe von Zelltypen zahlreiche Caveolen wie zum Beispiel Adipozyten, Endothelzellen, Typ I Pneumozyten, Fibroblasten, glatte und quergestreifte Muskelzellen (Palade 1953, Napolitano 1963, Mobley und Eisenberg 1975, Gabella 1976, Gil 1983). Dagegen sind bestimmte Zelltypen wie die Neuronen des zentralen Nervensystems und Lymphozyten frei von Caveolen (Fra et al. 1994, Cameron et al. 1997).

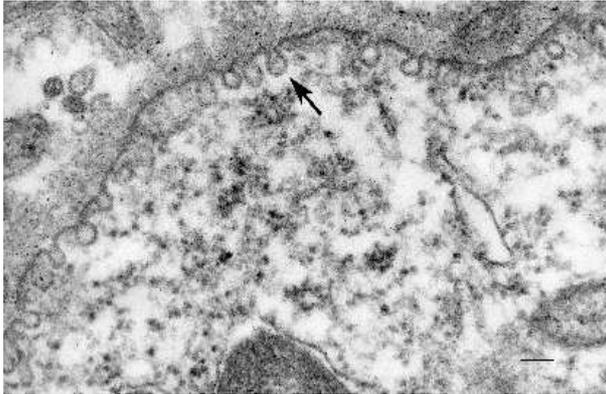


Abb. 1.1: Caveolen im Ultradünnschnitt einer Endothelzelle des Herzens. Bild: M. Westermann, Balken 100 nm

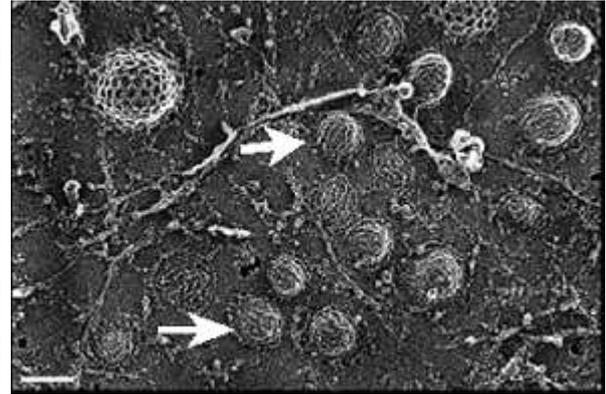


Abb. 1.2: Darstellung der gestreiften Hülle der Caveolen (siehe Pfeil) an der inneren Plasmamembran-Oberfläche nach Tief-Ätzung, Balken 100 nm. (Rothberg et al. 1992)

1.3.2 Zusammensetzung der Caveolen

Ungefähr 40 Jahre nach der ersten morphologischen Beschreibung der Caveolen begann man, die biochemische Zusammensetzung und die Struktur von Caveolen genauer zu untersuchen. Ebenso wie die Lipid Rafts sind auch die Caveolen reich an Cholesterol und Sphingolipiden. Die spezielle Lipid-Zusammensetzung vermittelt den Caveolen spezifische Eigenschaften wie zum Beispiel eine Unlöslichkeit in milden, anionischen Detergenzien wie Triton X-100. Diese Eigenschaften bildeten die Basis für die biochemische Identifikation, Reinigung und Charakterisierung von Lipid Rafts und ebenso Caveolen (Brown und Rose 1992, Lisanti et al. 1994).

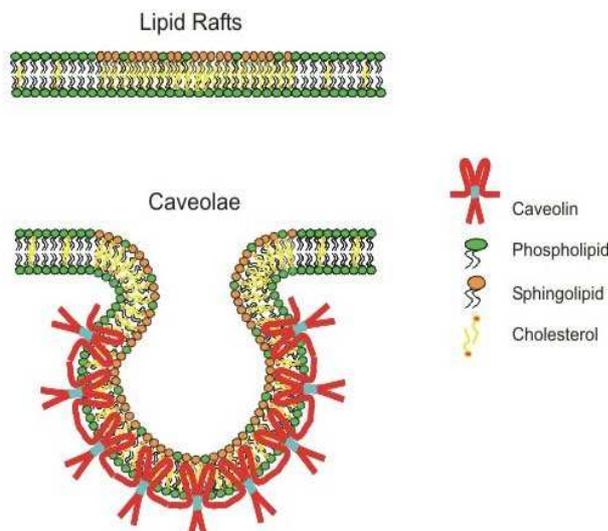


Abb. 1.3: Organisation von Lipid Rafts und Caveolen. (Razani et al. 2002a)

Trotz dieser gemeinsamen biochemischen Eigenschaften unterscheiden sich die Caveolen durch die Lokalisation der Caveolin-Proteine von den flachen Rafts (siehe Abbildung 1.3). Die Caveolin-Proteine fungieren als selektive Markerproteine für Caveolen und erlauben somit eine spezifische Analyse caveolärer Struktur und Funktionen. Zunächst wurde ein 22 kDa Protein, das Caveolin-1, als Bestandteil der Caveolen identifiziert (Glenney 1989, Rothberg et al. 1992, Dupree et al. 1993).

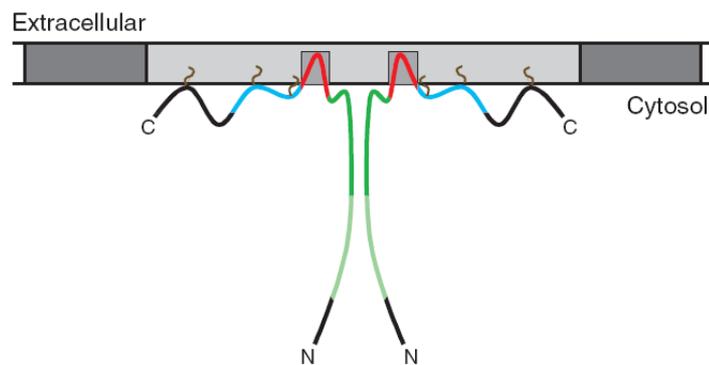


Abb. 1.4: Topologie von Caveolin in der inneren Zellmembran: Dimer von Caveolin-1; dunkel- und hellgrün = Oligomerisierungsdomäne; dunkelgrün und blau = C- und N-terminale Membran Attachment Domäne; rot = Transmembran Domäne; braun = Palmitoylgruppen dunkelgrau = Plasmamembran; hellgrau = Cholesterol- und Sphingomyelinreiche Membranen (Hnasko und Lisanti 2003)

Neben dem für Caveolin-1 kodierenden Gen wurden noch zwei weitere Caveolin-Gene beziehungsweise Proteine identifiziert. Caveolin-2, dessen Expressionsmuster mit dem von Caveolin-1 überlappt, wurde zusammen mit Caveolin-1 aus Adipozyten (Scherer et al. 1995) aufgereinigt und bildet mit diesem *in vivo* hetero-oligomere Komplexe (Scherer et al. 1996, 1997). Diese beiden Mitglieder der Caveolin-Familie kommen hauptsächlich in Endothelzellen, Fibroblasten, Typ I Pneumozyten und Adipozyten vor. Dagegen ist Caveolin-3, welches den höchsten Grad an Sequenz-Homologie mit Caveolin-1 aufweist, auf Muskelzellen beschränkt, in denen die Caveolin-1-Expression gering ist (Way und Parton 1995, Tang et al. 1996, Song et al. 1996a). Zusätzlich zu den α -Isoformen besitzen sowohl Caveolin-1 als auch Caveolin-2 kürzere β -Isoformen, wobei die Caveolin-1 β -Isoform aus einer alternativen Translation-Startsequenz resultiert, die ein um 32 Aminosäuren verkürztes Protein hervorbringt (Scherer et al. 1995). Caveolin-1 besitzt eine ungewöhnliche Membran-Topologie (siehe Abbildung 1.4). Es ist zwar ein integrales Membranprotein, durchzieht aber

als solches nicht die Lipid-Doppelschicht. Eine zentrale hydrophobe Domäne bildet dagegen eine sogenannte Haarnadelstruktur, welche in die cytoplasmatische Membranhälfte inseriert. Das C- und N- terminale Ende des Proteins verbleiben im Cytoplasma (Kurzchalia et al. 1992). Neben dieser 32 Aminosäure (AS) umfassenden Membrandomäne existieren sowohl am N-Terminus (AS 82-101) als auch am C-Terminus (AS 135-150) sogenannte Membran-Anheftungs-Domänen (Schlegel et al. 1999, Schlegel und Lisanti 2000). Darüber hinaus kann Caveolin-1 an 3 Cystein-Resten des C-Terminus (133, 143, 156) palmitoyliert sein (Dietzen et al. 1995), wodurch die Struktur an der Membran stabilisiert wird (Monier et al. 1996).

Eine weitere charakteristische Eigenschaft von Caveolin-1 ist die Bildung von stabilen Homo- und Hetero- Oligomeren mit Caveolin-2 aus 14-16 Monomeren, die nur durch Behandlung mit starken Detergenzien dissoziieren (Monier et al. 1995, Sargiacomo et al. 1995, Li et al. 1996). Die Bildung dieser Oligomere findet direkt nach der Synthese von Caveolin-1 im Endoplasmatischen Retikulum und vor dem Austritt in den Golgi-Komplex statt (Monier et al. 1995). Die hierfür verantwortliche Oligomerisierungsdomäne wurde am N-Terminus lokalisiert, welcher ebenfalls den Transport von Caveolin-1 zu den caveolären Invaginationen der Plasmamembran vermittelt (Luetterforst et al. 1999, Machleidt et al. 2000).

Neben der Bildung von Oligomeren ist die Bindung von Cholesterol ein weiteres Charakteristikum für die Struktur und Funktion der Caveolen. Caveolin-1 bindet Cholesterol und das Gangliosid GM1 *in vivo* und *in vitro* (Fra et al. 1995, Murata et al. 1995). Neben Caveolin ist Cholesterol maßgeblich an der caveolären Struktur beteiligt. Eine Behandlung mit Cholesterol-bindenden Substanzen wie zum Beispiel Nystatin, Filipin oder Cyclodextrin führt zu einer Abflachung und zum Verschwinden von morphologisch identifizierbaren Caveolen (Rothberg et al. 1992, Schnitzer et al. 1994, Hailstones et al. 1998, Westermann et al. 2005). Die stabile Membran-Invagination kommt durch die hohe Konzentration an Cholesterol (Bacia et al. 2005) sowie die Insertion von Caveolin-1 in die cytoplasmatische Hälfte der Doppelschicht zustande, wodurch die Oberfläche relativ zur exoplasmatischen Membranhälfte vergrößert wird und es zur Einstülpung der Membran kommt. Diese Stabilisierung einer gekrümmten Membran zusammen mit der Anwesenheit des Caveolins unterscheiden die Caveolen strukturell und funktionell von den Lipid Rafts (Meder and Simons 2006).

1.3.3 Funktion der Caveolen

Seit ihrer Entdeckung in den 1950er Jahren ist viel über die eigentliche Funktion der Caveolen spekuliert worden. Eine Reihe von Funktionen wurde ihnen und ihrem Markerprotein, dem Caveolin-1, zugeschrieben. Die Caveolen spielen eine Rolle bei einer Vielzahl verschiedener zellulärer Prozesse wie Transportvorgängen (Endocytose, Transcytose, Potocytose und Pinocytose), bei der Cholesterol und Lipid-Homeostase, bei Signaltransduktionsprozessen und in der Tumorsuppression.

1.3.3.1 Transportfunktion der Caveolen

Aufgrund ihrer vesikulären Morphologie und Anreicherung in Endothelzellen wurde den Caveolen schon sehr früh die Funktion der Transcytose von Proteinen durch kapillare Zellen zugeschrieben (Simionescu et al. 1975, Schnitzer et al. 1994, Predescu et al. 1998). Schnitzer et al. (2001) konnten zeigen, dass der Transport durch Caveolen ein bedeutender und kinetisch bevorzugter Weg für die Transcytose bestimmter Proteine darstellt. Über einen konstitutiven, durch Kinase-regulierten „Kiss-and Run“-Prozess sind die Caveolen in der Lage, sich in einem kleinen Volumen unterhalb der Plasmamembran zu bewegen (Pelkmans et al. 2005). Sie könnten auf diese Weise in Endothelzellen die Transcytosevorgänge bewirken. Außerdem werden die Caveolen mit einer endocytotischen Funktion in Beziehung gebracht, die bisher bei den Clathrin- und COPI-, COPII- beschichteten Vesikeln bekannt war. Einige Rezeptoren und extrazelluläre Makromoleküle werden speziell durch Caveolen anstatt durch Clathrin-umhüllte Vesikel in die Zelle aufgenommen. Dies sind zum Beispiel Cholera und Tetanus Toxin (Montesano et al. 1982) oder das Simian Virus 40 (SV40) (Anderson et al. 1996, Stang et al. 1997), die als multivalente Fracht die caveoläre Endocytose auslösen (Parton et al. 1994, Pelkmans et al. 2001, Kirkham et al. 2005, Damm et al. 2005). Außerdem konnte gezeigt werden, dass *N*-ethyl-maleimid (NEM) die Transcytose/Endocytose von Caveolen in Endothelzellen inhibiert (Predescu et al. 1994, Schnitzer et al. 1995a). Die Caveolen enthalten die für das Vesikel-Docking und Fusion nötigen Bestandteile (NSF, SNAP, VAMP, GTPase) (Schnitzer et al. 1995b, Predescu et al. 2001). Das Caveolin bleibt als Hüllkomponente im Gegensatz zu den Clathrin-beschichteten Vesikeln sowohl beim Transport als auch bei der Fusion mit dem Zielkompartiment membrangebunden (Pelkmans et al. 2004). FRAP-Untersuchungen zeigten jedoch, dass Caveolin-assoziierte Membranen nach

Invagination der Caveolen innerhalb der Zelle mobil, Caveolen an der Plasmamembran dagegen aber eher immobil sind. Die mobile Caveolin-Fraktion, die mit zellinternen Strukturen wie dem ER, dem Trans-Golgi-Netzwerk und Caveosomen assoziiert ist, beträgt etwa 80 %, wohingegen die immobile Caveolin-Fraktion, welche mit Caveolen der Plasmamembran assoziiert ist, nur 5-20 % beträgt (Thomson et al. 2002, Kenworthy et al. 2004). Diese Untersuchungen zeigen, dass Plasmamembran-assoziiertes Caveolin-1 eher unbeweglich ist und dass Caveolen nicht in eine effiziente konstitutive Endocytose involviert sind. Nur 2 % aller Caveolen schnüren sich pro Minute von der Membran ab (Kirkham et al. 2005), wobei Peters et al. (2003) zeigten, dass bei der Aufnahme von Prion-Proteinen durch Caveolen 10 % aller Caveolen pro Stunde internalisiert werden, was auf eine sehr langsame konstitutive Endocytose hindeutet. Darüber hinaus spielt das Actin-Cytoskelett eine entscheidende Rolle in der Stabilisierung und Immobilisierung der Caveolen (Mundy et al. 2002, Stahlhut und Deurs 2000). Diese Ergebnisse schließen aber eine endocytotische Funktion des Caveolins und der Caveolen unter bestimmten Bedingungen, in denen das Actin-Cytoskelett verändert wird, nicht aus. Dies ist der Fall bei der Aufnahme des SV40 Virus, welches über MHC-Klasse-I-Moleküle an die Zelloberfläche bindet. Über eine komplexe Signalkaskade kommt es zu einer Umorientierung des kortikalen Actin-Cytoskeletts und zur Rekrutierung von Dynamin. Ohne diese Stimulation sind nur 10 % der Caveolen mit Dynamin assoziiert, welches die Abschnürung der Caveolen vermittelt (Pelkmans et al. 2001, 2002 a, 2002 b).

1.3.3.2 Caveolen und Cholesterol-Homeostase

Außerdem kommt den Caveolen eine Bedeutung in der Cholesterol-Homeostase zu. Caveolin-1 ist in der Lage, mit Cholesterol Komplexe zu bilden, wobei ein Caveolin-Molekül 1-2 Cholesterol-Moleküle bindet (Murata et al. 1995, Thiele et al. 2000). Caveolin-1 reagiert daher in Bezug auf seine Lokalisation und transkriptionale Regulation sensitiv auf Veränderungen in der Cholesterol-Konzentration. Eine Behandlung von Zellen mit Cholesterol-Oxidase führt dazu, dass Caveolin-1 zum ER und Golgi transportiert wird, wobei ein Entfernen der Cholesterol-Oxidase zum Wiedereinbau von Caveolin und freiem Cholesterol in Caveolen führt (Smart et al. 1994). Die Caveolin-1-Expression ist durch zwei Sterol-regulierte Elemente in der Promotorregion abhängig vom Cholesterol-Gehalt (Hailstones et al. 1998, Bist et al. 1997, Fielding et al. 1997, 1999). Cholesterol wird *de novo*

hauptsächlich im ER von Leberzellen synthetisiert, wobei 90 % in die Plasmamembran eingebaut werden (Simons und Ikonen 2000). Welche molekularen Mechanismen und Transportwege dabei eine Rolle spielen, ist noch nicht im Einzelnen geklärt. Cholesterol soll hauptsächlich über einen Golgi-unabhängigen Weg zur Plasmamembran transportiert werden (Urbani und Simoni 1990, Heino et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Caveolin-1 beim Transport von Cholesterol zur Plasmamembran eine Rolle spielt (Smart et al. 1996), dass ein nicht vesikulärer Proteinkomplex aus Caveolin-1 und einigen Chaperonen der Cyclophilin- und Heat-Shock-Familie beteiligt ist und dass die Palmitoylierungsstellen im Caveolin-1 für die Bindung des Cholesterols nötig sind (Uittenbogaard et al. 1998, Uittenbogaard und Smart 2000).

Um ihren intrazellulären Cholesterol-Gehalt zu regulieren, sind periphere Zellen in der Lage, Cholesterol von der exoplasmatischen Membranhälfte an HDL-Partikel (High-density lipoprotein) für den Weitertransport zur Leber (reverser Cholesteroltransport) abzugeben, wobei Caveolen als Portale für diesen Efflux fungieren (Fielding und Fielding 1997) und Caveolin-1 diesen Prozess reguliert (Fielding et al. 1999, Arakawa et al. 2000, Frank et al. 2001). Darüber hinaus ist der Scavenger-Rezeptor (SR-BI, „Makrophagen-Rezeptor“), welcher als HDL-Rezeptor sowohl den Transfer von freiem Cholesterol aus der Plasmamembran zum HDL als auch die selektive Aufnahme von Cholesterol-Estern aus HDL-Partikeln in die Zelle vermittelt (Ji et al. 1997, Acton et al. 1996), ebenfalls in Caveolen konzentriert (Babitt et al. 1997). Die Bedeutung der Caveolen und des Caveolin-1 in Bezug auf den Fettstoffwechsel wird an Caveolin-defizienten Mäusen deutlich. Diese sind zwar lebensfähig und fertil, haben aber eine Reihe von Dysfunktionen und zeigen einen veränderten Phänotyp (Lay and Kurzchalia 2005). Caveolin-defiziente Mäuse sind resistent gegen Fett-Diät, zeigen kleinere Durchmesser der Adipozyten sowie eine Hyperplasie des braunen Fettgewebes (Razani et al. 2002b). Außerdem zeigen sie eine erheblich reduzierte Glucose-Aufnahme aufgrund einer drastischen Degradierung des Insulin-Rezeptors im Fettgewebe ohne Veränderungen der Insulin-Rezeptor-Genexpression (Cohen et al. 2003a). Weitere Untersuchungen an Caveolin-1-defizienten Mäusen ergaben, dass die Bildung von artherosklerotischen Plaques um bis zu 70 % minimiert ist, wobei auch der Gehalt an Scavenger Rezeptor für oxidiertes und modifiziertes LDL, CD36 und des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls (VCAM-1) deutlich reduziert sind. Daher scheint Caveolin-1 für den gezielten Transport von CD36 zur Plasmamembran und dessen Stabilisierung nötig zu sein (Frank et al. 2002).

1.3.3.3 Die Rolle der Caveolen in der Signaltransduktion

Weitere wichtige Funktionen besitzen Caveolen und Caveolin-1 in der Signaltransduktion, weshalb sie auch als „Signalosomen“ bezeichnet werden. Obwohl es kein absolutes Kriterium für die Fähigkeit von Proteinen gibt, in Caveolen zu lokalisieren, besitzt eine Vielzahl von Signalmolekülen Lipid-Modifikationen, die ihnen eine Affinität zu Caveolen verleihen. Gut charakterisierte Caveolen-assoziierte Proteine sind zum Beispiel H-Ras, die Familie der Src-Tyrosin-Kinasen, heterotrimere G-Protein α - Untereinheiten und die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), die alle eine oder mehrere Myristoyl-, Palmitoyl- oder Prenylgruppen enthalten (Li et al. 1995, Feron et al. 1996, Garcia-Cardena et al. 1996, Song et al. 1996b). Charakteristisch für die Bindung dieser Proteine ist die Interaktion mit der sogenannten Scaffolding-Domäne des Caveolin-1 (CSD), eine 20 Aminosäure (AS 82-101) umfassende Sequenz (Okamoto et al. 1998, Smart et al. 1999).

Bei Caveolin-1-defizienten Mäusen kommt es zur Deregulation des NO-Signalweges. Die Lokalisation von eNOS in Caveolen ist wichtig für die maximale eNOS-Aktivität und wird negativ durch Caveolin-1 reguliert (Garcia-Cardena et al. 1996, Bucci et al. 2000). Die Aorten dieser Mäuse sind nicht mehr in der Lage, einen gleichmäßigen kontraktile Tonus zu entwickeln. Die Freisetzung von NO (Stickstoffmonoxid) und der Gehalt an cGMP ist in diesen Mäusen höher (Drab et al. 2001). Caveolin-1 ist daher notwendig für die 3 wichtigsten vaskulären Funktionen, die auf dem NO-Signalweg beruhen: endotheliale Relaxation der Arterien, myogener Tonus und stimulierte Kontraktilität. Darüber hinaus scheint Caveolin-1 durch die Regulation von Protein-Protein-Interaktionen und Aktivierung eine Rolle bei der endothelialen Angiogenese zu spielen, wobei Caveolin-1 ein positiver Regulator für die endotheliale kapillare Tubulus-Formation ist (Liu et al. 2002).

Caveolin-1 gilt als negativer Regulator der p42/44 MAP-Kinase. In Caveolin-1-defizienten Mäusen ist eine Hyperaktivierung von ERK 1/2, welches eine Hauptkomponente der p42/44 MAP-Kinase-Kaskade ist, zu beobachten (Cohen et al. 2003b). Diese Mäuse haben infolgedessen Herzkrankheiten wie zum Beispiel dilatative Kardiomyopathie, pulmonare Hypertension oder Hypertrophie (Zhao et al. 2002), was darauf hindeutet, dass die Caveoline eine Schlüsselfunktion in der Signalgebung des kardiovaskulären Systems haben. Ein derartiger Effekt konnte auch für Caveolin-3 nachgewiesen werden. Zudem zeigen diese Mäuse eine Verengung in den Alveolen-Bereichen und eine Verdickung der Alveolen-Wand

in der Lunge. Es konnte in diesem Zusammenhang eine Hochregulierung von VEGF-R2 (Flk-1), einem Marker für nicht differenzierte Endothelzellen oder blutbildende Zellen, festgestellt werden. Die Verdickung der Wände kommt wahrscheinlich durch Auflagerung von extrazellulärem Material, begründet durch unkontrollierte Hyperproliferation von Angioblasten, zustande. Diese Tiere sind intolerant gegenüber Bewegung, und es tritt eine schnelle Erschöpfung ein (Drab et al. 2001).

Zusätzlich zur Organisation der Signal-Komplexe nimmt Caveolin auch Anteil an der Signalkaskade, indem es als Substrat für sowohl Tyrosinkinase als auch Serin-/Threoninkinase fungiert. Caveolin-1 kann am Tyrosin 14 (Tyr14) am aminoterminalen Ende des Proteins phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung ist konstitutiv auf einem geringen Niveau in den meisten Zelltypen, wobei sie als Antwort auf mehrere Stimuli zunimmt, wie zum Beispiel Insulin, Angiotensin II, Endothelin-1, Adrenocorticotropin (ACTH), PDGF (platelet-derived growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor) und EGF (epidermal growth factor) (Yamamoto et al. 1998, Mastick et al. 1995, Lee et al. 2000, Kim et al. 2000, Hua et al. 2003, Labrecque et al. 2003, Fielding et al. 2004, Colonna et al. 2005). Die Phosphorylierung von Tyr14 wird ebenfalls ausgelöst durch zellulären Stress wie Scherbeanspruchung, Apoptose, ultraviolette Strahlung, oxidativer Stress und osmotischer Schock, als Antwort auf Integrin-Aktivierung und bei Internalisierung der Caveolen (Aoki et al. 1999, Volonte et al. 2001, Navakauskiene et al. 2004, Radcliff and Rizzo 2005).

Aufgrund der Tatsache, dass Caveolin-1 als Scaffolding-Protein wirkt und die Fähigkeit besitzt, verschiedene Signalwege zu hemmen, wurde dem Caveolin eine Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben. Caveolin-1-defiziente Mäuse bilden spontan keine Tumore aus, sie zeigen aber eine erhöhte Tumorgenizität aufgrund von karzinogenen Stimuli (Razani et al. 2001 b, Capozza et al. 2003). Überexpression von Caveolin-1 zeigt, dass Caveolin-1 ein potenter Inhibitor für zahlreiche pro-proliferative Signalwege ist, indem es zum Beispiel den EGF-Rezeptor und einige Mitglieder der Ras-p42/44 MAP-Kinase-Kaskade bindet und diese hemmt (Couet et al. 1997, Engelman et al. 1998). In onkogen transformierten Zellen ist die Expression von Caveolin-1 oft unterdrückt, wobei nur eine geringe oder gar keine Expression in verschiedenen humanen Tumoren und Krebs-Zelllinien gefunden wurde (Razani et al. 2001 a). Andererseits ist aber die Caveolin-1-Expression in vielen späteren Tumorstadien hoch, und es wurde eine Korrelation zwischen der Entwicklungsstufe des Tumors und der Caveolin-1-

Expression gefunden. Die unterschiedliche Expressionsrate wird dadurch erklärt, dass Caveolin-1 die Fähigkeit besitzt, sowohl anti-proliferative als auch Pro-Überlebenseffekte auszuüben (Liscovitch et al. 2005).

1.4 Die Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung

Die Gefrierbruch- Methode (freeze-fracture), die als Konzept schon 1950 eingeführt wurde (Hall 1950, Moor et al. 1961), ermöglicht Einblicke in den Aufbau und die ultrastrukturelle Organisation von Biomembranen. Bei der konventionellen Gefrierbruch-Replika-Elektronenmikroskopie werden Zellen schnell eingefroren und bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit einem Messer aufgebrochen (siehe Abbildung 1.5). Dabei verläuft der Bruch bevorzugt durch die hydrophoben Bereiche der Lipid-Doppelschicht, wobei zwei Spaltflächen entstehen, zum einen die äußere (exoplasmatische) Spaltfläche (EF, E-face) und zum anderen die innere (protoplasmatische) Spaltfläche (PF, P-face). Beide Spaltflächen werden mit Platin (Pt) und Kohlenstoff (C) bedampft, um dünne Metall-Replika zu erhalten. Diese Replika werden dann von der Probe abgelöst, mit Hypochlorid gereinigt und können so im Transmissions-elektronenmikroskop (TEM) analysiert werden (Branton 1971, Meyer und Winkelmann 1972).

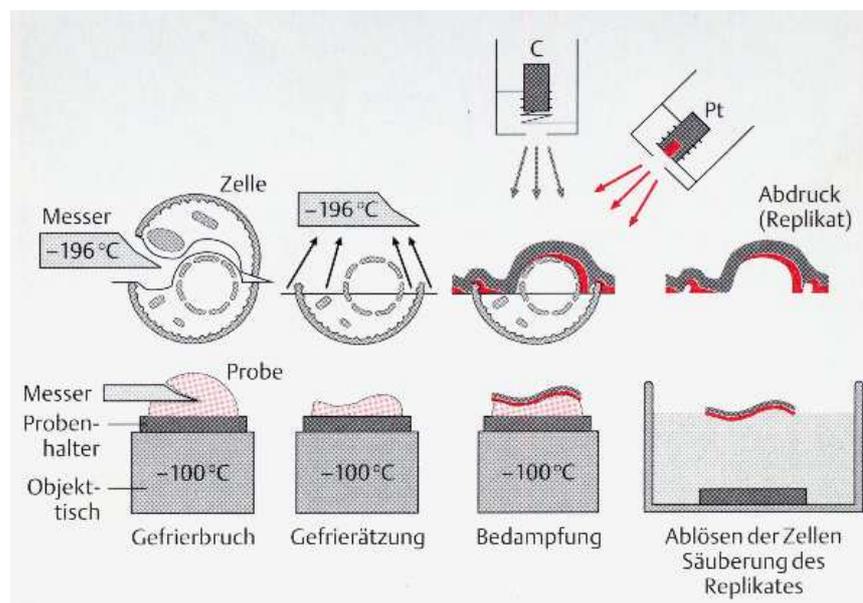


Abb. 1.5: Prinzip der Gefrierbruchmethode (Plattner, Hentschel 1997)

Vor allem die Gefrierbruchmethodik wurde zur Untersuchung von Membranstrukturen eingesetzt, als man begann, die große Zahl von Intramembranpartikeln (IMPs) mit diversen Proteinen zu korrelieren (Branton 1971, Singer und Nicolson 1972, Meyer und Winkelmann 1972). Dennoch war es mit dieser Methode alleine nicht möglich, direkte Informationen über die biochemische Natur von Membrankomponenten zu erhalten. Erst die Kombination der Gefrierbruchmethode mit cytochemischer Markierung von individuellen Molekülen der Zellmembran (freeze-fracture cytochemistry) lieferte direkte Einblicke in die chemische Natur und Topologie der Zellmembrankomponenten (Fujimoto 1993, Pinto da Silva 1984, 1987, Severs 1995, Takizawa und Saito 1996, Torris und Mancini 1996). Zunächst wurden Zellsuspensionen vor der Replikation markiert (Pinto da Silva und Branton 1970, Pinto da Silva und Kan 1984), wobei diese Methode als "label-fracture" bezeichnet wird. Eine Variation dieser Technik ist die "fracture-flip"-Methode, bei der von außen markierte Zellen aufgebrochen und nur mit einer Kohlenstoffschicht bedampft werden. Anschließend werden diese Kohlenstoff-Replika umgedreht und eine Platinschicht aufgedampft (Andersson-Forsman und Pinto da Silva 1988). Bei der "fracture-label"-Methode werden hingegen Zellen im Anschluss an den Gefrierbruch und nach der Pt/C-Bedampfung markiert (Dinchuk et al. 1987, Gruijters et al. 1987, Johnson and Meyer 1993). Diese verschiedenen Techniken der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung haben alle den Nachteil, dass nur die äußere, exoplasmatische Spaltfläche (E-face) zellulärer Membranen markierbar ist, wohingegen die innere, protoplasmatische Spaltfläche (P-face) nicht zugänglich ist. Erst mit der von Fujimoto (1995) eingeführten Methode der "SDS-digested freeze-fracture replica labeling (SDS-FRL)"-Technik wurde es möglich, die protoplasmatische Spaltfläche (P-face) der Plasmamembranen cytochemisch zu markieren. In Abbildung 1.6 ist diese Technik schematisch dargestellt. Dabei werden chemisch unfixierte Zellen cryofixiert und aufgebrochen (A). Die dabei entstehenden Spaltflächen werden durch Aufdampfen einer Pt/C-Schicht stabilisiert (Replikation, B). Um Zellreste abzulösen, werden die Replika mit 2,5 % SDS behandelt. Moleküle, die sich in direktem Kontakt zu den Replika befinden wie Membranlipide und membrangebundene Proteine bleiben an den Replika haften (C). Das Detergenz wird mit Hilfe von Pufferlösungen ausgewaschen und die an den Replika gebundenen Membrankomponenten können dann mit Antikörpern für die Immuncytochemie markiert werden (D, Fujimoto 1997). Der Nachweis des gebundenen ersten Antikörpers und damit des zu markierenden Epitops erfolgt dann über einen mit Gold gekoppelten zweiten Antikörper. Abbildung 1.7 zeigt eine schematische Darstellung durch einen Querschnitt eines derartigen Antikörper-Gold-Komplexes, der ein an der Replika haftendes Epitop markiert. Ein solcher

Antikörper-Gold-Komplex besitzt eine Ausdehnung von ~ 20-30 nm, so dass bei dieser Technik die Goldpartikel in einem Abstand von ~ 20-30 nm vom markierten Epitop entfernt sein können. Für diese Methode ist es entscheidend, dass chemisch unfixierte Zellen verwendet werden, da in Aldehyd-fixierten Zellen die zellulären Komponenten nicht mit SDS abgelöst werden können.

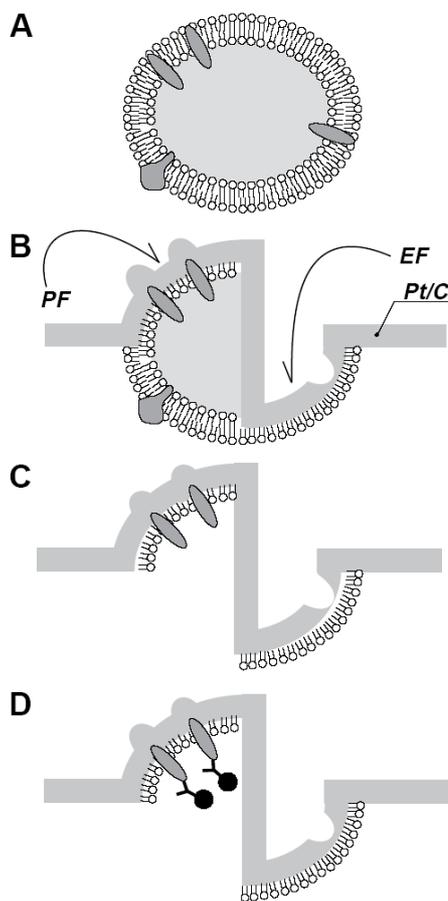


Abb. 1.6:
Schematische Darstellung der "SDS-digested freeze-fracture replica labeling"-Methode; (A) Einfrieren der Zellen, (B) Gefrierbruch und Pt/C-Bedampfung, (C) SDS-Reinigung, (D) Immunogold-Markierung. (Fujimoto 1995)

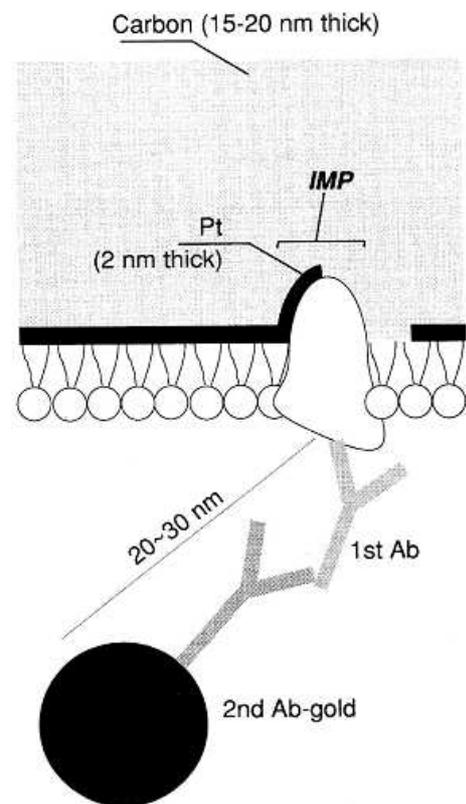


Abb. 1.7:
Schematische Darstellung eines Querschnitts durch eine Immunogold-markierte Replika; die Goldpartikel befinden sich in 20-30 nm Abstand zum Epitop. IMP = Intramembranpartikel; 1 st Ab = first antibody (1. Antikörper); 2 nd Ab = second antibody (Zweitantikörper); (Fujimoto 1997).

1.5 Die Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung an Caveolen

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen mit Hilfe der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung wurden hauptsächlich an Membranen von 3T3-Mausfibroblasten durchgeführt. Das Markerprotein der Caveolen, Caveolin-1, wurde an den entstandenen Replika mit einem spezifischen Erstantikörper gegen Caveolin-1 markiert. Die am Caveolin-1 gebundenen Erstantikörper wurden anschließend mit spezifischen Zweitantikörpern, welche mit Goldpartikeln gekoppelt sind, nachgewiesen. Die folgende Abbildung 1.8 zeigt ein Modell einer Caveole nach der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung. Die Abbildung dient der Definition der Caveolen-Bereiche, die im Verlauf dieser Arbeit erwähnt werden.

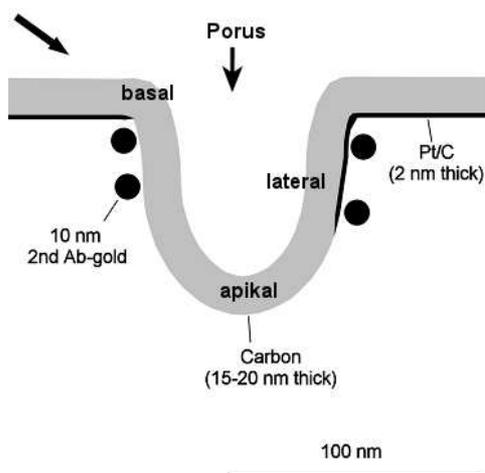


Abb. 1.8:
Modell einer replizierten Caveole nach Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung. Kennzeichnung der Caveolen-Bereiche: basal, lateral, apikal. Der Porus (senkrechter Pfeil) bezeichnet die Öffnung der Caveole. Die Platinbedampfungsrichtung wird durch den schrägen Pfeil gezeigt. 10 nm 2nd Ab-gold: Zweitantikörper mit 10 nm Goldpartikel gekoppelt

1.6 Zielsetzung

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Charakterisierung und Strukturanalyse der Caveolenmembran war die Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung die bevorzugt angewendete Methode. In verschiedenen Versuchsansätzen für die Immunogoldmarkierung von Caveolin-1 konnte festgestellt werden, dass die Markierungseffizienz stark variierte. Auch bei Untersuchungen anderer Membranproteine wie der CF₁ α ATP Synthase-Untereinheit in Membranen von Etioplasten (Sherameti et al. 2004) oder bei der Lokalisation der Tetrachlorethan reduzierenden Dehalogenase in *Sulfurospirillum multivorans* (John et al. 2006) konnten Unterschiede in den Markierungsraten festgestellt werden. Diese wurden zum

Teil jedoch nicht diskutiert. Bei der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung der Tetrachlor-ethan reduzierenden Dehalogenase wurden die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse in Bezug auf die Verbesserung der Markierungseffizienz schon einbezogen. Um die Struktur der Caveolen und die Verteilung des Caveolins mit Hilfe der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung genau untersuchen zu können, sollten zunächst die ursächlichen Faktoren für die Variation in der Markierungsrate bestimmt und der Einfluss der Replikation mit Platin- beziehungsweise Kohlenstoffschichten untersucht werden. Daraufhin sollte es möglich sein, die Methode der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung so zu optimieren, dass eine maximale Markierungsrate zu erzielen ist. Fujimoto (1995) nahm an, dass vor allem die Kohlenstoffschicht einen Einfluss auf die Adsorption der Membranproteine an die Replika hat und Rash und Yasumura (1999) bestätigten diese Hypothese, indem sie zeigten, dass gap-junction Proteine besser an Kohlenstoff-Replika gebunden werden als an konventionelle Pt/C-Replika. Dennoch wurde nicht geklärt, welchen Einfluss die Platinschicht auf die Markierung hat und in welcher Weise sich die Markierungsrate optimieren lässt. Daher bestand ein Ziel dieser Arbeit in der Optimierung der Effizienz der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung. Hierzu sollten unterschiedliche Faktoren, welche die Markierungsrate beeinflussen können wie die Platinschichtdicke, die Emission, die Wahl der Antikörper-Nachweismethode und die Goldkorngrößen untersucht werden. Darüber hinaus sind die Kenntnisse über die eigentliche Struktur der den Gefrierbruch-Replika anhaftenden Halbmembran, die nach Reinigung mit dem starken Detergenz SDS an den Replika verbleiben, nur fragmentär. Deshalb sollten Untersuchungen zur Darstellung der an den Replika verbliebenen Komponenten dazu beitragen, deren Struktur besser zu verstehen und aufzuklären.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der Charakterisierung und der Strukturanalyse der Caveolenmembran mit einer Kombination von biochemischen und elektronenmikroskopischen Methoden. Die Kenntnisse über Caveolen und deren Markerprotein Caveolin-1 sind zwar zahlreich, aber dennoch sind in Bezug auf die Struktur der Caveolen, die Verteilung des Caveolins und die Zusammensetzung des caveolären coats noch Fragen offen. Westermann et al. (2005) konnten mit Hilfe der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung zeigen, dass Caveolin-1 bandförmig, basolateral um die Caveolen angeordnet ist und dass die apikalen Bereiche tief eingesenkter Caveolen frei von Caveolin-1 sind. Die Untersuchungen der Caveolen mit Hilfe der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung sollten dazu beitragen, deren proteinbiochemische Zusammensetzung, ihre Struktur und letztendlich die Lokalisation des Caveolin-1 in der Caveolenmembran besser aufzuklären.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Für die Untersuchungen zur Weiterentwicklung und Optimierung der SDS-Gefrierbruch-Replika-Immunogoldmarkierung, sowie für einige Versuche zur Immunpräzipitation und für die Rasterelektronenmikroskopie wurden konfluent gewachsene NIH 3T3-Mausfibroblastenzellen (Zell-Linie 5.15, Sammlung NIH, National Institute of Health) verwendet. Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (Biochrom AG, Berlin) mit 10 % FKS fetalem Kälberserum (nicht hitzeinaktiviert) bei 37 °C und 10 % CO₂-Begasung angezüchtet, bis ein konfluentes Wachstumsstadium erreicht war. Diese Zellen wurden dann in die im Methodenteil beschriebenen Versuche eingesetzt. Für einige Versuche wurden 3T3-L1-Mausfibroblasten (Prädipozyten, Zell-Linie L1) verwendet, die nach der Methode von Frost und Lane (1985) zu Adipozyten differenziert wurden. Dazu wurden die Prädipozyten zunächst in Dulbecco's Modified Eagle-Medium (DMEM, 1x, Biochrom AG, Berlin) mit 10 % FKS (hitzeinaktiviert) bei 37 °C und 10 % CO₂ angezüchtet, bis ein konfluentes Wachstumsstadium erreicht war. Anschließend wurde die Differenzierung zu Adipozyten eingeleitet, indem das Wachstumsmedium gegen Differenzierungsmedium (DMEM mit 15 % FKS) ausgetauscht wurde, dem 0,5 µM IBMX, 1 µM Dexamethason, 10 µg/ml Insulin zugesetzt worden war (Tag 1). Danach erfolgte alle zwei Tage ein Mediumwechsel mit Differenzierungsmedium unter Zugabe von 10 µg/ml Insulin. Nach 8-10 Tagen hatte der größte Teil der Zellen den Adipozyten-Phänotyp ausgebildet, und die Differenzierung war abgeschlossen. Die differenzierten 3T3-L1-Zellen wurden entweder sofort in die Versuche eingesetzt, oder es wurde noch einmal ein Mediumwechsel durchgeführt und DMEM mit 10 % FKS zu den Adipozyten gegeben, bevor sie geerntet und in die unter 2.4.1 beschriebenen Untersuchungen eingesetzt wurden.

2.2 Die Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung

Die Grundlagen der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung wurden eingehend in der Einleitung unter 1.2 beschrieben. In diesem Abschnitt soll nun genauer auf die Methodik

eingegangen werden, wobei zunächst die Gefrierbruchtechnik am Beispiel der 3T3-Mausfibroblastenzellen erläutert wird, da die meisten Untersuchungen an diesen Zellen vorgenommen wurden. Im Anschluss daran wird exemplarisch die Immunmarkierung an den Gefrierbruch-Replika dargestellt, bevor in den nächsten Abschnitten die einzelnen Markierungsversuche genauer beschrieben werden.

2.2.1 Die Gefrierbruchtechnik und Herstellung der Gefrierbruch-Replika

Die Präparation der 3T3-Mausfibroblasten für den Gefrierbruch erfolgte in modifizierter Form wie in Westermann et al. (1999) beschrieben. Dazu wurde zunächst die Zellschicht der in Kulturflaschen konfluent gewachsenen Zellen mit PBS (phosphate-buffered saline, 75 mM NaCl, 12,5 mM NaH₂PO₄, 67 mM Na₂HPO₄, pH 7,2), dem ein Proteasehemmer (Complete Mini Proteaseinhibitor-Cocktail, Roche Diagnostics GmbH) nach Vorgabe des Herstellers zugesetzt war, gewaschen. Die Zellen wurden dann mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturflasche abgeschabt, in 500-1000 µl PBS (mit Proteaseinhibitor) aufgenommen und bei 24-60 x g (300-800 rpm) für maximal 5 Minuten zentrifugiert (Biofuge stratos, Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products GmbH). Nach Absaugen des Überstandes wurden die pelletierten Zellen in 50 µl PBS (mit Proteaseinhibitor) resuspendiert und der Zellsuspension 15 % [v/v] Glycerol zugesetzt. Das zugegebene Glycerol soll beim Einfrieren der Zellen als Gefrierschutz fungieren. Die so behandelte Zellsuspension aus chemisch unfixierten Zellen konnte dann für den Gefrierbruch (Moor et al. 1961) verwendet werden, wobei die „Doppel-Abdruck-Technik“ (Müller et al. 1980) angewendet wurde. Die Herstellung der Gefrierbrüche erfolgte unter Mithilfe von Frau Dipl. Ing. Kaiser. Dazu wurde ein Tropfen der Zellsuspension mit Hilfe einer Impföse auf ein Sandwichprofil (Kupferträger, Kupferblech der Stärke 0,1 mm, Fläche 4 x 4 mm, BAL-TEC, Liechtenstein) aufgetragen, ein zweiter Träger darüber gelegt und überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgesaugt. Diese Sandwiches wurden dann durch schnelles Eintauchen per Hand (Einfriergeschwindigkeit ≥ 5000 K/ sec.) in ein 1:1 Gemisch aus flüssigem Ethan/Propan, welches durch flüssigen Stickstoff gekühlt war, eingefroren. Der Gefrierbruch wurde in einer BAF 400T Gefrierbruch-Anlage (BAL-TEC, Liechtenstein) bei -150 °C im Hochvakuum (10^{-6} Pa) unter Verwendung eines Doppelabdruck-Tisches ausgeführt. Die entstandenen Bruchflächen wurden sofort mit einer 2,5 nm dicken kontrastgebenden Platinschicht (Pt) bedampft. Danach wurde in einem zweiten Schritt eine 20-30 nm dicke Kohlenstoffschicht (C) zur Stabilisierung

der Pt-Replika aufgedampft. Diese Methode wurde für die verschiedenen Versuche zur Optimierung der Markierungseffizienz abgeändert und ist in den jeweiligen Kapiteln erläutert. Das Aufdampfen der Platinschicht erfolgte in einem Winkel von 35°, wobei die Schichtdicke mit Hilfe eines Quarzkristall-Schichtdicken-Messers (QSG 060, BAL-TEC) gemessen wurde. Die Kohlenstoffschicht wurde dann senkrecht auf die Bruchflächen aufgedampft. Nach der Bedampfung wurden die Kupferträger aus der Gefrierbruchanlage herausgenommen, auf Raumtemperatur erwärmt und auf einer Flüssigkeitsoberfläche abflotiert. Die so hergestellten Replika wurden dann in die Immunogoldmarkierung eingesetzt.

2.2.2 Die Immunogoldmarkierung

Die Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung wurde in Anlehnung an Fujimoto (1995, 1997) durchgeführt. Dazu wurden die Replika zunächst in eine SDS-Lösung (2,5 % w/ v SDS, in 10 mM Tris/HCl, pH 8,4 und 30 mM Sucrose) überführt, um sie von Zellresten zu säubern. Die Inkubation der Replika in der SDS-Lösung erfolgte unter Schütteln über Nacht und bei Raumtemperatur. Die Replika wurden 4 mal für 15 Minuten in PBS gewaschen, um das SDS zu entfernen. Zum Abblocken der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte die Inkubation der Replika in LBB (Labeling blocking buffer; 1 % [w/ v] BSA, 0,5 % [w/ v] Gelatine, 0,005 % [v/ v] Tween-20 in PBS, pH 7,2) für 30 Minuten bei Raumtemperatur (Dinchuk et al. 1987, Rash et al. 1990). Für die Immunmarkierung wurden Erstantikörper eingesetzt, die für die jeweils zu markierenden Proteine spezifisch waren. Auf diese Methoden wird später genauer eingegangen werden. Der Erstantikörper wurde je nach Bedarf in LBB verdünnt und die Replika in einen Tropfen (50-100 µl) dieser Antikörperlösung überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht (ü. N.) bei 4 °C. Anschließend wurden die Replika 3 mal für 5 Minuten in LBB gewaschen, um den ungebundenen ersten Antikörper zu entfernen. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Gefrierbruch-Replika in einem Tropfen einer Zweitantikörper-Lösung (1:50 in LBB) für 1,5 - 2 Stunden bei Raumtemperatur. Dafür wurden Gold-konjugierte Zweitantikörper verwendet, die an den jeweils verwendeten Erstantikörper binden und mit 10 nm großen Goldpartikeln gekoppelt waren (British Biocell International, Cardiff, UK). Im Anschluss an die Immunmarkierung wurden die Replika 3 mal für 5 Minuten in PBS gewaschen, 10 Minuten in 0,5 % Glutaraldehyd-Lösung (in PBS) fixiert und abschließend 2 mal für 5 Minuten mit ddH₂O (doppelt-destilliertes Wasser) gewaschen. Die auf diese Weise immunmarkierten Gefrierbruch-Replika wurden auf unbeschichtete Kupfernetzchen (400

mesh) aufgefischt und im Transmissions-Elektronenmikroskop (EM 902 A, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) untersucht. Die Dokumentation erfolgte entweder analog (EM-Film) oder digital mit Hilfe einer CCD-Kamera (Fast Scan-F114, TVIPS GmbH, Gauting, Deutschland).

2.3 Verbesserung der Gefrierbruch-Immunogold-Markierungstechnik und Optimierung der Markierungseffizienz

Um die Möglichkeiten einer Verbesserung der Technik der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung und einer Optimierung der Markierungseffizienz zu untersuchen, wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt, wobei zum größten Teil das Membranprotein Caveolin-1 (Cav-1) in 3T3-Mausfibroblasten als Modellprotein diente. Dieses Protein wurde gewählt, da die Versuche auch der Strukturaufklärung der Caveolen und der Verteilung des Cav-1 an den Caveolen und in der Plasmamembran dienen sollten. Darüber hinaus war die Untersuchung des Cav-1 mit Hilfe der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung bereits etabliert, so zum Beispiel bei der Lokalisation von Cav-1 in der Zelle (Robenek et al. 2003, Robenek et al. 2004) sowie an Caveolen an der Plasmamembran (Takayama et al. 1999, Fujimoto et al. 2000, Westermann et al. 2005).

In den durchgeführten Versuchen wurden unterschiedliche für die Gefrierbruch-Immunmarkierung relevante Parameter abgeändert, um deren Einfluss auf die Markierungsrate auszutesten. Dazu erfolgte zunächst eine Variation der Platinschichtdicken für die Replikaherstellung, da in verschiedenen Versuchen eine Abhängigkeit der Markierungsrate von der aufgedampften Platin-Schichtdicke beobachtet werden konnte. Weiterhin wurden die Emissions-Parameter an der Verdampferquelle (Kathode) während des Bedampfungsvorganges und die Goldkorngröße der Zweitantikörper variiert. Darüber hinaus wurde eine alternative Nachweismethode des Erstantikörpers gegen Cav-1 gewählt (Cerium-Phosphat-Immunmarkierung). Diese hier aufgezählten Untersuchungen sind im Folgenden näher beschrieben. Für die Kontrollen wurden jeweils nur Zweitantikörper eingesetzt.

2.3.1 Variation der Bedampfungsparameter

Es wurden zum einen Replika mit unterschiedlichen Platin-Schichtdicken hergestellt und zum anderen eine umgekehrte Bedampfungsreihenfolge mit Kohlenstoff als erster und Platin als zweiter Bedampfungsschicht durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Bedampfung mit einer 20-30 nm dicken Kohlenstoffschicht, wonach eine 2-2,5 nm dicke Platinschicht aufgedampft wurde. Der genaue Versuchsansatz ist in Tabelle 2.1 dargestellt. Sowohl der Gefrierbruch, die Bedampfungen als auch die anschließende Immunogoldmarkierung wurden wie in 2.2 beschrieben durchgeführt. Dabei wurde zur Immunmarkierung als Erstantikörper Cav-1 polyclonal rabbit IgG (N-20; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) in einer 1:50 Verdünnung mit LBB eingesetzt. Dieser Antikörper bindet spezifisch an den N-Terminus von Cav-1. Die spezifische Bindung des Erstantikörpers wurde mit einem Gold-konjugierten Zweitantikörper (goat anti-rabbit IgG plus 10 nm Goldpartikel, British Biocell International, 1:50 in LBB) nachgewiesen. Die auf diese Weise immunmarkierten Replika konnten dann auf Netzen aufgefischt und im TEM untersucht werden. Die Anzahl der Goldpartikel wurde für die jeweiligen Bedampfungstypen ausgezählt und miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in 3.1.1 dargestellt.

Tabelle 2.1 Variation der Bedampfungsparameter

Bedampfung	1. Bedampfungsschicht	2. Bedampfungsschicht
1	2,5 nm Pt	20-30 nm C
2	1,5 nm Pt	20-30 nm C
3	20-30 nm C	2-2,5 nm Pt

2.3.2 Variation der Emissions-Parameter

In verschiedenen Versuchen der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung konnte festgestellt werden, dass sich die Markierungsraten für das gleiche Protein erheblich unterschieden, obwohl die jeweiligen Versuchsbedingungen konstant waren. Um dieses Phänomen zu untersuchen, wurden die Parameter der Aufdampfzeit und der Emissionsstromstärke an der Verdampferquelle (Kathode) während des Bedampfungsvorganges verändert. Aus der

„Praxis“ waren schon unterschiedliche Bedampfungsverläufe bekannt. Die Emissionsspannung betrug dabei konstant 1,35 kV, und die gemessene Platinschichtdicke war konstant 2,5 nm. Die genauen Versuchsbedingungen sind in Tabelle 2.2 dargestellt. Die Immunogold-Markierung von Cav-1 wurde wie in 2.2 beschrieben durchgeführt, die Goldpartikel ausgezählt und die Markierungsraten für die unterschiedlichen Bedampfungen miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in 3.1.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2 Variation der Emissionsparameter

Bedampfung	Bedampfungstyp	Emissionsstromstärke	Aufdampfzeit
1	2,5 nm Pt/C	89 mA	12 sec
2	2,5 nm Pt/C	65 mA	24 sec
3	2,5 nm Pt/C	59 mA	35 sec

2.3.3 Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung von Aquaporin 1 (AQP1)

Die Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung an AQP1 wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Markierung eines „echten“ Transmembranproteins ebenfalls von unterschiedlichen Bedampfungsparametern abhängt, wie es bei dem „Halbmembranprotein“ Caveolin-1 der Fall ist. Bei den Aquaporinen handelt es sich um eine Familie von Transmembranproteinen, die Wasser durch Zellmembranen transportieren. Bis jetzt konnten 11 Aquaporine identifiziert werden. AQP-1 war das erste identifizierte Mitglied dieser Proteinfamilie und wird überwiegend in Zellen exprimiert, für die ein hoher Netto-Wassertransport charakteristisch ist, wie zum Beispiel im proximalen Tubulus und roten Blutzellen. Sechs Transmembranhelices mit zwei hoch konservierten Schleifen (B und E), die das Signalmotiv Asparagin-Prolin-Alanin (NPA) beinhalten, verankern AQP-1 in der Zellmembran. AQP-1 bildet Tetramere aus, wobei jedoch jede Untereinheit ihre eigene Pore für den Wassertransport besitzt (Agre et al. 2002). Für den Gefrierbruch und die Immunogold-Markierung von AQP1 wurden humane Erythrozyten verwendet. Dazu wurden einige Tropfen Blut für 1 Minute bei 90 x g (1000 rpm) zentrifugiert (Biofuge stratos, Heraeus Instruments) und die pelletierten Erythrozyten kryofixiert. Es erfolgten unterschiedliche Bedampfungen,

die in Tabelle 2.3 dargestellt sind. Für die Immunmarkierung wurde als Erstantikörper AQP1 H-55 IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) verwendet, der für die Aminosäuren 215 bis 269 von AQP1 spezifisch ist. Dieser erkennt den Molekülbereich direkt hinter der 6. Transmembranhelix bis hin zum C-Terminus des Proteins. Als Zweitantikörper wurde ein goat anti-rabbit IgG plus 10 nm Goldpartikel (British Biocell International) verwendet. Nachdem die Markierung wie in 2.2 beschrieben durchgeführt worden war, konnten die Replika auf Netzchen aufgefischt und im TEM ausgewertet werden. Die einzelnen Markierungen wurden für die unterschiedlichen Bruchflächen und Bedampfungen ausgezählt und miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind unter 3.1.3 dargestellt.

Tabelle 2.3 Bedampfungsparameter für die Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung von AQP1

Bedampfung	Bedampfungstyp
1	2,5 nm Pt/C
2	1,5 nm Pt/C
3	C/Pt

2.3.4 Cerium-Phosphat-Immunmarkierung an Gefrierbruch-Replika

Um zu testen, ob eine Wechselwirkung zwischen der aufgedampften Platinschicht und den Goldpartikeln des Zweitantikörpers stattfindet, wurde als alternative Nachweismethode für den gebundenen Erstantikörper gegen Cav-1 ein „Cerium-Phosphat-Nachweis“ durchgeführt. Für diesen Versuch wurden 3T3-Mausfibroblasten verwendet, die wie in 2.2 beschrieben behandelt und gefriergebrochen wurden. Es erfolgten 2 Bedampfungsvarianten, zum einen die konventionelle Pt/C- und zum anderen die umgekehrte C/Pt-Bedampfung mit Kohlenstoff als erster Replikationsschicht. Die genauen Parameter sind in Tabelle 2.4 dargestellt. Die spezifische Bindung des Erstantikörpers gegen Cav-1 wurde mit einer alkalischen Phosphatase, gekoppelt an dem Zweitantikörper goat anti-rabbit IgG, F(ab')₂-AP (alkalische Phosphatase, Santa Cruz Biotechnology), nachgewiesen. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Bei alkalischen Phosphatasen handelt es sich um Enzyme, die die Hydrolyse von Phosphorsäureresten katalysieren und ihr Aktivitätsoptimum im alkalischen Bereich haben. Für die Durchführung der Immunmarkierung konnte daher nicht

mit einem Phosphatpuffer gearbeitet werden, da dieser als Substrat für die alkalische Phosphatase fungiert hätte. Daher wurde für die Waschungen während der Immunmarkierung und für die Herstellung des LBB-Puffers TBS (Tris-buffered saline, 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) anstatt PBS verwendet. Die Immunmarkierung erfolgte nach dem unter 2.2 beschriebenen Prinzip. Der Nachweis der gebundenen alkalischen Phosphatase und damit des Erstantikörpers wurde nach der von Halhuber et al. (1994) beschriebenen Methode durchgeführt. Die alkalische Phosphatase katalysiert dabei die Umsetzung des Substrates p-Nitrophenylphosphat ($C_6H_4NNa_2O_6P \cdot 6 H_2O$), wobei in Anwesenheit von Ceriumchlorid ($CeCl_3$) ein schwer löslicher Cerium-Phosphat-Komplex ($Ce(HPO_4)$) ausfällt, der als kontrastreiche Struktur elektronenmikroskopisch nachweisbar ist. Dazu wurden die unterschiedlich bedampften Replika in einem Glycin/NaOH-Puffer (50 mM Glycin/NaOH pH 10, 30 % w/ v Sucrose, 25 mM Tricin, 3 mM Ceriumchlorid), dem 1 mM Nitrophenylphosphat zugesetzt wurde, für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Replika wurden anschließend mit substratfreiem Glycin/NaOH-Puffer 2 mal 5 Minuten und dann 3 mal 5 Minuten in TBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte wie schon beschrieben für 10 Minuten in 0,5 % Glutaraldehyd (in TBS). Nachdem die Replika 2 mal mit ddH₂O gespült worden waren, konnten sie auf Netzchen aufgefischt und im TEM ausgewertet werden. Die Markierungseffizienz für die unterschiedlichen Bedampfungstypen wurde anhand der Intensität des Cerium-Phosphat-Niederschlags miteinander verglichen. Die Ergebnisse dieses Versuches sind im Ergebnisteil unter 3.1.4 dargestellt.

Tabelle 2.4 Bedampfungsparameter für die Cerium-Phosphat-Markierung

Bedampfung	1. Bedampfungsschicht	2. Bedampfungsschicht
1	2,5 nm Pt	20-30 nm C
2	20-30 nm C	2-2,5 nm Pt

2.3.5 Variation der Goldkorngröße –

Einfluss der Goldkorngröße auf die Markierungseffizienz

In der Einleitung wurde auf die Grundlagen und Methodik der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung eingegangen. In Abbildung 1.7 ist eine schematische Ansicht des Querschnitts durch eine Immunogold-markierte Replika dargestellt (Fujimoto 1997). In dieser Abbildung ist zu erkennen, dass die Goldpartikel 20-30 nm entfernt von dem markierten Epitop lokalisiert sind. Die Größe des Immunogoldkomplexes müsste somit maximal 30 nm betragen. Um die Dimensionen des Antikörper-Goldkomplexes darzustellen, wurde der Zweitantikörper-Goldkomplex (goat anti-rabbit IgG plus 10 nm Goldpartikel, British Biocell International) negativ kontrastiert (Nermut 1972). Dazu wurden 10 µl der Antikörperlösung auf ein Stück Parafilm aufgebracht und ein beglimmtes Kupfernetzchen (Sputter-Coater SCD 005, Beglimmungskopf ohne Sputter-Target BAL-TEC) für 10 Minuten auf diesen Tropfen gelegt, um den Antikörper an das Netzchen adsorbieren zu lassen. Das Netzchen wurde kurz in ddH₂O gespült und dann für 5 Minuten auf einen Tropfen (50 µl) Uranylacetat (1 % w/v in ddH₂O) gelegt, um die Antikörper zu kontrastieren. Daraufhin wurde überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgesaugt und das Netzchen im TEM untersucht. Die Größe des Antikörper-Gold-Komplexes konnte auf diese Weise bestimmt werden (siehe Ergebnisse unter 3.1.5).

Um herauszufinden, ob die Größe der an die Epitope gebundenen Immunogold-Komplexe einen Einfluss auf die Markierungsrate hat, wurden Zweitantikörper mit unterschiedlicher Goldkorngröße getestet. Dazu erfolgte wie schon beschrieben ein Gefrierbruch an NIH-3T3-Mausfibroblasten mit anschließender Kohlenstoff-Bedampfung (C). Die Immunmarkierung von Cav-1 wurde wie in 2.2 beschrieben mit dem Erstantikörper Cav-1 N-20 polyclonal rabbit (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) durchgeführt, wobei Zweitantikörper eingesetzt wurden, die mit 10 nm, 5 nm und 2 nm großen Goldpartikeln konjugiert waren (goat anti-rabbit IgG plus 5 nm Goldpartikel, goat anti-rabbit IgG plus 2 nm Goldpartikel, British Biocell International). Dieser Versuchsansatz ist in Tabelle 2.5 dargestellt. Die auf diese Weise immunmarkierten Replika wurden darüber hinaus mit dem Philips CM 120 untersucht, um das Verteilungsmuster des goldmarkierten Caveolins in einer Goniometer-Kippserie zu analysieren. Die Kippserien sowie die Anfertigung der 3D-Rekonstruktionen erfolgte unter Mithilfe von Herrn Dipl. Ing. Steiniger (Elektronenmikroskopisches Zentrum, Klinikum der FSU Jena). Die Ergebnisse dieser Versuche sind in 3.1.5 dargestellt.

Tabelle 2.5 Variation der Goldkorngröße

Bedampfung	Bedampfungstyp	Zweitantikörper
1	C	goat anti-rabbit IgG plus 10 nm Goldpartikel
2	C	goat anti-rabbit IgG plus 5 nm Goldpartikel
3	C	goat anti-rabbit IgG plus 2 nm Goldpartikel

2.3.6 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Caveolen-Membran

Neben den Untersuchungen der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung wurden auch rasterelektronenmikroskopische Analysen der caveolären Membranen von 3T3-Mausfibroblasten durchgeführt. Zum einen wurden mit 10 nm Goldpartikeln immunmarkierte Replika von 3T3-Mausfibroblasten verwendet, die mit der schon beschriebenen Gefrierbruchtechnik hergestellt worden waren. Die Untersuchung dieser Replika erfolgte im LEO 1530 „Gemini“ (Zeiss, Oberkochen) mit einem „Centaurus“ BSE-Detektor (back-scattered electron, K.E. Developments Ltd., United Kingdom), wobei die replizierte protoplasmatische Spaltfläche der Plasmamembran dargestellt werden sollte. Zum anderen wurden 3T3-Mausfibroblasten nach der von Erlandsen et al. (2001) beschriebenen Methode fixiert und ebenfalls im Raster EM untersucht, um die caveolären Strukturen der Zellen darzustellen. Dazu wurden die Zellen auf Glasplättchen kultiviert. Die auf den Glasträgern aufgewachsenen Zellen wurden 2 mal mit Na-Cacodylat-Puffer (0,1 M, pH 7,2) gewaschen und für 30 Minuten in 2,5 % Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurde die monoläre Zellschicht erneut 2 mal für je 5 Minuten mit Na-Cacodylat-Puffer gewaschen und 45 Minuten mit OsO₄ (Osmiumtetroxid, 1 % in Cacodylat-Puffer) fixiert. Die Zellen wurden dann 2 mal für je 5 Minuten mit Cacodylat-Puffer gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 2 mal 100 % Ethanol für jeweils 10 Minuten) entwässert und einer Kritisch-Punkt-Trocknung (Critical Point Dryer CPD 030, BAL-TEC) unterzogen. Die mit den Zellen bewachsenen Glasplättchen wurden mit LeitC-Klebefolie (Plano GmbH) auf Träger aufgeklebt und mit Gold Sputter-bedampft (Sputter Coater SCD 005 mit Goldtarget, BAL-TEC), bevor sie im Rasterelektronenmikroskop untersucht werden konnten.

2.4 Darstellung der an Gefrierbruch-stabilisierten Membranhälften gebundenen Komponenten

Wie schon zuvor erwähnt, konnte in verschiedenen Versuchen der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung von Caveolin-1 festgestellt werden, dass die Markierungsrate je nach Art der Bedampfung unterschiedlich war. Es war zu beobachten, dass mit abnehmender Platinschichtdicke die Markierungsrate im Mittel effizienter war als bei dick aufgedampften Platinschichten. Die im vorherigen Abschnitt dargestellten Versuche dienten alle der Optimierung der Markierungsrate für Cav-1 im Speziellen und der Gefrierbruch-Immunmarkierung im Allgemeinen. Im folgenden Abschnitt wird nun auf einige Untersuchungen eingegangen, die die Ursachen dieser Phänomene ergründen sollen. Die Grundlage für diese Versuche war die Hypothese, dass sich die Menge der nach der SDS-Reinigung gebundenen Komponenten wie Proteine und Lipide an den Replika-stabilisierten Membranhälften je nach Bedampfungstyp unterscheidet, so dass bei nur mit Kohlenstoff bedampften Membranspalflächen mehr zu markierendes Material haften bleibt als bei Pt/C-bedampften Membranhälften, was sich in einer verbesserten Markierungsrate äußern sollte. Daher wurde nun versucht festzustellen, ob an den C/Pt oder nur mit Kohlenstoff bedampften Replika mehr Material anhaftet als an normal bedampften Replika (Pt/C). Zunächst wurden dazu die Replika mit verschiedenen Kontrastierungsmethoden kontrastiert, um die an den Replika haftenden Komponenten sichtbar zu machen und für die verschiedenen Bedampfungstypen zu vergleichen. Außerdem erfolgte die Herstellung von Ultradünnschnitten immunmarkierter Replika, um die Gefrierbruch-stabilisierten Membranhälften sichtbar zu machen und eventuelle Schichtdickenunterschiede des anhaftenden Materials festzustellen. Des Weiteren wurden beidseitige C-Bedampfungen durchgeführt, so dass sich die Membranhälften zwischen den kontrastreichereren Bedampfungsschichten darstellte und deren Schichtdicken für die unterschiedlichen Bedampfungstypen miteinander verglichen werden konnten. Diese Untersuchungen sind in den nachfolgenden Abschnitten genauer erläutert.

2.4.1. Einbettung und Ultradünnschnitt von Replika-stabilisierten Membranhälften

Für die Einbettung und den Ultradünnschnitt der immunmarkierten Replika wurden 3T3-L1-Adipozyten eingesetzt, die wie in 2.1 beschrieben differenziert worden waren. Dieser Zelltyp bildet eine hohe Zahl an Caveolen aus (Forbes et al. 1979) und sollte daher besser geeignet sein als die 3T3-Mausfibroblasten, um in den Dünnschnitten noch Markierungen ausfindig machen zu können.

Der Gefrierbruch der Adipozyten erfolgte wie in 2.2 beschrieben, wobei 2 unterschiedliche Bedampfungsvarianten verwendet wurden. Zum einen wurden die Membranspalflächen mit einer Platin-Kohlenstoff-Schicht (Pt/C) und zum anderen nur mit Kohlenstoff bedampft (C), um festzustellen, ob an den Kohlenstoff-Replika mehr Membranmaterial wie Proteine und Lipide haften bleibt als an den Platin-Kohlenstoff-Replika (siehe Tabelle 2.6). Die Immunogoldmarkierung erfolgte wie in 2.2 beschrieben. Nach der Fixierung der Replika in 0,5 % Glutaraldehyd (10 Minuten) wurden diese zunächst jeweils 2 mal 5 Minuten mit ddH₂O und Natrium-Cacodylat-Puffer (C₂H₆AsO₂Na x 3 H₂O, 1 M, pH 7,2) gespült. Anschließend erfolgte ein Kontrastierungsschritt mit OsO₄ (Osmiumtetroxid, 1 % in Cacodylat-Puffer) für 30 Minuten. Die Replika wurden danach 2 mal für 5 Minuten mit Cacodylat-Puffer gewaschen und dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, wobei währenddessen noch ein zweiter Kontrastierungsschritt mit Uranylacetat erfolgte. Die genaue Durchführung der Entwässerung ist in Tabelle 2.7 dargestellt. Im Anschluss an die Entwässerung konnte die Einbettung nach Angaben der Firma Agar Scientific Ltd. (Essex, England) erfolgen (Glauert and Glauert 1958). Dazu wurden die Replika zunächst für 2 Minuten in Propylenoxid inkubiert. Dann erfolgte die Inkubation in einem Araldid-Propylenoxid-Gemisch (1:2) für 30 Minuten, in Araldid-Propylenoxid (1:1) ebenfalls für 30 Minuten und in Araldid-Propylenoxid (2:1) über Nacht. Zuletzt wurden die Replika in pures Araldid überführt, dem ein Katalysator (BDMA, Benzylmethylamin) zugesetzt war. Die Aushärtung erfolgte in einer Gummiform bei 60 °C für 48 Stunden. Die ausgehärteten Araldid-Blöckchen konnten dann aus der Form herausgelöst und Dünnschnitte unter Mithilfe von Frau Beck (Institut für Pathologie, Klinikum der FSU Jena) angefertigt werden (LKB 8800A Ultratome III, LKB Produkter AB, Bromma, Schweden), die nach der Methode von Reynolds (1963) kontrastiert wurden. Der Ansatz für die Kontrastierung mit Bleicitrat ist in Tabelle 2.8 aufgelistet, wobei die Kontrastierungsdauer 15 Minuten betrug. Die Dünnschnitte wurden im TEM ausgewertet und die unterschiedlich bedampften Replika-stabilisierten Membranhälften miteinander verglichen (siehe Ergebnisteil 3.2.1).

Tabelle 2.6 Bedampfungsparameter

Bedampfung	Bedampfungstyp
1	Pt/C
2	C

Tabelle 2.7 Entwässerungsschritte

EtOH-Konzentration	Inkubation
30 %	5 Minuten
50 % + Uranylacetat	30 Minuten
50 %	5 Minuten
70 %	5 Minuten
96 %	3 x 5 Minuten
100 %	3 x 5 Minuten

Tabelle 2.8 Kontrastierungslösung

Kontrastierungslösung
3 ml Stammlösung 1 (2,66 g Bleinitrat in 30 ml ddH ₂ O) + 3 ml Stammlösung 2 (4,3 g Natriumcitrat in 30 ml ddH ₂ O)
Mischen
+ 1,6 ml 1 N NaOH + 2,4 ml ddH ₂ O
Filtrieren

2.4.2 Schichtdickenbestimmung der Membranhälften immunmarkierter Replika mit Hilfe der beidseitigen C-Bedampfung

Die beidseitige Kohlenstoffbedampfung immunmarkierter Replika ermöglicht die "Einbettung" der Replika-stabilisierten Membranhälften zwischen zwei kontrastgebenden Kohlenstoff-Schichten, von denen sie sich abgrenzen und analysieren lassen. In diesem Versuch sollte zunächst überprüft werden, ob sich die Antikörper-Dimensionen beidseitig C-bedampfter Replika darstellen lassen und ob diese Methode geeignet ist, um Schichtdicken-Unterschiede der an den Replika anhaftenden Membrankomponenten aufzuzeigen. Dazu

wurden 3T3-Mausfibroblasten gefriergebrochen und die entstandenen Bruchflächen mit einer Kohlenstoff-Platinschicht (C/Pt, inverse Bedampfung) bedampft. Die SDS-gereinigten Replika wurden anschließend wie schon zuvor beschrieben (2.2) immunmarkiert. Es erfolgten 3 unterschiedliche Markierungsansätze, bei denen einige Replika nicht markiert, einige nur mit dem Erstantikörper (Cav-1 N-20 polyclonal rabbit IgG) und einige mit Erst- und Zweitantikörper (Cav-1 N-20 polyclonal rabbit, goat anti-rabbit IgG plus 10 nm Goldpartikel) immunmarkiert wurden (siehe Tabelle 2.9). Diese Versuchsanordnungen sollten zeigen, inwiefern sich die Schichtdicken der unterschiedlich markierten Replika-stabilisierten Membranhälften unterscheiden und welchen Anteil die gebundenen Antikörperschichten daran haben. Nachdem die Replika auf diese Weise markiert worden waren, erfolgte die Fixierung für 10 Minuten in 0,5 % Glutaraldehyd. Die Replika wurden dann 2 mal in ddH₂O gespült, auf Kupfernetzchen aufgefischt und luftgetrocknet. Im Anschluss daran konnte die Bedampfung mit einer zweiten Kohlenstoffschicht durchgeführt werden. Dazu wurden die Netzchen mit den Replika in die Gefrierbruch-Anlage eingebracht und die Rückseite mit einer ~20 nm dicken Kohlenstoffschicht bedampft. Die auf diese Weise beidseitig bedampften Replika konnten dann im TEM ausgewertet werden (siehe Ergebnisse 3.2.2).

Tabelle 2.9 Immunmarkierung beidseitig C-bedampfter Replika

Bedampfung	1. Bedampfung	Immunmarkierung	2. Bedampfung
1	C/Pt	-	C
2	C/Pt	Erstantikörper	C
3	C/Pt	1. + 2. Antikörper	C

2.4.3 Schichtdickenbestimmung der Membranhälften unterschiedlich bedampfter Replika mit Hilfe der beidseitigen C-Bedampfung

Neben der oben erwähnten beidseitigen C-Bedampfung immunmarkierter Replika wurde noch eine zweite beidseitige C-Bedampfung an nicht markierten Replika durchgeführt. Dieser Versuch erfolgte ebenfalls an 3T3-Mausfibroblasten. Dabei wurden die beim Gefrierbruch entstandenen Bruchflächen unterschiedlich bedampft. Es erfolgte eine konventionelle 2 nm Pt/C-Bedampfung, eine dünne 1,5 nm Pt/C- und eine C/Pt-Bedampfung mit Kohlenstoff als

erster Replikationsschicht (siehe Tabelle 2.10). Die Replika wurden anschließend wie in 2.2 beschrieben mit SDS gereinigt, gewaschen und fixiert. Nach der chemischen Fixierung mit Glutaraldehyd konnten die Replika mit ddH₂O gewaschen und auf Kupfernetzchen aufgefischt werden. Diese wurden dann umgedreht, die Rückseite mit einer ~20 nm dicken Kohlenstoffschicht bedampft und im TEM ausgewertet. Mit Hilfe dieser Versuchsanordnung sollte überprüft werden, ob bei einer Bedampfung mit einer dünnen Platinschicht oder bei der C/Pt-Bedampfung mehr Membranmaterial an den Replika haften bleibt als an den Membranspaltflächen, die mit einer konventionellen Pt/C-Bedampfung repliziert worden sind. Durch die rückseitig aufgebrachte Kohlenstoffschicht werden diese Membranhälften aufgrund der zwei kontrastreicherer Schichten abgegrenzt und lassen sich im Transmissionselektronenmikroskop darstellen. Die Schichtdicken der Gefrierbruch-stabilisierten Membranhälften wurden an den Caveolen untersucht und mit Hilfe der Software für die CCD-Kamera (EM-MENU 4) ausgemessen (siehe Ergebnisse 3.2.3).

Tabelle 2.10 Bedampfungsparameter für die beidseitige C-Bedampfung

Bedampfung	1. Bedampfung	2. Bedampfung
1	2 nm Pt/C	C
2	1,5 nm Pt/C	C
3	C/Pt	C

2.5 Charakterisierung und Strukturanalyse der Caveolen-Membran

Die in den vorherigen Abschnitten behandelten Versuche an Caveolen dienten hauptsächlich der Untersuchung zur Optimierung der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung. In diesem Abschnitt sollen nun die Methoden zur Charakterisierung und zur Strukturanalyse der Caveolen-Membran erläutert werden. Die Charakterisierung bezieht sich dabei vor allem auf Untersuchungen zur proteinbiochemischen Zusammensetzung von Caveolen, die mittels der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung am Beispiel von Flotillin-2, f-Actin, PTRF und eNOS durchgeführt wurden. Außerdem sollten die Isolierung caveolinreicher Membrandomänen, die Immunpräzipitation von Caveolen und Rekonstitutionsversuche in Kombination mit elektronenmikroskopischen Methoden einen Einblick in den strukturellen Aufbau der Caveolen geben.

2.5.1 Untersuchungen an “Caveolen-Proteinen”

Neben dem Caveolin-1 wurden auch einige Proteine untersucht, die in Caveolen lokalisiert wurden und funktionell mit Caveolen und Caveolin-1 in Zusammenhang gebracht wurden. Hierbei ist zunächst Flotillin-2 zu nennen. Flotillin oder Reggie/ Flotillin wurde biochemisch aus Triton X-100 unlöslichen, Caveolin-reichen Membrandomänen mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und als Caveolae-assoziiertes Protein definiert (Bickel et al. 1997). Zudem sollen sie mit Caveolin interagieren und hetero-oligomere Komplexe bilden (Volonte et al. 1999). Andere Ergebnisse sprechen jedoch gegen eine Kollokalisierung oder biochemische Interaktion (Stuermer et al. 2001, Souto et al. 2003). Mit Hilfe der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung sollte untersucht werden, ob Flotillin-2 in caveolären Bereichen der Plasmamembran lokalisiert ist.

Die Actinfilamente, die aus dem Protein Actin aufgebaut sind, sind neben den Mikrotubuli und den Intermediärfilamenten Hauptbestandteil des zellulären Cytoskeletts. Das Actin-Cytoskelett ist ein dynamisches, filamentöses Netzwerk und essentiell für multiple zelluläre Funktionen wie zum Beispiel Zellbewegung, Morphogenese, Polarität und Zellteilung (Drubin et al. 1996, Mitchison et al. 1996). Ultrastrukturelle und biochemische Analysen brachten das Actin-Cytoskelett mit caveolären Funktionen in Verbindung (Chang et al. 1994,

Fujimoto et al. 1995, Lisanti et al. 1994, Parton et al. 1994). Darüber hinaus spielt Actin eine entscheidende Rolle in der Stabilisierung der Caveolen an der Plasmamembran, wobei zusätzlich das Actin-bindende Protein Filamin als Ligand für Caveolin-1 identifiziert werden konnte (Stahlhut und van Deurs 2000, Thomson et al. 2001). Mittels der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung sollte die Verteilung des Actins untersucht und eine Lokalisation an der caveolären Membran nachgewiesen werden.

Die endotheliale Isoform der Stickstoff-Monoxid Synthase (eNOS) katalysiert die Reaktion zur Produktion von Stickstoff-Monoxid aus L-Arginin (Michel und Feron 1997, Moncada und Higgs 1993) und wird durch eine Vielzahl von transkriptionalen, posttranskriptionalen und posttranslationalen Mechanismen reguliert (Fulton et al. 2001, Kone 2000, Michel und Feron 1997). Protein-Protein-Interaktionen repräsentieren einen wichtigen posttranslationalen Regulationsmechanismus der eNOS-Aktivität. Es konnte gezeigt werden, dass Calmodulin als allosterischer Aktivator für eNOS fungiert, wobei Caveolin direkt mit eNOS interagiert und dieses inhibiert (Fulton et al. 2001, Kone 2000). Außerdem wurde eNOS in Endothelzellen in spezifischen zellulären Domänen lokalisiert wie zum Beispiel im Golgi und in Caveolen (Garcia-Cardena et al. 1996, Feron et al. 1996, Fulton et al. 2002). Daher sollte die Lokalisation von eNOS anhand von Untersuchungen mittels Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung überprüft werden.

Durch Immunpräzipitation aus solubilisierten Plasmamembranen von Ratten-Adipozyten konnte PTRF, ein bisher noch nicht in Caveolen nachgewiesenes Protein, als Bestandteil von Caveolen identifiziert werden (Aboulaich et al. 2004, Vinten et al. 2005). PTRF interagiert mit TTF-1 (transcription termination factor 1) und erleichtert die Dissoziation von pre-rRNA, Pol1 (Polymerase 1) und TTF-1 (Jansa et al. 1998). Caveolen sollen als Zielort für das Targeting und die posttranslationale Modifikation durch Proteolyse von PTRF und anderen Proteinen mit PEST-Domänen fungieren. Als PEST-Domänen bezeichnet man Bereiche in der Aminosäuresequenz eines Proteins, die reich an Prolin, Glutaminsäure, Serin und Threonin sind. Diese stellen Erkennungsdomänen für Signalproteine dar, die durch Proteolyse reguliert werden (Rechsteiner und Rogers 1996). Caveolen sind daher involviert in die Bindung, die Relokation und die durch Phosphorylierung bedingte proteolytische Kontrolle des Transkriptionsregulators PTRF und anderen Signalproteinen mit PEST-Domänen (Aboulaich et al. 2004). Vinten et al. (2001) konnten eine Kolokalisation von PTRF mit Caveolin nachweisen. Die caveoläre Lokalisation und die Kolokalisation mit Caveolin-1

sollte mit Hilfe der Gefrierbruch-Immunmarkierung im Zuge dieser Arbeit kontrolliert werden.

Die Gefrierbruch-Immunogoldmarkierungen wurden an 3T3-Mausfibroblasten durchgeführt, wobei in einer SDS-PAGE zunächst die verwendeten Antikörper für die Immunmarkierung an NIH-3T3-Zellen und 3T3-L1-Präadipocyten ausgetestet wurden. Dazu wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgeschabt, in PBS aufgenommen und für 5 Minuten bei 60 x g (800 rpm) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in Lysispuffer (siehe Tabelle 2.11) aufgenommen. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Layne (1955), wobei die optische Dichte der Zell-Lösung bei 260 nm und 280 nm gemessen wurde. Es wurde eine 1:20 Verdünnung hergestellt und bei 260nm und 280nm Wellenlänge im Photometer (UV-VIS-Spectrometer, Shimadzu) gegen Lysispuffer gemessen. Mit dem Faktor **F (E₂₈₀ : E₂₆₀)** konnte nach folgender Formel der Proteingehalt bestimmt werden:

$$\text{mg Protein/ ml} = F \cdot d \cdot E_{280} \quad (d = 1 \text{ cm}).$$

Der Nachweis der Proteine erfolgte mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli, 1970) und Western-Blot-Analyse (nach Towbin et al. 1979). Zu den lysierten Zellen wurde zunächst Dithiotreitol (DTT, 10 % w/v) und Bromphenolblau (10 % w/v, 0,2 % Bromphenolblau in Ethanol absolut) gegeben, bevor sie für 5 Minuten in kochendem Wasser inkubiert wurden, um die Proteine aus den Zellen zu denaturieren. Danach wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein auf das Polyacrylamidgel aufgetragen und für ungefähr 5 Stunden eine Spannung von 60 Volt angelegt, wobei ein Laufpuffer (10fach konzentriert: 1,9 M Glycin, 0,25 M Tris base, 0,05 % SDS w/ v, siehe Tabelle 2.11) verwendet wurde. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (Dalton Mark VII-L, Sigma) auf das Gel aufgetragen. In Tabelle 2.12 ist die Zusammensetzung eines PAA (Polyacrylamid)-Gels aufgelistet. Für den Western-Blot wurde das Polyacrylamidgel auf die mit Blot-Puffer (siehe 2.13) getränkten Filterpapiere und die Nitrocellulosemembran gelegt, mit Blot-Puffer getränkten Filterpapierstücken bedeckt und die Luftbasen durch Rollen mit einem Reagenzglas entfernt. Der Blotting-Vorgang wurde mit einem Gerät der Firma Biometra (Fast Blot B31, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland) für 1,5 Stunden bei 20 V durchgeführt. Im Anschluss daran wurde die Nitrocellulosemembran mit Ponceau S angefärbt, um die Proteine und damit den Erfolg des Western-Blottings nachzuweisen. Die Entfärbung erfolgte mit ddH₂O.

Danach konnte die Membran und die darauf befindlichen Proteine in TBS (10mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) mit Milchpulver abgesättigt und schließlich mit 1 Liter TBS gewaschen werden. Die Behandlung mit den Erstantikörpern, die für die jeweils nachzuweisenden Proteine eingesetzt wurden (siehe Tabelle 2.14), erfolgte über Nacht. Die Membran wurde danach wieder mit einem Liter TBS gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen, und anschließend mit den Zweitantikörpern (siehe Tabelle 2.14) behandelt.

Tabelle 2.11 Puffer für die SDS-PAGE

Lysispuffer	Laufpuffer 10x konzentriert
1 g SDS	144 g Glycin
4 ml 1M Tris pH 6,8	30 g Tris base
5 ml Glycerol	5 g 10 % SDS
mit ddH ₂ O auf 50 ml	mit ddH ₂ O auf 1 Liter

Tabelle 2.12 Zusammensetzung des PAA-Gels

Sammelgel		Trenngel	
Substanz	Menge	Substanz	Menge
PAA (Polyacrylamid)	4 ml	Acrylamid (30 %) (w/v)	15 ml
SG-P (Sammelgelpuffer) 1M Tris pH 6,8	2,5 ml	Trenngelpuffer 1,5M Tris pH 8,7	7,5 ml
ddH ₂ O	4,5 ml	2 % Bisacrylamid (w/v)	2,6 ml
10 % APS (w/v) (Ammoniumpersulfat)	200 µl	10 % SDS (w/v)	300 µl
TEMED (N, N, N', N' - Tetra- methyl-ethyl-diamin)	20 µl	ddH ₂ O	4,5 ml
10 % SDS (w/v) (Sodium- Dodecyl-Sulfate)	100 µl	10 % APS (w/v)	200 µl
		TEMED	20 µl

Tabelle 2.13 Zusammensetzung des Western-Blot Puffers

Western-Blot-Puffer	
Substanz	Menge
Methanol	200 ml
Glycin	14 g
Tris	2 g
10 % SDS	1 ml
ddH ₂ O	Add 1 Liter

Tabelle 2.14 Verwendete Antikörper für die Western-Blot-Analyse

Protein	Erstantikörper	Zweitantikörper
Cav-1	Cav-1 N-20 rabbit IgG (1:1000 in TBS, 0,5 % BSA)	goat anti-rabbit IgG (1:2000 in TBS, 0,5 % BSA)
Flot-2	Flot-2 mouse IgG (1:1000 in TBS, 0,5 % BSA)	goat anti-mouse IgG HRP (1:2000 in TBS, 0,5 % BSA)
PTRF	PTRF mouse IgG (1:500 in TBS, 0,5 % BSA)	goat anti-mouse IgG HRP (1:2000 in TBS, 0,5 % BSA)
Actin	Actin goat IgG (1:500 in TBS, 0,5 % BSA)	rabbit anti-goat IgG HRP (1:2000 in TBS, 0,5 % BSA)
eNOS-1	eNOS-1 mouse IgG (1:500 in TBS, 0,5 % BSA)	goat anti-mouse IgG HRP (1:2000 in TBS, 0,5 % BSA)

HRP = horseradish peroxidase

Actin goat IgG, Cav-1 N-20 rabbit IgG, Zweitantikörper (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

Flot-2 mouse IgG, PTRF mouse IgG, eNOS mouse IgG (BD Biosciences)

Der Nachweis der gebundenen Zweitantikörper und damit der Erstantikörper bzw. der Proteine erfolgte in einer immunochemischen Luminiszenz-Reaktion. Dazu wurde die Blotmembran zunächst für 2 Minuten in 10 ml Lösung A (200 ml Tris/HCl pH 8,6; 50 mg Luminol) mit 3 µl H₂O₂ und 1 ml Lösung B (11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO) inkubiert. Anschließend erfolgte die Filmexposition für 5 Minuten und die Entwicklung des Films.

Die genannten Proteine wurden mittels der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung untersucht. Die Aufarbeitung und der Gefrierbruch der 3T3-Mausfibroblasten erfolgten wie zuvor beschrieben. Die Bedampfungsparameter für diese Versuche sind in Tabelle 2.15 und die verwendeten Antikörper in Tabelle 2.16 dargestellt. Im Fall von PTRF wurde eine Doppelmarkierung zusammen mit Caveolin-1 durchgeführt. Cav-1 und Flot-2 wurden mit Zweitantikörpern markiert, die mit Gold unterschiedlicher Korngröße (10 nm, 20 nm) konjugiert waren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abschnitt 3.3.1 dargestellt.

Tabelle 2.15 Bedampfungsparameter für die Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung an Caveolen-Proteinen

Bedampfung	Bedampfungstyp
1	1,5 nm Pt/C
2	C/Pt

Tabelle 2.16 Verwendete Antikörper für die Immunmarkierung

Protein	Erstantikörper	Zweitantikörper
Cav-1	Cav-1 N-20 rabbit IgG (1:50 in LBB)	goat anti-rabbit IgG + 10 nm Gold (1:50 in LBB)
Flot-2	Flot-2 mouse IgG (1:50 in LBB)	goat anti-mouse IgG 10 nm Gold (1:50 in LBB)
PTRF	PTRF mouse IgG (1:50 in LBB)	goat anti-mouse IgG 10 nm Gold (1:50 in LBB)
Actin	Actin goat IgG (1:50 in LBB)	rabbit anti-goat IgG 10 nm Gold (1:50 in LBB)
eNOS-1	eNOS-1 mouse IgG (1:50 in LBB)	goat anti-mouse IgG 10 nm Gold (1:50 in LBB)

Zweitantikörper (British Biocell International)

2.5.2 Isolation caveolinreicher Membrandomänen

Für die Untersuchung und Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung an Triton-X-unlöslichen Membrandomänen wurden diese nach der Methode von Lisanti et al. (1994), modifiziert nach Brown und Rose (1992) und Sargiacomo et al. (1993), aus dem Lungengewebe einer Wistar-Ratte (♀, 254 g, 153 Tage alt) isoliert. 1,8 g des Lungengewebes wurden mit einem Labormixer zerkleinert, mit 9 ml MBS (25 mM MES pH 6,5; 0,15 M NaCl; 1 % Triton-X-100 v/v; 1 Tablette Proteaseinhibitor-Cocktail) gemischt und gepottert. Alle Versuchsschritte wurden bei 4 °C ausgeführt. Nach dem Pottieren verblieben noch 7,5 ml an Probe. Diese wurde 1:1 [v/v] mit 7,5 ml 80 % [w/v] Sucrose gemischt und in 6 Zentrifugenröhrchen je 2,5 ml pipettiert. Daraufhin wurden die Proben mit jeweils 9 ml eines Sucrose-Gradienten (30 %-5 %; 4,5 ml 30 % und 4,5 ml 5 % w/v Sucrose in MBS ohne Triton-X-100) überschichtet. Anschließend erfolgte eine aufsteigende Dichtegradientenzentrifugation in einer Optima XL-100K Ultrazentrifuge von Beckman (Beckman Coulter GmbH) bei 185000 x g (39000 rpm) bei 4 °C und für 20 Stunden in einem SW41Ti Rotor von Beckman. Im Anschluss an die Dichtegradientenzentrifugation konnte eine lichtbrechende Bande abgesaugt und in MES-Puffer pelletiert werden (Rotor 50.2 Ti von Beckman, 4 °C, ü.N.). Der Nachweis von Caveolin-1 erfolgte mit Hilfe der SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse, wobei die Nachweisreaktion mit Hilfe von Chloronaphtol und H₂O₂ durchgeführt wurde. Die caveolinreichen Membrandomänen wurden in einer Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abschnitt 3.3.2 dargestellt.

2.5.3 Immunpräzipitation von Caveolen

Mit Hilfe der Immunpräzipitation von Caveolen sollte versucht werden, den "caveolar coat" und das Verteilungsmuster von Caveolin-1 an den Caveolen darzustellen. Dazu wurden NIH-3T3-Mausfibroblasten angezüchtet und in die Immunpräzipitationsversuche eingesetzt, die nach einem Protokoll von Santa Cruz Biotechnology Inc. durchgeführt wurden. Die konfluente Zellschicht wurde zunächst mit PBS (inklusive Proteaseinhibitor-Cocktail) gewaschen. Die Zellen wurden dann vorsichtig vom Boden der Kulturflasche abgeschabt, in PBS aufgenommen und bei 60 x g (800 rpm), bei 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet konnte anschließend in 500 µl PBS aufgenommen und resuspendiert werden. Um die Zellen aufzuschließen, wurde die Suspension mit einem Glashomogenisator homogenisiert und mit

Ultraschall behandelt, wobei alle Versuchsschritte bei 4 °C ausgeführt wurden. Die Zellsuspension wurde kurz anzenrifugiert, um Zelltrümmer zu pelletieren. Nach dem Zellaufschluss wurden 2 mmol GTP zu dem Überstand gegeben und dieser für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert, was die Abschnürung von Caveolen aus den Membrandomänen induzieren sollte (Schnitzer et al. 1996). Anschließend erfolgte die Inkubation mit 10µl des Erstantikörpers Cav-1 N-20 bei 4 °C über Nacht auf dem Schüttler und danach die Inkubation mit der entsprechenden Agarose-Konjugat-Suspension (Protein A/G-Agarose, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) für 1-2 Stunden ebenfalls bei 4 °C auf dem Schüttler. Die Immunpräzipitate wurden bei 90 x g (1000 rpm) für 2 Minuten pelletiert und anschließend 2-4 mal mit PBS (inklusive Proteaseinhibitor-Cocktail) gewaschen. Um die Agarose von den präzipitierten Caveolen zu lösen, wurden die Präzipitate in 100µl 0,2 M Natriumhydrogencarbonat pH 11 mit 0,1 % [w/v] BSA für 30 Minuten inkubiert. Die Probe wurde bei 90 x g (1000 rpm) für 2 Minuten zentrifugiert, um die Agarose zu pelletieren. Anschließend konnte der pH-Wert des Überstandes mit 6 M HCl auf pH 7 eingestellt werden. Die auf diese Weise präzipitierten Caveolen wurden immunmarkiert und eine Negativ-Kontrastierung durchgeführt. Diese Immunmarkierung von negativ-kontrastierten Caveolen erfolgte in abgeänderter Form nach der Methode von Wischik et al. (1988). Dazu wurden 20 µl des Präzipitats an mit Formvar beschichteten, mit Kohlenstoff bedampften und beglimmten Kupfernetzchen (400 mesh) für 5 Minuten adsorbiert. Diese Netzchen wurden für 10 Minuten auf einen Tropfen 0,1 % [w/v] Gelatine in TBS gelegt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation auf einem Tropfen einer 1:25 verdünnten Lösung von Cav-1 N-20 in TBS mit 0,5 % [w/v] BSA für eine Stunde. Die Netzchen wurden 4 mal mit 0,1 % [w/v] Gelatine in TBS gewaschen und auf einem Tropfen einer 1:50 verdünnten Lösung des mit 10 nm großen Goldpartikeln konjugierten Zweitantikörpers in TBS mit 0,5 % [w/v] BSA für eine Stunde inkubiert. Danach wurden die Netzchen wieder 4 mal mit 0,1 % [w/v] Gelatine in TBS gewaschen, mit 1 % [w/v] Uranylacetat für 1 Minute kontrastiert und dann im TEM ausgewertet (siehe Ergebnisteil 3.3.3).

2.5.4 Rekonstitution von isolierten 400 kDa Caveolin-Komplexen in Liposomen

Als weitere Untersuchungsmethode zur Aufklärung der Struktur des caveolären coats und der Verteilung des Caveolin-1 sollten Rekonstitutionsstudien von aus Rinderlunge isolierten 400 kDa Caveolin-Komplexen dienen. Die Methodik der Rekonstitution ermöglicht es, komplexe

Strukturen *in vitro* nachzubauen und Rückschlüsse auf die genaue Struktur und Zusammensetzung des Komplexes und eventuell die Vorgänge der Komplexbildung *in vivo* zu ziehen. Die Isolation dieser Komplexe wurde von Monier et al. (1995) beschrieben, und Murata et al. (1995) führten in Anlehnung an die Isolation dieser 400 kDa Caveolin-Komplexe Rekonstitutionsexperimente durch, wobei die hier beschriebene Methode der Rekonstitution in abgeänderter Form übernommen wurde.

Zunächst wurden Triton-unlösliche Membranfraktionen isoliert. Dafür wurden 40 g Rinderlunge in Hoagland-Puffer (50 mM Tris/ HCl, pH 7,5; 25 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 0,1 mM EDTA; 250 mM Sucrose; 0,2 mM PMSF) homogenisiert, wobei das Verhältnis von Gewebe zu Puffer 1:2,5 betrug. Das Homogenat wurde für 20 Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert (Biofuge stratos, Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products GmbH) und der Überstand durch ein Tuch filtriert. Nach 75 Minuten Zentrifugation bei 72000 x g (28.000 rpm) in einem 50.2 Ti Rotor (Beckman Coulter GmbH), wurde das mikrosomale Pellet in 7,5 ml 250 mM Sucrose in TNE (25 mM Tris/ HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl; 2mM EDTA) mit 5 mM Mercaptoethanol aufgenommen und auf 1,5 M Sucrose (in einem Volumen von 10 ml) gebracht. Je 2,5 ml dieser Lösung wurde in ein Zentrifugenröhrchen (Beckman Instruments Inc.) gegeben und mit 6 ml einer 1,2 M und 3 ml einer 0,8 M Sucrose-Lösung (in TNE mit 5 mM Dithiotreitol, DTT) überschichtet. Nach Zentrifugation (Beckman Coulter Optima XL-100K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter GmbH) für 18 Stunden bei 104000 x g (29.000 rpm) in einem SW41 Ti Rotor (Beckman Coulter GmbH) konnte die Membranfraktion aus der Interphase abgesaugt werden. Die Fraktion wurde mit 1 % [v/v] Triton X-114 in TNE mit Proteaseinhibitor (Complete Mini Proteaseinhibitor-Cocktail, Roche Diagnostics GmbH) in einem Volumen von 10 ml solubilisiert, mit 1,4 M Sucrose versetzt und jeweils 2,5 ml mit 6 ml einer 1,1 M und 3 ml einer 0,15 M Sucrose-Lösung überschichtet. Die Zentrifugation wurde in einem SW41 Ti Rotor (Beckman Coulter GmbH) bei 185000 x g (39.000 rpm) für 20 Stunden durchgeführt (Beckman Coulter Optima XL-100K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter GmbH). Die Fraktion wurde aus der Interphase des Gradienten abgesaugt, mit TNE-Puffer auf 36 ml verdünnt und für 1 Stunde in einem 50.2 Ti Rotor bei 57000 x g (25.000 rpm) pelletiert. Das Pellet wurde daraufhin in 1 % [v/v] Triton X-114 in TNE resuspendiert, 30 Minuten auf Eis inkubiert und wieder auf eine Konzentration von 1,4 M Sucrose gebracht. Die Flotation wurde ein zweites Mal durchgeführt, und die Pellets wurden wiederum in 18 ml 1 % [v/v] Triton X-114 in TNE resuspendiert. Diese isolierten, Triton unlöslichen Membranfraktionen wurden anschließend für 15 Minuten auf 37 °C unter Rühren erwärmt, 5

Minuten auf Eis abgekühlt und 15 Minuten bei 10.000 x g in einem Beckman JA-10 Rotor zentrifugiert (Beckman Avanti J-30I Kühlzentrifuge, Beckman Coulter GmbH). Die Isolation der 400 kDa Komplexe erfolgte durch Inkubation von 0,8 ml der Pellet-Fraktion mit 1 % [w/v] SDS bei Raumtemperatur, welche auf 11 ml eines 10-30 % [w/v] Sucrose-Gradienten aufgegeben und für 20 Stunden bei 198000 x g (40.000 rpm) in einem SW41 Ti Rotor zentrifugiert wurde. Es wurden jeweils 1 ml-Fraktionen aus den Gradienten abgezogen und auf ihren Gehalt an Caveolin-1 mittels Western-Immunoblotting untersucht. Die mit Caveolin-1 angereicherten Fraktionen wurden zunächst gegen 0,2 % [w/v] SDS in TNE und dann gegen M/N-Puffer (20 mM MES, 140 mM NaCl, pH 6,3) mit 1 % [w/v] Octylglucosid (OG) jeweils über Nacht bei 4 °C dialysiert, und anschließend mit einem Amicon-Zentrifugenfilter (Amicon Ultra, Millipore) aufkonzentriert. Außerdem wurde eine Immunmarkierung von Caveolin-1 an den isolierten und negativ-kontrastierten 400 kDa Komplexen durchgeführt, um deren Struktur und Identifikation als Caveolin-1 zu analysieren.

Die isolierten 400 kDa Caveolin-Komplexe wurden in Rekonstitutionsexperimente eingesetzt. Zunächst wurden Proteoliposomen aus Leber-Extrakt-Lipiden (Liver Total Lipid Extract, Bovine, Avanti Polar Lipids) hergestellt, indem 1 mg Lipid in 1 ml Chloroform gelöst wurde. Die Cholesterol-Konzentration des Lipid-Extraktes betrug 7 % (weitere Bestandteile: 22 % Phosphatidylethanolamin, 8 % Phosphatidylinositol, 42 % Phosphatidylcholin, 1 % Lyso-Phosphatidylinositol und 21 % andere Lipide inklusive Neutral-Lipide, w/w). Für diesen Versuch wurde die Cholesterol-Konzentration auf 15-20 % [w/v] erhöht. Die gelösten Lipide wurden in ein Becherglas gegeben und unter Schütteln das Chloroform verdampft, bis ein gleichmäßiger Lipidfilm auf dem Boden des Becherglases entstanden war. Der Lipidfilm wurde in 2 ml M/N-Puffer mit 1 % [w/v] Octylglucosid für ungefähr 45 Minuten gelöst. Nach Zugabe von 5 µg des isolierten Proteins, welches einem Lipid:Protein-Verhältnis von 200:1 entspricht, erfolgte die Inkubation für ungefähr 45 Minuten bei Raumtemperatur. Das Detergenz wurde mit Hilfe von 160 mg/ml Biobeads (SM-2, Bio-Rad) entfernt, die für 90 Minuten unter Schütteln mit dem Protein-Lipid-Gemisch inkubiert wurden. Die Proteoliposomen konnten abgezogen, 5 mal 5 Sekunden im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex Super RK 103H) behandelt und anschließend durch Zentrifugation bei 50.000 x g für 30 Minuten pelletiert werden (Biofuge stratos, Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products GmbH). Das resultierende Pellet wurde anschließend 2 mal mit M/N-Puffer gewaschen und für eine Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung verwendet. Diese erfolgte wie zuvor beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1 Verbesserung der Gefrierbruch-Immunogold- Markierungstechnik und Optimierung der Markierungseffizienz

3.1.1 Variation der Bedampfungsparameter

Bei zahlreichen Versuchen zur Gefrierbruch-Immunmarkierung von Caveolin-1 konnten Unterschiede in der Markierungsrate in Abhängigkeit von der aufgedampften Platinschichtdicke festgestellt werden. In Bereichen mit einer dünnen Platinschicht und im „Platinschatten“ war die Markierung besser als in Bereichen mit einer dickeren Platinschicht. Diese Abhängigkeit der Markierungseffizienz von der Platin-Schichtdicke konnte auch bei der Markierung von anderen Membranproteinen festgestellt werden, wie bei der Lokalisation der CF₁ α ATP Synthase Untereinheit in Membranen von Etioplasten (Sherameti et al. 2004) oder bei der Lokalisation der Tetrachlorethan reduzierenden Dehalogenase in *Sulfurospirillum multivorans* (John et al. 2006). In diesen Publikationen wurde der Effekt der Bedampfung jedoch nicht weiter untersucht. Im letzteren Fall konnten die im Laufe dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse in Bezug auf die Optimierung der Markierungsrate einbezogen werden.

Um den Einfluss der Bedampfungsart auf die Markierungseffizienz von Caveolin-1 bei der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung zu untersuchen, wurden die Membranspaltflächen mit unterschiedlichen Platinschichtdicken bedampft. Platin als erste Replikationsschicht mit anschließender Kohlenstoffbedampfung stellt dabei die konventionelle Reihenfolge dar. Zusätzlich wurde eine neue Bedampfungsvariante durchgeführt, bei der nach dem Gefrierbruch zuerst eine 15-20 nm dicke Kohlenstoffschicht als erste Replikationsschicht und anschließend eine Platinschicht von 2-2,5 nm auf die Spaltflächen aufgedampft wurde. Die auf diese Weise erhaltenen Replika wurden im Transmissions-Elektronenmikroskop untersucht und fotografisch dokumentiert (siehe Abb. 3.1.a -3.1.c). Die an Caveolin-1 gebundenen Goldpartikel pro Caveole wurden für jede Bedampfungsvariante ausgezählt und miteinander verglichen. In allen Kontrollen ohne Erstantikörper konnte keine unspezifische Bindung des Zweitantikörpers nachgewiesen werden. Außerhalb caveolärer Strukturen wie im Eis konnten keine unspezifischen Erstantikörper-Bindungen gefunden werden.

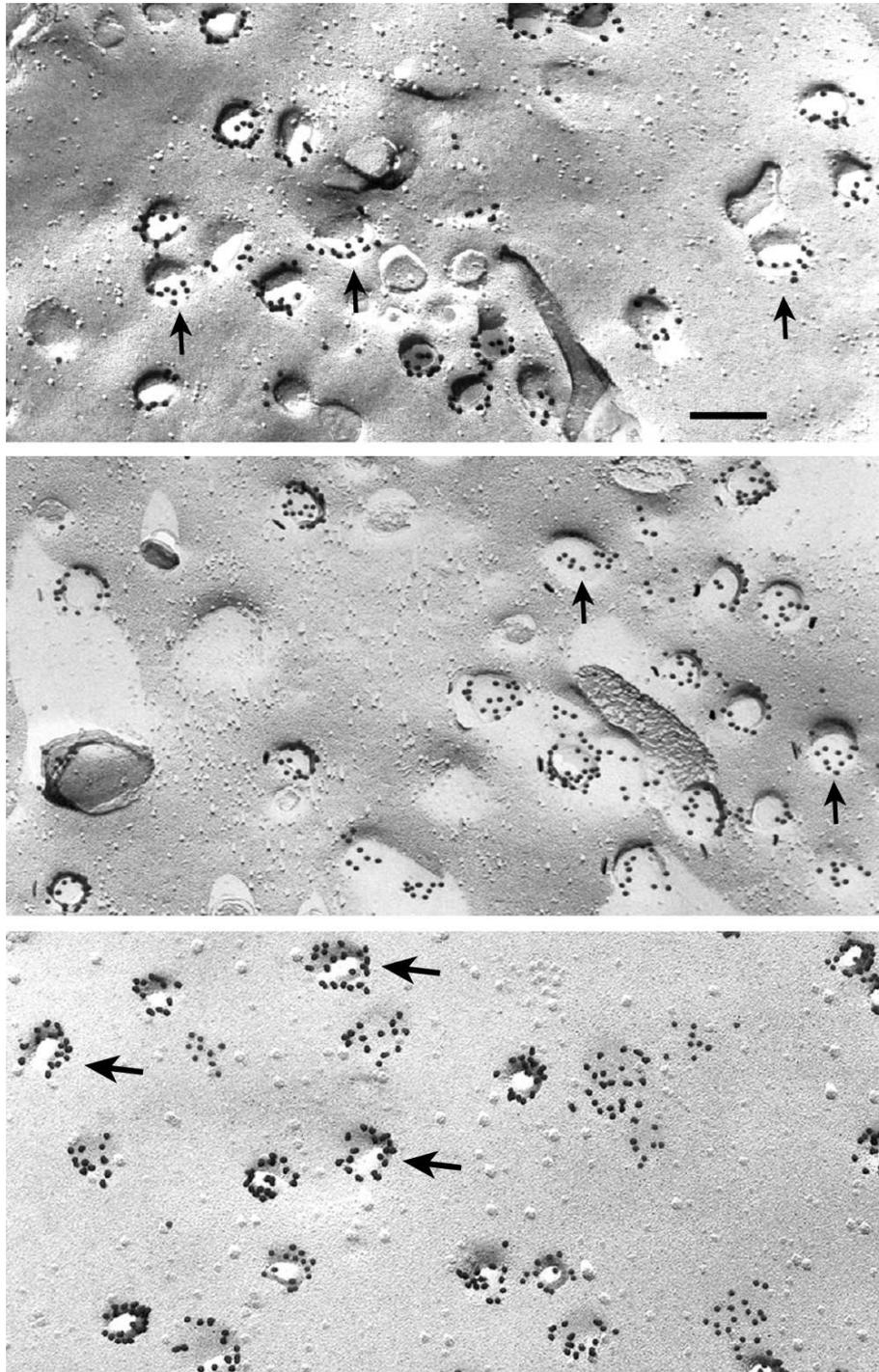


Abb. 3.1: Gefrierbruch Immunogoldmarkierung von Caveolin-1 in chemisch unfixierten 3T3-Mausfibroblasten, Balken 100 nm

- 2,5 nm Pt/C-Bedampfung, Pfeile zeigen die Anhäufung der Goldpartikel in einem Bereich mit dünner oder fehlender Platinschicht (Platinschatten)
- 1,5 nm Pt/C-Bedampfung, Pfeile zeigen die Anhäufung der Goldpartikel in einem Bereich mit dünner oder fehlender Platinschicht (Platinschatten)
- C/Pt-Bedampfung, Pfeile zeigen die gleichmäßige Verteilung der Goldpartikel

Darüber hinaus wurde die exoplasmatische Spaltfläche, an der keine Markierungen vorhanden waren, als Negativkontrolle herangezogen (siehe auch Abb. 3.8 unter 3.1.4). Die in Abb. 3.1.a -3.1.c dargestellten elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Markierung von Caveolin-1 an Caveolen der 3T3-Mausfibroblasten. Die Pfeile in den Abbildungen 3.1.a und 3.1.b weisen darauf hin, dass an den Caveolen in Bereichen mit dünner oder fehlender Platinschicht (helle Bereiche, „Platinschatten“) eine Anreicherung von Goldpartikeln zu beobachten ist. Für die „umgekehrte Bedampfung“ in Abbildung 3.1.c zeigen die Pfeile, dass die Goldpartikel gleichmäßig um die Caveole verteilt sind. Nach Bedampfung mit der dünneren Platinschicht von 1,5 nm (Abb. 3.1.b) ist eine Verbesserung der Markierung im Vergleich mit der 2,5 nm Pt/ C-Bedampfung zu verzeichnen. Die höchste Markierungsdichte findet sich allerdings bei der Bedampfung mit Kohlenstoff als erster Replikationsschicht („umgekehrte Bedampfung“), wie man in Abb. 3.1.c erkennen kann. Diese Beobachtungen konnten durch die Auszählung der Goldpartikel pro Caveole statistisch gesichert werden. So erhält man für die Bedampfung mit 2,5 nm Pt/C eine durchschnittliche Markierungsrate von $10,1 \pm 0,34$ Goldpartikeln pro Caveole (Abb. 3.2). Nach der Bedampfung mit 1,5 nm Pt/C erhält man im Durchschnitt $15,6 \pm 0,28$ Markierungen pro Caveole (Abb. 3.2) und nach der C/Pt-Bedampfung (Abb. 3.2) konnte eine durchschnittliche Markierungsrate von $17 \pm 0,26$ Goldpartikeln pro Caveole errechnet werden. Als Abweichungen (\pm) sind jeweils die Standardfehler der Mittelwerte angegeben. Die Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc-Test (Statistikprogramm SPSS, Beratung durch Herrn Dr. Vollandt, IMSID) zeigte, dass die Ergebnisse signifikant sind ($p < 0,001$). Die Markierungseffizienz der Caveolin-1 Immunogoldmarkierung an den Gefrierbruch-Replika hängt somit vom Bedampfungstyp ab. Die Dicke der aufgedampften Platinschicht spielt bei konventioneller Bedampfung eine deutliche Rolle, wogegen bei einer C/Pt- Bedampfung mit Kohlenstoff als erster Replikationsschicht die Markierungsrate am besten ist.

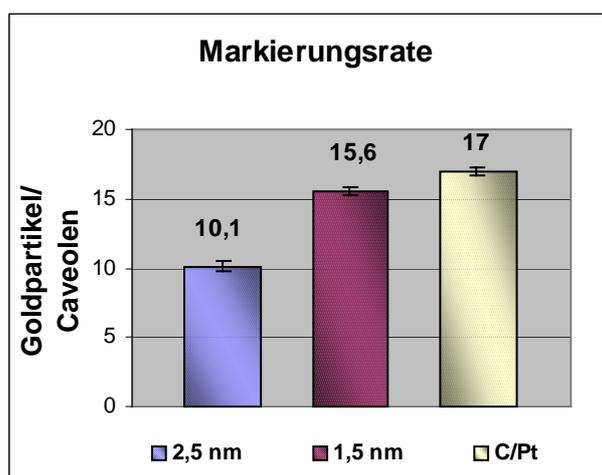


Abb. 3.2:
Markierungsraten für 2,5 nm Pt/C; 1,5 nm Pt/C
und C/Pt im Vergleich, Balken entsprechen
dem Standardfehler des Mittelwertes

3.1.2 Variation der Emissionsparameter

Da in verschiedenen Versuchen der Gefrierbruch-Immungoldmarkierung trotz konstanter Platinschichtdicken Unterschiede in der Markierungsrate von Caveolin-1 festgestellt werden konnten, wurden in diesem Versuch die Emissionsparameter variiert, um deren Einfluss auf die Markierungseffizienz zu überprüfen. Dazu wurden die Gefrierbruch-Spaltflächen immer konstant mit einer 2,5 nm Pt/C-Schicht bei konstanter Spannung von 1,35 kV an der Verdampferquelle bedampft. Nur die Emissionsstromstärke an der Verdampferquelle und damit die Aufdampfzeit wurden verändert. Die pro Caveolen gebundenen Goldpartikel wurden wiederum ausgezählt und die Daten statistisch ausgewertet. Abbildung 3.3 zeigt einen Vergleich der 3 ermittelten Markierungsraten der unterschiedlichen Emissionsparameter. Es ist zu erkennen, dass die höchste Markierungsrate mit durchschnittlich 13,4 Goldpartikel \pm 0,23 bei einer hohen Emissionsstromstärke (89 mA) und einer kurzen Aufdampfzeit (12 Sekunden) zu verzeichnen ist. Bei einer Emissionsstromstärke von 65 mA und einer Aufdampfzeit von 24 Sekunden konnten im Durchschnitt 9,3 \pm 0,18 Goldpartikel gezählt werden. Die niedrigste durchschnittliche Markierungsrate von 7,6 \pm 0,25 erhält man bei niedriger Emissionsstromstärke (59 mA) und langer Aufdampfzeit (35 Sekunden). Als Abweichungen sind die Standardfehler der Mittelwerte angegeben. Die Varianzanalyse (SPSS) ergab signifikante Unterschiede der einzelnen Markierungsraten in Abhängigkeit von der Emission und Zeit ($p < 0,001$).

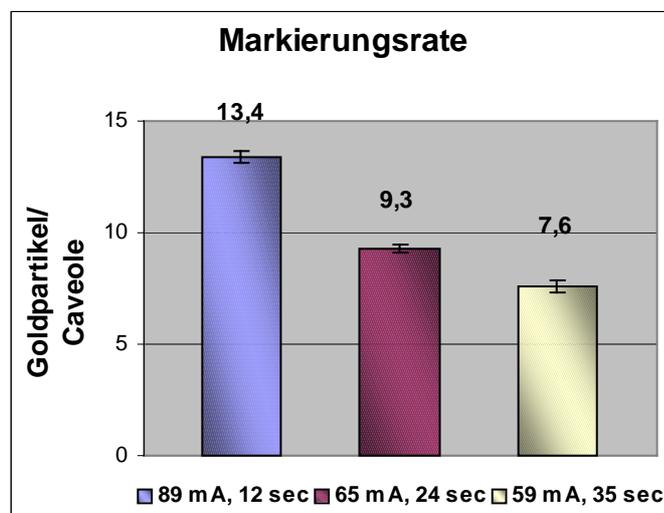


Abb. 3.3: 89 mA (12 sec.), 65 mA (24 sec.) und 59 mA, (35 sec.) im Vergleich, Balken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes

3.1.3 Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung von Aquaporin (AQP1)

Die Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung von AQP1 wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob wie bei der Caveolin-1 Markierung auch hier die Variation der Replikation einen Einfluss auf die Markierbarkeit hat. AQP1 wurde ausgewählt, weil es sich bei AQP1 im Gegensatz zu Caveolin-1 um ein „echtes“ Transmembranprotein mit 6 Transmembranhelices handelt. Caveolin-1 bildet eine sogenannte Haarnadelstruktur, mit der es nur auf der cytoplasmatischen Seite der Membran inseriert, aber die Membran nicht vollständig durchzieht. Ein „echtes“ Transmembranprotein wie AQP1 sollte besser an den Replika-stabilisierten Membranhälften haften und in seiner Markierbarkeit weniger abhängig von Variationen der Bedampfungsparameter sein. Wie im Methodenteil beschrieben wurden humane Erythrozyten bei verschiedenen Bedampfungsparametern gefriergebrochen. Die Goldpartikel wurden für die jeweiligen Spaltflächen (Bruchfläche im Eis, exoplasmatische Membranspaltfläche, Bruchfläche im Plasma und protoplasmatische Membranspaltfläche) ausgezählt und die Werte miteinander verglichen. In den folgenden Abbildungen (3.4.a-3.4.b) sind exemplarisch Aufnahmen der Bruchfläche der protoplasmatischen Spaltflächen (3.4.a) und im Plasma (3.4.b) C/Pt-bedampfter Replika dargestellt, die dann in einem Diagramm miteinander verglichen wurden (Abbildung 3.5).

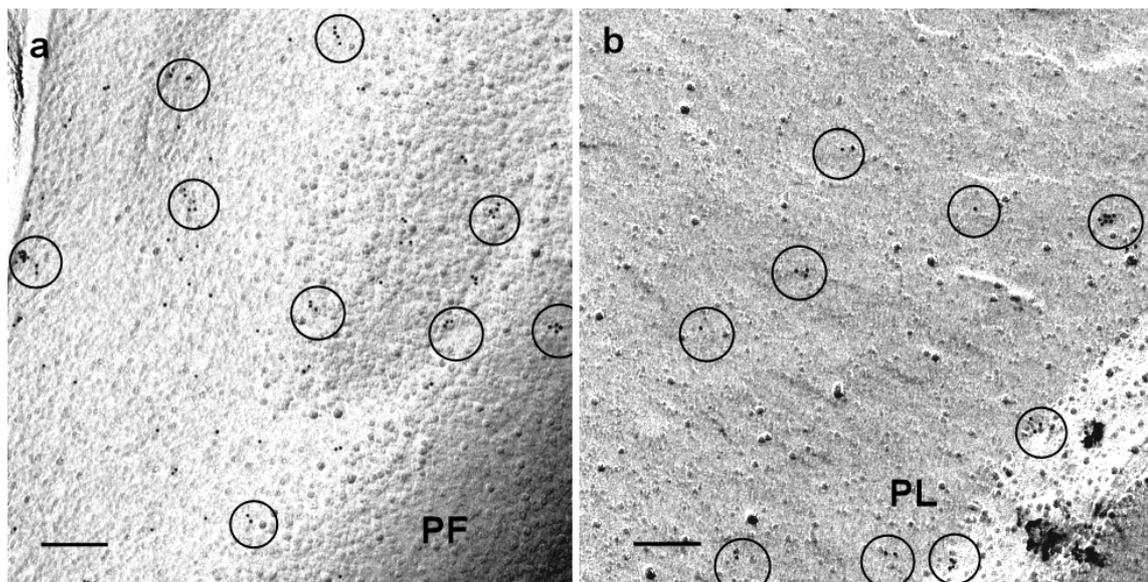


Abb. 3.4: AQP1-Markierung, C/Pt-Bedampfung, **a**) Protoplasmatische Spaltfläche; **b**) Plasma (PL); Gruppen von Goldpartikeln markieren AQP1 (Kreise); Balken 200 nm

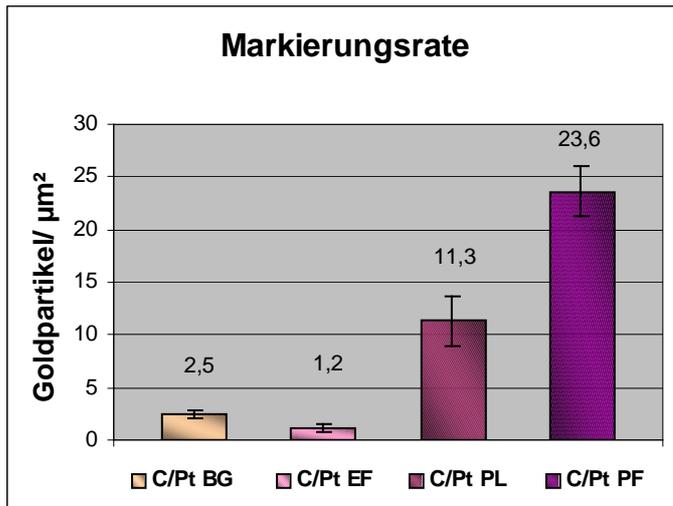


Abb. 3.5:
Markierungsrate von AQP1 für die unterschiedlichen Spaltflächen (BG=Eis, EF, PL, PF) bei C/Pt-Bedampfung, Balken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes

Die Hintergrundmarkierung im Eis beträgt durchschnittlich $2,5 \pm 0,32$ Goldpartikel/ μm^2 und auf der exoplasmatischen Membranspaltfläche konnten im Durchschnitt $1,2 \pm 0,36$ Goldpartikel/ μm^2 gezählt werden. Im Plasma dagegen ist die Markierung mit durchschnittlich $11 \pm 2,4$ Partikeln/ μm^2 deutlich höher und auf der protoplasmatischen Membranhälfte mit fast $24 \pm 2,4$ Goldpartikel/ μm^2 am höchsten, was darauf hindeutet, dass diese Markierung aufgrund der protoplasmatischen Lokalisation des Proteins AQP1 spezifisch ist. Laut Varianzanalyse (SPSS) unterscheiden sich alle Stichproben bis auf die Werte der Hintergrundmarkierung im Eis und der Markierung auf der exoplasmatischen Spaltfläche signifikant ($p < 0,05$). Zum Vergleich der Markierungsrate bei unterschiedlichen Bedampfungsparametern wurden die Goldpartikel pro Quadratmikrometer (μm^2) ausgezählt und die gemittelten Werte in Abbildung 3.6 graphisch dargestellt. Ein Vergleich der Werte zeigt, dass bei der C/Pt-Bedampfung weitaus mehr Markierungen zu verzeichnen sind als bei den beiden anderen Bedampfungstypen.

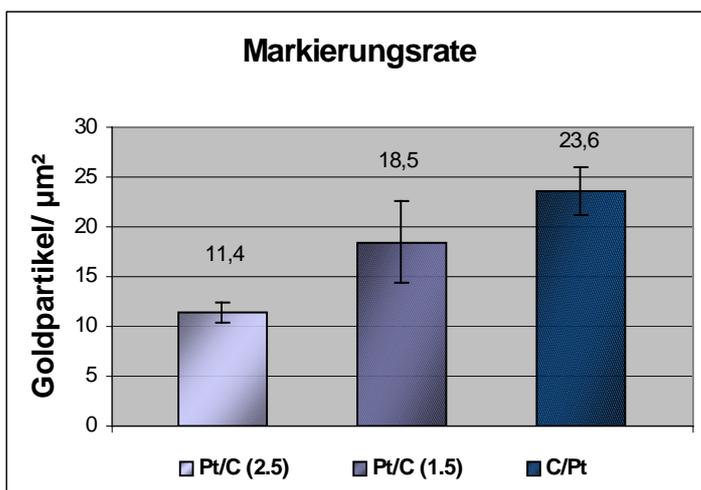


Abb. 3.6:
Markierungsrate von AQP1 (PF) für die unterschiedlichen Bedampfungsvarianten (2,5 nm Pt/C; 1,5 nm Pt/C, C/Pt), Balken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes

Von der 2,5 nm Pt/C-Bedampfung über die 1,5 nm Pt/C-Bedampfung bis hin zur C/Pt-Bedampfung nimmt die Markierungsrate für AQP1 zu. Nach 2,5 nm Pt/C-Bedampfung liegt die durchschnittliche Markierungsrate bei $11,4 \pm 0,97$ Goldpartikel pro μm^2 , bei 1,5 nm Pt/C konnten im Durchschnitt $18,5 \pm 4,07$ Partikel pro μm^2 ausgezählt werden und nach der umgekehrten Bedampfung (C/Pt) war die durchschnittliche Markierungsrate mit $23,6 \pm 2,41$ Partikeln pro μm^2 am höchsten. Die Art der Replikation scheint hier trotz der Epitoplokalisierung in Membrannähe beziehungsweise der Transmembran-Topologie von AQP1 einen Einfluss zu haben und ließe sich damit mit der von Caveolin-1 vergleichen. Eine statistische Auswertung (Varianzanalyse mit SPSS) ergab aber nur einen signifikanten Unterschied zwischen der 2,5 nm Pt/C- Bedampfung und der C/Pt- Bedampfung ($p < 0,05$). Die Unterschiede in den Markierungsraten zwischen der 2,5 nm Pt/C- und der 1,5 nm Pt/C-Bedampfung, sowie die Unterschiede zwischen der 1,5 nm Pt/C- und der C/Pt-Bedampfung sind nicht signifikant ($p > 0,05$).

3.1.4 „Cerium-Phosphat-Immunmarkierung“

Die Markierungsrate von Caveolin-1 ist, wie aus den vorherigen Versuchen deutlich wird, von der aufgedampften Platinschichtdicke abhängig. Um zu überprüfen, ob dieses Phänomen auf Wechselwirkungen der am Zweitantikörper gekoppelten Goldpartikel mit der Platinschicht beruht, wurde eine alternative Nachweismethode für die am Caveolin-1 gebundenen Erstantikörper verwendet. Der Nachweis der Bindung des Caveolin-1 Erstantikörpers erfolgte mit Hilfe eines unlöslichen, elektronenmikroskopisch nachweisbaren Cerium-Phosphat-Niederschlags. Wie im Methodenteil beschrieben wurde dazu eine 2,5 nm Pt/C- und eine C/Pt-Bedampfung durchgeführt. Die Replika wurden mit dem Erstantikörper gegen Caveolin-1 und einem mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Die Phosphatase spaltet vom Substrat p-Nitrophenylphosphat einen Phosphatrest ab, welcher in Anwesenheit von Ceriumchlorid einen unlöslichen Cerium-Phosphat-Niederschlag bildet. Dieser Niederschlag kann elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden. Die Auswertung dieses Versuches erfolgte ausschließlich durch den optischen Vergleich der Niederschlags-Intensität der beiden Bedampfungsvarianten. Als Kontrolle diente die Analyse der exoplasmatischen Spaltfläche, auf der Caveolin-1 nicht nachweisbar ist und somit kein Niederschlag entsteht.

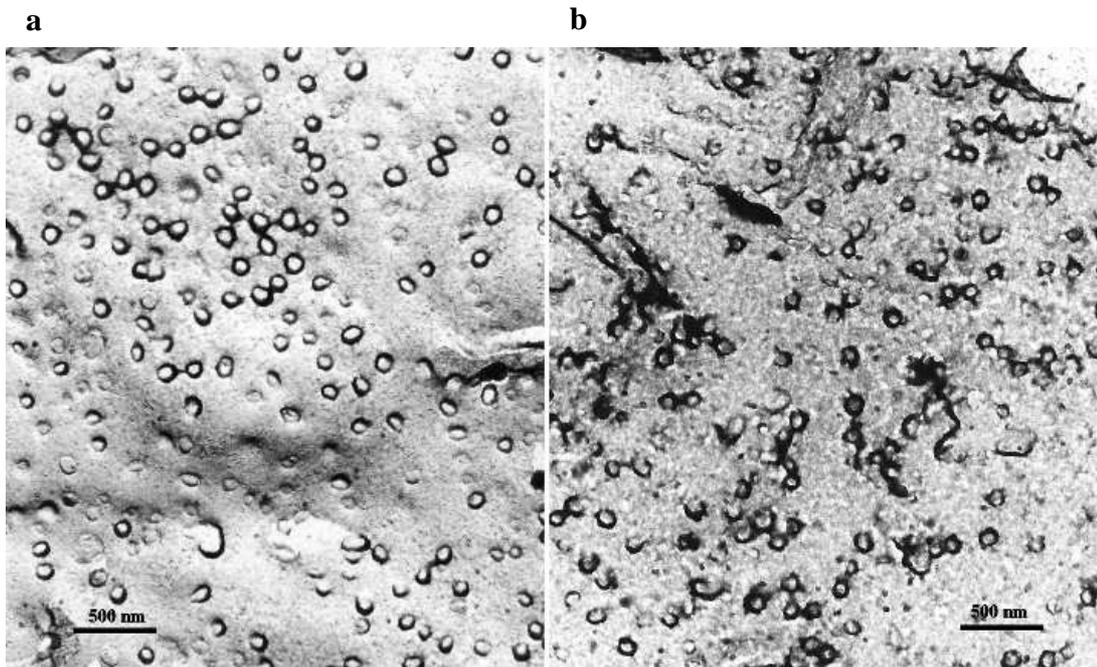


Abb. 3.7: **Protoplasmatische Spaltfläche; a) Pt/C-Bedampfung, b) C/Pt-Bedampfung:** Gefrierbruch-Immunmarkierung von Caveolin-1 an chemisch unfixierten NIH-3T3-Mausfibroblasten mit Cerium-Phosphat, Balken 500 nm

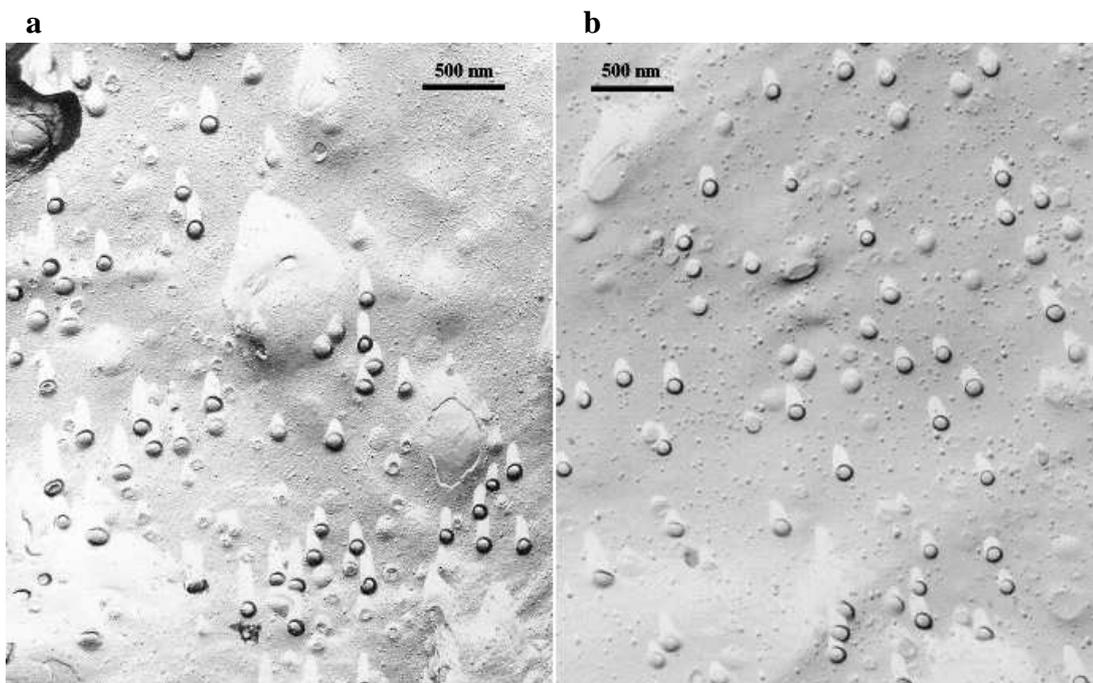


Abb. 3.8: **Exoplasmatische Spaltfläche; a) Pt/C-Bedampfung, b) C/Pt-Bedampfung:** Gefrierbruch-Immunmarkierung von Caveolin-1 an chemisch unfixierten NIH-3T3-Mausfibroblasten mit Cerium-Phosphat, Balken 500 nm

Die Ergebnisse dieses Versuches sind anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen in den Abbildungen 3.7 und 3.8 dargestellt. In Abbildung 3.7 sind die protoplasmatischen Spaltflächen der Plasmamembran für beide Replikationstypen dargestellt. Man erkennt deutlich einen Niederschlag von Cerium-Phosphat an den Caveolen. Dieser Niederschlag ist bei der Bedampfung mit C/Pt (b) deutlich stärker ausgeprägt als bei der Pt/C-Bedampfung (a). Die exoplasmatische Spaltfläche der Plasmamembran zeigt keinen Niederschlag von Cerium-Phosphat an den Caveolen und somit keine Markierung von Caveolin-1 (Abb. 3.8). Daraus geht hervor, dass Cerium-Phosphat nur auf der protoplasmatischen Spaltfläche der Plasmamembran bei der Immunmarkierung von Caveolin-1 ausfällt. Der verstärkte Niederschlag bei C/Pt-Bedampfung und die schlechte Markierungseffizienz bei hoher Platinschichtdicke deuten darauf hin, dass eine elektrostatische Abstoßung der Goldpartikel durch die aufgedampfte Platinschicht nicht die Ursache für die schlechte Markierungseffizienz bei hohen Pt-Schichtdicken ist. Die hier getestete Cerium-Phosphat-Methode zeigt ebenfalls eine bessere Markierung an den Replika mit Kohlenstoff als erster Bedampfungsschicht und bestätigt die Ergebnisse in 3.1.1.

3.1.5 Variation der Goldkorngröße

Um zu überprüfen, wie viel Platz ein Antikörper-Gold-Komplex an dem zu bindenden Epitop einnimmt, wurde die Größe eines Immunogold-Komplexes mit 10 nm Goldpartikel durch Negativkontrastierung untersucht. Abbildung 3.9 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme der 10 nm Antikörper-Gold-Komplexe. Es ist deutlich zu erkennen, dass die hell erscheinende Antikörperhülle die Goldpartikel umgibt, so dass sich für den gesamten 10 nm Antikörper-Gold-Komplex ein Durchmesser von ungefähr 20-25 nm ergibt.

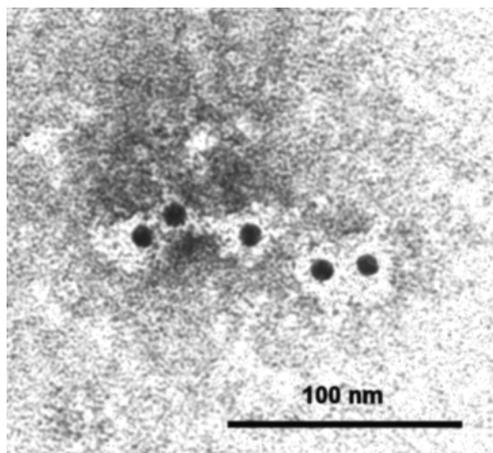


Abb. 3.9: Elektronenmikroskopische Aufnahme negativ kontrastierter Zweitantikörper konjugiert mit 10 nm großen Goldpartikeln; die Größe des 10 nm-Antikörper-Gold-Komplexes variiert zwischen 20 und 25 nm

Aus der ermittelten Größe des Komplexes, lässt sich die maximale Markierungsrate von Caveolin-1 an einer Caveole für die 10 nm Goldkomplexe abschätzen. An eine Caveole mit 100 nm Durchmesser und 250 nm Umfang können dann maximal 20-25 der 10 nm-Antikörper-Gold-Komplexe binden, wenn man davon ausgeht, dass sich diese Komplexe bandförmig, lateral um die Caveole anordnen. Die maximale Anzahl an Goldpartikeln, die gebunden werden können, hängt somit von der Größe der Caveole und der Größe des Antikörper-Gold-Komplexes ab. Daher sollten die Markierungsraten für Antikörper-Gold-Komplexe mit kleineren Goldpartikeln höher sein.

Um den Einfluss der Größe der an den Zweitantikörper gekoppelten Goldpartikel auf die Markierungsrate zu untersuchen, wurden Immunogoldmarkierungen mit unterschiedlich großen Goldpartikeln durchgeführt. Die Gefrierbrüche wurden nur mit Kohlenstoff bedampft und es wurden Zweitantikörper mit 10 nm, 5 nm und 2 nm Goldpartikelgröße eingesetzt. Abbildung 3.10 zeigt die unterschiedlichen Markierungsraten von Caveolin-1 nach Bindung von 10 nm, 5 nm und 2 nm Antikörper-Gold-Komplexen. Die durchschnittliche Markierungsrate der 10 nm-Antikörper-Gold-Komplexe liegt bei $9,4 \pm 0,19$ Goldpartikeln/Caveole. Die Markierungsrate der 5 nm-Antikörper-Gold-Komplexe liegt durchschnittlich bei $21 \pm 0,31$ Goldpartikeln/Caveole doppelt so hoch. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 3.11.a- c) ist diese Zunahme der Markierungsrate bei kleineren Goldpartikelgrößen noch einmal dargestellt. Diese Zunahme der durchschnittlichen Markierungsrate wird besonders deutlich bei der Anwendung von 2 nm-Antikörper-Goldkonjugaten. Es konnten hier im Durchschnitt bis zu $78 \pm 2,4$ Markierungen/Caveole ausgezählt werden (siehe Abb. 3.10, $p < 0,05$).

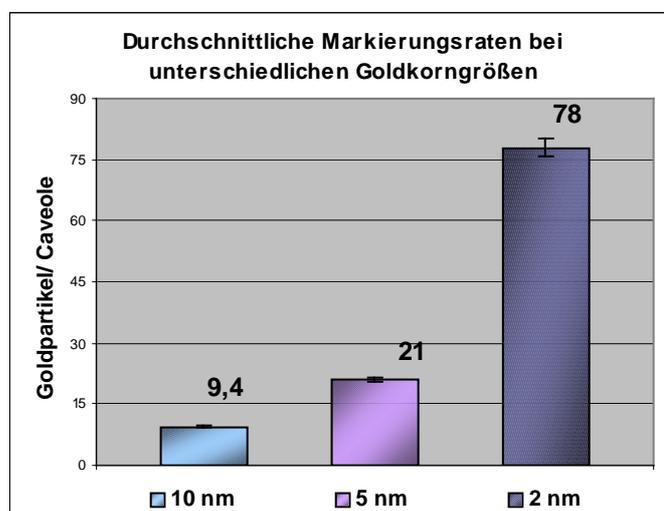


Abb. 3.10: Markierungsraten für 10 nm, 5 nm und 2 nm Antikörper-Gold Komplexe bei C-Bedampfung, Balken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts

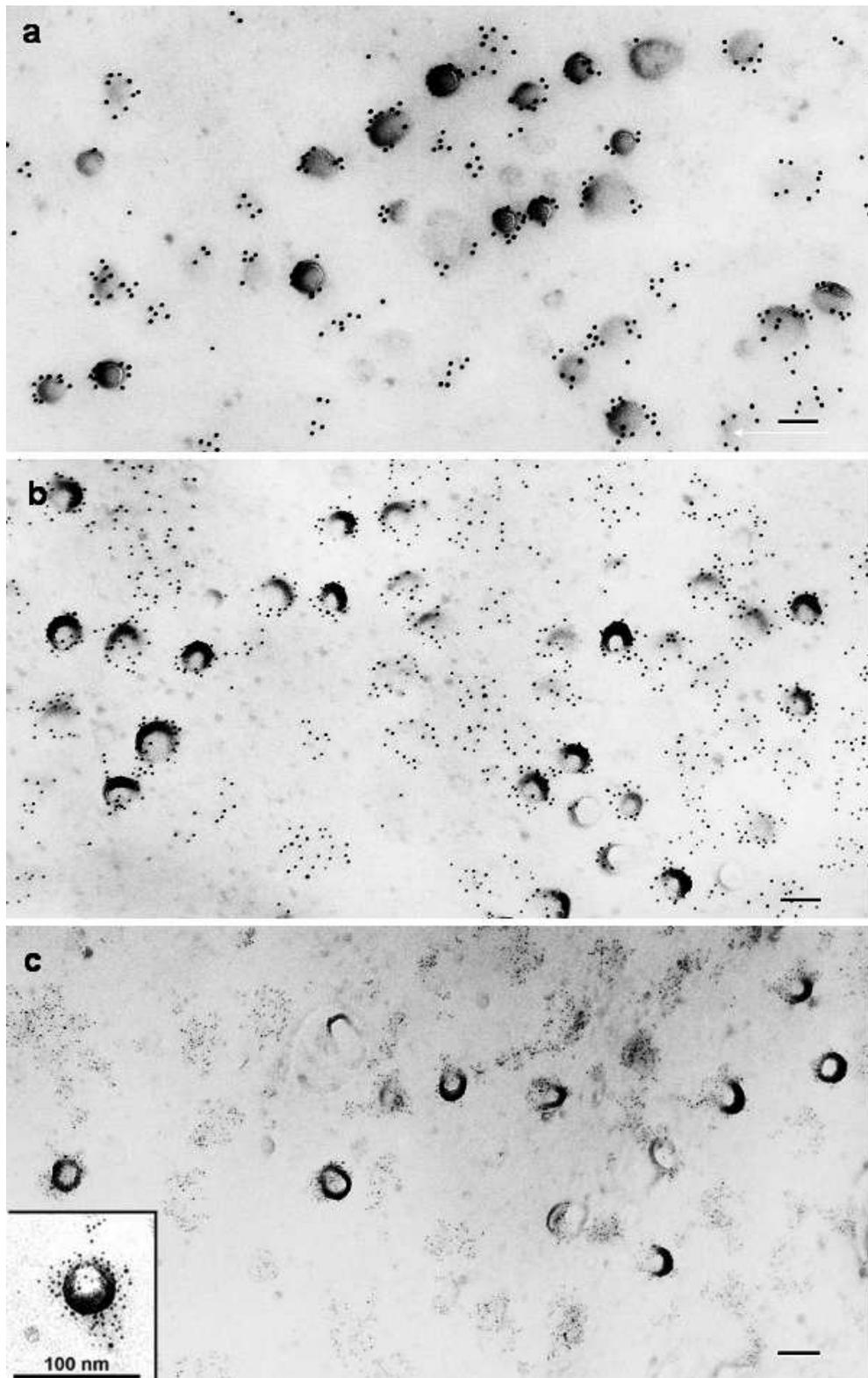


Abb. 3.11: Immunogoldmarkierung chemisch unfixierter NIH-3T3-Mausfibroblasten nach C-Bedampfung mit a) 10 nm-Antikörper-Gold-Komplexen, b) 5 nm-Antikörper-Gold-Komplexen und c) 2 nm-Antikörper-Gold-Komplexen; Balken 100 nm

Da Caveolen dreidimensionale Strukturen sind, wurden die Replika im Elektronenmikroskop um eine Drehachse gekippt, um das Verteilungsmuster der Caveolin-1-Markierungen an den Caveolen von nur mit Kohlenstoff bedampften Replika besser darstellen zu können. Die markierten Caveolen wurden in verschiedenen Winkeln aufgenommen und aus diesen Aufnahmen ließ sich mit der IMOD-Software eine 3D-Rekonstruktion einer Caveole und den gebundenen Antikörper-Gold-Komplexen anfertigen. Solche 3D-Rekonstruktion von mit 2 nm-, 5 nm- und 10 nm-Antikörper-Gold-Komplexen markierten, tief eingesenkten Caveolen sind in den Abbildungen 3.12-3.14 dargestellt und zeigen das dreidimensionale Verteilungsmuster der Goldpartikel. Die grau dargestellten Schichten entsprechen der inneren Begrenzung der Kohlenstoffschicht. Der Bereich zwischen den in grau und violett dargestellten Schichten (Abb. 3.13 und 3.14) entspricht der ungefähr 20 nm dicken Kohlenstoffschicht. Die in Abb. 3.13 und 3.14 violett eingezeichnete Schicht, welche die Membranhälfte repräsentiert, ließ sich aufgrund eines veränderten Rekonstruktionsverfahrens in Abb. 3.12 nicht abbilden. Der Bereich zwischen den in violett und orange dargestellten Rekonstruktionsschichten entspricht der Protein-Antikörperschicht. Die Kippserie und die 3D-Rekonstruktion zeigen, dass die Goldpartikel bandförmig lateral um die Caveole angeordnet sind. Eine Markierung im apikalen Bereich der Caveole konnte nicht nachgewiesen werden.

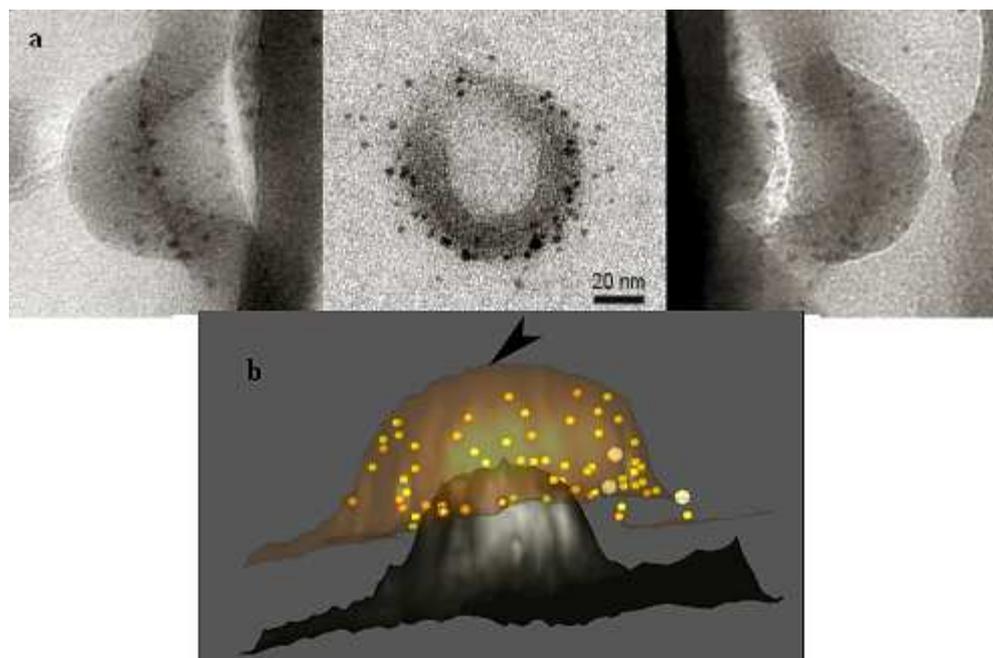


Abb. 3.12: a) Kippserie einer mit 2 nm-Antikörper-Gold-Komplexen markierten Caveole, +55°, 0°, -55°, Balken 20 nm
b) 3D-Rekonstruktion einer mit 2 nm-Antikörper-Gold-Komplexen markierten Caveole, IMOD-Software 3D-Modeling

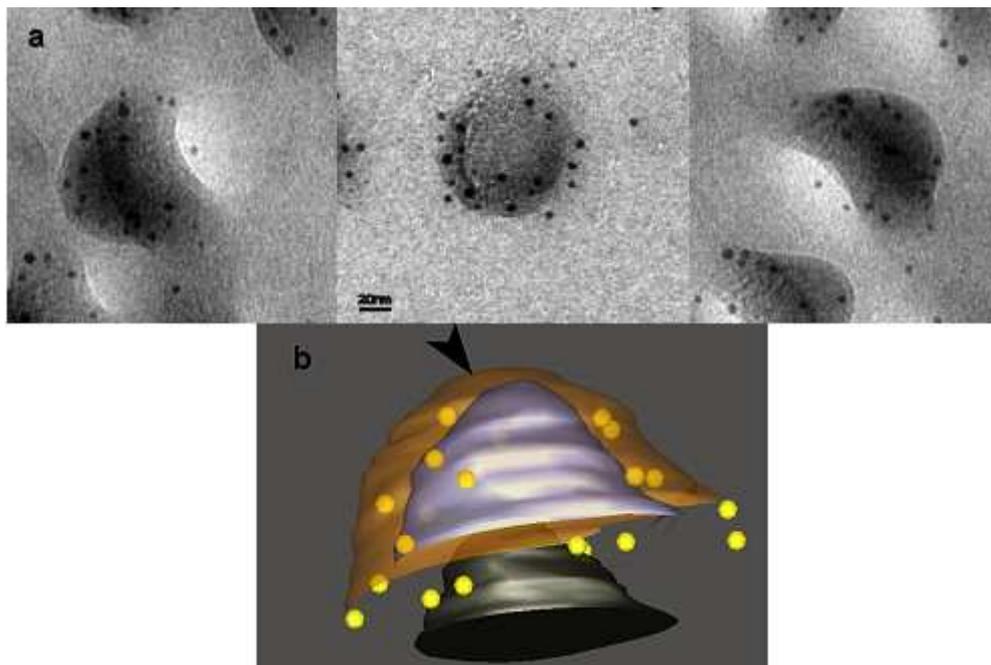


Abb. 3.13: a) Kippserie einer mit 5 nm-Antikörper-Gold-Komplexen markierten Caveole, +55°, 0°, -55°, Balken 20 nm
 b) 3D-Rekonstruktion einer mit 5 nm-Antikörper-Gold-Komplexen markierten Caveole, IMOD-Software 3D-Modeling

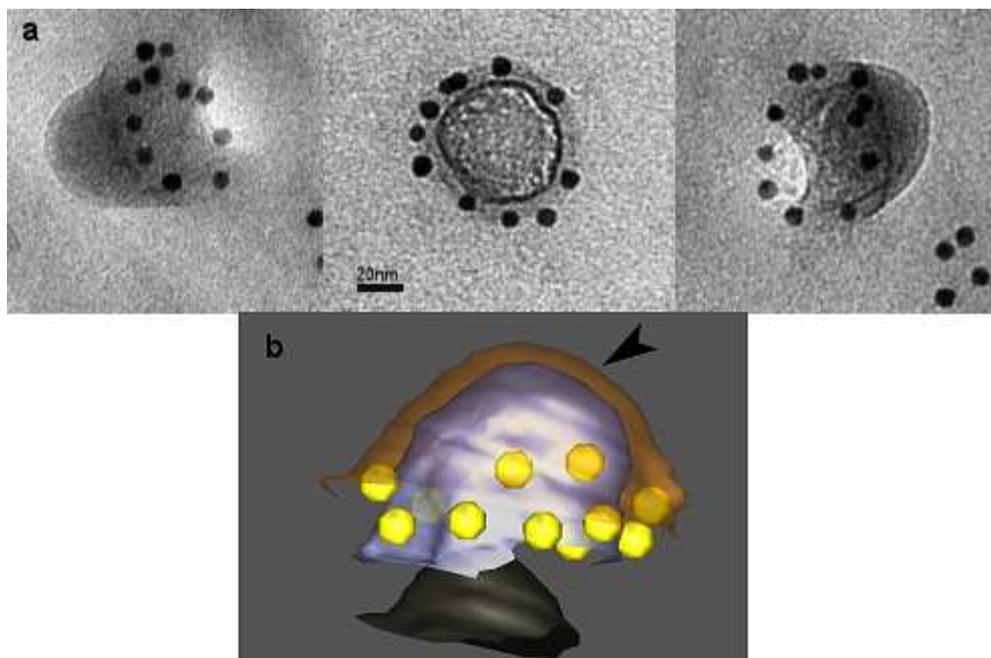


Abb. 3.14: a) Kippserie einer mit 10 nm-Antikörper-Gold-Komplexen markierten Caveole, +55°, 0°, -55°, Balken 20 nm
 b) 3D-Rekonstruktion einer mit 10 nm-Antikörper-Gold-Komplexen markierten Caveole, IMOD-Software 3D-Modeling

3.1.6 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Caveolen-Membran

Neben den Untersuchungen mit Hilfe der Gefrierbruchtechnik erfolgten auch Untersuchungen im Rasterelektronenmikroskop. Diese sollten zum einen dazu dienen, die replizierten protoplasmatischen Spaltflächen der Membranhälften mit markierten Caveolen darzustellen, zum anderen sollte aber auch die exoplasmatische Oberfläche der Plasmamembran von NIH-3T3-Mausfibroblasten untersucht werden. Wie im Methodenteil beschrieben wurden zunächst mit Immunogold markierte Replika im LEO 1530 „Gemini“ (Zeiss, Oberkochen) Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop analysiert. Das Ergebnis ist anhand der Aufnahme in Abbildung 3.15 gezeigt. Die Verteilung der Goldpartikel ist hier, ebenso wie mit den 3D-Rekonstruktionen nachgewiesen, im lateralen Bereich der Caveolen angeordnet. Nur an den flacheren Caveolen (siehe Kästchen) erscheinen gleichmäßig über die Fläche verteilte Immunogoldmarkierungen. Diese Methode bietet einen besseren räumlichen Eindruck der Caveolin-Verteilung als die TEM-Bilder. Sie bestätigt die Ergebnisse der 3D-Rekonstruktion. Auf den Oberflächen der Replika sind an den Caveolen aber keine Strukturen erkennbar, die auf eine caveoläre Hülle hinweisen.

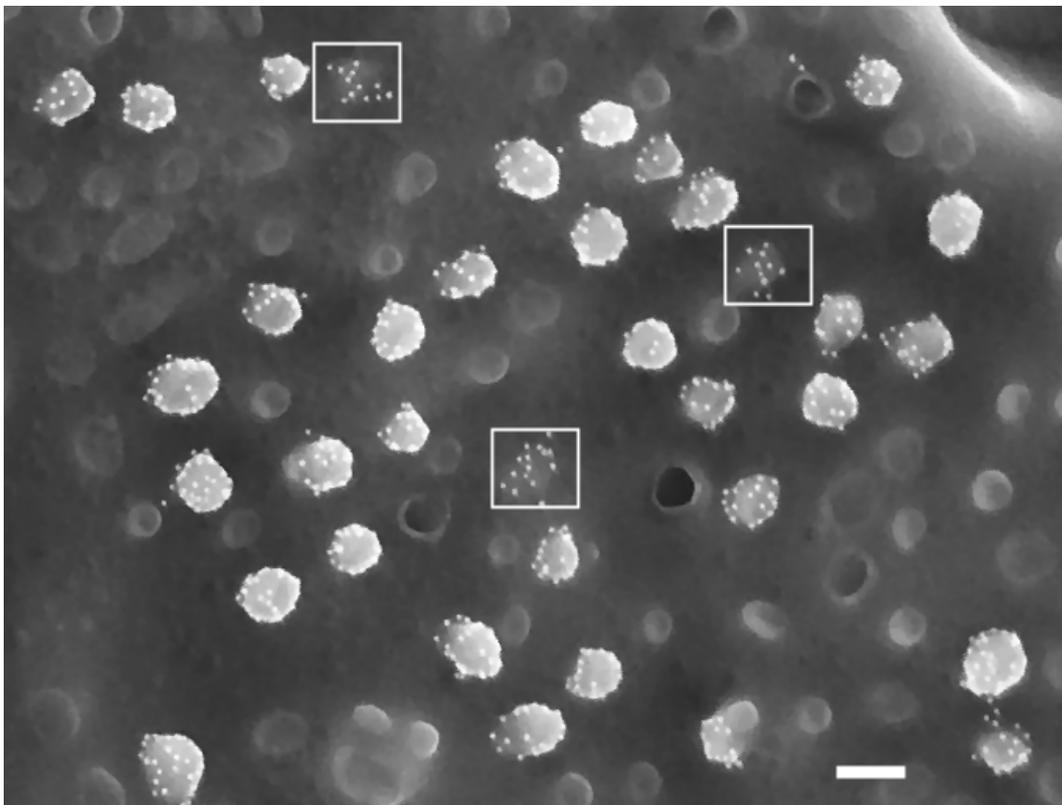


Abb. 3.15: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer mittels Gefrierbruchtechnik und Cav-1-Immunogoldmarkierung hergestellten Replika, Kästchen zeigen flache Caveolen mit gleichmäßiger Markierung, Balken 100 nm

In der darauffolgenden Abbildung 3.16 ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Oberfläche einer Glutaraldehyd-fixierten NIH-3T3-Mausfibroblastenzelle gezeigt. Die Öffnungen der Caveolen grenzen sich deutlich von der übrigen Plasmamembran ab. Eine ringförmige Oberflächenstruktur, die aus einzelnen partikulären Untereinheiten (siehe weiße Pfeilspitzen) aufgebaut ist, umgibt den Porus der Caveolen. Zusätzlich sind weitere partikuläre Strukturen zu erkennen, die in der Membran eingebettet sind (siehe schwarze Pfeile). Hierbei könnte es sich um Intramembranproteine handeln, die aufgrund der Goldbespatterung hervortreten.

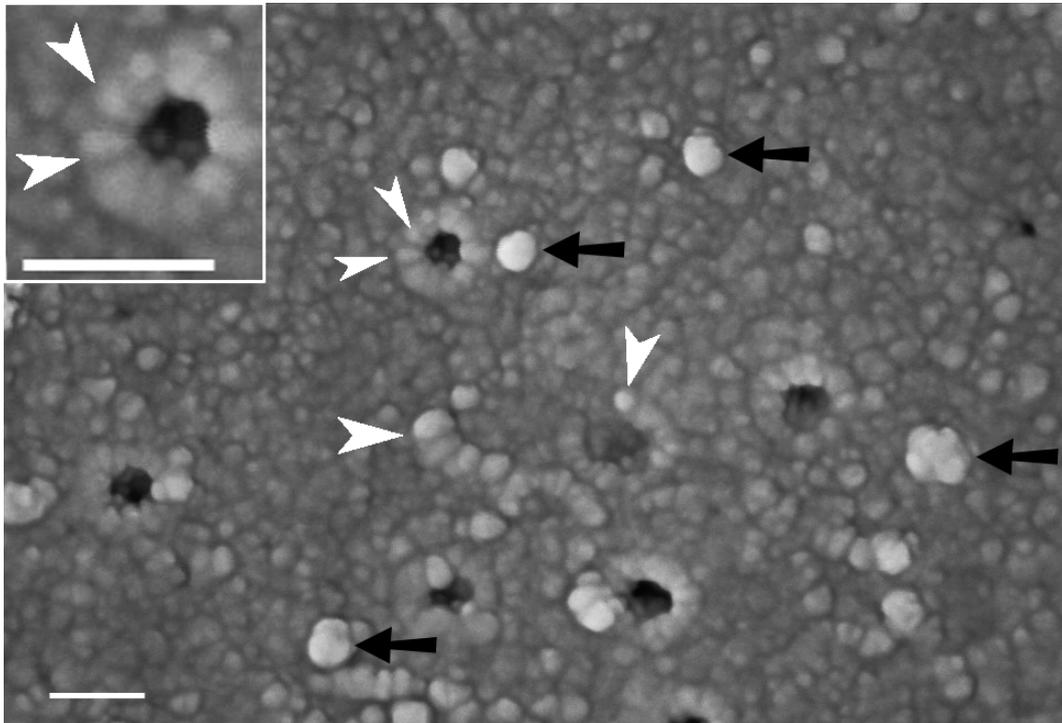


Abb. 3.16: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Plasmamembran-Oberfläche einer NIH-3T3-Mausfibroblastenzelle, weiße Pfeilspitzen zeigen caveoläre Ringstrukturen, schwarze Pfeile zeigen Partikelstrukturen auf der Membran, Balken 100 nm

3.2 Darstellung der an Gefrierbruch-stabilisierten Membranhälften gebundenen Komponenten

3.2.1 Einbettung und Ultradünnschnitt von Gefrierbruch-stabilisierten Membranhälften

Um weitere Daten zur Struktur Gefrierbruch-stabilsierter Membranhälften zu gewinnen, wurden immunmarkierte Gefrierbruch-Replika in Aralditharz eingebettet und ultradünn geschnitten. Hierbei konnten die an den Replika haftenden Lipid-Protein-Schichten dargestellt werden. In der Abbildung 3.17.b ist ein Dünnschnitt einer Pt/C-Replika dargestellt. Die ungefähr 2nm dicke Platinschicht mit der anhaftenden Lipid-Protein-Schicht einer Membranhälfte grenzt sich deutlich von der ungefähr 30 nm dicken Kohlenstoffschicht ab. Allerdings ist keine Unterscheidung zwischen der Platinschicht und der mit Osmiumtetroxid kontrastierten Membranhälfte möglich. In den ausgewählten Abbildungen sind keine Goldpartikel an den Replika vorhanden. Vergleicht man diese Abbildung mit denen reiner Kohlenstoff-Replika (Abbildungen 3.17.a und 3.17.c) erkennt man nur geringfügige Unterschiede in Bezug auf die Dicke der am Kohlenstoff haftenden Membranhälfte.

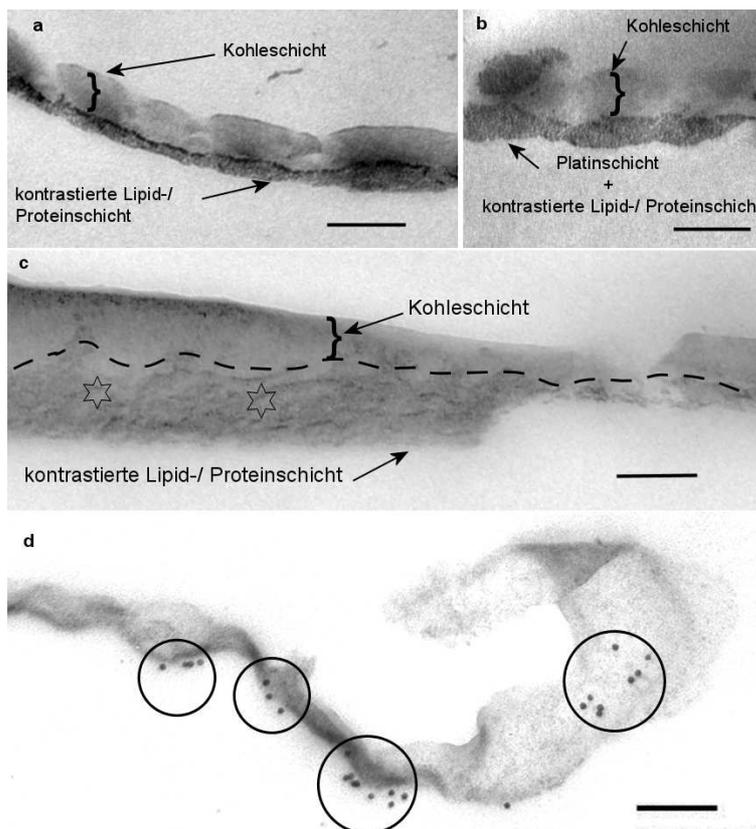


Abb. 3.17:
Dünnschnitte von Gefrierbruch-Replika chemisch unfixierter 3T3-Mausfibroblasten mit Caveolin-1 Immunmarkierung; **a)** Replika mit C-Bedampfung **b)** Replika mit Pt/C-Bedampfung, **c)** Replika mit C-Bedampfung, Partikelstrukturen gebundener Membrankomponenten (siehe Sterne), Linie begrenzt die Kohleschicht **d)** abgelöste Proteinschicht mit Caveolin-1 Immunmarkierung, Balken 100 nm

Die kontrastierte Lipid-Protein-Schicht scheint hier minimal dicker zu sein. Gut zu erkennen sind dagegen in Abbildung 3.17.c die an den Replika gebundenen Membrankomponenten, die sich als partikuläre und filamentöse Strukturen darstellen. Die Abbildung 3.17.d zeigt die kontrastierte Halbmembran, die sich im Verlauf des Dünnschnitts von der aufgedampften Platin-/ Kohleschicht abgelöst hat. Hier erkennt man die Caveolin-1-spezifischen 10 nm Goldpartikel (Kreise). An tangentialen Schnitten ist zu beobachten, dass sich die Gefrierbruch-stabilisierte Membranhälfte als eine Art Netzwerk darstellt, was in Abbildung 3.18 gezeigt wird. Auch hier finden sich Gruppen der Caveolin-1-spezifischen Markierung (Abb. 3.18, Kreise).

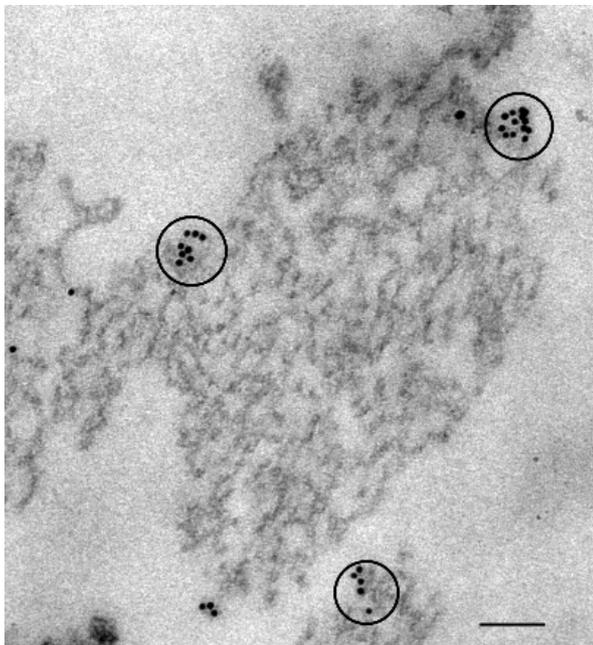


Abb. 3.18:
Tangentialer Dünnschnitt durch eine Gefrierbruch-Replika chemisch unfixierter 3T3-Mausfibroblasten mit Caveolin-1 Immunmarkierung, kontrastierte Lipid-Proteinschicht mit Caveolin-1 indizierenden 10 nm Goldpartikeln (siehe Kreise), Balken 100 nm

3.2.2 Schichtdickenbestimmung der Membranhälften immunmarkierter Replika mit Hilfe der beidseitigen C-Bedampfung

Mit der im Methodenteil unter 2.4.2 beschriebenen Versuchsanordnung der beidseitigen C-Bedampfung von Caveolin-1 immunmarkierten Replika sollte überprüft werden, ob sich die Dimensionen der gebundenen Antikörper darstellen lassen und ob diese Methode geeignet ist, um Schichtdicken-Unterschiede der anhaftenden Membrankomponenten aufzuzeigen. Dazu wurde auf die Rückseite der immunmarkierten Replika eine zusätzliche Kohlenstoffschicht aufgedampft. Die Schichtdicken der Membranhälften lassen sich auf diese Weise an den

vertikal orientierten Flanken der Caveolen (z-Richtung) darstellen. Es sollte gezeigt werden, inwiefern sich die Schichtdicken der unterschiedlich markierten Gefrierbruch-stabilisierten Membranspalthflächen unterscheiden und welchen Anteil die gebundenen Antikörper dazu beitragen. Die Replika wurden im TEM untersucht und die Schichtdicken der einzelnen Membranspalthälften und der anhaftenden Antikörperschichten konnten an den senkrechten Flanken der Caveolen ausgemessen werden. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in der folgenden Abbildung 3.19.a-c dargestellt. Abbildung 3.19.a zeigt die Gefrierbruch-stabilisierte Membranhälfte einer mit C/Pt-C bedampften Replika ohne Immunmarkierung und somit ohne Antikörperschicht. Die Dicke der Membranhälfte ist gut zwischen den zwei kontrastreichereren Kohlenstoffschichten zu erkennen. Es wurden mehrere caveoläre Membranhälften ohne Immunmarkierung ausgemessen und eine durchschnittliche Schichtdicke von 4,4 nm konnte bestimmt werden. In Abbildung 3.19.b ist die caveoläre Membranhälfte mit gebundener Erstantikörperschicht (Cav-1 N-20) dargestellt. Die durchschnittliche Schichtdicke dieser C/Pt-C-bedampften Membranspalthälfte liegt bei $6,1 \pm 0,18$ nm. Zuletzt wurde dann die Schichtdicke der Membranhälfte C/Pt-C-bedampfter Replika mit gebundener Erst- und Zweitantikörperschicht (Cav-1 N-20, goat anti-rabbit IgG plus 10 nm Goldpartikel) analysiert. Abbildung 3.19.c zeigt beidseitig bedampfte Caveolae mit beiden anhaftenden Antikörperschichten, deren durchschnittliche Schichtdicke zusammen $9,1 \pm 0,27$ nm beträgt. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Schichtdicken der Membranhälften zwischen den kontrastreichen Kohlenstoffschichten darstellen lassen. Zudem erlaubt die Methode der beidseitigen C-Bedampfung die Darstellung einer signifikanten Schichtdickenzunahme ($p < 0,001$) nach Bindung der einzelnen Antikörperschichten. Daher sollte diese Methode geeignet sein, Unterschiede in den Membranschichtdicken unterschiedlich bedampfter Replika zu ermitteln.

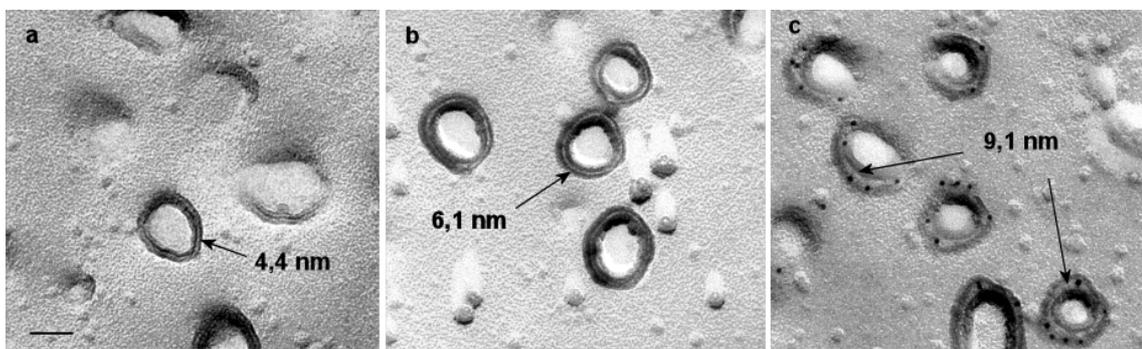


Abb. 3.19: Vergleich der Schichtdicken von Gefrierbruch-stabilisierten Membranhälften chemisch unfixierter 3T3-Mausfibroblasten nach beidseitiger C-Bedampfung (C/Pt-C) mit unterschiedlichen Markierungssituationen; **a**) Membranhälfte ohne Cav-1 Immunmarkierung mit 4,4 nm Schichtdicke; **b**) Membranhälfte mit gebundener Erstantikörperschicht mit einer Schichtdicke von 6,1 nm; **c**) Membranhälfte mit gebundener Erst- und Zweitantikörperschicht und einer Schichtdicke von 9,1 nm; Balken 50 nm

3.2.3 Schichtdickenbestimmung der Membranhälften unterschiedlich bedampfter Replika mit Hilfe der beidseitigen C-Bedampfung

Die Methode der beidseitigen C-Bedampfung wurde eingesetzt, um zu überprüfen, ob bei einer Bedampfung mit C/Pt mehr Membranmaterial an den Replika haften bleibt als nach einer konventionellen Pt/C-Bedampfung. Die unterschiedlichen Bedampfungsparameter wurden im Methodenteil beschrieben. Die Schichtdicke der Membranhälften konnte im TEM analysiert und ausgemessen werden (jeweils 20 pro Versuch). In der folgenden Abbildung 3.20.a-c sind die Ergebnisse dieses Versuches dargestellt. Abbildung 3.20.a zeigt die Membrandicke für NIH-3T3-Mausfibroblasten nach 2 nm Pt/C-C-Bedampfung. Die Caveolen wurden ausgemessen und es konnte eine Schichtdicke von $4,4 \pm 0,10$ nm ermittelt werden. In Abbildung 3.20.b ist die Membranhälfte nach 1,5 nm Pt/C-C-Bedampfung dargestellt, wobei hier eine Schichtdicke von $4,2 \pm 0,17$ nm gemessen wurde. Abbildung 3.20.c zeigt die Membranspalthälfte nach C/Pt-C-Bedampfung. Hier betrug die Schichtdicke bei $4,5 \pm 0,11$ nm. Es zeigt sich, dass mit Hilfe der Doppel-C-Bedampfung keine wesentlichen Unterschiede der Membranschichtdicken in Abhängigkeit von der Bedampfungsart feststellbar sind. Die Varianzanalyse bestätigt dieses Ergebnis und zeigt, dass keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Schichtdicken vorhanden sind ($p > 0,05$).

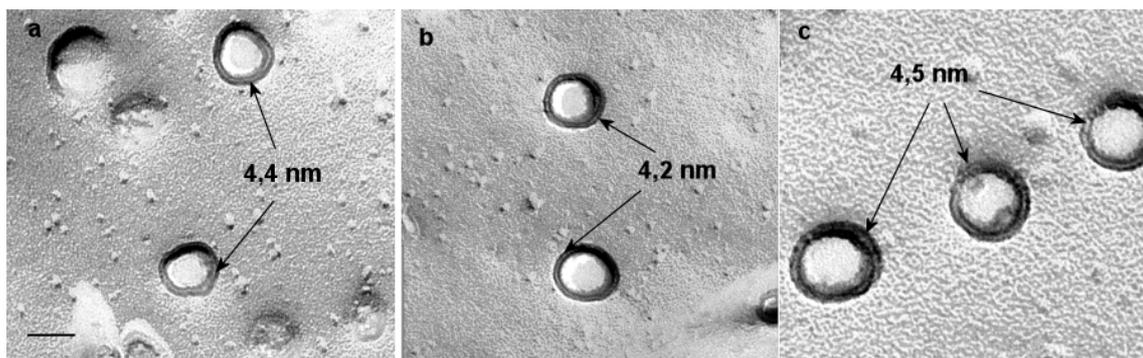


Abb. 3.20: Vergleich der Schichtdicken von Gefrierbruch-stabilisierten Membranhälften chemisch unfixierter 3T3-Mausfibroblasten nach beidseitiger C-Bedampfung (C/Pt-C); **a**) Replika mit 2 nm Pt/C, Schichtdicke der Membranhälfte ca. 4,4 nm; **b**) Replika mit 1,5 nm Pt/C; Schichtdicke der Membranhälfte ca. 4,2 nm; **c**) Replika mit C/Pt-Bedampfung, Schichtdicke der Membranhälfte ca. 4,5 nm; Balken 50 nm

3.3 Charakterisierung und Strukturanalyse der Caveolen-Membran

3.3.1 Untersuchungen an „Caveolen-Proteinen“

In diesem Abschnitt wird auf die Analyse der laut Literaturangaben mit Caveolen in Verbindung stehenden Proteine Flotillin-2, f-Actin, PTRF und eNOS-1 eingegangen. Die funktionelle Korrelation von Caveolin-1 mit den hier untersuchten Proteinen beruht auf biochemischen Analysen, wobei es an hoch aufgelösten, morphologischen Nachweisen mangelt. Mit Hilfe der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung sollten daher die bestehenden biochemischen Nachweise einer Assoziation von Caveolen und Caveolin-1 mit diesen Proteinen durch morphologische Untersuchungen ergänzt werden. Die Gefrierbruch-Immunogoldmarkierungen wurden an NIH-3T3-Mausfibroblasten durchgeführt, wobei in einer SDS-PAGE zunächst die Wirksamkeit der verwendeten Antikörper für die Immunmarkierung an NIH-3T3-Zellen und 3T3-L1-Präadipocyten ausgetestet wurden. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in der folgenden Abbildung 3.21 dargestellt.

Sowohl in NIH-3T3-Mausfibroblasten als auch in 3T3-L1-Präadipocyten konnten neben Caveolin-1 auch Flotillin-2, PTRF und f-Actin nachgewiesen werden. Die hier eingesetzten Antikörper zeigen gute Markierungseigenschaften und wurden daraufhin auch in der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung eingesetzt. Trotz des Einsatzes 10 % iger Gele war es jedoch nicht möglich das Protein eNOS im Western Blot nachzuweisen. Im Gefrierbruch dagegen gelang die Markierung. In den folgenden Abbildungen sind die Immunmarkierungen der genannten Proteine für die Pt/C- und C/Pt-Bedampfung dargestellt, wobei im Fall von PTRF die Doppelmarkierung mit Caveolin-1 gezeigt wird.

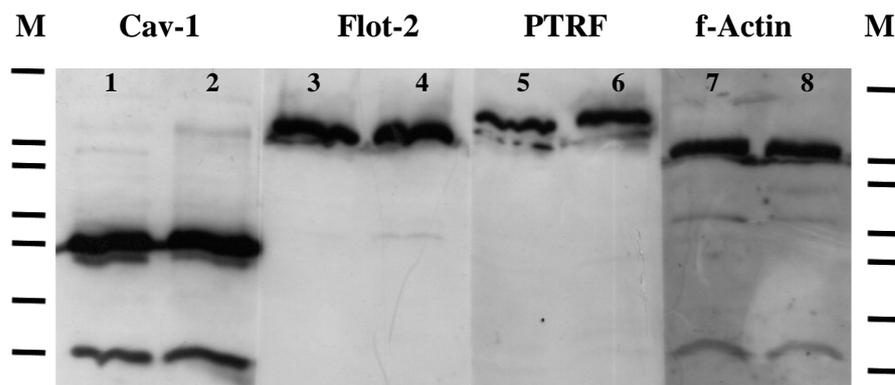


Abb. 3.21: SDS-PAGE caveolärer Proteine; Bande 1,3,5,7 : NIH-3T3 ; Bande 2,4,6,8 : 3T3-L1 ; Marker : 66, 45, 36, 29, 24, 20, 14.2 kDa

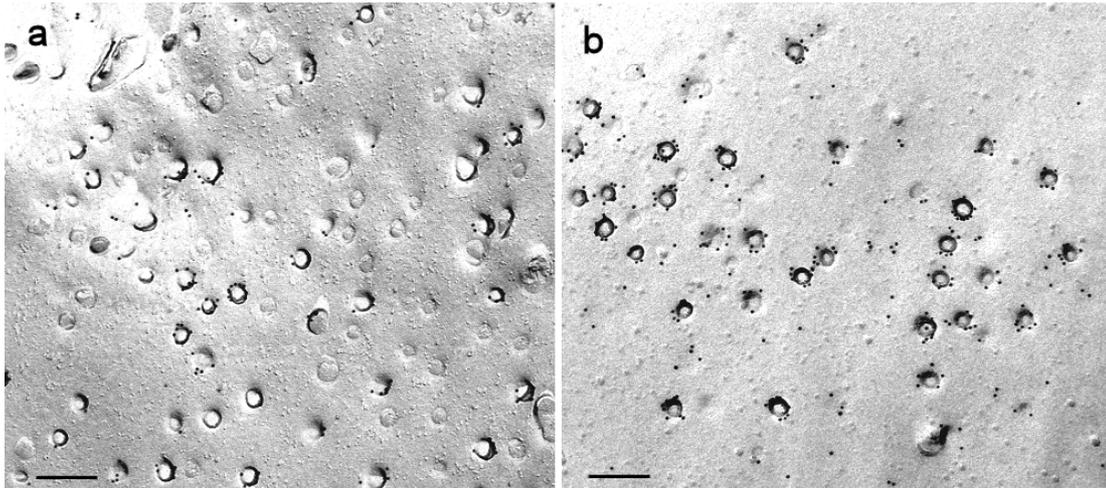


Abb. 3.22: **a)** Cav-1 Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung (PF), Pt/C-Bedampfung; **b)** Cav-1 Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung (PF), C/Pt-Bedampfung; Goldpartikel überwiegend an Caveolen; Balken 200 nm

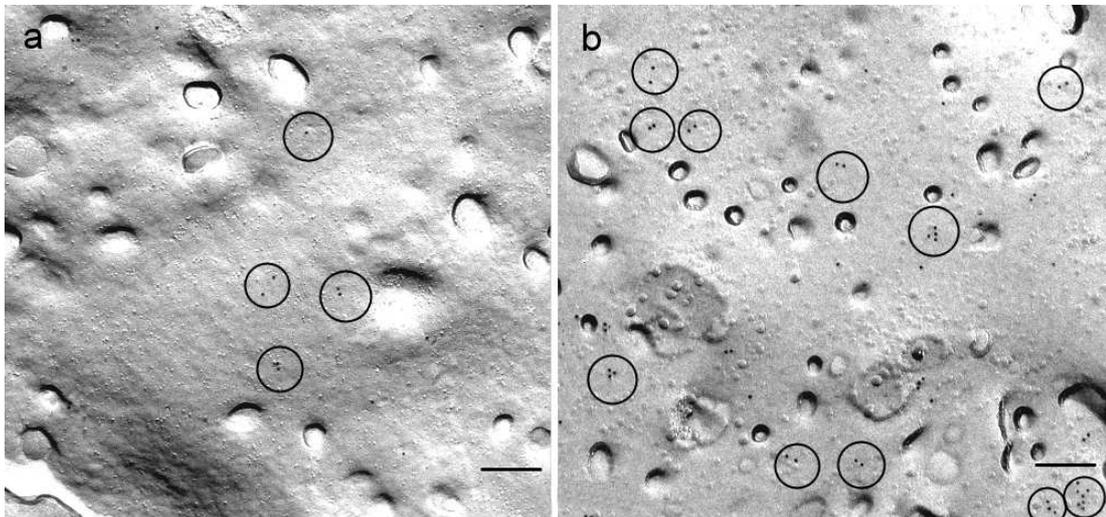


Abb. 3.23: **a)** Flot-2 Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung (PF), Pt/C-Bedampfung; **b)** Flot-2 Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung (PF), C/Pt-Bedampfung; Goldpartikel überwiegend in der flachen Membran außerhalb der Caveolen (Kreise); Balken 200 nm

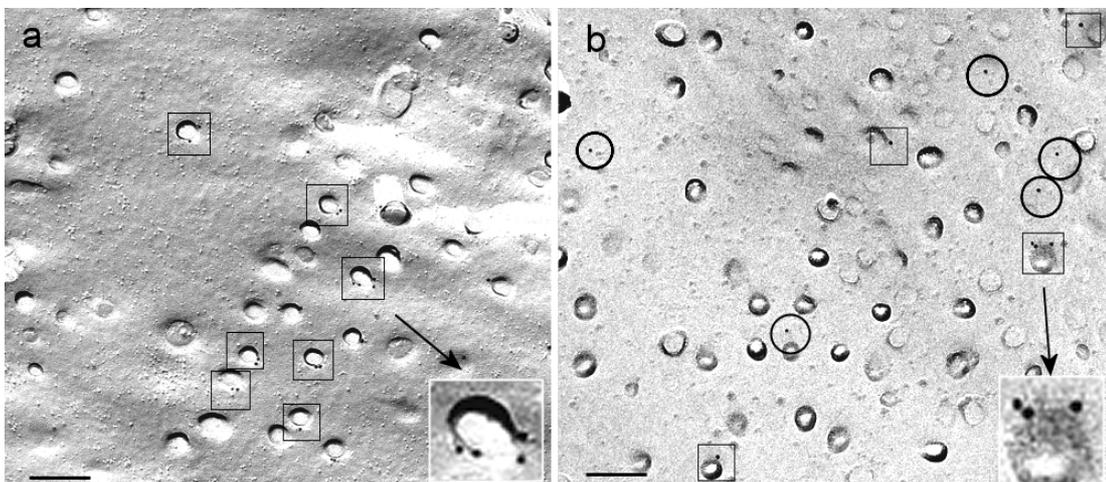


Abb. 3.24: **a)** eNOS Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung (PF), Pt/C-Bedampfung; **b)** eNOS Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung (PF), C/Pt-Bedampfung; Goldpartikel überwiegend an Caveolen (Kästchen) und wenige in der flachen Membran außerhalb der Caveolen (Kreise); Balken 200 nm

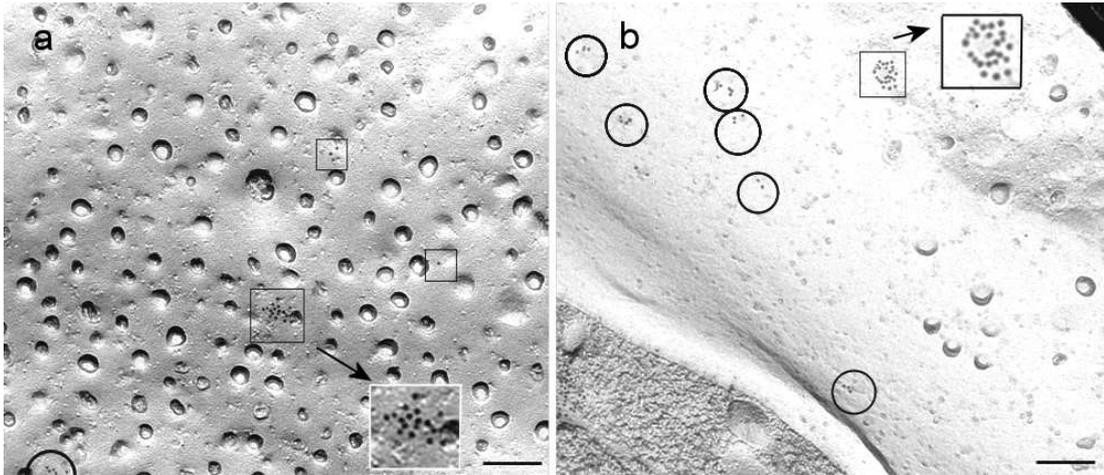


Abb. 3.25: **a)** **f-Actin** Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung (PF), Pt/C-Bedampfung; **b)** **f-Actin** Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung (PF), Pt/C-Bedampfung mit dünner Platinschicht; Goldpartikel überwiegend in der flachen Membran (Kreise) und einige in der Nähe von Caveolen (Kästchen); Balken 200 nm

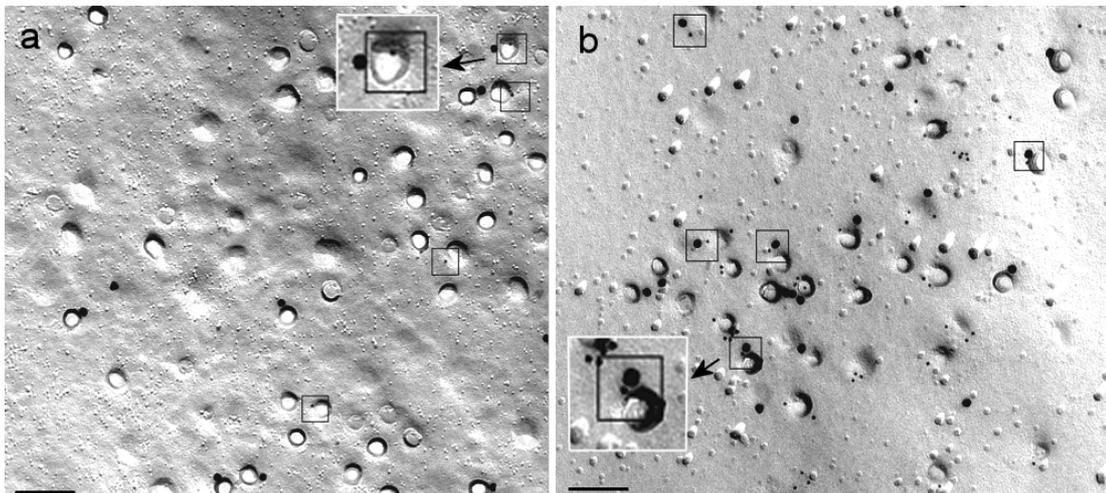


Abb. 3.26: **a)** **Cav-1 (20 nm) plus PTRF (10 nm)** Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung, Pt/C-Bedampfung; **b)** **Cav-1 (20 nm) plus PTRF (10 nm)** Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung, C/Pt-Bedampfung; Goldpartikel überwiegend an Caveolen (Kästchen); Balken 200 nm

Die Abbildungen 3.22.a und 3.22.b zeigen die Ergebnisse der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung von Caveolin-1. Sie werden dargestellt, um einen direkten Vergleich mit den anderen zu markierenden Proteine zeigen zu können. Die Goldpartikel der Caveolin-1 Markierung sind direkt an den Caveolenstrukturen sichtbar. Zusätzlich ist zu erkennen, dass die Markierungsrate für Caveolin-1 nach C/Pt-Bedampfung höher ist als nach der Pt/C-Bedampfung.

Neben Caveolin-1 soll auch Flotillin-2 in den Caveolen lokalisiert sein und wurde mit Caveolin-1 copräzipitiert (Bickel et al. 1997). In den Abbildungen 3.23.a und 3.23.b sind die Ergebnisse der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung von Flotillin-2 dargestellt. Im Vergleich zu Cav-1 sind weitaus weniger Goldpartikel zu erkennen. Die Markierungsrate ist bei Flot-2 sehr viel geringer. Die C/Pt-Bedampfung scheint aber auch hier die Markierungsrate zu verbessern. Dennoch sind nahezu keine Goldpartikel direkt an den Caveolenstrukturen zu identifizieren. Die meisten Goldpartikel befinden sich in der flachen Membran (siehe Kreise), so dass man mit Hilfe der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung eine Lokalisation des Flotillins in den Caveolen ausschließen kann.

Die eNOS-Markierung ist in den Abbildungen 3.24.a und 3.24.b dargestellt. Es zeigt sich eine Lokalisation dieses Proteins in den Caveolen (siehe Kästchen). Es sind im Vergleich zu Cav-1 weniger Goldpartikel gebunden, aber diese befinden sich fast ausschließlich an den Caveolen und nur einige wenige in der flachen Membran (siehe Kreise). Die C/Pt-Bedampfung hat offenbar keinen Einfluss auf die Markierungseffizienz.

Die Abbildungen 3.25.a und 3.25.b zeigen die Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung von f-Actin. Hier sind allerdings nur die Pt/C-Bedampfungen dargestellt, da die C/Pt-Bedampfung in diesem Zusammenhang nicht zur Verfügung steht. Dafür wurde mit Abbildung 3.25.b ein Bereich ausgewählt, in dem die Platinschicht recht dünn ist oder fehlt („Platinschatten“). Man erkennt in beiden Abbildungen kleine Gruppen von Goldpartikeln (siehe Kreise, Kästchen). Es befinden sich kaum Markierungen an den Caveolen, sondern eher in der flachen Membran (Kreise). Nur vereinzelt lassen sich f-Actin-Markierungen in der Nähe von Caveolen identifizieren (Kästchen), woraus hervorgeht, dass Actin nicht direkt in Caveolen lokalisiert ist.

In den Abbildungen 3.26.a und 3.26.b sind die Ergebnisse der Doppelmarkierung von Cav-1 und PTRF dargestellt. Cav-1 wurde hier mit 20 nm und PTRF mit 10 nm großen Goldpartikeln markiert. Im Vergleich zur Cav-1-Markierung mit 10 nm großen Goldpartikeln (Abb. 3.22) wird deutlich, dass bei 20 nm großen Partikeln die Markierungsrate geringer ist. Auch die PTRF-Markierung ist hier gering (Abb. 3.26.a; Kästchen). Dennoch ist die Lokalisation von PTRF und eine Co-Lokalisation mit Cav-1 mit Hilfe der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung möglich. Anhand der C/Pt-Bedampfung, bei der die Markierung von Cav-1 als auch PTRF deutlich höher ist, kann man erkennen, dass beide Proteine überwiegend

in den Caveolen vorkommen und darüber hinaus kolokalisieren (siehe Abb. 3.26.b; Kästchen).

3.3.2 Isolation caveolinreicher Membrandomänen

Ziel der Isolation caveolinreicher Membranvesikel war es, die strukturelle Organisation der Caveolen und der Caveolinproteine besser zu verstehen. Dazu wurden wie im Methodenteil beschrieben die caveolinreichen Vesikel aus Rattenlunge isoliert und diese für eine Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung verwendet. Zunächst wurde die Isolation der caveolinreichen Membranvesikel anhand des immunochemischen Nachweises von Cav-1 in einer SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse überprüft (siehe Abbildung 3.27)

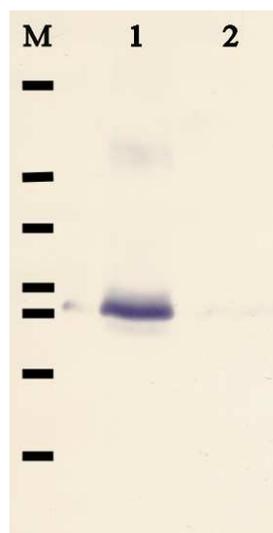


Abb. 3.27:
Isolation caveolinreicher Membranvesikel
aus Rattenlunge, Western-Blot; Marker :
66, 45, 36, 29, 24, 20, 14.2 kDa; Bande 1:
0,5 µg isolierter Membranvesikel; Bande
2: 0,5 µg Homogenat

Es wurden jeweils 0,5 µg Gesamt-Protein der isolierten Membranvesikel (Bande 1) im Vergleich zu dem Homogenat des Lungengewebes (Bande 2; 0,5 µg Gesamt-Protein), aus welchem diese isoliert wurden, auf das Gel aufgetragen. In der ersten Bande ist eine deutliche Anreicherung von Caveolin-1 aus den isolierten Membrandomänen zu erkennen. In den folgenden Abbildungen sind exemplarisch einige elektronenmikroskopische Aufnahmen (Abb. 3.28.a -3.28.d) der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierungsversuche dieser isolierten caveolinreichen Membrandomänen dargestellt.

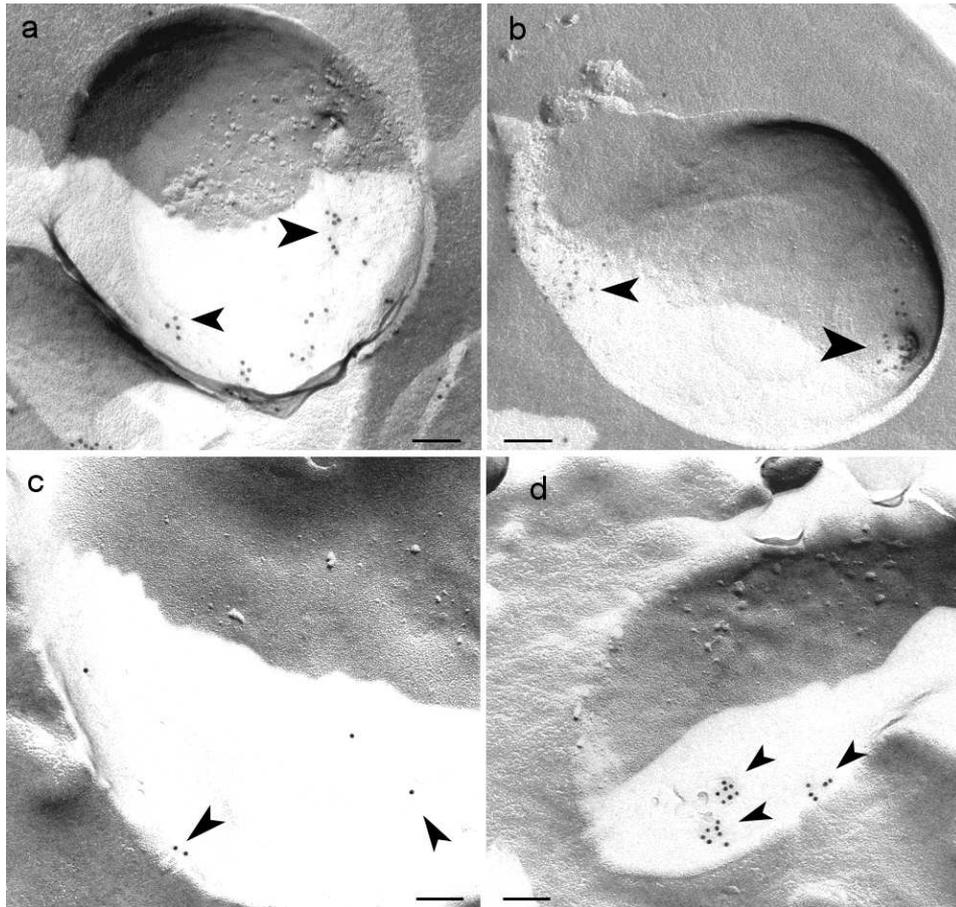


Abb.3.28.a-d: Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung isolierter Membranvesikel, Pfeilspitzen zeigen Caveolin-1 Immunogoldmarkierungen; Balken 100 nm

Wie aus den Abbildungen ersichtlich ist, haben die isolierten caveolinreichen Membrandomänen eine vesikuläre Struktur unterschiedlicher Größe. Diese Vesikel enthalten Intramembranpartikel, die darauf hindeuten, dass hier Transmembranproteine eingelagert sind. Die meisten Goldmarkierungen finden sich in Bereichen, in denen während der Bedampfung nur eine dünne Platinschicht („Platinschatten“) aufgedampft wurde. Die strukturelle Wiedergabe ist aufgrund des fehlenden Pt-Kontrastes nicht so gut, wie in Bereichen mit dickerer Platinschicht. Dennoch lassen sich Partikelstrukturen erkennen, an denen Caveolin-Markierungen lokalisiert werden können. Über die strukturelle Organisation des Caveolins beziehungsweise der Caveolen sagen diese Aufnahmen aber nur sehr wenig aus. Man kann aber erkennen, dass einige Markierungen in Gruppen angeordnet sind (siehe Abb. 3.28.a, b und d). In der Abbildung 3.28.b ist eine eingesenkte, markierte Caveole in einem Vesikel zu erkennen. Ansonsten sind die Goldmarkierungen eher vereinzelt zu finden, so dass man keine konkreten Aussagen über die strukturelle Anordnung oder Oligomerisation des Caveolins in den isolierten Vesikeln machen kann.

3.3.3 Immunpräzipitation von Caveolen

Die Immunpräzipitation von Caveolen sollte wie bei dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen Versuch dazu dienen, die strukturelle Organisation der Caveolen und das Verteilungsmuster des Caveolins („caveolar coat“) zu analysieren und elektronenmikroskopisch darzustellen. In den folgenden Abbildungen 3.29.a-3.29.e sind die Ergebnisse der Immunpräzipitation mit anschließender Immunogoldmarkierung und Negativkontrastierung anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt.

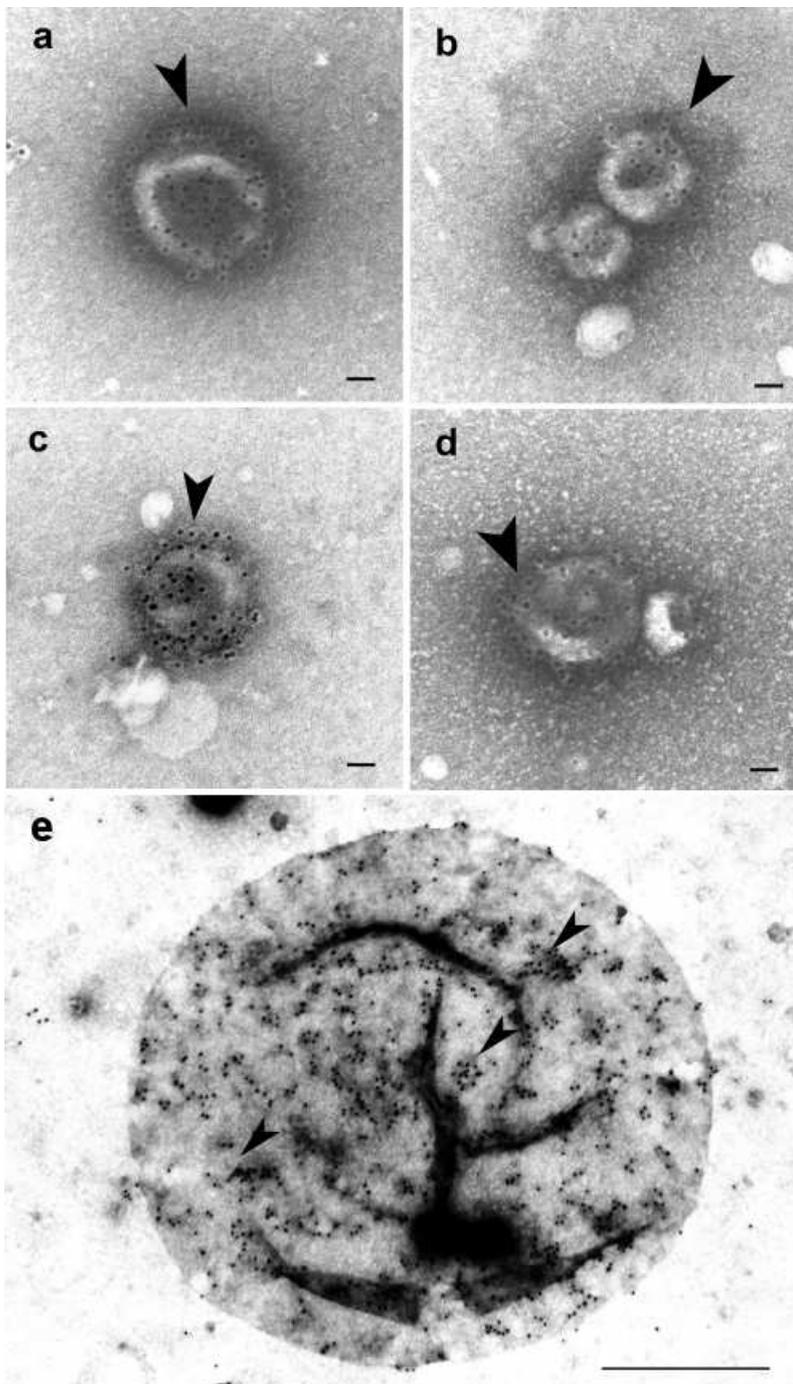


Abb. 29.a-d:
Immunpräzipitierte Vesikel
im Negativkontrast mit Cav-
1-Markierung (Pfeilspitzen),
Balken 100 nm; e) isolierte
caveolinreiche Membran-
domäne, Balken 500 nm

Wie die Aufnahmen zeigen, konnten mit Hilfe der Immunpräzipitation Vesikel isoliert werden, an denen Cav-1 mit 10 nm großen Immunogoldpartikeln markiert werden konnte. Die Größe der Vesikel ist mit bis zu 300 nm Durchmesser allerdings größer als die nativer Caveolen mit 50-100 nm Durchmesser. Über das Verteilungsmuster des Caveolins lassen sich aber auch hier keine konkreten Aussagen machen. Im Vergleich zu den isolierten caveolinreichen Membrandomänen ist bei den immunpräzipitierten Vesikeln mehr Markierung vorhanden. Die Cav-1 spezifischen Markierungen sind diffus über die gesamte Oberfläche der präzipitierten Vesikel verteilt. Neben den vereinzelt durch Immunpräzipitation isolierten Vesikeln konnten ebenfalls ganze Membrandomänen präzipitiert werden. Abbildung 3.29.e lässt erkennen, dass auch hier Gruppen von Caveolin-1-spezifischen Immunogoldmarkierungen vorhanden sind, die auf Caveolen hindeuten (Pfeilspitzen). Einzelne Caveolen ließen sich mit dieser Methode jedoch nicht isolieren.

3.3.4 Rekonstitution von isolierten 400 kDa Caveolin-Komplexen in Liposomen

Die Isolation von Caveolin-Komplexen sowie deren Rekonstitution in Proteoliposomen dienten der strukturellen Aufklärung der caveolären Hülle, der Verteilung von Caveolin-1 an Caveolen und der Frage, ob sich die Caveolen-Struktur durch Selbstorganisation bildet. Mit Hilfe der Rekonstitutionsmethode können komplexe Strukturen *in vitro* nachgebaut werden, um Rückschlüsse auf ihre Struktur und Bildung *in vivo* zu ziehen. Zunächst wurden dazu die Caveolin-Komplexe mit der von Monier et al. (1995) beschriebenen Methode aus Rinderlunge isoliert. In Abbildung 3.30 ist die Western-Blot-Analyse der mit Caveolin-1 angereicherten Fraktion aus dem kontinuierlichen Sucrose-Dichtegradienten, sowie zweier darüber und einer darunter liegenden Fraktionen dargestellt. In den unteren Fraktionen (Banden 1, 2) ist kein Caveolin-1 nachzuweisen. In den beiden darüber liegenden Fraktionen sind die Banden (4, 5) für Caveolin-1 zwar intensiver, es sind aber noch zusätzliche Banden erkennbar. Die „sauberste“ Fraktion, die in Bande 3 gezeigt ist, wurde aus 3 Fraktionen entnommen und für die Rekonstitutionsstudien verwendet. In der Abbildung 3.31 sind Detailaufnahmen (a- c) und eine Übersicht (d) von den isolierten und Caveolin-1 immunmarkierten Komplexen im Negativkontrast dargestellt. Die Komplexe zeigen sich als filamentöse Strukturen (Abb. 3.31.a-b) oder partikuläre Strukturen (Abb. 3.31.c) unterschiedlicher Größe. Die Goldpartikel (Pfeilspitzen) zeigen die Caveolin-1 Markierung der isolierten Strukturen.

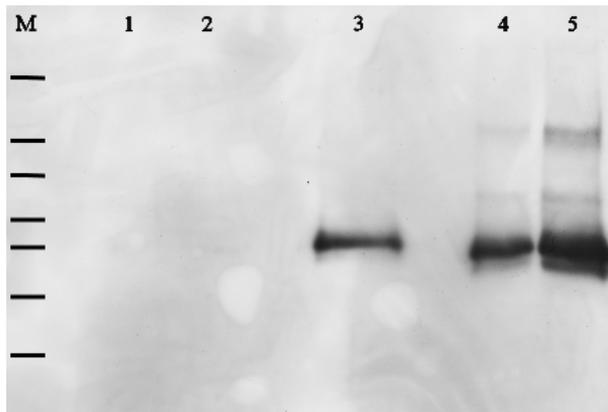


Abb. 3.30: Isolation von Caveolin-1-Komplexen aus Rinderlunge, Fraktionen aus dem Dichtegradienten; Western-Blot; Bande 1, 2: Fraktionen unter der angereicherten Cav-1 Fraktion; Bande 3: angereicherte Cav-1 Fraktion; Bande 4, 5: Fraktionen über der angereicherten Cav-1 Fraktion; Marker : 66, 45, 36, 29, 24, 20, 14.2 kDa

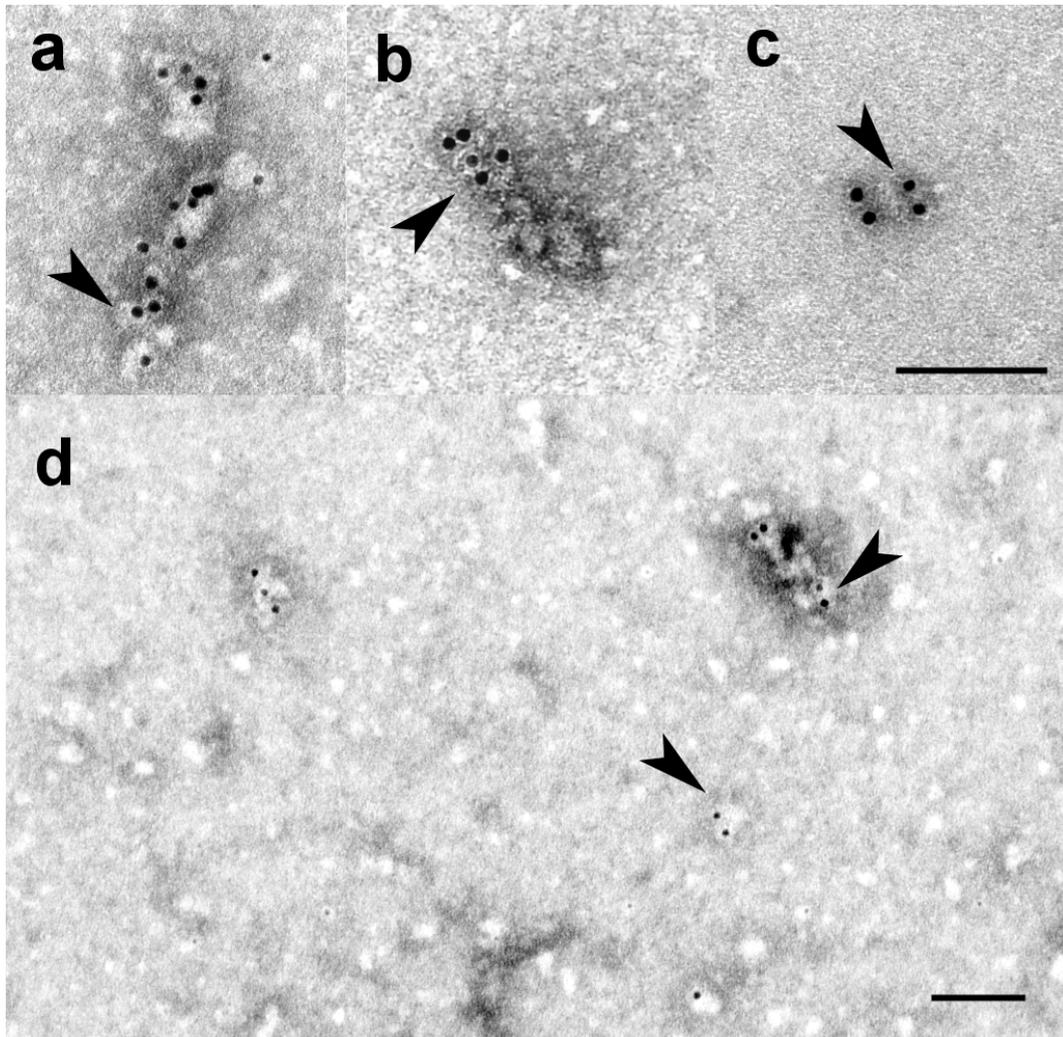


Abb.3.31: **a- c)** Detailaufnahmen der isolierten Caveolin-1-Komplexe mit Cav-1 Immunmarkierung im Negativkontrast, **d) Übersicht**, Pfeilspitzen zeigen einzelne Partikel mit Caveolin-1 Immunogoldmarkierungen; Balken 100 nm

Die hier im Negativkontrast dargestellten isolierten Caveolin-Komplexe wurden wie im Methodenteil beschrieben für die Rekonstitutionsstudien verwendet und konnten erfolgreich in Proteoliposomen eingebaut werden. Die folgenden Abbildungen (3.32.a- c und 3.33) zeigen gefriergebrochene Liposomen mit eingebautem Caveolin-1, welches mit Hilfe der Immunogoldmarkierung nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.32.a-c, Pfeilspitzen). Es sind ausschließlich Gefrierbrüche mit C/Pt-Bedampfung gezeigt, da hier wie auch in 3.1.1 gezeigt die Markierungsrate höher ist. Sowohl auf den konkaven als auch auf den konvexen Spaltflächen zeigt sich der Einbau von Caveolin-1 anhand der Goldmarkierung. Diese ist meist in Gruppen angeordnet (Abb. 3.32.a-c, Pfeilspitzen) und ist nicht im umgebenden Eis (Medium) zu finden (Übersichtsaufnahme 3.33). Höchstens 1 % der Markierung befand sich im Eis (Medium) außerhalb der Liposomen.

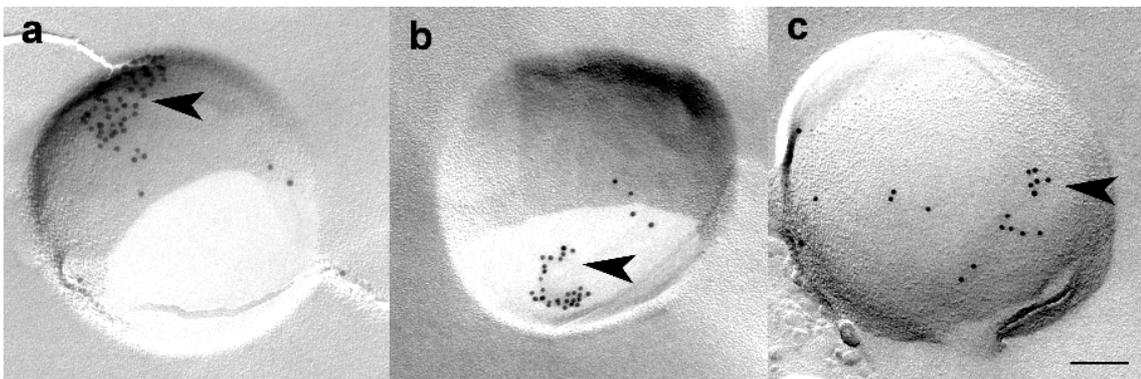


Abb.3.32: **a- c)** Detailaufnahmen von Gefrierbrüchen der rekonstituierten Cav-1 Proteoliposomen mit Cav-1 Immunogoldmarkierung; **a) und b)** konkave Spaltfläche; **c)** konvexe Spaltfläche; Pfeilspitzen zeigen Caveolin-1 Immunogoldmarkierungen; Balken 100 nm

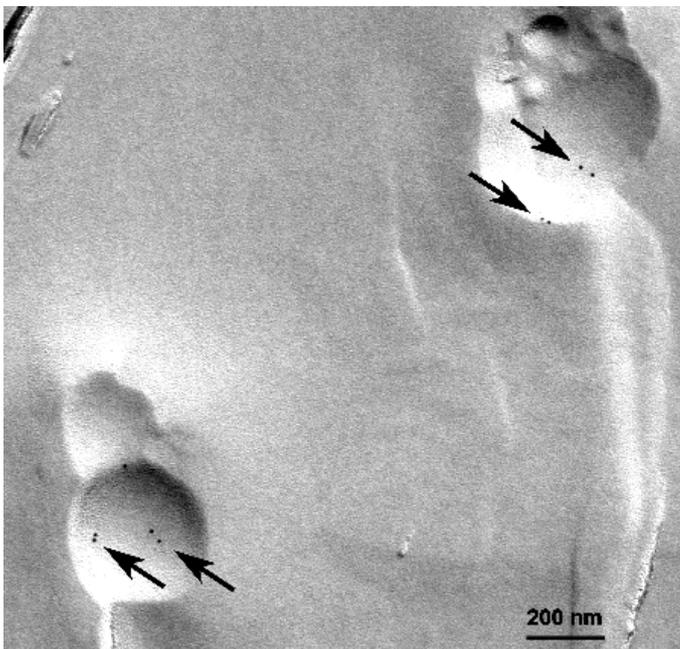


Abb.3.33: Übersicht eines Gefrierbruches der rekonstituierten Cav-1 Proteoliposomen mit Cav-1 Immunogoldmarkierung; Pfeile zeigen Caveolin-1 Immunogoldmarkierungen; Balken 200 nm

4. Diskussion

4.1 Optimierung der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung

Die Methode der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung ermöglicht Einblicke in den Aufbau und die ultrastrukturelle Organisation von Biomembranen und dient der Lokalisation und biochemischen Identifikation von Membrankomponenten. Dabei liefert die Kombination der Gefrierbruchmethode mit der cytochemischen Markierung von individuellen Molekülen der Zellmembran direkte Einblicke in die chemische Natur und Topologie der Zellmembrankomponenten (Fujimoto 1993, Pinto da Silva 1984, 1987, Severs 1995, Takizawa und Saito 1996, Torris und Mancini 1996). Die von Fujimoto (1995) eingeführte Methode der “SDS-digested freeze-fracture replica labeling (SDS-FRL)”-Technik war eine Weiterentwicklung in der Gefrierbruch-Immunmarkierungstechnik. Erst durch diese Technik wurde es möglich, auch die protoplasmatische Spalthälfte (P-face) der Membranen cytochemisch zu markieren und Proteine der cytoplasmatischen Membranhälfte mittels der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung zu lokalisieren. Ein zusätzlicher Vorteil ist der Einsatz kryofixierten Materials, was eine Artefaktbildung durch chemische Fixierungsmittel ausschließt und einen nativen Zustand der Zellen gewährleistet. Eine Weiterentwicklung und Optimierung dieser Methodik konnte in Zusammenhang dieser Arbeit in unserer Arbeitsgruppe etabliert werden.

Auch für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Charakterisierung und Strukturanalyse der Caveolenmembran war die Gefrierbruch-Cytochemie die bevorzugt angewendete Methode. In verschiedenen Versuchsansätzen der Immunogoldmarkierung von Caveolin-1 konnte festgestellt werden, dass die Markierungseffizienz häufig unterschiedlich war. Diese unterschiedlichen Markierungsraten korrelierten mit der Schichtdicke der aufgedampften Platinschicht. Derartige Beobachtungen konnten auch bei der Lokalisation anderer Membranproteine gemacht werden. Bei der Lokalisation von Phosphatidylcholin auf der E-Fläche von sekretorischen Vesikeln (Fujimoto et al. 1996) oder der bei der Lokalisation der Tetrachlorethan reduzierenden Dehalogenase in *Sulfurospirillum multivorans* (John et al. 2006) mit Hilfe der Methode der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung konnten Unterschiede in den Markierungsraten bei unterschiedlichen Platinschichtdicken beobachtet werden. Diese Unterschiede wurden aber zum Teil nicht diskutiert. Bei der Arbeit von John et al. (2006)

wurde bei den in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Gefrierbruch-Immunogoldmarkierungen bereits die „umgekehrte“ C/Pt-Bedampfung angewendet. Um die Struktur der Caveolen und die Verteilung des Caveolins mit Hilfe der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung genau untersuchen zu können, sollten zunächst die ursächlichen Faktoren für die Variation in der Markierungsrate bestimmt und der Einfluss der Platin- beziehungsweise Kohlenstoffschicht untersucht werden. Auf diese Weise sollte es möglich sein, die Methode der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung so zu optimieren, dass eine maximale Markierungsrate zu erzielen ist. Schon Fujimoto (1995) nahm an, dass vor allem die Kohlenstoffschicht entscheidend für die Adsorption der Membranproteine an den Replika ist. Rash und Yasumura (1999) bestätigten diese Hypothese, indem sie zeigten, dass gap-junction Proteine besser an Kohlenstoff-Replika adsorbiert waren als an konventionellen Pt/C-Replika. Dennoch wurde nicht geklärt, welchen Einfluss die Bedampfungsparameter auf die Markierung haben und in welcher Weise sich die Markierungsrate optimieren lässt. Darüber hinaus sind die Kenntnisse über die eigentliche Zusammensetzung der Gefrierbruch-Replika und des anhaftenden biologischen Materials nur fragmentär.

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, mit Hilfe von Variationen unterschiedlicher Faktoren, welche die Markierungsrate an Gefrierbruch-Replika beeinflussen können, die Methode zu optimieren. Außerdem sollten weitere Untersuchungen an Gefrierbruch-Replika zur Darstellung der an den Replika gebundenen Komponenten dazu beitragen, deren Struktur besser zu verstehen. Als Untersuchungsmodell dienten chemisch unfixierte 3T3-Mausfibroblasten und 3T3-L1-Adipozyten an denen Caveolin-1, das Markerprotein der Caveolen, mit Immunogold markiert wurden. Zunächst wurden die Parameter für die Bedampfung mit Platin und Kohlenstoff variiert. Durch die Variation der aufgedampften Platinschichtdicke konnte eindeutig gezeigt werden, dass dünne Platinschichtdicken von 1,5 nm Schichtdicke eine signifikant bessere Markierungseffizienz erzeugen als Platinschichtdicken von 2,5 nm, die oft wegen des sehr hohen elektronenmikroskopischen Kontrastes benutzt werden. Die beste Markierungsrate wurde bei einer C/Pt-Bedampfung erzielt, bei der zuerst die Kohlenstoffschicht und anschließend die Platinschicht auf die Membranspaltfläche aufgebracht worden war. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die aufgedampfte Platinschicht einen einflussreichen Faktor für die Markierungseffizienz darstellt.

Als eine mögliche Ursache für die verminderte Markierungsrate bei 2,5 nm Pt/C-Bedampfung wurde in unserer Arbeitsgruppe eine elektrostatische Abstoßung der am Zweitantikörper

gebundenen Goldpartikel durch die Platinschicht diskutiert. Diese Vermutung konnte durch eine alternative Nachweismethode des gebundenen Erstantikörpers mit Hilfe eines Ceriumphosphat-Niederschlags überprüft werden. Die Bindung des Gold-Zweitantikörpers wird nicht durch die Bedampfungsparameter beeinflusst, denn die höhere Caveolin-1 Markierbarkeit bei Kohle-bedampften Replika konnte auch bei Verwendung von Ceriumphosphat nachgewiesen werden.

Eine Ursache für die limitierende Wirkung der Platinschicht scheint in ihrem Aufdampfvorgang zu liegen. In Versuchen, bei denen die Emissionsparameter wie die Emissionsstromstärke und die Aufdampfzeit bei konstant gehaltener Platinschichtdicke und konstanter Beschleunigungsspannung an der Verdampferquelle variiert wurden, konnte gezeigt werden, dass kurze Aufdampfzeiten mit hoher Emissionsstromstärke (89 mA, 12 sec.) zu signifikant besseren Markierungsraten führen. Lange Aufdampfzeiten mit niedriger Emissionsstromstärke (59 mA, 35 sec.) dagegen limitieren die Markierungseffizienz. Während des Aufdampfvorgangs werden die gefrorenen Proben bei -150°C gekühlt, so dass eine thermische Schädigung der Epitope unwahrscheinlich erscheint. Die Unterschiede in der Markierungsrate könnten darin begründet liegen, dass die Platinschichten sich bei unterschiedlichen Emissionsstromstärken in ihrer mikrogranulären Partikelstruktur unterscheiden. Bei hohen Emissionsstromstärken könnten die Mikrokörnung und Verteilung dazu führen, so dass mehr biologisches Material an den Replika haften bleibt. Die Unterschiede in der Mikrostruktur von Platin- und Kohleschichten konnte schon von Fukami (1958) gezeigt werden. Diese Unterschiede in der Mikrostruktur könnten ebenso die Ursache für eine bessere Markierung der C/Pt- Replika sein, bei der zuerst die Kohleschicht aufgedampft wird.

Die Kohlenstoffschicht kann wahrscheinlich aufgrund ihrer eher amorphen Struktur (Fukami 1958) das an den Replika haftende biologische Material wie Proteine und Lipide besser binden und festhalten, was sich in einer erhöhten Anzahl an Epitopen und einer höheren Markierungseffizienz äußern würde. Diese Hypothese wurde mit Hilfe von Ultradünnschnitten unterschiedlich bedampfter Replika überprüft (siehe Ergebnisteil 3.2.1). Die mit Osmiumtetroxid kontrastierten Protein- und Lipidschichten zeigten keine Unterschiede in Bezug auf die Schichtdicke bei unterschiedlichen Bedampfungsarten. In tangentialen Schnitten durch die Replika konnte die Replika-stabilisierte kontrastierte Protein-Lipidschicht dargestellt werden. Diese zeigte sich als ein Netzwerk, in dem lokale

Gruppierungen von Caveolin-1 Immunogoldmarkierungen auftraten. Damit konnte zum ersten Mal das an den Replika gebundene Material gezeigt werden. Da die Replika mit dem starken Detergenz SDS gereinigt werden, könnte man vermuten, dass kaum noch Membran-Komponenten an den Replika haften bleiben. Diese Vermutung konnte mit Hilfe der Darstellung des an den Replika haftenden Materials widerlegt werden. Aus dieser Beobachtung resultiert die weiterführende Annahme, dass sich die gesteigerte Markierungseffizienz nicht in einer Schichtdickenzunahme des an den Replika haftenden Materials äußert, sondern durch ein dichteres Replika-gebundenes Protein-Lipid-Netzwerk. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass bei Versuchen mit beidseitig Kohlenstoff-bedampften Replika keine Unterschiede in der Schichtdicke der Membranhälften für unterschiedliche Bedampfungsvarianten erfasst werden konnten. Die Dicken der angelagerten Antikörperschichten nach Immunmarkierung ließen sich dagegen gut differenzieren (siehe Ergebnisteil 3.2.2). Der morphologische Nachweis eines dichteren Protein-Lipid-Netzwerkes konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erbracht werden.

Einen zusätzlichen Faktor für die Dichte an Immunogoldmarkierung stellt die Größe der eingesetzten Zweitantikörper-Gold-Komplexe dar. Je kleiner diese Komplexe sind, desto höher ist die Zweitantikörper-Partikeldichte (siehe Ergebnisteil 3.1.5). Hier ist die signifikant verbesserte Zweitantikörper-Markierungseffizienz durch den geringeren Platzbedarf der kleineren Antikörper-Gold-Komplexe zu erklären. Bei den Markierungsversuchen von Caveolin-1 ist es wahrscheinlich, dass es zur Bindung von mehreren Zweitantikörpern an einen Erstantikörper kommen kann. Laut des Produktdatenblattes kann der verwendete Zweitantikörper (British Biocell International) an beide H- und L-Ketten des Erstantikörpers binden. Somit kann es zu einer Verstärkung der Markierung kommen, wodurch keine genaue Quantifizierung von Caveolin-1-Molekülen mit Hilfe der Caveolin-1-spezifischen Goldpartikel des Zweitantikörpers möglich ist. Als Alternative könnten Protein A oder mit Gold gekoppelte Erstantikörper verwendet werden. Dadurch könnte der Nachweis von Caveolin-1 spezifiziert und eine genauere Quantifizierung ermöglicht werden.

Die dargestellten Versuche tragen dazu bei, die Struktur der caveolären Hülle und das Verteilungsmuster von Caveolin-1 aufzuklären. Anhand der unter 3.1.5. dargestellten Abbildungen der 3D-Rekonstruktionen wird deutlich, dass sich die Markierungen von Caveolin-1 auf den oberen Bereich der Caveolen beschränkt. Die Markierung ist ring- oder bandförmig lateral um die Caveolen angeordnet, wobei der „Boden“ der Caveole frei von

Caveolin-1 indizierenden Goldpartikeln ist. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Westermann et al (2005) überein, womit eine eindeutige Lokalisation von Caveolin-1 nahe dem „Halsbereich“ der Caveolen vermutet werden kann.

Neben den Untersuchungen der Caveolen im Transmissionselektronenmikroskop wurden auch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Zum einen wurden dazu Gefrierbruch-Replika von 3T3-Mausfibroblastenzellen verwendet, wobei sich die replizierte innere cytoplasmatische Oberfläche darstellen lässt. Diese Methode erlaubt zusätzlich zu den 3D-Rekonstruktionen eine bessere räumliche Vorstellung der Caveolin-Verteilung als die TEM-Bilder. Die Verteilung der Caveolin-1 spezifischen Markierungen (Goldpartikel) bestätigt eine bandförmige Organisation des Caveolins unterhalb der Caveolen-Öffnung (Abb. 3.15). Nur an flachen Caveolen, sind die Markierungen diffus verteilt.

Zum anderen sollte die äußere exoplasmatische Oberfläche der Plasmamembran einer NIH-3T3-Mausfibroblastenzelle untersucht und die Öffnung der Caveolen dargestellt werden. Hierbei zeichnen sich auf der Oberfläche der Plasmamembran kleinere partikuläre Strukturen ab, die Bestandteil der Glykokalix sein könnten. Bei den größeren Partikel-Strukturen könnte es sich um Glykolipide oder Proteinkomplexe der äußeren Membranhälfte handeln, die aufgrund der Goldbespaltung stärker hervortreten. Erlandsen et al. (2001) konnten mit Hilfe hoch auflösender Cryo-FESEM (cryo-field emission scanning electron microscopy) ebenfalls Strukturen der Glykokalix an der Oberfläche von Thrombozyten darstellen. Diese Strukturen wurden als Zell-Adhäsionsmoleküle (CAMs, cell adhesion molecules) wie zum Beispiel P-Selektin oder Integrine identifiziert.

Die äußere Oberfläche und die Öffnung der Caveolen konnte erstmalig so hochaufgelöst dargestellt werden. Es zeichnen sich ringförmig angeordnete partikuläre Strukturen ab, die den Porus der Caveolen umgeben (Abb. 3.16). Diese Strukturen könnten sich durch die Fixierung mit Glutaraldehyd, ein daraus resultierendes Zusammenziehen der Membran und durch die Goldbespaltung stärker darstellen als es *in vivo* der Fall wäre. Diese Strukturen könnten Proteinkomplexe der äußeren Membran darstellen, die aufgrund der Membrankrümmung an den Caveolen nach außen gedrückt werden. Ähnliche ringförmige um die Caveolen angeordnete Intramembranpartikel konnten auch von Westermann et al. (1999) an Gefrierbrüchen Glutaraldehyd-fixierter 3T3-L1 Fibroblasten auf der exoplasmatischen Spaltfläche beobachtet werden. Zudem zeigt sich nach der Fixierung mit Glutaraldehyd, dass

ein Großteil der Caveolen abgebrochen ist, was sich durch ein Zusammenziehen im Halsbereich der Caveolen durch die Fixierung erklären lässt. Aufgrund der Fixierung stellen sich die Caveolen im Ultradünnschnitt als omega-förmige, im Halsbereich verengte Strukturen dar (siehe auch Abb. 1.1.). In den durch Gefrierbruch hergestellten Replika stellen sich die Caveolen dagegen eher als becherförmig ohne eine Verengung im Halsbereich dar. Die Verengung im Halsbereich ist somit ein Artefakt der Glutaraldehydfixierung. Auf der protoplasmatischen Spaltfläche und bei nicht fixierten Zellen fehlen diese Intramembranpartikel allerdings. Foti et al. (2007) zeigten auf der exoplasmatischen Membran-Spalthälfte von fixierten 3T3-L1-Adipozyten Partikel in der Halsregion der Caveolen. Die Partikel konnten als Insulin-Rezeptoren identifiziert werden. Die Halsregion der Caveolen soll daher eine distinkte Plasmamembran-Subdomäne bilden, die den Insulin-Rezeptor anreichert, wobei Actin eine stabilisierende Funktion übernehmen soll.

Für Caveolin-1 konnte eine eindeutige Abhängigkeit der Markierungsrate von der Bedampfung festgestellt werden (siehe Ergebnisse unter 3.1.1). Caveolin-1 ist auf der cytosolischen Seite über eine sogenannte Haarnadelstruktur in der Plasmamembran verankert, wobei es die Plasmamembran wahrscheinlich nicht vollständig durchzieht (siehe Abb. 1.4). Das zu markierende Epitop ist bei diesem „Halbmembranprotein“ am N-terminalen Ende lokalisiert. Eine derartige Insertion in die Membran könnte sich bei der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung als kritisch erweisen, da aufgrund der geringeren Membranverankerung im Vergleich zu echten Transmembranproteinen eine weniger stabile Bindung an den Gefrierbruch-stabilisierten Membranhälften denkbar ist. Diese „Halbmembranproteine“ könnten durch die Behandlung mit SDS zum Teil von den Replika abgelöst werden. Der Einfluss der SDS-Behandlung auf die Markierungsrate wurde im Zuge dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die Bedingungen der SDS-Reinigung wurden bei allen Versuchen konstant gewählt, so dass die unterschiedlichen Markierungsraten nicht durch unterschiedliche Inkubationsdauer oder Inkubationstemperatur resultieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Immunogoldmarkierungen von Transmembranproteinen, welche vollständig in die Plasmamembran inserieren, keine signifikante Abhängigkeit der Markierungsrate von unterschiedlichen Bedampfungsparametern festzustellen ist. Hierzu wurden Versuche zur Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung von AQP1 durchgeführt. AQP1 ist mit 6 Transmembranhelices in der Plasmamembran verankert, wobei das zu markierende Epitop direkt hinter der 6. Helix bis hin zum C-Terminus lokalisiert ist. Im Vergleich zur Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung von Caveolin-1 sollte bei den Markierungsversuchen

von AQP1 eine geringere oder keine Abhängigkeit von unterschiedlichen Bedampfungssituationen zu beobachten sein. Die unter 3.1.3 in Abbildung 3.6 dargestellten Ergebnisse bestätigen diese Hypothese. Eine statistische Auswertung (Varianzanalyse und Post-Hoc-Test mit SPSS) der für die 3 verschiedenen Bedampfungstypen (2,5 nm Pt/C; 1,5 nm Pt/C und C/Pt) ausgezählten durchschnittlichen Markierungen pro μm^2 ergibt nur einen signifikanten Unterschied zwischen der 2,5 nm Pt/C-Bedampfung und der C/Pt-Bedampfung. Ein statistischer Vergleich der Markierungsraten der übrigen Bedampfungen zeigt keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Immunogoldmarkierungen von Caveolin-1, bei der die statistische Auswertung gezeigt hat, dass sich alle drei Bedampfungstypen signifikant unterscheiden (siehe Ergebnisteil 3.1.1.). Diese Ergebnisse bestätigen die von Schlörmann et al. (2007) gemachten Beobachtungen in Bezug auf das Transmembranprotein Connexin 43 und lassen vermuten, dass die Membraninsertion der Proteine die Effizienz der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung beeinflussen kann. Bei Connexin 43 handelt es sich um ein oligomeres Transmembranprotein, das aus zwei hexameren Connexonen, welche jeweils aus 24 Transmembranhelices aufgebaut sind, einen dodekameren Zell-verbundenen Kanal bildet (Cheng et al. 2003). Gefrierbruch- Immunogoldmarkierungen von Connexin 43 zeigten nach unterschiedlicher Bedampfung ebenfalls keine Unterschiede in den Markierungsraten (Schlörmann et al. 2007).

4.2 Biochemische Charakterisierung der Caveolen-Membran

Neben den strukturellen Untersuchungen an den Caveolen-Membranen bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit in der biochemischen beziehungsweise morphologischen Charakterisierung der Caveolen mit Hilfe der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung. Zahlreiche Proteine wie zum Beispiel G-Proteine, Membran-Rezeptorproteine, Tyrosinkinasen, Enzyme wie eNOS, GTPasen, Adapterproteine und strukturelle Proteine wie Actin sollen in Caveolen angereichert sein (Anderson 1998, Razani et al. 2002a). Zum Teil beruhen diese Beobachtungen auf biochemischen Isolationsmethoden Detergenz-unlöslicher Membranbestandteile, wie es zum Beispiel für Flotillin der Fall war.

Flotillin ist in Lipid Rafts lokalisiert (Lang et al. 1998, Neumann-Giessen 2004) und wurde als Raft-Markerprotein aus mit Caveolen angereicherten Membranen murinen Lungengewebes isoliert, sequenziert und die *flotillin-1* und *flotillin-2* codierenden Gene identifiziert,

die zuvor schon als ESA (Epidermal Surface Antigen) bekannt waren (Bickel et al. 1997). Flotilline besitzen eine evolutionär konservierte PHB-Domäne (prohibitin homology domain). Diese Domäne könnte eine Haarnadel-ähnliche Struktur ausbilden, wie es bei der Membrandomäne des Caveolins der Fall ist. Eine weitere Ähnlichkeit besteht in der Lokalisation der Flotilline in Detergenz-resistenten Membrandomänen (Langhorst et al. 2005, Morrow und Parton 2005). Eine Kolokalisation oder biochemische Interaktion mit Caveolin-1 konnte aber nicht bestätigt werden (Stuermer et al. 2001, Souto et al. 2003). Daher ist es umstritten, ob Flotilline in Zellen, die Caveolen besitzen, in diesen lokalisiert sind, oder eine eigene „Art“ von nicht caveolären Plasmamembran-Mikrodomänen beziehungsweise Rafts bilden.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung die Lokalisation von Flotillin-2 an der Plasmamembran von 3T3-Mausfibroblasten analysiert. Im Ergebnisteil 3.3.1 (Abb. 3.23.a-b) sind die Markierungsversuche von Flotillin-2 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass nahezu keine Flotillin-2-spezifischen Markierungen an Caveolen zu finden sind. Die Flotillin-2-Markierungen befinden sich ausschließlich in flachen Plasmamembranbereichen außerhalb von Caveolen. Damit kann eine Lokalisation von Flotillin-2 und somit eine Kolokalisation mit Caveolin-1 an Caveolen ausgeschlossen werden. Auch Rajendran et al. (2007) und Frick et al. (2007) konnten zeigen, dass Flotillin nicht mit Caveolin-1 und Caveolen assoziiert ist.

Die Flotillin-2-Markierungen waren häufig in Gruppen angeordnet, was darauf hindeutet, dass dieses Protein eigene Raft-Domänen bildet. Die in Gruppen angeordneten Flotillin-2-spezifischen Markierungen sind auf einer Fläche von ungefähr 50-100 nm Durchmesser verteilt. Diese Größe stimmt mit der von Kurzchalia und Parton (1999) postulierten Größe von Lipid Rafts von 70 nm überein. Die Flotillin-2 Markierung weist noch auf ein weiteres Problem hin, welches schon diskutiert wurde. Wie bei Caveolin-1 ist die Markierung von der Bedampfungsart abhängig (Abb. 3.23.b). Die postulierte Haarnadel-ähnliche Struktur von Flotillin-2 könnte wie auch bei Caveolin-1 für diese Abhängigkeit der Markierung von den Bedampfungsparametern verantwortlich sein. Diese Ergebnisse bestätigen somit die Hypothese, dass die Membrantopologie eines Proteins die Markierungsrate beeinflussen könnte.

Das biochemisch wahrscheinlich am besten untersuchte Signalprotein, welches durch Caveolin moduliert wird, ist eNOS, die endotheliale Isoform der Stickstoffmonoxid-Synthase. Eine Acetylierung von eNOS führt zu dessen Transport in Lipid Raft Domänen/Caveolae der

Plasmamembran oder zum Golgi-Apparat. Dabei besitzt nicht mit Caveolin-1 interagierendes eNOS, welches in Lipid Rafts oder Caveolen lokalisiert ist, optimale enzymatische Aktivität. Eine Interaktion beziehungsweise Bindung an Caveolin-1 inhibiert seine Funktion (Garcia-Cardena et al. 1996, Fulton et al. 2002). Anhand der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung sollte die Lokalisation von eNOS an Plasmamembran-Caveolen von 3T3-Mausfibroblasten dargestellt werden (siehe Abb. 3.24.a-b). Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass eNOS-Markierungen hauptsächlich an Caveolen zu finden sind, wobei einige Markierungen auch in der flachen Membran vorkommen, was auf eine Lokalisation von eNOS sowohl in Caveolen als auch in flachen Rafts hindeutet. Die Anzahl der Markierungen ist aber weitaus geringer als die für Caveolin-1 (siehe Abb. 3.24.a-b). In 3T3-Mausfibroblasten ist die Expression von eNOS im Vergleich zu anderen Zelltypen wie Endothelzellen offenbar geringer. Die Methode der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung konnte dennoch einen morphologischen Nachweis für die Lokalisation von eNOS in Caveolen erbringen.

Die Actinfilamente bilden den Hauptbestandteil des zellulären Cytoskeletts und sind essentiell für zahlreiche Funktionen in der Zelle wie zum Beispiel Zellbewegung, Morphogenese, Polarität und Zellteilung (Drubin et al. 1996, Mitchison et al. 1996). Durch Untersuchungen an isolierten Caveolen-Membranen aus Lungengewebe (Lisanti et al. 1994) oder aus glatten Muskelzellen (Chang et al. 1994) konnte Actin an Caveolen identifiziert werden. Actin spielt dabei eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung und Immobilisierung der Caveolen an der Plasmamembran (Mundy et al. 2002, Stahlhut und Deurs 2000, Thomson et al. 2002). Sowohl für die endocytotische Funktion als auch für Signaltransduktionsprozesse ist die Positionierung und Stabilisierung der Caveolen über das Actin-Cytoskelett von entscheidender Bedeutung. Die endocytotische Funktion zum Beispiel wird dadurch minimiert, wobei aber Kinase-regulierte Kiss-and-Run-Zyklen (Pelkmans et al. 2005) und eine Toxin- oder Virus-stimulierte Endocytose möglich sind (Pelkmans und Helenius 2002).

Die Lokalisation von Actin an der Plasmamembran wurde mit Hilfe der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung überprüft. Wenn es durch das Actin-Cytoskelett zu einer Stabilisierung und Positionierung der Caveolen an der Plasmamembran kommt, müssten zahlreiche Immunogoldmarkierungen von Actin an den Caveolen zu finden sein. Wie die Abbildung 3.25 zeigt, ist dies aber nicht der Fall. Es konnten zwar Gruppen von Actin-Markierungen an der Plasmamembran identifiziert werden, aber diese sind überwiegend in ebenen Membranbereichen zu finden und seltener direkt an Caveolen. Somit scheint keine

direkte Verbindung von Actin zu den Caveolen beziehungsweise zum Caveolin-1 vorhanden zu sein. Da die Actinfilamente nicht in die Plasmamembran integriert sind, wäre es möglich, dass durch die SDS-Behandlung ein Teil der Actin-Proteine von den Replika abgelöst wurden. Daher können keine eindeutigen Aussagen in Bezug auf die Actin-Verteilung gemacht werden. Zudem soll Actin über sogenannte Actin-bindende Proteine wie zum Beispiel Filamin an Caveolin-1 gebunden sein (Stahlhut und van Deurs 2000), was eine direkte Markierung von Actin an den Caveolen in Frage stellt.

PTRF (polymerase I and transcription release factor) wurde zunächst als Zellkern-Protein identifiziert, welches Funktionen in der transkriptionellen Kontrolle übernimmt. PTRF erleichtert die Dissoziation von pre-rRNA, Pol1 (Polymerase 1) und TTF-1 (transcription termination factor 1), indem es mit TTF-1 interagiert (Jansa et al. 1998). Kürzlich konnte dieses Protein, welches über eine PEST-Domäne proteolytisch reguliert wird, durch ein screening caveolärer Proteine in Caveolen von Adipozyten nachgewiesen werden (Vinten et al. 2001). Caveolen sollen daher als Zielort für das Targeting und die post-translationale Modifikation von PTRF und anderen Proteinen mit PEST-Domänen fungieren (Aboulaich et al. 2004, Vinten et al. 2005). Darüber hinaus scheint PTRF neben seiner transkriptionellen Funktion im Zellkern auch eine Funktion im Triacylglycerol-Metabolismus zu haben, wobei bestimmten Subtypen von Caveolen ebenfalls eine Rolle zugeordnet wird (Aboulaich et al. 2006). PTRF stellt daher einen entscheidenden Verbindungspunkt zu den Caveolen und ihrer Funktion sowohl in der Bindung, der Relokation, und der durch Phosphorylierung bedingten proteolytischen Kontrolle von Signalproteinen mit PEST-Domänen als auch im Triacylglycerol-Metabolismus dar. Deshalb sollte PTRF mit Hilfe der Gefrierbruch-Immungoldmarkierung lokalisiert werden. Wie anhand der Abbildungen 3.26.a-b deutlich wird, konnte PTRF an Caveolen lokalisiert werden. Die PTRF spezifischen Markierungen wurden überwiegend an den Caveolen und darüber hinaus in direkter Nähe zu Caveolin-1-Markierungen gefunden. Somit konnte gezeigt werden, dass Caveolin-1 und PTRF kolo-kalisieren und daher durchaus in einem funktionellen Zusammenhang stehen könnten.

4.3 Strukturanalyse der Caveolen-Membran

Trotz zahlreicher Untersuchungen an Caveolen ist der Aufbau der caveolären Hülle immer noch nicht vollständig verstanden und aufgeklärt. Daher bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, die strukturelle Organisation der Caveolen und die Verteilung des Caveolins zu untersuchen. Peters et al. (1985) konnten durch hoch auflösende Rasterelektronenmikroskopie an Kritisch-Punkt getrockneten Plasmamembranen von Endothelzellen filamentöse Strukturen auf der cytoplasmatischen Oberfläche von Caveolen zeigen. Izumi et al. (1988) wiesen gestreifte Strukturen an der cytoplasmatischen Oberfläche von Endothelzellen nach. Auch Rothberg et al. (1992) konnten anhand von Plasmamembran-Replika von Fibroblastenzellen nach Tiefätzung auf der cytoplasmatischen Oberfläche eine für Caveolen charakteristische gestreifte Hülle nachweisen, die aus 10 nm dicken Filamenten besteht und die Caveolen spiralförmig umgibt (siehe auch Abb. 1.2). Diese Filamente sollen aus Caveolin-1 aufgebaut sein (Rothberg et al. 1992). Fernandez et al. (2002) konnten ebenfalls zeigen, dass Caveolin-1 Heptamere bildet und spontan zu 10 nm großen Filamenten assembliert. Andere Autoren wie Westermann et al. (1999, 2005) und Thorn et al. (2003) konnten jedoch keine gestreifte Hülle, die durch Caveolin-Filamente gebildet wird, nachweisen. Westermann et al. (2005) konnten zeigen, dass Caveolin-1 im lateralen Bereich um die Caveolen lokalisiert ist und nicht die gesamte Caveole umgibt. Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche zur Immunogoldmarkierung von 3T3-Mausfibroblastenzellen in Bezug auf Variationen in der Goldkorngröße (siehe Abschnitt 3.1.4) bestätigen diese Befunde. Es konnte in 3D-Rekonstruktionen (Abb. 3.12-3.14) von mit unterschiedlichen Goldpartikelgrößen markiertem Caveolin-1 eindeutig gezeigt werden, dass Caveolin-1 basolateral um die Caveolenstruktur lokalisiert ist. Caveolin-1 Markierungen im apikalen Bereich von tief eingesenkten Caveolen sind die Ausnahme. Auch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von immunmarkierten Replika (Abb. 3.15) zeigen nahezu keine Markierung von Caveolin-1 in apikalen Bereichen der Caveolen. Diese Ergebnisse stellen die Existenz einer durch Caveolin-1 aufgebauten caveolären, gestreiften Hülle, die die cytoplasmatische Caveolen-Oberfläche vollständig bedeckt, in Frage.

Um die Organisation, den strukturellen Aufbau der Caveolen und den Einfluss des Caveolin-1 auf die Strukturbildung genauer zu untersuchen, wurden zunächst caveolinreiche Membrandomänen aus Lungengewebe isoliert und mit Hilfe der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung untersucht. Caveolin-1 wurde immunmarkiert und dessen Lokalisation und die Struktur der

isolierten Vesikel analysiert. Das Ergebnis waren hauptsächlich Membranvesikel unterschiedlicher Größe. Der Durchmesser dieser Vesikel überschritt dabei die für Caveolen charakteristische Größe von 50-100 nm. Es konnten mit der gewählten Isolationsmethode also keine einzelnen strukturell intakten Caveolen isoliert werden. Während der Isolationsmethode kam es aufgrund von mechanischer Beanspruchung wahrscheinlich zur strukturellen Schädigung der gesamten Membran, wobei die Triton-unlöslichen Membrandomänen im Zuge der Isolation mittels Dichte-Gradienten-Zentrifugation miteinander zu größeren Membrankomplexen fusioniert sind (Westermann et al. 1999). Bei den isolierten Vesikeln handelt es sich daher wahrscheinlich um fusionierte Triton-unlösliche Membrandomänen, zu denen auch die Caveolen zählen. Die meisten Goldpartikel finden sich in Bereichen mit geringer Platinschichtdicke, so dass die verminderte strukturelle Widergabe in diesen Bereichen eine Lokalisation von Intramembranpartikeln erschwert. Die Intramembranpartikel in den Bereichen mit guter struktureller Widergabe und starker Platinbedampfung sind dagegen frei von Goldpartikeln. Daher kann nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich bei den Intramembranpartikeln um Caveolin-1-Oligomere handelt. Auch Westermann et al. (1999) konnten keine direkte Lokalisation von Caveolin-1-spezifischer Markierung an Intramembranpartikeln zeigen. Caveolin-1 bildet vermutlich keine deutlichen IMP.

Die Goldpartikel sind häufig in Gruppen angeordnet, was auf eine Konzentration von Caveolin-1 in bestimmten Bereichen der Membran hindeutet, wie es bei den Caveolen der Fall ist. Caveolin-1-markierte Strukturen, die auf die Bildung einer durch Caveolin-1 aufgebauten caveolären Hülle hindeuten, konnten jedoch nicht identifiziert werden. Das Fehlen derartiger Strukturen und die Größe der Membrandomänen könnte darin begründet liegen, dass es während der Isolation der Membranvesikel zu einem strukturellen Schaden gekommen ist. Dennoch besitzen diese Domänen immer noch Caveolin-1-spezifische Markierungen, an denen strukturelle Eigenheiten einer durch Caveolin-1 aufgebauten Hülle erkennbar sein müssten.

Um eine strukturelle Schädigung zu minimieren, wurde versucht, einzelne Caveolen durch Immunpräzipitation zu isolieren. Diese sollten besser geeignet sein, um die caveoläre Hülle zu untersuchen. Die durch Immunpräzipitation isolierten Vesikel (siehe Ergebnisteil 3.4.3) wiesen ebenfalls größere Durchmesser auf, als es für Caveolen charakteristisch ist. Die Vesikel waren zwar kleiner als die zuvor beschriebenen Triton-isolierten caveolinreichen Membrandomänen, hatten aber immer noch einen Durchmesser von 200-300 nm. Daher muss

davon ausgegangen werden, dass es auch mit dieser Methode zu einer strukturellen Schädigung durch die Behandlung mit Ultraschall gekommen ist, wobei einzelne Caveolen anschließend miteinander fusioniert sind. Beide Methoden waren also nicht geeignet, um einzelne, strukturell intakte Caveolen zu isolieren. Dies wird besonders deutlich an der Abb. 3.29.e, in der eine große isolierte Membrandomäne dargestellt wird. Dennoch ließen sich die immunpräzipitierten Vesikel eindeutig mit Caveolin-1-spezifischen Antikörpern markieren. Es sind weitaus mehr Goldpartikel bei diesen isolierten Vesikeln zu finden als bei den zuvor beschriebenen caveolinreichen Membrandomänen. Die große Markierungsdichte von Caveolin-1 ist eventuell durch eine Vernetzung der Caveolin-Proteine aufgrund der Antikörperbehandlung während der Immunpräzipitation zurückzuführen. Diese Goldpartikel sind diffus über die Vesikel-Oberfläche verteilt. An der isolierten großen Membrandomäne (Abb. 29.e) sind darüber hinaus Gruppen von Caveolin-1-spezifischen Markierungen zu finden, die auf flache caveoläre Strukturen hindeuten und mit einem Durchmesser von ungefähr 100 nm mit den Durchmessern von Caveolen übereinstimmen. Aber auch an den immunpräzipitierten Vesikeln sind keine Strukturen erkennbar, weder Partikel noch Filamente, die die caveoläre Hülle, wie sie von Rothberg (1992) gezeigt wurde, darstellen.

Caveolin-1 bildet darüber hinaus *in vivo* hoch molekulare Homo-Oligomere von 350-400 kDa (Monier et al. 1995, Sargiacomo et al. 1995). Jedes dieser Oligomere setzt sich dabei aus 14-15 Caveolin-Monomeren zusammen. Diese hoch molekularen Komplexe mit 14-15 in die Membran inserierenden Haarnadel-ähnlichen Domänen sollten daher nach einem Gefrierbruch als Intramembranpartikel sichtbar sein. Wie zuvor erwähnt konnten an den isolierten caveolinreichen und gefriergebrochenen Membranen zwar Intramembranpartikel lokalisiert werden, diese waren aber nicht mit Caveolin-1-spezifischen Markierungen assoziiert. Da es mit den beiden erwähnten Methoden nicht möglich war, einzelne Caveolen zu isolieren, um die caveoläre Hülle zu analysieren, wurden hoch-molekulare 400 kDa Caveolin-1-Komplexe isoliert. Diese Komplexe zeigten sich im Negativkontrast als partikuläre und filamentöse Strukturen unterschiedlicher Größe, die mit Caveolin-1-spezifischen Antikörpern markiert werden konnten. Diese Strukturen könnten also Caveolin-1-Oligomere darstellen, die sich in unterschiedlichen Größen zusammenlagern. Die hoch-molekularen Caveolin-1-Komplexe wurden anschließend in Rekonstitutionsexperimente eingesetzt. Mit Hilfe der Rekonstitutionsmethode können komplexe Strukturen *in vitro* nachgebaut werden, um Rückschlüsse auf ihre Struktur *in vivo* zu ziehen. Die im Negativkontrast gezeigten Strukturen der Caveolin-1-Komplexe sollten sich nach erfolgreicher Rekonstitution in Liposomen und

anschließender Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung möglicherweise als Strukturen (IMP) zeigen.

Im Abschnitt 3.3.4 sind die Ergebnisse dieser Rekonstitutionsexperimente beschrieben. Es ist gelungen, die Caveolin-1-Komplexe in Liposomen aus extrahierten Leber-Lipiden einzubauen, was anhand der Caveolin-1-spezifischen Markierungen an den Liposomen deutlich wird. Auch bei der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung der rekonstituierten Liposomen wurden unterschiedliche Bedampfungsvarianten gewählt, wobei sich herausstellte, dass auch hier wiederum die C/Pt-bedampften Replika die besten Markierungsraten zeigten. Es konnten sowohl vereinzelte Goldpartikel als auch Gruppen von Caveolin-1-spezifischen Markierungen an den Liposomen lokalisiert werden. Doch auch hier konnten in den Vesikeln keine Intramembranpartikel oder andere Strukturen nachgewiesen werden. Die Gruppen von Goldpartikeln zeigen, dass mehrere Caveolin-1-Proteine, bei denen es sich wahrscheinlich um hoch-molekulare Caveolin-1-Komplexe handelt, in Liposomen eingebaut werden konnten. Die Caveolin-1-spezifischen Markierungen finden sich sowohl auf den konkaven als auch auf den konvexen Spaltflächen. Aufgrund der Rekonstitutionsmethode, bei der Caveolin-1 mit den Lipiden gemischt wurde, konnten sich die Caveolin-1-Proteine aufgrund einer „Anlieferung“ von beiden Seiten in beide Membranhälften gleichermaßen gut einbauen. *In vivo* erfolgt die Anlieferung von Caveolin-1 von der cytoplasmatischen Seite, was eine Lokalisation auf der protoplasmatischen Membranhälfte, welche der konkaven Vesikel-Spaltfläche entsprechen würde, determiniert.

Darüber hinaus wurden Rekonstitutionsexperimente der Caveolin-1-Komplexe in Liposomen aus Dipalmitoyl-L- α -Phosphatidylcholin (L- α -Lecithin, DPPC) durchgeführt. Nach Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung waren hier weniger Caveolin-1-spezifische Markierungen als bei den Liposomen aus Leber-Lipiden nachweisbar. Diese Befunde deuten darauf hin, dass sich die Caveolin-1-Komplexe nicht gut in diese Liposomen einbauen und dass die Lipid-Zusammensetzung hierbei eine entscheidende Rolle spielt. Sowohl die Liposomen aus Leber-Lipiden als auch die aus DPPC hergestellten Liposomen enthielten eine Cholesterol-Konzentration von 15-20 % (w/v). Dabei ist es möglich, dass die isolierten Caveolin-1-Komplexe ebenfalls noch Cholesterol enthielten. Murata et al. (1995) gaben an, dass an den nach der Methode von Monier et al. (1995) isolierten Caveolin-1-Komplexen nach der Aufreinigung noch Cholesterol gebunden war. Da der Cholesterol-Gehalt in beiden Rekonstitutionsansätzen gleich gewählt wurde, ist anzunehmen, dass der unterschiedlich gute

Einbau von Caveolin-1 in die Liposomen von deren Lipid-Zusammensetzung abhängt. Die Leber-Lipide (15-20 % Cholesterol, 22 % Phosphatidylethanolamin, 8 % Phosphatidylinositol, 42 % Phosphatidylcholin, 1 % Lyso Phosphatidylinositol und 21 % andere Lipide inklusive Neutral-Lipide; w/w) bilden *in vitro* wahrscheinlich Liposomen und somit Modellmembranen, die den Membranen *in vivo* näher kommen als Dipalmitoyl-L- α -Phosphatidylcholin. Bei Verwendung eines Lipid-Gemisches ist wahrscheinlich ein besserer Einbau der Caveolin-1-Komplexe gewährleistet als bei Verwendung einer Lipid-Spezies.

Das Fehlen von Strukturen, die auf eine caveoläre Hülle hindeuten, könnte sowohl bei den rekonstituierten Vesikeln als auch bei den isolierten Triton-unlöslichen Membrandomänen nach Gefrierbruch in der Struktur und Membrantopologie von Caveolin-1 begründet sein. Bei Caveolin-1 handelt es sich um ein sogenanntes „Halbmembranprotein“, welches nicht beide Membranhälften durchzieht, sondern mit einer Art Haarnadelstruktur auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran inserieren soll (Kurzchalia et al. 1992). Während des Gefrierbruches verläuft der Bruch überwiegend durch die hydrophoben Bereiche und spaltet die Membran in zwei Hälften. Intramembranpartikel zeichnen sich dann ab, wenn sie die Membran vollständig durchziehen. Da Caveolin-1 wahrscheinlich nur in eine Membranhälfte inseriert, verläuft der Bruch über das Protein hinweg, so dass sich keine Strukturen abzeichnen können. Dieses Bruchverhalten würde somit auch die Membrantopologie von Caveolin-1 als „Halbmembranprotein“ bestätigen. Um Strukturen zu zeigen, die auf eine caveoläre Hülle hindeuten, müssten daher andere Methoden zur Oberflächendarstellung gewählt werden. Man könnte mit Caveolin-1 rekonstituierte Vesikel fixieren und eine Oberflächenbedampfung durchführen. Partikel- oder Filament-Strukturen müssten sich auf diese Weise darstellen lassen.

Neben partikulären oder filamentösen Strukturen hätte man bei mit Caveolin-1 rekonstituierten Liposomen auch die für Caveolen charakteristischen Membran-Invaginationen, wie sie *in vivo* in der Plasmamembran existieren, erwarten können. Derartige Einstülpungen konnten jedoch nicht beobachtet werden. Die Ursache für das Fehlen der charakteristischen Caveolen-Invaginationen besteht wahrscheinlich in der symmetrischen, in beiden Membranhälften gleichen Lipid-Zusammensetzung der Liposomen. Für die Ausbildung der Einstülpungen ist wahrscheinlich eine lokale Anreicherung von Sphingolipiden und Cholesterol in der exoplasmatischen Seite der Membran, wie sie in Rafts vorkommt, essentiell. Eine Cholesterol-Konzentration von 15-20 % allein reichte nicht aus,

um mit den rekonstituierten Caveolin-1-Komplexen diese Einstülpungen nachzubauen. Dafür müsste ein Lipid-Gemisch gewählt werden, welches reich an Sphingolipiden ist, die sich wie es in Rafts üblich ist, auf der der „exoplasmatischen“ entsprechenden Seite der Liposomen anreichern und Raft-ähnliche Membrandomänen ausbilden. Das Fehlen der für Caveolen charakteristischen Einstülpung könnte somit zum einen von der fehlenden Membran-Asymmetrie der Modelmembranen abhängen. Darüber hinaus können andere zelluläre Faktoren, die eine Bildung von caveolären Plasmamembran-Invaginationen bedingen, nicht ausgeschlossen werden.

An den rekonstituierten Vesikeln ist zumindest eine Domänenbildung von Caveolin-1-spezifischen Markierungen zu erkennen. Eine solche Domänenbildung oder Anreicherung von Caveolin-1 in spezifischen Bereichen der Plasmamembran ist ebenfalls an Gefrierbrüchen von 3T3-Mausfibroblasten zu beobachten (Abb. 3.1). Hierbei handelt es sich um flache Caveolen, bei denen die Caveolin-1 spezifischen Markierungen diffus verteilt sind. Nur an tief eingesenkten Caveolen kommt es zu der charakteristischen bandförmigen Anordnung von Caveolin-1, wobei diese Anordnung die Krümmung der Membran stabilisieren könnte und die Raft-Lipide von den übrigen Lipiden der Plasmamembran abgrenzt. Die flachen Caveolen könnten den in den Liposomen vorhandenen flachen caveolären Domänen entsprechen. Sowohl in den flachen Caveolen, die man an Gefrierbrüchen von 3T3-Fibroblasten beobachten kann, als auch die flachen caveolären Domänen in den Liposomen scheinen entscheidende Faktoren für die Ausbildung der Invaginationen zu fehlen. Die Bildung von Caveolen ist daher wahrscheinlich ein hoch regulierter Prozess und kommt nicht alleine durch ein self-assembly von Caveolin-1 und Cholesterol an der Plasmamembran zustande.

Die von Rothberg et al. (1992) postulierte Hülle, die aus 10 nm dicken Filamenten aufgebaut ist, könnte dabei eine Rolle in der Stabilisierung der Caveolen-Struktur spielen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Gefrierbruch-Immunogoldmarkierungen deuten aber nicht darauf hin, dass Caveolin-1 die gesamte Caveole umgibt, sondern nur als Ring oder Band lateral um die Caveole lokalisiert ist. Diese Ergebnisse bestätigen die von Westermann et al. (2005) beobachteten Ergebnisse in Bezug auf das Verteilungsmuster von Caveolin-1 an Plasmamembran-Caveolen. Eine Quantifizierung GFP-markierten Caveolins ergab, dass 144 ± 39 Caveolin-Moleküle pro Caveole inkorporiert werden (Pelkmans et al. 2005). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Caveolin-1 Heptamere bildet und zu 10 nm großen Filamenten assembliert (Fernandez et al. 2002). Diese 144 Moleküle würden somit ein Filament von 200

nm Länge bilden, das eine 50-100 nm große Caveole mit einem Durchmesser von 150-300 nm gerade einmal umspannen würde (Meder and Simons 2006). Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls für eine bandförmige Lokalisation von Caveolin-1 im lateralen Bereich der Caveolen und gegen eine ausschließlich aus Caveolin-1 aufgebaute Hülle um die gesamte Caveole. Daher sind vermutlich andere Proteine an der Ausbildung der caveolären Hülle und an der Stabilisierung der Caveolen-Struktur mit beteiligt.

Mulholland et al. (1994) schlugen ein ultrastrukturelles Modell für das Actin-Cytoskelett der Hefe und deren spiralförmige Assoziation mit Plasmamembran-Einstülpungen vor. Ausgehend von diesem Model könnte die caveoläre Hülle aus 10 nm Actinfibrillen bestehen, die in einer spiralförmigen Anordnung mit dem Cytoskelett verbunden sind. Chang et al. (1994) reinigten caveoläre Fraktionen aus glatten Muskelzellen auf. Diese caveoläre Fraktion enthielt genauso viel Actin wie die Plasmamembran-Fraktion. Rothberg et al. (1992) zeigten, dass die „caveoläre Hülle“ resistent gegen hohe Salzkonzentrationen und hohe pH-Werte ist, weshalb sie davon ausgingen, dass es sich bei der Hüllkomponente nicht um periphere Membranproteine handeln kann. Chang et al. (1992) dagegen zeigten, das Actin nach dem Einsatz von starken Detergenzien und hohen Salzkonzentrationen immer noch an den Caveolen gebunden war. Außerdem konnten die Filament-Strukturen durch den Einsatz von Myosin-Fragmenten dekoriert und verstärkt und durch den Einsatz von Phalloidin stabilisiert werden (Izumi et al. 1988). Das Actin-Cytoskelett soll eine entscheidende Rolle in der Stabilisierung der Caveolen an der Plasmamembran spielen (Stahlhut und van Deurs 2000, Thomson et al. 2002).

Eine Rolle des Actins als Komponente der caveolären Hülle kann nicht ausgeschlossen werden. Die Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung von Actin zeigte allerdings keine eindeutigen Ergebnisse, wobei die Methode wahrscheinlich auch nicht geeignet ist, um die Verteilung des nicht-Membranproteins Actins an den Caveolen zu untersuchen, da SDS die an die Replika assoziierten Proteine ablöst. Hierzu wären Methoden der Oberflächendarstellung der cytoplasmatischen Membranhälfte nötig. Weitere Untersuchungen müssen Aufschluss über die Zusammensetzung der caveolären Hülle und die Rolle von Caveolin-1 und Actin bei der Stabilisierung und Entstehung der Caveolen-Struktur geben. Hierbei ist es entscheidend, eine Darstellung direkt an der cytoplasmatischen Oberfläche der Zellen zu erreichen, wie sie von Rothberg et al. (1992) angewendet wurde.

In unserer Arbeitsgruppe konnte in Zusammenhang mit dieser Arbeit die Methode der SDS-Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung entscheidend weiterentwickelt und optimiert werden. Somit bietet diese neu überarbeitete Methode bessere Möglichkeiten, membrangebundene Komponenten in Zellen im nahezu nativen Zustand zu untersuchen. Besondere Anwendungsmöglichkeiten ergeben sich bei Untersuchungen von Lipid-Raft-Domänen der Plasmamembran, deren Größe und Zusammensetzung mit Hilfe der Lokalisation von Raft-Proteinen durch die Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung dargestellt werden kann. In diesem Zusammenhang könnten eine Vielzahl membrangebundene Komponenten, die bei der Signaltransduktion eine Rolle spielen, lokalisiert werden.

5. Zusammenfassung

Das Wissen über Caveolen und deren Markerprotein Caveolin-1 ist zwar groß; aber dennoch sind in Bezug auf die Struktur der Caveolen, die Verteilung des Caveolins und die Zusammensetzung der caveolären Hülle noch zahlreiche Fragen offen. Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, Daten zur Zusammensetzung der Caveolen, ihrer Struktur und letztendlich zur Lokalisation des Caveolin-1 in der Caveolenmembran zu erhalten.

In dieser Arbeit war die Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung die bevorzugt angewendete Methode. Um die Struktur der Caveolen und die Verteilung des Caveolins mit Hilfe der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung genau untersuchen zu können, war zunächst eine Optimierung dieser Methode essentiell. Es konnte gezeigt werden, dass die Markierungsrate von Caveolin-1 an den Gefrierbruch-Replika entscheidend von der Schichtdicke der aufgedampften Platinschicht beeinflusst wird. Die Markierungsraten von Caveolin-1 konnten durch das Aufdampfen einer dünneren Platinschicht von 1,5 nm Stärke und durch die Variation der Bedampfungsreihenfolge, bei der zuerst die Kohlenstoffschicht und als zweites die Platinschicht aufgedampft wurde, signifikant gesteigert werden. Darüber hinaus spielt wahrscheinlich die Membrantopologie des zu markierenden Proteins eine Rolle für die Effizienz der Immunmarkierung an den Gefrierbruch-Replika. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Transmembranproteine wie zum Beispiel AQP1 im Gegensatz zu dem „Halbmembranprotein“ Caveolin-1 wahrscheinlich aufgrund einer stabileren Haftung an den Replika in ihrer Markierbarkeit weniger von Variationen in der Bedampfung abhängig sind.

Zum ersten Mal wurde versucht, die Struktur von Gefrierbruch-stabilisierten Membranhälften zu zeigen. Es ist gelungen, das an den Replika haftende Material, welches sich als netzwerkartige Struktur zeigte, an Ultradünnschnitten von Caveolin-1-markierten Gefrierbruch-Replika darzustellen. Dieses Netzwerk repräsentiert Membrankomponenten wie Lipide und Proteine, die nach der SDS-Reinigung an den Replika verbleiben.

Durch die Optimierung der Gefrierbruch-Immunogoldmarkierung war es möglich, das Verteilungsmuster des Caveolin-1 an den Caveolen sowie deren Zusammensetzung in Bezug auf einige ausgewählte Proteine aufzuklären. Die Proteine eNOS und PTRF konnten eindeutig

in Caveolen lokalisiert werden, wobei eNOS zusätzlich auch in flachen Membranbereichen gefunden werden konnte. Flotillin-2 konnte nicht in Caveolen, sondern in flachen Rafts der Plasmamembran lokalisiert werden. In Bezug auf Actin waren keine Aussagen möglich.

Mit Hilfe der 3D-Rekonstruktionen von Caveolin-1-immunmarkierten Replika konnte gezeigt werden, dass Caveolin-1 lateral um die Caveole lokalisiert ist. Die apikalen Bereiche der Caveolen enthalten nahezu kein Caveolin-1. Dieses Verteilungsmuster spricht gegen die Annahme, dass Caveolin-1 eine filamentöse Hülle um die gesamte Caveole bildet. Isolierte caveolinreiche, Triton-unlösliche Membrandomänen sowie immunpräzipitierte caveolinreiche Vesikel zeigten keine filamentösen Strukturen, die auf eine ausschließlich aus Caveolin-1 aufgebaute caveoläre Hülle hindeuten.

Darüber hinaus ist es gelungen, Caveolin-1-Komplexe zu isolieren und in Liposomen zu rekonstituieren. Bei diesen Versuchen bildete Caveolin-1 keine Intramembranpartikel. Es konnten keine Strukturen gezeigt werden, die für eine Hüllkomponente charakteristisch sind. Die rekonstituierten Caveolin-1-Komplexe bildeten trotz hoher Cholesterol-Konzentration in den Liposomen keine für Caveolen charakteristischen Invaginationen, was darauf hindeutet, dass noch andere zelluläre Faktoren für die Ausbildung der Caveolen-Struktur notwendig sein könnten.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse tragen dazu bei, das Verteilungsmuster des Caveolin-1 an den Caveolen zu definieren. Somit muss die Modellvorstellung vom strukturellen Aufbau der Caveolen neu überdacht werden.

6. Literaturverzeichnis

- Aboulaich N, Vainonen JP, Stralfors P, Vener AV (2004) Vectorial proteomics reveal targeting, phosphorylation and specific fragmentation of polymerase I and transcript release factor (PTRF) at the surface of caveolae in human adipocytes. *Biochem J* 383: 237-248
- Aboulaich N, Örtegren U, Vener AV, Stralfors P (2006) Association and insulin regulated translocation of hormon-sensitive lipase with PTRF. *Biochem Biophys Res Commun* 350 (3): 657-661
- Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, and Krieger M (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science (Wash DC)* 271:518–520
- Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S (2002) Aquaporin water channels- from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 542: 3-16
- Anderson HA, Chen Y, Norkin LC (1996) Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol Biol Cell* 7: 1825-1834
- Anderson RGW (1998) The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* 1998. 67:199–225
- Andersson-Forsman C, Pinto da Silva P (1988) Fracture-flip: new high-resolution images of cell surfaces after carbon stabilization of freeze-fractured membranes. *J Cell Sci* 90: 531-541
- Aoki T, Nomura R, Fujimoto T (1999) Tyrosine phosphorylation of caveolin-1 in the endothelium. *Exp Cell Res* 253: 629-636
- Arakawa R, Abe-Dohmae S, Asai M, Ito JI, and Yokoyama S (2000) Involvement of caveolin-1 in cholesterol enrichment of high density lipoprotein during its assembly by apolipoprotein and THP-1 cells. *J Lipid Res* 41:1952–1962
- Babitt J, Trigatti B, Rigotti A, Smart EJ, Anderson RGW, Xu S, and Krieger M (1997) Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J Biol Chem* 272:13242–13249
- Bacia K, Schwille P, and Kurzchalia T (2005) Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(9): 3272–3277

- Bickel PE, Scherer PE, Schnitzer JE, Oh P, Lisanti MP, Lodish HF (1997) Flotillin and Epidermal Surface Antigen Define a New Family of Caveolae-associated Integral Membrane Proteins. *J Biol Chem* 272: 13793-13802
- Bist A, Fielding PE, and Fielding CJ (1997) Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10693– 10698
- Branton D (1966) Fracture faces of broken membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 55(5):1048-56
- Branton D (1971) Freeze-etching studies of membrane structure. *Philos Trans R Soc Lond Biol* 261: 133-138
- Brown DA and Rose JK (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68: 533-544
- Brown DA and London E (1998) Function of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 111-136
- Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, Sessa WC (2000) In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med* 6: 1362-1367
- Cameron PL, Ruffin JW, Bollag R, Rasmussen H, Cameron RS (1997) Identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain. *J Neurosci* 17: 9520-9535
- Capozza F, Williams TM, Schubert W, McClain S, Bouzahzah B, Sotgia F and Lisanti MP (2003) Absence of caveolin-1 sensitizes mouse skin to carcinogen-induced epidermal hyperplasia and tumor formation. *Am J Pathol* 162: 2029–2039
- Chang WJ, Ying Y, Rothberg KG, Hooper NM, Turner AJ, Gambliel HA, JD Gunzburg, Mumby SM, Gilman AG, Anderson RGW (1994) Purification and Characterization of Smooth Muscle Cell Caveolae. *J Cell Biol* 126: 127-138
- Cheng A, Schweissinger D, Dawood F, Kumar N, Yeager M (2003) Projection structure of full length connexin 43 by electron cryocrystallography. *Cell Commun Adhes* 10: 187–191
- Cohen AW, Razani B, Wang XB, Combs TP, Williams TM, Scherer PE, Lisanti MP (2003a) Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue. *Am J Physiol Cell Physiol* 285(1):C222-35
- Cohen AW, Park DS, Woodman SE, Williams TM, Chandra M, Shirani J, Pereira de Souza A, Kitsis RN, Russell RG, Weiss LM, Tang B, Jelicks LA, Factor SM, Shtutin V, Tanowitz HB, Lisanti MP (2003b) Caveolin-1 null mice develop cardiac hypertrophy with hyperactivation of p42/ 44 MAP kinase in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol, Cell Physiol* 284: C457-C474

- Colonna C and Podesta EJ (2005) ACTH-induced caveolin-1 tyrosine phosphorylation is related to podosome assembly in Y1 adrenal cells. *Exp Cell Res* 304: 432-442
- Couet J, Sargiacomo M, and Lisanti MP (1997b) Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J Biol Chem* 272:30429–30438
- Damm EM, Pelkmans L, Kartenbeck J, Mezzacasa A, Kurzchalia T, Helenius A (2005) Clathrin- and caveolin- 1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J Cell Biol* 168(3): 477–488
- Danielli JF and Davson H (1935) A contribution to the theory of permeability of thin films. *J Cell Comp Physiol* 5: 495–508
- Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM (1995) Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem* 270 (12): 6838-6842
- Dinchuk JE, Johnson TJA, Rash JE (1987) Postreplication labeling of E-leaflet molecules: membrane immunoglobulins localized in sectioned labeled replicas examined by TEM and HVEM. *J Electron Microsc Tech* 7: 1-16
- Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293: 2449-2452
- Drubin DG, Nelson WJ (1996) Origins of cell polarity. *Cell* 84(3):335-44
- Dupree P, Parton RG, Raposo G, Kurzchalia TV, Simons K (1993) Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J* 12(4): 1597–1605
- Engelman JA, Chu C, Lin A, Jo H, Ikezu T, Okamoto T, Kohtz DS, and Lisanti MP (1998) Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain. *FEBS Lett* 428:205– 211
- Erlandsen SL, Greet Bittermann A, White J, Leith A, Marko M (2001) High-resolution CryoFESEM of individual cell adhesion molecules (CAMs) in the glycocalyx of human platelets: detection of P-selectin (CD62P), GPI-IX complex (CD42A/CD42B alpha,B beta), and integrin GPIIbIIIa (CD41/CD61) by immunogold labeling and stereo imaging. *J Histochem Cytochem* 49:809-19.
- Fernandez I, Ying Y, Albanesi J, Anderson RG (2002) Mechanism of caveolin filament assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(17): 11193–11198
- Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, and Michel T (1996) Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 271: 22810–22814

- Fielding CJ and Fielding PE (1997) Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res* 38:1503–1521
- Fielding CJ, Bist A, and Fielding PE (1999) Intracellular cholesterol transport in synchronized human skin fibroblasts. *Biochemistry* 38:2506–2513
- Fielding PE, Chau P, Liu D, Spencer TA, Fielding CJ (2004) Mechanism of platelet-derived growth factor-dependent caveolin-1 phosphorylation: relationship to sterol binding and the role of serine-80. *Biochemistry* 43: 2578-2586
- Forbes MS, Rennels M, Nelson E (1979) Caveolar systems and sarcoplasmic reticulum in coronary smooth muscle cells. *J Ultrastruct Res* 67: 325-339
- Foti M, Porcheron G, Fournier M, Maeder C, Carpentier JL (2007) The neck of caveolae is a distinct plasma membrane subdomain that concentrates insulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(4):1242-7. Epub 2007
- Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG (1994) Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *J Biol Chem* 269(49): 30745–30748
- Fra AM, Masserini M, Palestini P, Sonnino S, Simons K (1995) A photo-reactive derivative of ganglioside GM1 specifically crosslinks VIP21-caveolin on the cell surface. *FEBS Lett* 375(1–2): 11–14
- Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG (1995) De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(19): 8655–8659
- Frank PG, Pedraza A, Cohen DE, and Lisanti MP (2001) Adenovirus-mediated expression of caveolin-1 in mouse liver increases plasma high-density lipoprotein levels. *Biochemistry* 40:10892–10900
- Frank PG, Marcel YL, Connelly MA, Lublin DM, Franklin V, Williams DL, Lisanti MP (2002) Stabilization of caveolin-1 by cellular cholesterol and scavenger receptor class B type I. *Biochemistry* 41: 11931-11940
- Frick M, Bright NA, Riento K, Bray A, Merrified C, Nichols BJ (2007) Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding. *Curr Biol*;17 (13):1151-1156
- Frost SC, Lane MD (1985) Evidence for the involvement of vicinal sulphydryl groups in insulin-activated hexose transport by 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 260: 2646-2652
- Fujimoto K (1993) Freeze-fracture cytochemistry and fracture-flip cytochemistry. In: Ogawa K, Barka T (eds) *Electron microscopic cytochemistry and immunocytochemistry in biomedicine*. CRC Press, Boca Raton, pp 347-359

- Fujimoto K (1995) Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *J Cell Sci* 108: 3443-3449
- Fujimoto T, Miyawaki A, Mikoshiba K (1995) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae is linked to actin filaments. *J Cell Sci* 108: 7-15
- Fujimoto K, Umeda M, Fujimoto T (1996) Transmembrane phospholipid distribution revealed by freeze-fracture replica labeling. *J Cell Sci* 109, 2453-2460
- Fujimoto K (1997) SDS-digested freeze-fracture labeling electron microscopy to study the two-dimensional distribution of integral membrane proteins and phospholipids on biomembranes: practical procedure, interpretation and application. *Histochem Cell Biol* 107: 87-96
- Fujimoto T, Kogo H, Nomura R, Une T (2000) Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *J Cell Sci* 113: 3509-3517
- Fukami A (1958) On a High Resolution Pre-shadowed Carbon Replica Method and its Direct Stripping Technique. *J Electron Microsc (Tokyo)*; 7: 25-27
- Fulton D Gratton JP and Sessa WC (2001) Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/ calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* 299: 818–824
- Fulton D, Fontana J, Sowa G, Gratton JP, Lin M, Li KX, Michell B, Kemp BE, Rodman D, and Sessa WC (2002) Localization endothelial nitric-oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide in Golgi and plasma membrane defines the existence of two pools of active enzyme. *J Biol Chem* 277: 4277–4284
- Gabella G (1976) Quantitative morphological study of smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli. *Cell Tissue Res* 170:161–186
- Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, and Sessa WC (1996) Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6448–6453
- Gil J (1983) Number and distribution of plasmalemmal vesicles in the lung. *Fed Proc* 42:2414–2418
- Glauert AM and Glauert RH (1958) Araldite as an embedding medium for electron microscopy. *J Biophys Biochem Cytol* 4: 191-194
- Glenney JR Jr. (1989) Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J Biol Chem* 264: 20163–20166
- Gorter E, Grendel F (1925) On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *JEM* 41: 439-443
- Gruijters WTM, Kistler J, Bullivant S, Goodenough DA (1987) Immunolocalization of MP70 in lens fiber 16-17 nm intercellular junctions. *J Cell Biol* 104: 565-572

- Hailstones D, Sleer LS, Parton RG, Stanley KK (1998) Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *J Lipid Res* 39: 369-379
- Halbhuber KJ, Schulze M, Rhode H, Bublitz R, Feuerstein H, Walter M, Linss W, Meyer HW, Horn A (1994) Is the brush border membrane of the intestinal mucosa a generator of "chymosomes" *Cell Mol Biol* 40 (8): 1077-1096
- Hall CE (1950) A low temperature replica method for electron microscopy. *J Appl Phys* 21: 61-67
- Heino S, Lusa S, Somerharju P, Ehnholm C, Olkkonen VM, and Ikonen E (2000) Dissecting the role of the golgi complex and lipid rafts in biosynthetic transport of cholesterol to the cell surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8375–8380
- Hnasko R, Lisanti MP (2003) The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease. *Mol Interv* 3 (8): 445-464
- Holthuis JC, TP Levine (2005) Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(3): 209–220
- Hua H, Munk S, Whiteside CI (2003) Endothelin-1 activates mesangial cell ERK1/2 via EGF-receptor transactivation and caveolin-1 interaction. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F303-F312
- Ipsen JH, Karlstrom G, Mouritsen OG, Wennerstrom H, Zuckermann MJ (1987) Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim Biophys Acta*, 905(1):162-72
- Izumi T, Shibata Y, Yamamoto T (1988) Striped structures on the cytoplasmic surface membranes of the endothelial vesicles of the rat aorta revealed by quick-freeze, deep-etching replicas. *Anat Rec*, 220(3):225-32
- Jansa P, Mason SW, Hoffmann-Rohrer U, Grummt I (1998) Cloning and functional characterization of PTRF, a novel protein which induces dissociation of paused ternary transcription complexes. *EMBO J* 17(10):2855-64
- Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, Rothblat GH, Swaney JB, and Tall AR (1997) Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* 272:20982–20985
- John M, Schmitz RP, Westermann M, Richter W, Diekert G (2006) Growth substrate dependent localization of tetrachloroethene reductive dehalogenase in *Sulfurospirillum multivorans*. *Arch Microbiol* 186: 99-106
- Johnson RG, Meyer RA (1993) Gap junction assembly: the external domains in the connexin fulfill an essential function. In: Hall JE, Zampighi GA, Davis RM (eds) *Gap junctions*. Progress in cell research, vol 3. Elsevier, New York, pp 283-289

- Kenworthy AK, Nichols BJ, Remmert CL, Hendrix GM, Kumar M, Zimmerberg J, Lippincott-Schwartz J (2004) Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *J Cell Biol* 165: 735-746
- Kim YN, Wiepz GJ, Guadarrama AG, Bertics PJ (2000) Epidermal growth factor-stimulated tyrosine phosphorylation of caveolin-1. Enhanced caveolin-1 tyrosine phosphorylation following aberrant epidermal growth factor receptor status. *J Biol Chem* 275: 7481-7491
- Kirkham M, Fujita A, Chadda R, Nixon SJ, Kurzchalia TV, Sharma DK, Pagano RE, Hancock JF, Mayor S, Parton RG (2005) Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *J Cell Biol* 168(3): 465–476
- Kone BC (2000) Protein-protein interactions controlling nitric oxide synthases. *Acta Physiol Scand* 168: 27–31
- Kurzchalia TV, Dupree P, Parton RG, Kellner R, Virta H, Lehnert M, Simons K (1992) VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J Cell Biol* 118(5): 1003–1014
- Kurzchalia TV, Parton RG (1999) Membrane Microdomains and caveolae. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 424-431
- Labrecque L, Royal I, Surprenant DS, Patterson C, Gingras D, Béliveau R (2003) Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Mol Biol Cell* 14: 334-337
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259) :680-5
- Lang DM, Lommel S, Jung M, Ankerhold R, Petrausch B, Laessing U, Wiechers MF, Plattner H and Stuermer CAO. (1998) Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasma membrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. *J Neurobiol.* 37, 502–523
- Langhorst MF, Reuter A, Stuermer CA (2005) Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cell Mol Life Sci* 62, 2228–2240
- Lay SLL and Kurzchalia TV (2005) Getting rid of caveolins: phenotypes of caveolin-deficient animals. *Biochim Biophys Acta* 1746: 322-333
- Layne E (1955) Spectrometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Meth. In Enzym* 1: 447-454
- Lee H, Volonte D, Galbiati F, Iyengar P, Lublin DM, Bregman DB, Wilson MT, Campos-Gonzalez R, Bouzahzah B, Pestell RG, Scherer PE, Lisanti MP (2000) Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr14) in vivo : identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Mol Endocrinol* 14: 1750-1775

- Li S, Okamoto T, Chun M, Sargiacomo M, Casanova JE, Hansen SH, Nishimoto I, and Lisanti MP (1995) Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J Biol Chem* 270:15693–15701
- Li S, Song KS, Lisanti MP (1996) Expression and characterization of recombinant caveolin. Purification by polyhistidine tagging and cholesterol-dependent incorporation into defined lipid membranes. *J Biol Chem* 271 (1): 568-573
- Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M (1994) Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* 126 (1): 111-126
- Liscovitch M, Burgermeister E, Jain N, Ravid D, Shatz M and L Tencer (2005) Caveolin and cancer: a complex relationship. In: *Membrane Microdomain Signaling: Lipid Rafts in Biology and Medicine*, M.P. Mattson (Ed.), Humana Press, Totowa, New Jersey, 161-190.
- Liu J, Wang XB, Park DS, Lisanti MP (2002) Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation. *J Biol Chem* 277 : 10661-10668
- Luetterforst R, Stang E, Zorzi N, Carozzi A, Way M, Parton RG (1999) Molecular characterization of caveolin association with the Golgi complex: identification of a cis-Golgi targeting domain in the caveolin molecule. *J Cell Biol* 145(7): 1443–1459
- Machleidt T, Li WP, Liu P, Anderson RG (2000) Multiple domains in caveolin-1 control its intracellular traffic. *J Cell Biol* 148(1): 17–28
- Mastick C, Brady MJ, Saltiel AR (1995) Insulin stimulates phosphorylation of caveolin. *J Cell Biol* 129: 1523-1531
- Meder D and Simons K (2006) In Fielding CJ (Ed) *Lipid rafts and caveolae*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp 1-23
- Meyer HW, Winkelmann H (1972) Über die Anordnungen der Membranproteine nach Untersuchungen mit der Gefrierätzung an isolierten Erythrozytenmembranen. *Protoplasma* 75: 255-284
- Michel T and Feron O (1997) Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 100: 2146–2152,
- Mitchison TJ, Cramer LP (1996) Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84(3):371-9
- Mobley BA and Eisenberg BR (1975) Sizes of components in frog skeletal muscle measured by methods of stereology. *J Gen Physiol* 66:31–45
- Moncada S and Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002–2012

- Monier S, Parton RG, Vogel F, Behlke J, Henske A, Kurzchalia TV (1995) VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* 6(7): 911–927
- Monier S, Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM, Kurzchalia TV (1996) Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. *FEBS Lett* 388 (2-3): 143-149
- Montesano R, Roth J, Robert A, Orci L (1982) Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature (Lond)* 296: 651-653
- Moor H, Müllethaler K, Waldner H, Frey-Wyssling A (1961) A new freezing-ultramicrotome. *J Biophys Biochem Cytol* 10:1-13
- Morrow IC, Parton RG (2005) Flotillins and the PHB domain protein family: rafts, worms and anaesthetics. *Traffic* 6, 725–740
- Mulholland J, Preuss D, Moon A, Wong A, Drubin D, Botstein D (1994) Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. *J Cell Biol* 125(2): 381-91
- Müller M, Meister N, Morr H (1980) Freezing in a propane jet and its application in freeze-fracturing. *Mikroskopie* 36: 129-140
- Mundy D, Machleidt T, Ying Y, Anderson RGW, Bloom GS (2002) Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 115; 4327-4339
- Murata M, Peränen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(22): 10339–10343
- Napolitano LM (1963) The differentiation of white adipose cells. An electron microscope study. *J Cell Biol* 18:663–679
- Navakauskiene R, Treigyte G, Gineitis A, Magnusson KE (2004) Identification of apoptotic tyrosine-phosphorylated proteins after etoposide or retinoic acid treatment. *Proteomics* 4: 1029-1041
- Nermut MV (1972) Negative staining of viruses. *J Microsc* 96: 351-362
- Neumann-Giessen C, Falkenbach B, Beicht P, Claasen S, Lüers G, Stuermer CAO, Herzog V, Tikkanen R (2004). Membrane and Raft Association of Reggie-1/Flotillin-2: Role of Myristoylation, Palmitoylation and Oligomerization. Induction of Filopodia by Overexpression. *Biochem J* 378:509-18
- Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, and Lisanti MP (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing “pre-assembled signaling complexes” at the plasma membrane. *J Biol Chem* 273:5419–5422

- Palade GE (1953) Fine structure of blood capillaries. *J Appl Physiol* 24: 1424
- Parton RG, Joggerst B and Simons K (1994) Regulated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 127(5): 1199–1215
- Parton RG, Way M, Zorzi N, Stang E (1997) Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J Cell Biol* 136: 137-154
- Pelkmans L, Kartenbeck J and Helenius A (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* 3(5): 473–483
- Pelkmans L, Puntener D, Helenius A (2002a) Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* 296: 535-539
- Pelkmans, L. & Helenius (2002b) A. Endocytosis via caveolae. *Traffic* 3, 311–320
- Pelkmans L, Bürli T, Zerial M, Helenius A (2004) Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* 118(6): 767–780.
- Pelkmans L and M Zerial (2005) Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature* 436(7047): 128–133
- Peters KR, Carley WW and Palade GE (1985) Endothelial plasmalemmal vesicles have a characteristic striped bipolar surface structure. *J Cell Biol*; 110(6): 2233–2238.
- Peters PJ, Mironov A, Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, DeArmond SJ, Burton DR, Williamson RA, Vey M, Prusiner SB (2003) Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol* 162: 703-717
- Pinto da Silva P, Branton D (1970) Membrane splitting in freeze-etching. Covalently labelled ferritin as a membrane marker. *J Cell Biol* 45: 598-605
- Pinto da Silva P (1984) Freeze-fracture cytochemistry. In : Polak JM, Varndell IM (eds) *Immunolabelling for electron microscopy*. Elsevier, New York, pp 179-188
- Pinto da Silva P, Kan FW (1984) Label-fracture: a method for high resolution labeling of cell surfaces. *J Cell Biol* 99: 1156-1161
- Pinto da Silva P (1987) Molecular cytochemistry on freeze-fractured cells: freeze-etching, fracture-label, fracture-permeation, and label-fracture. In: Miller KR (ed) *Advances in cell biology*, vol 1. Jai Press, Greenwich, pp 157-190
- Plattner H, Hentschel J (1997) *Taschenlehrbuch Zellbiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Predescu D, Horvat R, Predescu S, Palade GE (1994) Transcytosis in the continuous endothelium of the myocardial microvasculature is inhibited by N-ethylmaleimide. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3014-3018
- Predescu D, Predescu S, McQuistan T, and Palade GE (1998) Transcytosis of α_1 -acidic glycoprotein in the continuous microvascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(11): 6175–6180

- Predescu SA, Predescu DN, Palade GE (2001) Endothelial transcytosis machinery involves supramolecular protein-lipid complexes. *Mol Biol Cell* 12: 1029-1033
- Radel C and Rizzo V (2005) Integrin mechanotransduction stimulates caveolin-1 phosphorylation and recruitment of Csk to mediate action reorganization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H936-H945
- Rajendran L, Le Lay S, Illges H (2007) Raft association and lipid droplet targeting of flotillins are independent of caveolin. *Biol Chem*; 388(3):307-314
- Rash JE, Johnson TJA, Dinchuk JE, Duch DS, Levonson SR (1990) Labeling intramembrane particles in freeze-fracture replicas. In: Hui SW (ed) *Freeze-fracture studies of membranes*. CRC Press, Boca Raton, pp 41-59
- Rash JE, Yasumura T (1999) Direct immunogold labeling of connexins and aquaporin-4 in freeze-fracture replicas of liver, brain, and spinal cord: factors limiting quantitative analysis. *Cell Tissue Res* 296(2): 307-21
- Razani B, Schlegel A, Liu J, Lisanti MP (2001a) Caveolin-1, a putative tumour suppressor gene. *Biochem Soc Trans* 29: 494-499
- Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, Macaluso F, Russell R.G., Li M, Pestell, RG, Di Vizio D, Hou H, Jr., Kneitz B, Lagaud G, Christ GJ, Edelmann W and Lisanti MP (2001b) Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* 276: 38121–38138
- Razani B, Woodman SE, Lisanti MP (2002a) Caveolae: From cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 54 (3): 431-467
- Razani B, Combs TP, Wang XB, Frank PG, Park DS, Russell RG, Li M, Tang B, Jelicks LA, Scherer PE, and Lisanti MP (2002b) Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J Biol Chem* 277:8635–8647
- Rechsteiner, M. and Rogers, S. W. (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21: 267–271
- Resh MD (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1451, 1-16
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208-212
- Rietveld A, Neutz S, Simons K & Eaton A (1999) Association of sterol- and glycosylphosphatidyinositol-linked proteins with *Drosophila* raft lipid microdomains. *J. Biol. Chem.* 274, 12049-12054

- Robenek MJ, Schlattmann K, Plenz G, Zimmer KP, Troyer D, Robenek H (2003) Cholesterol transporter caveolin-1 transits the lipid bilayer during intracellular cycling. *FASEB J* 17: 1940-1942
- Robenek MJ, Severs NJ, Schlattmann K, Plenz G, Zimmer KP, Troyer D, Robenek H (2004) Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. *FASEB J* 18: 866-868
- Robertson JD (1967) Origin of the unit membrane concept. *Protoplasma* 63(1):218-45
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WG, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68(4): 673-682
- Sargiacomo M, Sudol M, Tang ZL, Lisanti P (1993) Signal transducing molecules and GPI-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol* 122: 789-807
- Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z, Kübler E, Song KS, Sanders MC, Lisanti MP (1995) Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9407-9411
- Scherer PE, Lisanti MP, Baldini G, Sargiacoma M, Corley-Mastick C, Lodish HF (1994) Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *J Cell Biol* 127: 1233-1243
- Scherer PE, Tang Z-L, Chun MC, Sargiacomo M, Lodish HF, Lisanti MP (1995) Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J Biol Chem* 270(27): 16395-16401
- Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP (1996) Identification, sequence and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 131-135
- Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelmann JA, Galbiati F, Couet J, Kohtz DS, van Donselaar E, Peters P, Lisanti MP (1997) Cell-type and tissuespecific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex *in vivo*. *J Biol Chem* 272(46): 29337-29346
- Schlegel A, Schwab RB, Scherer PE, Lisanti MP (1999) A role for the caveolin scaffolding domain in mediating the membrane attachment of caveolin-1. The caveolin scaffolding domain is both necessary and sufficient for membrane binding *in vitro*. *J Biol Chem* 274 (32): 22660-22667
- Schlegel A, Lisanti MP (2000) A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. Two separate regions of the caveolin-1 C-terminal domain mediate

- membrane binding and oligomer/oligomer interactions in vivo. *J Biol Chem* 275 (28): 21605-21617
- Schlörmann W, John M, Steiniger F, Westermann M, Richter W (2007) Improved antigen retrieval in freeze-fracture cytochemistry by evaporation of carbon as first replication layer. *Histochem Cell Biol* 127 (6): 633-639
- Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J (1994) Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: Reduced transcytosis, scavenger endocytosis and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* 127: 1217-1232
- Schnitzer JE, Allard J, Oh P (1995a) NEM inhibits transcytosis, endocytosis and capillary permeability: implication of caveolae fusion in endothelia. *Am J Physiol* 268: H48-H55
- Schnitzer JE, Lu J, Oh P (1995b) Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins and GTPases. *J Biol Chem* 270: 14399-14404
- Schnitzer JE, Oh P, McIntosh DP (1996) Role of GTP hydrolysis in fission of caveolae directly from plasma membranes. *Science (Wash DC)* 274: 239-242
- Schnitzer JE (2001) Caveolae: from basic trafficking mechanisms to targeting transcytosis for tissue-specific drug and gene delivery in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* 49(3):265-80
- Schroeder R, London E & Brown D (1994) Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 12130-12134
- Severs NJ (1995) Freeze-fracture cytochemistry: an explanatory survey of methods. In: Severs NJ, Shotton MD (eds) *Rapid freezing, freeze-fracture and deep etching*. Wiley-Liss, New York, pp 173-208
- Sherameti I, Shahollari B, Landsberger M, Westermann M, Cherepneva G, Kusnetsov V, Oelmüller R (2004) Cytokinin stimulates polyribosome loading of nuclear-encoded mRNAs for the plastid ATP synthase in etioplasts of *Lupinus luteus*: the complex accumulates in the inner envelope membrane with the CF1 moiety located towards the stromal space. *Plant J* 38:578-593
- Simionescu N, Simionescu M, Palade GE (1975) Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides: Evidence for the existence of patent transendothelial channels. *J Cell Biol* 64: 586-607
- Simons K & van Meer G (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27, 6197-6202
- Simons K & Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572
- Simons K and Ikonen E (2000) How cells handle cholesterol. *Science (Wash DC)* 290:1721-1726

- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1 (1): 31-39
- Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 75: 720-731
- Smart E, Ying Y-S, Conrad P, and Anderson RGW (1994) Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J Cell Biol* 27:1185–1197
- Smart EJ, Ying Y-S, Donzell WC, and Anderson RGW (1996) A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* 271:29427–29435
- Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, and Lisanti MP (1999) Caveolins, liquid-ordered domains and signal transduction. *Mol Cell Biol* 19:7289–7304
- Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz DS, Lisanti MP (1996a) Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem* 271 (25): 15160-15165
- Song KS, Li S, Okamoto T, Quilliam L, Sargiacomo M, and Lisanti MP (1996b) Copurification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent free purification of caveolae membranes. *J Biol Chem* 271:9690–9697
- Souto RP, Vallega G, Wharton J, Vinten J, Trantum-Jensen J, Pilch PF (2003) Immunopurification and characterization of rat adipocyte caveolae suggest their disassociation from insulin signaling. *J Biol Chem* 278: 18321-18329
- Stahlhut M, van Deurs B (2000) Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 11(1):325-37
- Stang E, Kartenbeck J, Parton RG (1997) Major histocompatibility complex class I molecules mediate association of SV40 with caveolae. *Mol Biol Cell* 8: 47-57
- Stuermer CA, Lang DM, Kirsch F, Wiechers M, Deininger SO, Plattner H (2001) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and fyn kinase assemble in noncaveolar plasma membrane microdomains defined by reggie-1 and -2. *Mol Biol Cell* 235: 86-97
- Takayama I, Terada N, Baba T, Ueda H, Kato Y, Fujii Y, Ohno S (1999) “In vivo cryotechnique” in combination with replica immunoelectron microscopy for caveolin in smooth muscle cells. *Histochem Cell Biol* 112 : 443-445
- Takizawa T, Saito T (1996) Freeze-fracture enzyme cytochemistry: application of enzyme cytochemistry to freeze-fracture cytochemistry. *J Electron Microsc (Tokyo)* 45: 242-246

- Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP (1996) Molecular cloning of caveolin- 3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 271(4): 2255–2261
- Thiele C, Hannah MJ, Fahrenholz F, and Huttner WB (2000) Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol* 2:42–49
- Thomsen P, Roepstorff K, Stalhut M, van Deurs B (2002) Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol Biol Cell*; 13:238–250
- Thorn H, Stenkula KG, Karlsson M, Ortegren U, Nystrom FH, Gustavsson J, Stralfors P (2003) Cell surface orifices of caveolae and localization of caveolin to the necks of caveolae in adipocytes. *Mol Biol Cell* 14(10): 3967-3976
- Torris MR, Mancini P (1996) Freeze-fracture immunogold labeling. *Histochem Cell Biol* 106: 19-30
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 24:145-9
- Uittenbogaard A, Ying Y, and Smart EJ (1998) Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex: involvement in cholesterol trafficking. *J Biol Chem* 273:6525–6532
- Uittenbogaard A and Smart EJ (2000) Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation and rapid transport of cholesterol to caveolae. *J Biol Chem* 275:25595–25599
- Urbani L and Simoni RD (1990) Cholesterol and vesicular stomatitis virus G protein take separate routes from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *J Biol Chem* 265:1919–1923
- Vinten J, Voldstedlund M, Clausen H, Christiansen K, Carlsen J, Trantum-Jensen J (2001) A 60-kDa protein abundant in adipocyte caveolae. *Cell Tissue Res* 305: 99-106
- Vinten J, Johnsen AH, Roepstorff P, Harpøth J, Trantum-Jensen J (2005) Identification of a major protein on the cytosolic face of caveolae. *Biochim Biophys Acta* 1717: 34-40
- Volonte D, Galbiati F, Li S, Nishiyama K, Okamoto T, Lisanti MP (1999) Foltillins/Cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a hetero-oligomeric complex with caveolins *in vivo*. *J Biol Chem* 274: 12702-12709
- Volonte D, Galbiati F, Pestell RG, Lisanti MP (2001) Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr14) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress. *J Biol Chem* 276: 8094-8103

- Way M, Parton RG (1995) M-caveolin, a muscle specific caveolin-related protein. *FEBS Lett* 376 (1-2): 108-112
- Westermann M, Leutbecher H, Meyer HW (1999) Membrane structure of caveolae and isolated caveolin-rich vesicles. *Histochem Cell Biol* 111: 71-81
- Westermann M, Steiniger F, Richter W (2005) Belt-like localisation of caveolin in deep caveolae and its redistribution after cholesterol depletion. *Histochem Cell Biol* 123: 613-620
- Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W, Crowther RA (1988) Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4884-4888
- Yamada E (1955) The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1(5): 445– 458
- Yamamoto M, Toya Y, Schwencke C, Lisanti MP, Myers M, and Ishikawa Y (1998) Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J Biol Chem* 273:26962– 26968
- Zachowski A (1993) Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J.* 294, 1-14
- Zhao YY, Liu Y, Stan RV, Fan L, Gu Y, Dalton N, Chu PH, Peterson K, Ross J, Chien KR (2002) Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11375-11380

7.1 Chemikalienliste

Acrylamid, Serva, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland
Actin goat IgG, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
AGFA Multikontrast Premium, Hans O. Mahn & Co. KG, Stapelfeld, Deutschland
Ammoniumpersulfat, Serva, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland
AQP1 rabbit IgG, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Araldid, Agar Scientific Ltd., Essex, England
Argon, Linde AG Geschäftsbereich Linde Gas, Leuna, Deutschland
Benzyltrimethylamin, Agar Scientific Ltd., Essex, England
Bisacrylamid, Serva, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland
Bio-Beads SM-2, Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Bromphenolblau, Serva, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland
BSA, Albumin Fraction V, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Cav-1 N-20 polyclonal rabbit IgG, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Ceriumchlorid, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Cholesterol, Serva, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland
CO₂, Linde AG Geschäftsbereich Linde Gas, Leuna, Deutschland
Dexamethason, Serva, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol, DTT, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DMEM, Biochrom AG, Berlin, Deutschland
DMSO, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EDTA, Serva, Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidelberg, Deutschland
eNOS-1 mouse IgG, BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Entwickler MH28, Calbe Fotochemie GmbH, Calbe, Deutschland
Essigsäure, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Ethan, Linde AG Geschäftsbereich Linde Gas, Leuna, Deutschland
Ethanol, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Filterpapier, Protran Nitrocellulose Transfer Membrane, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
Fixierer A300, Calbe Fotochemie GmbH, Calbe, Deutschland

FKS, Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Flot-2 mouse IgG, BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Formaldehyd, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Gelatine, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Glutaraldehyd, Serva, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland
Glutaraldehyd, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Glycerin, Ferak Laborat GmbH, Berlin, Deutschland
Glycin, Serva, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland
goat anti-mouse IgG 10 nm Gold, British Biocell International, Cardiff, UK
goat anti-mouse IgG 20 nm Gold, British Biocell International, Cardiff, UK
goat anti-rabbit IgG 10 nm Gold, British Biocell International, Cardiff, UK
goat anti-rabbit IgG 20 nm Gold, British Biocell International, Cardiff, UK
goat anti-rabbit IgG, F(ab')₂-AP, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
goat anti-mouse IgG HRP Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
goat anti-rabbit IgG HRP, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
GTP, Guanosin-5'-triphosphate disodium salt, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
HCl, Merck, Darmstadt, Deutschland
IBMX, Serva, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland
Insulin, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
KCl, Kaliumchlorid, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kohlenstoff, BAL-TEC, Liechtenstein
Liver Total Lipid Extract, Bovine, Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, Alabama USA
Luminol, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid, MgCl₂, Merck, Darmstadt, Deutschland
MES, Serva, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland
Mercaptoethanol, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Methanol, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Milchpulver, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Cacodylat, Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid, NaCl, Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid, NaOH, Merck, Darmstadt, Deutschland
NIH-L1/ 3T3-Mausfibroblasten, National Institute of Health, Maryland, USA

Octyl-beta-D-glucopyranoside, Serva, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland

Osmiumtetroxid, Merck, Darmstadt, Deutschland

para-Hydroxycoumarinsäure, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

p-Nitrophenylphosphat, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Platin, BAL-TEC, Liechtenstein

PMSF, Serva, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland

Ponceau S, Serva, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland

Propan, Linde AG Geschäftsbereich Linde Gas, Leuna, Deutschland

Propylenoxid, Merck, Darmstadt, Deutschland

Protran Nitrocellulose Transfer Membrane, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland

Proteasehemmer, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Protein A/G Plus-Agarose, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland

PTRF mouse IgG, BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

rabbit anti-goat IgG HRP, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland

rabbit anti-goat IgG 10 nm Gold, British Biocell International, Cardiff, UK

Rinderlunge, Schlachthof Jena

RPMI, Biochrom AG, Berlin, Deutschland

SDS, Serva, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland

Stickstoff, Linde AG Geschäftsbereich Linde Gas, Leuna, Deutschland

Sucrose, Merck, Darmstadt, Deutschland

TEMED, Serva, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland

Tricin, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Tris, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Triton-X-100, Ferak Laborat GmbH, Berlin, Deutschland

Triton X-114, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

Tween-20, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

Uranylacetat, Merck, Darmstadt, Deutschland

Uranylacetat, Plano W Plannet GmbH, Wetzlar, Deutschland

Wasserstoffperoxid, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Wistar-Ratte, bezogen von OA Dr. med. Lemke, Anatomie I, FSU Jena

7.2 Geräteliste

Amicon-Zentrifugenfilter, Amicon Ultra, Millipore, Millipore Corporation, Billerica, USA

Bandelin Sonorex Super RK 103H, Ultraschallbad, Schalltec GmbH, Mörfelden-Walldorf

BAF400T, Gefrierbruch-Anlage, BAL-TEC, Liechtenstein

Beckman Coulter Optima XL-100K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

Beckman Avanti J-30I Kühlzentrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

Beckman 41 Ti Rotor, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

Beckman 50.2 Ti Rotor, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

Beckman JA-10 Rotor, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

Beglimmungskopf ohne Sputter-Target, BAL-TEC, Liechtenstein

Biofuge stratos, Heraeus Instruments, Kendro Laboratory products, Langenselbold, Deutschland

Centaurus BSE-Detektor, K.E. Developments Ltd., Cambridge, United Kingdom

CM 120, TEM, Philips/ Fei, Eindhoven, Niederlande

Critical Point Dryer CDP 030, BAL-TEC, Liechtenstein

Digitalkamera, Fast Scan-F114 1K, TVIPS GmbH, Gauting, Deutschland

Elektronenstrahlverdampfer-Einrichtung EVM 030, BAL-TEC, Liechtenstein

EM 900, TEM, Zeiss, Oberkochen, Deutschland

EM 902 A, TEM, Zeiss, Oberkochen, Deutschland

EM-Menu 4, Software Digitalkamera, Gauting, Deutschland

Fast Blot B31, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland

Gemini LEO 1530, Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK

IMOD-Software, Boulder Laboratory for 3D-Electron Microscopy of Cells and Reagents of the University of Colorado, Colorado, USA

Kupfernetzchen, 300 Maschen (mesh), SCI Science Services, München, Deutschland

Kupferträger, BAL-TEC, Liechtenstein

LeitC-Klebefolie, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland

LKB 8800A Ultratome III, LKB Produkter AB, Bromma, Schweden

MACO EM-Film EMS, Hans O. Mahn & Co. KG, Stapelfeld, Deutschland

Röntgenkassette, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Schichtdickenmessgerät QSG 060, BAL-TEC, Liechtenstein

Sputter Coater SCD 005, BAL-TEC, Liechtenstein

Sputterkopf mit Goldtarget, BAL-TEC, Liechtenstein

UV-1202, UV-VIS-Spektrometer, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland

Zentrifugenröhrchen, Beckman Instruments Inc., Spinco Division, Palo Alto, CA, USA

9. Verzeichnis der eigenen wissenschaftlichen Publikationen

Veröffentlichte Kurzfassungen von Tagungsbeiträgen:

Schlörmann W., Müller G., Krumbein W. E., Rhiel E. „Pigmentreconstitution of light-harvesting proteins of the centric diatom *Cyclotella cryptica* overexpressed in *E. coli*“ (2002), Botanikertagung 2002, 22.09.02-27.09.02, Freiburg i. Br., Abstracts, p.79

Schlörmann W., Steiniger F., Richter W., Westermann M. (2005) Improvement opportunities for freeze-fracture labeling efficiency. Dreiländertagung für Elektronenmikroskopie 23.08.05 – 3.09.05, Davos, Schweiz, Abstracts (149)

Steiniger F., Schlörmann W., Westermann M., Richter W. (2005) 3D-reconstruction of immuno-labeled freeze-fracture replicas by electron tomography. Dreiländertagung für Elektronenmikroskopie 23.08.05 – 3.09.05, Davos, Schweiz, Abstracts (152)

Schlörmann W., Steiniger F., Richter W., Westermann M. (2007) Structure of immunolabeled freeze-fracture replica-bound membrane halves. *Microsc. Microanal.* Vol. 13 Suppl. 3 (182)

Wissenschaftliche Originalarbeiten:

Brakemann T., Schlörmann W., Marquard J., Nolte M., Rhiel E. (2006) Association of fucoxanthin chlorophyll a/c-binding polypeptides with photosystems and phosphorylation in the centric diatom *Cyclotella cryptica*. *Protist.* 157 (4): 463-575

Westermann M., Pop O.I., Gerlach R., Appel T.R., Schlörmann W., Schreiber S., Müller J.P. (2006) The TatAd component of the *Bacillus subtilis* twin-arginine protein transport system forms homo-multimeric complexes in its cytosolic and membrane embedded localisation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758 (4): 443-451

Schlörmann W., John M., Steiniger F., Westermann M., Richter W. (2007) Improved antigen retrieval in freeze-fracture cytochemistry by evaporation of carbon as first replication layer. *Histochem. Cell. Biol.*, 127 (6): 633-639

10. Danksagung

Ganz herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. med. habil. Halbhuber, Herrn PD. Dr. habil. Agricola, Herrn Dr. Richter und Herrn PD Dr. habil. Martin Westermann, die es mir ermöglicht haben, im Elektronenmikroskopischen Zentrum am Klinikum der Friedrich-Schiller Universität Jena meine Promotion anzufertigen und mir zu diesem Zweck einen Laborplatz, Arbeitsmittel und Laborgeräte zu Verfügung gestellt haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. habil. Martin Westermann für seine intensive Betreuung meiner Promotion und für seine tatkräftige Unterstützung.

Darüber hinaus bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Richter dafür, dass er mir bei den vielseitigsten Fragestellungen unterstützend zur Seite stand.

Bei Herrn Dipl. Ing. Frank Steiniger möchte ich mich für seine Hilfe und Unterstützung in allen technischen Dingen, seien es nicht funktionierende CCD-Kameras, Computer oder durchgebrannte Kathoden, sowie für die Anfertigung der 3D-Rekonstruktionen und für die gute Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Dr. Sandor Nietzsche, der mich in physikalischen und mathematisch-statistischen Fragestellungen beraten hat.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dipl. Ing. Renate Kaiser sowie auch bei Frau Susanne Linde für die unzähligen Gefrierbrüche und für die Hilfe bei diversen Präparationsmethoden bedanken.

Vielen Dank möchte ich auch den beiden ehemaligen Photo-Damen Gerlinde Engelhardt und Gisela Vöckler für die Photoarbeiten, sowie Inge-Marie Herrmann für ihre humorvolle Art und Hilfe in allen Lebenslagen sagen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Christine Kämnitz dafür, dass sie mich so herzlich in ihrem Labor aufgenommen hat und mir immer mit Rat und Tat, nicht nur in Laborangelegenheiten, zur Seite stand.

Darüber hinaus bedanke ich mich auch bei Herrn Dr. Roland Kaufmann für das Korrekturlesen dieser Arbeit und den beiden MTA Elke Oswald und Beate Schulze aus der Allgemeinen und Viszeralen Chirurgie im Forschungszentrum Lobeda dafür, dass ich meine Zellkulturarbeiten bei ihnen machen durfte und sie mich dabei immer mit ihrer offenen und herzlichen Art unterstützt haben.

Mein spezieller Dank gilt allen meinen Freunden, in besonderem Maße Insa Baumfalk, Ina Goldenstein, Inga Hummelsiep und Enno Wrage-Brors für deren unermüdliche Aufmunterung und Interesse an meiner Arbeit.

Meiner Familie, vor allem meinen Geschwistern, Nichten und Neffen und allen anderen Familienmitgliedern danke ich dafür, dass sie mich immer unterstützt, gefördert und mir den Rücken gestärkt haben. Ganz besonders möchte ich auch meiner Tante Marianne Petersitzke für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für ihre großzügige Unterstützung danken.

Mein größter Dank gilt aber meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich auch bei meiner Promotion immer unterstützt und gefördert haben. Danke für Eure Liebe und Eure unermüdliche Unterstützung.

11. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist.

Ich habe die Dissertation selbständig angefertigt und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben. Es wurden keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen.

Folgende Personen haben mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt: PD Dr. habil. Martin Westermann, Dr. Walter Richter (Elektronenmikroskopisches Zentrum am Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität).

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen und Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Dissertation wurde noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht und die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung wurde nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den 26.09.07